

优化的GlycoWorks HILIC SPE流程 用于mAb型样品中N-糖的定量与稳定回收

Matthew A. Lauber、Stephan M. Koza 和 Kenneth J. Fountain,
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德市)

应用优势

- GlycoWorks HILIC μ Elution提取板提供了一种高效的多聚糖纯化装置
- 采用优化的SPE条件定量并一致性地回收不同范围内的N-糖
- 优化的SPE条件具有出色的方法稳定性
- 可采用2-AB标记的多聚糖标准品确保样品制备和分析方法的性能

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class Bio系统

ACQUITY UPLC GST Amide (BEH Glycan)色谱柱

GlycoWorks™ 96孔HILIC μ Elution提取板

多聚糖性能测试标准品

关键词

N-糖, GlycoWorks, BEH glycan,
多聚糖性能测试标准品,
HILIC, HILIC SPE

简介

据估计, 所有蛋白质中有一半以上都经过糖基化^{1,2}。这一翻译后修饰涉及寡糖的连接, 其在许多生物过程中发挥着重要作用³。治疗性抗体是一类受糖基化影响突出的蛋白质, 此类抗体中多聚糖图谱的改变可能导致其效能和免疫原性出现明显降低。因此, 治疗性抗体的多聚糖图谱在细胞系选育过程中通常被作为关键性质量属性(CQA)进行评估, 并且在开发和批量放行过程中必须进行监测。

一套用于评价糖蛋白中N-糖的高效分析平台包括: 通过PNGase F释放出多聚糖, 采用具有荧光活性的2-氨基苯甲酰胺(2-AB)进行标记, 然后采用亲水作用色谱法(HILIC)进行分离, 最后由荧光检测器(FLR)进行检测, 如图1所示³⁻¹⁰。

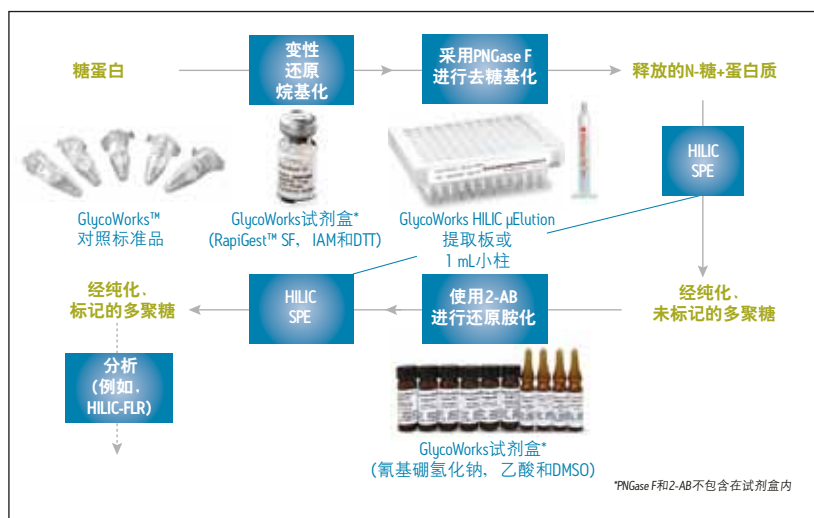


图1. 使用GlycoWorks试剂盒从糖蛋白中制备出2-AB标记的多聚糖的示意图。GlycoWorks解决方案中包含的消耗品以蓝色突出显示。请注意: PNGase F和2-AB不包含在GlycoWorks试剂盒内。

