

阴离子交换 - 亲水混合色谱模式的 GlyPac AXH 色谱柱分析人促红细胞生成素 (EPO)N 糖

史俊霞¹ 金琦芸¹ 李响²

¹ 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司

² 中国食品药品检定研究院

关键字: 重组人促红细胞生成素 (EPO), GlyPac AXH 色谱柱, Hypersep Aminopropyl 固相萃取小柱, PNG 酶, 2AB 标记 N 糖链, 荧光检测器

摘要:

本文考察使用 PNG 酶, 对比非还原酶切和二硫苏糖醇 (DTT) 还原条件下酶切人促红细胞生成素 (EPO) 的 N 糖, 使用 2-AB 标记后在阴离子交换和亲水相互作用双模式下的 GlycanPac AXH 色谱柱上的以唾液酸数目差异进行分组分离的结果差异。为高唾液酸化的蛋白的 N 糖分析提供参考。

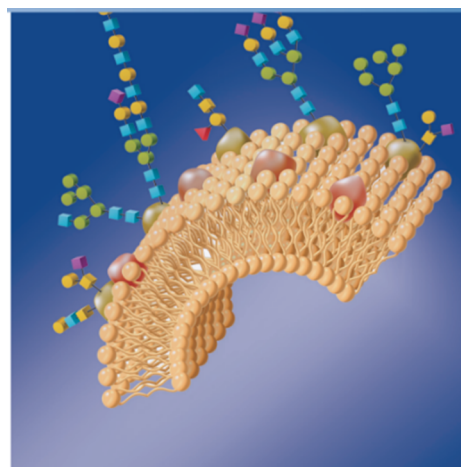
1. 引言:

重组人促红细胞生成素 (EPO) 广泛应用于治疗肾性贫血以及肿瘤等各种慢性疾病所伴发的贫血。EPO 是一种单链的酸性糖蛋白, 分子量为 32000-39000Da, EPO 的糖基包括 3 个 N2 糖链 (分别位于 Asp 24, Asp 38, Asp 83) 和一个 O 糖链 (位于 Ser126)。他们的主要成分是甘露糖, 岩藻糖和唾液酸等^[1]。其中, 唾液酸在维持 EPO 分子的酸性, 阻断细胞表面半乳糖受体结合, 防止 EPO 失活等方面有重要作用^[2]。本文采用了非还原酶切和 DTT 还原酶切 N 糖链, 2-AB 标记后, 经过 Hypersep AminoPropyl 小柱净化后的糖链样品, 在 Glypac AXH 的 HPLC 和 UHPLC 色谱柱上进行分析。

Glypac AXH 混合模式色谱柱通过独特的阴离子交换和 HILIC 双重模式, 可以将 N 糖按照唾液酸数目大小进行分组分离, 比单纯的 HILIC 模式色谱柱给出更丰富的唾液酸分布信息, 非常适合用于 EPO 类高唾液酸化的蛋白的 N 糖唾液酸分布测定。

2. 实验部分

2.1 仪器, 色谱柱与试剂



- 2.1.1 GlycanPac AXH 1.9 μm 2.1 mm X150 mm (P/N 082472, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.2 GlycanPac AXH 3.0 μm 3.0 mm X150 mm (P/N 082469, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.3 Hypersep Aminopropyl 100 mg/1mL (P/N 60108-364, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.4 一水合磷酸二氢钠 (分析纯, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.5 十二水合磷酸氢二钠 (分析纯, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.6 磷酸钠 (分析纯, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.7 碳酸氢铵 (分析纯, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.8 N-糖苷酶 F (无甘油, NEB)
- 2.1.9 二硫苏糖醇 (DTT) (99%, Thermo Fisher 公司)

- 2.1.10 稀磷酸 (分析纯, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.11 50% 氢氧化钠溶液 (分析纯, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.12 醋酸钠 (分析纯, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.13 二甲亚砜 (DMSO) (色谱纯, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.14 2-氨基苯甲酰胺 (分析纯, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.15 氰基硼氢化钠 (分析纯, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.16 甲醇 (色谱纯, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.17 10kD 超滤管 (2 mL, Thermo Fisher 公司)
- 2.1.18 Hypersep SPE 玻璃固相萃取装置 (ThermoFisher 公司)
- 2.1.19 Vanquish Flex UHPLC (ThermoFisher 公司)
- 2.1.20 离心机 (ThermoFisher 公司)
- 2.1.21 震荡加热器 (ThermoFisher 公司)
- 2.1.22 真空离心浓缩仪 (ThermoFisher 公司)

2.2 样品信息

重组人促红细胞生成素注射液: 2.5 mg/mL

2.3 溶液配置

2.3.1 糖苷酶切缓冲液 (25 mM PBS, pH7.5)

