

Agilent AdvanceBio Gly-X グリカンサンプル前処理と 2-AB Express 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



従来色素、高度なワークフロー

N-グリカンの特性解析は生物製剤の開発においてきわめて需要です。一般的に、酵素によって遊離されたグリカンは、タグで誘導体化され、LC/FLD および LC/MS での蛍光検出が可能になります。ラベル化 N-グリカンのサンプル前処理は多くの場合、完了までに何時間も、あるいは何日もかかります。

Agilent AdvanceBio Gly-X (旧 ProZyme) は、シンプルな溶液内ワークフローを実現する次世代 N-グリカン前処理プラットフォームです。N-グリカンは、N-グリカナナーゼによって 5 分以内に糖タンパク質から遊離されます。Agilent AdvanceBio InstantPC (旧 ProZyme) などの次世代蛍光色素と組み合わせると、サンプル前処理プロトコル全体を 1 時間未満で完了することができます。InstantPC が優れた蛍光信号および質量分析のための良好な特性を備え、低アバンダンスのグリカンを検出できるのに対し、2-AB (2-アミノベンズアミノ) 色素は 20 年以上の間 N-グリカンデータを生成するために使用され、多くのラボで使用方法が確立されています。

従来型の 2-AB ラベリングを用いた高速 Gly-X ワークフローという要求に応えるために、オンマトリックス Agilent AdvanceBio 2-AB Express (旧 ProZyme) ラベリングが開発されました。高速ラベル化によって、従来のワークフローにおける非常に時間のかかる乾燥ステップが不要になりました。Gly-X と 2-AB Express は、乾燥ステップのない従来の還元的アミノ化ラベリングを実現し、同時に効率的な真空プレートクリーンアップにより、余分な標識色素や変性剤を除去します。UHPLC 用のサンプルをわずか 2 時間で用意できます。

糖タンパク質 40 µg

変性 3 分間

N-グリカナナーゼ消化 5 分間

グリカンの遊離

1 時間の 2-AB Express ラベリング
(乾燥なし)

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

生産性向上を実現する要素

- 5 分の PNGase F による分解で、偏りのない N-グリカン遊離を実現
- 2-AB Express でのラベリングにより、乾燥ステップが不要になりプロトコルを短縮
- 確立された 2-AB ラベル化糖鎖の分析メソッドを用いることで、進行中の複数のプロジェクトでデータの継続性を確保
- モジュール式のため、柔軟なキット使用が可能



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



Trusted Answers

脱グリコシル化

Gly-X N-グリカンの高速遊離技術

Gly-X N-グリカンの遊離とラベリングが、96 ウェルプレートの一ウェル内で実行されます。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)。