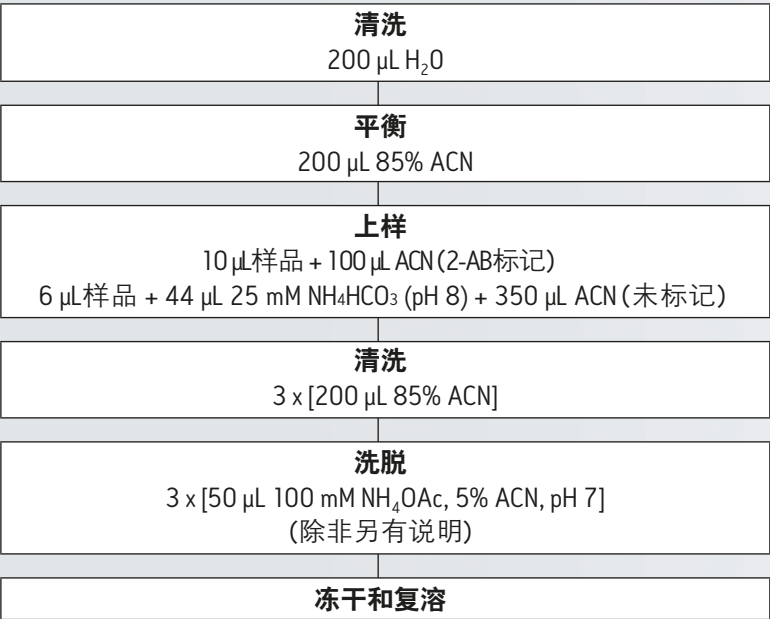
实验

样品描述

标记的寡糖回收率研究中，将多聚糖性能测试标准品(部件号186006349)与2-AB标记的三唾液酸化A3 (ProZyme)在水中混合，得到浓度为3 pmol/μL的溶液。取一份10 μL的此混合物，加入15 μL乙腈(ACN)进行稀释，得到对照样品。另取一份10 μL此混合物在真空条件下干燥，制得冻干的对照样品。此外，根据《GlycoWorks高通量样品制备试剂盒维护和使用手册》(文献编号715004079)采用HILIC SPE对一份10μL的混合物进行处理。对各洗脱液进行研究，如图3至6所示。进样前，将干燥的多聚糖复溶于10 μL水和15 μL乙腈中。

未标记的寡糖回收率研究中，将未标记的Man5和三唾液酸化A3 (购自ProZyme)复溶于水中，并混合至相同的摩尔浓度(6.7 μM)。取一份6 μL的此混合物，加入6 μL ACN进行稀释，得到对照样品。另取一份6 μL此混合物在真空条件下干燥，制得冻干的对照品。此外，根据《GlycoWorks高通量样品制备试剂盒维护和使用手册》采用HILIC SPE对一份6μL的混合物进行处理。采用由100 mM的乙酸铵(NH4OAc, 溶于5% ACN中)构成的洗脱液(pH 7)进行洗脱。进样前，将干燥的多聚糖复溶于6 μL水和6 μL ACN中。

本研究所执行HILIC SPE步骤的示意图如下：



注：将洗脱液转移至微量离心管中，然后冻干。之后，将样品复溶并转移至样品瓶中准备进样。

本分析的样品制备步骤比较复杂。GlycoWorks可将许多必需的消耗品组合在一起，从而简化工作流程。此外，GlycoWorks产品还提供了一套纯化步骤解决方案，这些步骤在制备标记多聚糖用于分析的整个过程中必不可少。其中HILIC固相萃取(SPE)方法^{11,12}目前已开发用于从蛋白质和缓冲液/配方成分中纯化所释放出的多聚糖，这些成分可能会干扰衍生化处理。HILIC SPE还可以从过量试剂中纯化经衍生化的标记多聚糖，过量试剂可能会干扰下游的色谱分析，缩短色谱柱使用寿命，从而影响方法的稳定性。

本应用纪要对HILIC SPE样品制备方法进行了评价，以确保未标记和标记N-糖的定量回收率。本研究采用测试混合物(包括一组复杂的2-AB标记的人IgG多糖，其中加标有高甘露糖和三唾液酸化多聚糖)检验和优化SPE回收率，并研究经优化的洗脱条件的稳定性。另外，还采用LC/MS验证HILIC SPE在优化条件下所得未标记多聚糖的定量回收率。

方法条件 (除非另有说明)

液相色谱条件

系统: 配备20 cm柱温箱的
ACQUITY UPLC H-Class Bio系统

检测条件: Waters® ACQUITY UPLC FLR检测器

激发波长: 330 nm

发射波长: 420 nm

扫描率: 10 Hz

时间常数: 0.2 s

增益: 1.00

色谱柱: ACQUITY UPLC GST Amide (BEH Glycan),
1.7 µm, 2.1x150 mm ([部件号 186004742](#))

柱温: 60 °C

样品温度: 15 °C

进样体积: 2.5 µL (HILIC-FLR), 10 µL (HILIC-MS)

流速: 0.5 mL/min (在梯度的高水相再生步骤中
为0.25 mL/min)

流动相A: 100 mM甲酸铵, pH 4.4

流动相B: 乙腈(ACN)

样品收集

收集板: 1 mL圆孔收集板 ([部件号 186002481](#))

