

使用新型荧光和MS敏感标记试剂快速制备游离N-糖用于HILIC分析

Matthew A. Lauber, Darryl W. Brousmiche, Zhengmao Hua, Stephan M. Koza, Ellen Guthrie, Paula Magnelli, Christopher H. Taron, Kenneth J. Fountain

Waters Corporation, New England BioLabs

摘要

使用传统方法制备用于HILIC-FLR-MS分析的N-糖要么费时费力，要么对灵敏度有不利影响。我们新开发的GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖分析试剂盒克服了这些缺点，可实现前所未有的蛋白糖基检测灵敏度，同时还能提高N-糖样品的制备通量。

有了这一方法：

糖蛋白能够在约10分钟内完成去糖基化过程，并生成N-糖胺。

然后，这些蛋白糖基与新型*RapiFluor*-MS试剂快速反应，在5 min的反应时间内即可被标记上由高效荧光基团以及能提高荧光及MS检测灵敏度的强碱性叔胺基团组成的标记物。

在用时不超过15 min的最终步骤中，通过 μ Elution HILIC SPE方法将所得的*RapiFluor*-MS标记蛋白糖基从反应副产物中提取出来，这一精心开发的SPE提取方法能够对多种蛋白糖基（从中性到四唾液酸化蛋白糖基）进行定量回收，并且样品一经提取就能立即分析。

因此，高灵敏度的*RapiFluor*-MS标记试剂让分析人员在30 min内即可完成从糖蛋白到待分析样品的N-糖样品制备过程。

优势

- 在30 min内制备标记N-糖（从糖蛋白到就绪的待分析样品）

- 完全游离糖基，可得到无偏差的结果
- 使用GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒，制备方案精简
- 可达到前所未有的N-糖检测灵敏度，荧光检测和MS检测的灵敏度可分别提高至少2倍和100倍
- 基于稳定的SPE样品处理，准确分析中性到四唾液酸化的N-糖

简介

N-糖谱图在生物制药过程中通常被定义为关键的质量属性，因为它是衡量疗效、安全性以及生产条件的一个指标¹⁻²。因此，临床和商业化生物治疗制剂的蛋白糖基分析方法是否具有高灵敏度和详尽表征的能力无疑非常重要。除此之外，如果分析方法还能够以快速的运行时间和高通量加快产品开发进程，其优势将更加明显。大部分用于评估糖蛋白N-糖的分析策略都需要使用PNGase F对糖蛋白进行糖基释放，然后使用具有可检测特性的化学基团对生成的N-糖进行标记。一种高效的方法是使用亲水作用色谱(HILIC)分离标记的糖基，然后通过荧光(FLR)或质谱(MS)进行检测³⁻¹⁰。

遗憾的是，使用传统方法制备用于HILIC-FLR-MS分析的N-糖要么费时费力，要么对灵敏度有不利影响¹¹。例如，传统的糖基释放步骤所要求的糖蛋白温育时间为1 h，而许多分析人员通常会温育过夜(16 h)。伴随这一过程的是长达2至3 h的标记步骤，这个步骤依赖于还原醛端的还原胺化反应，而这些醛类末端只能在其从糖胺形态水解后才能在N-糖上形成。而对于最常用的标记化合物2-氨基苯甲酰胺(2-AB)，得到的蛋白糖基可使用荧光轻松进行检测，但如果要使用电喷雾离子质谱(ESI-MS)检测就相当困难了。

长久以来，人们不断地对传统的N-糖样品制备方法进行改进，但是迄今为止还没有找到一种集简单、高MS灵敏度以及高通量这些期望属性于一身的解决方案。人们曾经尝试使用具有能增强电喷雾电离效率的官能团的其它标记试剂（例如普鲁卡因胺）¹²，但是这仍然没能解决由于依赖于还原性胺化标记步骤而造成的分析过程笨拙、耗时的问题。因此，人们研究了能在数分钟内生成标记蛋白糖基的快速标记方法。实际上，最近出现了两种用于快速标记蛋白糖基的标记物，其中包括一种可快速标记的氨基苯甲酰胺(AB)类似物¹³。在快速反应中，使用连接脲的氨基苯甲酰胺对前体糖胺的还原性醛端进行修饰。虽然这种快速标记试剂能够加快标记过程，但是它无法提供现代N-糖分析所需的更高的电离化效率。

为了解决上述问题，我们开发了一种样品制备解决方案，该方案能够为蛋白糖基检测提供前所未有的FLR和MS灵敏度，同时还能提高N-糖样品制备的通量。我们合成了一种新型标记试剂，一旦糖胺从糖蛋白上释放，该试剂即可迅速与其发生反应。在仅5 min的反应内，标记试剂RapiFluor-MS将对N-糖进行标记，RapiFluor-MS由N-羟基丁二酰亚胺(NHS)氨基甲酸酯快速标记基团、高效喹啉荧光基团以及可提高电离能力的强碱性叔胺基团组成。为了进一步加快N-糖的制备过程，我们还将快速标记步骤直接与使用了RapiGest SF表面活性剂的快速PNGase F糖基

释放步骤集成，并且还包括HILIC μ Elution SPE纯化步骤，该纯化步骤不仅能够实现对游离的已标记蛋白糖基的高效定量回收，而且还可免去LC-FLR-MS样品分析前的溶剂干燥步骤。

实验

液相条件

LC系统:	ACQUITY UPLC H-Class Bio系统
样品温度:	5 °C
分析柱柱温:	60 °C
流速:	0.4 mL/min
荧光检测条件:	激发光265 nm/发射光425 nm (<i>RapiFluor-MS</i>) 激发光278 nm/发射光344 nm (<i>Instant AB</i>) 激发光330 nm/发射光420 nm (2-AB) (2 Hz扫描速率[150 mm色谱柱]/5 Hz扫描速率[50 mm色谱柱], 增益=1)
进样体积:	$\leq 1 \mu\text{L}$ (使用水相稀释剂, 用于2.1 mm内径色谱柱) $\leq 30 \mu\text{L}$ (使用DMF/ACN稀释样品, 用于2.1 mm内径色谱柱)
色谱柱:	ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide 130Å, 1.7 μm , 2.1 x 50 mm ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide 130Å, 1.7 μm , 2.1 x 150 mm
样品收集/样品瓶:	样品收集组

聚丙烯材质12 x 32 mm螺纹口样品瓶，容积300 μ L

流动相A: 50 mM甲酸铵，pH 4.4 (LC-MS级；配自100倍浓缩液)

流动相B: ACN (LC-MS级)

梯度 (用于2.1 x 50 mm色谱柱) :

时 间(min)	流 速(mL/min)	%A	%B	曲 线
0.0	0.4	25.0	75.0	6.0
11.7	0.4	46.0	54.0	6.0
12.2	0.2	100.0	0.0	6.0
13.2	0.2	100.0	0.0	6.0
14.4	0.2	25.0	75.0	6.0
15.9	0.4	25.0	75.0	6.0
18.3	0.4	25.0	75.0	6.0

梯度 (用于2.1 x 150 mm色谱柱) :

时 间(min)	流 速(mL/min)	%A	%B	曲 线
0.0	0.4	25.0	75.0	6.0
35.0	0.4	46.0	54.0	6.0
36.5	0.2	100.0	0.0	6.0
39.5	0.2	100.0	0.0	6.0
43.1	0.2	25.0	75.0	6.0
47.6	0.4	25.0	75.0	6.0
55.0	0.4	25.0	75.0	6.0

MS条件

MS系统:	SYNAPT G2-S HDMS
电离模式:	ESI+
分析仪模式:	TOF MS, 分辨率模式 (约20 K)
毛细管电压:	3.0 kV
锥孔电压:	80 V
源温度:	120 °C
脱溶剂气温度:	350 °C

脱溶剂气流速:	800 L/h
校正:	NaI, 1 µg/µL, 从500至2500 m/z
Lockspray (ASM B侧):	100 fmol/µL [Glu]人血纤维蛋白肽B的0.1% (v/v) 甲酸溶液, 70:30水/乙腈 (每90秒)
采集:	500-2500 m/z, 1 Hz扫描频率
数据管理:	MassLynx软件 (4.1版)