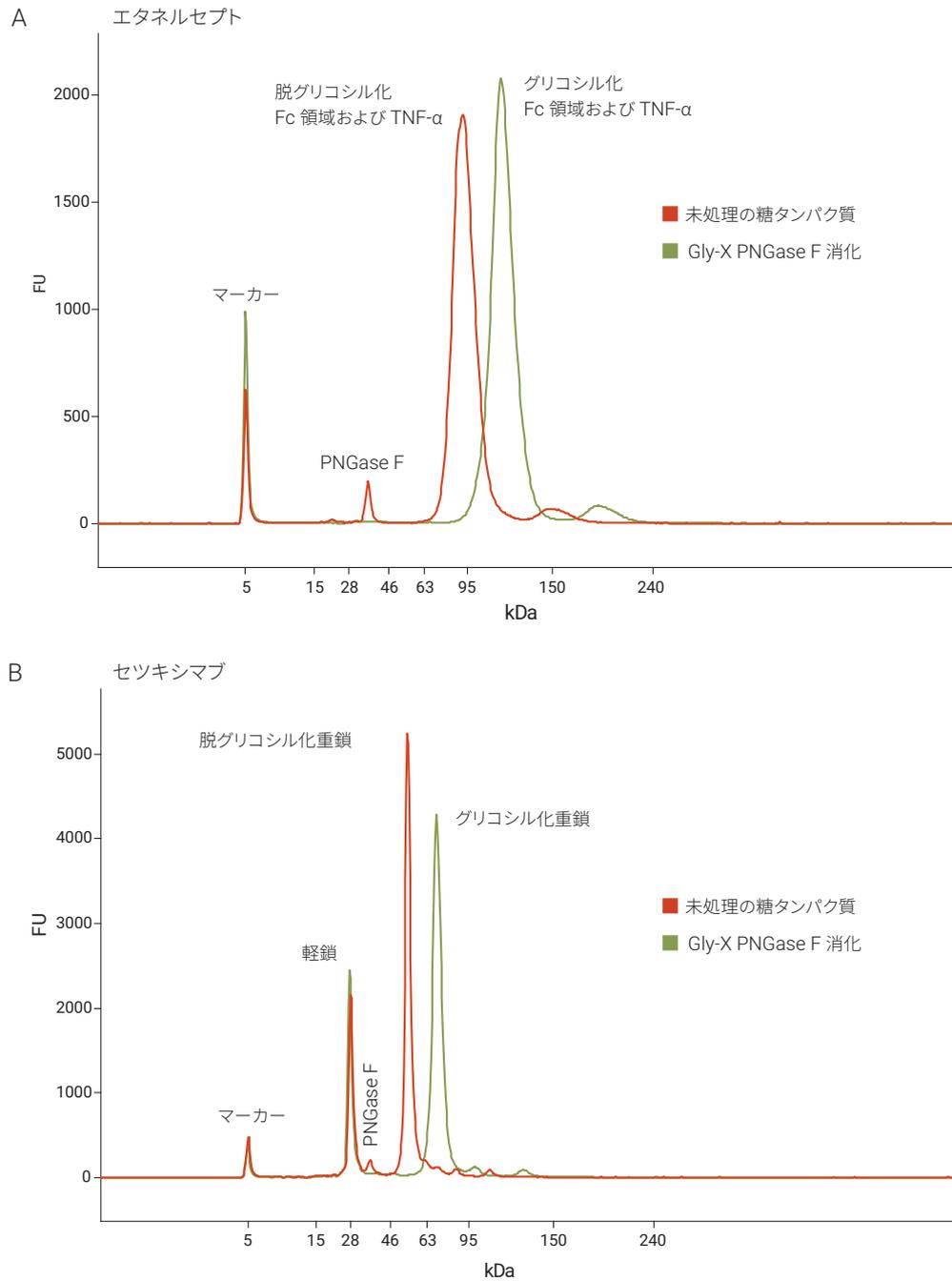


図 1: Agilent AdvanceBio Gly-X の酵素による脱グリコシル化の効率。エタネルセプト (A) は、N-結合型グリコシル化部位を IgG1 Fc 領域に 1 つ、TNF-α コンポーネントに 2 つ含みます。セツキシマブ (B) には、2 つの重鎖 N-グリコシル化部位 (Fc 領域に 1 つと Fab 領域に 1 つ) があります。Gly-X による脱グリコシル化では、グリコシル化ピークのリテンションタイムが、Agilent バイオアナライザで検出されたとおりにシフトします。

ラベリング

N-グリカンの高速ラベリング

遊離 N-グリカンの高速ラベリングは、 -NH_2 グリコシルアミン型から -OH 遊離還元末端型への溶液中での高速変換によって行われます。続いて、マトリックスにサンプルがロードされ、2-AB との還元的アミノ化反応によってオンマトリックスで N-グリカンがラベリングされます (図 2)。オンマトリックスラベリングのプロセスにより、サンプルの乾燥が不要となります。