样品瓶: 通过LCGC认证的透明玻璃瓶; 12x32 mm
螺纹口Qsert样品瓶 ([部件号 186001126C](#))

梯度:

HILIC-FLR	时间(min)	% A	% B	流速(mL/min)
	0	22.0	78.0	0.5
	38.5	44.1	55.9	0.5
	39.5	80.0	20.0	0.25
	44.5	80.0	20.0	0.25
	46.5	22.0	78.0	0.5
	50.0	22.0	78.0	0.5

HILIC-MS	时间(min)	% A	% B	流速(mL/min)
	0	27.9	72.1	0.5
	19.25	50.0	50.0	0.5
	20.25	80.0	20.0	0.25
	25.25	80.0	20.0	0.25
	27.25	22.0	78.0	0.5
	31.00	22.0	78.0	0.5

质谱条件

质谱仪: Xevo® G2 QTof

电离模式: ESI+

分析仪模式: 灵敏度

毛细管电压: 3.20 kV;

锥孔电压: 37 V

源温度: 100 °C

脱溶剂气温度: 350 °C

锥孔气体流速: 0.0 L/h

脱溶剂气体流速: 800 L/h

校正: NaI, 1 µg/µL, 从50至2000 m/z

采集: 700至3000 m/z, 扫描率1 Hz

LockMass: 溶于50:50 ACN/水 (含0.1%甲酸) 中的
0.5 µM [Glu¹]-血纤维蛋白肽

数据管理

UNIFI®和MassLynx®软件

结果与讨论

优化GlycoWorks HILIC SPE的多聚糖回收率

将多聚糖性能测试标准品与2-AB标记的三唾液酸化A3多聚糖混合制得测试混合物，该测试混合物可用于严苛的GlycoWorks HILIC SPE的N-糖回收率检验。多聚糖性能测试标准品由2-AB标记的N-糖组成，该N-糖由混合的人血清IgG衍生而得，其中加标有高甘露糖(Man5和Man6)。加入三唾液酸化A3进一步增加了此混合物的复杂程度，因为A3多聚糖比人体中发现的多聚糖或类人IgG的体积更大、酸性更强，并且在基于HILIC的分离过程中键合强度更高。图2显示了使用ACQUITY UPLC GST Amide (BEH Glycan)色谱柱与UNIFI软件(用于仪器控制和数据解析)相结合，对该混合物进行的HILIC-FLR分析。

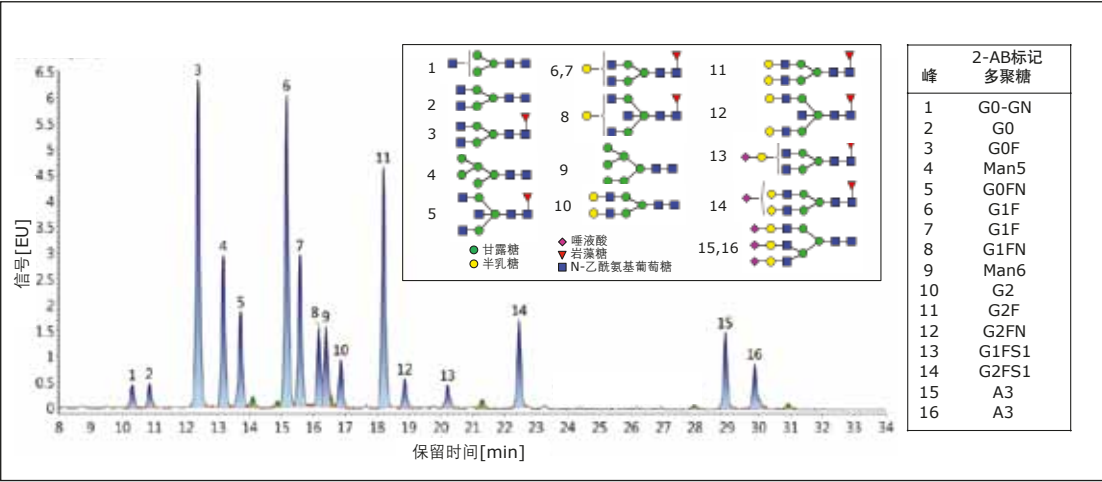


图2. 2-AB标记的多聚糖性能测试标准品和三唾液酸化A3多聚糖的HILIC-FLR分析结果。将2.5 μ L浓度为3 pmol的样品注入ACQUITY UPLC GST Amide (BEH Glycan), 1.7 μ m, 2.1x150 mm色谱柱。通过UNIFI处理检测到的峰涂有蓝色(预期组分)或绿色(发现组分)阴影。

