

重组人EPO N-联糖基化和O-联糖基化的全面表征

Matthew A. Lauber, Stephan M. Koza和Erin E. Chambers
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德市)

应用优势

- 解析EPO N-联糖基化和O-联糖基化信息的两种简易策略
- 实现高度天线化游离N-糖和完整蛋白质糖型的前所未有的HILIC分离
- 可兼容MS的HILIC能够详细研究样品成分
- 通过糖蛋白分离对ACQUITY UPLC® Glycoprotein BEH Amide糖蛋白分析专用柱(300Å, 1.7 μm固定相)进行QC测试, 确保批次间重现性保持一致

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide,
300Å糖蛋白分析专用柱(正在申请专利)
糖蛋白性能测试标准品

GlycoWorks™ RapiFluor-MS™ N-糖分析试剂盒

ACQUITY UPLC H-Class Bio系统

Xevo® G2-XS QToF质谱仪

SYNAPT® G2-S HDMS

关键词

ACQUITY UPLC H-Class Bio系统,
BEH Amide 300Å, 糖基, 糖基化蛋白质,
糖基化, O-联, N-联, HILIC, RapiFluor-MS标记

简介

免疫球蛋白G(IgG)形态是许多蛋白质治疗药物的开发方向¹。与此同时, 各种重组人体激素和酶的问世也让许多高效的患者疗法得以实现。例如, 促红细胞生成素(EPO)α等刺激红细胞生成的治疗药物很早以前就被用于治疗贫血症。这一增加患者红细胞数的疗法最早由Epogen®公司商品化, 该产品于1989年经FDA批准后在美国上市²。时至今日, 随着生物制药行业的格局不断发展以及Epogen专利过期(2013年)³, EPO药品成为了国际和国内生物仿制药市场的仿制对象。

尽管促红细胞生成素α的一级结构相对较小, 但它含有3个N-糖基化位点和1个O-糖基化位点(图1)⁴。由于糖基化的原因, 尽管促红细胞生成素α的蛋白质质量仅为18 kDa, 但其分子量却达到30~40 kDa。有趣的是, 促红细胞生成素的糖基化与其功能和血清半衰期密切相关。有研究表明, 其糖基谱图中有两个属性与其体内活性(包括天线化和唾液酸化作用)呈正相关关系⁵⁻⁷。因此, 准确表征促红细胞生成素治疗药物的糖基化非常重要。此外, 研究促红细胞生成素的糖基化还有另一项重要意义, 那就是将详细的糖基分析作为开发有效的促红细胞生成素生物仿制药的重要途径。

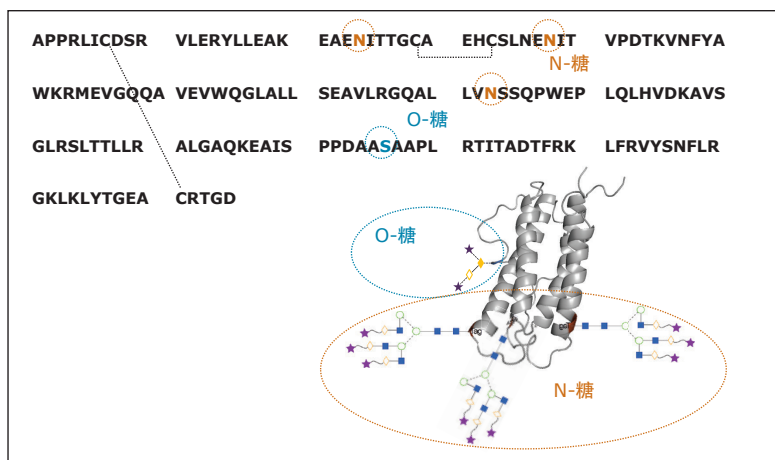


图1. 重组人促红细胞生成素α (rhEPO) 的序列和结构信息。

实验

样品描述

将CHO细胞表达的重组人促红细胞生成素 α (PeproTech, Rocky Hill, NJ) 复溶于50 mM HEPES NaOH pH 7.9缓冲液中, 得到浓度为2 mg/mL的溶液。

