



# Agilent AdvanceBio シアル酸定量キット

サンプル処理の簡素化を実現

## 利点とメリット

- 高速かつ信頼性の高い総シアル酸含有量の定量分析
- 広いダイナミックレンジ
- プレートリーダーによる蛍光およびUV 検出に対応可能
- シアル酸の分解を最小限に抑えることが可能
- ユーザーフレンドリーなハイスループット形式
- 48 サンプルと 96 サンプルの 2 サイズに対応
- 自動化向けのワークフロー

糖タンパク質 10  $\mu$ L

シアリダーゼ A の消化 30 分

シアル酸の遊離

変換と発色 60 分

プレートの分析

Ex 530 nm/Em 590 nm (FLD)  
530 nm (吸光)

## ハイスループットを実現する、高感度なシアル酸定量分析

シアル酸は、治療用糖タンパクの有効性に関わる重要な働きを担います。N-グリカンまたはO-グリカンの非還元末端にシアル酸の有無で、タンパク質の薬物動態と免疫原性に大きな影響を及ぼす可能性があります。したがって、タンパク質医薬品のシアル酸含有量を可能な限り高いレベルに維持できるようにすること、その管理とモニタリングが必要不可欠です。AdvanceBio 総シアル酸定量キット (旧 ProZyme) なら、シアル酸定量分析を高感度に行え、ハイスループットも実現します。このワークフローは、遊離したシアル酸を酵素的に過酸化水素に変換する共役酵素反応に基づいています。過酸化水素は色素に化学量論的に反応して強い蛍光を発生し、吸光反応を起こします。この方法によって、酵素によるシアル酸の遊離、変換、検出と定量を単一の 96 ウェルプレートで行え、高速かつシンプルなサンプル処理を実現できます。

## ワークフロー

### ステップ 1: シアル酸の遊離

糖タンパク質 + シアリダーゼ A  $\rightarrow$  シアル酸 + 脱グリコシル化糖タンパク質 (シアル酸を遊離)

### ステップ 2: 遊離したシアル酸の検出 (60 分)

N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼの触媒作用により、可逆反応が引き起こされます。

シアル酸  $\leftrightarrow$  マンノサミン + ピルビン酸

次に、ピルビン酸オキシダーゼの触媒作用により、次の反応が引き起こされます。

ピルビン酸  $\rightarrow$  アセチルリン酸 +  $H_2O_2$

$H_2O_2$  は色素と 1:1 の複合体を形成し、蛍光検出または吸光検出によって分析可能な蛍光性レポーター色素となります。

色素 +  $H_2O_2$   $\rightarrow$  レポーター色素

## サンプル前処理および考察

AdvanceBio 総シアル酸定量キットは、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、ポリシアル酸や全細胞といったさまざまな種類のサンプルに対応可能です。最適な結果を得るには、サンプルを水、PBS やその他の低モル濃度バッファに含ませる必要があります。

このアッセイのダイナミックレンジは、蛍光検出でシアル酸量 40 ~ 1,000 pmol、吸光検出でシアル酸量 500 ~ 4,000 pmol です。このキットは、48 ポイントまたは 96 ポイントのデータポイントの生成に適した、2 種類の構成に対応可能です。各サンプルに対し、3 回実施する場合（サンプルとネガティブコントロール）はデータポイントが 6 ポイント、2 回実施する場合はデータポイントが 4 ポイント必要です。シアル酸の信頼性の高い適切な定量のため、サンプルセットごとに、サンプルと並行してシアル酸検量線を生成する必要があります（図 1）。100 μM 原液で同梱されるシアル酸標準（N-アセチルノイラミン酸）は、同種のシアル酸の 3 つの異なるロットで一貫した高い信頼性を示しています（図 2）。本書で示すデータはすべて、BioTek Synergy H1 マイクロプレートリーダーで、蛍光検出によって収集したものです。

## データ例：総シアル酸の定量結果

表 1. AdvanceBio シアル酸定量キットで対応可能なタンパク質の総量と共に示した、さまざまな糖タンパク質の初期濃度の例

|              | フェチュイン | MabThera* | Enbrel | Zaltrap | オレンシア | エベオチン<br>アルファ |
|--------------|--------|-----------|--------|---------|-------|---------------|
| 濃度 (mg/mL)   | 0.25   | 10        | 0.25   | 0.5     | 0.5   | 1             |
| サンプル量 (μL)   | 10     | 10*       | 10     | 10      | 10    | 10            |
| サンプル質量 (μg)  | 2.5    | 100       | 2.5    | 5       | 5     | 10            |
| MW (kDa)     | 48     | 145       | 150    | 115     | 92    | 30.4          |
| タンパク質 (pmol) | 52     | 690       | 16.7   | 43      | 54    | 329           |