根据本分析方法，对GlycoWorks解决方案的HILIC SPE结果进行评价。GlycoWorks试剂盒(部件号176003090)中包含以硅胶为基质的氨基基吸附剂，其由于高极性有助于HILIC分离而被选择。然而，由于该吸附剂具有弱碱性表面并可能发生阴离子交换，因此假设GlycoWorks HILIC SPE中多聚糖的相对回收率和总回收率对洗脱条件尤其敏感。为评估此步骤，我们详细考察了GlycoWorks HILIC吸附剂的洗脱效果。根据《GlycoWorks高通量样品制备试剂盒维护和使用手册》中提供的方案将2-AB标记的多聚糖上样到96孔HILIC μ Elution提取板¹³，再使用多种洗脱液对其洗脱，然后测定测试混合物中各主要物质的回收率。将之与HILIC SPE步骤之后仅进行冻干和复溶操作所得多聚糖的回收率进行比较。首先考察一系列含20% ACN和浓度逐渐增加的碳酸氢铵(NH_4HCO_3 , pH 8–9)的洗脱液。由于必须进行冻干操作，因此选用挥发性盐类。回收率结果表明：选用的洗脱液不同，多聚糖的回收率存在差异，较小的中性物质的回收率优于较大的酸性物质。对于仅含20% ACN/80% 水(H_2O)而不含其他组分的洗脱液，测试混合物中的酸性多聚糖回收率很低或者完全无法回收；与此同时，中性多聚糖的回收率则比较高($\geq 70\%$)。加入浓度为25 mM或更高浓度的 NH_4HCO_3 能够最大限度减少这一明显不理想的离子保留机制。但是，即便加入100 mM NH_4HCO_3 ，多聚糖的回收率与亲水性或葡萄糖单位(GU)值之间仍然存在显著相关性(图3A)。

回收率偏差或物质形成可能会导致样品制备步骤产生问题。除了无法准确表述样品中存在的物质外，还可能表明方法不够稳定，并且获得的相对丰度图谱可能无法重现测定，对于重现性最差的物质尤其如此。因此，我们对这些观察到的2-AB标记的多聚糖回收率进行了优化。已知极性分析物在极性吸附剂上的保留特性由氢键和离子相互作用决定，对含水量较高(ACN浓度较低)的洗脱液进行了评估(图3B)。正如预期所料，使用有机溶剂浓度较低的 NH_4HCO_3 洗脱液得到的多聚糖回收率更高且偏差更小。在本研究范围内，由25 mM NH_4HCO_3 /5% ACN组成的洗脱液能够获得最优的回收率。