使用GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒从rhEPO中释放N-糖并对其进行RapiFluor-MS标记, 具体操作说明见维护和使用手册(部件号715004793)。进样90 μ L RapiFluor-MS标记的N-糖的SPE洗脱物、100 μ L二甲基甲酰胺和210 μ L乙腈的混合物。

为了分析O-糖基化, 我们利用GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒维护和使用手册(部件号715004793)中所述的快速糖基释放技术对rhEPO进行了N-糖基释放。

方法条件(除非另有说明)

色谱柱平衡

全新(之前未使用过的)ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide, 300Å, 1.7 μ m糖蛋白分析专用柱应通过两次或两次以上的连续进样和分离进行平衡, 直至获得稳定一致的分析结果。更多信息请参阅色谱柱的维护和使用手册(部件号720005408ZH)。

RapiFluor-MS游离N-糖的LC条件

LC系统: ACQUITY UPLC H-Class Bio系统
 样品温度: 10 °C分析柱
 柱温: 60 °C
 流速: 0.4 mL/min
 进样体积: 10 μ L
 色谱柱: ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide, 300Å, 1.7 μ m, 2.1 x 150 mm 糖蛋白分析专用柱(部件号176003702, 配备糖蛋白性能测试标准品)
 荧光检测条件: 激发波长265 nm/发射波长425 nm, 2 Hz样品收集/
 样品瓶: 样品收集模块(部件号186007988) 聚丙烯材质12 x 32 mm螺纹口样品瓶, 容积300 μ L(部件号186002640)

流动相A: 50 mM甲酸铵, pH 4.4 (LC-MS级; 由100x浓缩液制得, 部件号186007081)

流动相B: ACN(LC-MS级)

时间	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.4	25	75	6
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

RapiFluor-MS游离N-糖的MS条件

MS系统: Xevo G2-XS QTof
 电离模式: ESI+
 分析仪模式: 分辨率(~40 K)
 毛细管电压: 2.2 kV
 锥孔电压: 75 V
 离子源温度: 120 °C
 脱溶剂气温度: 500 °C
 电离源补偿: 50 V
 脱溶剂气流速: 600 L/h
 校准: NaI, 1 μ g/ μ L, 100-2000 m/z
 采集: 700-2000 m/z, 0.5 s扫描速率
 Lockspray: 300 fmol/ μ L人血纤维蛋白肽B的 0.1% (v/v) 甲酸溶液, 70:30水/乙腈(每90秒)
 数据管理: MassLynx®软件(4.1版)

N-糖基释放rhEPO的完整蛋白质HILIC分析的LC条件

LC系统: ACQUITY UPLC H-Class Bio系统
 样品温度: 10 °C分析柱
 柱温: 45 °C
 流速: 0.2 mL/min
 荧光检测条件: 激发波长280 nm/发射波长320 nm (内源性荧光), 10 Hz

流动相A: 含0.1% (v/v) TFA的H₂O
 流动相B: 0.1% (v/v) TFA的乙腈溶液
 HILIC进样体积: 1.3 μL (在不对色谱性能造成负面影响的前提下, 一根2.1 mm内径的HILIC色谱柱最多可承受约1 μL的水相进样。)
 色谱柱: ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide, 300Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm糖蛋白分析专用柱 (部件号176003702, 配备糖蛋白性能测试标准品)
 样品瓶: 聚丙烯材质12 x 32 mm螺纹口, 容积300 μL (部件号186002640)
 梯度:

时间	%A	%B	曲线
0.0	15.0	85.0	6
0.5	15.0	85.0	6
1.0	25.0	75.0	6
21.0	35.0	65.0	6
22.0	100.0	0.0	6
24.0	100.0	0.0	6
25.0	15.0	85.0	6
35.0	15.0	85.0	6

