

製品コード 4400

研究用

---

**TAKARA**

**シアル酸蛍光標識用  
試薬キット**

---

説明書

v201611Da



---

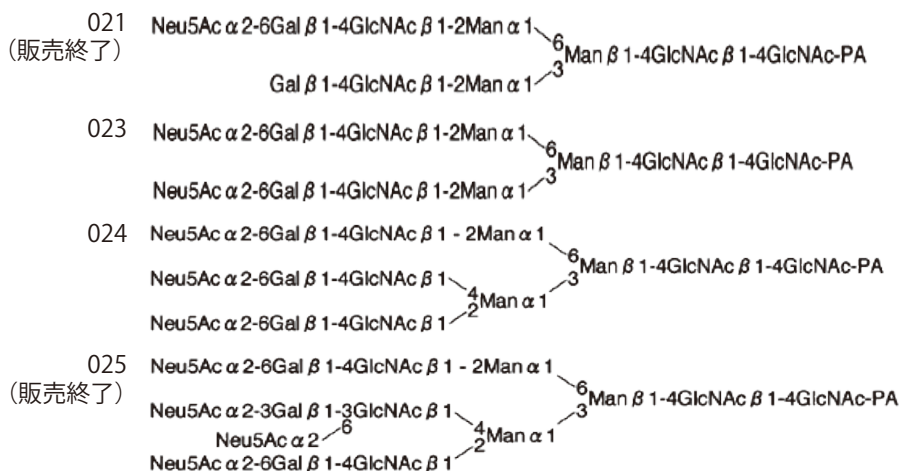
### III. 操作

- (1) 遊離のシアル酸を含む試料\*<sup>1</sup> (各 5 pmol ~ 5 nmol) をスクリーキャップ付 1.5 ml チューブに入れる。
  - \* 1 : 試料は 50  $\mu$ l 以下にする。また、酸性下での反応のため試料の pH は中性または酸性になるようにする。コントロールとして Neu5Ac (100  $\mu$ M) を使用する場合は、1 反応あたり 2 ~ 20  $\mu$ l を使用して反応を行い、反応液のうち 10  $\mu$ l (10 ~ 100 pmol) を分析してください。
- (2) DMB Solution : Coupling Solution : H<sub>2</sub>O = 1 : 5 : 4 の混合液\*<sup>2</sup> を調製し、試料に 200  $\mu$ l 添加しよく攪拌する。遮光し、50°C にて 2 時間 30 分反応させる。
  - \* 2 : 混合した試薬は 4°C で保存した場合、一週間は安定である。
- (3) 氷水中に入れて冷却 (5 分程度) し、反応を終了させる。
- (4) 反応液のうち 10  $\mu$ l を逆相カラム\*<sup>3</sup> を用いた HPLC にて分析する。\*<sup>4</sup>  
(励起波長 : 373 nm、測定波長 : 448 nm)  
また、あらかじめ分析したスタンダードのシアル酸の HPLC Peak Height より検量線を作成しておき、サンプル中のシアル酸量を求める。
  - \* 3 : YMC-Pack ODS-A (ワイエムシ社製 : 製品番号 AA12S05-2546WT) などをご使用ください。
  - \* 4 : 分析は反応当日に行ってください。

## IV. 実施例

### <実施例 1：糖タンパク質由来 PA 化糖鎖スタンダードの分析>

- (1) 部分酸水解によるシアル酸 (Neu5Ac) の遊離  
各 2.5  $\mu$ l (約 25 pmol 相当) の PA 化糖鎖スタンダード PA-Sugar Chain 021、023、024、025 を 50  $\mu$ l の 0.05 N HCl 中、80°C で 1 時間加熱し、シアル酸を遊離させた。