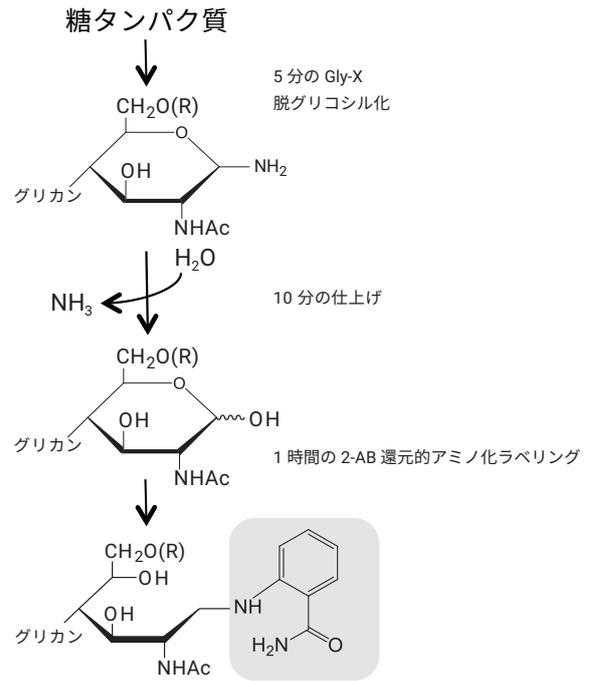


図 2: 2-AB Express による N-グリカンのラベリング

2-AB Express ラベル化 N-グリカンのクリーンアップ

ラベリング後、2-AB ラベル化グリカンは、マトリックスに結合している間に遊離色素が洗浄され、溶出溶媒の極性を変えることによって溶出されます。

次のすべてのステップで、96 ウェル真空ろ過マニホールドが使用されます。

- アセトニトリルを用いた 3 回の洗浄
- DI 水を用いた溶出

Gly-X 2-AB Express クリーンアップにより、80 ~ 90 % を超えるラベル化グリカンが保持され (データは示していません)、個々のグリカンについて偏りはありません (図 3)。また、図 4 に示すように、クリーンアップではシアル酸付加されたグリカン種も保持されています。

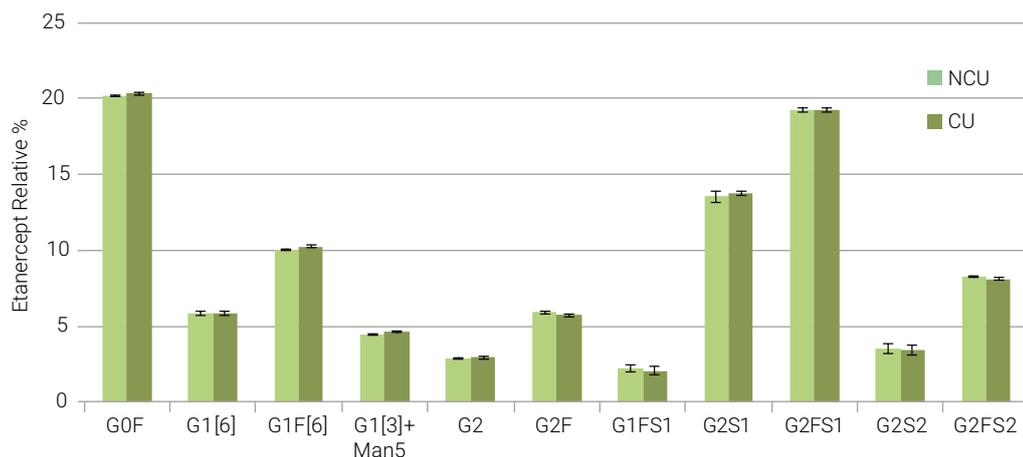


図 3: グリカンの回収率。クリーンアップした場合 (■) とクリーンアップなしの場合 (■) について、エタネルセプト N-グリカンを UHPLC で測定しました。N = 8 での個々のグリカン種の相対 % 面積において、データは偏りを示していません。