\* モノクローナル抗体など、シアル化レベルの低い糖タンパク質の場合は、本キットで最大 30 μL のサンプルをご使用いただけます。

表 2. さまざまな糖タンパク質の典型的な総シアル酸 (SA) 量、N = 3。

|                             | フェチュイン       | MabThera    | Enbrel       | Zaltrap      | オレンシア        | エベオチン<br>アルファ |
|-----------------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| 初期濃度 (mg/mL)                | 0.25         | 10          | 0.25         | 0.5          | 0.5          | 1             |
| MW (kDa)                    | 48           | 145         | 150          | 115          | 92           | 30.4          |
| nmol SA/10 μL<br>サンプル       | 0.58         | 0.08        | 0.55         | 0.45         | 0.59         | 0.16          |
| nmol SA/mg<br>タンパク質         | 232.53       | 0.79        | 220.93       | 90.27        | 117.27       | 15.50         |
| <b>mol SA/mol<br/>タンパク質</b> | <b>11.16</b> | <b>0.11</b> | <b>33.14</b> | <b>10.38</b> | <b>10.79</b> | <b>0.47</b>   |
| %CV (n=3)                   | 0.55 %       | 2.65 %      | 1.81 %       | 0.46 %       | 0.60 %       | 3.59 %        |
| SD (mol SA/mol<br>タンパク質)    | 0.06         | 0.00        | 0.60         | 0.05         | 0.06         | 0.02          |

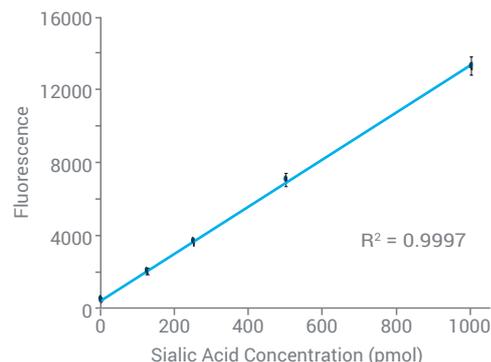


図 1. AdvanceBio 総シアル酸定量キット検量線。検量線の 5 つのポイントは、0、125、250、500 および 1,000 pmol のシアル酸量に相当し、R<sup>2</sup> 値は 0.9997 です。

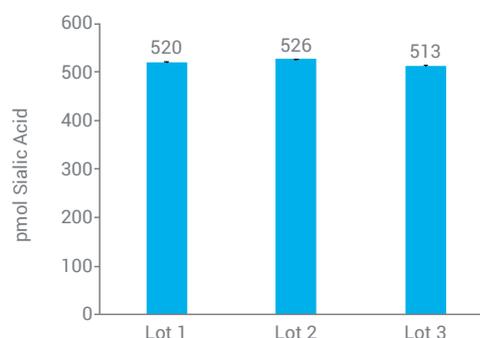


図 2. Neu5Ac シアル酸標準溶液のロット間比較。500 pmol のシアル酸の測定

## 検査キットの構成

AdvanceBio 総シアル酸定量キットには、次の試薬と標準が付属しています。

| モジュール：AdvanceBio 総シアル酸定量キット (GS48-SAQ および GS96-SAQ) |          |          |             |
|---|----------|----------|-------------|
| コンポーネント   | 数量       |          | 保管          |
|   | GS48-SAQ | GS96-SAQ |             |
| 100 µM N-アセチルノイラミン酸 (NANA, NeuAc) シアル酸標準 (1 mL)     | 1        | 2        | -20 °C      |
| ウシフェチュインコントロール (0.4 mg、凍結乾燥)                        | 1        | 2        | -20 °C      |
| SAQ 色素 (凍結乾燥)                                       | 1        | 2        | -20 °C      |
| パーオキシダーゼ (凍結乾燥)                                     | 1        | 2        | -20 °C      |
| DMSO  | 1        | 2        | -20 ~ 4 °C  |
| 変換試薬 (凍結乾燥)   | 1        | 2        | -20 °C      |
| SAQ バッファ A  | 1        | 2        | -20 ~ 4 °C  |
| SAQ バッファ B  | 1        | 2        | -20 ~ 4 °C  |
| SAQ バッファ C  | 1        | 2        | -20 ~ 4 °C  |
| シアリダーゼ A  | 1        | 2        | 4 °C        |
| 96 ウェルマイクロプレート (透明底)                                | 1        | 2        | -20 °C ~ RT |
| シールフィルム   | 1        | 2        | -20 °C ~ RT |

## 製品情報

| 部品番号     | 品名                              |
|----------|---------------------------------|
| GS48-SAQ | AdvanceBio 総シアル酸定量キット (48 カウント) |
| GS96-SAQ | AdvanceBio 総シアル酸定量キット (96 カウント) |

ユーザーマニュアル (英語のみ) は、アジレント資料番号 [5994-1277EN](#) をご覧ください。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

Printed in Japan, November 10, 2020

5994-2789JAJP

DE.7484143519