

利用*Rapi* Fluor-MS标记糖基自动化完成富含二硫键的糖蛋白样品前处理

Yamin Htet, Stephan M. Koza

Waters Corporation

摘要

N-糖会影响许多治疗性蛋白质的安全性和有效性，因此在生物治疗药物的质量控制中受到常规监测。现行糖基分析方法是使用经过充分研究的单克隆抗体(mAb)糖基开发的。本文介绍了一种互补方法，能够对人绒毛膜促性腺激素(hCG)（一种高度复杂的糖蛋白，含有多个二硫键）释放的N-糖提供可重现糖谱。自动化还原蛋白质实验方案对于商业以及研究环境均适用。

优势

- 快速自动化方案，能够在1 h内处理32个样品
- 对复杂且富含二硫键的糖蛋白提供可重现糖谱
- 符合质量控制要求的方案，商业环境和研究应用均适用

简介

N-糖分析具有挑战性，但属于常规分析

许多治疗性糖蛋白由N-糖组成，这些N-糖在蛋白质的折叠、构象和稳定性中发挥关键作用¹。N-糖是在天冬酰胺(Asn)侧链的氮原子处以共价键连接糖蛋白的糖¹。与化学合成不同，N-糖的生物合成是一项协同工作，在不同阶段有多种酶参与，因此会产生多种N-糖结构：高甘露糖、杂合物、复合物¹。由于此类结构异质性，游离寡糖分析充满多项技术挑战²。

糖基对生产条件非常敏感，还会影响生物治疗药物的有效性和临床安全性²。因此，药物开发人员和制造商必须对糖蛋白释放的游离寡糖进行监测、表征和鉴定，以确保生物治疗药物的质量²。此外，N-糖基化蛋白质常作为多种疾病（例如睾丸癌³和异位妊娠⁴）的生物标志物进行分析。这些与疾病相关的糖蛋白的结构和异质性越来越复杂⁴。一种促进N-糖释放的方法是还原糖蛋白中的二硫键以帮助糖蛋白展开，暴露不易接近的N-糖以通过PNGase F释放。人绒毛膜促性腺激素(hCG)具有高度复杂的结构，非常适合用作这种方法的候选分析物。hCG主要以在异位妊娠中的作用而为人所知，由复杂型N-糖和多个二硫键组成，如图1所示⁴。



图1.含有N-糖（红色）和二硫键（黄色）的人绒毛膜促性腺激素(hCG)结构。图片来自网站(swissmodel.expasy.org)。

最初，对于富含二硫键的糖蛋白，GlycoWorks RapiFluor-MS程序^{5,6}概述了使用三(2-羧乙基)磷酸(TCEP)作为还原剂的分析方法。TCEP还原虽然与RFMS标记游离寡糖的HILIC分离兼容，但是TCEP还原的副产物已被证明会干扰RFMS标记游离寡糖的反相混合模式(RP/AX)分离。因此，开发出一种使用适量糖蛋白和二硫苏糖醇(DTT)作为还原剂，不会对N-糖的RP/AX分离造成显著干扰的程序。

GlycoWorks RapiFluor-MS还原方案为复杂的N-糖分析提供快速精简的解决方案

这种新型还原方案与采用Andrew+移液机器人的原始GlycoWorks RapiFluor-MS（非还原）方案⁷类似，不同之处在于引入了两种试剂：二硫苏糖醇(DTT)和乙酸铵。DTT用于还原二硫键，以阻碍PNGase F酶对某些N-糖的有效性。使用ACQUITY Premier BEH C₁₈ AX糖基分析专用柱（部件号：[186009758 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009758-acquity-premier-glycan-beh-c18-ax-95a-17--m-21-x-50-mm-column-1-.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009758-acquity-premier-glycan-beh-c18-ax-95a-17--m-21-x-50-mm-column-1-.html)）等RP/AX色谱柱时，利用乙酸铵作为淬灭溶液，尽量减少干扰峰。如果使用HILIC色谱柱，则乙酸铵为可选试剂。还原方案概述见图2，该方案包括3个步骤：1)还原和糖基释放，2)标记和淬灭，3)净化。

