

# Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB

## 高速 N-グリカンサンプル前処理

Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB の試薬と消耗品は、画期的な溶液内での酵素によるタンパク質の脱グリコシル化と、その後の 2-AB 色素による遊離 N-グリカンの高速ラベリングを利用しています。このワークフローでは、オンマトリックスラベリングにより乾燥ステップが不要となります。また、2 時間以内でサンプルを前処理できるシンプルなワークフローを使用しています。



サンプルの前処理には、次の追加製品が必要です。

### ラボの消耗品と機器

ピペットとピペットチップ  
Eppendorf チューブ  
サーマルサイクラー  
ブロックヒーター

### その他の試薬

アセトニトリル



**1. N-グリコナーゼ希釈標準溶液を調製します。**ピペットで 1 サンプルあたり 1.2  $\mu\text{L}$  の N-グリコナーゼを 1 本のエッペンドルフチューブに移します。  
時間：1 分      合計時間：1 分



**2. 1 サンプルあたり 1.2  $\mu\text{L}$  の消化緩衝液をエッペンドルフチューブに加えます。**N-グリコナーゼと消化緩衝液を 4  $^{\circ}\text{C}$  に戻します。  
時間：1 分      合計時間：2 分



**3. 2-AB 希釈標準溶液を調製します。**1 サンプルあたり、2  $\mu\text{L}$  の 2-AB 溶液（白のキャップ）を 1 本の Eppendorf チューブに添加します。  
時間：1 分      合計時間：3 分



**4. 1 サンプルあたり 2  $\mu\text{L}$  の 2-AB 還元剤（黒のキャップ）を、同じ Eppendorf チューブに添加します。**  
時間：1 分      合計時間：4 分



**5. 1 サンプルあたり 4  $\mu\text{L}$  の 2-AB 触媒（黄色のキャップ）を、同じ Eppendorf チューブに添加します。**  
時間：1 分      合計時間：5 分



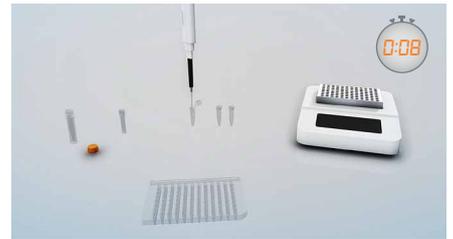
6. 1 サンプルあたり 88 µL のアセトニトリルを、同じ Eppendorf チューブに添加します。2-AB 溶液、2-AB 還元剤、2-AB 触媒を -20 °C に戻します。

時間：1分 合計時間：6分



7. Gly-X を脱グリコシル化します。前処理するサンプルごとに、2 µL の Gly-X 変性剤（オレンジ色のキャップ）を、Gly-X 脱グリコシル化プレートのウェルにピペットで注入します。

時間：1分 合計時間：7分



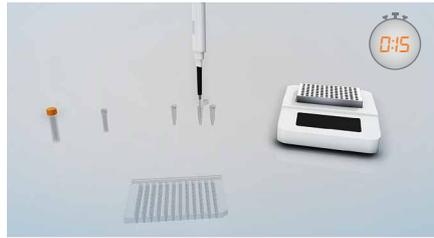
8. 各ウェルに 20 µL の糖タンパク質サンプルを添加します。ピペットを使ってよく混ぜます。**必ず、分注ステップ間でピペットチップを交換してください。**

時間：1分 合計時間：8分



9. ベンチトップ上のプレートを軽くたたいて、ウェルの底部にあるサンプルを採取します。Gly-X 脱グリコシル化プレートをヒーターの上に置き、カバーをせずに 90 °C で 3 分間培養します。

時間：4分 合計時間：12分



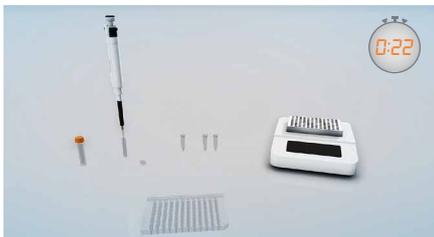
10. プレートをとり外し、ベンチ上に室温で 2 分間置きます。プレート上の各サンプルウェルに 2 µL の N-グリコシラーゼ希釈標準溶液を添加します。ピペットを使ってよく混ぜます。

時間：3分 合計時間：15分



11. ベンチトップ上のプレートを軽くたたいて、ウェルの底部にあるサンプルを採取します。Gly-X 脱グリコシル化プレートをヒーターの上に置き、カバーをせずに 50 °C で 5 分間培養します。

