

TN42 高效阴离子交换色谱分析糖蛋白类低聚糖

前言

再生体衍生糖蛋白类在治疗剂应用方面的发展导致了表征碳水化合物结构方法的需求增长。高效阴离子交换色谱与脉冲安培检测 (HPAE-PAD) 技术可以直接快速的定量未衍生的碳水化合物样品,所以在表征其结构方面被广泛应用。HPAE-PAD 可以根据所带的电荷分离低聚糖,而且还可以根据糖的大小、组成和单糖单元的连接来分离带相同电荷的低聚糖。

低聚糖可以通过与标准的共淋洗或通过保留时间的比较来进行表征。HPAE-PAD 方法中低聚糖结构之间的经验关系和色谱保留在前面已有描述[1]。HPAE-PAD 分离得到的低聚糖通常在柱后收集而后用质谱和 NMR 作进一步的结构分析。

在药物和生物技术工业中,HPAE-PAD 技术在糖蛋白类碳水化合物结构方面的应用包括:1),在初始表征时用来分离和鉴别存在的低聚糖结构;2),监测糖基化的一致性,鉴别细胞培养条件或生产过程改变引起的糖的变化;3),监测不同的细胞系表达引起的糖基化变化。附录中列出了 HPAE-PAD 在糖蛋白类谱中的应用文章。

本技术注解描述了 HPAE-PAD 方法应用于一家生物技术公司质量控制测定 N-牛胎球蛋白低聚糖方法的准确度、精密度、线性和检测限。这些结果可以为 HPAE-PAD 绘制低聚糖谱的方法验证提供指导。

实验部分

Dionex DX-500 系统包括:LC30 柱温箱;GP40 梯度泵,有在线脱气装置;ED40 电化学检测器,金电极;AS3500 自动进样器或 8880 自动进样器;PeakNet 色谱工作站

试剂与标准

去离子水,色谱级;50% (w/w) 氢氧化钠 (Fisher Scientific);胎球蛋白低聚糖糖醇标准 (Dionex, P/N43064);脱唾液酸和二唾液酸半乳糖化双触角低聚糖标准 (Oxford GlycoSciences)

条件

柱子:CarboPac PA-100 分析柱 (4×250mm),带保护柱

检测:ED40 电化学检测器,金电极

进样体积:10μL

波形:碳水化合物波形 (参见 TN21)

淋洗液:A:100mM NaOH;B:100mM NaOH/0.5M NaAc

流速:1mL/min

方法:

时间 (min)	%A	%B
初始	99	1
0.0	99	1
0.2	99	1
10	90	10
50	55	45
50.1	0	100
55	0	100
55.1	99	1
70	99	1

本分离方法中的初始条件包括 1%B, 是为了防止柱子从氢氧化钠换成醋酸钠淋洗液时偶尔产生的基线干扰。这个方法是在一家生物技术公司的质量控制实验室开发的。我们相信, 如果淋洗液 A 由 100mM 氢氧化钠换成 100mM 氢氧化钠/5mMNaAc, 并且把应用 99%A 和 1%B 的时间全部换成 100%A, 这个方法的重复性会更好。

本方法应用的金电极是一个旧电极且近段时间没有打磨。

梯度优化

前面所述梯度可以有效的分离唾液酸胎球蛋白低聚糖糖醇。因为 HPAE 的分离是通过离子交换来进行的, 方法非常灵活, 梯度条件也可以根据特定的分离要求进行优化。两个“优化”的梯度方法已有报道[2], 其中之一来分离唾液酸 N-多聚糖, 另外一个用来分离脱唾液酸 N-多聚糖。对于中性 N-连接低聚糖的分离, 淋洗液 pH 的增大可以提高分离度[3]。