N-糖基释放rhEPO的完整蛋白质HILIC分析的MS条件

MS系统: SYNAPT G2-S HDMS
 电离模式: ESI+
 分析仪模式: 分辨率(~20 K)
 毛细管电压: 3.0 kV
 锥孔电压: 45 V
 电离源补偿: 50 V
 离子源温度: 150 °C
 脱溶剂气温度: 500 °C
 脱溶剂气流速: 800 L/h
 校准: NaI, 1 μg/μL, 500-5000 m/z
 采集: 700-4800 m/z, 1 s扫描速率
 数据管理: MassLynx软件(4.1版)

本应用纪要展示了两种可用于详细研究重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 的N-联糖基化和O-联糖基化的简易策略。在本研究中, 我们首先快速释放rhEPO中的N-糖基, 对其进行GlycoWorks RapiFluor-MS标记, 然后利用灵敏的荧光检测和质谱检测技术进行亲水作用色谱 (HILIC) 分析。在接下来的平行分析中, 我们利用完整蛋白质的HILIC分析甄别糖基释放的rhEPO, 以解析O-糖基化的相关信息。

结果与讨论

使用RapiFluor-MS标记和HILIC分析对rhEPO进行游离N-糖分析

此前已有许多人对重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 的糖基化进行过研究^{4-5, 8-13}。之前的这些研究在很大程度上需要使用多项相关技术。本研究的目标是为EPO分析建立两种简易的基于LC的互补方法, 分别用于获取N-糖基化和O-糖基化的相关信息。

借助采用新型糖基标记试剂RapiFluor-MS的样品制备新策略, 我们可轻松得到rhEPO的N-糖谱图。该样品制备策略基于GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒, 分析人员可快速释放N-糖并采用能提高荧光检测和电喷雾离子质谱 (ESI-MS) 检测灵敏度的标记物对其进行标记¹⁴。在之前的应用纪要中, RapiFluor-MS主要用于分析各种IgG样品¹⁴⁻¹⁶, 但除此之外, 采用GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒的实验方案, 即使面对rhEPO等高度糖基化的蛋白质, 分析人员同样能轻松完成样品制备。

经验证, RapiFluor-MS标记的N-糖适用于进行亲水作用色谱 (HILIC) 分析。因此, RapiFluor-MS的HILIC-荧光-MS分析已成为了一种适用于蛋白质N-糖基化详细研究的强大工具¹⁴。

为了实现上述目的，本研究利用HILIC分析了由rhEPO制备的RapiFluor-MS N-糖样品。我们选用了最近推出的大孔径酰胺色谱柱 — ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide, 300Å, 1.7 μm糖蛋白分析专用柱，以期达到最优的N-糖分离分析分离度。该色谱柱专为糖肽和糖蛋白等大分子的HILIC分离而设计，而研究表明，其大孔径颗粒结构还能使高度支链化的三天线和四天线N-糖的峰容量增加10–20%¹⁷，因此该色谱柱也是对通常具有高度天线化结构的EPO N-糖进行HILIC分析的理想选择。图2A展示了得自0.4 μg rhEPO的RapiFluor-MS N-糖的HILIC荧光和基峰强度(BPI) MS谱图。虽然本次分析的样品量相对较少，但成功获得了高信噪比的谱图。

荧光检测的灵敏追踪有助于分析实现准确的相对定量。虽然我们可以观察到MS灵敏度随着N-糖结构的增大而降低，但MS谱图的信噪比仍然值得我们关注。而RapiFluor-MS试剂和具有更高传输效率及灵敏度的新一代MS仪器Xevo G2-XS QToF的结合，让这些特定数据的质量得到了保障。如图2B中的质谱采集结果所示，该QToF技术可达到前所未有的灵敏度和高质量数分辨率，图2B在本研究中被用作指认N-糖物质的依据。