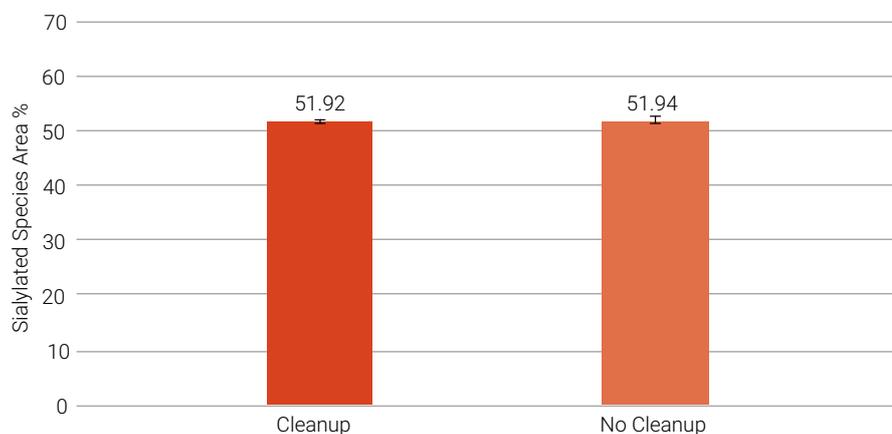


図 4: シアル酸付加種の保持。エタネルセプト N-グリカンが UHPLC で測定され、シアル酸付加種の合計面積についてクリーンアップがある場合 (■) とない場合 (■) で比較しました。グラフから、シアル酸付加グリカンの損失がないことがわかります。

分析

2-AB Express ラベル化 N-グリカンの HILIC-FLD プロファイル

図 5 に、エタネルセプト 2-AB N-グリカンの HILIC 溶出プロファイルを示します。溶出の順序は、InstantAB および InstantPC などの他のラベル化グリカンと類似しています (データは示していません)。

グリカンプロファイルの複雑さによって、HILIC メソッドの時間を変えることができます。図 5 に、60 分メソッドで分離されたエタネルセプト N-グリカンを示します。Gly-X クリーンアップによって 99.97% を超える遊離色素が除去されるため、遊離色素のピークは最小です (データは示していません)。

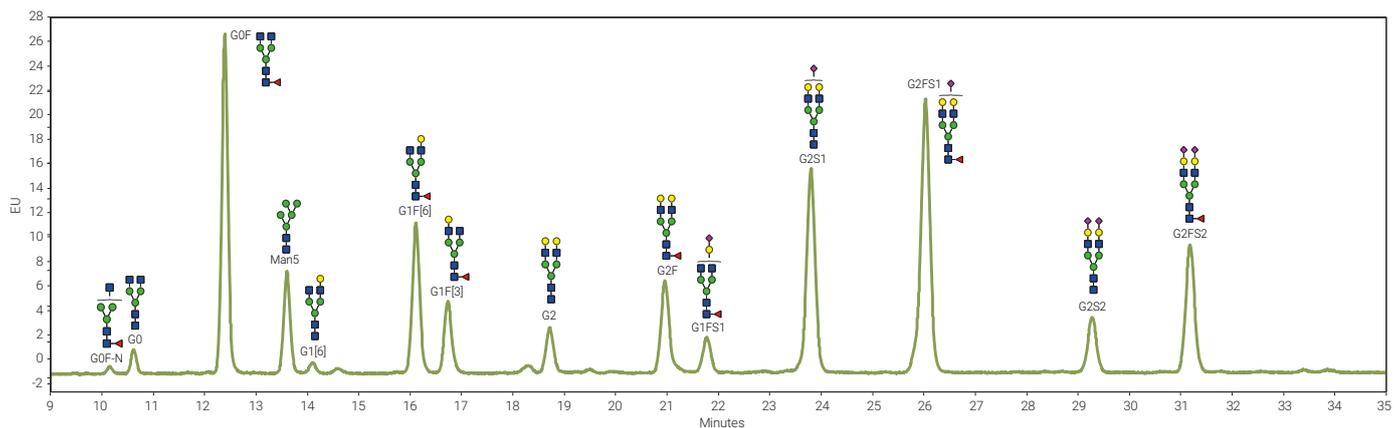


図 5: Agilent AdvanceBio Gly-X および 2-AB Express Labeling キットを用いたエタネルセプト 2-AB ラベル化 N-グリカンの HILIC-FLD プロファイル。60 分間グラジエント。

