

# AdvanceBio Gly-X InstantPC

## サンプル前処理と LC/FLD/MS を用いた 生物製剤の糖タンパク質の N-グリカン分析

### 簡素化と標準化による N-グリカン分析の生産性の向上

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 は次世代の N-グリカンサンプル前処理プラットフォームです<sup>1</sup>。迅速なグリカンラベリング用の InstantPC 色素、蛍光検出 (FLD) と質量分析 (MS) のための高いシグナル、余分なラベル色素や変性剤を除去する効率的な真空プレートクリーンアップステップにより、溶液内ワークフローを簡素化します。AdvanceBio Glycan マッピングカラムを使用すると、ラベル化 N-グリカンサンプルの UHPLC/FLD/MS の前処理が 60 分以内に完了し、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) や、その後の相対的な定量を実施できます。また、N-グリカン分離のキャリブレーションや、N-グリカン種の同定用に、幅広い InstantPC ラベル化 N-グリカン標準が用意されています。

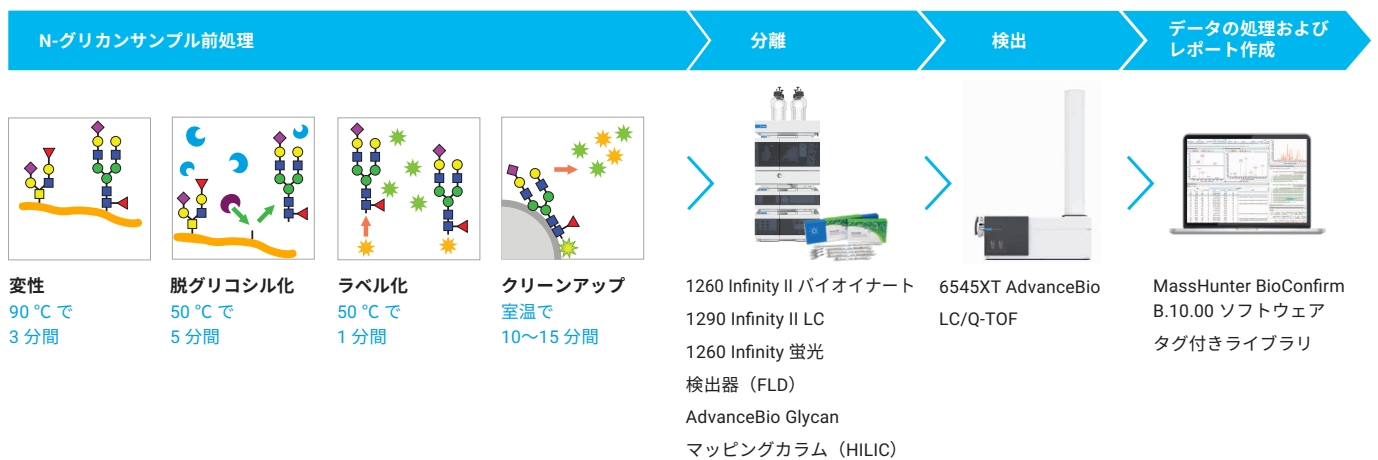


図 1. Gly-X InstantPC サンプル前処理と LC/FLD/MS を用いた遊離 N-グリカン分析のワークフロー

## アジレントが設計・作成した包括的な N-グリカン分析ワークフローソリューション

このガイドでは、InstantPC N-グリカン分析を開始する際に必要になる消耗品について説明します。多数の消耗品を試験した結果を、アプリケーションノート [5994-1348JAJP](#) で報告しました。<sup>2</sup> この研究では、リツキシマブ（リツキサン、モノクローナル抗体：mAb）とエタネルセプト（エンブレル、Fc 融合タンパク質）の N-グリカンを評価し、InstantPC ラベル化 N-グリカン分析は、2-AB グリカンと比較して蛍光シグナルが大幅に高く、MS イオン化効率に優れており、低アバンドンスのグリカン種の検出が可能であることを実証しました。

