

## 使用Andrew+移液机器人自动化完成中高通量的GlycoWorks *RapiFluor*-MS样品前处理

---

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提供的Andrew+移液机器人，实现GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖标记24和48样品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 $\leq 5\%$ 。此外，前处理批次内的相对标准差也必须满足上述要求。结果表明，24样品自动化方案与手动前处理方案相比，总峰面积偏差为12.3%，相对峰面积偏差为0.0%。48样品自动化方案的结果也与24样品手动前处理方案相当，总峰面积偏差为23.0%，相对峰面积偏差为0.0%。48样品自动化方案还表现出优异的前处理批次内重现性，2次前处理得到的总峰面积相对标准差分别为11.6%和15.2%。

### 优势

- 中等通量N-糖分析
- 高通量N-糖分析
- 经济有效的机器人解决方案
- 协同自动化
- 快速N-糖标记

- 自动方法转移
- 为终端用户节省时间
- 提高效率

---

## 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<sup>1,2</sup>。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，并且标记通常不稳定。此外，传统标记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 *RapiFluor*-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<sup>3</sup>。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<sup>4</sup>。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 *RapiFluor*-MS试剂盒实现了自动化<sup>5</sup>。

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。本应用简报提供的数据表明，该自动化平台适用于处理中等通量（24个样品）和高通量（48个样品）的GlycoWorks *RapiFluor*-MS游离N-糖分析。