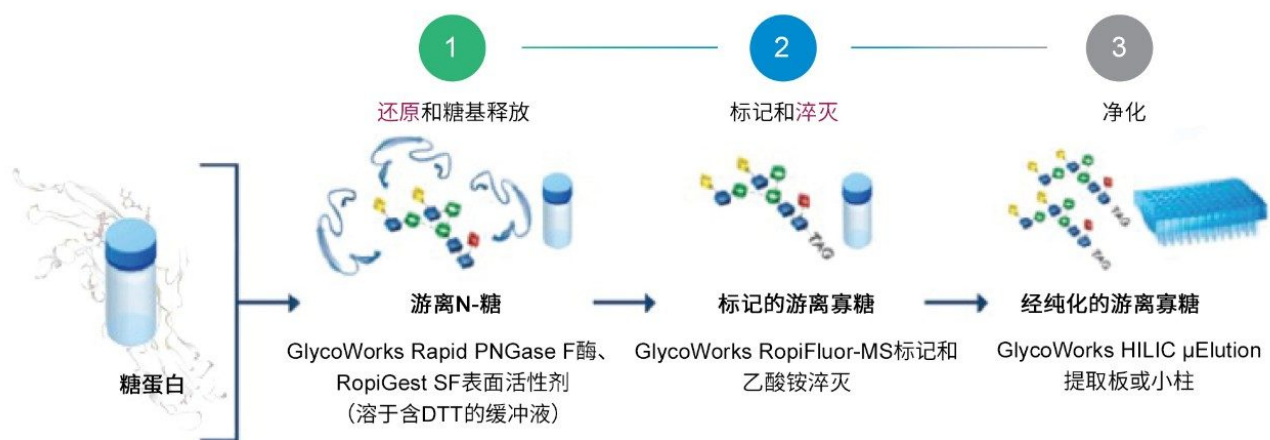


图2.使用GlycoWorks RapiFluor-MS还原方案快速制备复杂N-糖的工作流程。在HILIC分离中，用乙酸铵淬灭为可选项。

实验

样品描述

手动样品前处理方案参考如下：[720006992EN <](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006992en.pdf)

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006992en.pdf>⁸和[720006991EN <](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006991en.pdf)

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006991en.pdf>⁹。适当调整这些方案，使之适应

所用的实验室器皿并保持自动化方案的高游离寡糖回收率。首先制备三种溶液。将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>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186006552-intact-mab-mass-check-standard.html)）（1 mg/瓶）复溶于830 μL 18.2 M Ω 水中，获得1.2 mg/mL mAb溶液。制备含2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DTT变性缓冲液的3% *RapiGest*表面活性剂（部件号：[186008090 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186008090-rapigest-sf-3-mg-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186008090-rapigest-sf-3-mg-1-pk.html)）：首先取3 mg *RapiGest*溶于60 μL GlycoWorks Rapid缓冲液（部件号：[186008939 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/186008939-glycoworks-rapid-deglycosylation-kit---1-x-24.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/186008939-glycoworks-rapid-deglycosylation-kit---1-x-24.html)）中，再向表面活性剂混合物中加入40 μL 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DTT溶液（水）。将Rapid PNGase F酶(30 μL)（部件号：[186008939 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/186008939-glycoworks-rapid-deglycosylation-kit---1-x-24.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/186008939-glycoworks-rapid-deglycosylation-kit---1-x-24.html)）用220 μL 水稀释。将10 μL 1.2 mg/mL糖蛋白分配到96孔板中，然后加入10 μL 含2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DTT变性缓冲液的3% (w/v) *RapiGest*，开始糖基释放。在90 $^{\circ}\text{C}$ 下加热变性3 min后，将溶液冷却至环境温度，然后加入10 μL PNGase F溶液。在50 $^{\circ}\text{C}$ 下继续糖基释放5 min。向装有9 mg RFMS试剂的样品瓶中加入110 μL 无水DMF，抽吸混合，获得*RapiFluor-MS* (RFMS)（部件号：[186008091 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/186008091-glycoworks-rapifluor-ms-labeling-module-24-sample.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/186008091-glycoworks-rapifluor-ms-labeling-module-24-sample.html)）溶液。向得到的糖基释放溶液中加入15 μL RFMS溶液进行标记。使标记反应在环境温度下持续5 min。加入乙酸铵溶液(10 μL , 0.5 M)，在环境温度下淬灭反应5 min。

在准备纯化N-糖时，先用200 μL 水活化GlycoWorks HILIC $\mu\text{Elution}$ 板（部件号：[186002780 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186002780-glycoworks-hilic--elution-plate.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186002780-glycoworks-hilic--elution-plate.html)），再用200 μL 85%乙腈平衡。得到的N-糖混合物用495 μL 乙腈稀释后上样至样品板。用4个300 μL 1%甲酸、90%乙腈清洗样品，以去除杂质和过量的标记试剂。最后，使用3个30 μL 洗脱缓冲液（部件号：[186007992 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/186007992-glycoworks-spe-reagents.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/186007992-glycoworks-spe-reagents.html)）洗脱N-糖，然后用310 μL 样品稀释剂（部件号：[186007992 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/186007992-glycoworks-spe-reagents.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/186007992-glycoworks-spe-reagents.html)）稀释，获得纯化的游离寡糖。