HPAE-PAD 通常用强碱淋洗液。偶尔的情况下也会用中性或弱酸性淋洗液。例如, 弱酸性淋洗液可以更好的分离唾液酸化和磷酸化的低聚糖[4]。弱酸性淋洗液必须柱后加碱而后用脉冲安培检测。据报道, 高 pH 淋洗条件需要对胎球蛋白低聚糖进行优化分离, 而低 pH 条件可以极大提高由血清类黏蛋白、人的绒毛膜促性腺激素和激肽释放酶中得到的低聚糖[5]。含有 0.5mM NaOH 和 3% NaAc (用 50% NaOH 滴定 3% HAc 至 pH 5.5) 的淋洗液用作梯度再生的方法在单糖和低聚糖的分离中是非常有效的[6]。

还原低聚糖和被还原低聚糖

在 100mM NaOH 溶液中, 可以测量到末端 GlcNAc 到 ManNAc 的差向异构变化。然而, 某些高度保留的带 GlcNAc 和 ManNAc 的低聚糖的还原终点在 HPAE-PAD 分离测定的过程中可能会有差向异构变化。虽然差向异构通常并不重要, 一些研究人员仍然选择在 HPAE-PAD 分离测定前将低聚糖还原为相应的醛醇, 以得到分离度更好的峰形[7-8]。

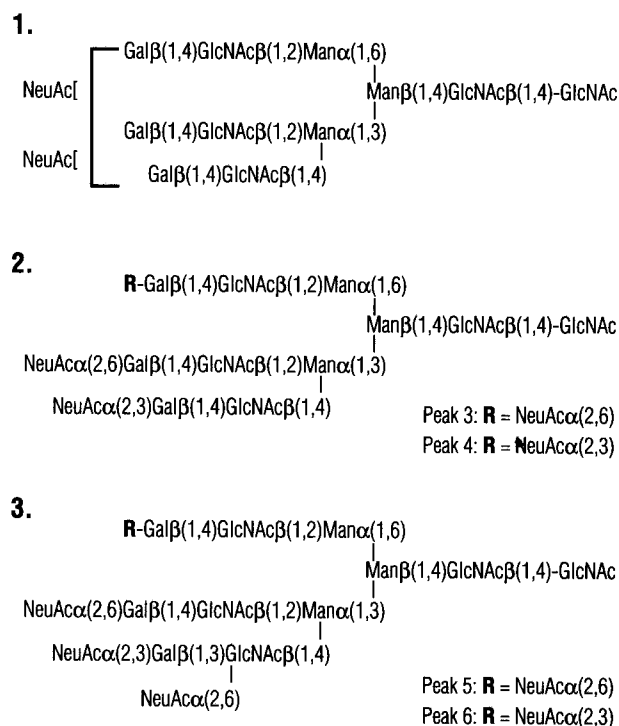


表 1 牛胎球蛋白中主要的碳水化合物结构

样品和溶液的准备

淋洗液

0.1M NaOH

实验过程中必须使用高质量的超纯水。水的电阻率至少在 18M Ω -cm 以上而且应包含尽可能少的二氧化碳，且没有生物污染。此外，水中的另外一种污染物—硼酸盐，能够穿透水纯化装置，应该在泵和进样阀之间装入硼酸盐捕获装置。应尽量避免在高纯水装置中使用塑料管，因为塑料管中经常会滋生细菌，从而成为碳水化合物污染源。

降低碳酸盐（pH12 下存在的二价阴离子）的污染是非常重要的，因为碳酸盐会强烈的结合在柱子上，干扰碳水化合物的色谱峰，降低灵敏度和柱效。市售的氢氧化钠小球的表面附着了一薄层碳酸钠，所以不能使用。通常情况下是配制 50%（w/w）的氢氧化钠储备溶液。

取 10.4mL 50%（w/w）的氢氧化钠储备溶液溶于 1990mL 水中配制成 0.1M 的氢氧化钠溶液。配制好的氢氧化钠溶液应一直储存在 34-55 kPa（5-8psi）的氦气下。