この Gly-X InstantPC N-グリカン分析ワークフローガイドには、次の製品情報が含まれています。

- サンプル前処理キット - Gly-X InstantPC は、LC/FLD の強い蛍光シグナルと MS 分析のイオン化向上を目的として特別に開発され、最適化されています。
- InstantPC ラベル化 N-グリカン標準品 - 十分に特性解析された個別の標準品とライブラリは、生物製剤薬品の安全性と有効性に影響を与える可能性のある N-グリカン種のプロファイリングにおいて、重要な役割を果たします。
- グリカン分離用の HILIC カラム
- 溶媒と試薬
- パイアルとキャップ
- データ解析とレポート作成

## N-グリカン分析の生産性向上を実現する要素

- LC/FLD 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 LC/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・高分離能分析に対応
- 柔軟なサンプルスリーブットをサポートし、無駄がないモジュール形式

図 2 に、Gly-X InstantPC で前処理したリツキシマブとエタネルセプトの遊離 N-グリカンの HILIC/FLD データの例を示します。N-グリカン構造割り当ての MS データなどの詳細については、アプリケーションノート [5994-1348JAJP](#) に記載されています。

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

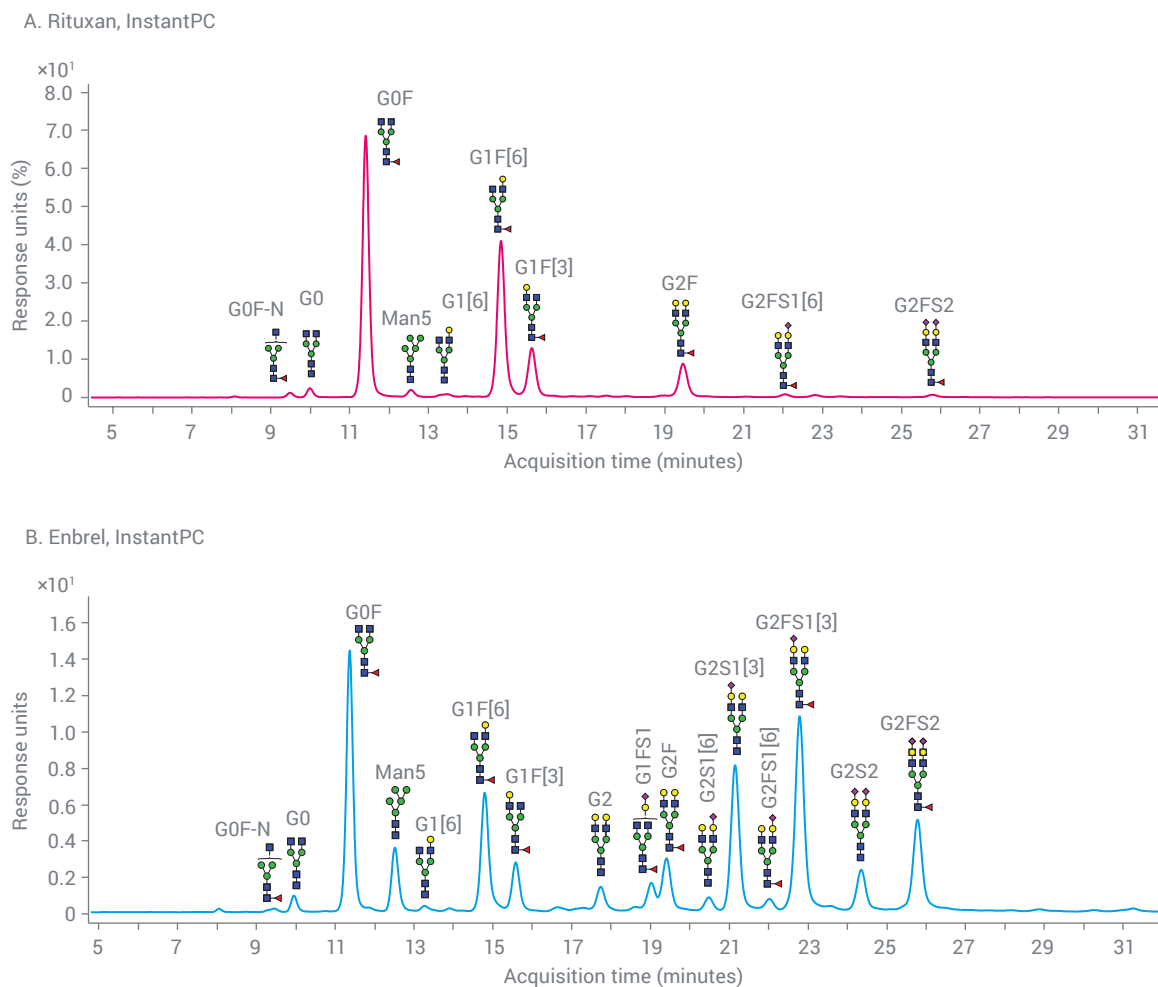


図 2. InstantPC でラベル化された A) リツキサンおよび B) エンブレル N-グリカンの HILIC-UHPLC 蛍光プロファイル。N-グリカンの相対面積 (%) を表 1 と 2 に示します (n = 4)。データはアプリケーションノート [5994-1348\\_JAJP](https://www.agilent.com/chem/5994-1348_JAJP) に記載されています。UHPLC 条件および Q-TOF パラメータを表 3 と 4 に示します。

表 1. InstantPC でラベル化されたリツキサン N-グリカンの相対面積、標準偏差、および CV 値 (n = 4)

	平均相対面積 (%)	標準偏差	%CV
G0F-N	0.75	0.01	1.55
G0	1.47	0.02	1.18
G0F	46.82	0.07	0.15
Man5	1.21	0.01	0.83
G1[6]	0.75	0.02	2.67
G1F[6]	31.21	0.11	0.35
