

Code No. 4400

研究用

TaKaRa

Sialic Acid Fluorescence
Labeling Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 操作方法	1
● 实验例	2
● 应用例	6
● 关联产品	9
● 参考文献	9

● 制品说明

使用 1, 2-diamino-4, 5-methyleneoxybenzene (DMB)对唾液酸进行荧光标记是一个既简单又非常灵敏的分析方法^(1, 2) (例 1)。在这个方法中, 游离的唾液酸被 DMB 标记后, 可以通过反相 HPLC 进行分析。糖蛋白、糖脂等样品可以通过酶解或酸水解后释放糖链上的唾液酸, 对游离唾液酸进行定量检定。DMB-唾液酸的检测极限是 57 fmol^(1, 2)。

本制品简化了 DMB-衍生过程, 以水溶液状态提供, 仅需将试剂混合便可进行反应。

DMB 法与 PA 化法结合是高灵敏度分析糖链的方法, 用于唾液酸糖结合物的分析, 具有很高的灵敏度。

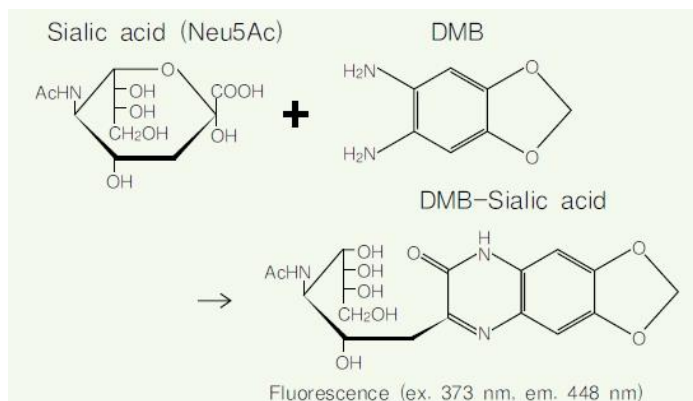


图 1: 用 DMB 荧光标记的唾液酸

● 制品内容 (100 次量)

DMB Solution*	1 ml × 2
Coupling Solution (Containing acetic acid, sodium hydrosulfite)	5 ml × 2
Neu5Ac (100 μM)	500 μl

*: DMB Solution 可能会有颜色, 但是对产品性能没有影响。

● 保 存

-20°C (DMB Solution 避光保存)

● 操作方法

- 在 1.5 ml 的旋盖 tube 中准备含有游离唾液酸的样品 (5 pmol-5 nmol)。*：样品体积必须小于 50 μl。由于标记反应过程在酸性条件下进行, 所以样品溶液的 pH 值必须保持中性或酸性。*：对照使用 100 μM Neu5Ac, 每个反应分别取 2-20 μl 的 Neu5Ac, 取 10 μl (10-100 pmol) 的反应液进行分析。
- 准备混合溶液, 试剂比例如下:
试剂 1 (DMB Solution): 试剂 2 (Coupling Solution): 水 = 1:5:4
*：这个混合溶液在 4°C 可稳定保存一周时间。
- 加入 200 μl 混合溶液到样品中, 混合均匀。
- 50°C 避光反应 2.5 小时。
- 冰中放置约 5 分钟停止反应。
- 取 10 μl 反应混合液进行反相 HPLC 检测。(激发波长: 373 nm, 发射波长: 448 nm) 所有分析应在