样品描述

根据《GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖分析试剂盒维护和使用手册》(715004793)中的指南, 制备来自完整单克隆抗体质量数检查标准品 (部件号186006552)、牛胎球蛋白(Sigma F3004)以及混合人源IgG(Sigma I4506)的N-糖。

为了比较分别使用Instant AB和*RapiFluor*-MS标记的蛋白糖基的响应因子, 我们使用等摩尔量的过量试剂进行标记反应, 然后直接对反应混合物原液进行HILIC-FLR-MS分析, 以避免SPE纯化步骤可能带来的偏差。响应因子为测得的FA2 N-糖(Oxford notation)色谱峰面积与蛋白糖基来源糖蛋白质量的比值。

为了比较2-AB标记与*RapiFluor*-MS标记的蛋白糖基的响应因子, 我们对来自混合人源IgG的等量标记N-糖进行了HILIC-FLR-MS分析, 并且使用外部定量标准品 (2-AB标记的三乙酰壳三糖和*RapiFluor*-MS衍生化丙胺, 高纯, 经HPLC和¹H NMR确认) 对色谱柱载量进行了校正。测得的FA2色谱峰面积与蛋白糖基摩尔量的比值即为响应因子。

此外, 我们还对衍生后提取*RapiFluor*-MS标记蛋白糖基的步骤进行了评估, 评估步骤使用了释放自混合人源IgG和牛胎球蛋白混合物 (1:1, 质量比) 的标记N-糖测试混合物。制备测试混合物后需将其复溶, 复溶所使用的溶液与*RapiFluor*-MS N-糖试剂盒方案中溶解蛋白糖基所使用的溶液组成相同。所有其它样品制备技术请参阅《GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖分析试剂盒维护和使用手册》(715004793)。

结果与讨论

合理设计的新型N-糖标记试剂

我们基于合理设计的考虑合成了一种可以协助进行N-糖分析的新型标记试剂（图1），该试剂能够实现快速标记动力学和高荧光量子产率，而且可显著提高MS检测能力。传统的N-糖样品制备方法取决于具有醛端的糖类的还原性胺化反应，在这一过程中，蛋白糖基必须经历多个化学转化过程以及漫长的高温温育步骤¹¹。此外，为了最大限度减小去唾液酸作用，还必须在无水条件下对蛋白糖基进行还原胺化。这样一来，由于需要将样品从水性状态转化到无水状态，样品制备步骤变得十分复杂耗时。考虑到上述原因，我们新设计的标记试剂放弃了还原胺化，转而利用水相快速标记反应。为此，沃特世利用其在氨基酸快速荧光标记方面的丰富经验开发了一种能够满足现代N-糖分析需求的新型试剂。二十多年前，沃特世推出了一种被称为AccQ·Fluor快速标记试剂，这种试剂现在已经被广泛用于通过荧光检测准确分析蛋白质样品的氨基酸组成¹⁴⁻¹⁵。

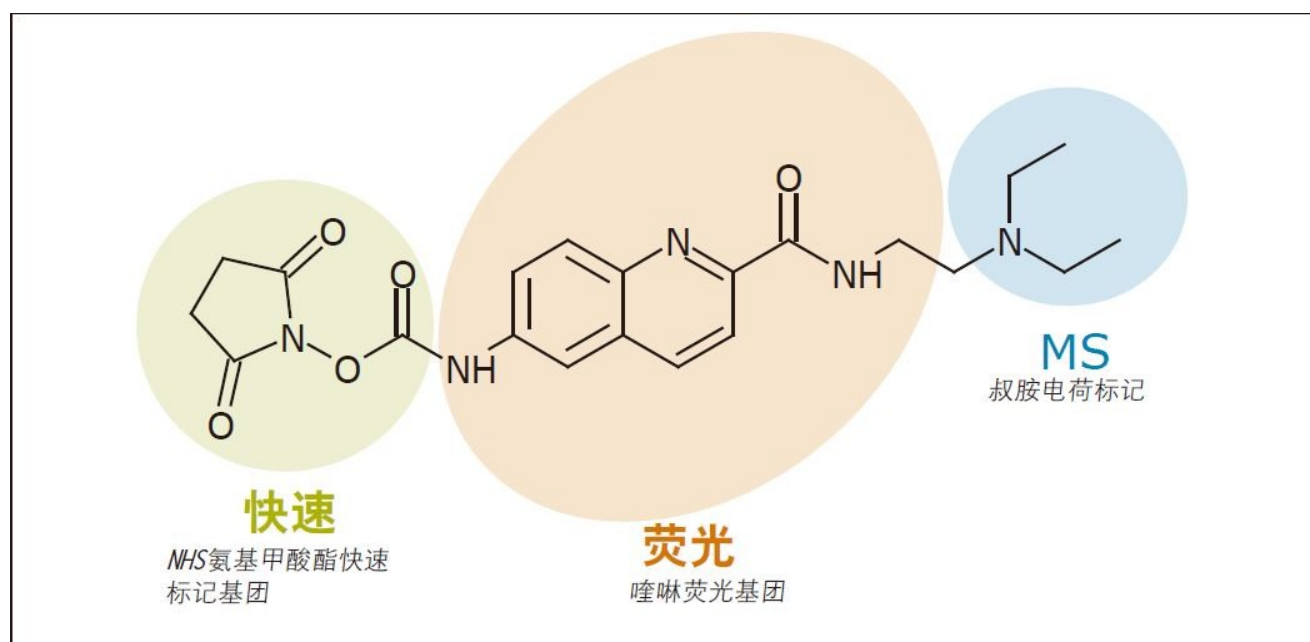


图1. RapiFluor-MS的分子结构。图中突出显示了能够实现快速标记、高效荧光以及增强的电离效率的化学结构。

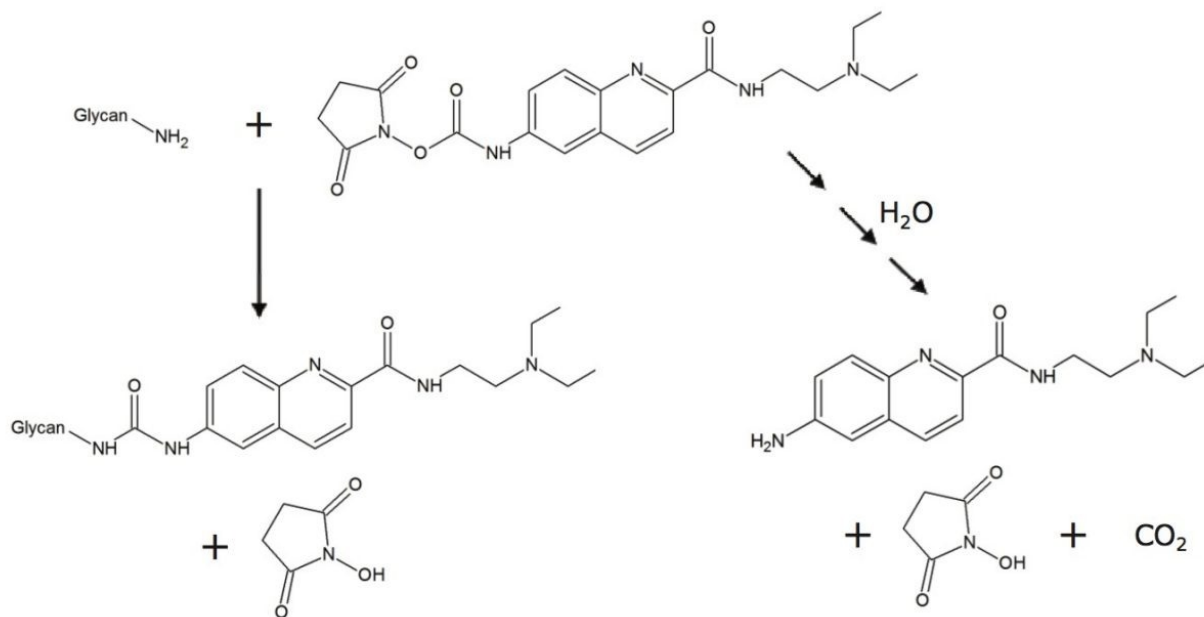


图2.N-糖胺的*RapiFluor*-MS衍生化反应示意图。左边的路径展示了糖胺的衍生化反应，所生成的N-糖带有连接脲(NH-CO-NH)的*RapiFluor*-MS标记。右边的路径展示了*RapiFluor*-MS的水解。

