

应用纪要

使用Andrew+移液机器人实现GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS自动化

Corey E. Reed, Stephan M. Koza, Steven Calciano

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

使用Andrew Alliance（沃特世下属公司）提供的Andrew+移液机器人，实现GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS N-糖试剂盒的自动化并验证性能。验证要求包括：与同数量样品的手动前处理结果相比，总峰面积偏差 $\leq 25\%$ ，相对峰面积偏差 $\leq 5\%$ 。在验证过程中，由于自动化方案中的消耗品变化导致非特异性样品损失平均达到45%，因此显然需要对方案进行优化。采取一些更改措施以缓解样品损失问题，然后与手动方案比较，自动化方案表现出88%的回收率。在整个优化过程中，相对峰面积一直保持较高的重现性，且自动方案的相对峰面积偏差与手动方案相比不超过2.6%。

优势

- 简便易用且节省时间
- 提高效率并减少故障，从而节省成本
- 经济有效的机器人解决方案
- 协同自动化
- 快速N-糖标记

- 减少分析人员压力
- 突破分析瓶颈
- 自动方法转移

简介

在生物药开发过程中，通常将糖基化作为一项关键质量属性(CQA)进行监测，因为它是衡量生产条件一致性、产品疗效和安全性的指标^{1,2}。传统的游离N-糖标记方法可能需要数小时甚至数天才能完成。此外，传统标记通常不稳定，并且无法同时提供优异的荧光和质谱检测灵敏度，导致研究实验室只能限定使用其中一种检测方法。

有明确记载的事实显示，沃特世推出的GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS N-糖标记试剂盒及相关方案能够缩短准确标记所需的时间，同时提高荧光和质谱检测能力³。该标记工作流程以及HILIC净化和样品采集工作可在一小时内完成（具体取决于样品数量），且该方法操作简单，实现自动化相对容易⁴。该程序实现自动化的主要优势在于，能够缩短分析人员进行样品前处理所需的时间，减少培训和文档记录负担，以及降低因单调乏味的移液操作引发错误的风险。考虑到这一点，2018年，沃特世利用Andrew Alliance移液机器人(Andrew)让GlycoWorks *Rapi* Fluor-MS试剂盒实现了自动化⁵。

该自动化方案经过多轮优化，可确保单克隆抗体(mAb) N-糖的完全释放和标记与手动执行方案时获得的结果相当。同一样品的用户手动制备方案与自动方案相比，小鼠单克隆抗体标准品中释放的主要糖型和次要糖型的相对标准差为9-19%。

2019年，Andrew Alliance发布新版移液机器人，名为Andrew+（图1）。该系统采用网络连接装置以及可同时兼容单通道和多通道电子移液的改良机械臂，大幅节省时间并提高样品处理通量。本应用简报详细介绍了8样品GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS游离N-糖方案的优化过程。