同一天完成。

* 可使用 YMC-Pack ODS-A (YMC; Cat. #AA12S05-2546WT)等。

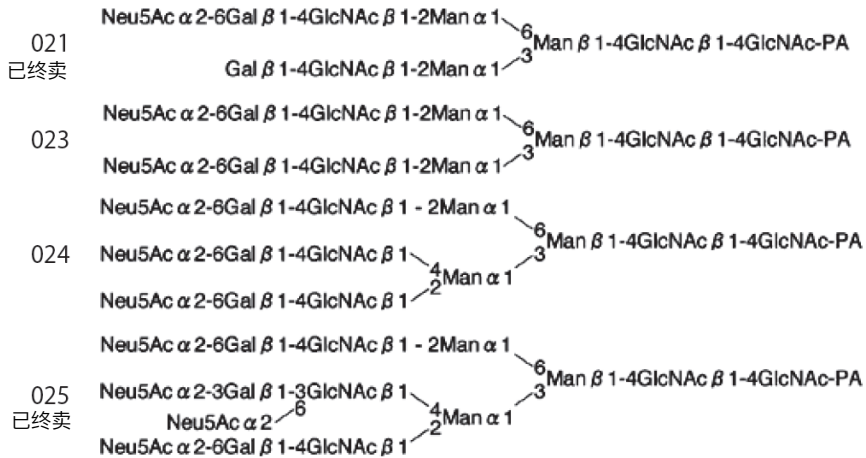
7. 通过唾液酸的标准曲线，确定并计算样品的唾液酸量。

● 实验例

例 1: 来源于糖蛋白的 PA-Sugar Chains 标准品分析

(1) 通过部分酸水解释放唾液酸 (Neu5Ac)。

PA-Sugar Chain 021, 023, 024, 025 各 2.5 μ l (约 25 pmol) 分别加入到 50 μ l 0.05 N 的盐酸中, 80 $^{\circ}$ C 加热反应 1 小时。



(2) 在唾液酸酶作用下释放唾液酸 (Neu5Ac)。

使用 PA-Sugar Chain 021, 023, 024, 025 (每 2.5 μ l, 约 25 pmol) 作为底物, 分别加入 100 mU 的 *Arthrobacter ureafaciens* 唾液酸酶, 在 50 μ l NaOAc pH5.0 条件下, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟, 100 $^{\circ}$ C 加热 3 分钟停止反应。

(3) 使用 DMB 对游离的唾液酸进行荧光标记并进行 HPLC 分析。

根据试剂盒的说明, 使用 DMB 标记上述 (1) (2) 分离出的样品。

每个样品取 10 μ l 进行 HPLC 分析 (例如: 图 2 所示 PA-Sugar Chain 021 的色谱图)。

每个样品的峰高同唾液酸标准品的峰高比较, 根据样品中唾液酸量分析样品, 结果见表 1。

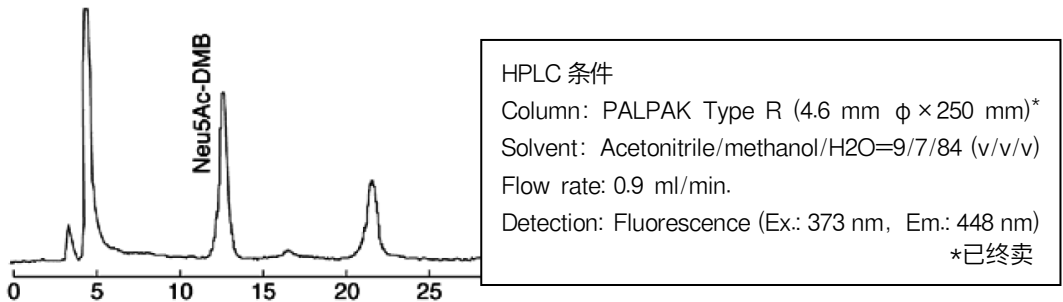


图 2: 从 PA-Sugar Chain 021 中释放出来的游离唾液酸, DMB 标记后的 HPLC 分析图

(4) 对 PA-Sugar Chains 还原末端的 PA-GlcNAc 定量。

PA-Sugar Chain 021, 023, 024, 025 各 5 μl (约 50 μmol)，分别加入到独立的玻璃管中并干燥。各加入 50 μl 有恒沸点的 5.7 N HCl，真空封接玻璃管，100 $^{\circ}\text{C}$ 反应 16 小时，有效地进行酸水解。打开玻璃管，对管中的混合物进行干燥，为了完全去除盐酸，分别加入少量的水并且煮沸，再加入 48 μl 新配制的饱和碳酸氢钠溶液来溶解残渣。当每个混合物的 pH 值略呈碱性时，加入 2 μl 的醋酸并且混匀。室温放置 15 分钟后，再次加入 48 μl 的饱和碳酸氢钠和 2 μl 的醋酸，混合均匀，室温放置 30 分钟有效地进行氮乙酰化。每个乙酰化混合物取 20 μl 检测 (图 3 所示 PA-Sugar Chain 021 色谱图)。