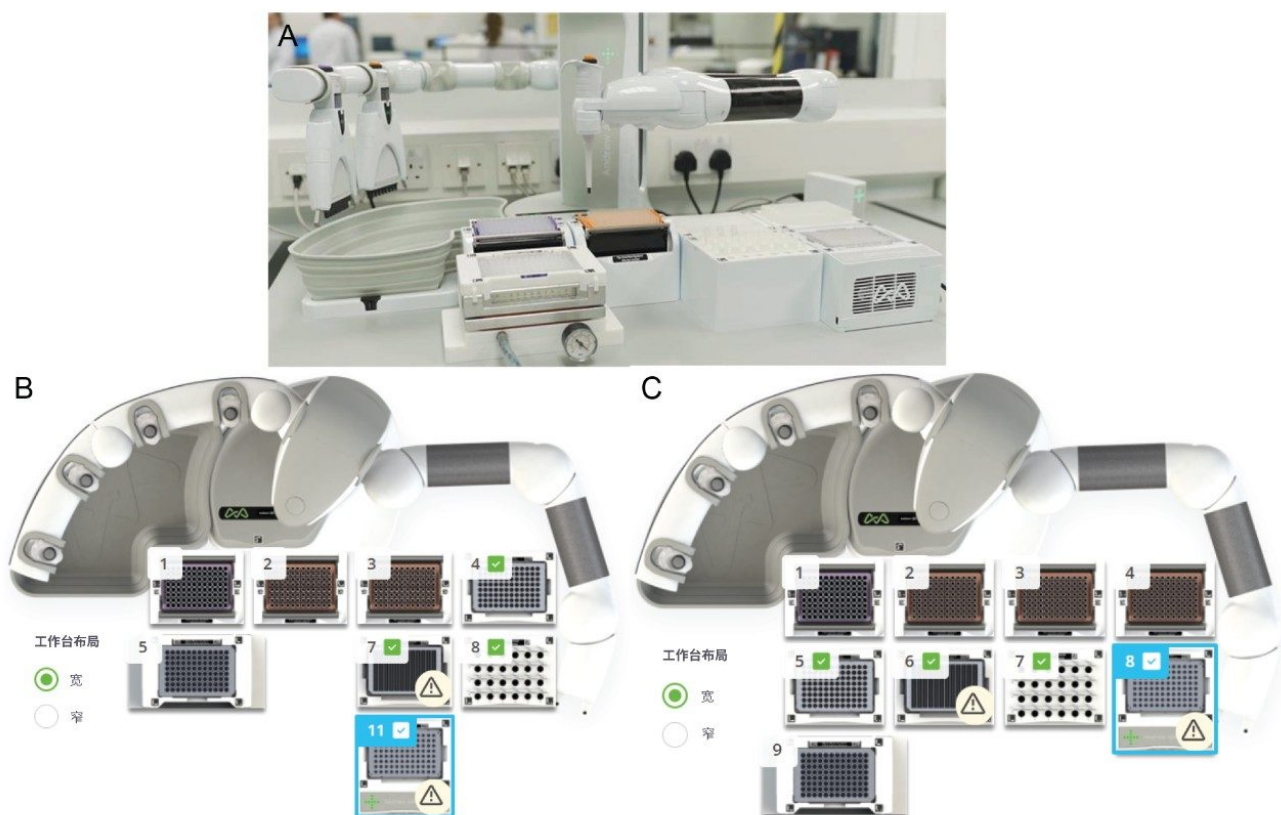


图1.A) 8样品GlycoWorks RapiFluor-MS方案中Andrew+的设置图。

B) 24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  $\mu\text{L}$  Optifit移液吸头的吸头盒Domino；(2)配备10 - 300  $\mu\text{L}$  Optifit移液吸头的吸头盒Domino；(3)配备10 - 300  $\mu\text{L}$  Optifit移液吸头的吸头盒Domino；(4)配备Waters QuanRecovery 700  $\mu\text{L}$  96孔样品板（采用MaxPeak HPS技术）的储存样品板Domino；(5)配备Waters GlycoWorks HILIC  $\mu\text{Elution}$ 提取板的 $\mu\text{Elution}$ 提取板Vacuum+ Domino；(7)配备Axygen 12孔溶剂瓶和12通道加样槽的深孔板Domino；(8)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；(11)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。

C) 48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  $\mu\text{L}$  Optifit移液吸头的吸头盒Domino；(2)配备10 - 300  $\mu\text{L}$  Optifit移液吸头的吸头盒Domino；(3)配备10 - 300  $\mu\text{L}$  Optifit移液吸头的吸头盒Domino；(4)配备10 - 300  $\mu\text{L}$  Optifit移液吸头的吸头盒Domino；(5)配备Waters QuanRecovery 700  $\mu\text{L}$  96孔样品板（采用MaxPeak HPS技术）的储存样品板Domino；(6)配备Axygen 12孔溶剂瓶和12通道加样槽的深孔板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；(9)配备Waters GlycoWorks HILIC  $\mu\text{Elution}$ 提取板的 $\mu\text{Elution}$ 提取板

---

## 结果与讨论

之前的应用简报中详细介绍了在Andrew+系统上优化低通量（8个样品）GlycoWorks *RapiFluor*-MS方案的过程<sup>6</sup>。由于执行中高通量的样品前处理方案需要额外的时间，因此方案的洗脱和后期样品稀释步骤所用的重要试剂不会立即添加到自动化工作台上。这样做的目的在于防止试剂蒸发并防止因体积减小而导致本可避免的移液错误。在开发和测试这些自动化方案的过程中，使用快速分析方法加快开发速度。为简化处理流程，只监测小鼠单克隆抗体的4个主峰。图2显示了中等通量（24个样品）自动化方案的验证结果。