時間：6分 合計時間：21分



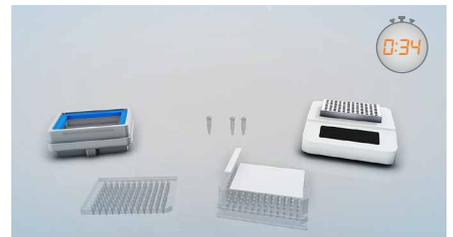
12. プレートをとり外します。プレート上の各サンプルウェルに、2 µL の 2-AB 最終試薬を添加します。ピペットを使ってよく混ぜます。

時間：1分 合計時間：22分



13. ベンチトップ上のプレートを軽くたたいて、ウェルの底部にあるサンプルを採取します。Gly-X 脱グリコシル化プレートをヒーターの上に置き、カバーをせずに 50 °C で 10 分間培養します。

時間：11分 合計時間：33分



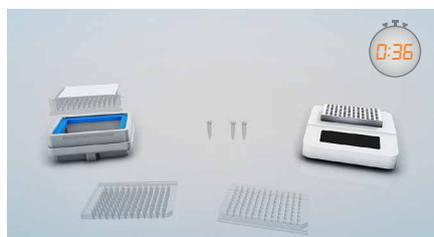
14. グリカンをマトリックスにロードします。Gly-X クリーンアッププレート上の白のキャップを慎重に取り外します。

時間：1分 合計時間：34分



15. 真空マニホールドに廃液トレイを取り付けます。

時間：1分 合計時間：35分



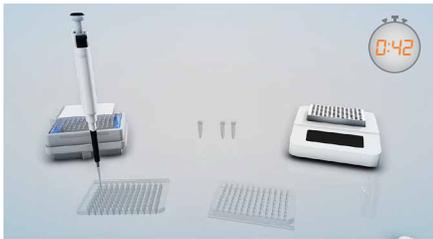
16. 真空マニホールドの上に Gly-X クリーンアッププレートを置きます。

時間：1分 合計時間：36分



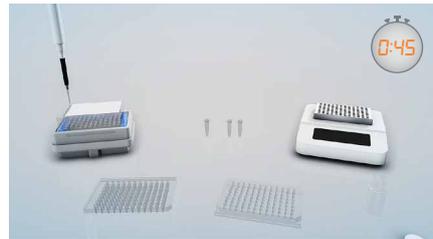
17. Gly-X クリーンアッププレートの各ウェルに 450 µL のアセトニトリルを添加します。これはクリーンアップ中に使用します。未使用のウェルのキャップは取り外さないでください。

時間：3分 合計時間：39分



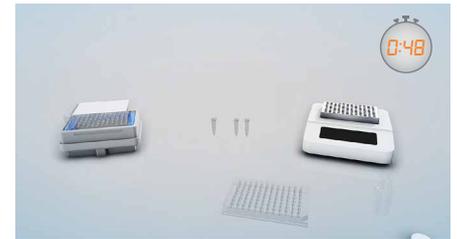
18. すべてのサンプルに 150  $\mu$ L の アセトニトリルを添加します。ピペットを使ってよく混ぜます。

時間：3分 合計時間：42分



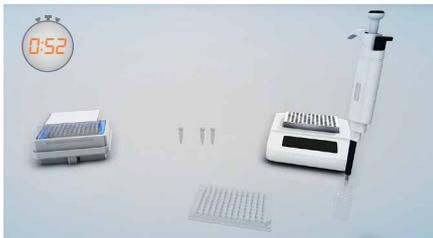
19. Gly-X 脱グリコシル化プレートから、サンプル全体 (172  $\mu$ L 以下) を Gly-X クリーンアッププレートの対応するウェルに移します。ピペットを使ってよく混ぜます。各サンプルが Gly-X クリーンアッププレートに移されるまで、ステップ 18 ~ 19 を繰り返します。

時間：3分 合計時間：45分



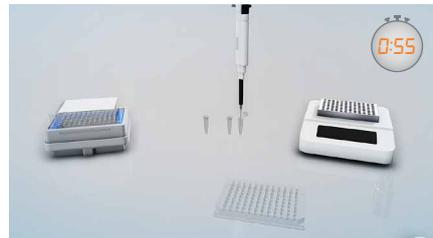
20. 真空ポンプで減圧し (5 Hg 未満)、サンプル溶液をウェルから廃液プレートに流します。

時間：3分 合計時間：48分



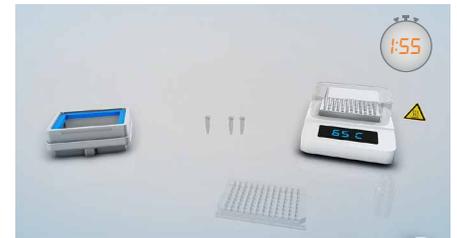
21. 各ウェルに 600  $\mu$ L のアセトニトリルを添加します。再び 5 in Hg 未満の真空圧力をかけて、溶液を通過させます。