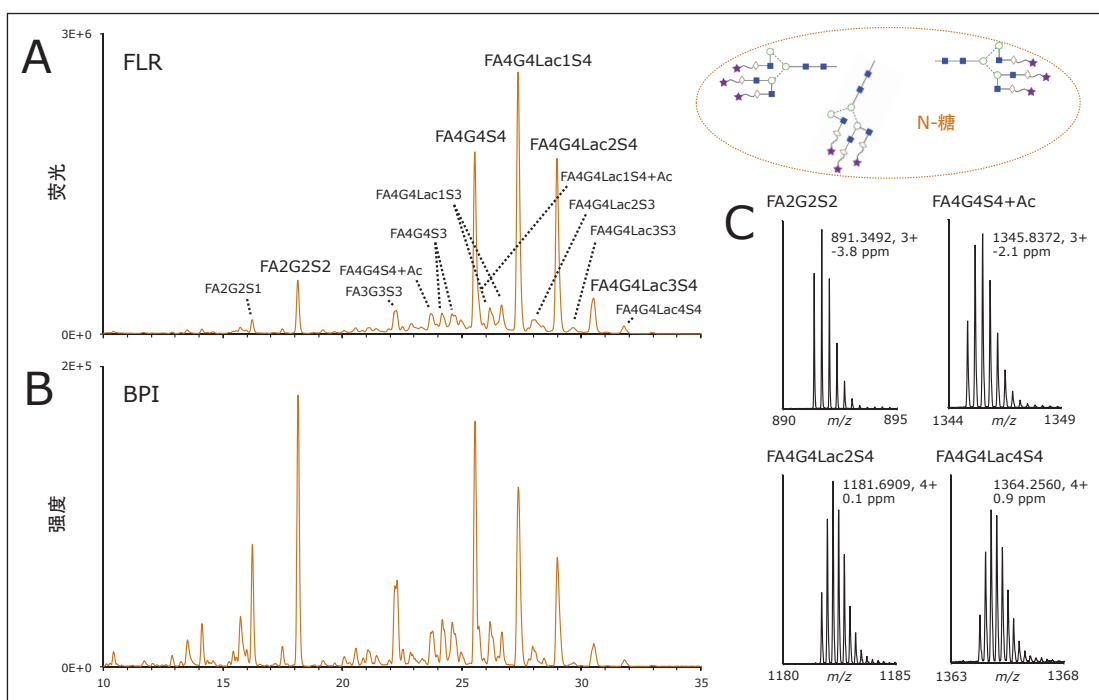


图2. rhEPO游离N-糖的HILIC分析。RapiFluor-MS标记的rhEPO游离N-糖的(A) 荧光谱图和(B) 基峰强度(BPI) 谱图。使用ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide, 300Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm糖蛋白分析专用柱分析来自0.4 μg蛋白质的糖基获得色谱图。(C) 四种N-糖物质的MS谱图。根据Oxford Notation列出了N-糖指认结果。“+Ac”表示乙酰化，如之前曾有报道的唾液酸残基(Neu5Ac)的O-乙酰化⁸。

该分析方法所具备的色谱和质谱级灵敏度简化了N-糖指认过程，让分析人员能够轻松绘制hEPO N-糖物质的N-糖谱图(图3)。

本研究分析所得的hEPO N-糖谱图中主要包括具有不同N-乙酰乳糖胺延伸结构的四天线、四唾液酸化N-糖(FA4G4S4)，但同时该谱图中也包括一个对应二唾液酸化双天线N-糖(FA2G2S2)的高丰度峰。由于四天线与双天线N-糖的比率与EPO的体内活性之间呈正相关性⁶，很明显该分析能为我们提供非常有价值的信息。通过该N-糖分析可轻松获得的其它信息还包括唾液酸化的程度以及乳糖胺延伸结构修饰的程度。总的来说，这些结果表明，采用相对比较简单*RapiFluor*-MS N-糖制备方法及相应的HILIC-荧光-MS分析确实能够获得信息量非常丰富的N-糖谱图。