为了确定在还原末端的 PA-GlcNAc 量，每个样品的峰高同 PA-GlcNAc 标准品的峰高比较 (分析与样品出峰时间相同的峰)，结果见表 1。通过(3)中获得的唾液酸量和 PA-GlcNAc 量(表 1)的比值，得出每摩尔糖链结合唾液酸的摩尔数量。

表 1 每个糖链结合的唾液酸数量

PA-Sugar Chain	Neu5Ac(pmol/ μl)		PA-GlcNAc (pmol/ μl)	每个糖链的结合的唾液酸数量	
	酸水解	酶水解		酸水解	酶水解
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

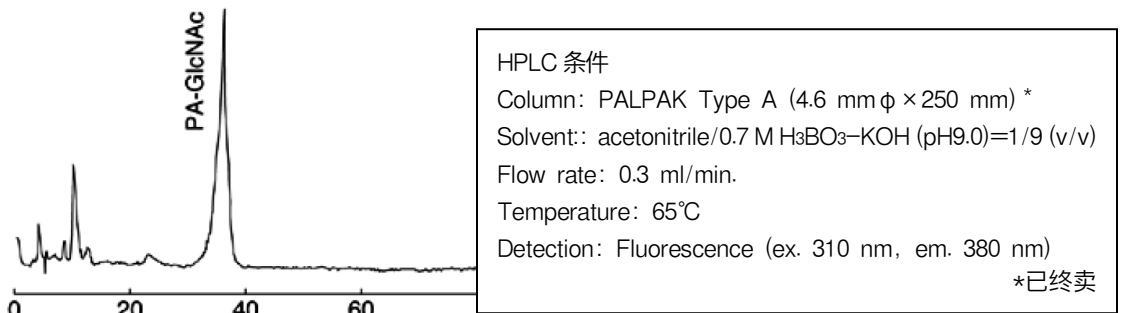


图 3: 来源于 PA-Sugar Chain 021 还原末端的 PA-GlcNAc 的 HPLC 分析图

例 2: 来源于牛胎球蛋白的 N-连接型糖链的分析

(1) N-连接型糖链的分析

N-连接型糖链是牛胎球蛋白经过胍解和 N-乙酰化得来的。使用 *GlycoTAG*TM (糖质标记仪) 将 2-氨基吡啶荧光标记到糖链上，再使用 PALPAK Type N* (离子交换型) 进行 HPLC 分析。图 4 是 N-连接型糖链的色谱图。

如图所示，获得的 asialo, monosialo, disialo, trisialo 和 tetrasialo 部分。

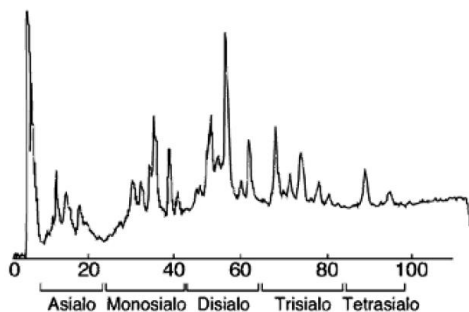


图 4: 来源于牛胎球蛋白的 N-连接型糖链的 HPLC 分析

(2) 每部分唾液酸的定量

从(1)中获得的各个部分取约 100 pmol 量到 50 μ l 的 0.05 N HCl 体系中, 80°C 反应 1 小时, 通过部分酸水解释放唾液酸。按试剂盒的操作方法对唾液酸进行 DMB 标记, 并进行 HPLC 检测。结果见表 2。

(3) 每部分还原末端的 PA-GlcNAc 定量

根据例 1 分析糖蛋白来源的 PA-Sugar Chain 标准品 (4) 的描述方法, 每部分取 100 pmol 进行酸水解和 N-乙酰化。通过 HPLC 分析法, 确定还原末端的 PA-GlcNAc 量。通过唾液酸量和 PA-GlcNAc 量的比值, 得出每部分每个糖链结合唾液酸的数量, 他们分别是 0.16, 0.98, 1.86, 2.86 和 4.26 (见表 2)。

