

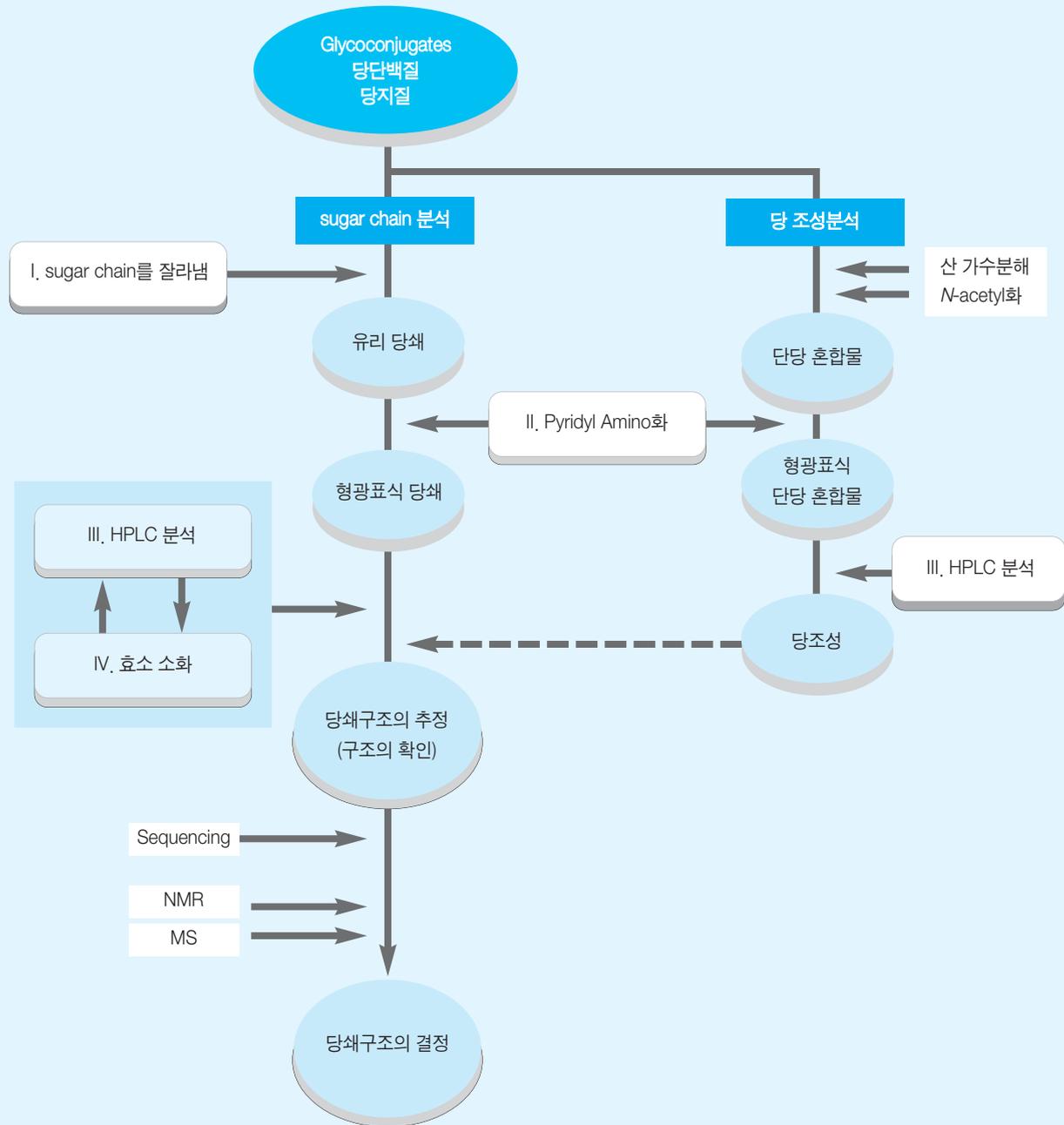


Glycobiology

TaKaRa

Sugar chain 구조 해석의 Flow Chart	O-2
O-a 당질표준품	
Pyridyl Amino (PA)화	O-4
Lyso -gangliosides	O-5
O-b 효소	
Glycopeptidase F	O-6
Lacto-N-biosidase	O-6
α -1, 2-L-Fucosidase	O-7
α -1, 3/4L-Fucosidase	O-7
α -2, 3-Sialidase	O-7
rEGCase II	O-8
SCDase (Sphingolipid ceramide N-deacylase)	O-8
O-c 기타 Kit 류	
Pyridylamination Manual Kit	O-9
Sialic Acid Fluorescence Labeling Kit	O-9
Cellulose Cartridge Glycan Preparation Kit	O-10
PALPAK 시리즈	O-10

Sugar chain 구조 해석의 Flow Chart



형광표식 당쇄를 고감도 HPLC분석으로 미량의 시료 (f-pmol수준)라도 당쇄구조의 추정이 가능하다.