RT (min)	物质	MW _{单体, 理论值} (Da)	实测值 <i>m/z</i>	<i>z</i>	MW _{单体, 理论值} (Da)	质量数误差 (ppm)
16.21	FA2G2S1	2388.9201	1195.4659	2	2388.9172	1.2
18.12	FA2G2S2	2680.0155	894.3492	3	2680.0258	-3.8
22.24	FA3G3S3	3336.2432	1113.0924	3	3336.2554	-3.7
23.68	FA4G4S4 + Ac	4034.4813	1345.8372	3	4034.4898	-2.1
24.15/24.60	FA4G4S3	3701.3754	1234.7966	3	3701.368	2.0
25.52	FA4G4S4	3992.4708	1331.8309	3	3992.4709	0.0
25.7	FA4G4Lac1S4 + Ac	4399.6135	1467.5425	3	4399.6057	1.8
26.16/26.66	FA4G4Lac1S3	4066.5076	1356.5104	3	4066.5094	-0.4
27.34	FA4G4Lac1S4	4357.6030	1090.4097	4	4357.6097	-1.5
27.95	FA4G4Lac2S3	4431.6397	1108.9143	4	4431.6281	2.6
28.97	FA4G4Lac2S4	4722.7352	1181.6909	4	4722.7345	0.1
29.66	FA4G4Lac3S3	4796.7719	1200.2004	4	4796.7725	-0.1
30.50	FA4G4Lac3S4	5087.8674	1272.976	4	5087.8749	-1.5
31.77	FA4G4Lac4S4	5452.9996	1364.256	4	5452.9949	0.9

图3. 为各种游离N-糖物质的鉴定提供依据的LC-MS数据。“+Ac”表示乙酰化，如之前曾有报道的唾液酸残基(Neu5Ac)的O-乙酰化⁸。

利用大孔径酰胺HILIC分离分析完整rhEPO的O-糖基化

由于目前没有高度可靠的机制能够从对应蛋白质中释放出O-糖，因此O-糖的表征颇具挑战性。由于采用PNGase F进行糖基释放简便而高效，分析游离糖基成为了一种倍受青睐的N-糖表征方法。除了采用同类型的通用糖苷酶之外，分析人员还通过各种化学方法来释放O-糖，如利用碱性β消除¹⁸或胍解作用¹⁹等。但这些释放机制通常难以实施，而且常常会引入干扰(即所谓的“脱落产物”)。

在本研究中，我们没有采用分析rhEPO游离O-糖的策略，而是开发了另一种表征策略。我们设计了一套新的工作流程，该流程首先使用GlycoWorks Rapid PNGase F和1% RapiGest™ SF表面活性剂对rhEPO进行快速糖基释放，10分钟之后，我们获得了一份经N-糖基释放的完整rhEPO样品，然后采用ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide糖蛋白分析专用柱通过HILIC分离对其进行分析。图4展示了本次分析中使用内源性荧光检测和完整蛋白质HILIC技术(在先前的研究中进行过介绍²⁰)获得的色谱图。本研究分析的N-糖基释放rhEPO分离得到了一系列(约10个)色谱峰。在线ESI-MS提供了十分详细的信息，有助于我们将rhEPO的蛋白形态准确分配给各个色谱峰。

结果显示，两个丰度最高的LC峰分别具有18893.8和19185.3 Da的去卷积质量数，与分别具有三糖和四糖O-糖修饰结构的C端精氨酸截断N-糖基释放rhEPO一致。更具体地讲，我们观察到的较轻物质的质量数偏移代表了包括1个己糖、1个N-乙酰己糖胺和1个唾液酸结构的糖基修饰。同时，我们观察到的较重物质的质量数偏移则代表包括相同结构的糖基修饰，但多了一个N-乙酰-神经氨酸结构。