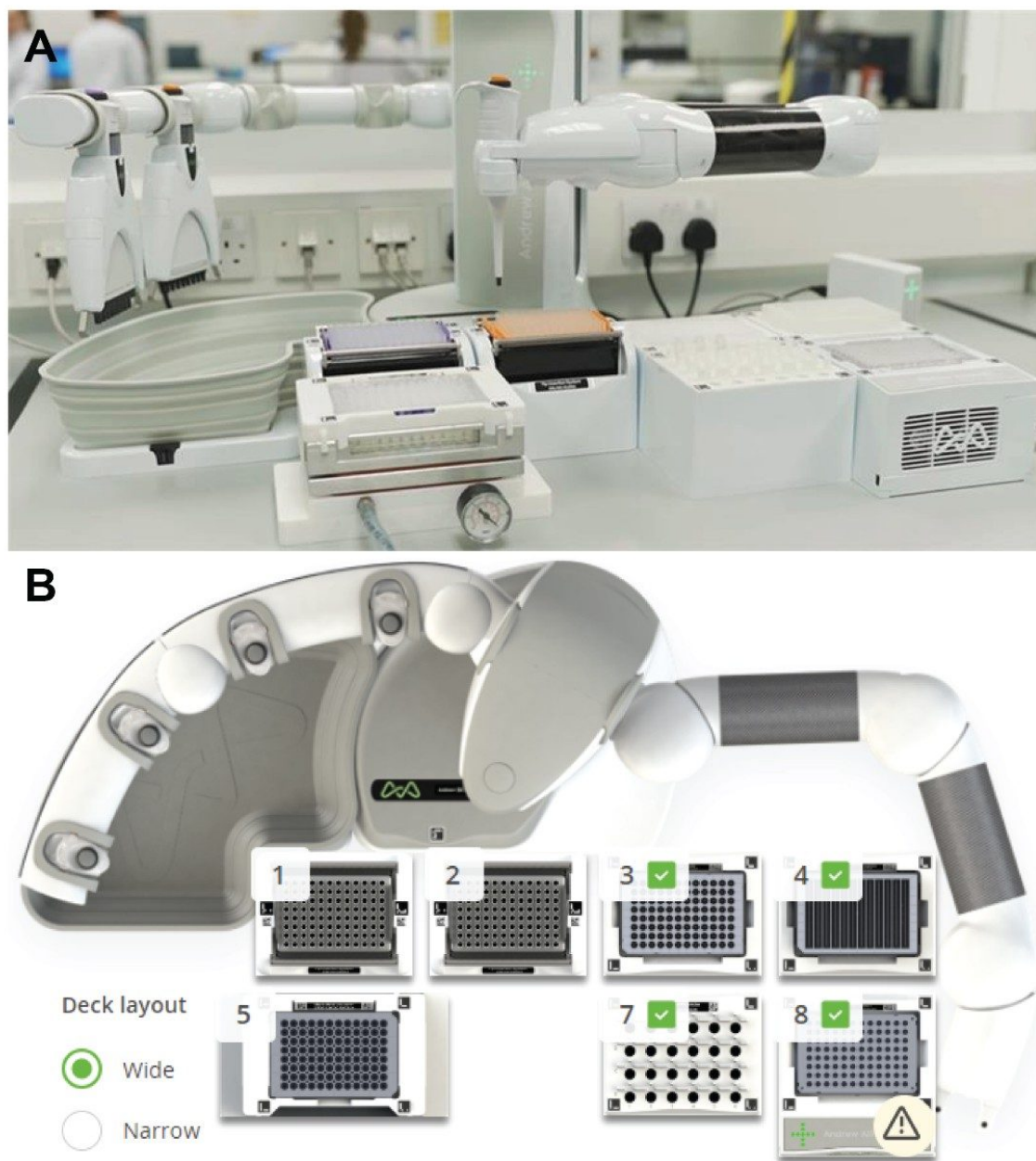


图1.A) 8样品GlycoWorks RapiFluor-MS方案中Andrew+的设置图。B) 8样品GlycoWorks RapiFluor-MS方案中Andrew+设置的OneLab俯视图。自动化工作台空间上的Domino包括：(1)配备50 - 1200 μ L Optifit移液吸头的吸头盒Domino；(2)配备10 - 300 μ L Optifit移液吸头的吸头盒Domino；(3)配备QuanRecovery 700 μ L 96孔样品板（采用MaxPeak HPS技术）的储存样品板Domino；(4)配备Axygen

12孔溶剂瓶和12通道加样槽的深孔板*Domino*；(5)配备*GlycoWorks HILIC μ Elution*提取板的 *μ Elution*提取板*Vacuum+ Domino*；(7)配备*Fisherbrand Premium 1.5 mL*锥形微量离心管（用于*PNGase F*酶、*RapiFluor-MS*标记试剂和*RapiGest-SF*表面活性剂）的微量离心管*Domino*；(8)配备*Eppendorf twin.tec* 96孔带裙边*LoBind PCR*板（盛装待分析样品）的96-PCR板*Peltier+ Domino*。

结果与讨论

使用Andrew+开发自动化方案的过程中进行了多次消耗品变更，目的是确保能够与SBS/SLAS微孔板规格⁶兼容，从而集成标准实验器皿以及用于加热和抽真空的连接装置。在手动方案操作中，利用1.2 mL样品反应管进行蛋白变性、去糖基化并用预设所需温度的加热块进行标记。自动化方案利用高速SBS规格的Peltier装置，但手动工作流程中使用的1.2 mL反应管不再适用。因此，在反应步骤中采用200 μ L 96孔Eppendorf Lo-Bind PCR板。自动化方案会针对各反应管优化样品板规格，使其与各种连接装置和8通道移液器兼容。但是，在该方案的关键点需要强制更换体积为200 μ L的小型Eppendorf板。