G1F[3]	9.27	0.05	0.54
G2F	7.04	0.04	0.51
G2FS1[6]	0.67	0.02	2.29
G2FS1[3]	0.37	0.06	15.98
G2FS2	0.45	0.03	6.67

表 2. InstantPC でラベル化されたリツキサン N-グリカンの相対面積 (%)、標準偏差、および %CV 値 (n = 4)

	平均相対面積 (%)	標準偏差	%CV
G0	1.10	0.02	2.09
G0F	19.36	0.16	0.84
Man5	5.08	0.03	0.52
G1[6]	0.48	0.00	0.00
G1F[6]	10.48	0.04	0.39
G1F[3]	3.97	0.01	0.25
G2	2.08	0.01	0.55
G1FS1	1.84	0.05	2.49
G2F	4.26	0.09	1.99
G2S1[6]	1.18	0.01	0.49
G2S1[3]	13.91	0.04	0.31
G2FS1[6]	0.89	0.00	0.00
G2FS1[3]	20.54	0.08	0.37
G2S2	4.26	0.01	0.14
G2FS2	10.54	0.08	0.78

表 3. InstantPC ラベル化 N-グリカンの LC/FLD 分析条件

パラメータ	設定値		
カラム	Agilent AdvanceBio Glycan マッピング、2.1 × 150 mm、1.8 μm (p/n 859700-913)		
カラム温度	40 °C		
移動相	A) 50 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.5 B) アセトニトリル		
グラジエントプログラム	InstantPC ラベル化 N-グリカン		
	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)
	0	80	0.5
	2	75	0.5
	48	62	0.5
	49	40	0.5
	51.5	80	0.5
52	80	0.5	
60	80	0.5	
注入量	1 μL (0.4 μg タンパク質からのグリカンに相当する量)		
蛍光検出	Agilent 1260 Infinity II FLD InstantPC : λEx 285 nm、λEm 345 nm		

### Gly-X InstantPC の使用開始

#### 糖タンパク質サンプル前処理の注意事項

糖タンパク質サンプルは、低塩濃度の中性緩衝液中に、界面活性剤やアミンのような求核試薬がない状態で、最大 2 mg/mL に調製する必要があります。サンプルが高濃度の場合は、水または 50 mM HEPES (pH 7.9) で希釈する必要があります。