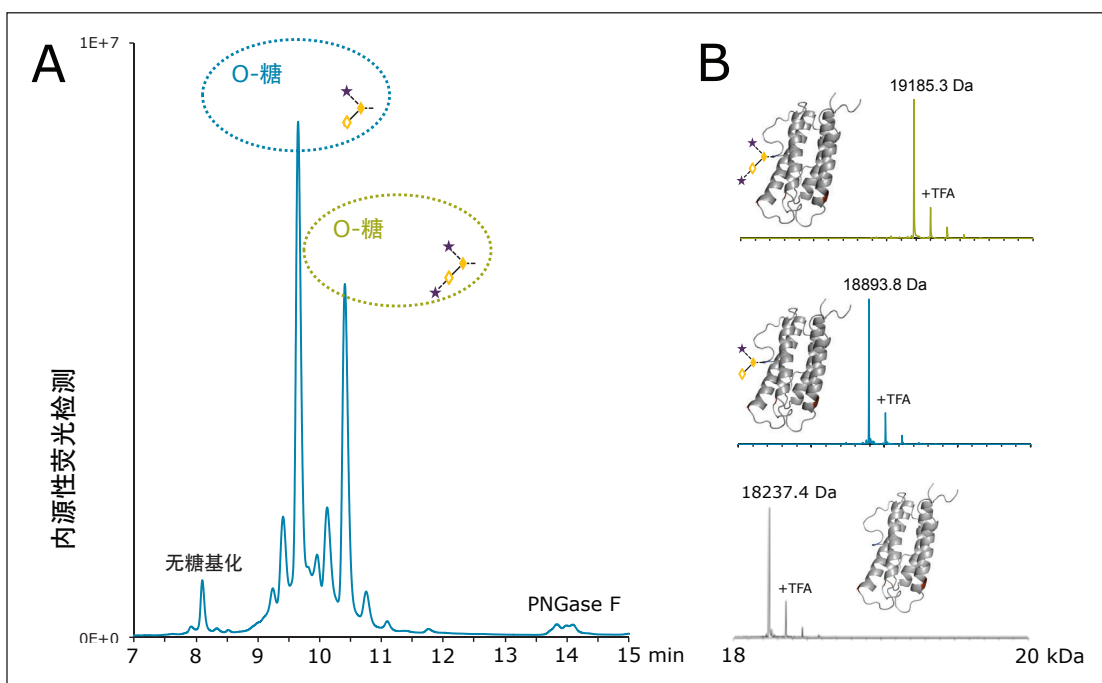


图4. N-糖基释放的完整rhEPO的HILIC-荧光-MS分析。(A) 荧光色谱图，展示了O-糖的异质性和占据率。使用2.1 x 150 mm ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide, 300Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm糖蛋白分析专用柱分析0.7 μg蛋白质所得的色谱图。(B) 对应于rhEPO的三种主要蛋白形态的解卷积质谱图。峰鉴定结果(此处标记的除外)如图5所示。

对LC-MS数据的进一步研究结果还表明，经过O-糖无糖基化的rhEPO蛋白形态在约8.2 min的保留时间处洗脱。此外，这些LC-MS数据还表明rhEPO至少还有两种其它的O-联糖型，以及更多种C端截断的蛋白形态(图5)。由此，我们可以看出该工作流程的确可用于快速分析rhEPO的N-联糖基化，帮助我们获取关于占据率和异质性的信息。

RT (min)	物质	MW _{平均, 理论值} (Da)	MW _{平均, 理论值} (Da)	质量数误差 (Da)
8.0	N-糖基释放, -C-端GDR	18066.5	18065.2	-1.3
	3 N-糖基释放, -C-端DR	18123.6	18122.4	-1.2
8.2	N-糖基释放, -C-端R	18238.7	18237.4	-1.3
9.3	N-糖基释放, -C-端R +Hex1HexNAc1Neu5Ac1+Ac	18937.3	18936.2	-1.1
9.5	N-糖基释放, -C-端GDR +Hex1HexNAc1Neu5Ac1	18723.1	18722.3	-0.8
	N-糖基释放, -C-端DR +Hex1HexNAc1Neu5Ac1	18780.1	18779.1	-1.0
9.7	N-糖基释放, -C-端R +Hex1HexNAc1Neu5Ac1	18895.2	18893.8	-1.4
9.9	N-糖基释放, -C-端R +Hex1HexNAc1Neu5Ac2+Ac	19228.5	19227.3	-1.2
10.0	N-糖基释放, -C-端R +Hex1HexNAc1Neu5Ac1 + 0	18911.2	18910.0	-1.2
10.2	N-糖基释放, -C-端GDR +Hex1HexNAc1Neu5Ac2	19014.3	19013.7	-0.6
10.5	N-糖基释放, -C-端R +Hex1HexNAc1Neu5Ac2	19186.5	19185.3	-1.2
10.8	N-糖基释放, -C-端R +Hex1HexNAc1Neu5Ac2 + 0	19202.5	19201.2	-1.3

