

Agilent AdvanceBio Gly-X グリカンサンプル前処理と InstantDye の自動化

AdvanceBio Gly-X キットによる自動サンプル前処理



Agilent AdvanceBio Gly-X で N-グリカンのサンプル前処理を自動化

自動化により、手作業の時間を短縮し、誤操作やデータのばらつきを低減できます。迅速な脱グリコシル化、ラベリング、クリーンアップなど、Agilent Gly-X グリカンサンプル前処理および InstantDye (旧 ProZyme) プロトコルの各手順は、96 ウェルプレートで実行します。これにより、大半の分注ワークステーションで Gly-X キットを直接使用できるようになります。変更は不要で、特別なキットコンポーネントやキットフォーマットも必要ありません。

Gly-X による N-グリカンのサンプル前処理は、手動での実行も、自動化ワークステーションでの実行も可能です。このため、スループットやワークフローのニーズに基づいて、柔軟かつ効率的にキットモジュールを使用できます。



糖タンパク質 40 µg

変性 3 分間

N-グリコナーゼ消化 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、LC/MS、CE

データ解析

生産性向上を実現する要素

- Gly-X キットは手動と自動の両方のメソッドをサポート
- 自動メソッドで得られるデータは手動ワークフローの場合と同じ
- メソッド間でキットモジュールを柔軟に使用可能
- LC/MS 用標識色素と CE 用標識色素の両方で実証済み



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

基本的なガイドライン

Gly-X による N-グリカンの脱グリコシル化と InstantDye ラベリングは 96 ウェルプレートで、クリーンアップは 96 ウェル真空プレートで実行されます。Gly-X キットを自動化する場合、自動プラットフォームでのピペティングには 4 ~ 400 μL の容量が必要です。プラットフォームには、バイアル、トラフ、96 ウェルプレートを設置する場所を確保する必要があります。また、96 ウェルプレートをデッキ上のステーション間で移動できるようにする必要があります。

Gly-X の脱グリコシル化とラベリングには、2 種類のインキュベーション温度 (50 °C と 90 °C) が必要です。これらは 96 ウェル PCR プレート上で実行します。これらの手順は通常、デッキ上にある 2 つのヒーターブロック、または 1 つのサーマルサイクラーで実施します。

Gly-X のクリーンアップは、96 ウェル真空プレートで実行しますが、これにはオンボード自動加圧式マニホールドを推奨します。オンボード真空マニホールドも使用できます。

ラベル化 N-グリカンは、クリーンアッププレートから PCR プレートに溶出されます。これにも加圧式マニホールドを用います。

自動化ワークフロー

自動化ワークフロー (図 1) ではまず、3 種類の試薬原液 (Gly-X 変性剤、N-グリカナーゼ、選択した InstantDye) の必要量をバイアルから 96 ウェル「ソース」プレートへ移します。試薬はそれぞれ、処理対象サンプルと同じ番号のウェルに移します。次に、糖タンパク質サンプルを、サンプルプレートから、試薬が入っているソースプレートのウェルに移し、混合して、サンプルプレートへ戻します。その後、サンプルプレートを指定された温度でインキュベーションします。

このようにして、すべてのインキュベーションをサンプルプレートで行います。サンプルプレートからソースプレートへサンプルを移してから、サンプルプレートへ戻すときには、マルチチャンネルピペットを使うことができます。

Gly-X 変性剤の添加後、サンプルを 90 °C で 3 分間インキュベーションします。N-グリカナーゼを入れた後、サンプルプレートを 50 °C で 5 分間インキュベーションします。脱グリコシル化に続いて、ラベリング試薬を添加し、50 °C で 1 分間インキュベーションします。その後、サンプルを Gly-X クリーンアッププレートに移し、Hamilton 社の Nimbus デッキで [MPE]2 加圧式モジュールを用いて、圧力勾配によって洗浄します。InstantPC ラベル化 N-グリカンの溶出バッファは、キットに含まれており、InstantQ ラベル化グリカンの溶出液は脱イオン水です。ラベル化 N-グリカンを、溶出液 100 μL で PCR プレートに溶出します。これで Agilent Gly-Q グリカン分析システム (旧 ProZyme) を使った LC/MS (InstantPC) または CE (InstantQ) による分析の前処理は完了です。