试剂	还原方案 (手动和自动化)
还原和糖基释放	
糖蛋白	10 μ L (1.2 mg/mL)
3% (w/v) RapiGest SF, 溶于 变性缓冲液 (含2 μ g/ μ L DTT) 中	10 μ L
GlycoWorks Rapid PNGase F酶	10 μ L
标记和淬灭	
GlycoWorks RapiFluor-MS溶液	15 μ L
乙酸铵(50 mM)	10 μ L
乙腈稀释	495 μ L (145 μ L + 2 \times 175 μ L)
最终体积	550 μ L
净化	
水 (活化)	200 μ L
80%乙腈 (平衡)	200 μ L
1%甲酸的90% 乙腈溶液 (清洗)	4 \times 300 μ L
洗脱缓冲液	90 μ L (3 \times 30 μ L)
稀释剂	310 μ L (2 \times 155 μ L)
最终体积	400 μ L

表1.本应用纪要中手动和自动化还原方案的溶剂用量。有关样品稀释的更多详细信息，参见上文实验部分。

液相色谱条件

液相色谱系统：

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统

检测条件：

FLR检测器，激发波长265 nm，发射波长425 nm
10

样品收集：

96孔twin.tec PCR板，带裙边，绿色，
Eppendorf (部件号：951020443)

色谱柱：

ACQUITY UPLC BEH Amide游离寡糖分析专用柱，
1.7 μ m, 2.1 mm \times 150 mm, 130 Å (部件号

: 186004742)

柱温: 60 °C

样品温度: 10 °C

进样体积: 10 µL

流动相A: 50 mM甲酸铵, pH 4.4 (LCMS级, 部件号 : 186007081)

流动相B: 乙腈

Gradient

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	25	75	初始
35.0	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	0.4	25	75	6

数据管理

色谱软件: Empower 3

结果与讨论

利用GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS还原方案实现N-糖分析自动化

常规N-糖分析的自动化非常适合QC环境以及一般研究，可实现高度一致性和重现性。自动化GlycoWorks *Rapi* Fluor-MS还原方案能够为富含二硫键的糖蛋白释放的复杂N-糖提供高度可重现的糖谱。自动化还原方案的步骤如下面的流程图所示。