表 2: 牛胎球蛋白来源的每个 N-连接型糖链结合唾液酸数量

	Neu5Ac (pmol/ μ l)	PA-GlcNAc (pmol/ μ l)	每个糖链结合的唾液酸数量
Asialo fraction	1.01	6.41	0.16
Monosialo fraction	8.23	8.45	0.98
Disialo fraction	26.36	14.20	1.86
Trisialo fraction	18.15	6.34	2.86
Tetrasialo fraction	7.10	1.67	4.26

例 3: 来源于糖脂的 PA-Sugar Chains 标准品分析

通常唾液酸通过 α -键与糖复合物连接, 在酸性条件下这个连接是不稳定的。如果它们被连接到还原末端, 那么在 50 mM HCl 中, 80°C 反应 1 小时条件下, 很容易被分离。然而, 众所周知, 由于 *N*-acetylgalactosamin 的空间位阻作用, 由{-GalNAc β 1-4 (Neu5Ac α 2-3) Gal-}连接的唾液酸很难被水解。在糖脂类 GM1 中能遇到这种连接结构。它们不能通过正常的 *Clostridium perfringens* 或者 *Vibrio cholerae* 唾液酸酶 (特异性切断 α -2, 3 和 α -2, 6 连接) 的添加量来释放唾液酸。就 PA-sugar chains (GM1-PA) 中那样一个唾液酸的部分酸水解来说, 如图 5 所示, 加热处理 1 小时后仅仅 80% 的唾液酸被释放, 加热处理 3 小时后几乎 100% 的唾液酸被释放。

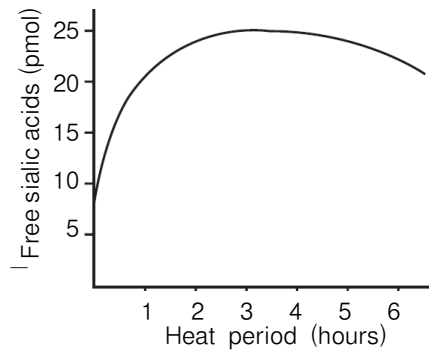


图 5: 25 pmol 的 GM1-PA 在 50 μ l 的 50 mM HCl 体系中 80°C 加热后的游离唾液酸量 (DMB 标记法检测)

(1) 唾液酸条件

I. 部分酸水解

PA-Sugar 029, 032, 033 (已终卖), 035, 036 和 037 (各 2.5 μ l, 约 25 pmol) 在下述 A, B, C 条件下反应:

A: 在 50 μ l 的 50 mM HCl 体系下, 80°C, 3 小时

B: 在 50 μ l 的 2 M 醋酸体系下, 80°C, 3 小时

C: 在 50 μ l 的 1 M 甲酸体系下, 100°C, 1 小时

根据试剂盒说明, 进行 DMB 标记, 并通过 HPLC 检测对唾液酸定量。结果见表 3。

II. 酶解

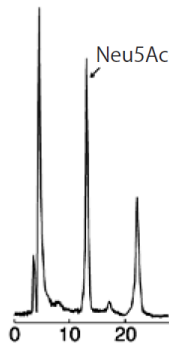
PA-Sugar 029, 032, 033, 035, 036 和 037 各 2.5 μ l (约 25 pmol) 分别在 25 μ l 包含 500 mU *Arthrobacter ureafaciens* 唾液酸酶的 50 mM NaOAc pH6.0 中 37°C 反应 30 分钟, 接着 100°C 加热 3 分钟停止反应。

根据试剂盒说明, 进行 DMB 标记, 并通过 HPLC 检测对唾液酸定量。结果见表 3。

(2) DMB 荧光标记游离唾液酸并进行 HPLC 检测

根据试剂盒说明, DMB 标记事先准备好的(1)-I 或(1)-II 中释放出来的游离唾液酸, 样品量相当于 1 pmol 的糖链, 进行 HPLC 分析 (图 6 所示 PA-Sugar Chain 029 的色谱图)。