称取二水合磷酸氢二钠 7.513 g, 一水合磷酸二氢钠 0.557 g, 置于 900 mL 超纯水中, 并用稀磷酸调节 pH 值至 7.5, 充分溶解后用超纯水定容至 1000 mL。

2.3.2 2-AB 标记溶液

取 350 μ L DMSO 置于离心管中, 再加入 150 μ L 冰乙酸, 混合均匀, 得到 30% 醋酸的 DMSO 溶液。称取 20 mg 2-AB 加至 400 μ L 30% 醋酸的 DMSO 溶液中, 震荡溶解得到 2-AB 溶液。称取 24 mg 氰基硼氢化钠加至 400 μ L 2-AB 溶液中, 震荡溶解, 65 $^{\circ}$ C 加热助溶, 得到 2-AB 标记试剂, 1h 内使用。

2.3.3 净化标记试剂的溶液

洗涤液: 85% 乙腈

洗脱液: 含 5% 乙腈的 100 mM 碳酸氢铵溶液

称取 0.79 g 碳酸氢铵溶于 90 mL 超纯水中, 再加入 5 mL 乙腈, 混合均匀后用甲酸调节 pH 值至 7.0, 并用超纯水定容至 100 mL。

2.3.4 流动相

流动相 A: (100 mM 甲酸铵, pH4.4)

称取 6.3 g 甲酸铵, 溶于 990 mL 超纯水中, 用甲酸调节 pH 值至 4.4, 用超纯水定容至 1L。经 0.22 μ m 滤膜过滤, 超声脱气 20 min。

流动相 B: (70% 乙腈)

2.4 样品制备

2.4.1 超滤置换缓冲液:

取 400 μ L 注射液于超滤管 (MWCO 10 kD) 中, 5000 g 离心 10 min; 加入 400 μ L 25 mM 的 PBS 缓冲液 (pH 值 7.5) 至 400 μ L, 混匀, 5000 g 离心 10 min; 重复 3 次, 最后一次加入 400 μ L 的 PBS 缓冲液, 保持原液浓度为 2.5 mg/mL, 作为样品溶液。

2.4.2 非还原酶切

取样品溶液 100 μ L, 加至 0.6 mL 的离心管中, 再加入 4 μ L 糖苷酶, 充分混合后, 37.5 $^{\circ}$ C, 1400 转下酶切 16 小时。

2.4.3 还原酶切

取样品溶液 100 μ L, 加入 4 μ L 糖苷酶, 再加入 1 μ L 1mol/L DTT, 充分混合后, 37.5 $^{\circ}$ C, 1400 转下酶切 16 小时。

2.4.4 N 糖苷超滤与冻干

取酶解后的样品 100 μ L 转移至超滤管中, 加入 300 μ L 超纯水, 混匀, 14000 rpm 离心 8 min; 再加入 300 μ L 超纯水, 混匀, 14000 rpm 离心 8 min, 收集滤出液至 1.5 mL 离心管中。将离心管中的液体冷冻结实后放入真空干燥仪中充分干燥 (一般 4.5 h)。

2.4.5 2-AB 标记糖苷

干燥的糖链中加入 2-AB 标记试剂 0.1 mL, 置于 37.5 $^{\circ}$ C, 1400 转下, 反应 3 h, 进行荧光标记。

2.4.6 2-AB 标记糖苷的净化步骤

1. 使用 HyperSep Aminopropyl 100 mg (P/N60108-364) 小柱对样品进行纯化, 先向每个小柱中加入 500 μ L 超纯水, 两次进行平衡, 使用负压设备按照 1 滴 / 秒的速度将超纯水排出, 并吹到废液缸中。
2. 加入 500 μ L 85% 乙腈溶液平衡柱子 2 次, 并将乙腈排出。
3. 按照糖链标记后的样品: 纯乙腈 =1:10 的比例分别将每份样品与纯乙腈混合, 进行上样。
4. 用 200 μ L 85% 的乙腈洗涤 3 次,
5. 再用 100 μ L 含 5% 乙腈的 100mM 碳酸氢铵溶液 (pH 值 7.0) 洗脱 4 次, 收集洗脱液。
6. 将三个收集液体置于真空干燥仪中浓缩 4.5 h 至干燥, 即得到一份荧光标记的 N 糖链冻干样品
7. 在每份样品中加入 32.5 μ L 超纯水复溶, 溶解后再加入 17.5 μ L 乙腈, 作为上样品。

2.5 色谱条件:

色谱柱 1: GlycanPac AXH 1.9 μ m 2.1 X150 mm (P/N 082472)

色谱柱 2: GlycanPac AXH 3.0 μ m 3.0 X150 mm (P/N 082469)

流动相: A: 100 mM 甲酸铵, pH4.4 B: 乙腈: 水 =7: 3

梯度条件:

时间 (min)	流动相A	流动相B
0	2	98
2	2	98
18	6	94
23	6	94
30	8	92
35	8	92
52	15	85
55	80	20
62	80	20
65	2	98
70	2	98

流速: 0.4 mL/min(1.9 μm) / 0.8 mL/min (3.0 μm)

柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$

荧光检测器: Ex330 nm/Em 420 nm

进样量: 10 μL

3. 实验结果与讨论

实验结果

EPO 唾液酸化修饰程度差异影响其在体内的生物活性, 采用阴离子交换 +HILIC 复合模式填料色谱柱, 将酶切后的糖链按照唾液酸数目多少进行分组分离, 比单纯 HILIC 模式给出更丰富的唾液酸分布信息。本文对比了非还原和还原酶切两种前处理方法, 发现还原酶切可以提高酶切效率, 提高样品的响应强度, 但是低唾液酸组分有损失, 如图 (1) 和图 (3) 所示。对比 UHPLC 方法和 HPLC 方法, 发现 UHPLC 方法可以分出更多的组分峰。HPLC 方法分辨率较低, 如图 (1) 和图 (2) 的非还原酶切对比图, 图 (3) 和图 (4) 的还原酶切所示对比图。在多次平行实验过程中, 发现非还原酶切的重现性优于还原酶切的重现性。如图 (5) 和图 (6) 所示, 其中非还原酶切中, 6 次酶切的峰面积相对标准偏差均在 13% 以内, 峰面积百分比相对标准偏差在 0.1% 以内。如表 (1) 和表 (2) 所示。

实验讨论:

在该实验实施过程中需要注意:

1. 超滤换液的过程中, 需要用枪头反复抽吸几次 PBS 缓冲液, 可以促进样品充分溶解在缓冲液中。
2. 精确控制酶切温度和时间, 这两个因素会影响酶切效率。
3. 确定 N 糖苷样品在干燥状态下进行标记, 且标记温度不易过高, 时间不易过长, 整个操作过程中, 要避免水污染。
4. N-糖苷 SPE 净化过程中, 使用负压系统, 可以很好的控制流速, 提高样品制备的重现性。
5. 2-AB 标记后的样品尽早测试, 超过 72 小时后, 样品会降解严重。
6. 新柱子或者经过长时间保存的柱子, 需要进样 2 针进行饱和。