GlycoWorks RapiFluor-MS还原方案

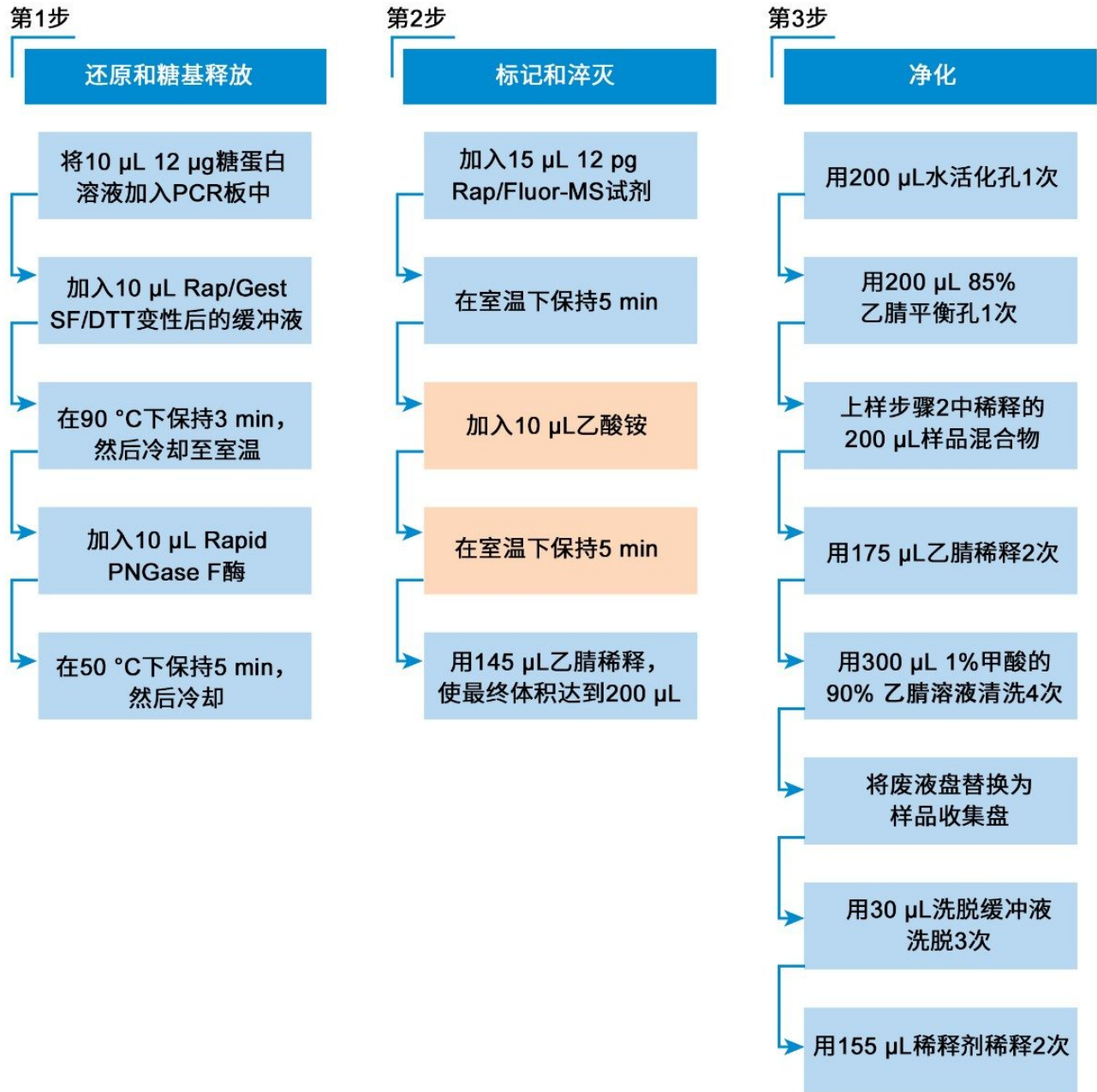


图3.自动化GlycoWorks RapiFluor-MS还原方案的流程图。在HILIC分离中，用乙酸铵淬灭（以橙色突出显示）为可选项。

该程序将Andrew+移液机器人放置在化学通风橱中（尺寸为72W × 33.5D；13.8平方英尺；型号：HBBV6，Lab Crafters, Inc.）。两种Domino配置如图4和图5所示。图4中的配置使用3行Domino，并将执行完整还原方案。选择较小化学通风橱的用户（如上文所述）需要使用图5 (A)和(B)中所示的2步配置，其中仅使用2行Domino。“步骤A”将执行还原和糖基释放、标记和淬灭，“步骤B”将执行纯化。



图4. GlycoWorks RapiFluor-MS快速自动化还原32样品方案的Andrew+ Domino配置。3行Domino配置。32个样品的运行时间为1 h。

