

GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS N-糖分析试剂盒： 使用手动、半自动或全自动工作流程进行 低通量到高通量N-糖样品制备的可扩展解决 方案

Philip Lambert, Danielle Cullen, Corey Reed, Stephan M. Koza, Matthew A. Lauber, Jennifer L. Fournier, Leanne Davey

Waters Corporation

摘要

本应用纪要证明GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS N-糖样品制备试剂盒可从手动工作流程扩展至半自动及全自动工作流程。

优势

- 通量灵活性和可扩展性：使用GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS N-糖分析试剂盒选件进行低通量至高通量N-糖样品制备，手动、半自动或全自动工作流程均适用。
- 自动处理试剂盒中包含经过充分验证的Tecan脚本和详细的脚本开发参数。
- 试剂盒数量与主要的自动化液体处理平台兼容。

简介

本应用纪要旨在证明GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖分析试剂盒选件的通量灵活性和可扩展性。产品选件有：适用于低通量到中等通量（半自动）样品制备的GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖分析试剂盒；以及适用于全自动高通量样品制备的自动化GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖分析试剂盒。

自推出以来，GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖分析试剂盒为科学家手动制备糖蛋白样品进行N-糖分析提供了一种快速且可重现的方法。新型*RapiFluor*-MS标记物和相关的化学消耗品让生物分析科学家在样品制备效率以及FLR和MS检测灵敏度上获得了明显优势。此手动样品制备工作流程非常适合样品通量相对较低或无法使用自动液体处理平台的实验室。

对于其它实验室，则可以利用自动工作流程进一步提升GlycoWorks的效率，尤其是满足中至高通量的需求。除了提高实验室效率外，自动处理复杂的工作流程还可以实现方法的简化和标准化。但是，这些实验室在使现有工作流程适应自动处理方法，以及创建和验证自动化脚本方面存在挑战。

为解决这些挑战，沃特世公司倾力推出自动化GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖分析试剂盒，以及一系列半自动和全自动工作流程，将现有的快速*RapiFluor*-MS和相关化学消耗品的优势与自动化的优势结合起来。

实验

分析方法条件（除非另有说明）

通用N-糖分析方法

LC条件

LC系统：

ACQUITY UPLC I-Class或

ACQUITY UPLC H-Class Bio，配备ACQUITY
UPLC

FLR荧光检测器

色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH Amide糖基分析专用柱， 130Å, 1.7 µm, 2.1 x 150 mm (部件号：186004742)
柱温	60 °C
样品温度	10 °C
检测条件	激发光265 nm/发射光425 nm
数据采集速率	10 Hz
初始流速	0.4 mL/min
流动相A：	50 mM甲酸铵溶液 pH 4.4 (部件号：186007081) (推荐使用LC-MS级水[Fisher部件号W6或者 等效试剂]。)
流动相B：	100%乙腈 (推荐使用LC-MS级乙腈， Fisher部件号A955或等效试剂)
密封清洗液和LC：	70% LC-MS级乙腈 (推荐使用LC-MS级乙腈， Fisher部件号A955或等效试剂。) 30% LC-MS级水 ([推荐使用Fisher部件号W6或等效试剂] 。) (v/v)

自动进样器清洗

进样体积：	建议10 μ L (=30 μ L，用DMF/ACN 稀释的SPE洗脱物，2.1 mm内径色谱柱)
进样针：	注入以DMF 作为助溶剂的样品时， 推荐使用 不锈钢进样针

梯度：

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.4	25	75	6
35	0.4	46	54	6
36.5	0.2	100	0	6
39.5	0.2	100	0	6
43.1	0.2	25	75	6
47.6	0.4	25	75	6
55	0.4	25	75	6

数据管理：Empower 3 CDS

样品描述

执行以下规程进行方法比较。

使用手动、半自动(Andrew Alliance)和全自动(Tecan)工作流程；使用同一批糖蛋白（沃特世完整单克隆抗体质量数检查标准品，部件号：186006552）以及同一批自动化GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS N-糖分析试剂盒（部件号：176004152）制备15份N-糖样品。按照每种工作流程说明中指定的试剂浓度来制备样品：