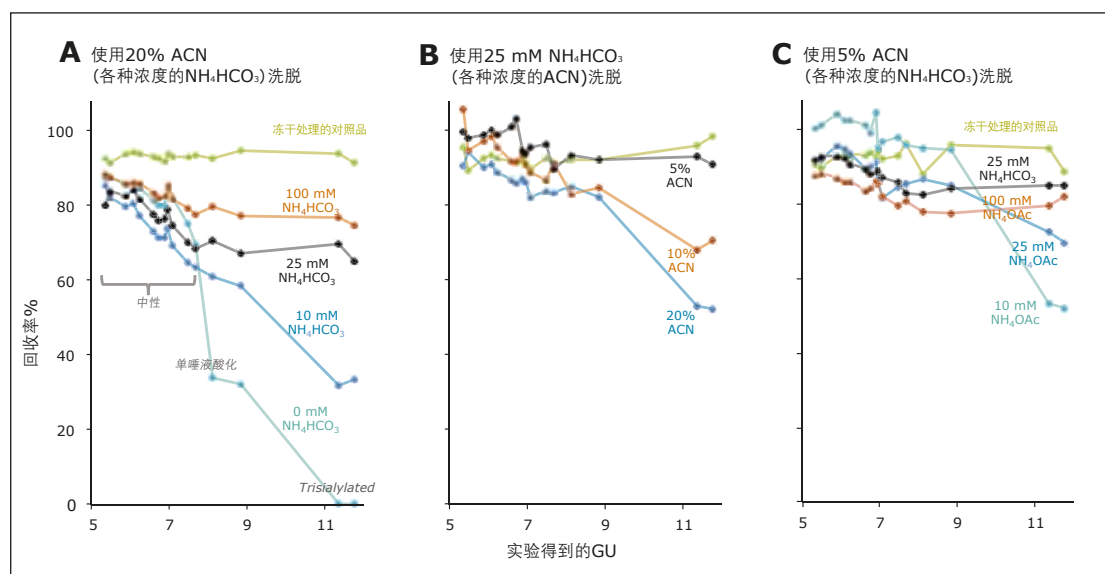


图3. 使用GlycoWorks HILIC SPE 96孔 μ Elution提取板所得2-AB标记的N-糖(图2)的回收率(处理30 pmol的多聚糖)。图中所示各种洗脱条件下的回收率百分比为实验所测葡萄糖单位(GU)的函数。数值取三次重复分析的平均值。

遗憾的是，含有 NH_4HCO_3 的洗脱液在本应用中存在问题，因为它们具有碱性（通常 $\text{pH}=8$ ，但暴露在空气中时可增加至 $\text{pH}9$ ），可能导致硅胶SPE颗粒发生明显的溶解并使得复溶样品中产生大量沉淀。为了避免这一潜在问题并建立一套更可靠的流程，我们对基于中性乙酸铵溶液($\text{pH } 7$)的替代洗脱液进行了考察。乙酸铵(NH_4OAc)洗脱液对2-AB标记多聚糖回收率的影响如图3所示。选用100 mM NH_4OAc 、5% ACN洗脱液作为最佳洗脱条件，因为它能够提供较高且相对无偏差的分析物回收率，与使用25 mM NH_4HCO_3 、5% ACN洗脱液获得的结果相似。

图4A和4B所示的系列色谱图表明HILIC SPE处理前后的测试混合物呈现出高度一致的多聚糖图谱。对照样品以及经过处理的样品的相对丰度测定结果如图4C所示。与对照品相比，整个图谱的相对丰度差异 $\leq 7\%$ 。例如，在SPE处理前后，测得的GOF(峰3)的相对丰度分别为17.9%和18.6%。在SPE处理前后，三唾液酸化A3(峰16)的相对丰度分别为2.8%和2.7%(图4C)。这些优化的洗脱条件为两类典型的多聚糖(人体IgG与高度唾液酸化多聚糖)均提供了良好的定量回收率，如A3多聚糖的回收率所示。在这些条件下，GlycoWorks HILIC $\mu\text{Elution}$ 提取板非常适用于从各种糖蛋白制备N-糖，包括GU值很低的中性多聚糖以及具有高GU值、高度唾液酸化的多聚糖。

