

Agilent AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理と InstantPC キット

シンプルなワークフローによる
高速 FLD/MS グリカン分析



簡素化と標準化による生産性向上

N-結合型グリカンの位置と構造は、治療用タンパク質の薬理学で重要な役割を果たし、免疫原性や薬物動態、薬力学に影響を与える可能性があります。

Agilent AdvanceBio Gly-X (旧 ProZyme) は、溶液内ワークフローを簡素化する次世代の N-グリカン前処理プラットフォームです。Agilent InstantPC (旧 ProZyme) 色素や、真空プレートの効率的なクリーンアップステップと組み合わせ、余分な標識色素や変性剤を除去することで、UHPLC や LC/MS 用のサンプルの前処理が通常 60 分以内に完了します。

生産性向上を実現する要素

- UHPLC や LC/MS 用サンプルを 1 時間以内に前処理
- 5 分間の PNGase F 消化により、N-グリカンを偏りなく遊離
- 高い UHPLC-FLD および MS シグナルのための InstantPC 色素
- 室温で安定するシンプルな 96 ウェルクリーンアッププレート
- 高速・高分解能分析に対応
- 柔軟なサンプルスループットをサポートし、無駄がないモジュール形式

糖タンパク質 40 µg

変性 3 分間

N-グリカナーゼ消化 5 分間

グリカンの遊離

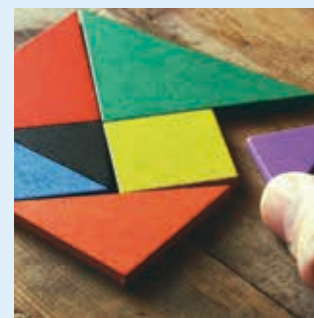
InstantPC ラベリング 1 分間

ラベル化グリカン

96 ウェルクリーンアッププレート

UHPLC、MS/MS

データ解析



糖鎖分析を加速する トータルソリューション

アジレントのバイオ医薬品向け製品群に ProZyme の製品とサービスが加わりました。今後は、糖鎖分析のあらゆるステップをサポートする機器および消耗品をすべてアジレントからご購入いただけます。サンプル前処理から始まり、確かな分析結果を得るまでの包括的なグリカン分析ワークフローをアジレントが実現します。これにより、お客様の求める信頼性と再現性に優れた結果を容易に得られるようになります。

詳しくはこちら:

www.agilent.com/chem/jp

脱グリコシル化

AdvanceBio Gly-X 技術

Gly-X N-グリカンの遊離とラベリングは 96 ウェルプレートの一ウェルで実行されます。独自の変性剤により N-グリカン部位の曝露が増進され、酵素による迅速な切断が実現し、5 分で N-グリカナーゼ (PNGase F) による Gly-X 脱グリコシル化が可能になります。

Gly-X は、高温条件下 (50 °C) でも、偏りなく PNGase F の活性を保ちます。Gly-X 変性試薬は室温で安定し、特別な取り扱いが必要なく、MS にも適しています。Gly-X では、大半のタンパク質の溶液内での酵素脱グリコシル化が、1 ウェルにつき 40 µg まで、5 分以内に完了します (図 1)。