AccQ·Fluor具有两个重要的化学特征：NHS-氨基甲酸酯快速标记反应基团和高效的喹啉荧光基团。

AccQ·Fluor的这些结构构成了新型蛋白糖基标记试剂的基础。带糖胺的N-糖在蛋白酶的作用下从糖蛋白上被释放之后，该试剂的NHS-氨基甲酸酯反应基团能够迅速对其进行标记。在室温、水相条件下仅5 min的反应中，新型试剂就能完成对N-糖的标记，生成非常稳定的脲链（图2）。除了快速标记的能力外，新型标记试剂还能提供极高的MS和荧光检测灵敏度。喹啉荧光基团在该新型试剂中发挥着核心功能，使其能够像AccQ·Fluor一样，实现高灵敏度的荧光检测。这一新型试剂与AccQ·Fluor的不同之处在于它还具有叔胺侧链，这一结构的作用是增强正离子电喷雾电离(ESI+)的MS信号。总而言之，这一新型N-糖标记试剂建立在沃特世丰富的化学试剂专业知识基础之上，具有三种重要的化学结构：快速标记反应基团、高效荧光基团以及强碱性MS活性基团。为了体现出这些出色的属性，这一新型标记试剂被命名为*RapiFluor*-MS。

RapiFluor-MS可实现高灵敏度检测

我们对*RapiFluor*-MS的N-糖标记进行了深入研究，特别对比了使用*RapiFluor*-MS标记的蛋白糖基与使用其它试剂标记的蛋白糖基的响应因子。与*RapiFluor*-MS最为相似的市售试剂是一种名为Instant AB的氨基苯甲酰胺的NHS氨基甲酸酯类似物¹³。图3A和3B展示了源自小鼠单克隆抗体(完整单克隆抗体质量数检测标准品部件号186006552)并分别用*RapiFluor*-MS和Instant AB标记的等量N-糖的HILC荧光和基峰强度(BPI)MS谱图。根据观测到的色谱峰面积，得到了IgG谱图中含量最高的蛋白糖基—岩藻糖基化双天线FA2蛋白糖基的荧光及MS检测响应因子（图3C）。FA2蛋白糖基的结果表明，*RapiFluor*-MS标记的蛋白糖基的荧光信号比Instant AB标记的N-糖的荧光信号高2倍，更惊人的是，它的MS信号比后者高780倍。

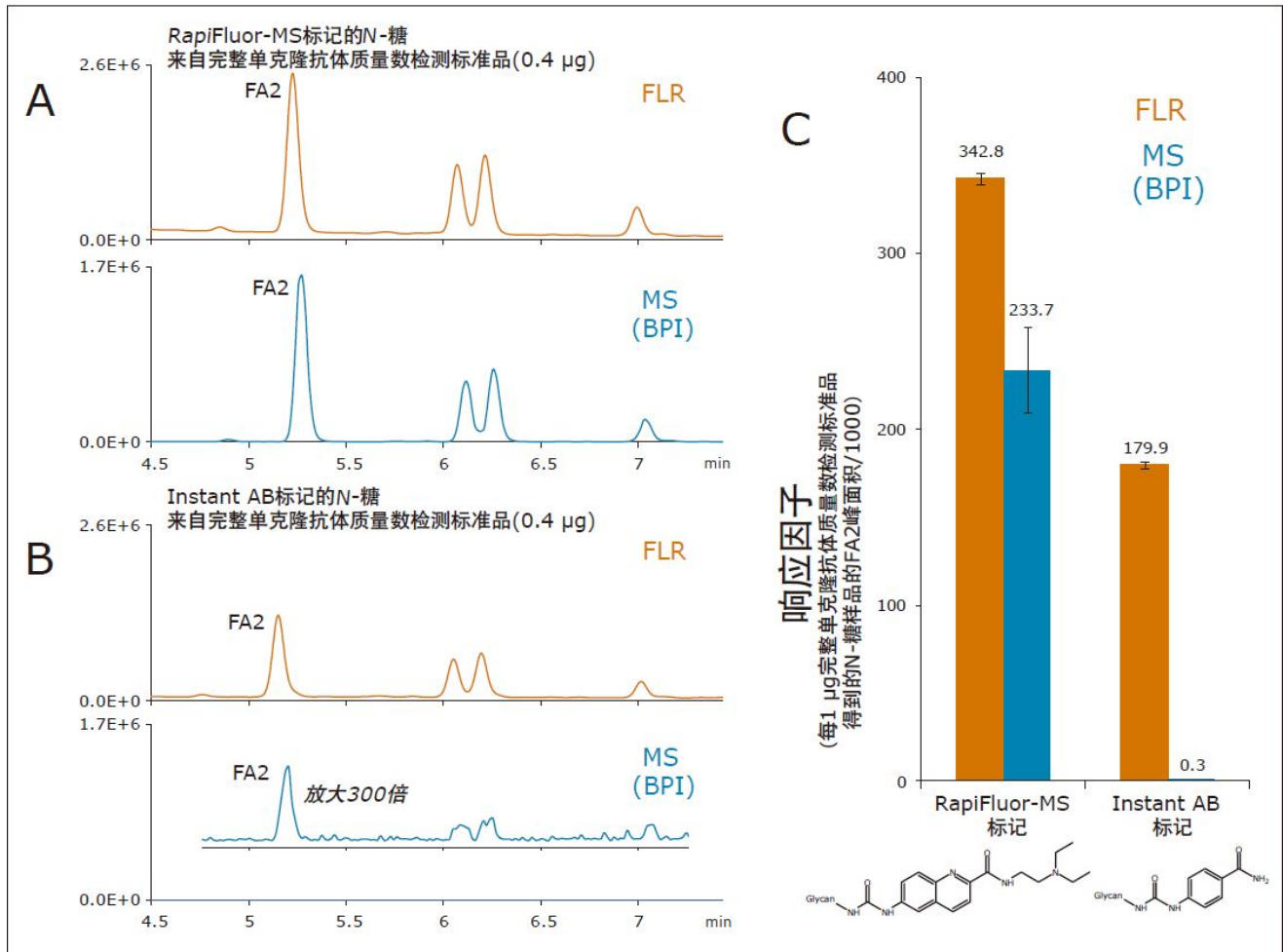


图3. RapiFluor-MS(A)和Instant AB (B)标记的、来自完整单克隆抗体质量数检查标准品的N-糖的HILIC-FLR-MS谱图。荧光(FLR)色谱图以橙色表示，基峰强度(BPI) MS谱图用蓝色表示。采用ACQUITY UPLC BEH Amide 130Å, 1.7 μm, 2.1 x 50 mm色谱柱对标记的蛋白糖基（来自0.4 μg糖蛋白，进样量为1 μL水相样品）进行分离。(C)分别使用RapiFluor-MS和Instant AB标记的蛋白糖基的响应因子（每1 μg完整单克隆抗体质量数检查标准品得到的N-糖样品的FA2峰面积）。荧光(FLR)和MS（基峰强度）的响应因子分别用橙色和蓝色表示。重复进行两次分析。