0.5M NaOH/0.1M NaAc

用 1L 的量筒取 800mL 水，加入磁子并搅拌。称取 41g 无水醋酸钠晶体，不断的加入到搅动的水中，避免生成难以溶解的块状固体。醋酸钠溶解后，取出搅拌磁子。用塑料吸液管量取 5.2mL 50%（w/w）的氢氧化钠储备溶液于醋酸钠溶液中，并吸取醋酸钠溶液润洗吸液管，而后重新滴入醋酸钠溶液，反复几次。最后用水定容至 1000mL。更换搅拌磁子并搅拌

至均匀。用 0.2 μ m 的尼龙膜真空抽滤此淋洗液，而后一直储存在 34-55 kPa (5-8psi) 的氦气下。

结果与讨论

胎球蛋白低聚糖的分离色谱图

HPAE-PAD 分离牛胎球蛋白低聚糖的分离色谱图见图 1。HPAE-PAD 可以用来特征化牛胎球蛋白中的十种低聚糖，图 1 中的峰 1-6 的结构如表 1 所示。峰 7 是三唾液酸三触角低聚糖络合物。在碱性条件下，本技术不但可以分离唾液酸组分，而且可以分离同一电荷的 α (2, 3) 链和 α (2, 6) 链的唾液酸。带 α (2, 3) 链和 α (2, 6) 链部分较多的唾液酸最后分离。唾液酸的中性部分也影响分离。在所研究的唾液酸中，含有 Gal β (1, 3) GlcNAc 序列的唾液酸比 Gal β (1, 4) GlcNAc 序列的唾液酸保留要强。

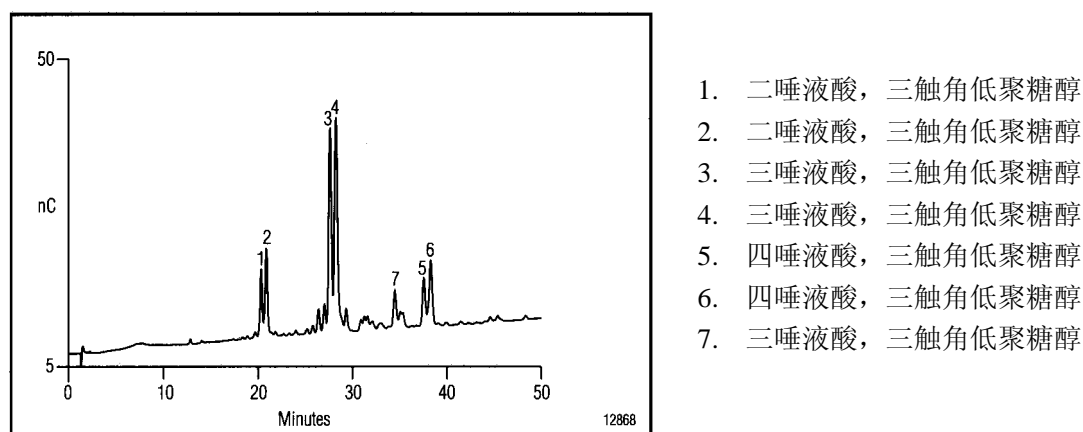


图 1 胎球蛋白 N-连接低聚糖醇在 CarboPac-100 柱上的分离

准确度与精密度

图 1 中牛胎球蛋白低聚糖分离谱图的保留时间和峰面积的稳定性是通过连续 33 次进样测定 250pmol 的市售胎球蛋白低聚糖醛醇混合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差得到的。CarboPac PA-100 的柱温设置在 30 $^{\circ}$ 。

图 1 中 7 个主要峰的保留时间和峰面积的相对标准偏差如图 2A 和图 2B 所示。前两次进样的数据忽略了，因为发现检测器的响应直到第三次进样才稳定。保留时间的相对标准偏差小于 0.2%。峰面积的相对标准偏差在 1.9% 到 4.1%。在另外一个同样的操作系统上重复实验，以室温分离上述化合物得到的保留时间的相对标准偏差小于 0.5%，峰面积的相对标准偏差与之大致相同。保留时间的相对标准偏差小于 0.5% 与以前报道的分离人的 BHK 细胞中促红细胞生成素表达的唾液酸和脱唾液酸 N-链碳水化合物的相对标准偏差类似[2]。报道的相对标准偏差是从两个内标化合物 Neu5Ac 和 (Neu5Ac)₃ 在不同日期多次进样得到的[2]。