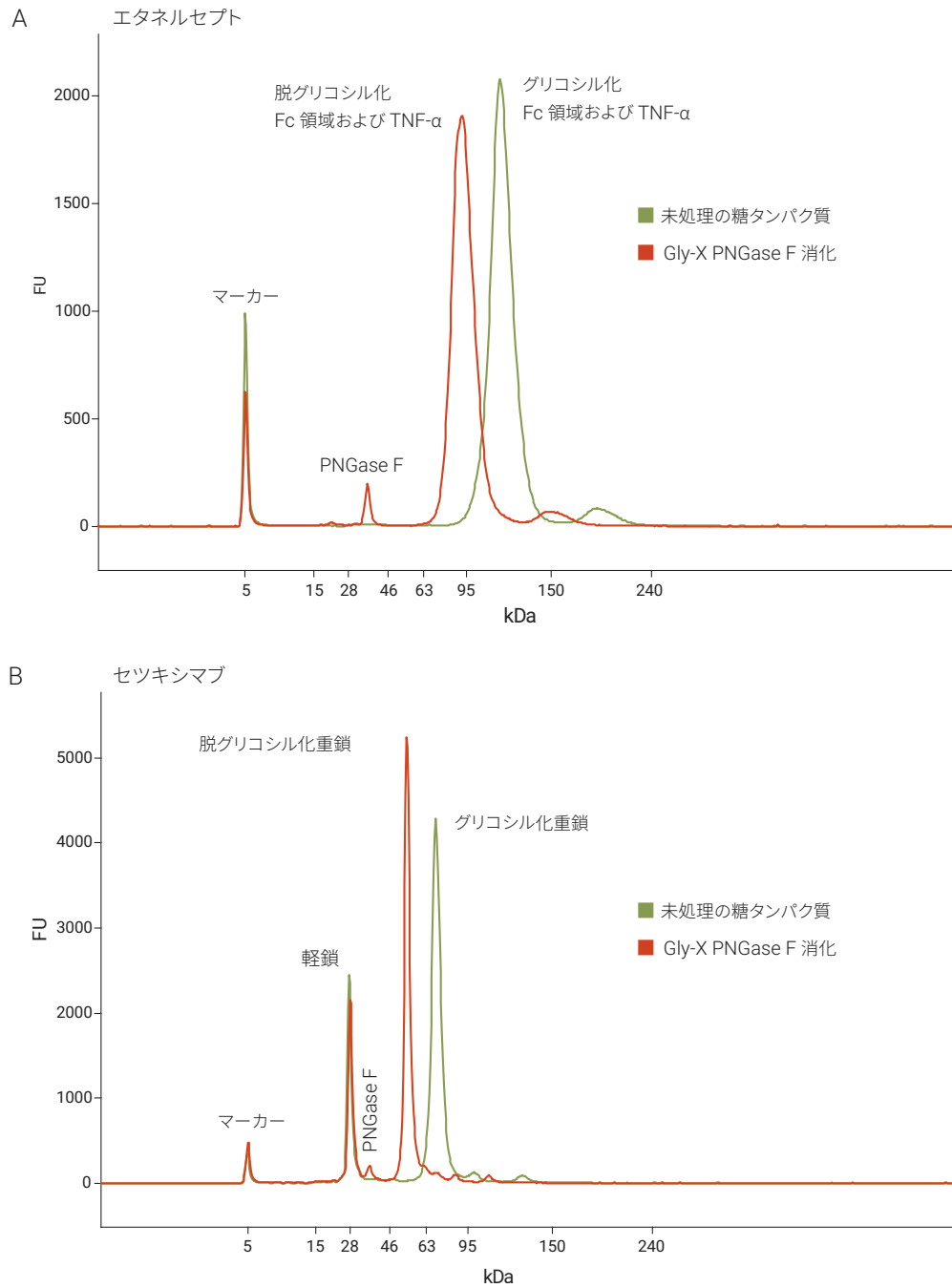


図 1: Agilent AdvanceBio Gly-X の酵素による脱グリコシル化の効率。エタネルセプト (A) は、N-結合型グリコシル化部位を IgG1 Fc 領域に 1 つ、TNF- α コンポーネントに 2 つ含みます。セツキシマブ (B) には、2 つの重鎖 N-グリコシル化部位 (Fc 領域に 1 つと Fab 領域に 1 つ) があります。Gly-X による脱グリコシル化では、ターゲットピークのリテンションタイムが、Agilent Bioanalyzer で検出されたとおりにシフトします。

ラベリング

N-グリカンの InstantPC ラベリング

Gly-X では、バッファ成分と変性剤が InstantPC 色素との互換性を持つため、PNGase F 消化の直後に、1 分間のラベリングステップが可能です。InstantPC 色素 (図 2) は、新しい N-グリカンインスタント標識色素の 1 つであり、MS と HILIC/FLD の感度を大幅に高めます。