- (2) シアリダーゼによるシアル酸の遊離  
各 2.5  $\mu$ l (約 25 pmol 相当) の PA-Sugar Chain 021、023、024、025 を基質とし、50  $\mu$ l の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 中、*Arthrobacter ureafaciens* 由来 シアリダーゼ 100 mU を加えて、37°C で 30 分間反応させた後、100°C で 3 分間加熱して酵素反応を終了した。
- (3) 遊離シアル酸の DMB による蛍光標識と HPLC 分析  
(1) または (2) で得られたサンプルをキットのプロトコールに従って DMB 標識した反応液のうち、10  $\mu$ l を用いて分析を行った (一例として、PA-Sugar Chain 021 の HPLC 分析パターンを図 2 に示した)。  
サンプルの HPLC のピークの高さと、サンプルと同時に実験を行ったシアル酸スタンダードのピークの高さを比べることによって、サンプル中のシアル酸の定量を行うことができた。結果を表 1 に示した。

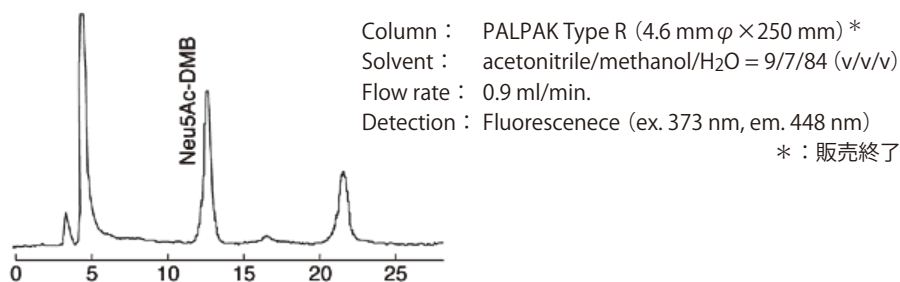


図 2. PA-Sugar Chain 021 DMB 化遊離シアル酸の HPLC 分析

(4) PA 化糖鎖の還元末端の定量

各 5  $\mu$ l (約 50 pmol 相当) の PA-Sugar Chain 021、023、024、025 をガラスチューブに入れ濃縮乾固し、5.7 N 定沸点塩酸 50  $\mu$ l を加えて減圧封管した。それを 100°C で 16 時間加熱することにより酸水解を行った。開管後濃縮乾固させ、水を少量加えて共沸し、塩酸を完全に留去した。残渣に新しく調製した飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液を 48  $\mu$ l 加えて溶かし、反応液が弱塩基性になっていることを確かめた後、無水酢酸 2  $\mu$ l を加えよく攪拌した。15 分間室温に放置した後、さらに 48  $\mu$ l の飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液と 2  $\mu$ l の無水酢酸を加え、よく攪拌後 30 分間室温に放置し、N-アセチル化を行った。反応液のうち 20  $\mu$ l を用いて分析を行った (一例として、PA 化糖鎖スタンダード 021 の HPLC 分析パターンを図 3 に示した)。サンプルの HPLC のピークの高さと、サンプルと同時に実験を行った PA-GlcNAc スタンダードのピークの高さを比べることによって、還元末端の PA-GlcNAc の定量を行った。結果を表 1 に示した。(3) で求めたシアル酸量を PA-GlcNAc 量で割り算することによって、糖鎖 1 モル当たりの結合シアル酸のモル数を求めることができる (表 1)。

表 1. PA-Sugar Chain の糖鎖あたりの結合シアル酸数

PA-Sugar Chain	Neu5Ac (pmol/ $\mu$ l)		PA-GlcNAc (pmol/ $\mu$ l)	糖鎖あたりの結合シアル酸数	
	酸水解	酵素消化		酸水解	酵素消化
021	13.0	12.9	11.6	1.1	1.1
023	25.0	26.1	11.2	2.2	2.3
024	59.7	60.8	18.6	3.2	3.3
025	58.9	65.0	14.7	4.0	4.4

(個)