线性

对检测器对 N-链胎球蛋白低聚糖醛醇混合物的响应进行了评价。在一个很宽的浓度范围 (250pmol-5nmol)，七种主要低聚糖的峰面积响应不成线性，如图 3A 所示。然而，在一

个较窄的浓度范围 (100pmol-1nmol), 检测器的响应值呈很好的线性相关, 如图 3B 所示 (峰 1, 2, 3, 4, 6, 7 的 $r^2 > 0.990$, 峰 5 的 $r^2 > 0.943$)。本组实验在另外一个系统上进行重复也得到类似的结果。

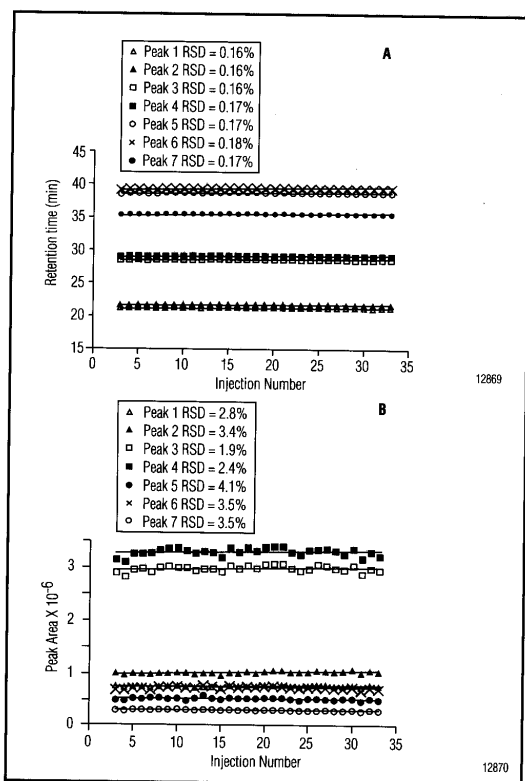


图 2

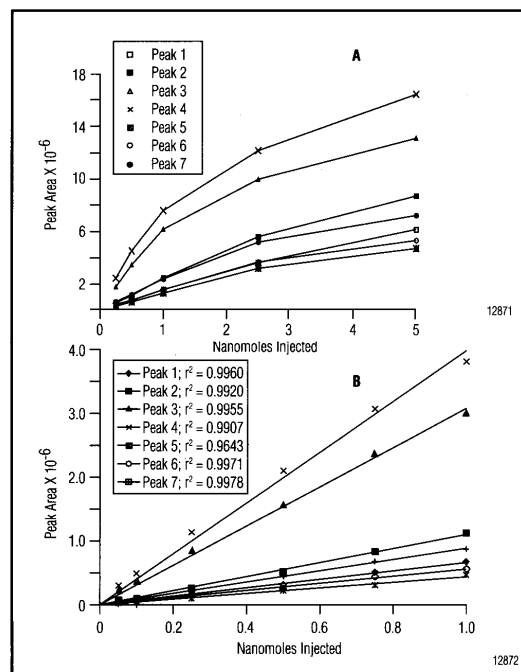


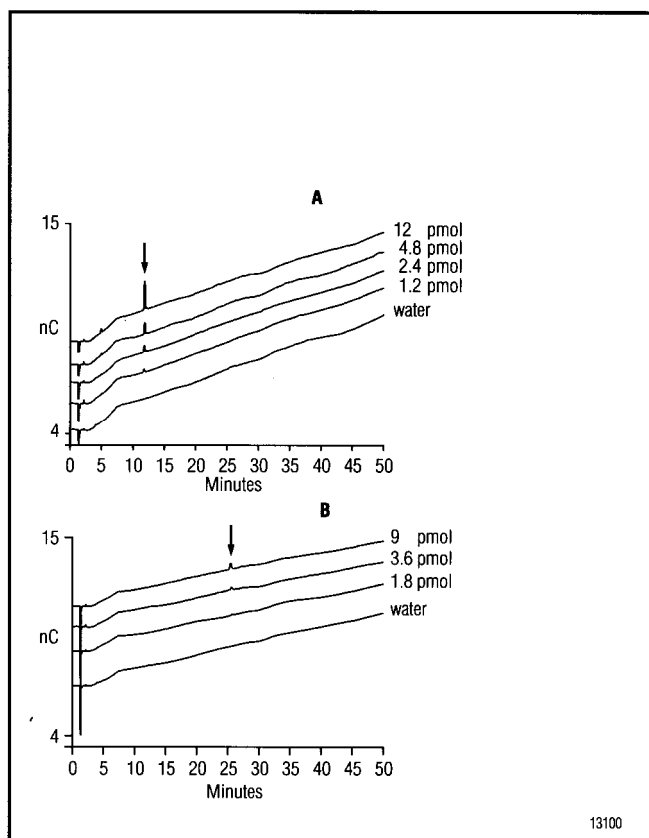
图 3

图 2 胎球蛋白低聚糖醇在 CarboPac-100 柱上的分离上保留时间的重复性 (A) 和峰面积的重复性 (B)

图 3 (A) 在宽的浓度范围内对胎球蛋白低聚糖醇的响应
(B) 50 到 1000pmol 的胎球蛋白低聚糖醇的响应线性

检测限

测定了两种商品化低聚糖标准(一唾液酸半乳糖化的二触角标准和二唾液酸半乳糖化的二触角标准)的检测限。测定低含量唾液酸半乳糖化的二触角标准的图见图 4A, 检测限可达到 pmol。1.2pmol 进样的信噪比为 13。二唾液酸半乳糖化的二触角标准的检测限见图 4B。低含量范围 (pmol) 的检测限类似, 均低于 3。1.8pmol 进样的信噪比为 11.8。0-50 分钟的基线漂移大约为 5nC。



柱: CarboPac-100 分析柱和保护柱
淋洗液: 5-225mM 醋酸钠溶于 100mM 氢氧化钠中

流速: 1mL/min

检测器: ED40, Au 电极

样品: 低聚糖标准