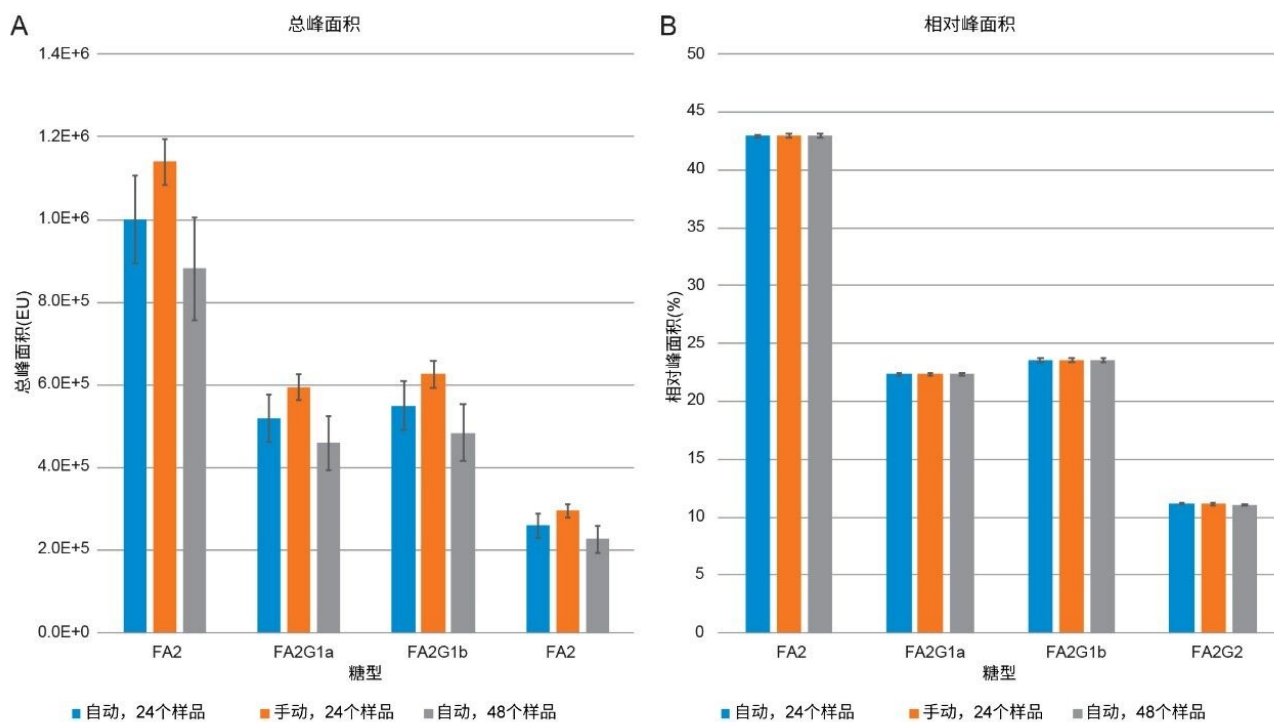


图2.小鼠IgG1蛋白完整单克隆抗体质量数检查标准品（部件号186006552 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186006552-intact-mab-mass-check-standard.html>>）的手动和自动化24样品前处理以及自动化48样品前处理结果。数据集为不同日期2次前处理的累积数据，对于24样品前处理方案，总N = 48；对于48样品前处理方案，总N = 96。

A) 色谱图中4种主要糖型的总峰面积比较。

B) 同样4种糖型的相对峰面积比较。

与经验丰富的用户手动前处理方案相比，利用自动化24样品前处理方案得到的结果偏差在方案验证设定的偏差限值25%范围内，使用自动化平台得到标记游离寡糖的回收率高达87.7%（表1）。此外，相对峰面积比较显示与手动样品前处理的偏差为0%。总体而言，中等通量GlycoWorks RapiFluor-MS自动化解决方案的结果与手动解决方案相当。

总峰面积												
N-糖	24样品前处理				48样品前处理				自动1	自动2	平均值	比较
	手动1	手动2	平均值	自动1	自动2	平均值	比较					
FA2	1162780	1116735	1139758	1045290	954464	999877	88	840721	922032	881377	77	
FA2G1a	608030	579670	593850	544854	495734	520294	88	438922	479768	459345	77	
FA2G1b	638938	612132	625535	573011	524491	548751	88	463968	505430	484699	77	
FA2G2	304483	287248	295865	272423	246837	259630	88	218538	237150	227844	77	
						平均值 =	88			平均值 =	77	