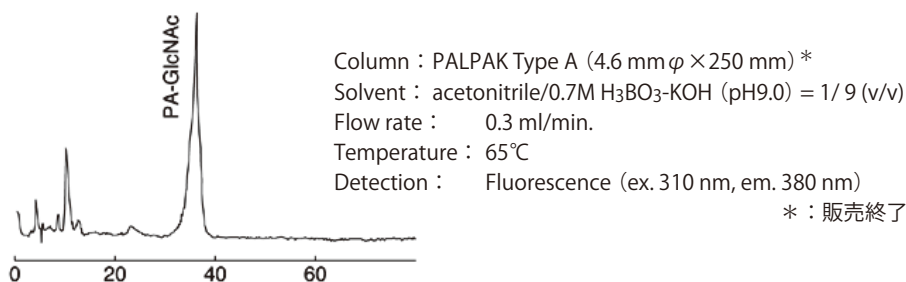


図 3. PA-Sugar Chain 021 の還元末端の HPLC 分析

## <実施例 2：ウシ Fetuin 由来 N-link 糖鎖の分析>

### (1) N-link 糖鎖の分析

ウシ Fetuin よりヒドラジン分解、N-アセチル化を行い N-link 糖鎖を得た。得られた糖鎖を *GlycoTAG* を用いて 2-アミノピリジンで蛍光標識した。PALPAK Type N\* を用い、イオン交換モードで HPLC 分析を行ったところ、図 4 に示すパターンが得られ、図のように asialo 画分～ tetrasialo 画分をそれぞれ分取した。

\*：販売終了

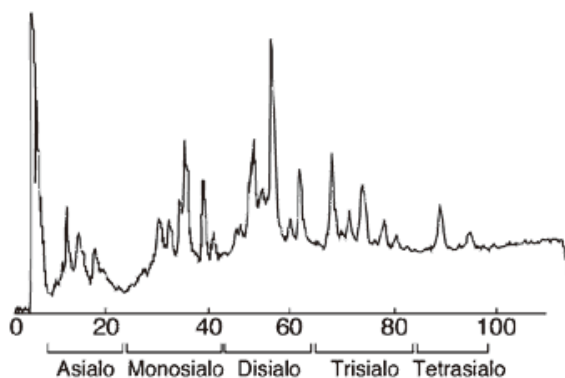


図 4. ウシ Fetuin 由来 PA 化糖鎖の HPLC 分析

### (2) 各画分のシアル酸量の定量

(1) で分取した画分の各約 100 pmol を 50  $\mu$ l の 0.05 N HCl 中、80°C で 1 時間加熱し、部分酸水解によりシアル酸を遊離させた。キットのプロトコールに従って遊離したシアル酸の DMB 標識を行い、HPLC 分析した。得られた結果を表 2 に示した。

### (3) 各画分の還元末端 PA-GlcNAc の定量

前述の方法 <実施例 1: 糖タンパク質由来 PA 化糖鎖スタンダードの分析> (4) に従って、(1) で分取した画分の各約 100 pmol を酸加水分解、N-アセチル化し、HPLC 分析によって還元末端の PA-GlcNAc 量を求めた。シアル酸量を PA-GlcNAc 量で割り算し、糖鎖あたりの結合シアル酸の個数を求めたところ、各画分から 0.16 個、0.98 個、1.86 個、2.86 個、4.26 個という結果が得られた (表 2)。

表 2. ウシ Fetuin 由来糖鎖の糖鎖あたりの結合シアル酸数

	Neu5Ac (pmol/ $\mu$ l)	PA-GlcNAc (pmol/ $\mu$ l)	糖鎖あたりの結合 シアル酸数 (個)
Asialo 画分	1.01	6.41	0.16
Monosialo 画分	8.23	8.45	0.98
Disialo 画分	26.36	14.20	1.86
Trisialo 画分	18.15	6.34	2.86
Tetrasialo 画分	7.10	1.67	4.26