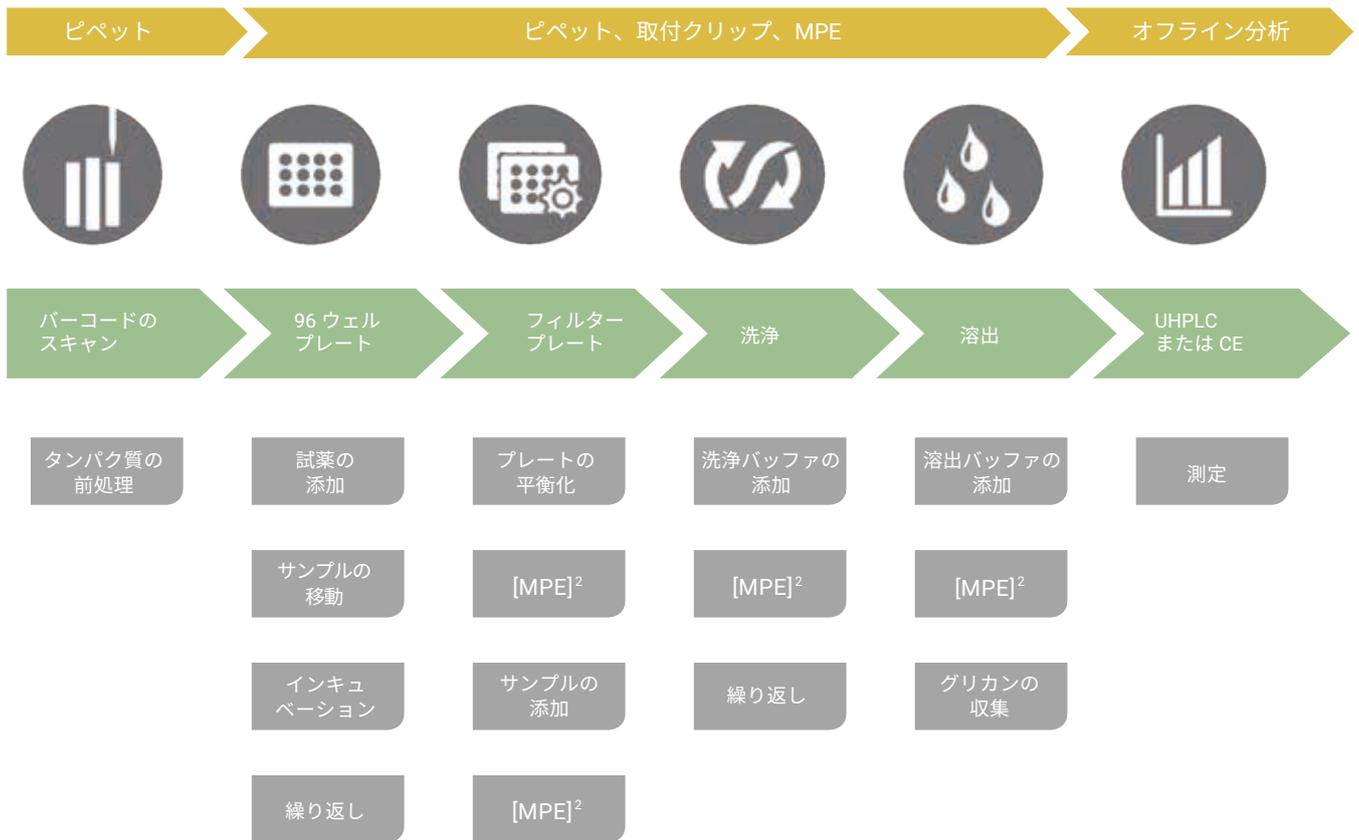


図 1: 自動化ソリューションの概要: Hamilton NIMBUS で Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep と InstantPC、InstantQ を用いたワークフロー