完成该方案的标记步骤之后，将40 μ L反应体积用360 μ L乙腈稀释，使总反应体积达到400 μ L，这与200 μ L的96孔PCR板不兼容。一种解决方法是，在将样品添加到HILIC μ Elution提取板之前，用1 mL 96孔板将反应体积稀释至400 μ L。然后将稀释后的体积转移到HILIC样品板中进行净化，再进行分析。使用的分析方法可参见《*GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒维护和使用手册*》（部件号[715004793ZH](https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=134829211&type=USRM) <<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=134829211&type=USRM>>）。图2为经过预优化的自动化方案与经验丰富的用户手动处理方案比较的结果。

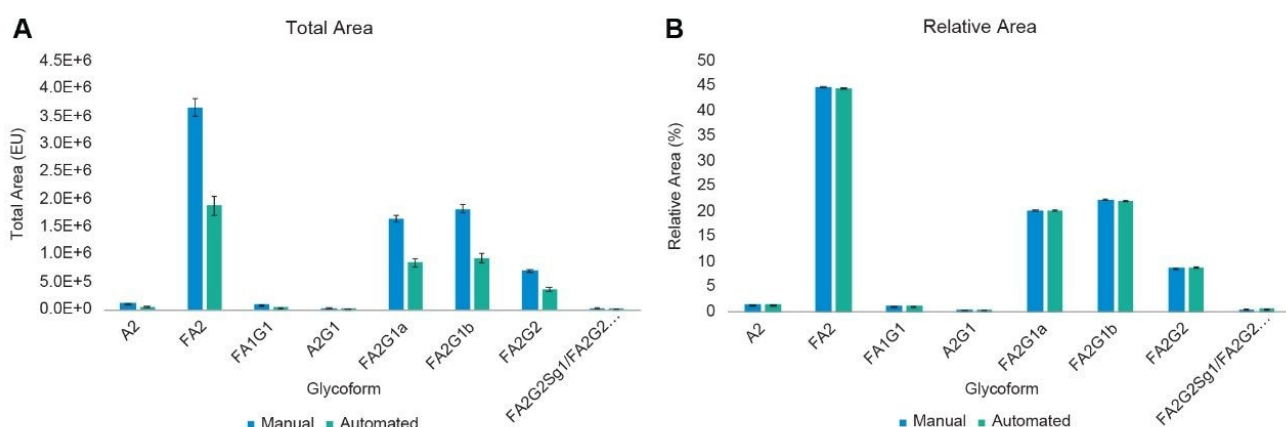


图2.同一天对小鼠IgG1蛋白完整单克隆抗体质量数检查标准品（部件号：[186006552](#)）进行八次手动和自动化样品前处理，在同一样品组中进行分析。为减少工作量，八个手动处理的样品中有四个未分析。八个自动化处理的样品全都进行了分析，以确保未完全失败。计算样品结果的平均值，误差条表示所有样品的标准差。A)色谱图中所有八种游离寡糖的总峰面积比较。B)同样八个游离寡糖峰的相对峰面积比较。

该自动化方案与用户手动处理方案不具可比性。总峰面积比较结果显示，与手动方案相比，自动化方案中8种游离寡糖的平均回收率为54%（表1）。需要注意的是，观察到的样品损失无偏差，因为自动和手动样品前处理之间的相对峰面积保持恒定。该结果明显超出自动化方法的可接受标准（即，总峰面积在手动方法的25%以内）。

Peak	Manual		Automated		Comparison	
	Total Area	Relative Area	Total Area	Relative Area	Total Area	Relative Area
A2	123,162.63	1.51	63,989.88	1.50	51.96	99.96
FA2	3,667,162.75	44.88	1,895,823.06	44.60	51.70	99.38
FA1G1	99,699.00	1.22	51,388.31	1.21	51.54	99.08
A2G1	37,437.25	0.46	19,971.38	0.47	53.35	102.60
FA2G1a	1,651,808.00	20.22	862,653.75	20.29	52.22	100.38
FA2G1b	1,829,892.88	22.40	944,003.88	22.21	51.59	99.16
FA2G2	715,667.88	8.76	381,768.75	8.98	53.34	102.49
FA2G2Sg1/ FA2G2Ga2	46,392.75	0.57	31,299.25	0.74	67.47	129.52
				Average =	54.15	104.07