### <実施例 3：糖脂質由来 PA 化糖鎖スタンダードの分析>

シアル酸は通常、酸に不安定な  $\alpha$  結合によって複合糖質に結合しており、糖鎖末端に結合している場合、50 mM 塩酸中、80°C 1 時間の加熱で簡単に遊離する<sup>8)</sup>。ところが、糖脂質 GM1 に見られる -GalNAc $\beta$ 1-4 (Neu5Ac $\alpha$ 2-3) Gal- という構造で結合したシアル酸は、N-アセチルガラクトサミンとの立体障害のため加水分解を受けにくいことが知られている。*Clostridium perfringens* や *Vibrio cholerae* 由来のシアリダーゼ ( $\alpha$ -2, 3、 $\alpha$ -2, 6 結合に特異的) を用いた場合、通常の酵素量ではシアル酸は遊離しない。また、部分酸水解の場合でも PA 化糖鎖 (GM1-PA) では図 5 に示すように 1 時間ではシアル酸は 80% 程度しか遊離せず、3 時間でほぼ 100% 遊離することがわかる。

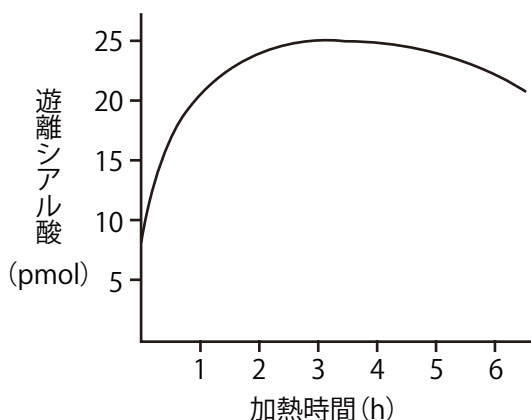


図 5. 25 pmol の GM1-PA を含む 50 mM HCl 50  $\mu$ l を 80°C で加熱した時の遊離シアル酸量 (シアル酸量は DMB 化により測定)

#### (1) 脱シアル酸の条件

##### [I. 部分酸水解の条件]

各 2.5  $\mu$ l (約 25 pmol 相当) の PA-Sugar Chain 029、032、033 (販売終了)、035、036、037 を次に示す A ~ C の条件で部分酸水解をした。

A: 50 mM 塩酸 50  $\mu$ l 中、80°C 3 時間

B: 2 M 酢酸 50  $\mu$ l 中、80°C 3 時間

C: 1 M ギ酸 50  $\mu$ l 中、100°C 1 時間

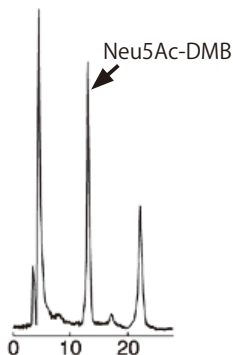
A ~ C の方法で得られた水解物をキットのプロトコールに従って DMB 標識し、HPLC によってシアル酸の定量を行った。結果を表 3 に示す。

##### [II. 酵素による加水分解]

各 2.5  $\mu$ l (約 25 pmol 相当) の PA-Sugar Chain 029、032、033、035、036、037 を、*Arthrobacter ureafaciens* 由来シアリダーゼ 500 mU を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 25  $\mu$ l 中で 37°C 30 分間反応させた後、100°C で 3 分間加熱して酵素反応を停止した。キットのプロトコールに従って DMB 標識し、HPLC によってシアル酸の定量を行った。結果を表 3 に示す。

(2) 遊離シアル酸の DMB による蛍光標識と HPLC 分析

I または II で得られたサンプルをキットのプロトコールに従って DMB で標識した。糖鎖 1 pmol に相当する量を HPLC で分析した。一例として、PA-Sugar Chain 029 の HPLC の分析パターンを図 6 に示す。サンプルの HPLC のピークの高さとサンプルと同時に実験を行ったスタンダードのシアル酸のピークの高さを比較することによって、サンプル中のシアル酸の定量を行った。