デッキの設定

消耗品とキットコンポーネントのロード

- チップ (50 μ L と 1000 μ L) のロード
- 試薬ソースプレートのロード:PCR プレート、セミスカート付
- Gly-X クリーンアッププレートスタックのロード
- Gly-X コレクションプレートまたはスカート付 PCR プレートのロード

キット試薬のロード

Gly-X 変性剤 -

0.5 mL バイアルに入れ、脱イオン水で 1:1 に希釈

- 試薬ブロックに配置

N-グリカナナーゼ希釈標準溶液 - キットの指示に従って、

消化緩衝液を使って準備し、混合液を 0.5 mL バイアルに入れ、

脱イオン水で 1:1 に希釈

- 試薬ブロックに配置

InstantDye - キットの指示に従って準備

- 0.5 mL バイアルに入れて試薬ブロックに配置

必要なバッファのロード

ロード/洗浄バッファ

- InstantPC では、100 mL のロード/洗浄バッファを準備し、デッキのトラフに配置

- InstantQ では、デッキのトラフにエタノールを配置

溶出試薬

- InstantPC では、キットで提供された Gly-X InstantPC 溶出液をデッキのトラフに添加

- InstantQ では、デッキのトラフに水を配置

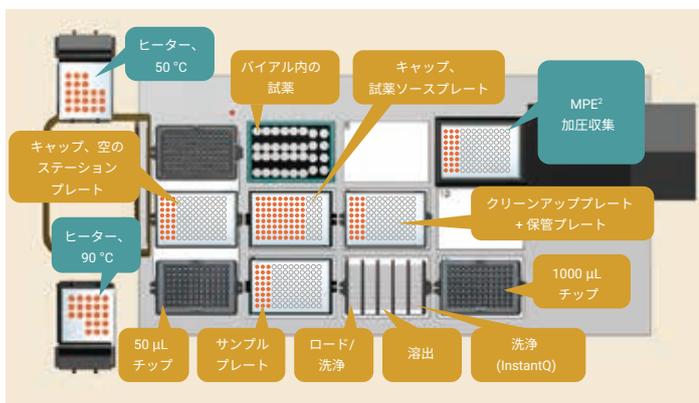


図 2: Hamilton NIMBUS デッキのレイアウト。プレート、バイアル、トラフ、ヒーター、MPE 加圧式マニホールドの位置

信頼性の高い結果

融合タンパク質エタネルセプトと水ブランクは、基盤の目状にサンプルプレートに配置され、ウェル間の再現性の検証およびクロスオーバーのテストが行われました。このテストは、InstantPC色素 (UHPLC による) と InstantQ 色素 (Gly-Q の CE による) の両方について実施しました。下の図は、自動化ソリューションプロトコルの開発中に使用したメソッドにかかわらず、類似するデータが得られることを示しています。

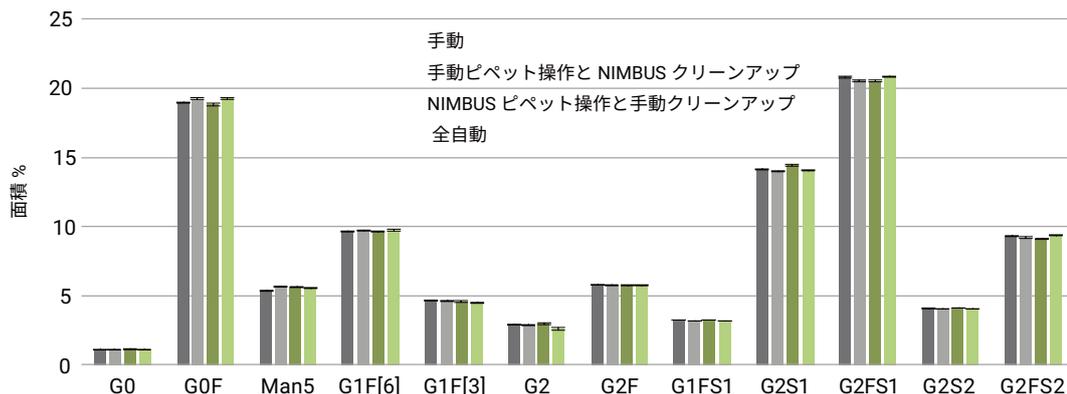


図 3: さまざまなメソッドで前処理されたエタネルセプトの InstantPC ラベル化 N-グリカン (n=8)