每个样品的峰高同唾液酸标准品的峰高比较, 确定样品的唾液酸量。

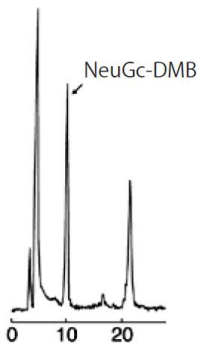


Column: PALPAK Type R (4.6 mm ϕ x 250 mm)
Solvent: acetonitrile/methanol/H₂O = 9/7/84 (v/v/v)
Flow rate: 0.9 ml/min.
Detection: Fluorescence (ex.373 nm, em.448 nm)

图 6: 来源于 PA-Sugar Chain 029 的唾液酸 HPLC 分析

(3) NeuGc 分析

将 2.5 μ l (约 25 pmol) 的 PA-Sugar Chain 030 干燥, 加入 50 μ l 的 50 mM HCl, 80°C 反应 3 小时, 释放 NeuGc, DMB 标记后 HPLC 检测。结果如图 7 所示。DMB 标记法也同样适用于 NeuGc 分析。

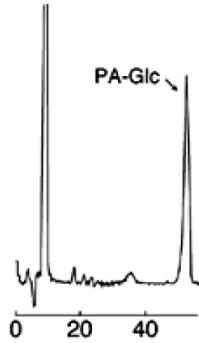


Column: PALPAK Type R (4.6 mm ϕ x 250 mm)
Solvent: acetonitrile/methanol/H₂O = 9/7/84 (v/v/v)
Flow rate: 0.9 ml/min.
Detection: Fluorescence (ex.373 nm, em.448 nm)

图 7: 来源于 PA-Sugar Chain 030 游离出的 NeuGc 的 HPLC 分析图

(4) PA-Sugar Chains 还原末端的 PA-Glc 定量

PA-Sugar Chain 029, 032, 033, 035, 036, 037 各 5 μl (约 50 pmol) 分别加入到独立的玻璃管中并干燥。每个管中加入 50 μl 的 2 N HCl/2 N TFA 的混合溶液, 真空封接玻璃管, 100°C 反应 6 小时有效地进行酸水解。打开玻璃管并且将混合溶液干燥, 加入少量的水并且煮沸, 分别加入 25 μl 的水溶解残渣, 每个样品取 5 μl 按图 3 的条件进行 HPLC 检测, 图 8 是 PA-Sugar Chain 032 的色谱图。每个样品峰高同 PA-Glc 标准品峰高 (与样品出峰时间相同的峰) 比较, 确定在还原末端的 PA-Glc 的量, 结果如表 3 所示。



Column: PALPAK Type A (4.6 mm ϕ x 250 mm)
 Solvent: acetonitrile/0.7 M H₃BO₃-KOH (pH9.0) = 1/9 (v/v)
 Flow rate: 0.3 ml/min.
 Temperature: 65°C
 Detection: Fluorescence (ex.310 nm, em.480 nm)

图 8: 来源于 PA-Sugar Chain 032 的 PA-Glc 的 HPLC 分析图

(5) 每个糖链连接的唾液酸量

通过 (2) 中获得的) 唾液酸量和还原末端 PA-Glc 量的比值, 可以计算出每摩尔糖链连接的唾液酸的摩尔数量 (见表 3)。表 3 所示, 带有{-GalNAc β 1-4 (-Neu5Ac α 2-3) Gal-}结构的 PA-Sugar Chain 032, 033, 036, 037 结合的唾液酸摩尔数比不带有这个结构的 PA-Sugar Chain 029, 035 的少。部分酸水解 (A: 50 mM HCl, 80°C, 3 小时) 的结果较好。

表 3: 每个糖链连接的唾液酸的摩尔数

PA-Sugar Chain	I.部分酸水解释放的唾液酸量 (pmol/ μl)			II.唾液酸酶作用释放的唾液酸量 (pmol/ μl)	(4) 还原末端的 PA-Glc 量 (pmol/ μl)	每个糖链上连接的唾液酸数量			
	A	B	C			A	B	C	唾液酸酶消化反应
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