근래 당단백질이나 당지질의 당쇄부분의 다양한 생물학적 기능이 주목받고 있다. 최근에는 selectin family와 그의 당쇄 리간드 (ligand)로 대표되는 것과 같이 당쇄 자신이 세포간 상호작용, 그 중에서도 세포간의 인식, 식별, 접촉 등의 과정에 깊이 관여하고 있을 가능성을 시사하고 있다.

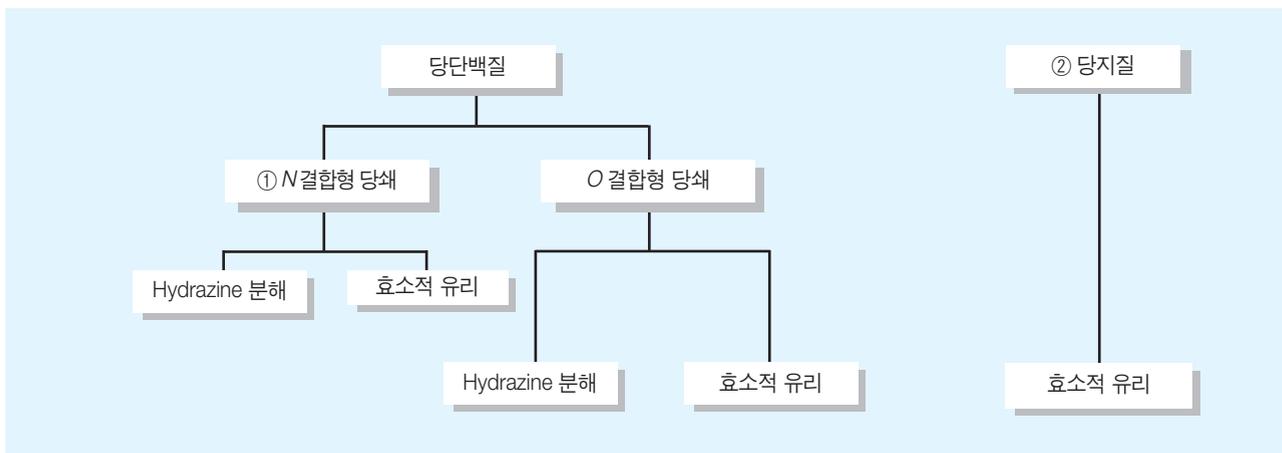
이와 같이 당쇄가 갖는 다양한 기능이 밝혀짐에 따라서 간편하면서도 고감도로 당쇄구조를 해석할 수 있는 간편한 방법이 필요로 하게 되었다. 그러나 당분 자체에는 고감도 검출에 이용할 수 있는 마커가 없기 때문에 외부로부터 어떤 형태의 표식을 도입할 필요가 있다.

Osaka 대학의 Hase 등은 당쇄의 환원말단을 2-aminopyridine으로 형광 표식하는 방법을 개발하였다. Pyridylamino (PA)화 당쇄는 femtomol (10^{-15} mol) 수준의 검출이 가능하고 역상계 컬럼을 사용한 HPLC로 양질로 분리할 수 있다. 또,

PA기는 빛이나 산, 알칼리 처리, hydrazine 분해, Smith 분해, 부분 acetolysis, methyl화 분석 등의 반응 조건 하에서도 안정하므로 PA화 당쇄를 이들 반응에 공용할 수 있다. Takara Bio는 이 PA화 법에 의한 당쇄구조 해석법을 널리 보급하기 위하여 Hase 등과 공동 연구로, 단당과 당쇄를 단시간에 정량적으로 형광 표식할 수 있는 PA화법을 개발하였다.