我们通过类似的方法将RapiFluor-MS标记与传统的2-AB标记进行了对比。为了进行对比，分别使用RapiFluor-MS和2-AB标记了源自混合人源IgG的N-糖，并以相同的进样量对其进行了HILIC-FLR-MS分析（图4A和4B）。考虑到这两种显著不同的方案分别进行了快速标记和还原性胺化反应步骤，我们采用定量标准品进行了外标校准以确定在HILIC色谱柱上载量和洗脱的FA2蛋白糖基的量。采用FA2蛋白糖基的校正量确定的响应因子见图4C。我们再次发现使用RapiFluor-MS标记的蛋白糖基的检测信号明显更高（比2-AB标记的蛋白糖基的荧光信号高14倍，比其MS信号高160倍）。

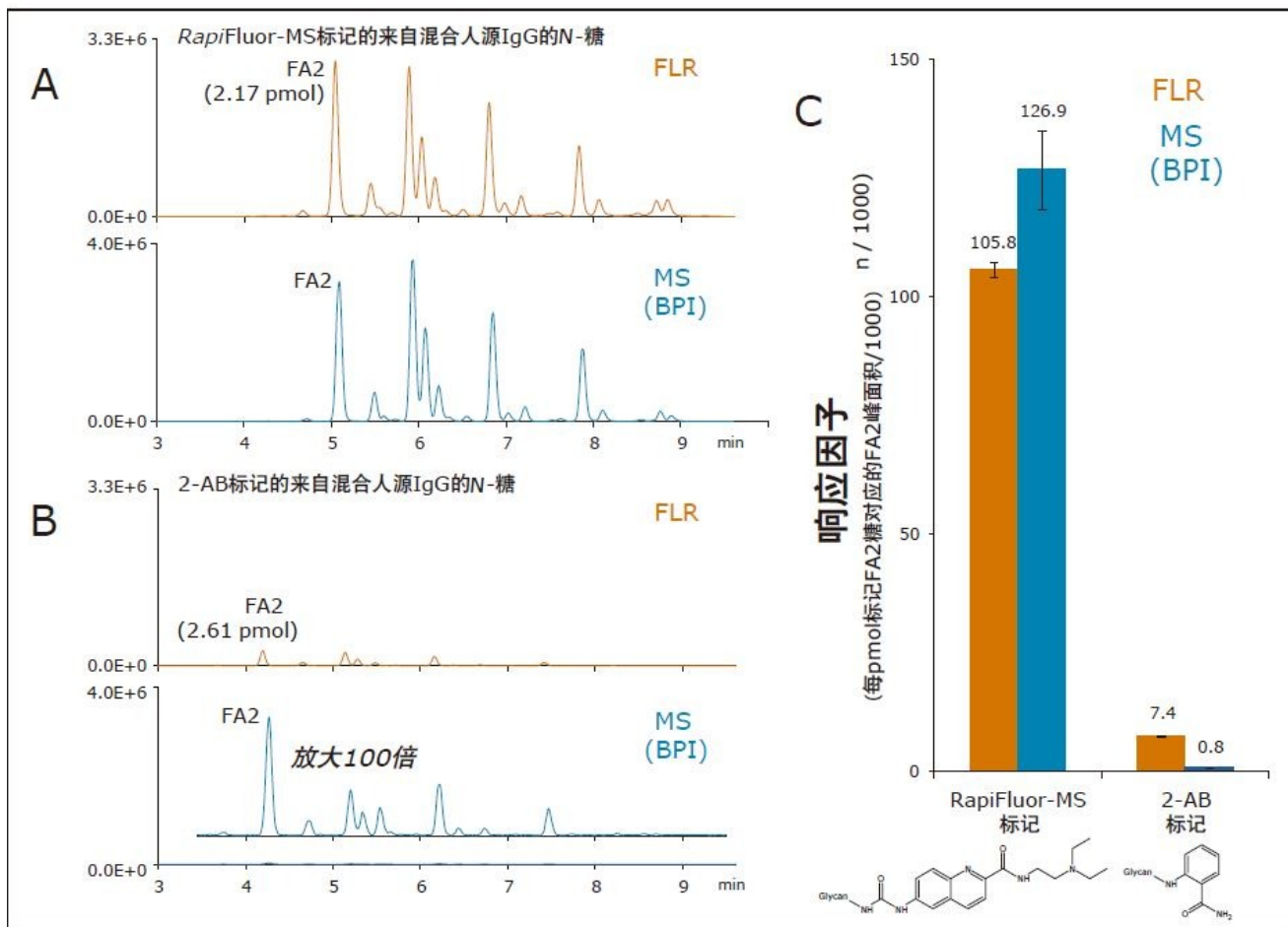


图4. RapiFluor-MS (A)和2-AB (B)标记的、来自混合人源IgG的N-糖的HILIC-FLR-MS谱图。荧光(FLR)色谱图以橙色表示，基峰强度(BPI) MS谱图用蓝色表示。采用ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide 130Å, 1.7 μm, 2.1 x 50 mm色谱柱对标记的蛋白糖基(约14 pmol总蛋白糖基, 进样量为1 μL水相样品)进行分离。使用定量标准品通过两点外标校准对FA2蛋白糖基的量进行校准。(C) RapiFluor-MS和2-AB标记的蛋白糖基的响应因子(通过外标校准确定的每皮摩尔FA2对应的FA2峰面积)。荧光(FLR)和MS (BPI)的响应因子分别用橙色和蓝色表示。重复进行两次分析。

为了汇总上述观察结果,我们以Instant AB和2-AB的响应因子占RapiFluor-MS响应因子的百分比作图,结果如图5所示。从图中可以看出,荧光和MS灵敏度方面的增长是非常明显的,因为该图展示的是根据RapiFluor-MS响应因子进行了标准化的Instant AB和2-AB响应因子。该图中还给出了使用另一种标记试剂(普鲁卡因胺)进行还原胺化反应的相对性能。普鲁卡因胺是氨基苯甲酰胺的一种化学类似物,近年来,人们利用它来改善使用HILIC-ESI(+)-MS分析还原胺化蛋白糖基时的电离效率。之前的研究表明,普鲁卡因胺标记的蛋白糖基能产生与2-AB标记的蛋白糖基相当的荧光信号,而MS信号则比后者高50倍^{12,16}。与普鲁卡因胺相比,RapiFluor-MS在MS灵敏度方面有相当大的提高。也就是说,新型RapiFluor-MS标记试剂不仅支持蛋白糖基的快速标记,而且还可为分析人员提供无与伦比的荧光及MS检测灵敏度。