图5. 为各种N-糖基释放rhEPO蛋白形态的鉴定提供依据的LC-MS数据。“-C-端”表示rhEPO的C-端截断；并标明了截断的不同残基。Hex、HexNAc和Neu5Ac分别表示己糖、N-乙酰己糖胺和唾液酸结构。例如，Hex1HexNAc1Neu5Ac1对应的是包含1个己糖、1个N-乙酰己糖胺和1个唾液酸结构的O-糖基化。“+0”表示增加一个氧原子造成的质量数偏移，例如氧化或者将Neu5Ac替换为Neu5Gc8。作为丰度最高的rhEPO序列变体(-C-端R)及其糖型的鉴定依据的数据以粗体突出显示。“+Ac”表示乙酰化，如之前曾有报道的唾液酸残基(Neu5Ac)的O-乙酰化⁹。

结论

最近，糖基分析领域出现了几款基于可兼容亲水作用色谱 (HILIC) 的 LC-MS 的强大工具。这些新型糖基分析工作流程的核心是专为大分子分离而设计的 HILIC 色谱柱。借助 ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide 糖蛋白分析专用柱，分析人员能够在大分子游离 N-糖的分离中实现更高的分离度。这种分析方法与 RapiFluor-MS 标记联用时不仅能提高分离度，还能获得前所未有的灵敏度。我们在本研究中将该方法成功应用于详细研究重组人促红细胞生成素 α (rhEPO) 的 N-糖基化。由于 N-糖基化与 EPO 的半衰期和活性有关，成功获取这类信息并达到前所未有的数据质量对于开发新型 EPO 治疗剂有着无可估量的价值。EPO 还具有 O-糖基化结构；该结构的占据率和异质性对于研究各种药物之间的兼容性也具有非常重要的意义。在本应用纪要中，我们概述了一个使用 ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide 糖蛋白分析专用柱的实验方案，该方案包括简单的样品制备步骤，然后通过随后的 HILIC 分离分析完整 rhEPO 上的 O-糖基属性。概括地讲，重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 分子此前由于其糖基化结构相对复杂，一直被视为糖基化表征的难题，而我们介绍的两种简易策略可用于详细研究 rhEPO 的 N-联糖基化和 O-联糖基化。充分利用这些工具有助于我们加快新型生物仿制药的开发进程。