製品情報

AdvanceBio Gly-X および InstantPC

キットおよびモジュール

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
AdvanceBio Gly-X InstantPC クリーンアップモジュール、InstantPC 用 (96-ct)	GX96-102
AdvanceBio Gly-X 真空マニホールドスパーサ (2 パック)	GX100
AssayMAP PA50 Protein-A アフィニティ精製キット (96 ct)	G5524-60010 KIT

AdvanceBio Gly-X および InstantQ

キットおよびモジュール

説明	部品番号
AdvanceBio Gly-X および InstantQ キット (96 ct)	GX96-IQ
AdvanceBio Gly-X および InstantQ キット (24 ct)	GX24-IQ
AdvanceBio Gly-X および InstantQ 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)	GX96-302IQ
AdvanceBio Gly-X および InstantQ 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)	GX24-302IQ
AdvanceBio Gly-X InstantQ ラベリングモジュール (96-ct)	GX96-301
AdvanceBio Gly-X InstantQ ラベリングモジュール (24-ct)	GX24-301
AdvanceBio Gly-X InstantPC クリーンアップモジュール、InstantPC 用 (96-ct)	GX96-302
AdvanceBio Gly-X 真空マニホールドスパーサ (2 パック)	GX100
AssayMAP PA50 Protein-A アフィニティ精製キット (96 ct)	G5524-60010 KIT
Gly-Q カートリッジモジュール	GQ103
シアリダーゼ A	GK80040
シアリダーゼ S	GK80021

製品情報

AdvanceBio Gly-X および InstantPC

標準およびコントロール

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

標準およびコントロール

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 本鎖糖鎖ライブラリ	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

製品情報

AdvanceBio Gly-X および InstantQ

標準およびコントロール

InstantQ ラベル化個別 N-グリカン標準液		部品番号
G0-N		GKSQ-401
G0		GKSQ-301
G0F-N		GKSQ-402
G0F		GKSQ-302
G1		GKSQ-317
G1F		GKSQ-316
G2		GKSQ-304
G2F		GKSQ-305
G1F + 1aGal		GKSQ-403
G2F + 1aGal		GKSQ-404
G2F + 2aGal		GKSQ-318
A1 (α2,3)		GKSQ-321
A1 (α2,6)		GKSQ-311
A1F (α2,3)		GKSQ-325
A1F (α2,6)		GKSQ-315
A2 (α2,3)		GKSQ-322
A2 (α2,6)		GKSQ-312
A2F (α2,3)		GKSQ-323
A2F (α2,6)		GKSQ-313
A3 (α2,6)		GKSQ-314

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
5994-1003JAJP

AdvanceBio Gly-X および InstantQ

標準およびコントロール

InstantQ ラベル化個別 N-グリカン標準液		部品番号
Man5		GKSQ-103
Man6		GKSQ-104
Man7		GKSQ-105
Man8		GKSQ-106
Man9		GKSQ-107

InstantQ N-グリカンライブラリ

部品番号

ヒト IgG N-グリカンライブラリ	GKSQ-005
リボヌクレアーゼ B N-結合型グリカンライブラリ	GKSQ-009
CHO mAb N-結合型グリカンライブラリ	GKSQ-020
CHO mAb N-結合型グリカンライブラリ + CHO mAb 糖タンパク質	GKSQ-020-P
α(2-3) シアル化 3 本鎖糖鎖ライブラリ	GKSQ-233
α(2-3) シアル化 3 本鎖糖鎖ライブラリ	GKSQ-234
α(2-6) シアル化 3 本鎖糖鎖ライブラリ	GKSQ-263
α(2-6) シアル化 4 本鎖糖鎖ライブラリ	GKSQ-264

InstantQ ラダーおよび 泳動標準

部品番号

Gly-Q GU ラダー	GKSQ-503
Gly-Q 泳動標準 (上限および下限)	GKSQ-500
Gly-Q アライメント標準セット (GKSQ-500 & GKSQ-503)	GKSQ-505