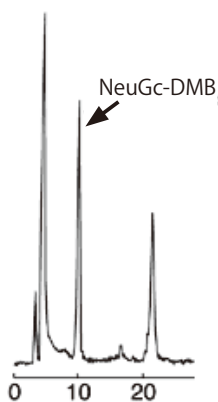


Column : PALPAK Type R (4.6 mm  $\phi$   $\times$  250 mm)  
Solvent : acetonitrile/methanol/H<sub>2</sub>O = 9/7/84 (v/v/v)  
Flow rate : 0.9 ml/min.  
Detection : Fluorescence (ex. 373 nm, em. 448 nm)

図 6. PA-Sugar Chain 029 由来遊離シアル酸の HPLC 分析

(3) NeuGc の分析

2.5  $\mu$ l の PA-Sugar Chain 030 (約 25 pmol 相当) を濃縮乾固し、50  $\mu$ l の 50 mM 塩酸を加えて 80°C で 3 時間加熱し NeuGc を遊離した。キットのプロトコールに従って DMB 標識し HPLC 分析を行った。結果を図 7 に示す。DMB 化によって Neu5Ac だけでなく NeuGc の分析も行うことができる。



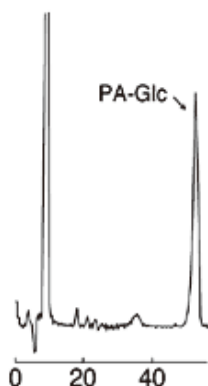
Column : PALPAK Type R (4.6 mm  $\phi$   $\times$  250 mm)  
Solvent : acetonitrile/methanol/H<sub>2</sub>O = 9/7/84 (v/v/v)  
Flow rate : 0.9 ml/min.  
Detection : Fluorescence (ex. 373 nm, em. 448 nm)

図 7. PA-Sugar Chain 030 由来遊離 NeuGc の HPLC 分析



(4) PA 化糖鎖の還元末端の定量

各 5  $\mu$ l (約 50 pmol 相当) の PA-Sugar Chain 029、032、033、035、036、037 をガラスチューブに入れ濃縮乾固し、2 N 塩酸 / 2 M TFA 混合液 50  $\mu$ l を加えて減圧封管した。100 $^{\circ}$ C 6 時間加熱し酸水解を行った。開管後、濃縮乾固させ水を少量加えて共沸した。さらに水を 25  $\mu$ l 加えて残渣を溶かし、そのうち 5  $\mu$ l を図 3 に示した HPLC 条件で分析した。一例として、PA-Sugar Chain 032 の HPLC 分析パターンを図 8 に示す。サンプルの HPLC のピークの高さと、サンプルと同時に実験を行ったスタンダードの PA-Glc のピークの高さを比較することによって、還元末端の PA-Glc の定量を行った。結果を表 3 に示す。



Column : PALPAK Type A (4.6 mm  $\phi$   $\times$  250 mm)  
 Solvent : acetonitrile/ 0.7M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-KOH (pH9.0) = 1/ 9 (v/v)  
 Flow rate : 0.3 ml/min.  
 Temperature : 65 $^{\circ}$ C  
 Detection : Fluorescence (ex. 310 nm, em. 380 nm)

図 8. PA-Sugar Chain 032 の還元末端の HPLC 分析

(5) 糖鎖あたりの結合シアル酸量

(2) で求めたシアル酸量を還元末端量で割り算することによって糖鎖 1 モルあたり結合しているシアル酸のモル数を求めることができる (表 3)。

表 3 の結果より、-GalNAc  $\beta$  1-4 (-Neu5Ac  $\alpha$  2-3) Gal- という構造をもつ PA-Sugar Chain 032、033、036、037 は、もたない糖鎖 (029、035) に比べて若干シアル酸のモル数が低く検出される傾向があるが、50 mM 塩酸中 80 $^{\circ}$ C 3 時間で部分酸水解を行ったサンプルの結果は良好であった。