プロカインの活性化された形態である InstantPC は、PNGase F 消化により遊離されたグリコシルアミンとの安定した尿素結合を形成し、ポジティブモードで高い MS シグナルを生成する 3 級アミンを含みます。InstantPC は、モノアイソトピック質量 261.14773 Da を還元末端に追加します。

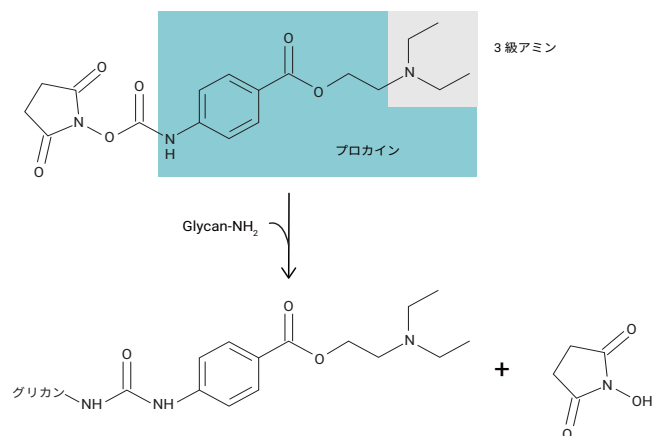


図 2: 新しいグリカン標識色素、Agilent InstantPC の構造

Agilent InstantPC とその他のグリカン標識色素の比較

グリカン分析でよく使われている標識色素は十分にイオン化されないため、低アバンダンスのグリカンの検出には、通常、蛍光分析を使わざるを得ません。InstantPC は、テストされたグリカン標識色素の中で LC/FLD シグナルが最も強くなっています (図 3A)。

次に蛍光分析に適した標識色素はプロカインアミドですが、その前処理で行われる還元的アミノ化ワークフローにはさらに長い時間がかかります。LC の高い FLD シグナルに加え、InstantPC には、ポジティブモードで高い MS シグナルを生成する 3 級アミンが含まれます (図 3B)。

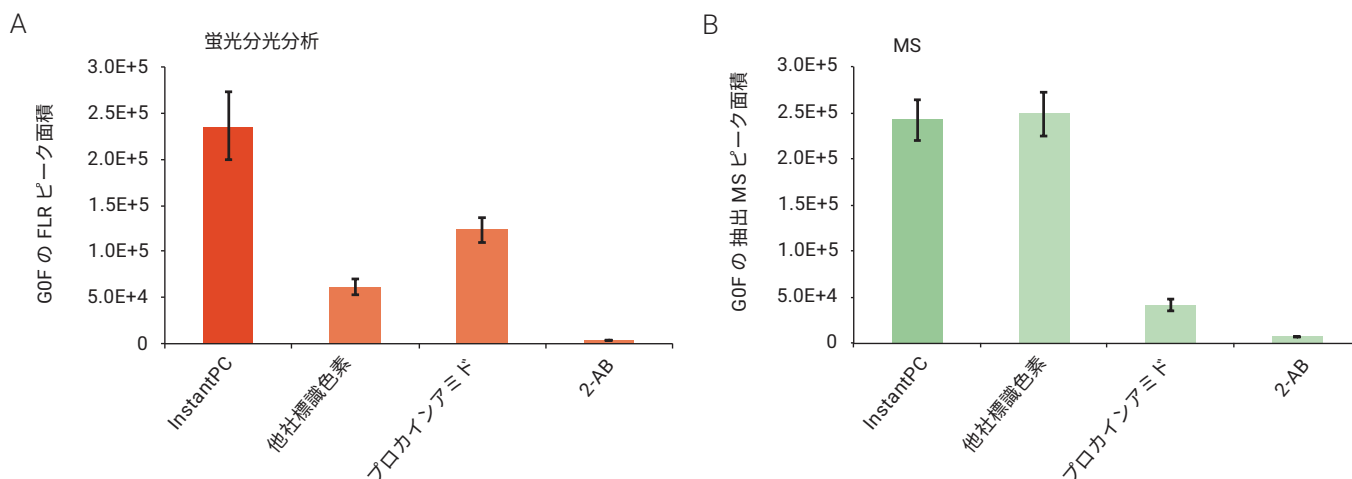


図 3: FLD (A) と MS (B) のレスポンスの比較。メーカーの指示に従って、同量の糖タンパク質サンプルから得られたグリカンに、Agilent InstantPC、他社標識色素、プロカインアミド、2-AB でラベリングし、UHPLC で測定しました。グラフの棒は、GOF N-グリカン種のピーク面積を表します。