仕様	Gly-X および 2-AB Express
タンパク質のロード範囲	1 ~ 40 µg (タンパク質のグリコシル化によってはこれ以上)
脱グリコシル化効率	大半のタンパク質で > 99 %
グリカン回収率	> 80 %
遊離色素の除去	> 99 %
シアル酸付加種の保持	> 99 %
精度 (ウェル間、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	130 分 (24 サンプル)
サンプル安定性	-20 °C で最小 6 か月、4 ~ 8 °C で 5 日

製品情報

説明	部品番号
Gly-X および 2-AB Express キット (96 ct)	GX96-2AB
Gly-X および 2-AB Express キット (24 ct)	GX24-2AB
Gly-X および 2-AB Express 脱グリコシル化とラベリングモジュールセット (96 ct)	GX96-401AB
Gly-X および 2-AB Express 脱グリコシル化とラベリングモジュールセット (24 ct)	GX24-401AB
Gly-X 2-AB Express ラベリングモジュール (96 ct)	GX96-401
Gly-X 2-AB Express ラベリングモジュール (24 ct)	GX24-401
2-AB Express 用 Gly-X クリーンアップモジュール (96 ct)	GX96-402
Gly-X 2-AB Express スタータキット (Gly-X 真空マニホールドスペーサ、 および 2 個のヒーターブロックのふた)	GX400
AssayMAP PA50 Protein-A アフィニティ 精製キット (96 ct)	G5524-60010 KIT

2-AB ラベル化 N-グリカンライブラリ

	部品番号
ヒト IgG N-結合型グリカンライブラリ	GKSB-005
2antennary + 高マンノース 分割ライブラリ	GKSB-520
ヒト α1-酸性糖タンパク質 N-結合型グリカンライブラリ	GKSB-001
ウシフェチュイン N-結合型グリカン ライブラリ	GKSB-002
グルコースホモポリマー標準	GKSB-503
α(2-3) シアル化 2 本鎖糖鎖 ライブラリ	GKSB-232
α(2-6) シアル化 2 本鎖糖鎖 ライブラリ	GKSB-262
α(2-3) シアル化 3 本鎖糖鎖 ライブラリ	GKSB-233
α(2-6) シアル化 3 本鎖糖鎖 ライブラリ	GKSB-263
α(2-3) シアル化 4 本鎖糖鎖 ライブラリ	GKSB-234
α(2-6) シアル化 4 本鎖糖鎖 ライブラリ	GKSB-264

製品情報

2-AB ラベル化個別 グリカン標準

		部品番号
G0-N		GKSB-401
G0		GKSB-301
G0F-N		GKSB-402
G0F		GKSB-302
G0FB		GKSB-303
G1		GKSB-317
G1F		GKSB-316
G2		GKSB-304
G2F		GKSB-305
G2FB		GKSB-306
G2F w/1 α-gal		GKSB-318
G2S1 α(2,6)		GKSB-311
G2FS1 α(2,6)		GKSB-315
G2S2 α(2,6)		GKSB-312
G2FS2 α(2,6)		GKSB-313
A3		GKSB-307
G3		GKSB-308
G3S3 α(2,6)		GKSB-314

2-AB ラベル化個別 グリカン標準

		部品番号
A4		GKSB-309
G4		GKSB-310
HYBR		GKSB-111
NN		GKSB-100
Man3		GKSB-101
Man3F		GKSB-102
Man5		GKSB-103
Man6		GKSB-104
Man7		GKSB-105
Man8		GKSB-106
Man9		GKSB-107
GalGalNAc		GKSB-201
3'-SLN		GKSB-203
6'-SLN		GKSB-204

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
5994-1004JAJP