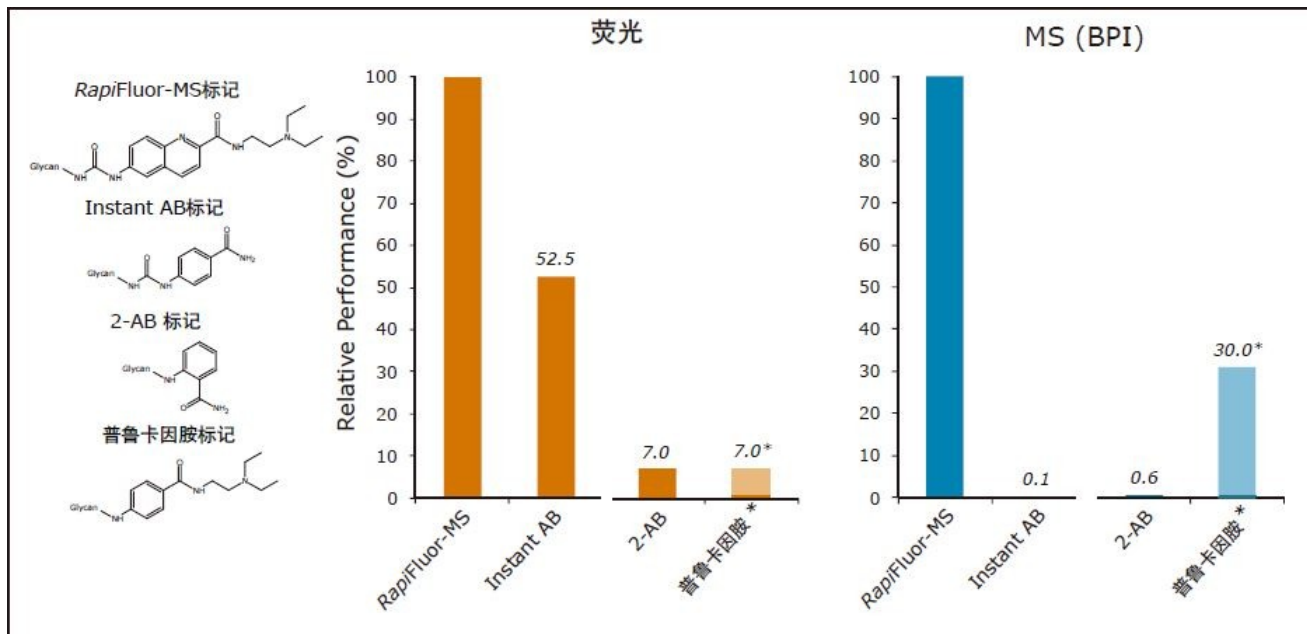


图5.蛋白糖基标记的相对性能。响应因子根据RapiFluor-MS标记的N-糖的荧光和MS响应因子进行了标准化。

(*)根据已发表的N-糖对比研究结果推测出的对比性结果，已发表的研究结果显示，普鲁卡因胺可提供与2-AB相当的荧光灵敏度，而ESI-MS灵敏度则比后者高50倍（Klapoetke 等，2010）。

使用新型Rapid PNGase F和RapiGest SF表面活性剂快速糖基释放

RapiFluor-MS标记对N-糖样品制备产生了革命性的影响，它能够和GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒一起被实验室轻松采用。这一来自沃特世和纽英伦生物技术公司的完整解决方案是专门为消除N-糖样品制备过程中的多重瓶颈而设计的。优化的N-糖样品制备工作流程仅需三步：糖基释放（将蛋白糖基从糖蛋白上释放）、标记（赋予蛋白糖基可被检测的化学基团）以及纯化步骤（去除样品中的潜在干扰物）（图6）。传统的N-糖样品制备方法不仅需要漫长的标记步骤，还需要漫长的糖基释放步骤（1到16 h），极其耗时。为了确保RapiFluor-MS快速标记不受耗时的糖基释放过程影响，沃特世与纽英伦生物技术公司合作，共同开发了专为集成快速标记试剂而设计的Rapid PNGase F糖基释放方案。

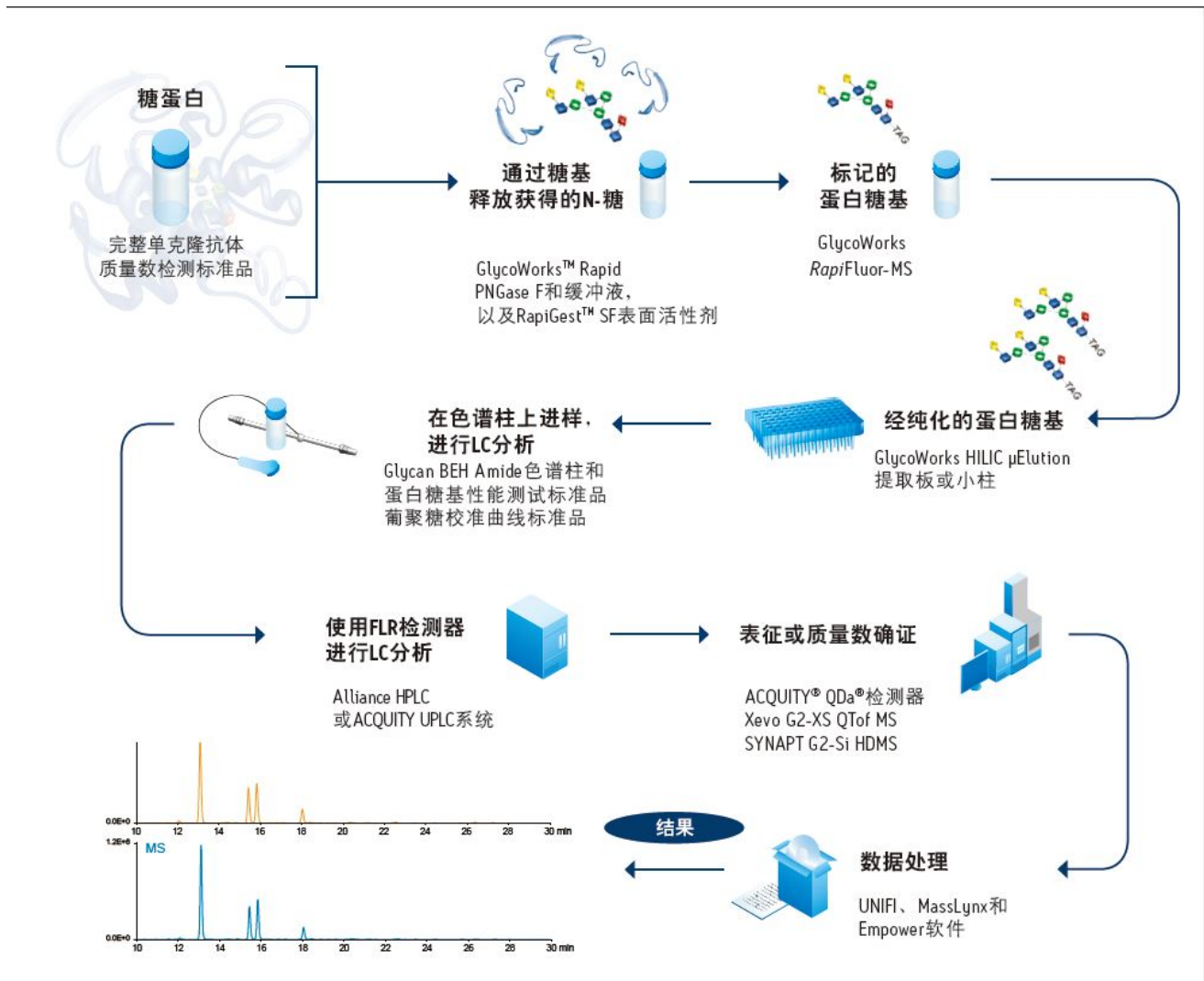


图6.使用RapiFluor-MS N-糖试剂盒快速制备N-糖的工作流程。

GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒提供了新剂型的Rapid PNGase F和RapiGest SF表面活性剂，可在大约10 min的步骤中对各种糖蛋白进行充分的糖基释放。这一快速糖基释放步骤是通过RapiGest实现的，它是一种阴离子表面活性剂，可确保Rapid PNGase充分接触N-糖并保持糖蛋白热变性后的可溶解性。最重要的是，RapiGest是一种酶友好的试剂，因此可在高浓度下使用而不会影响Rapid PNGase F的活性。在我们所开发的快速糖基释放技术中，糖蛋白将与高浓度RapiGest (1%)反应并将被加热至 $\geq 80^{\circ}\text{C}$ 保持2 min。接下来，无需任何其它的样品处理步骤，只需将Rapid PNGase F加入溶液中，并将混合物在高温(50°C)条件下温育5 min，就能实现完全、无偏差的糖基释放。

我们使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对这一快速糖基释放过程的效果进行了评估。SDS-PAGE是一种根据蛋白质在溶液中的大小对其进行分离的有效技术，通常被用来分离糖基化蛋白质和去糖基化蛋白质¹⁷⁻¹⁸。我们采用快速步骤对多种糖蛋白进行了糖基释放，并且使用SDS-PAGE对它们进行了分析，一同分析的还有未经PNGase F处理的阴性对照以及阳性对照，阳性对照样品通过传统的多步骤糖基释放方法制备，其中包括

基于SDS的变性步骤及PNGase F温育步骤（37°C，30min）。图7展示了本研究的结果，可以看出，每种被测蛋白质在进行了快速糖基释放步骤之后，其表观分子量都明显下降。而且，表观分子量的降低量与使用对照方法糖基释放的蛋白质的相当。这些结果表明，采用独特的Rapid PNGase F和RapiGest SF表面活性剂实现的快速糖基释放步骤可达到与传统方法不相上下的糖基释放效果，而该方法所需的时间仅为传统方法的一小部分。