クリーンアップ

Agilent InstantPC ラベル化 N-グリカンの クリーンアップ

Agilent AdvanceBio Gly-X のワークフローには、ラベル化グリカンから遊離色素と変性剤を除去するクリーンアップステップが含まれます。サンプルがロードされる 96 ウェルクリーンアッププレートは、ラベル化グリカンを取り込んでから、溶出溶媒の極性を変更して遊離できるために最適化されています。

一般的な真空ろ過マニホールドは、以下のすべてのステップで使用されます。

1. サンプルのロード
2. ロード/洗浄溶液を使った洗浄 (2x)
3. 160 mM ギ酸アンモニウム/10% アセトニトリル溶液による溶出

Gly-X クリーンアップでは、ラベル化グリカンの 95 % 超が保持されます (データの記載なし)。シアル酸付加されたグリカン種は、図 4 のように保持されます。このクリーンアップでは、遊離標識色素だけでなく、ラベル化グリカンの変性剤も除去されます。

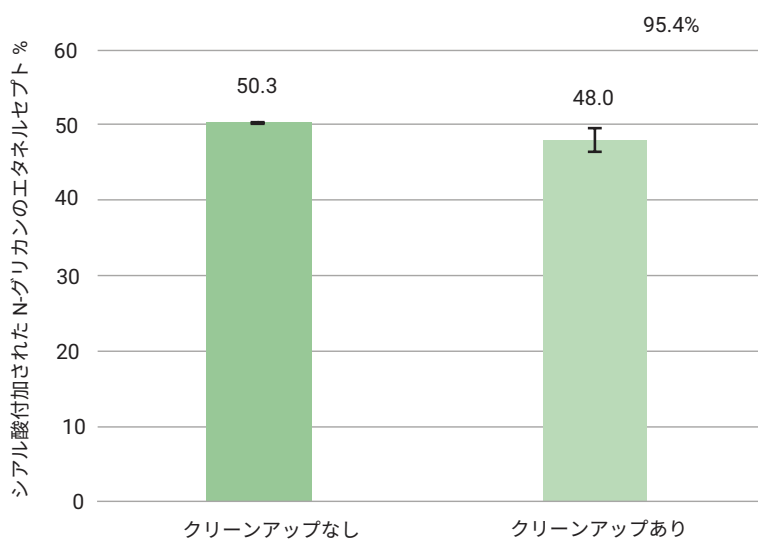


図 4: Agilent AdvanceBio Gly-X のクリーンアップ。Gly-X と Agilent InstantPC キットで前処理したグリカンについて、シアル酸付加されたエタネルセプト N-グリカンの相対 % 面積を、最終的なクリーンアップステップがある場合と、ない場合に分けて計算しました。

分析

Agilent InstantPC ラベル化 N-グリカンの HILIC/FLD プロファイル

エタネルセプト InstantPC N-グリカンの HILIC 溶出プロファイルを図 5 に示します。溶出順序は、2-AB など、他のグリカン標識色素に類似しています。グリカンプロファイルの複雑さに応じて、さまざまな長さの HILIC メソッドを使用できます。

図 5 は、60 分メソッドで分離したエタネルセプト N-グリカンを示しています。Gly-X クリーンアップにより、遊離色素の 99.97% 超が除去されるため、遊離色素のピークは最小限に抑えられます。Gly-X で前処理したサンプルから得られた相対 % ピーク面積データは、高い再現性を示しています (表 1)。