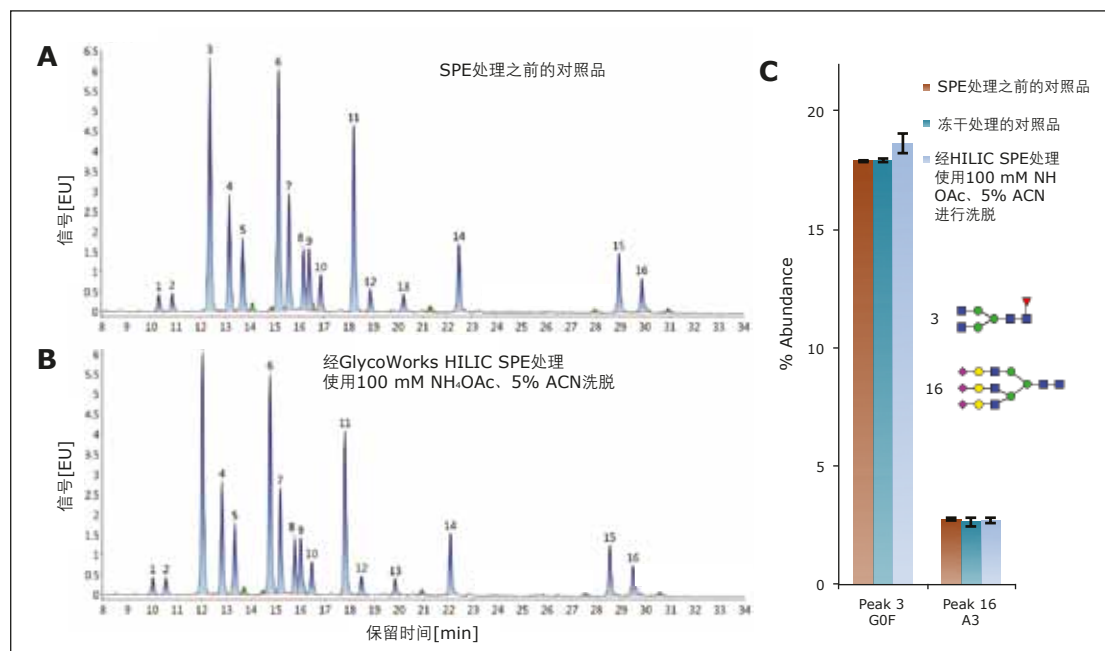


图4. 在优化的洗脱条件下经GlycoWorks HILIC SPE处理前(A)和处理后(B)得到的多聚糖图谱。显示了GlycoWorks HILIC SPE处理前后测试混合物中两种2-AB标记的多聚糖(低GU值和高GU值)的典型色谱图以及测得的相对丰度(C)($n=3$)。

优化SPE洗脱条件的稳定性测试

GlycoWorks HILIC μ Elution提取板经优化可获得所需的回收率以及(更重要的)稳定结果。本研究对洗脱条件进行了有目的的优化,使得即便关键洗脱参数(即有机浓度和离子强度)发生相对较大的改变,对于所得多聚糖图谱的影响也可降至最低。为了证明这点,我们对HILIC SPE方法进行了稳定性测试。将采用优化浓度的ACN和NH₄OAc的SPE洗脱液得到的多聚糖图谱与采用浓度变化10%的ACN和NH₄OAc洗脱液所得到的多聚糖图谱进行比较。研究中刻意将离子强度的变化与ACN浓度的变化进行组合观察。实验中采用了含110 mM NH₄OAc、4.5% ACN的强洗脱液以及含90 mM NH₄OAc、5.5% ACN的相对较弱洗脱液。图5显示了使用这些变化洗脱条件时,所得测试混合物中的各主要成分的相对丰度。所得到的多聚糖图谱与测试所用的条件相对应。经实验发现,对于三唾液酸化A3(峰16)的回收率,最佳条件与极端条件下所得相对丰度的最大百分比差异仅为7%,因此这是一套即使用于质量控制应用也非常可靠的N-糖制备解决方案。

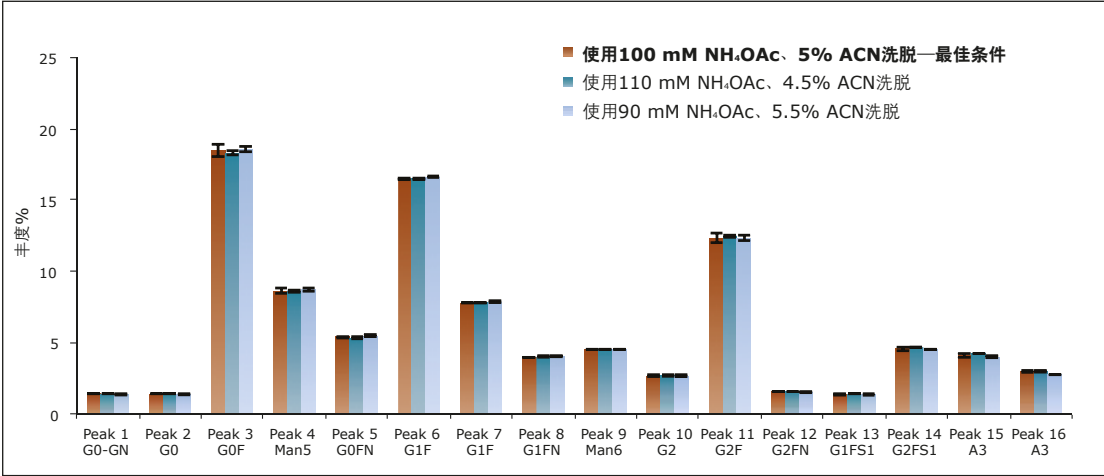


图5. SPE洗脱条件的稳定性测试。经过GlycoWorks HILIC SPE处理后, 在优化的洗脱条件与关键参数改变10%的洗脱条件下获得的测试混合物的多聚糖图谱(n=3)。

