



Agilent AdvanceBio シアル酸 プロファイリング/定量キット

NANA、NGNA の各シアル酸種の高速定量

利点とメリット

検出：

- 反応時間を含むワークフローを約 5 時間で完了可能
- 1 ~ 2000 pmol の広濃度範囲でシアル酸を検出
- シアル化レベルの低いタンパク質も高感度検出可能

サイズ：

- 96 ウェルプレート用
- 定量分析用の標準品 (NANA、NGNA) がキットに付属
- 定性分析用シアル酸リファレンスパネルがキットに付属
- 自動化対応

総シアル酸定量キット (部品番号 GS48-SAQ、GS96-SAQ) と併用すれば、より確度の高い評価が可能になります。

生物製剤の糖タンパク質中のシアル酸のプロファイリングと定量を効率化

糖鎖は、組成や結合位置に基づいてさまざまなオリゴ糖構造を形成する単糖類が結び付いた炭水化物です。N-グリカンまたはO-グリカンの非還元末端でキャッピングするシアル酸は、治療用糖タンパク質の有効性に関わる重要な役割を果たします。末端シアル酸は、分子や用途によって、クリアランス率や抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性を低下させる場合も、抗炎症性の働きをする場合もあります。生物製剤に含まれる一般的なシアル酸種は、N-アセチルノイラミン酸 (NANA または Neu5Ac) と N-グリコリルノイラミン酸 (NGNA または Neu5Gc) の 2 つです。Neu5Ac は一般的に優勢種であり、一方、Neu5Gc はヒトの体内では合成されないため、生物製剤中に存在すれば、免疫応答を引き起こす可能性があります。したがって、シアル酸の絶対量だけでなく、治療用糖タンパク質中に存在する異なる種のシアル酸レベルもモニタリングすることが欠かせません。

Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリング/定量キット (部品番号 GS24-SAP) なら、シアル酸のプロファイリングと定量をどちらも高感度で行え、高スループット手法を実現します。シアル酸を酸加水分解によって糖タンパク質から遊離させ、次に、蛍光色素分子の 1,2-ジアミノ 4,5-メチレンジオキシベンゼン (DMB) で誘導体化することで、蛍光検出 (FLD) とオプションの質量分析 (MS) 検出を行う逆相 (RP) 液体クロマトグラフィーによる分離が可能になります (図 1)。

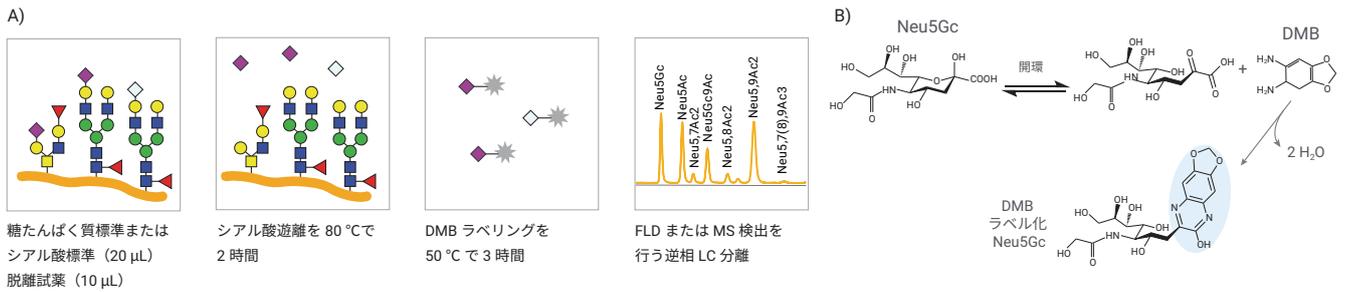


図1. シアル酸の遊離と DMB ラベリングのワークフロー A) キットを利用したシアル酸のラベリ化と検出手順の概要

必要な機器とサンプル前処理に関する考察

Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリング/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。