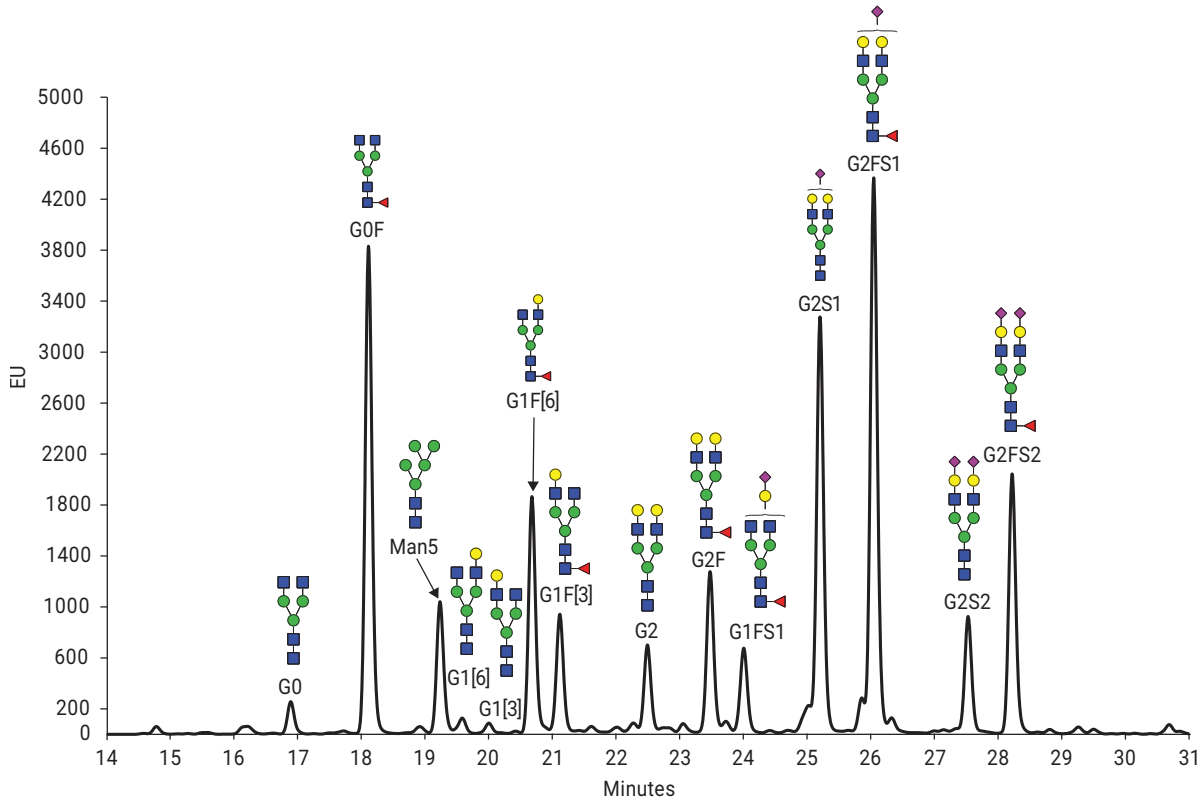


図 5: Gly-X と InstantPC キットを用いたエタネルセプト InstantPC-ラベル化 N-グリカンの HILIC/FLD プロファイル。60 分間のグラジエント。

表 1. エタネルセプト N-グリカン全ピーク面積に対し、面積が 2% を超えるピークと、その面積 CV (n=8)

グリカン	% 面積	% 面積 CV	グリカン	% 面積	% 面積 CV
G0F-N	19.8	2.1	G1F[3]	4.1	0.9
G0	4.7	1.5	G2F	13.7	2.5
G0F	9.4	1.5	G2FS1[3]	4.8	0.3
Man5	4.8	2.4	G2FS1[6]	20.3	0.9
G1[6]	2.5	2.4	G2FS2	10.7	2.2
G1F[6]	4.5	1.0			