表 3. PA-Sugar Chain の糖鎖あたりの結合シアル酸数

PA-Sugar Chain	I. 部分酸水解によるシアル酸量 (pmol/ $\mu$ l)			II. シアリダーゼ消化によるシアル酸量 (pmol/ $\mu$ l)	(4) 還元末端量 PA-Glc (pmol/ $\mu$ l)	糖鎖あたりの結合シアル酸数 (個)			
	A	B	C			A	B	C	シアリダーゼ消化
029	13.88	13.05	12.02	13.24	13.71	1.01	0.95	0.88	0.97
032	9.11	6.01	6.20	6.16	8.62	1.06	0.70	0.72	0.71
033	26.38	22.12	24.76	20.36	13.08	2.02	1.69	1.89	1.56
035	31.83	30.75	30.24	30.19	5.77	2.02	1.95	1.92	1.91
036	37.00	35.37	36.35	33.05	13.93	2.66	2.54	2.61	2.37
037	50.19	46.99	48.86	45.02	13.76	3.65	3.41	3.55	3.27

## V. 応用例

### 多サンプルの正確・迅速な定量に適したプロトコールの検討

シアル酸を含む医薬品および食品（たとえば、医薬ではエリスロポエチン、食品ではミルクオリゴ糖など）の製造および分析の現場では、多くのサンプルについてシアル酸を正確かつ迅速に定量することが要求される。このような多サンプルの定量に適したプロトコールの検討例を示す。

[HPLC の分析条件について]

予備的実験により、カラム温度は 40°C に設定し、溶出は Solvent A (methanol/water = 7/93, v/v)、Solvent B (acetonitrile/methanol = 93/7, v/v) を用いたグラジエント溶出とした。なお、多サンプルの分析を行う場合、試薬由来のピークが非常に遅れて溶出されるためクロマト中に非常に大きなブロードピークが現われ、分析を妨げることがある。そこで、分析ごとに acetonitrile/methanol (93/7, v/v) の溶出液でカラムを洗浄することにした。

また、オートインジェクターによるインジェクト量の補正のために、内部標準として、シアル酸の一種、3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid (keto-deoxy-nonulosonic acid、KDN)<sup>9)</sup> を用いた (Toront Research Chemical 社より入手可能)。

KDN は、N-acetylneuraminic acid (NANA) や N-glycolylneuraminic acid (NGNA) と非常に構造が近く (図 9)、DMB に対する反応性がほとんど変わらないことが予想される。

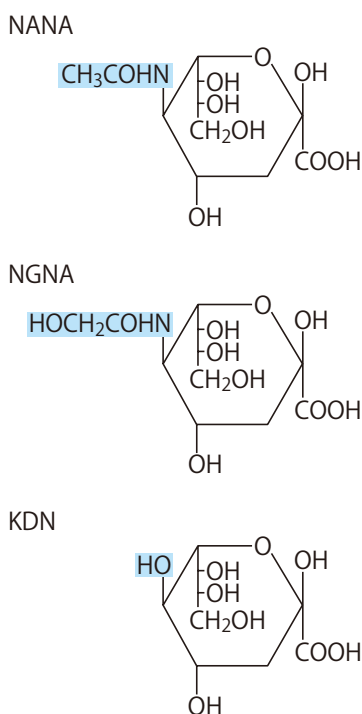


図 9. シアル酸の構造

### [実験 1：各種シアル酸の DMB 化反応のタイムコース]

各 10 pmol の NANA、NGNA および KDN を含む水溶液 10  $\mu$ l に、キットの標識試薬混合液を 200  $\mu$ l 加え、遮光条件下で 50 $^{\circ}$ C にて反応させた。0.5 時間、1.25 時間、2.5 時間、5.0 時間の時点で反応液をサンプリングし、その 10  $\mu$ l (シアル酸各 476 fmol 相当) を HPLC で分析した (図 10)。