이 새로운 PA화법은 sialo 당쇄로부터 sialic acid의 이탈이 거의 없으며 또, epimerization 등의 부반응도 일어나지 않는다. HPLC분석에 있어서 표준품이 되는 고순도의 각종 PA화 당쇄나 당질 분석용 HPLC 컬럼, 그리고 당쇄의 구조와 기능해석에 유용한 각종 Glycosidase류 등 Glycobiology의 연구 분야를 폭넓게 지원하고 있다.

I : Sugar chain을 잘라냄



	당쇄를 잘라내는데 사용 가능한 효소
① N결합형 당쇄	Glycopeptidase F
② 당지질	rEGCase II
	EGCase II ACT

II : Pyridyl Amino (PA)화

	당사에서 판매하는 제품
전처리	Cellulose Cartridge Glycan Preparation Kit
	Cellulose Cartridge Glycan Pack
PA화	Pyridylation Manual Kit

III : HPLC분획· 분석

[Column]

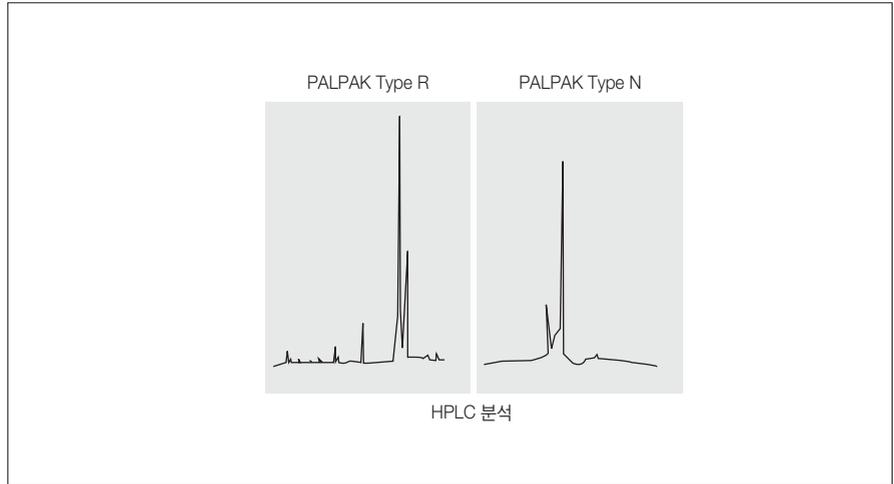
사용조건	사용컬럼
당쇄의 크기에 따른 분리	PALPAKType N (amino기 : 순상)
Sialic acid의 수에 의한 분리	PALPAKType N (aminopropyl기 : 음이온 교환 모드)
당쇄의 구조에 의한 분리	PALPAKType R (ODS : 역상, pmol 수준의 분석과 분획이 가능)
	PALPAKType R-MB (ODS : 역상, 미량분석 f ~ pmol 수준의 분석이 가능)

IV : 소화 효소

당사에서 판매하는 제품
Lacto-N-biosidase
α -1, 2-L-Fucosidase
α -1, 3/4-L-Fucosidase
α -2, 3-Sialidase

Sugar chain의 고감도 분석법 - Pyridyl Amino (PA)화법

최근들어 복합 당질의 구조와 기능의 연구가 생화학 뿐만 아니라 세포생물학 · 생리학 등 다양한 영역의 연구자로부터 주목받고 있다. 그러나, 기존의 당질분석법은 고도의 기술과 많은 시간을 요하는 등 어려움이 많았다. 그 같은 문제점을 해결할 수 있는 획기적인 당질분석 방법이 pyridyl amino (PA)화법이다. Takara Bio는 기존의 PA화법을 개량한 전용시약을 개발하였다.