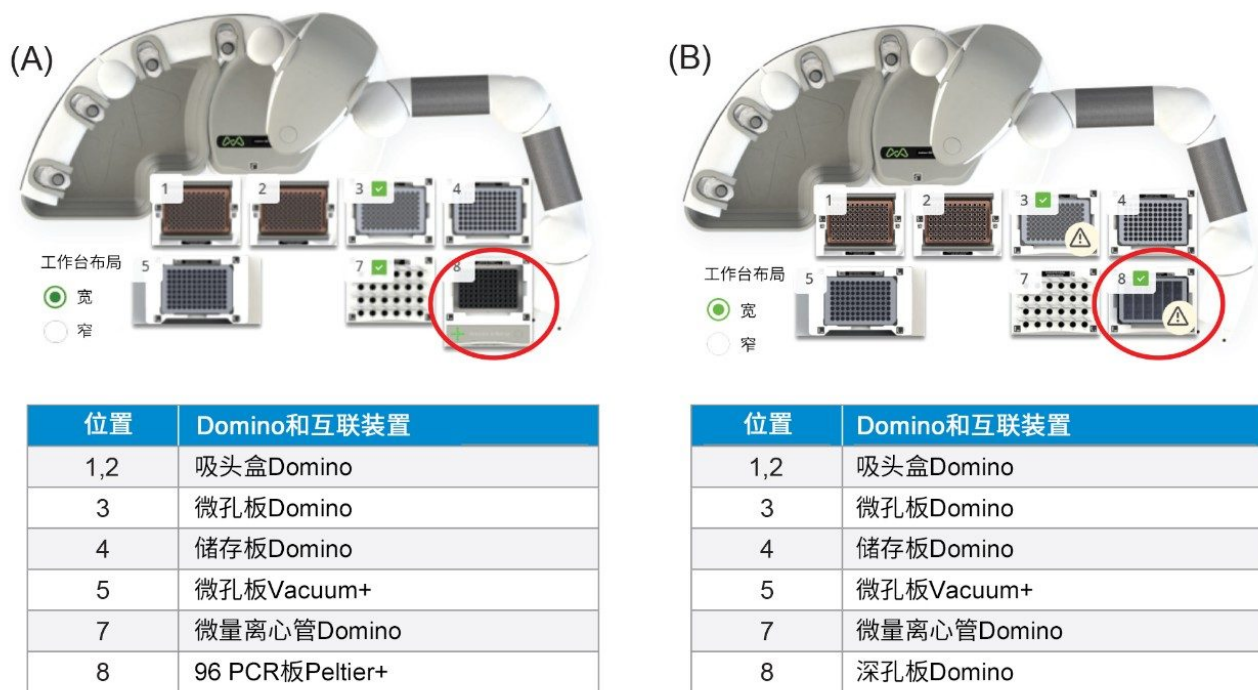


图5. GlycoWorks RapiFluor-MS快速自动化还原32样品方案的Andrew+ Domino配置：(A)第1步，(B)第2步。这些配置使用2行Domino以适应较小的化学通风橱。32个样品的总运行时间为1 h 10 min。

GlycoWorks RapiFluor-MS快速自动化还原方案可分析富含二硫键的糖蛋白释放的N-糖

使用该还原方案，Andrew+为单克隆抗体(mAb)提供了一致的糖谱。使用完整单克隆抗体质量数检查标准品（部件号：186006552 <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186006552>>）执行初步优化，该标准品用作程序中RFMS标记部分的对照品，因为从mAb中释放的N-糖在不经二硫键还原的情况下有效。该还原方案对游离N-糖提供了相媲美的回收率。图6显示了还原方案（图6A）与非还原方案（图6B）的色谱图比较。糖蛋白释放的所有四种主要糖型都在总峰面积上出现差异。

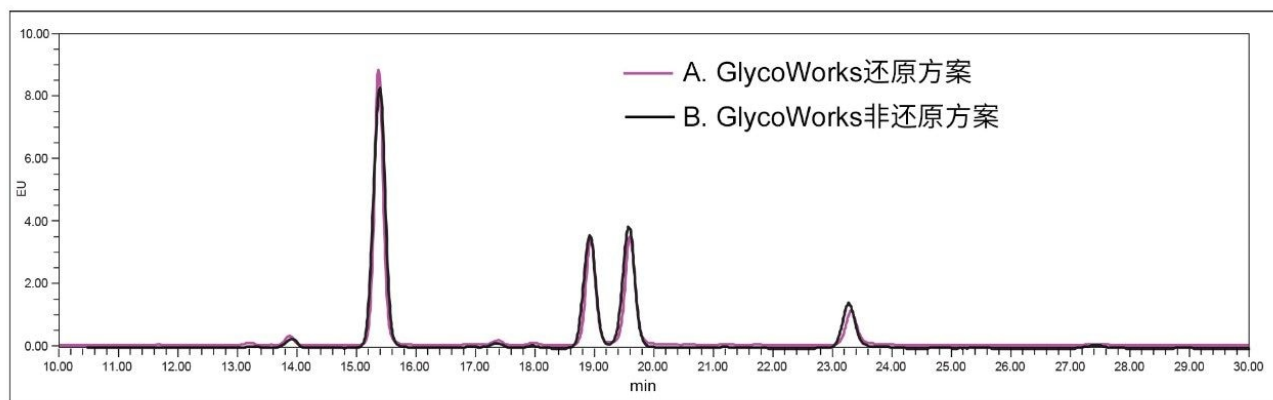


图6.使用(A) *GlycoWorks RapiFluor-MS*还原方案和(B) *GlycoWorks RapiFluor-MS*非还原方案从完整单克隆抗体质量数检查标准品释放的游离寡糖。两种方案获得的游离寡糖含量相似。

图7比较了手动（6个样品）和自动化运行（6、16或32个样品）方案分析mAb中选定（FA2、FA2G1a、FA2G1b和FA2G2）游离寡糖的相对峰面积和总峰面积。每种样品前处理方案均使用UPLC分析6个制得的样品。手动和自动化实验中4种选定游离寡糖的相对峰面积相当（FA2的%RSD \leq 5%），如图7A所示。在6样品手动程序(FA2 = 42%)与32样品自动化程序(FA2 = 44%)之间观察到最大偏差百分比（对于FA2为5%）。

手动和自动化游离寡糖样品前处理方案的总峰面积一致，如图7B所示。比较16样品和32样品自动化实验，发现FA2的平均峰面积具有最大百分比差异(14%)。游离寡糖样品前处理的关键是避免失败。在这些实验中，两种样品前处理方案之间各回收率的最大差异用相对峰面积范围 $[100 \times (\text{最大值}-\text{最小值})/\text{平均值}]$ 表示，对于6样品手动程序，FA2的最大差异为21%。