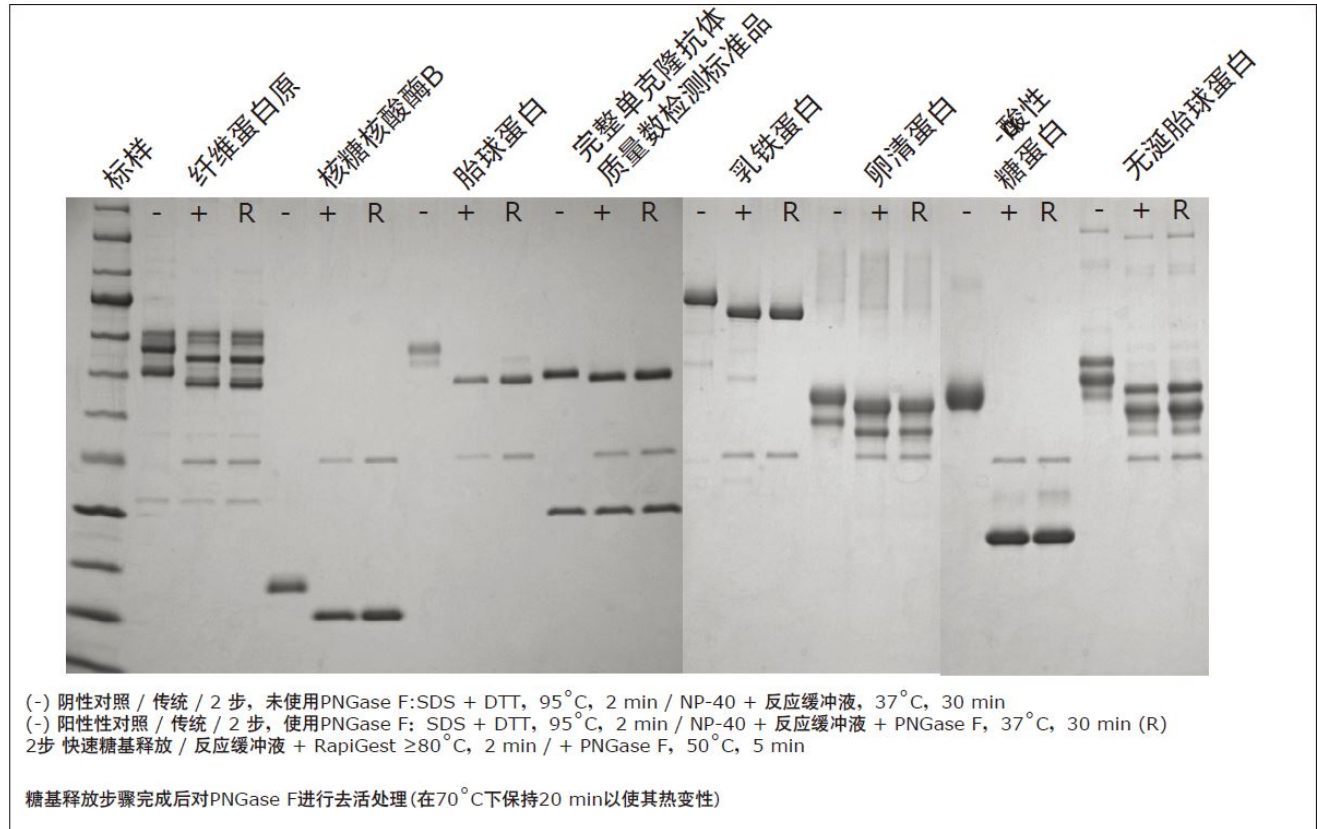


图7.糖蛋白糖基释放的凝胶电泳分析。阴性对照(-)显示了天然糖蛋白的迁移距离和表观分子量，阳性对照(+)显示了通过传统两步糖基释放步骤（使用SDS变性之后加入PNGase F在37 °C下温育30 min）获得的糖基释放蛋白质的迁移距离及其降低的表观分子量。图中还示出了使用两步快速步骤（使用RapiGest-辅助热变性之后使用Glycoworks Rapid PNGase F在50 °C下温育5 min）进行糖基释放的结果，该结果表明这些糖蛋白均实现了完全的糖基释放(R)。使用考马斯亮蓝染色法进行条带可视化。

稳定的定量HILIC SPE

如前文所述，N-糖样品制备的最后一步旨在提取出标记的蛋白糖基以备分析。因此，我们设计了一种使用固相萃取法(SPE)从反应副产物中提取已标记蛋白糖基的有效方法。特别地，该SPE方法是专为从糖基释放蛋白质、PNGase F、缓冲液/制剂组分、RapiGest表面活性剂以及标记反应副产物等组成的混合物中选择性地提取Rapi Fluor-MS标记的N-糖而设计的，如果未将这些物质去除干净，它们将会干扰标记蛋白糖基的HILIC分析（图8）。我们提供RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒专用的GlycoWorks μ Elution提取板，它含有专为该应用而设计的硅基氨基丙基吸附剂¹⁹⁻²²。GlycoWorks SPE吸附剂具有强极性，能够轻松并选择性地保留蛋白糖基之类的极性化合物。此

外，该吸附剂具有弱碱性表面，能够基于离子交换和静电场排斥提供进一步的选择性优势。同样值得一提的是 GlycoWorks μ Elution提取板专门针对最小洗脱体积而设计，因而样品无需进行干燥步骤即可马上分析。此外，GlycoWorks μ Elution提取板为96孔样式，这意味着它可用于高通量实验，或者在低通量实验中连续使用（需以正确方式适当存储，请参阅维护和使用手册）。

在HILIC SPE过程中，先用水预处理吸附剂，然后将其平衡至高乙腈上样条件。然后，加载经乙腈稀释的蛋白糖基样品，用含1%甲酸的90%乙腈溶液组成的酸性清洗溶剂清洗掉样品基质。通过在氨丙基HILIC吸附剂与反应副产物之间引入静电排斥和提高基质组分的溶解性可使清洗条件到达最佳SPE选择性。清洗完成后，将标记的游离糖基从HILIC吸附剂上洗脱下来。由于GlycoWorks SPE吸附剂具有弱碱性表面以及阴离子交换能力（正如它具有阳离子排斥能力），必须使用具有强离子强度的洗脱剂来洗脱标记的蛋白糖基。因此，我们开发了一种由200 mM乙酸铵的5%乙腈溶液(pH 7)组成的洗脱缓冲液（部件号186007991）。用该洗脱缓冲液完成洗脱后，即可使用混合有机溶剂（乙腈和二甲基甲酰胺）稀释RapiFluor-MS标记的蛋白糖基，并直接通过UPLC或HPLC HILIC色谱柱使用荧光和/或ESI-MS检测进行分析。