利用LC/MS检测经GlycoWorks HILIC SPE处理前后的未标记多聚糖

GlycoWorks HILIC μ Elution提取板也被建议用于对某些通过酶消化从目标糖蛋白中裂解的未标记多聚糖进行初步纯化。如前所述，2-AB标记的多聚糖比其他未标记多聚糖的亲水性略差，因为苯甲酰胺荧光标记物具有疏水性。为确认未标记多聚糖与标记多聚糖的回收率是否相似，我们进行了另一项研究。建立HILIC-MS分析方法，测定两种未标记多聚糖的相对丰度，这两种未标记多聚糖代表了大多数IgG N-糖的极端情况。测试的混合物中包含等量的中性、低GU值多聚糖(Man5)和酸性、高GU值多聚糖(三唾液酸化A3)。通过Xevo G2 QTof获取此混合物的提取离子色谱图(XIC)，如图6A所示。有趣的是，未标记的Man5与A3均观察到两个主峰，表明其存在不同的异构体。实验使用了宽质谱窗口构建色谱图，足以捕获质子化的未标记多聚糖及其盐加成产物，然后对通过此方式获得的XIC进行积分，用得到的峰面积计算未标记多聚糖在HILIC SPE处理前后的相对丰度(图6B)。与2-AB标记的多聚糖一样，SPE处理前后的未标记多聚糖混合物的图谱高度相似，表明优化的GlycoWorks HILIC SPE流程用于未标记的多聚糖也可获得偏差极小的回收率。