A: Asialo galactosylated biantennary 低聚糖

B : Disialyted galactosylated biantennary 低聚糖

图 4 低聚糖标准—低含量测定

结论

我们对 HPAE-PAD 分离低聚糖的准确度、精密性、线性和最低检测限进行了表征。结果证明了“期望的性能”，用于 HPAE-PAD 方法绘制低聚糖谱图的方法是可行的。

参考文献

1. Rohrer J, Glycobiology, 1995, 5, 359-360.
2. Hermentin P, Witzel R, Vliegthart JFG, Kamerling JP, Nimtz M, Conradt HS. Anal. Biochem., 1992, 203, 281-289.
3. Cooper GC, Rohrer JS. Anal. Biochem., 1995, 226, 182-184.
4. Townsend RR, Hardy MR, Hindsgaul O, Lee TC. Anal. Biochem., 1998, 174, 459-470.
5. Waston E, Bhide A, Kenney WC, Lin FK. Anal. Biochem., 1992, 205, 90-95.
6. Anumula KR, Taylor PB. Eur. J. Biochem., 1991, 195, 269-280.
7. Pfeiffer G, Geyer H, Geyer R, Kalsner I, Wendorf P. Biomed. Chromatogr., 1990, 4, 193-199.
8. Pfeiffer G, Strube KH, Schmidt M, Geyer R. Eur. J. Biochem., 1994, 219, 331-348.