表1.图2所示自动化和手动样品处理数据的总峰面积计数（用发射单位(EU)表示）和相对峰面积计数(%), 还显示了样品自动化处理与手动处理的比较结果。

为确定样品损失原因，必须对方案进行故障排除。排除反应步骤（变性、去糖基化和*RapiFluor*-MS标记）以及样品净化步骤作为分析物显著损失的潜在原因后，推断样品损失的主要原因是使用了1 mL 96孔板稀释样品。修改实验程序或实验器皿无法充分改善该稀释步骤中的分析物回收率。

但是，取消方案中的储存位置，直接在 μ Elution提取板中混合样品后，自动化样品前处理的回收率显著提高（图3）。最终的自动化8样品GlycoWorks *RapiFluor*-MS方案在HILIC μ Elution提取板中预加入200 μ L乙腈，然后用160 μ L乙腈将反应溶液稀释至200 μ L，再转移到HILIC板中混合至最终体积400 μ L。与经验丰富的用户手动处理相比，该方案表现出88%的回收率。与所有其他检测一样，手动和自动化前处理之间的相对峰面积（包括低浓度游离寡糖）高度相似（表2）。需要注意的是，前处理批次内的相对标准差表明自动化解决方案的总峰面积重现性优于用户手动处理方案（表3）。两种前处理方法之间相对峰面积的相对标准差相当。

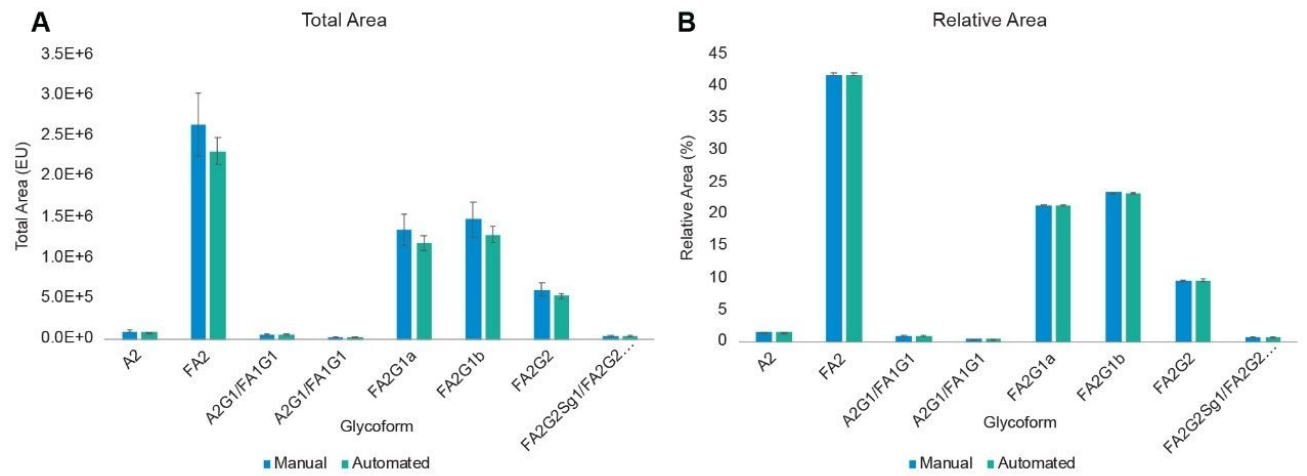


图3.最终的GlycoWorks *RapiFluor*-MS 8样品方案。数据为手动和自动化8样品前处理方案的累积值。在所有情况下， $N = 16$ 。A)色谱图中所有八种游离寡糖的总峰面积比较。B)同样八个游离寡糖峰的相对峰面积比较。