相对峰面积												
N-糖	24样品前处理				48样品前处理				自动1	自动2	平均值	比较
	手动1	手动2	平均值	自动1	自动2	平均值	比较					
FA2	43	43	43	43	43	43	100	43	43	43	100	
FA2G1a	22	22	22	22	22	22	100	22	22	22	100	
FA2G1b	24	24	24	24	24	24	100	24	24	24	100	
FA2G2	11	11	11	11	11	11	100	11	11	11	100	
						平均值 =	100			平均值 =	100	

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。

图2还显示了高通量（48个样品）自动化方案的验证结果。原本尝试比较自动化48样品前处理方案与手动48样品前处理方案，但经过多次尝试，经验丰富的用户也无法手动有效处理如此之多的样品。而这正好凸显了利用Andrew+机器人实现高通量程序自动化的优势。计算两次前处理结果的平均值，机器人处理得到的标记N-糖回收率与中等通量方法处理得到的回收率（图2）相当，与手动处理中等通量样品相比，总峰面积偏差为23%，相对峰面积偏差为0%（表1）。

总体而言，使用自动化前处理方案时，总峰面积的相对标准差略高于由经验丰富的用户手动进行前处理得到的结果（表2）。自动化24样品前处理方案显示的相对标准差不超过11.3%，自动化48样品前处理方案显示的相对标准差不超过15.6%。对于相对峰面积，所有前处理方案（自动和手动）的平均相对标准差均约0.5%，再次证明GlycoWorks RapiFluor-MS方案在保持准确标记方面的稳定性。

前处理批次内相对标准差												
N-糖	总峰面积						相对峰面积					
	24个样品				48个样品		24个样品				48个样品	
	自动1	自动2	手动1	手动2	自动1	自动2	自动1	自动2	手动1	手动2	自动1	自动2
FA2	10.9	8.2	4.9	3.9	11.6	14.8	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.4
FA2G1a	11.1	8.4	5.0	4.4	11.6	15.3	0.7	0.6	0.6	0.7	0.5	0.7
FA2G1b	11.0	8.2	5.2	3.6	11.7	15.1	0.6	0.7	0.5	0.7	0.6	0.7
FA2G2	11.3	8.3	5.2	3.9	11.7	15.6	0.5	0.6	0.5	0.7	0.5	0.7
平均值	11.1	8.3	5.1	4.0	11.6	15.2	0.6	0.5	0.5	0.6	0.5	0.6

表2.手动和自动化24样品前处理以及自动化48样品GlycoWorks前处理的相对标准差比较

## 结论

使用Andrew+液体处理平台开发自动化中等通量（24个样品）和高通量（48个样品）GlycoWorks RapiFluor-MS 方案。上述自动化解决方案使GlycoWorks产品脚本更加完善，这些脚本能够运用于运行Andrew+系统所需的OneLab软件中，并可以立即下载。两种脚本与手动执行的方案均表现出优异的可比性，满足相应的偏差要求，即，与手动前处理的样品相比，总峰面积的偏差 $\leq 25\%$ ，相对峰面积的偏差 $\leq 5\%$ 。

## 参考文献

1. Fournier, J. A Review of Glycan Analysis Requirements.2015.
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 (720005506EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2016/quality-control-automation-glycoworks-rapifluor.html>> ).Waters Corporation 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. Reed, C. E.; Koza, S. M.; Calciano, S. GlycoWorks *RapiFluor*-MS Automation Using the Andrew+ Pipetting Robot (720006971EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/glycoworks-rapifluor-ms-automation-using-the-andrew-pipetting-robot.html>> ). Waters Corporation August 2020.

---

## 特色产品

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

[ACQUITY UPLC FLR检测器 <https://www.waters.com/514222>](https://www.waters.com/514222)

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

720007008ZH, 2020年9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