- 最大濃度：2 mg/mL
- 反応ごとのタンパク質の最大量：40 μg (例えば各 2 mg/mL 溶液を 2 μL)。mAb にはさらに多くのタンパク質を使用できますが (最大 100 μg)、データの直線性を評価する必要があります。
- 緩衝液：界面活性剤やアミンなどの求核試薬を含まない低塩濃度 (約 150 mM) の中性緩衝液。サンプルを水または 50 mM HEPES (pH 7.9) で希釈することができます。

その他の注意事項：

- アミン緩衝液 (例えば、トリス、アルギニン、グリシン、ヒスチジン) 中のサンプルの成分は、バッファー交換ステップを実施してから脱グリコシル化する必要があります。10 kDa 分子量カットオフスピン遠心分離フィルタを推奨します。
- サンプルをプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーで前処理する場合は、溶出液として 0.1% ギ酸を使用する必要があります。
- PBS は推奨しません。
- 詳細については、Gly-X InstantPC のマニュアルをご覧ください。<sup>5</sup>

表 4. InstantPC ラベル化 N-グリカン分析の質量分析パラメータ

Agilent 6545XT Q-TOF	
イオン源	デュアル AJS ESI
ガス温度	150 °C
ドライガス流量	9 L/min
ネプライザ	35 psi
シースガス温度	300 °C
シースガス流量	10 L/min
Vcap	3,000 V
ノズル電圧	500 V
フラグメンタ	120 V
スキマ電圧	65 V
質量範囲	m/z 600 ~ 3,000
スキャン速度	1 スペクトル/秒
取り込みモード	高分解能 (4 GHz)

### インキュベーションおよびクリーンアップ用ハードウェア

Gly-X InstantPC のサンプル前処理では、タンパク質変性の際にサンプルを 90 °C まで加熱し、PNGase F 消化と InstantPC ラベリングの際に 50 °C まで加熱します。提供される 96 ウェルプレートでサンプルを加熱する際には、サーマルサイクラーまたは乾燥ブロックヒーターの使用を推奨します。推奨製品を下に示します。クリーンアッププロセスは、吸引濾過をすることで促進できます。推奨の Millipore モデル以外の真空マニホールドおよびポンプの使用をご希望の場合は、アジレントにお問い合わせください。

加熱および吸引濾過用ハードウェア (他社製)	部品番号
96 ウェルサーマルサイクラー (Corning)	THERM-1001、110V THERM-1000、230V
乾燥ブロックヒーター、4 ブロック、HB4DG、US (2 個) (Troemner)	HB4DG
モジュール型加熱ブロック (2 個) (VWR)	VWR 13259-260
真空マニホールド (Millipore)	MSVMHTS00
真空ポンプ (Millipore)	WP6211560、110 V WP6122050、220V

## HILIC 分離のベストプラクティス

HILIC 分離では、1 µL の少量のラベル化グリカンを注入することが最も有効です。水性の注入量が > 1 µL になると、ピーク形状と分離能が損なわれます。注入量 > 1 µL の有機溶媒によるサンプル希釈の手順については、Gly-X InstantPC のユーザーマニュアル [5994-1231EN](#) の 14 ページをご覧ください。

HPLC システムを最適化して、デッドボリュームを最小限に抑える必要があります。最大動作圧の 80 % 以下で使用すると、より長寿命でカラムを使うことができます。

代表的な動作温度は 40 °C です。これより高い温度でも使用できますが、カラム寿命が短くなります。

## グリカン標準品

アジレントは、InstantPC でラベル化された遊離 N-グリカン標準品およびライブラリを幅広く提供しています。これらの製品により、遊離グリカンの分析に使用する LC/FLD/MS システムをキャリブレーションできます。ラベル化 N-グリカン標準品の詳細なリストについては、グリカン標準品のテクニカルリーフレット [5994-2202EN](#) をご覧ください。グリカン標準品は、グリカン異性体と不分離ピークの同定において重要です。共溶出の可能性があるのは、G0F/Man5、Man5/G1、G1FS1/G2F などです。