サンプルの種類や濃度によっては、高度にシアル酸化したサンプルに対してサンプルの希釈が必要な場合があります。また、シアル化レベルの低いモノクローナル抗体などのサンプルの場合は、乾燥させて少量の脱イオン水に再懸濁させて濃度を得る必要があります。このキットには、推奨される使用方法に従って 24 のデータポイントを生成するのに十分な試薬が付属しています。したがって、6 サンプルを 3 回前処理することも、9 サンプルを 2 回前処理することも可能です。詳細については、[取扱説明書をご覧ください](#)。このアッセイのダイナミックレンジは、サンプルウェルあたりシアル酸 1 ~ 2000 pmol です。ユーザー側でご用意いただく機器は、PCR 用のサーマルサイクラーか、必要な培養ステップで 50 ~ 80 °C を維持できる、蓋つきのヒートブロックのいずれかです。分析には、蛍光検出を行える HPLC 分析システム (HPLC または UHPLC) が必要です。詳細については、[取扱説明書をご覧ください](#)。

シアル酸のプロファイリングと定量

- このワークフローでは、既知のシアル酸種を組み込んだシアル酸リファレンスパネル (SARP) によるシアル酸種の定性的同定 (プロファイリング) (図 2) と Neu5Ac と Neu5Gc の定量分析用標準による絶対定量 (図 3) を行います。
- このキットで得られた総シアル酸の定量 (Neu5Ac および Neu5Gc) 結果は、AdvanceBio 総シアル酸定量キット (部品番号 GS48-SAQ または GS96-SAQ) で得られるデータと遜色ありません (表 1)。
- Neu5Ac と Neu5Gc の定量結果は、以前の DMB ラベリングワークフロー (GKK-407) で得られるデータと遜色ありません (表 2)。