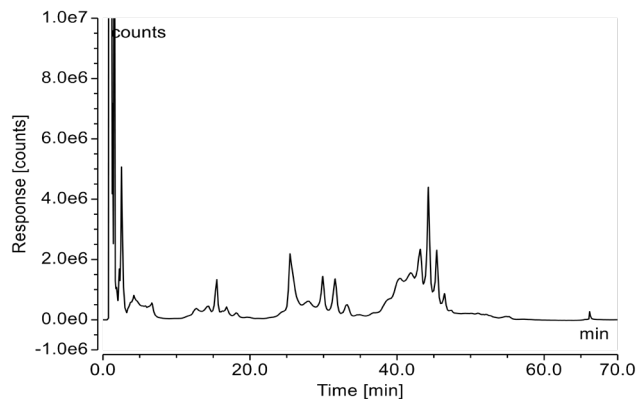


图 (1) GlycanPac AXH 1.9 μm 色谱柱上的非还原酶切结果

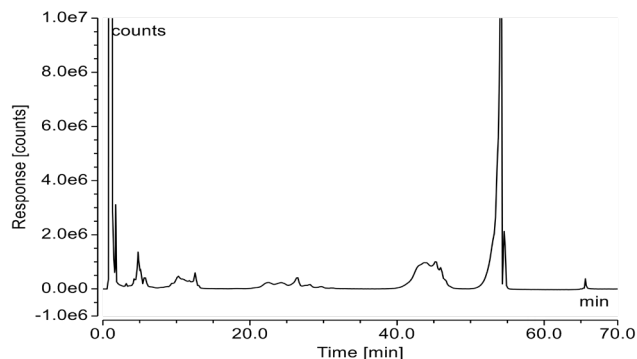


图 (2) GlycanPac AXH 3 μm 色谱柱上的非还原酶切结果

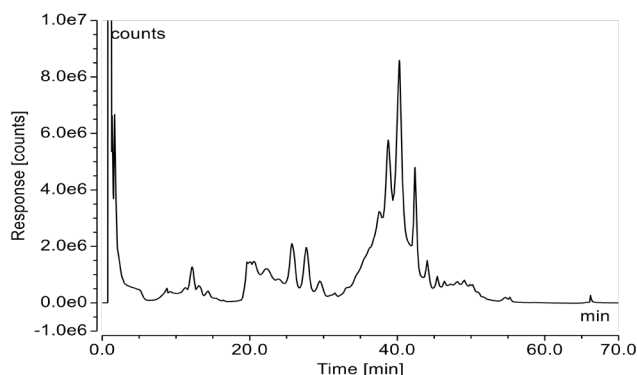
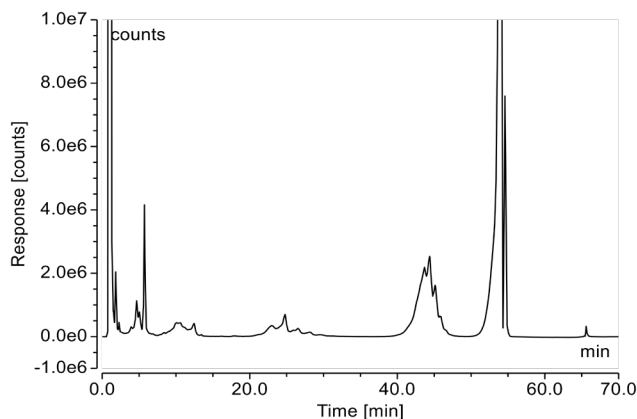


图 (3) GlycanPac AXH 1.9 μm 色谱柱上的还原酶切结果



(4) GlycanPac AXH 3 μm 上的色谱柱的还原酶切结果

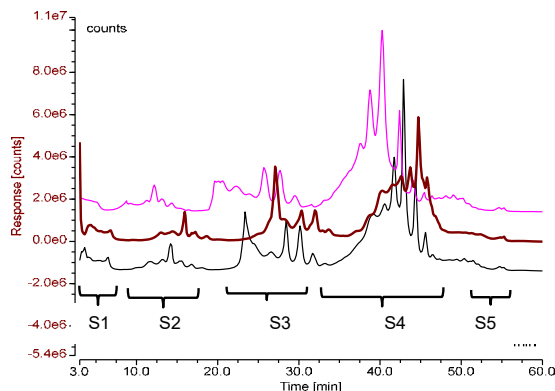
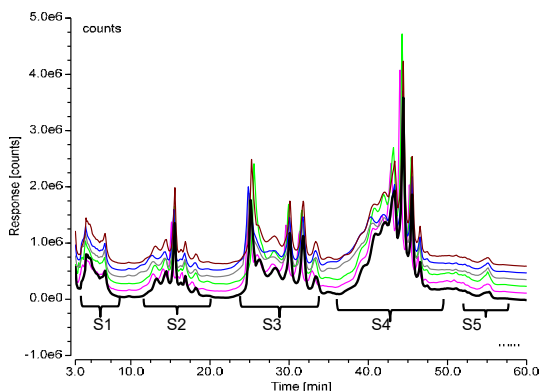


图 (5) GlycanPac AXH 1.9 μm 色谱柱上的非还原酶切 6 个平行样品
结果

图 (6) GlycanPac AXH 1.9 μm 色谱柱上的还原酶切 3 个平行样品
结果

表 (1) 非还原酶切条件下, EPO 的 6 个平行样品峰面积相对标准偏差结果

名称	峰面积 (counts*min)						RSD%
	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品	
mono-sialylated	1251246.05	930020.53	1191574.51	1109615.13	1298530.33	1037794.28	12.1
bi-sialylated	1941237.39	1535417.03	1668836.88	1507115.02	1750964.11	1836795.94	9.9
tri-sialylated	5556667.85	4395213.38	4667796.17	4361106.66	5339986.54	4906027.58	10.1
tetra-sialylated	11323305.00	9557224.36	10598196.66	9031489.01	10745878.93	10997004.05	8.5
total	20072456.30	16417875.32	18126404.22	16009325.81	19135359.92	18777621.84	8.7

表 (2) 非还原酶切条件下, EPO 的 6 个平行样品峰面积百分比相对标准偏差结果

名称	峰面积百分比 (%)						RSD%
	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品	
mono-sialylated	6.23	5.66	6.57	6.93	6.79	5.53	0.09
bi-sialylated	9.67	9.35	9.21	9.41	9.15	9.78	0.03
tri-sialylated	27.68	26.77	25.75	27.24	27.91	26.13	0.03
tetra-sialylated	56.41	58.21	58.47	56.41	56.16	58.56	0.02
total	100	100	100	100	100	100	--

4. 实验结论

采用新型的阴离子交换和亲水相互作用混合模式 GlycanPac AXH 色谱柱, 可以将 EPO 中的 N 糖链, 根据唾液酸的个数进行分组, 对比非还原酶切和还原酶切两种样品制备方法, 非还原酶切方法的重现性更好, 更稳定。

参考文献

- [1] Davis J M, A rakaw a T, Strick land T W, et al. B iochem 2 istry, 1987, 26: 2633—2638
- [2] Dongm i C, M yungsoo K, Tongsei A. J. Ch rom atogr. B, 1996, 687: 189—199
- [3] GlycanPac AXH-1 Columns Product Manual



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

thermo scientific