HPLC에 의한 분석예

Sialic acid의 유리 없이 PA화 Sialic acid 결합 당쇄의 분리

PA 유도체의 특징

■ 고감도 검출

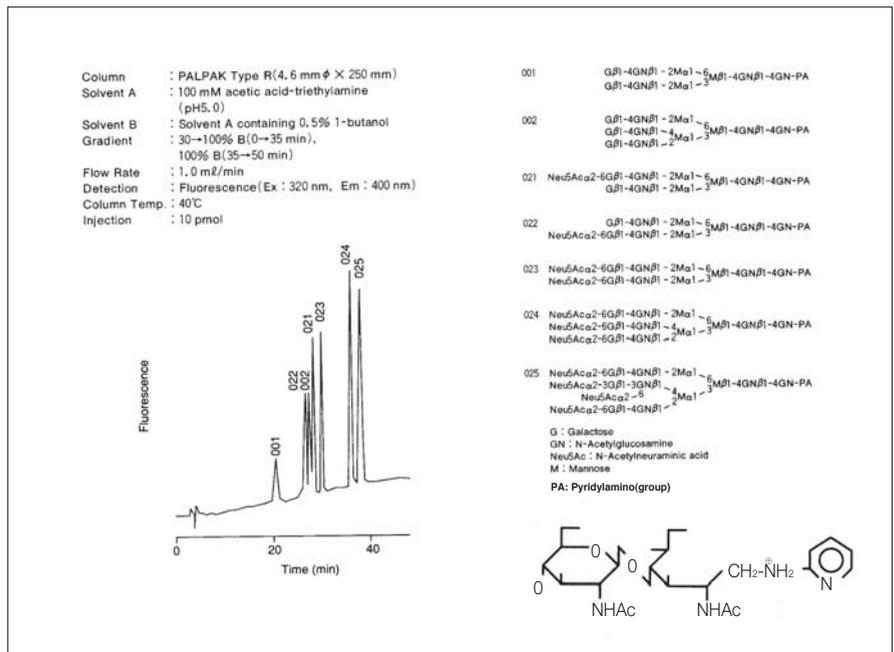
PA 유도체는 형광성이므로 형광 검출기로 0.03 pmol까지 검출 가능.

■ 안정성

PA 유도체는 일반의 형광성 물질과 달리 빛에 안정하다. 또, 산 · 알칼리 처리에도 안정하므로 hydrazine 분해, Smith 분해, 부분 acetolysis, methyl화 분석 등이 가능.

■ HPLC 분석

PA유도체가 갖는 특성 때문에 역상계, 순상계나 이온교환의 조합으로 단당과 다당의 분리 · 분석이 가능



Lyso-gangliosides

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Lyso-GM1	TKR	4351	1 mg	478,000원
Lyso-GM2	TKR	4352	0.1 mg	292,000원
Lyso-GM3	TKR	4353	0.1 mg	386,000원
Lyso-GD1a	TKR	4354	0.1 mg	386,000원

■ **형상** 동결건조품

■ **순도** TLC 분석으로 95% 이상

■ **보존** -20℃

■ **제품설명**

본 제품은 천연 ganglioside로부터 효소적으로 glycolipid를 제거한 것으로 세포의 증식, 분화, 사멸이나 신호전달의 기능 연구에 이용할 수 있다. 또 sphingosine에 유리 아미노기를 갖고 있어, RI표지, 형광 표지, 고정화 등에 ganglioside 유도체의 원료로 이용할 수 있다.

■ **특징**

천연 유래의 각 ganglioside와 동일한 당쇄 및 장쇄 (long strand) 염기 (sphingosine) 구조를 갖는다.