参考文献

1. An, Z., Monoclonal antibodies – a proven and rapidly expanding therapeutic modality for human diseases. *Protein Cell* 2010, 1 (4), 319–30.
2. Bennett, C. L.; Spiegel, D. M.; Macdougall, I. C.; Norris, L.; Qureshi, Z. P.; Sartor, O.; Lai, S. Y.; Tallman, M. S.; Raisch, D. W.; Smith, S. W.; Silver, S.; Murday, A. S.; Armitage, J. O.; Goldsmith, D., A review of safety, efficacy, and utilization of erythropoietin, darbepoetin, and peginesatide for patients with cancer or chronic kidney disease: a report from the Southern Network on Adverse Reactions (SONAR). *Semin Thromb Hemost* 2012, 38 (8), 783–96.
3. US\$67 billion worth of biosimilar patents expiring before 2020 2012. <http://www.gabionline.net/Biosimilars/General/US-67-billion-worth-of-biosimilar-patents-expiring-before-2020>.
4. Rush, R. S.; Derby, P. L.; Smith, D. M.; Merry, C.; Rogers, G.; Rohde, M. F.; Katta, V., Microheterogeneity of erythropoietin carbohydrate structure. *Anal Chem* 1995, 67 (8), 1442–52.
5. Dube, S.; Fisher, J. W.; Powell, J. S., Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. *J Biol Chem* 1988, 263 (33), 17516–21.
6. Takeuchi, M.; Inoue, N.; Strickland, T. W.; Kubota, M.; Wada, M.; Shimizu, R.; Hoshi, S.; Kozutsumi, H.; Takasaki, S.; Kobata, A., Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86 (20), 7819–22.
7. Takeuchi, M.; Takasaki, S.; Shimada, M.; Kobata, A., Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1990, 265 (21), 12127–30.
8. Harazono, A.; Hashii, N.; Kuribayashi, R.; Nakazawa, S.; Kawasaki, N., Mass spectrometric glycoform profiling of the innovator and biosimilar erythropoietin and darbepoetin by LC/ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal* 2013, 83, 65–74.
9. Sasaki, H.; Bothner, B.; Dell, A.; Fukuda, M., Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem* 1987, 262 (25), 12059–76.
10. Takeuchi, M.; Takasaki, S.; Miyazaki, H.; Kato, T.; Hoshi, S.; Kochibe, N.; Kobata, A., Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1988, 263 (8), 3657–63.
11. Rush, R. S.; Derby, P. L.; Strickland, T. W.; Rohde, M. F., Peptide mapping and evaluation of glycopeptide microheterogeneity derived from endoproteinase digestion of erythropoietin by affinity high-performance capillary electrophoresis. *Anal Chem* 1993, 65 (14), 1834–42.
12. Gimenez, E.; Benavente, F.; Barbosa, J.; Sanz-Nebot, V., Analysis of intact erythropoietin and novel erythropoiesis-stimulating protein by capillary electrophoresis-electrospray-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* 2008, 29 (10), 2161–70.
13. Gimenez, E.; Benavente, F.; de Bolos, C.; Nicolas, E.; Barbosa, J.; Sanz-Nebot, V., Analysis of recombinant human erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein digests by immunoaffinity capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2009, 1216 (12), 2574–82.
14. 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), 5401–9.
15. Lauber, M. A.; Brousmiche, D. W.; Hua, Z.; Koza, S. M.; Guthrie, E.; Magnelli, P.; Taron, C. H.; Fountain, K. J., Rapid Preparation of Released N-Glycans for HILIC Analysis Using a Novel Fluorescence and MS-Active Labeling Reagent. Waters Application Note [720005275EN](#) 2015.
16. Eoin F.J. Cosgrave, M. A. L., Robert Birdsall, and Sean M. McCarthy, New Capabilities for Monitoring Released N-Glycans through the Combined Use of RapiFluor-MS Labeling, ACQUITY UPLC H-Class Bio System, and Serial Fluorescence/ACQUITY QDa Mass Detection. Waters Application Note [720005352EN](#) 2015.

17. Lauber, M. A.; Koza, S. M., Enhancing the Peak Capacity of High Molecular Weight N-Glycan HILIC Separations with a Wide-Pore Amide Bonded Stationary Phase. Waters Technology Brief [720005381EN](#) 2015.
18. Huang, Y.; Mechref, Y.; Novotny, M. V., Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Anal Chem* 2001, 73 (24), 6063–9.
19. Patel, T. P.; Parekh, R. B., Release of oligosaccharides from glycoproteins by hydrazinolysis. *Methods Enzymol* 1994, 230, 57–66.
20. Lauber, M. A.; Koza, S. M., Developing High Resolution HILIC Separations of Intact Glycosylated Proteins Using a Wide-Pore Amide-Bonded Stationary Phase Waters Application Note [720005380EN](#) 2015.



扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, MassLynx, ACQUITY UPLC, SYNAPT和Xevo是沃特世公司的注册商标。GlycoWorks, RapiGest和RapiFluor-MS是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2015年 沃特世公司 中国印刷 2015年8月 720005462ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
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 5999
成都: 028 - 6765 3588
香港: 852 - 2964 1800

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