- 手动工作流程：《GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS N-糖分析试剂盒维护和使用手册》(715004793ZH)
- 半自动工作流程：《GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS N-糖分析试剂盒结合Andrew Alliance移液机器人》(720006197EN)
- 全自动工作流程(Tecan)：《自动化GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS N-糖分析试剂盒维护和使用手册》(715005359EN)

*Rapi*Fluor-MS游离寡糖性能测试标准品（部件号：186007983）和*Rapi*Fluor-MS完整单克隆抗体标准品（部件号：186008843）复溶于50 µL水中进行色谱系统基准测试和系统适应性测试。

制得的所有样品均利用同一套ACQUITY UPLC H-Class Bio UPLC-FLR系统进行测试。

结果与讨论

	%CV, n = 15			
	G0F	G1Fa	G1Fb	G2F
手动	0.2	0.1	0.3	0.7
Tecan 48x	1.1	0.6	0.8	1.7
Tecan 96x	0.8	0.5	0.6	1.4
Andrew Alliance	0.4	0.5	0.3	0.7

表1.手动、半自动(Andrew Alliance)和全自动(Tecan) GlycoWorks样品制备方法得到的样品N-糖峰面积百分比测量值精度数据(%CV, n=15)

为了定性比较样品制备方法，本研究以图表形式展示了每个样品组(n = 15)选定峰的N-糖平均峰面积百分比数据（图1和2）。

方法数据集的初步统计分析（t-检验）表明，这些方法不具备统计学等效性($p < 0.05$)。进一步分析表明，该检验受到每个数据集的高精度限制，在一项模拟检验中，仅对少量数据点进行细微调整即得到 $p > 0.05$ 的结果。