時間：4分 合計時間：52分



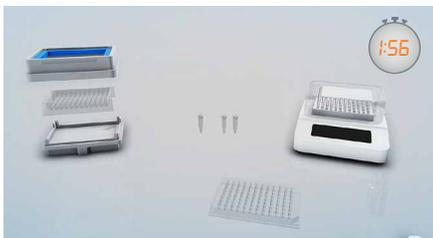
22. オンマトリックス 2-AB Express ラベリング。Gly-X クリーンアッププレートの各ウェルに 80  $\mu$ L の 2-AB 希釈標準溶液を添加します。5 in Hg 未満の真空圧力をかけて、溶液を通過させます。

時間：3分 合計時間：55分



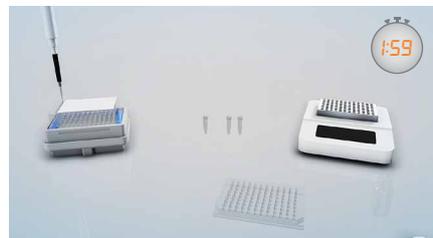
23. ヒートブロックの上に Gly-X クリーンアッププレートを設置します。ヒートブロックカバーを掛け、65  $^{\circ}$ C で 1 時間培養します。

時間：60分 合計時間：1時間 55分



24. 2-AB クリーンアップ - 洗浄。真空マニホールドの廃液トレイを取り外し、ロードプレート (ディープウェルプレート) を取り付けます。

時間：1分 合計時間：1時間 56分



25. 真空マニホールドの上に Gly-X クリーンアッププレートを設置します。各ウェルに 600  $\mu$ L のアセトニトリルを添加します。

時間：3分 合計時間：1時間 59分



26. 5 in Hg 未満の真空圧力をかけ、溶出液をロードプレートに収集します。ロードプレートを取り外し、真空マニホールドに廃液トレイを取り付けます。

時間：4分 合計時間：2時間 3分



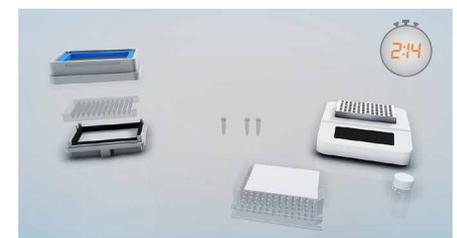
27. 2-AB クリーンアップ - 再ロード。ロードプレートから収集した溶出液全体 (600  $\mu$ L 以下) を、クリーンアッププレートの対応するウェルに移します。5 in Hg 未満の真空圧力をかけます。

時間：5分 合計時間：2時間 8分



28. 2-AB クリーンアップ - 洗浄。クリーンアッププレート上の各ウェルに 600  $\mu$ L のアセトニトリルを添加します。5 in Hg 未満の真空圧力をかけます。同じステップをあと 2 回繰り返して、合計 3 回洗浄します。

時間：5分 合計時間：2時間 13分



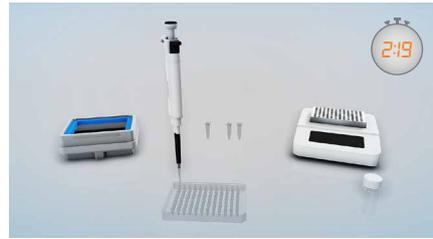
29. 2-AB クリーンアップ - 溶出。Gly-X 真空マニホールドスパーサ (黒のスパーサ) を取り付けます。コレクションプレート (PCR プレート) を取り付けます。

時間：1分 合計時間：2時間 14分



**30.** 真空マニホールドの上に、もう一度クリーンアッププレートを設置します。クリーンアッププレートの各ウェルに 100  $\mu$ L の脱イオン水を添加します。5 in Hg 未満の真空圧力をかけます。

時間：3分 合計時間：2時間17分



**31.** コレクションプレートを取り出します。分析前に各サンプルを混ぜます。

時間：2分 合計時間：2時間19分



**32.** マルチサンプル内にコレクションプレートを置き、分析を実行します。

時間：1分 合計時間：2時間20分

## グリカンサンプルの前処理および分析用の消耗品一式

アジレントは、分析作業に必要なあらゆる消耗品をご用意しています。

- すぐに簡単に使用できるサンプル前処理キットと各種 N-グリカンラベル
- ラベル化 N-グリカン標準およびライブラリ
- ラベルなし N-グリカン標準およびライブラリ
- N-グリカンの構造特性解析用のエンドグリコシダーゼとエキソグリコシダーゼ
- インタクト糖タンパク質、遊離グリカン、単糖類など、あらゆるレベルの分析に使用できる HILIC カラムおよびその他の LC 消耗品

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. 2021  
Printed in Japan, July 19, 2021  
5994-3564JAJP  
DE44393.4298263889