■ **구조**

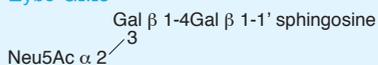
Lyso-GM1



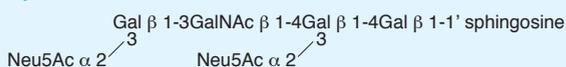
Lyso-GM2



Lyso-GM3



Lyso-GD1a



효소

Peptide : N-glycosidase F

※ 반응용 버퍼첨부

Glycopeptidase F (Peptide : N-glycosidase F)

MSDS

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Glycopeptidase F	TKR	4450	25 mU	278,000원

■형상

동결건조품 [50 mM EDTA와 0.05% sodium azide를 함유하는 20 mM Sodium Phosphate 용액 (pH7.2)]

■첨부 시약

Denature buffer : 1% SDS/ 1 M Tris-HCl (pH8.6)
 Native buffer : 1M Tris-HCl (pH8.6)
 Stabilizer solution : 5% Nonidet P-40
 Contorl glycoprotein : 10 mg/ml Bovine Fetuin

■보존

-20℃ (2년간 안정)
용해 후 분주하여 -20℃ 보존 (6개월간 안정)
동결용해의 반복을 피한다.

■효소번호

3, 5, 1, 52

■유래

E.coli carrying the plasmid including Glycopeptidase F gene

■반응

*N-glycosidase*형 당쇄와 단백질과의 결합부위 (GlcNAc-Asn 결합)를 특이적으로 절단한다.

■활성의 정의

37℃, pH8.6에서 dansylfetuin glycopeptide로부터 1분 동안 1 μmol의 dansyl-fetuin deglycosylated peptide 를 생성하는 효소 활성을 1 U으로 한다.

Lacto-N-biosidase

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Lacto-N-biosidase	TKR	4456	100 μ U	552,000원

■농도

1 μU/μl

■형상

용액 [0.05% Brij 58을 함유하는 50 mM sodium acetate 완충액 (pH5.5)]

■보존

4℃ (1년간 안정)

■유래

Streptomyces sp. 142

■효소번호

3, 2, 1, 140

■제품설명

본 제품은 1형 당쇄구조에 특이적으로 작용하여 당쇄의 비환원 말단으로부터 lacto-N-biose (Gal β 1-3GlcNAc)을 유리하나, 2형의 당쇄에는 전혀 작용하지 않는다. 당단백질이나 당지질 당쇄의 1형, 2형 구조의 판별에 이용할 수 있다. 또 α-1, 3/4-Fucosidase (Code 4453)과 조합하여 사용하므로써 Lewis^x 구조와 Lewis^y 구조를 식별할 수 있다. 당단백질이나 당지질의 당쇄 구조와 기능의 해석에 유용하다. 본 효소 100 μU (1 튜브)으로 당쇄 ~10 pmol에 대하여 약 50-100 회분의 효소 분해가 가능하다.

■반응

비환원 말단에 1형 당쇄구조 (Gal β 1-3GlcNAc-)를 갖는 당쇄에 작용하여 lacto-N -biose (Gal β 1-3GlcNAc)를 유리한다.

■활성의 정의

37℃, pH5.5에서 PA-lacto-N-tetraose로부터 1분동안 1 μmol의 PA-lactose를 생성하는 효소량을 1 U라 한다.

O-b

신
회

α -1, 2-L-Fucosidase

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
α -1, 2-L-Fucosidase	TKR	4451	2 U	386,000원

■ **형상** 동결건조품 (백색비결정 분말)

■ **보존**

4℃ 이하 건조상태 (용해 후는 4℃에서 1~2 개월, 동결상태는 1년간 안정)

■ **효소번호**

3, 2, 1, 51

■ **유래**

Corynebacterium sp.

■ **반응**

당쇄중의 α -1, 2-L-fucoside 결합을 특이적으로 절단한다.

■ **활성의 정의**

37℃, pH8.5에서 p-nitrophenyl- α -L-fucoside로부터 1분 동안 1 μ mol의 p-nitrophenol을 유리시키는 효소활성을 1 U으로 한다.

α -1, 3/4-L-Fucosidase

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
α -1, 3/4-L-Fucosidase	TKR	4453	100 μ U	386,000원

■ **농도** 1 mU/ ml

■ **형상**

용액동결품 [0.1 M NaCl, 0.02% sodium azide와 0.1% Brij 58을 함유하는 50 mM Potassium phosphate buffer (pH6.0)]

■ **보존**

- 20℃ (용해하여 4℃에 보존하는 경우 12개월간 안정, 동결용해의 반복은 피한다).