Column : PALPAK Type R (4.6 mm  $\phi$   $\times$  250 mm)  
SolventA : methanol/H<sub>2</sub>O = 7/93 (v/v)  
SolventB : acetonitrile/methanol = 93/7 (v/v)  
Elution : 0 - 25 min. 5% Solvent B  
25 - 35 min. 100% Solvent B  
35 - 50 min. 5% Solvent B (re-equilibration)  
Flow rate : 1 ml/min.  
Temperature : 40 $^{\circ}$ C  
Detection : Fluorescence (ex. 373 nm, em. 448 nm)

図 10. DMB シアル酸の分離

### 【結果】

図 10 の条件では、NANA、NGNA、KDN ともに非常に良好な分離を示した。また、acetonitrile/methanol (93/7, v/v) による 10 分間のカラム洗浄によりカラム内の不純物 (30 分付近の大きなピーク) を除去することができた。得られた DMB 化反応のタイムコース (反応 2.5 時間の時点の各 DMB シアル酸のピーク高を 1 とし、ピーク高の時間変化をプロットした) を図 11 に示す。NANA、NGNA および KDN のそれぞれの反応タイムコースは非常によく一致した。このことは、KDN が DMB に対して NANA および NGNA と同じ反応性をもつこと、つまり、KDN が DMB 法によるシアル酸分析の内部標準として有効であることを示している。

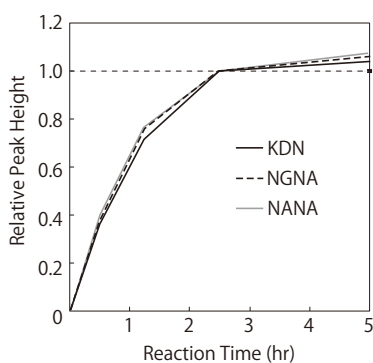


図 11. 各種シアル酸の DMB 化タイムコース (2.5 時間でのピーク高を 1 とした)

## [実験 2：糖タンパク質のシアル酸分析例]

ウシ顎下腺ムチンには NANA や NGNA 以外にこれらのシアル酸の O-アセチル化体が 10 種類以上含まれていることが報告されている<sup>10)</sup>。O-アセチル基は塩酸や硫酸などの強酸による脱シアル酸処理条件では一部脱離するため、シアル酸を完全遊離できる条件 (0.1 N HCl, 80°C 1 hour) に加え、O-アセチル基が脱離しにくいとされている条件 (2 M AcOH, 80°C 3 hours)<sup>11)</sup> でも脱シアル酸処理し、分析を行った。

ウシ顎下腺ムチン 1  $\mu$ g に内部標準として KDN を 20 pmol 加え、50  $\mu$ l の 0.1 N 塩酸または 2 M 酢酸中でシアル酸を遊離させた。キットのプロトコールに従って遊離したシアル酸の DMB 標識を行い、反応液 10  $\mu$ l (タンパク質 40 ng に相当) を HPLC 分析した (図 12)。表 4 にスタンダードを基に定量した遊離シアル酸量を示す。