● 应用例

操作方法优化的研究目的是快速准确地对样品进行定量。

在包含唾液酸的食品或药品的制造和分析中(例如: 药品中的红细胞生成素, 食品工业中的牛奶寡糖), 快速和准确地对唾液酸定量是必要的。下面是适用于这个目的的实验方法。

[HPLC 条件]

据初步研究，柱温设定 40°C，采用梯度洗脱，Solvent A: methanol/water = 7/93 (v/v)，Solvent B: methanol/acetonitrile = 7/93 (v/v)。在分析样品的大量数据时，试剂洗脱出峰得非常晚，有时在色谱图上会出现一个比较宽的峰，妨碍样品的分析。所以每次分析结束后，必须使用 Solvent B 充分清洗柱子。

另外，为了通过自动进样器校正样品的进样体积，使用 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid (keto-deoxy-nonulosonic acid, KDN10、Toronto Reseach Chemicals Inc.) 中的一种作为内参标准品。

KDN 同 N-acetylneuraminic acid (NANA)和 N-glycolylneuraminic acid (NGNA)的结构相似(见图 9)，因此 DMB 的可逆反应是基本相同的。

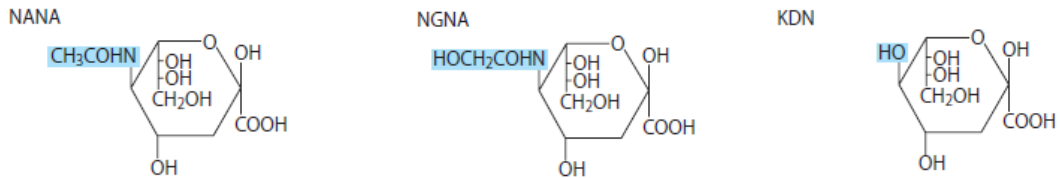


图 9: 唾液酸的结构图

[实验 1: 各种不同唾液酸的 DMB 标记法的时间过程]

10 pmol 的 NANA、NGNA 和 KDN 各 10 μl 水溶液分别加入到 200 μl 的标记混合液中，50°C 水浴避光反应，当反应 0.5、1.25、2.5、5 小时后，每个样品取 10 μl (每种类型的唾液酸 476 fmol)，HPLC 检测 (见图 10)。

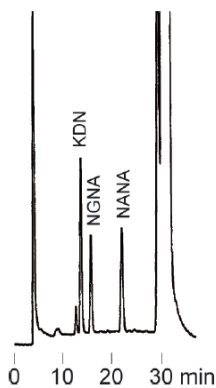


图 10: DMB 标记唾液酸的分离图

Column: PALPAK Type R (4.6 mm ϕ x 250 mm)
Solvent A: methanol/H₂O = 7/93 (v/v)
Solvent B: methanol/acetonitrile = 7/93 (v/v)
Elution: 0–25 min., 5% Solvent B
25–35 min., 100% Solvent B
35–50 min., 5% Solvent B (re-equibration)
Flow rate: 1 ml/min.
Temperature: 40°C
Detection: Fluorescence (ex.373 nm, em.448 nm)

结 果

图 10 显示在不同时间，每种唾液酸 (NANA、NGNA、KDN) 都有一个清晰的峰，当柱子使用 Solvent B 洗脱 10 分钟后，污染物 (接近 30 分钟的大峰) 被洗脱。图 11 显示的是 DMB 标记每种唾液酸的反应-时间过程图 (在特定时间的峰高被标绘，假设在反应 2.5 小时，DMB 标记的每种唾液酸的峰高都是 1)。NANA、NGNA、KDN 的时间路线彼此都是相似的，DMB 标记 KDN 与 DMB 标记 NANA 和 NGNA 的反应是相同的，KDN 可以作为有效的内参标准用于 DMB 法标记唾液酸。