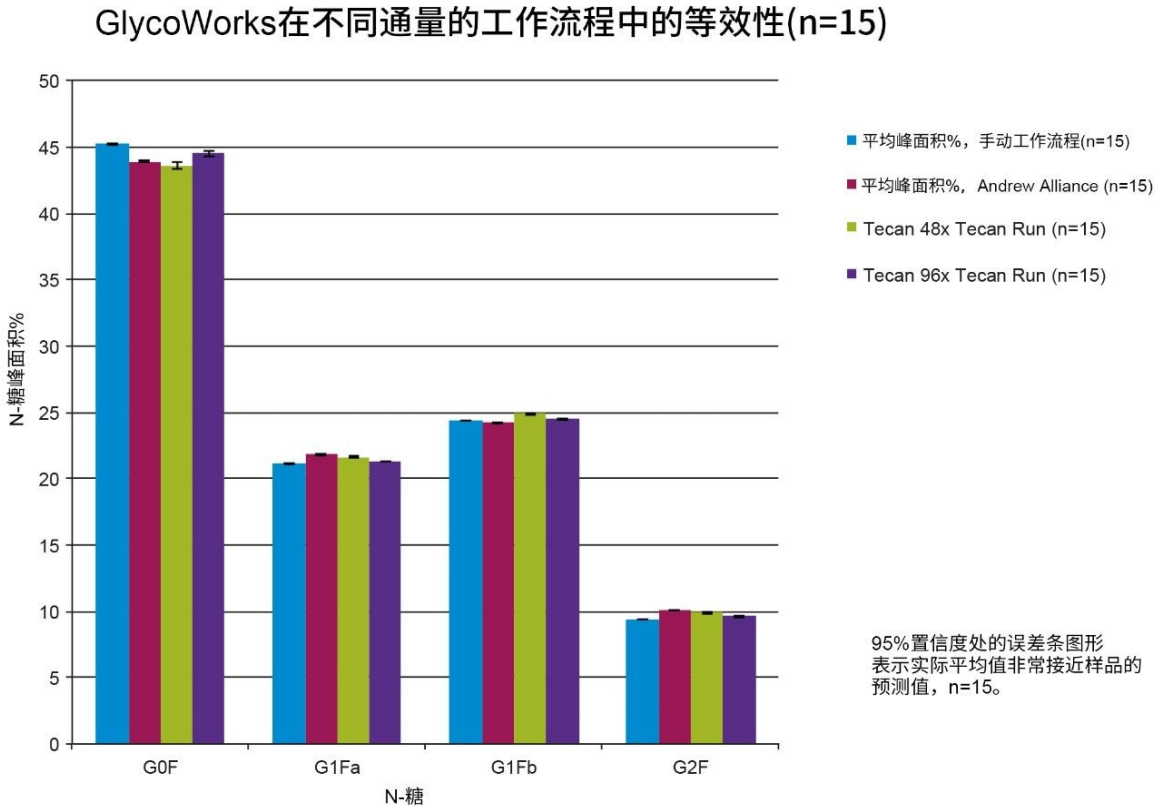


图1.手动、半自动(*Andrew Alliance*)和全自动(*Tecan*) *GlycoWorks*样品制备的N-糖样品峰面积百分比数据

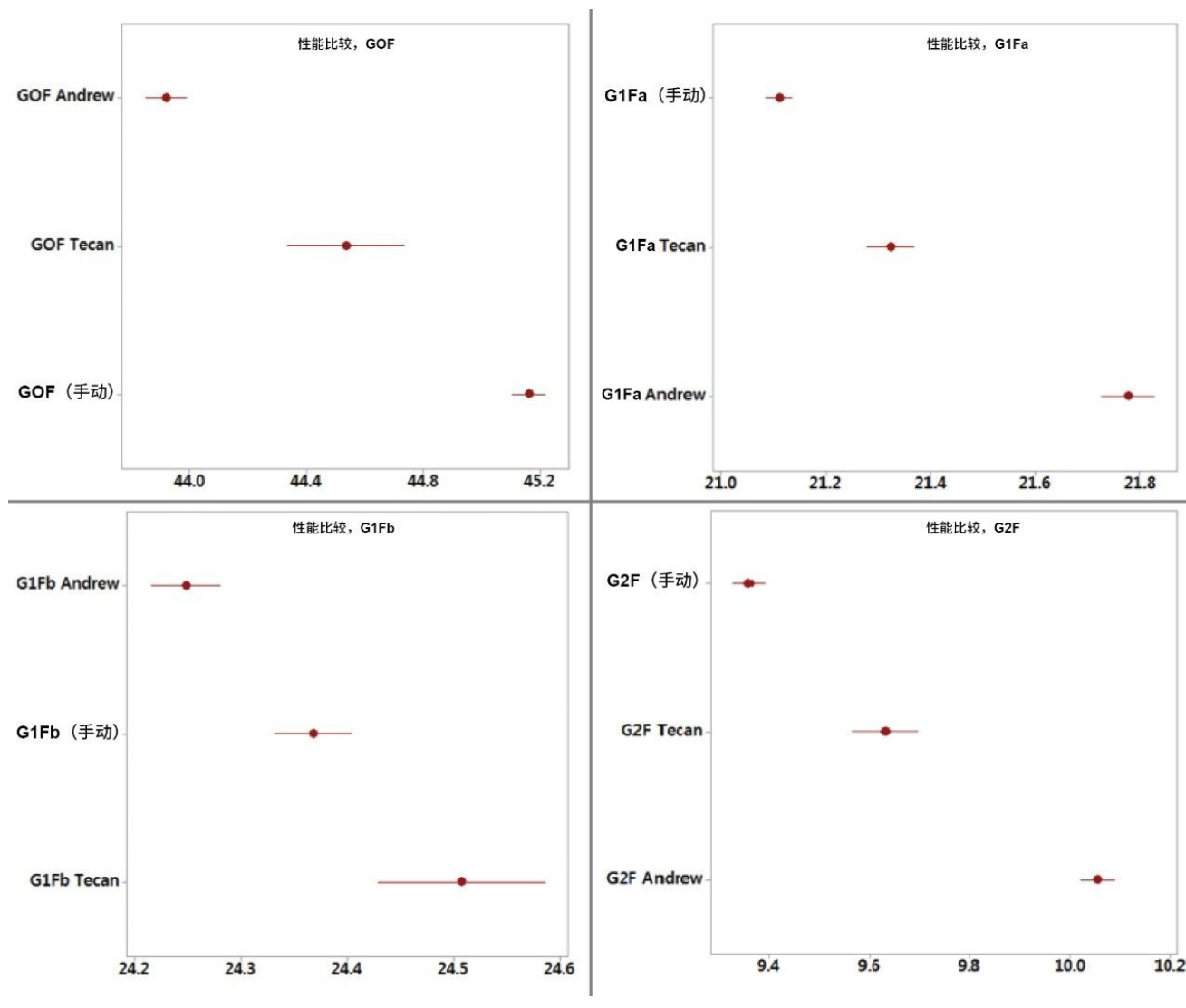


图2.GOF、G1Fa、G1Fb和G2F的性能比较结果，展示了每种方法的平均峰面积百分比值和每项测量的精度。

本研究开展了进一步统计分析，以量化自动方法相对于手动方法的偏差，以及半自动方法相对于全自动方法的偏差。将每个N-糖峰面积百分比数据集的最小值至最大值制成表格进行评估，并计算平均偏差百分比（估算值和95%置信区间）（表2-4）。