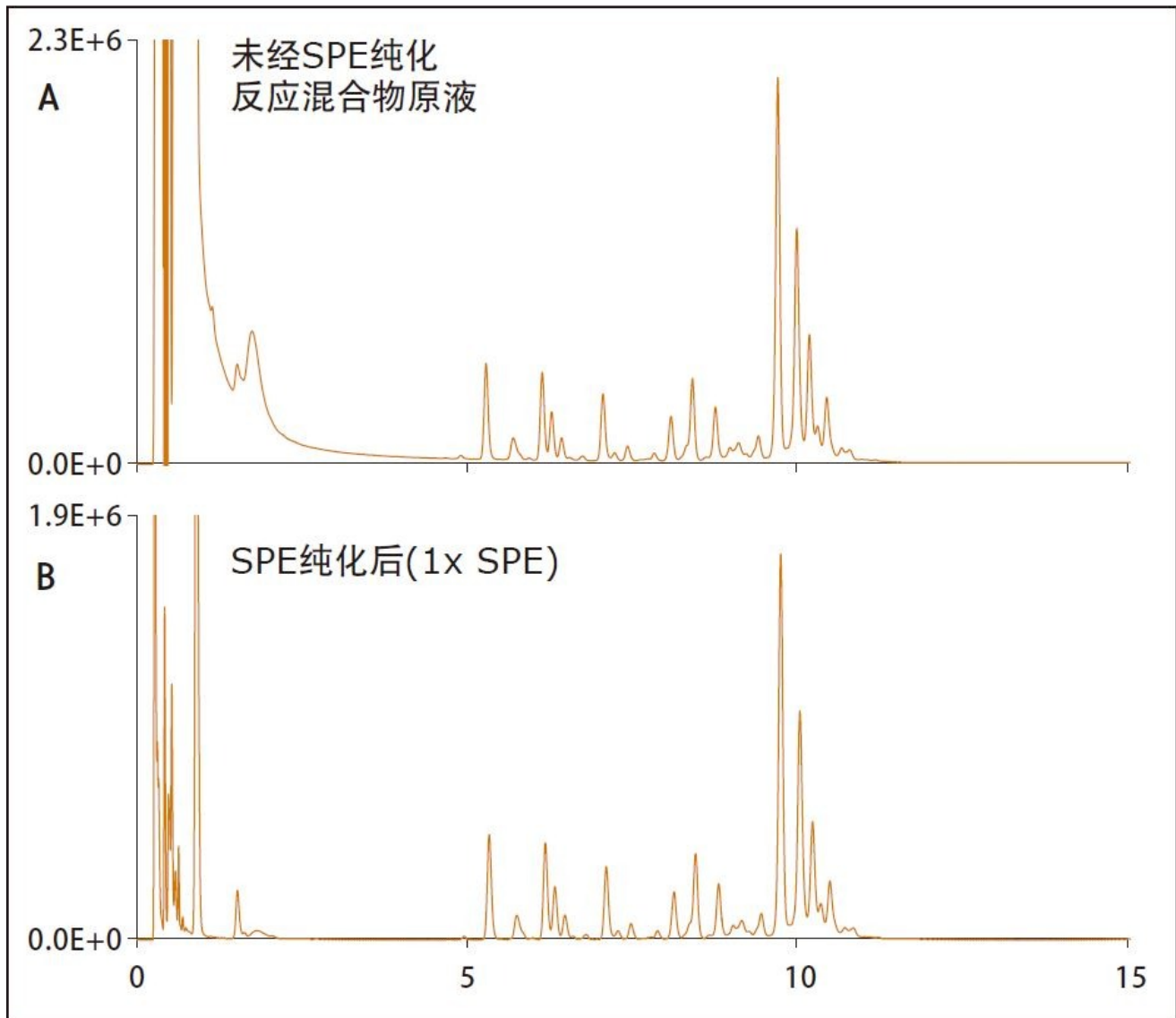


图8.HILIC SPE去除色谱干扰。(A) RapiFluor-MS标记的来自混合人源IgG和牛胎球蛋白的蛋白糖基组成的测试混合物，使用ACQUITY UPLC BEH Amide 130Å, 1.7 m, 2.1 x 50 mm色谱柱分离并进行荧光检测（标记N-糖来自0.4 μg糖蛋白，进样量为1 μL反应混合物原液）。(B)使用HILIC SPE提取后的测试混合物（标记N-糖来自0.4 μg糖蛋白，进样量为10 μL经ACN/DMF稀释的SPE洗脱物）。

和RapiFluor-MS N-糖试剂盒的其它方面一样，我们对该GlycoWorks SPE步骤进行了深入评估。我们配制了一种测试混合物以评价RapiFluor-MS标记的多种N-糖的回收率，混合物中包括从小分子量中性蛋白糖基到高分子量的四唾液酸化蛋白糖基在内的多种蛋白糖基。这样的混合物通过从混合人源IgG和牛胎球蛋白释放N-糖并对其进行标记制备而成。图9A示出了使用HILIC色谱柱和荧光检测分析对该测试混合物进行示例性分析的结果。图中标出了代表蛋白糖基性质极值的蛋白糖基种类，包括去唾液酸FA2蛋白糖基和带四唾液酸化天线结构的蛋白糖基(A3S1G3S3)。为了评估SPE过程的效果，我们将该混合物进行了第二次GlycoWorks SPE处理，然后再次使用HILIC色谱和荧光检测进行了分析，结果如图9B所示。可以看出，经过两次SPE处理的样品呈现出的标记蛋白糖基

谱图与只经一次SPE处理的样品的谱图相当。确实，我们发现该SPE步骤对所有纯化蛋白糖基的绝对回收率都在约70%至80%之间，而更重要的是它可获得高度准确的相对产量。图9C示出了四种蛋白糖基（FA2、FA2G2S1、A3G3S3和A3S1G3S3）经过一次与两次SPE处理的样品的相对丰度。可以看出，四唾液酸化A3S1G3S3的相对丰度的偏差最大，其中经一次和两次SPE处理的样品的相对丰度分别为5.7%和6.1%。这些结果表明，GlycoWorks SPE是一种可立即分析所提取的标记蛋白糖基样品的有效机制，而且对于多种N-糖来说，该方法都不会对其相对丰度的准确性造成显著影响。

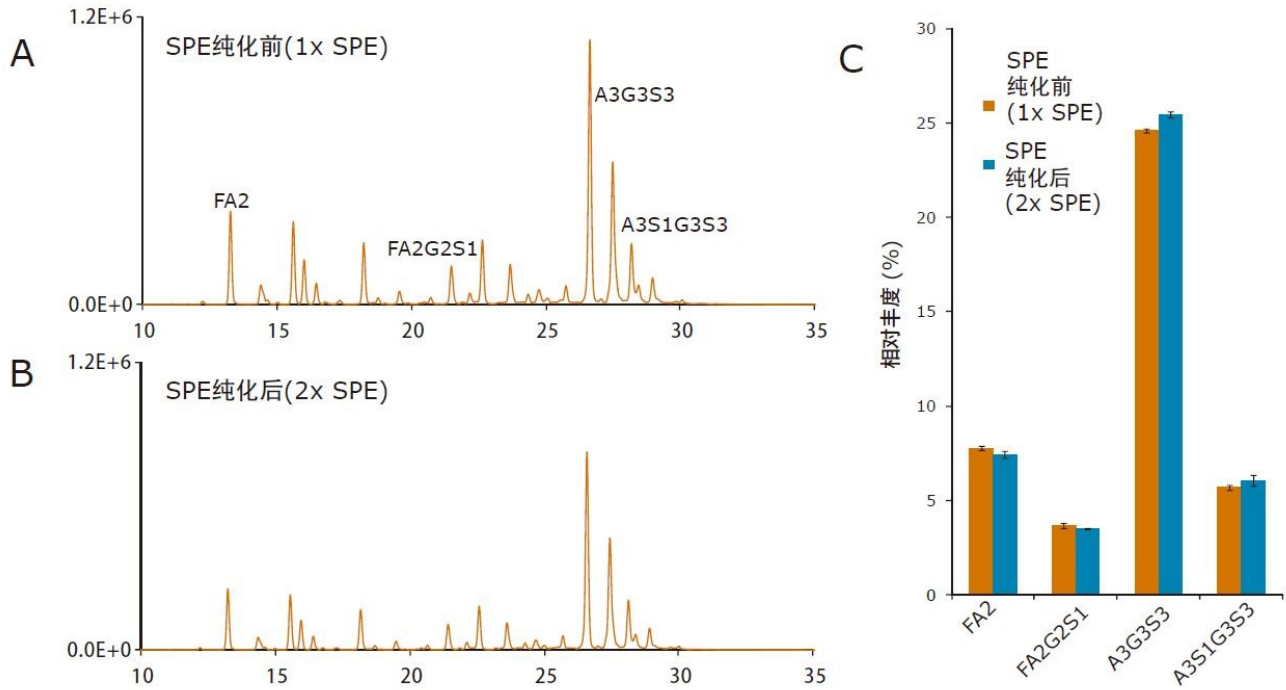


图9.使用GlycoWorks HILIC μ Elution提取板对RapiFluor-MS标记的N-糖进行SPE提取。(A) RapiFluor-MS标记的来自混合人源IgG和牛胎球蛋白的蛋白糖基组成的测试混合物，使用ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide, 130Å, 1.7 μ m, 2.1 x 150 mm色谱柱分离并进行荧光检测（标记N-糖来自0.4 μ g糖蛋白，进样量为10 μ L经ACN/DMF稀释的样品）。(B)经HILIC SPE提取后的测试混合物分析结果。(C)一组RapiFluor-MS标记的蛋白糖基经GlycoWorks HILIC SPE处理前后的相对丰度对比。