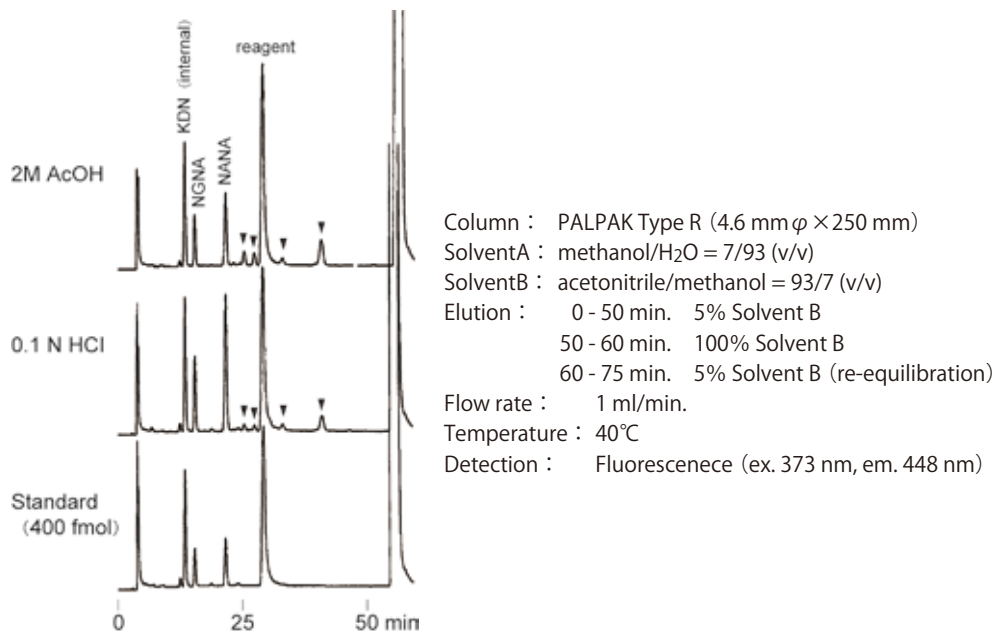


図 12. ウシ顎下腺ムチンのシアル酸分析

表 4. シアル酸定量における酸加水分解条件の比較

	NGNA (pmol/ $\mu$ g)	NANA (pmol/ $\mu$ g)
塩酸処理	17.1	24.7
酢酸処理	13.6	15.8

### 【結果】

NGNA および NANA とともに塩酸処理の方が値が大きかった。酢酸処理でシアル酸がすべて脱離しているとすれば、この差は O-アセチル化シアル酸によるものと考えられる (両者の内部標準の KDN のピークに差が見られなかったことから、酸水解条件の違いによって DMB 化反応自体が影響を受けたとは考えられない)。確かに、O-アセチル化シアル酸と思われるピークがいくつか見られ、(図 12、▼)、これらのピークは塩酸処理よりも酢酸処理の方が 2 倍近く大きかった。

現在のところ、O-アセチル化シアル酸のスタンダードの市販品がないため、O-アセチル化シアル酸を個別に定量することができない (ただし、同定のみが目的ならば、Oxford GlycoSystems 社から販売されている混合物を利用することができる)。したがって、O-アセチル化シアル酸を含むサンプルの全シアル酸の定量を目的とする場合は、あらかじめアルカリ条件下 (0.1 N NaOH, 37°C 30 min.)<sup>10)</sup> で脱 O-アセチル化してから加水分解を行い、DMB 化する必要がある。

## VI. 関連製品

PA-Sugar Chain 各種 (PA-Sugar Chain 023 (製品コード 4123) など)

## VII. 参考文献

- 1) Nakamura, M., Hara, S., Yamaguchi, Y., Takemori, Y., and Ohkura, Y. *Chem Pharm Bull.* (1987) **35**: 687.
- 2) Hara, S., Yamaguchi, M., Takemori, Y., Furuhashi, K., Ogura, H., and Nakamura, M. *Anal Biochem.* (1989) **179**: 162.
- 3) Svennerholm, L. *Biochim Biophys Acta.* (1957) **24**: 604.
- 4) Warren, L. *J Biol Chem.* (1959) **234**: 1971.
- 5) Kondo, A., Suzuki, J., Kuraya, N., Hase, S., Kato, I., and Ikenaka, T. *Agric Biol Chem.* (1990) **54**: 2169.
- 6) Suzuki, J., Kondo, A., Kato, I., Hase, S., and Ikenaka, T. *Agric Biol Chem.* (1991) **5**: 283.
- 7) Ohara, K., Sano, M., Kondo, A., and Kato, I. *Chromatogr.* (1991) **586**: 35.
- 8) Svennerholm, L. *Acta Chem Scand.* (1958) **12**: 547.
- 9) Nadano, D., et al. *J Biol Chem.* (1986) **261**: 11550-11557.
- 10) Klein, A., et al. *Glycobiology.* (1997) **7**: 421-432.
- 11) Varki, A. and Diaz, S. *Anal Biochem.* (1984) **137**: 236-247.

## VIII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

**タカラバイオ株式会社**