仕様	Agilent AdvanceBio Gly-X および InstantPC
タンパク質のロード量	1 ~ 40* µg
脱グリコシル化の効率	大半のタンパク質で完了
標識色素	InstantPC FLD および MS 検出に対して最適
残留変性試薬	LC-MS (Q-TOF) で検出せず
グリカンの回収	>95%
遊離色素の除去	>99%
シアル酸付加された種の確保	>95%
精度 (ウェル間および日間)	主なグリカンのピーク面積 CV 5 %未満
総ワークフロー時間 (試薬の前処理を含む)	42 分 (16 サンプル)、 99 分 (96 サンプル)
オートサンブラでのサンプルの 安定性	最長 6 日間 (穿孔後はこの限りではありません)
サンプルの長期安定性	Gly-X Eluent、-20 °C で最高 30 日間
キットの構成	分析 1 回あたり 1 ~ 96 個のサンプルの 前処理に十分な量の試薬 クリーンアッププレートは再利用可能、 室温で保管可能

*グリコシル化の程度によっては、40 µg を超える糖タンパク質を使用できます。





























製品情報

説明	部品番号
AdvanceBio Gly-X および InstantPC キット (96-ct)	GX96-IPC
AdvanceBio Gly-X および InstantPC キット (24-ct)*	GX24-IPC
AdvanceBio Gly-X および InstantPC 脱グリコシル化およびラベリングモジュールセット (96-ct)	GX96-201PC
AdvanceBio Gly-X および InstantPC 脱グリコシル化およびラベリングモジュールセット (24-ct)	GX24-201PC
AdvanceBio Gly-X InstantPC ラベリングモジュール (96-ct)	GX96-101
AdvanceBio Gly-X InstantPC ラベリングモジュール (24-ct)	GX24-101
Gly-X InstantPC クリーンアップモジュール (96-ct)	GX96-102
AssayMAP PA50 Protein-A アフィニティ精製 キット (96-ct)	G5524-60010 KIT

* GX24-IPC には、96-ct のクリーンアッププレートが含まれます。クリーンアッププレートは室温で保存し、GX24-201PC のリフィルを注文してください。

製品情報

InstantPC ラベル化個別 グリカン標準

		部品番号
G0-N		GKPC-401
G0		GKPC-301
G0F-N		GKPC-402
G0F		GKPC-302
G1		GKPC-317
G1F		GKPC-316
G2		GKPC-304
G2F		GKPC-305
G1F + 1aGal		GKPC-403
G2F + 1aGal		GKPC-404
G2F + 2aGal		GKPC-318
G1S1 (α2,3)		GKPC-329
G1S1 (α2,6)		GKPC-319
G1FS1 (α2,3)		GKPC-330
G1S1 (α2,6)		GKPC-320
G2S1 (α2,3)		GKPC-321
G2S1 (α2,6)		GKPC-311
G2FS1 (α2,3)		GKPC-325
G2FS1 (α2,6)		GKPC-315
G2S2 (α2,3)		GKPC-322
G2S2 (α2,6)		GKPC-312
G2FS2 (α2,3)		GKPC-323
G2FS2 (α2,6)		GKPC-313
Man5		GKPC-103
Man6		GKPC-104
Man7		GKPC-105
Man8		GKPC-106
Man9		GKPC-107

InstantPC ラベル化 N-グリカンライブラリ

	部品番号
AdvanceBio ヒト IgG N-結合型 グリカンライブラリ	GKPC-005
グルコースホモポリマー	GKPC-503
CHO mAb N-結合型グリカンライブラリ	GKPC-020
CHO mAb N-結合型グリカンライブラリ + CHO mAb 糖タンパク質	GKPC-020-P
α(2-3) シアル化 3 本鎖糖鎖ライブラリ	GKPC-233
α(2-6) シアル化 3 本鎖ライブラリ	GKPC-263
α(2-3) シアル化 4 本鎖糖鎖ライブラリ	GKPC-234
α(2-6) シアル化 4 本鎖糖鎖ライブラリ	GKPC-264

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2019
Printed in Japan, June 07, 2019
5994-0918JAJP