## 標準品、カラム、消耗品などの情報

下の表に記載されている製品をアジレントオンラインストアから注文するには、MyList # ヘッダーリンクをクリックして、製品を [お気に入りの製品] リストに追加します。次に、必要な製品の数量を入力してカートに追加し、レジに進みます。リストは [お気に入りの製品] に残り、将来のご注文の際にご使用いただけます。

[お気に入りの製品] を初めてご使用になる場合は、アカウント確認のために電子メールアドレスの入力が求められます。すでにアジレントのアカウントをお持ちの場合は、ログインできます。アジレントのアカウントをお持ちでない場合は、ご登録が必要になります。この機能は、e-コマースが有効である地域でのみご利用いただけます。すべての商品は、通常のアジレント営業所や販売店から注文できます。

表：1 5994-1348JAJP で使用されている Gly-X InstantPC N-グリカンサンプル前処理、AdvanceBio Glycan マッピング HILIC カラム、溶媒、およびサンプル容器

品名	部品番号
<b>サンプル前処理</b>	
AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットおよび InstantPC キット、96-ct	GX96-IPC
AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットおよび InstantPC キット、24-ct*	GX24-IPC*
Gly-X 真空マニホールドスパーサ	GX100
<b>HILIC カラム</b>	
AdvanceBio Glycan マッピング 300 Å, 2.1 x 150 mm, 1.8 µm	859700-913
<b>試薬</b>	
InfinityLab UltraPure LC/MS 用アセトニトリル (1 L)	5191-4496
MS ソリューション、ギ酸、10 mL	US-700002341
InfinityLab UltraPure LC/MS 用純水	5191-4498
<b>バイアルとキャップ**</b>	
スクリュートップバイアル、250 µL、100 個	5190-2242
キャップ、スナップ、青、PTFE/シリコンセプタム、100 個 キャップサイズ：11 mm	5182-0541

\* 24-ct キット (GX24-IPC) には、96 ウェル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管し、Gly-X InstantPC 脱グリコシル化およびラベリングモジュールの 24-ct リフィアル (GX24-201PC) を注文してください。

\*\*InstantPC ラベル化グリカンは 96 ウェルプレートに溶出します。サンプルはプレートから直接 LC に注入するか、またはサンプルバイアルに移します。

表：2 Gly-X InstantPC N-グリカンサンプル前処理キットとモジュールの追加の構成

品名	部品番号
AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットおよび InstantPC キット、96-ct	GX96-IPC
AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットおよび InstantPC キット、24-ct	GX24-IPC
AdvanceBio Gly-X 脱グリコシル化モジュール、24-ct	GX24-100
AdvanceBio Gly-X InstantPC ラベリングモジュール、24-ct	GX24-101
AdvanceBio Gly-X 脱グリコシル化モジュール、96-ct	GX96-100
AdvanceBio Gly-X InstantPC ラベリングモジュール、96-ct	GX96-101
AdvanceBio Gly-X InstantPC クリーンアップモジュール、96-ct	GX96-102
AdvanceBio Gly-X 脱グリコシル化および InstantPC ラベリングモジュールセット、24-ct	GX24-201PC
AdvanceBio Gly-X 脱グリコシル化および InstantPC ラベリングモジュールセット、96-ct	GX96-201PC
Gly-X 真空マニホールドスパーサ	GX100

### グリカン標準品

アジレントのラベル化 N-グリカン標準品の詳細なリストについては、グリカン標準品テクニカルリーフレット [5994-2202EN](#) をご覧ください。

表：3 リツキシマブ中に存在する InstantPC ラベル化 N-グリカン標準品。<sup>2</sup>これらの標準品は N-グリカン分離でコントロールとして使用し、不分離ピークを区別できます。

表 3 (リツキシマブで検出された N-グリカン)

品名	CFG 構造	部品番号
G0F-N / FA1		GKPC-402
G0 / A2		GKPC-301
G0F / FA2		GKPC-302
Man5 / M5		GKPC-103
G1 / A2G1		GKPC-317
G1F / FA2G1		GKPC-316
G2F / FA2G2		GKPC-305
G2FS1 α(2,3) / FA2G2S(3)1		GKPC-325
G2FS2 α(2,3) / FA2G2S(3)2		GKPC-323