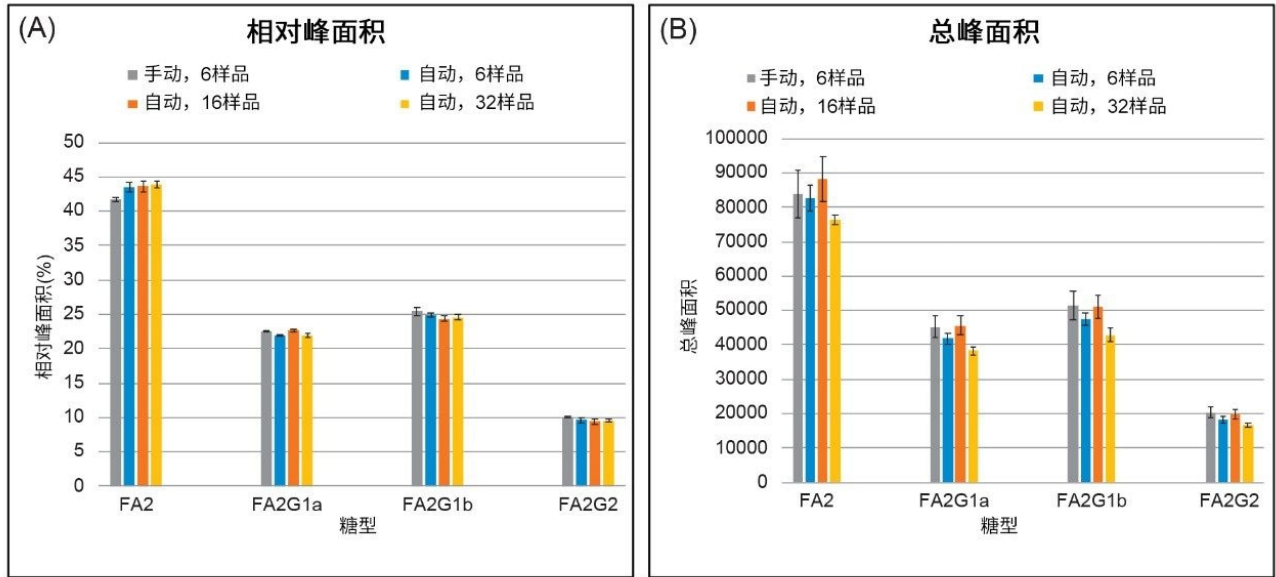


图7.由手动程序（6个样品）与Andrew+液体处理机器人（6、16或32个样品）释放的糖谱比较。这些实验使用了完整单克隆抗体质量数检查标准品（部件号：[186006552](#)）。

还选择了人绒毛膜促性腺激素(hCG)测试还原方案，因为它具有高度复杂的结构和多个二硫键。hCG的结构由代表两个高度糖基化亚基的二聚体以及四个N-糖和多个二硫键组成⁴。连接的N-糖主要为复合型⁴。

还原方案能够释放使用非还原方案时难以触及的N-糖。图8展示了两种方案的糖谱差异。在变性过程中，DTT还原使PNGase F酶能够触及更多游离寡糖以实现糖基释放。还原方案（黑色迹线）中带(*)标记的峰表明释放的游离寡糖含量明显增加。还原方案中有三个带(*)标记的峰（黑色迹线）高于粉色迹线中带(*)标记的峰。