结论

使用传统方法制备用于HILIC-FLR-MS分析的N-糖要么费时费力，要么对灵敏度有不利影响。我们新开发的GlycoWorks RapiFluorFluor-MS N-糖分析试剂盒克服了这些缺点，可实现前所未有的蛋白糖基检测灵敏度，同时还能提高N-糖样品的制备通量。该方法可在大约10 min内完成糖蛋白的糖基释放并生成N-糖胺。然后，这些蛋白糖基与新型RapiFluor-MS试剂快速反应，在5 min的反应时间内即可被标记上由高效荧光基团以及能提高荧光

及MS检测灵敏度的强碱性叔胺基团组成的标记物。在用时不超过15 min的最终步骤中，通过 μ Elution HILIC SPE方法将所得的RapiFluor-MS标记蛋白糖基从反应副产物中提取出来，这一精心开发的SPE提取方法能够对多种蛋白糖基（从中性到四唾液酸化蛋白糖基）进行定量回收，并且样品一经提取就能立即分析。因此，高灵敏度的RapiFluor-MS标记试剂让分析人员在30 min内即可完成从糖蛋白到待分析样品的N-糖样品制备过程。

参考文献

1. Beck, A.; Wagner-Rousset, E.; Ayoub, D.; Van Dorsselaer, A.; SanglierCianferani, S., Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem* 2013, 85 (2), 715–36.
2. Dalziel, M.; Crispin, M.; Scanlan, C. N.; Zitzmann, N.; Dwek, R. A., Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. *Science* 2014, 343 (6166), 1235681.
3. Kaneshiro, K.; Watanabe, M.; Terasawa, K.; Uchimura, H.; Fukuyama, Y.; Iwamoto, S.; Sato, T. A.; Shimizu, K.; Tsujimoto, G.; Tanaka, K., Rapid quantitative profiling of N-glycan by the glycan-labeling method using 3-aminoquinoline/ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid. *Anal Chem* 2012, 84 (16), 7146-51.
4. Ahn, J.; Bones, J.; Yu, Y. Q.; Rudd, P. M.; Gilar, M., Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans using hydrophilic interaction chromatography columns packed with 1.7 microm sorbent. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010, 878 (3–4), 403–8.
5. Yu, Y. Q.; Ahn, J.; Gilar, M., Trastuzumab Glycan Batch-to-Batch Profiling using a UPLC/FLR/MS Mass Spectrometry Platform. *Waters Application Note 720003576en* 2010.
6. Hilliard, M.; Struwe, W.; Carta, G.; O' Rourke, J.; McLoughlin, N.; Rudd, P.; Yu, Y. Q., A Systematic Approach to Glycan Analysis Using HILIC-UPLC and an Online Database of Standardized Values. *Waters Application Note 720004203en* 2012
7. Hilliard, M.; Struwe, W.; Adamczyk, B.; Saldova, R.; Yu, Y. Q.; O' Rourke, J.; Carta, G.; Rudd, P., Development of a Glycan Database for Waters ACQUITY UPLC Systems. *Waters Application Note 720004202en* 2012.
8. Yu, Y. Q., Analysis of N-Linked Glycans from Coagulation Factor IX, Recombinant and Plasma Derived, Using HILIC UPLC/FLR/QToF MS. *Waters Application Note 720004019en* 2011.

9. Marino, K.; Bones, J.; Kattla, J. J.; Rudd, P. M., A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol* 2010, 6 (10), 713–23.
10. Gillece-Castro, B.; Tran, K. v.; Turner, J. E.; Wheat, T. E.; Diehl, D. M., N-Linked Glycans of Glycoproteins: A New Column for Improved Resolution. *Waters Application Note 720003112en* 2009.
11. Mechref, Y.; Hu, Y.; Desantos-Garcia, J. L.; Hussein, A.; Tang, H., Quantitative glycomics strategies. *Mol Cell Proteomics* 2013, 12 (4), 874–84.
12. Klapoetke, S.; Zhang, J.; Becht, S.; Gu, X.; Ding, X., The evaluation of a novel approach for the profiling and identification of N-linked glycan with a procainamide tag by HPLC with fluorescent and mass spectrometric detection. *J Pharm Biomed Anal* 2010, 53 (3), 315–24.
13. Cook, K. S.; Bullock, K.; Sullivan, T., Development and qualification of an antibody rapid deglycosylation method. *Biologicals* 2012, 40 (2), 109–17
14. Cohen, S. A.; Michaud, D. P., Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1993, 211 (2), 279–87.
15. Cohen, S. A.; DeAntonis, K.; Michaud, D. P., Compositional Protein Analysis Using 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, A Novel Derivatization Reagent. In *Techniques in Protein Chemistry IV*, 1993; pp 289–298.
16. Ivleva, V.; Yu, Y. Q., UPLC/FLR/QToF MS Analysis of Procainamide-Labeled N-Glycans. *Waters Application Note 720004212en* 2012.
17. Kung, L. A.; Tao, S. C.; Qian, J.; Smith, M. G.; Snyder, M.; Zhu, H., Global analysis of the glycoproteome in *Saccharomyces cerevisiae* reveals new roles for protein glycosylation in eukaryotes. *Mol Syst Biol* 2009, 5, 308.
18. Schwalbe, R. A.; Wang, Z.; Bianchi, L.; Brown, A. M., Novel sites of N-glycosylation in ROMK1 reveal the putative pore-forming segment H5 as extracellular. *J Biol Chem* 1996, 271 (39), 24201–6.
19. Lauber, M. A.; Koza, S. M.; Fountain, K. J., Optimization of GlycoWorks HILIC SPE for the Quantitative and Robust Recovery of N-Linked Glycans from mAb Type Samples. *Waters Application Note 720004717EN* 2013.
20. Yu, Y. Q.; Gilar, M.; Kaska, J.; Gebler, J. C., A Deglycosylation and Sample Cleanup Method for Mass

Spectrometry Analysis of N-linked Glycans. Waters Application Note 720001146EN 2007.

21. Yu, Y. Q.; Gilar, M.; Kaska, J.; Gebler, J. C., A rapid sample preparation method for mass spectrometric characterization of N-linked glycans. Rapid Commun Mass Spectrom 2005, 19 (16), 2331–6.
22. Lauber, M. A.; Fournier, J. L.; Koza, S. M.; Fountain, K. J., GlycoWorks HILIC SPE Robust Glycan Sample Preparation. Waters Technology Brief 720005116EN 2014.

特色产品

- [ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio <https://www.waters.com/10166246>](https://www.waters.com/10166246)
- [Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <https://www.waters.com/134798222>](https://www.waters.com/134798222)
- [ACQUITY UPLC FLR检测器 <https://www.waters.com/514222>](https://www.waters.com/514222)
- [ACQUITY QDa质谱检测器 <https://www.waters.com/134761404>](https://www.waters.com/134761404)

可在线购买:

- [ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm 色谱柱 <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186004740>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186004740)
- [ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide 130Å, 1.7 µm, 2.1 x 150 mm <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186004742>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186004742)
- [样品收集组 <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186007988>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186007988)
- [聚丙烯材质12 x 32 mm 螺纹口样品瓶, 容积300 µL <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186002640>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186002640)
- [完整单克隆抗体质量数检查标准品 <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186006552>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186006552)
- [GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒 <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=176003713>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=176003713)

720005275ZH, 2015年1月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.