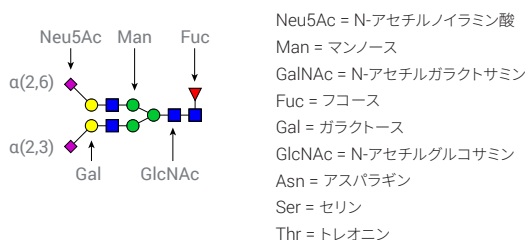


図 3. グリカンの模式図は、CFG (Consortium for Functional Glycomics) <sup>®</sup> の推奨に従い、GlycoWorkbench 2.14.10 を使用して描きました。

表：4 エタネルセプト中に存在する InstantPC ラベル化 N-グリカン標準品。<sup>2</sup>これらの標準品は N-グリカン分離でコントロールとして使用し、不分離ピークを区別できます。

表 4 (エンブレレで検出された N-グリカン)

品名	CFG 構造	部品番号
G0F-N / FA1		GKPC-402
G0 / A2		GKPC-301
G0F / FA2		GKPC-302
Man5 / M5		GKPC-103
G1 / A2G1		GKPC-317
G1F / FA2G1		GKPC-316
G2 / A2G2		GKPC-304
G1FS1 α(2,3) / FA2G1S(3)1		GKPC-330
G2F / FA2G2		GKPC-305
G2S1 α(2,3) / A2G2S(3)1		GKPC-321
G2FS1 α(2,3) / FA2G2S(3)1		GKPC-325
G2S2 α(2,3) / A2G2S(3)2		GKPC-322
G2FS2 α(2,3) / FA2G2S(3)2		GKPC-323

表：5 AdvanceBio InstantPC ラベル化高マンノース型 N-グリカン標準品

品名	CFG 構造	部品番号
Man5 / M5		GKPC-103
Man6 / M6		GKPC-104
Man7 / M7		GKPC-105
Man8 / M8		GKPC-106
Man9 / M9		GKPC-107

表：6 シアル化糖タンパク質の研究用の InstantPC ラベル化 3 本鎖および 4 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ。グリカンの構造は分析証明書に記載されています。

品名	部品番号
InstantPC α(2,3) シアル化 3 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKPC-233
InstantPC α(2,6) シアル化 3 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKPC-263
InstantPC α(2,3) シアル化 4 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKPC-234
InstantPC α(2,6) シアル化 4 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKPC-264

表：7 N-グリカンライブラリとコントロール糖タンパク質。グリカンの構造は分析証明書に記載されています。

品名	部品番号
ヒト IgG N-グリカンライブラリ: InstantPC でラベル化された、複数のバイセクティング GlcNAc N-グリカンなどの通常のヒト IgG の N-グリカンと一致する複雑な 2 本鎖糖鎖オリゴ糖で構成されています。	GKPC-005
CHO mAb N-グリカンライブラリ: 多数の CHO 由来モノクローナル抗体 (mAb) 中に存在する、InstantPC でラベル化された複雑な中性フコシル化 2 本鎖糖鎖 N-グリカンおよび高マンノース型 N-グリカン Man5 で構成されています。	GKPC-020
CHO mAb N-グリカンライブラリ + CHO mAb 糖タンパク質: 多数の CHO 由来治療用糖タンパク質中に存在する複雑な 2 本鎖糖鎖および高マンノース型 N-グリカンで構成されています。ライブラリの元になる糖タンパク質は、サンプル前処理の含有物中にコントロールとして含まれています。	GKPC-020-P
AdvanceBio InstantPC マルトデキストリンラダー: グルコース単位 (GU) 値を生成するためのラダー標準品として使用します <sup>7</sup> 。	GKPC-503
Agilent-NISTmAb*, 25 μL	5191-5744
Agilent-NISTmAb*, 4 x 25 μL	5191-5745