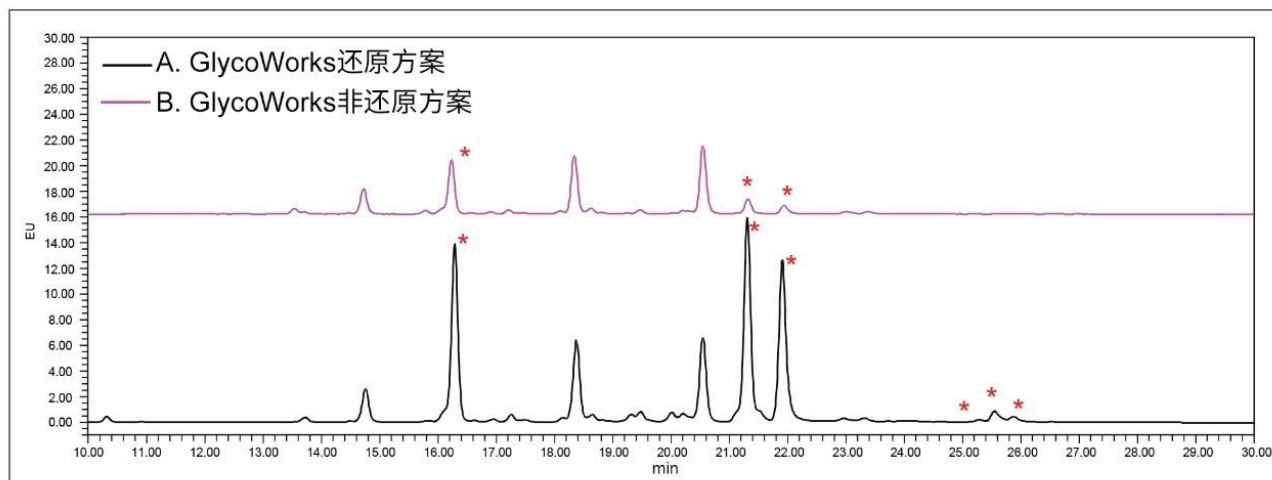


图8.使用(A) *GlycoWorks RapiFluor-MS*还原方案和(B) *GlycoWorks RapiFluor-MS*非还原方案从人绒毛膜促性腺激素(hCG)释放的游离寡糖

还原方案增加了游离寡糖释放量，如带(*)标记的峰所示。使用快速自动化还原方案，Andrew+为hCG释放的游离寡糖提供了一致的糖谱。图9比较了手动（6个样品）和自动化运行（6、16或32个样品）方案分析hCG中选定游离寡糖的相对峰面积和总峰面积。每种样品前处理方案均使用UPLC分析6个制得的样品。手动和自动化实验中9种选定游离寡糖的相对峰面积相当（峰5和峰6的RSD \leq 5%），如图9A所示。在6样品自动化程序（峰5 = 28%）与16样品自动化程序（峰5 = 30%）之间观察到最大偏差百分比（对于峰5为7%）。

手动和自动化游离寡糖样品前处理方案的总峰面积一致，如图8B所示。比较6样品手动和6样品自动化实验，发现峰5和峰6的平均峰面积具有最大百分比差异(12%)。两种样品前处理方案之间各回收率的最大差异用相对峰面积范围 $[100 \times (\text{最大值}-\text{最小值})/\text{平均值}]$ 表示，对于6样品手动程序，峰5的最大差异为25%。

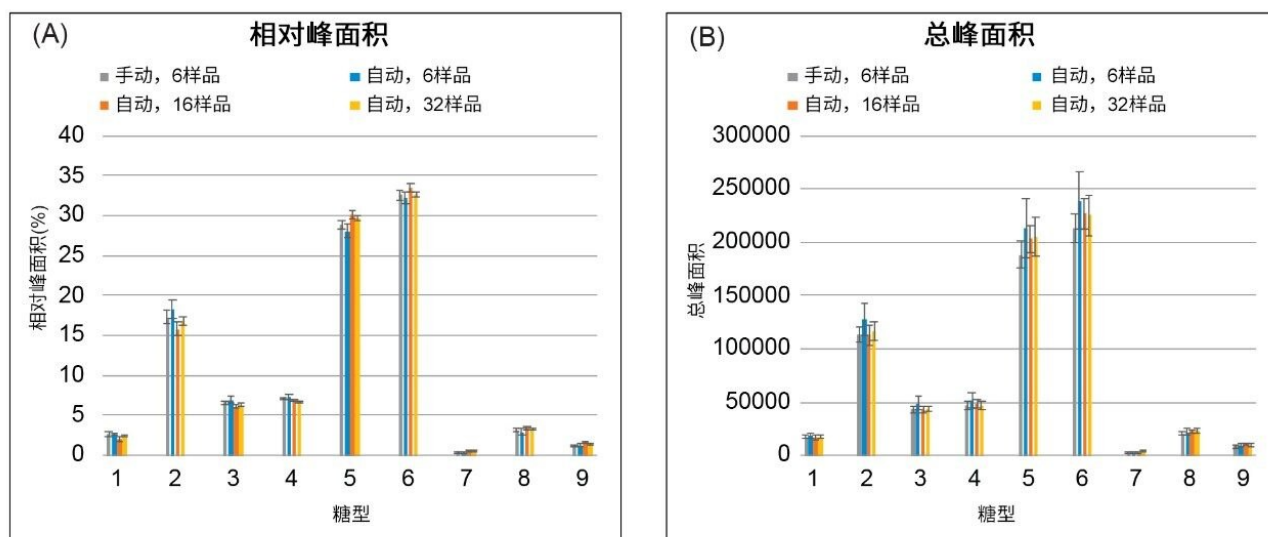


图9.由手动程序($n=6$)和Andrew+液体处理机器人 ($n=6$ 、16和32) 释放N-糖的糖谱比较。这些实验使用了人绒毛膜促性腺激素(hCG)。

结论

游离寡糖对生产条件非常敏感，常作为蛋白质生物治疗药物的关键质量属性(CQA)进行常规监测和表征。常规N-糖分析的自动化对于一般研究以及工艺和产品开发都具有重要意义。自动化样品前处理方法遵循GlycoWorks Rapi Fluor-MS游离N-糖方法，本文进行了相应调整，包括使用二硫苏糖醇(DTT)还原糖蛋白。使用还原方案在Andrew+上制备的游离N-糖样品的相对丰度和回收率与手动实验方案中观察到的结果相当。综上，本文介绍了一种自动化、互补方法，能够为包含复杂游离寡糖的富含二硫键的糖蛋白（例如hCG）提供可重现的N-糖谱。