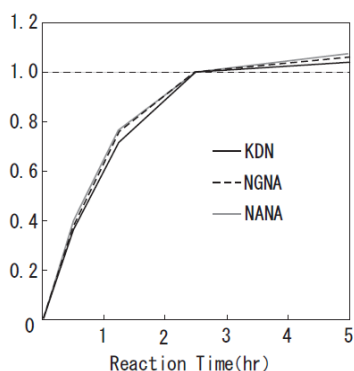


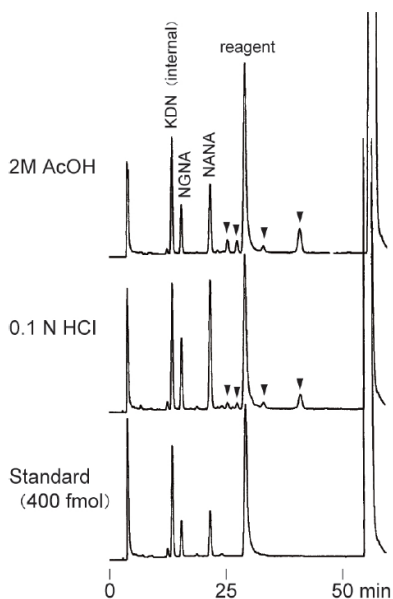
图 11: DMB 标记不同唾液酸的时间过程图

(计算相对峰高, 2.5 小时, 每一个被 DMB 标记后的唾液酸的峰高都是 1.)

【实验 2: 分析糖蛋白中的唾液酸】

据报道, 牛下颌腺粘液素包含超过 10 种的 O-acetylated 唾液酸、NANA 和 NGNA¹¹⁾。脱唾液酸上的一些 O-acetyl 基团在强酸作用下能被分离。例如: 盐酸或硫酸。因此, 在 O-acetyl 基团不容易被分离的条件下 (2 M AcOH, 80°C, 3 小时)¹²⁾, 及在唾液酸能被完全分离的条件下 (1 N HCl, 80°C, 1 小时), 都需要进行脱唾液酸。

20 pmol 的 KDN 作为内参标准, 加入到 1 μg 的牛下颌腺粘液素, 在 50 μl 的 0.1 N HCl 或 2 M HAc 中, 唾液酸被分离。DMB 标记游离的唾液酸。取 10 μl 反应混合物 (相当 40 ng 蛋白) 进行 HPLC 检测 (图 12)。表 4 所示, 根据标准唾液酸, 对游离的唾液酸定量。



Column: PALPAK Type R (4.6 mm ϕ x 250 mm)
 Solvent A: methanol/water = 7/93 (v/v)
 Solvent B: acetonitrile/methanol = 7/93 (v/v)
 Elution: 0–50 min., 5% Solvent B
 50–60 min., 100% Solvent B
 60–75 min., 5% Solvent B (re-equilibration)
 Flow rate: 1 ml/min.
 Temperature: 40°C
 Detection: Fluorescence (ex.373 nm, em.448 nm)

图 12: 牛下颌腺粘液素中的唾液酸分析

表 4: 酸水解唾液酸的定量比较

	NGNA (pmol/ μ g)	NANA (pmol/ μ g)
0.1 N HCl	17.1	24.7
2 M AcOH	13.6	15.8

结 果

当用 HCl 酸水解处理时，游离的唾液酸(NANA, NGNA)量更大。在用醋酸水解时，唾液酸也全部被释放，数量上的不同主要是由于 O-acetylated 唾液酸导致的。作为内参标准的 KDN 峰在两种处理方法之间没有差别。DMB 标记反应本身不太可能受到不同的酸性条件影响。事实上，在图 12 中可以观察到一些被怀疑是 O-acetylated 唾液酸的峰。这些在醋酸作用下出现的峰几乎是在盐酸作用下的 2 倍。

目前，没有商业化的 O-acetylated 唾液酸标准品，因此，不太可能对 O-acetylated 唾液酸进行定量。Oxford GlcoSystems Plc 仅以区分为目的使用。为了确定包含 O-acetylated 唾液酸的唾液酸总量，在水解和 DMB 标记前必须在碱性条件下(0.1 N NaOH, 37°C, 30 min)¹¹⁾对样品进行脱 O-acetylated 处理。

● 关联产品

各种不同的糖链 (PA-Sugar Chain 023(Code No. 4123)等)

● 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. (1991) *Chromatogr.* **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.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术(北京)有限公司翻译制作，最新版本文件请参考TAKARA BIO INC.网站。为正确使用Takara产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>