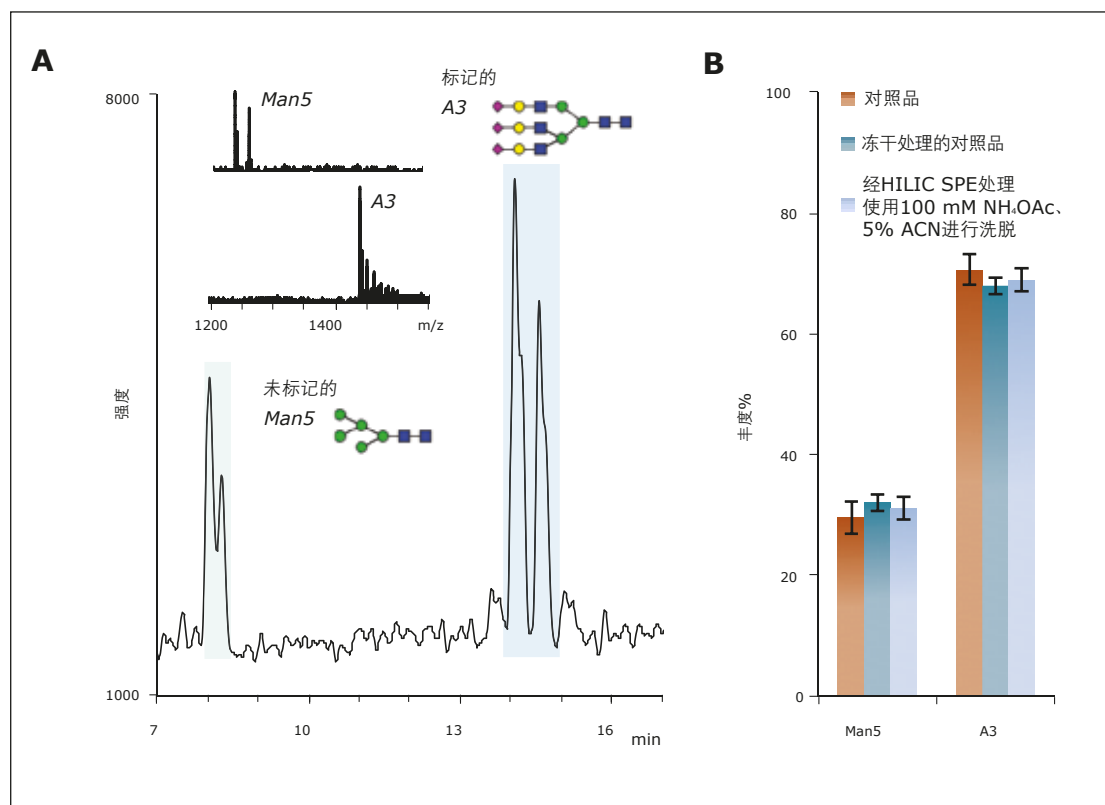


图6. 评价GlycoWorks HILIC SPE对于未标记多聚糖分布的影响。对含有低GU、中性多聚糖(Man5)和高GU、酸性多聚糖(三唾液酸化A3)的混合物进行HILIC-ESI-MS分析，所得提取离子色谱图(XIC，1235-1270+1435-1500 m/z)显示在左侧图(A)中。通过此分析所得GlycoWorks HILIC SPE处理前后的混合物相对丰度如右侧图(B)所示。在本研究中，采用GlycoWorks HILIC SPE对40 pmol的各未标记多聚糖进行处理，从12 μ L各多聚糖的复溶溶液中取10 μ L(总的最大载样量为33 pmol)上样到ACQUITY UPLC GST Amide (BEH Glycan), 1.7 μ m, 2.1x150 mm色谱柱上进行分析。

结论

本实验对HILIC SPE方法进行了仔细研究和优化, 可以为2-AB标记的N-糖以及未标记的N-糖提供良好的定量回收率。我们采用了包含多种不同N-糖(2-AB标记)的测试混合物检验GlycoWorks HILIC μ Elution提取板的性能, 并为检测方法开发出稳定可重现的最佳洗脱条件。在经优化SPE的稳定性测试中, 尽管SPE洗脱液的关键参数发生了显著改变, 但多聚糖图谱的变化极小。此外, LC/MS分析表明, 未标记的多聚糖在最新优化的洗脱条件下与2-AB标记的多聚糖一样, 可获得偏差极小的回收率。以上研究重点突出了GlycoWorks解决方案的开发及其在推动N-糖的释放、标记和纯化技术发展方面的价值。

参考文献

1. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1473(1): 4-8.
2. Hart GW. Glycosylation. *Curr Opin Cell Biol*. 1992; 4(6): 1017-23.
3. Marino K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol*. 2010; 6(10): 713-23.
4. Kaneshiro K, Watanabe M, Terasawa K, Uchimura H, Fukuyama Y, Iwamoto S, Sato TA, Shimizu K, Tsujimoto G, Tanaka K. Rapid quantitative profiling of N-glycan by the glycan-labeling method using 3-aminoquinoline/alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid. *Anal Chem*. 2012; 84(16): 7146-51.
5. Ahn J, Bones J, Yu YQ, Rudd PM, 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.
6. Yu YQ, Ahn J, Gilar M. Trastuzumab Glycan Batch-to-Batch Profiling using a UPLC/FLR/MS Mass Spectrometry Platform. Waters Application Note [720003576en](#). 2010 June.
7. Hilliard M, Struwe W, Carta G, O'Rourke J, McLoughlin N, Rudd P, Yu YQ. A Systematic Approach to Glycan Analysis Using HILIC-UPLC and an Online Database of Standardized Values. Waters Application Note [720004203en](#). 2012 December.
8. Hilliard M, Struwe W, Adamczyk B, Saldova R, Yu YQ, O'Rourke J, Carta G, Rudd P. Development of a Glycan Database for Waters ACQUITY UPLC Systems. Waters Application Note [720004202en](#). 2012 Sept.
9. Yu YQ. Analysis of N-Linked Glycans from Coagulation Factor IX, Recombinant and Plasma Derived, Using HILIC UPLC/FLR/QToF MS. Waters Application Note [720004019en](#). 2011 June.
10. Gillette-Castro B, Tran KV, Turner JE, Wheat TE, Diehl DM. N-Linked Glycans of Glycoproteins: A New Column for Improved Resolution. Waters Application Note [720003112en](#). 2009 June.
11. Yu YQ, Gilar M, Kaska J, Gebler JC. A rapid sample preparation method for mass spectrometric characterization of N-linked glycans. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005; 19(16): 2331-6.
12. Yu YQ, Gilar M, Kaska J, Gebler JC. A Deglycosylation and Sample Cleanup Method for Mass Spectrometry Analysis of N-linked Glycans. Waters Application Note [720001146en](#). 2007 May.
13. GlycoWorks High-Throughput Sample Preparation Kit. *Waters Care and Use Manual* [715004079](#). 2013.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、ACQUITY UPLC、Xevo、UNIFI、MassLynx 和 The Science of What's Possible 是沃特世公司的注册商标。GlycoWorks 是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013年 沃特世公司 中国印制
2013年6月 720004717ZH LL-PDF

沃特世科技(上海)有限公司
北京: 010 - 5209 3866
上海: 021 - 6156 2666
广州: 020 - 2829 6555
成都: 028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676
www.waters.com