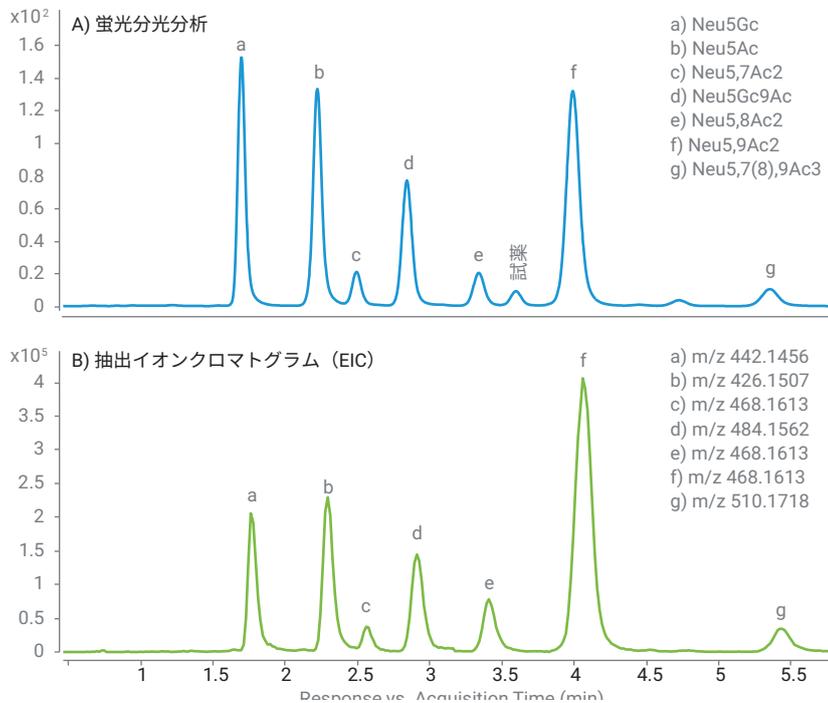


図2. DMB ラベリ化 SARP の UHPLC クロマトグラム。A) 蛍光分光分析 B) DMB ラベリ化シアル酸種の抽出イオンクロマトグラム、[M+H]⁺

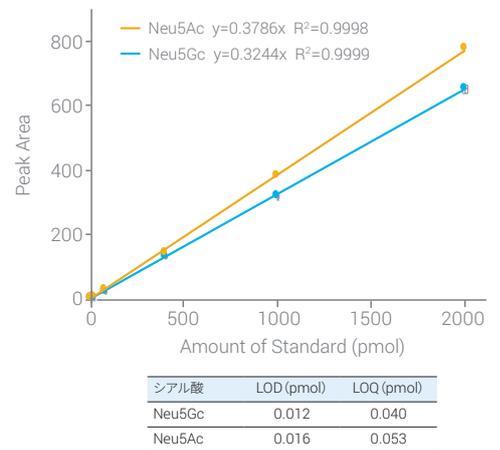


図3. Neu5Gc と Neu5Ac の検量線、n=2。Neu5G と Neu5Ac の検出下限 (LOD) と定量下限 (LOQ) を表に示します。

製品情報

表1. Agilent AdvanceBio 総シアル酸定量キット (部品番号 GS48-SAQ) で得られた値と比較した、Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリング/定量キット (部品番号 GS24-SAP) による総シアル酸量 (Neu5Ac and Neu5Gc)、n=3

	AdvanceBio シアル酸 プロファイリング/定量キット		AdvanceBio 総シアル酸 定量キット	
	pmol/μg	%CV	pmol/μg	%CV
リツキサン	0.62	4.17 %	0.47	5.04 %
エンブレル	220	1.65 %	210	12.34 %
アービタックス	3.80	7.26 %	3.49	0.69 %
フェチュイン	226	4.45 %	232	7.39 %

表2. Glyko SIGNAL DMB シアル酸ラベリングキット (部品番号 GKK-407) で追加の Neu5Ac 定量分析用標準を用いて得られた値と比較した、Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリング/定量キット (部品番号 GS24-SAP) による Neu5Gc と Neu5Ac の定量値 (pmol/μg)、n=3。
ND = 不検出

糖タンパク質	シアル酸	AdvanceBio シアル酸 プロファイリング/定量キット		GKK-407	
		pmol/μg	%CV	pmol/μg	%CV
リツキサン	Neu5Gc	0.02	1.76 %	ND	-
	Neu5Ac	0.60	4.25 %	0.58	1.12 %
エンブレル	Neu5Ac	223	2.92 %	226	3.57 %
アービタックス	Neu5Gc	3.68	1.02 %	ND	-
	Neu5Ac	0.12	4.46 %	ND	-
フェチュイン	Neu5Gc	4.78	4.90 %	ND	-
	Neu5Ac	222	4.44 %	201	1.47 %

部品番号	品名
GS24-SAP	Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリング/定量キット (24 カウント)

検査キットの構成

Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリング/定量キットには、絶対定量とシアル酸同定用に、以下の試薬と標準物質が付属しています。

モジュール：AdvanceBio シアル酸プロファイリング/定量キット (GS24-SAP)		
コンポーネント	数量	保管
100 μM <i>N</i> -アセチルノイラミン酸 (NANA、NeuAc) シアル酸標準 (200 μL)	1	-20 °C
100 μM <i>N</i> -グリコリルノイラミン酸 (NGNA、NeuGc) シアル酸標準 (200 μL)	1	-20 °C
シアル酸リファレンスパネル (凍結乾燥)	1	-20 °C
バイアル A：ラベリング希釈液 (300 μL)	1	-20 °C
バイアル B：還元剤	2	-20 °C
バイアル C：DMB 染料	2	-20 °C
バイアル D：脱離試薬 (300 μL)	1	-20 °C
キャップストリップ	6	-20 °C – RT
96 ウェルリアクションプレート	1	-20 °C – RT

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

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

5994-2788JAJP

DE.7510648148