Glycan	Total Area		Comparison	Relative Area		
	Manual	Automated		Manual	Automated	Comparison
A2	96,643.56	84,044.66	86.96	1.53	1.52	99.57
FA2	2,642,255.63	2,313,827.81	87.57	41.90	41.91	100.02
A2G1/ FA1G1	62,134.00	55,083.25	88.65	0.99	1.00	101.08
A2G1/ FA1G1	28,161.31	25,316.84	89.90	0.45	0.46	102.52
FA2G1a	1,348,973.03	1,181,814.28	87.61	21.39	21.40	100.05
FA2G1b	1,475,253.97	1,289,646.13	87.42	23.39	23.36	99.85
FA2G2	608,925.28	533,387.41	87.59	9.67	9.66	99.94
FA2G2Sg1/ FA2G2Ga2	42,667.00	37,987.63	89.03	0.69	0.69	100.64
		Average =	88.09		Average =	100.46

表2.图3所示最终自动化GlycoWorks方案样品处理数据的总峰面积计数（用发射单位(EU)表示）和相对峰面积计数(%)，还显示了样品自动化处理与手动处理的比较结果。

N-Glycal	Relative Standard Deviation			
	Total area		Relative area	
	Manual	Automated	Manual	Automated
A2	16.8	7.6	3.0	3.1
FA2	14.6	7.1	0.5	0.6
A2G1/FA1G1	13.6	7.6	1.9	1.4
A2G1/FA1G1	13.5	7.8	2.3	3.5
FA2G1a	14.6	7.1	0.2	0.3
FA2G1b	14.7	7.2	0.4	0.4
FA2G2	13.8	7.1	1.2	1.8
FA2G2Sg1/FA2G2Ga2	8.9	13.9	12.9	14.0
Average	13.8	8.2	2.8	3.1

表3.图3所示的手动和自动化8样品GlycoWorks前处理的相对标准差比较结果。绿色单元格突出显示了两种前处理方法之间各峰较低的相对标准差。

结论

使用自动化8样品GlycoWorks RapiFluor-MS方案进行的初步检测表明，样品损失原因存在于该方案的特定环节。经确定，样品损失原因是储存步骤。取消储存位置，直接在HILIC μ Elution提取板中完全稀释样品后，与经验丰富的用户手动处理相比，采用自动化方案得到标记游离寡糖的回收率提高至88%。这完全符合优化过程开始时设定的偏差限值 $\leq 25\%$ 的要求。即使存在样品损失问题，所有检测的相对峰面积也保持一致，证明GlycoWorks方案具有稳定性。总体而言，采用Andrew+的自动化8样品GlycoWorks RapiFluor-MS方案提供了一种经济高效且易于实施的游离N-糖分析解决方案。

参考文献

1. Fournier, J. A Review of Glycan Analysis Requirements. *BioPharm International*. 2015, 28 (10), 32-37.
2. Dahodwala, H.; Sharfstein, S. T. *Biosimilars: Imitation Games*; ACS Publications, 2017.
3. Lauber, M. A.; Yu, Y.-Q.; Brousmiche, D. W.; Hua, Z.; Koza, S. M.; Magnelli, P.; Guthrie, E.; Taron, C. H.; Fountain, K. J. Rapid Preparation of Released N-Glycans for HILIC Analysis Using a Labeling Reagent That Facilitates Sensitive Fluorescence and ESI-MS Detection. *Anal. Chem.* 2015, 87 (10), 5401–5409.
4. Koza, S. M.; McCall, S. A.; Lauber, M. A.; Chambers, E. E. Quality Control and Automation Friendly GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Sample Preparation. Waters Application Note, [720005506EN](https://www.waters.com/waters/library.htm?&lid=134865160) <<https://www.waters.com/waters/library.htm?&lid=134865160>> , May 2020.
5. Reed, C. E.; Fournier, J.; Vamvoukas, N.; Koza, S. M. Automated Preparation of MS-Sensitive Fluorescently Labeled N-Glycans with a Commercial Pipetting Robot. *SLAS Technol. Transl. Life Sci. Innov.* 2018, 23 (6), 550-559.
6. Secretariat, S. for L. A. and S. ANSI SLAS 2-2004 (R2012). American National Standards Institute (ANSI) 2004.

特色产品

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

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒 <<https://www.waters.com/134828150>>

Andrew+移液机器人 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135070059>>

720006971ZH, 2020年8月

© 2022 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