N-糖	手动 最小值-最大值	Tecan 最小值-最大值	综合 SD	平均偏差%	
				估算值	95% CI
G0F	45.030-45.320	44.020-45.110	0.402	-0.625	-0.849至-0.428
G1Fa	21.080-21.160	21.180-21.500	0.213	0.213	0.151至0.273
G1Fb	24.230-24.510	24.280-24.750	0.141	0.141	0.061至0.222
G2F	9.210-9.460	9.420-9.820	0.269	0.269	0.173至0.366

表2.全自动Tecan与手动GlycoWorks N-糖样品制备方法的比较结果

N-糖	手动 最小值-最大值	Andrew Alliance 最小值-最大值	SD	平均偏差%	
				估算值	95% CI
G0F	45.030-45.320	43.600-44.160	0.206	-1.243	-1.357至-1.129
G1Fa	21.080-21.160	21.640-21.980	0.665	0.125	0.596至0.734
G1Fb	24.230-24.510	24.120-24.360	0.123	-0.119	-0.188至-0.051
G2F	9.210-9.460	9.960-10.200	0.112	0.693	0.631至0.756

表3.半自动Andrew Alliance与手动GlycoWorks N-糖样品制备方法的比较结果

N-糖	Andrew Alliance 最小值-最大值	Tecan 最小值-最大值	SD	平均偏差%	
				估算值	95% CI
G0F	43.600-44.160	44.020-45.110	0.430	0.618	0.380至0.856
G1Fa	21.640-21.980	21.180-21.500	0.146	-0.452	-0.533至-0.371
G1Fb	24.120-24.360	24.280-24.750	0.187	0.261	0.157至0.364
G2F	9.960-10.200	9.730-9.950	0.159	-0.424	-0.512至-0.336

表4.Andrew Alliance与Tecan GlycoWorks N-糖样品制备方法的比较结果

沃特世开发的半自动和全自动样品制备工作流程可与GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒以及自动化GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒结合使用，提供N-糖谱图面积百分比结果，相对于已有的手动GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖样品制备工作流程不存在显著偏差。

半自动和全自动方法的测量精度很高，均<2% CV（表1）。因此，自动化GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒可应用于高效、自动处理、高通量的N-糖样品制备流程，不会明显降低精度。进一步统计分析展示了半自动和全自动方法的预期测量范围（最小值-最大值）和测量偏差（表2和3）。

本应用纪要提供的数据可帮助生物制药科学家评估每种方法的分析性能。

结论

沃特世推出了一系列经过验证的产品和自动化N-糖样品制备工作流程，帮助科学家大幅提升效率和通量灵活性。本应用纪要证明GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖样品制备试剂盒可从手动工作流程扩展至半自动及全自动工作流程。

自动化GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒内随附经验证的Tecan脚本，可使N-糖样品制备实现完全自动化。试剂盒中的试剂数量经过精心设计，可与其它主要的自动化液体处理产品兼容。高效的RapiFluor-MS标记物和GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒的相关化学消耗品相结合，搭配经验证的自动化工作流程和脚本，为实验室提供了利用现有自动化资源的有效方法。

这些GlycoWorks自动化资源组成一套完善的产品系列，可发挥出色的灵活性，从而满足实验室的通量要求并匹配其自动化资源。如需了解关于手动工作流程、半自动工作流程(Andrew Alliance)以及全自动工作流程(Tecan)的更多资源，请访问<http://wvmc.waters.com/glycans/>，查看相应的应用纪要。

特色产品

Empower 3色谱数据软件 <<https://www.waters.com/513188>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC FLR检测器 <<https://www.waters.com/514222>>

720006322ZH, 2018年6月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号