\* NISTmAb の InstantPC N-グリカンの詳細は、アジレントのアプリケーションノート [5991-8071 JAJP](#) に記載されています。

表：8 親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) 分析に利用する AdvanceBio Glycan マッピングカラム: 高い分離能と低い背圧を実現する 2.7 μm 表面多孔質カラムと、最高の分離能を実現する 1.8 μm カラム。例えば、p/n 859700-913 (2.1 × 150 mm、1.8 μm) は、アプリケーションノート 5994-1348JAJP で使用されています。AdvanceBio Glycan マッピングカラムを使用した、InstantPC N-グリカン分析の 15、30、および 37 分 HILIC メソッドについては、アジレントのアプリケーションノート [5991-8071 JAJP](#) をご覧ください。

品名	部品番号
<b>1.8 μm、最大圧力 120 MPa、最高温度 40 °C</b>	
AdvanceBio Glycan マッピング 300 Å, 2.1 x 150 mm, 1.8 μm	859700-913
AdvanceBio Glycan マッピング 300 Å, 2.1 x 100 mm, 1.8 μm	858700-913
AdvanceBio Glycan マッピング 300 Å, 2.1 x 5 mm, 1.8 μm、ガードカラム、3 個	821725-905
<b>2.7 μm、最大圧力 60 MPa、最高温度 40 °C</b>	
AdvanceBio Glycan マッピング 120 Å, 2.1 x 100 mm, 2.7 μm	685775-913
AdvanceBio Glycan マッピング 120 Å, 2.1 x 150 mm, 2.7 μm	683775-913
AdvanceBio Glycan マッピング 120 Å, 2.1 x 250 mm, 2.7 μm	651750-913
AdvanceBio Glycan マッピング 120 Å, 2.1 x 5 mm, 2.7 μm、ガードカラム、3 個	821725-906
AdvanceBio Glycan マッピング 120 Å, 4.6 x 100 mm, 2.7 μm	685975-913
AdvanceBio Glycan マッピング 120 Å, 4.6 x 150 mm, 2.7 μm	683975-913
AdvanceBio Glycan マッピング 120 Å, 4.6 x 250 mm, 2.7 μm	680975-913
AdvanceBio Glycan マッピング 120 Å, 4.6 x 5 mm, 2.7 μm、ガードカラム、3 個	820750-905

## 参考文献

1. N-Glycan Analysis: Better Together. Agilent Brochure [5994-1647EN](#), 2020.
2. Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC および 2-AB Express サンプル前処理と LC/FLD/MS を用いた生物製剤の N-グリカン分析の効率的なワークフロー, Agilent Application Note [5994-1348JAJP](#), 2019.
3. 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, [5994-0918JAJP](#), 2019.
4. Glycan Standards Technical Flyer, [5994-2202EN](#), 2020.
5. Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep with InstantPC Kit, 96-ct (formerly ProZyme). User Manual [5994-1231EN](#).
6. Agilent LC/MSD XT を用いた蛍光検出および質量選択検出によるモノクローナル抗体 N-グリカンの分析, Agilent Application Note [5991-8071 JAJP](#).
7. Y Xie, et al. High-throughput and high-sensitivity N-Glycan profiling: A platform for biopharmaceutical development and disease biomarker discovery. Analytical Biochemistry, Volume 623, 15 June 2021, 114205.
8. Varki A, et al. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. Glycobiology. 2015 Dec; 25(12): 1323–1324.

## Agilent CrossLab:優れた成果をサポート

Agilent CrossLab は、サービスと消耗品を統合し、お客様のワークフローのサポート、生産性の向上や運用の効率化を実現するためのお手伝いをいたします。アジレントは、あらゆる場面で「見えない価値」を提供し、お客様の目標達成を支援します。また、お客様が機器やラボを管理して最高の性能を実現できるように、メソッドの最適化やトレーニングから、ラボ全体の移設と運用分析まで、幅広い製品とサービスを提供しています。



ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンタ

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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いません。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. 2021  
Printed in Japan, Aug 13, 2021  
5994-3926JAJP  
DE44396.4422106482