注意事项

1.糖蛋白推荐起始量

- 本自动化还原方案旨在用12 μg 糖蛋白获得理想结果。只要相应地调整标记试剂(RFMS)的体积，浓度为1.5 mg/mL的样品也可以得到适当的结果。适量糖蛋白的显著变化（即 $< 10 \mu\text{g}$ ）可能影响Rapid PNGase F酶与底物的比率以及RFMS标记试剂的过量摩尔浓度，由此可能导致意外标记干扰或糖型回收率低。

2.关于RapiFluor-MS试剂:

- RapiFluor-MS是一种高反应活性的伯胺/仲胺标记试剂，它在水中的水解半衰期大约为10–100 s。因此，在所提供的无水DMF（一种非亲核、极性非质子溶剂）中溶解此试剂非常重要。如果小心操作，减少溶液在大气湿度下的暴露，该试剂溶液可以使用一整天。
- 还原方案的RFMS用量是非还原方案的两倍，因为还原剂DTT为亲核试剂，会通过消耗RFMS干扰标记反应。因此，可由24样品试剂盒（Andrew+ 24样品GlycoWorks应用，部件号：176003349）生成16份还原蛋白游离寡糖标记制剂，由48样品试剂盒（Andrew+ 96样品GlycoWorks应用，部件号：176003350；或Andrew+ 96HT样品GlycoWorks应用，部件号：176003351）生成32份制剂。

3.一步式或两步式还原方案

- 如果Andrew+机器人在化学通风橱内，用户可根据化学通风橱的尺寸选择所用的自动化方案。3行Domino方案用于运行完整实验。2行Domino配置的2步式方案（步骤A和步骤B）可适应更小尺寸的化学通风橱（尺寸为72W × 33.5D；13.8平方英尺；型号：HBBV6，Lab Crafters.Inc.）。

4.微孔板夹持器

- 建议使用夹持器（部件号：186009776 <<https://www.andrewalliance.com/microplate-column-gripper/>>）在化学通风橱内实施还原方案。完成热变性步骤前后，使用微孔板夹持器在Domino与Peltier+之间移动96孔反应板。这种转移将有助于在手动与自动化方案之间获得相当的游离寡糖回收率。

参考资料

1. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H. *Essentials of Glycobiology*, Third Edition. 2017. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015–2017. doi: 10.1101/glycobiology.3e.00.
2. Zhang, P.; Woen, S.; Wang, T.; Liau, B.; Zhao, S.; Chen, C.; Yang, Y.; Song, Z.; Wormald, M. R.; Yu, C.; Rudd, P. M. Challenges of Glycosylation Analysis and Control: An Integrated Approach to Producing Optimal and Consistent Therapeutic Drugs. *Drug Discovery Today*. 2016, 21 (5), 740–765.

3. Hires, M.; Jane, E.; Mego, M.; Chovanec, M.; Kasak, P.; Tkac, J. Glycan Analysis as Biomarkers for Testicular Cancer. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 2019, 9(4), 156.
4. Biskup, K.; Blanchard, V.; Castillo-Binder, P.; Alexander, H.; Engeland, K.; Schug, S. (2020). N- and O-Glycosylation Patterns and Functional Testing of CGB7 versus CGB3/5/8 Variants of the Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Beta Subunit. *Glycoconjugate Journal*, 2020, 37(5), 599–610.
5. 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.
6. 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](#), Revised 2020.
7. Reed, C. E., Koza, S., Calciano, S. 使用Andrew+移液机器人自动化完成中高通量的GlycoWork RapiFluor-MS样品前处理. 沃特世应用简报, [720007008ZH](#), 2020.
8. GlycoWorks RapiFluor-MS Quick Start Protocol – 24 Sample. Waters Brochure, [720006992EN](#) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006992en.pdf>> , 2021.
9. GlycoWorks RapiFluor-MS Quick Start Protocol – 96 Sample. Waters Brochure, [720006991EN](#) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006991en.pdf>> , 2020.
10. Lauber, M. A.; Brousmiche, D. W.; Hua, Z.; Koza, S. M.; Guthrie, E.; Magnelli, P.; Taron, C. H.; Fountain, K. J. 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. 沃特世应用纪要, [720005275ZH](#), 2015.

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)

720007402ZH, 2021年10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