■ **효소번호**

3, 2, 1, 51

■ **유래**

Streptomyces sp. 142

■ **반응**

당쇄중의 α -1,3과 α -1,4 fucoside 결합을 특이적으로 절단한다.

■ **활성의 정의**

37℃, pH6.0에서 2 μ M의 PA-lacto-N-fucopentaose III (Code 4145; 종매)로부터 1분 동안 1 μ mol의 PA-lacto-N-neotetraose를 생성하는 효소활성을 1 U으로 한다.

Cloned

α -2, 3-Sialidase

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
α -2, 3-Sialidase	TKR	4455	5 U	386,000원

■ **형상**

동결건조품 (0.1 M NaCl과 0.02% Sodium azide를 함유하는 50 mM Potassium phosphate buffer (pH6.8) 100 μ 를 동결건조)

■ **보존**

- 20℃ (8개월간 안정, 용해하여 4℃에 보관하는 경우는 6개월간 안정, 동결용해의 반복은 피한다)

■ **효소번호**

3, 2, 1, 18

■ **유래**

Cloned from *Salmonella typhimurium* LT2 and expressed in *Escherichia coli*

■ **반응**

당쇄중의 α -2, 3 sialyl 결합을 특이적으로 절단한다.

■ **활성의 정의**

37℃, pH5.5에서 3'-sialyllactose로부터 1분 동안 1 μ mol의 sialic acid를 유리하는 효소 활성을 1 U으로 한다.

O-b

표

rEGCase II

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
rEGCase II	TKR	4460	100 mU	352,000원

■형상

용액동결품 [0,2% BSA, 0,1% Lubrol PX를 함유하는 20 mM Sodium acetate 완충액 (pH6,0)]

■농도 2 mU/ μ l

■보존

- 20℃ 이하 (용액은 동결용해에 의해 활성이 저하되므로 용해 후에는 4℃에 보존하여 2-3 일 내에 사용을 권장한다. 동결보존하는 경우 필요량을 분주하여 동결하며 동결용해의 반복은 피한다.)

■효소번호

3, 2, 1, 123

■유래

Cloned from *Rhodococcus* sp. and expressed in *Escherichia coli*

■반응

산성 및 중성 당지질에 작용하여 당쇄부분과 ceramide 부분의 사이를 절단한다.

■활성의 정의

37℃, pH5,0에서 asialo GM1으로부터 1분 동안 1 μ mol의 glucose에 해당하는 환원당을 생성하는 효소활성을 1 U으로 한다.

■특이성

Ceramide에 결합된 당이 galactosialceramide, glucosialceramide와 같은 단당인 경우, 결합된 당이 이당 이상인 경우와 환원말단이 galactose인 경우에 작용하지 않는다. 또한, Globoside에는 작용하기 어렵고 glycerol-당지질, 당단백질에도 작용하지 않는다.

■주의

본 제품은 계면활성제를 함유하고 있으나 Activator II를 포함하지 않아 살아있는 세포에는 사용할 수 없다. 살아있는 세포표면의 sphingo 당지질의 분해는 EGCCase II ACT (endoglycoceramidase II with Activator II, Code 4461)을 사용한다.

■ License Notice : [M17]

Sphingolipid ceramide N-deacylase

SCDase (Sphingolipid Ceramide N-deacylase)

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
SCDase	TKR	4462	250 mU	419,000원

■형상

용액동결품 [50 mM sodium acetate(pH6,0), 0,1% Lubrol PX]

■보존

- 20℃ 이하 (동결용해를 반복하지 않는다. 용해 후 소량씩 분주하여 동결보존하는 것이 좋다)

■효소번호

3, 5, 1, 69

■제품설명

본 제품은 sphingolipid에 작용하여 lysosphingolipid와 지방산을 생성하는 효소이다. 또, lyso체와 지방산으로부터 sphingolipid를 합성하는 촉합반응 및 sphingolipid의 지방산을 교환하는 반응도 높은 효율로 시행할 수 있다. 기질 특이성으로서 GM1, globoside sulfatide등 산성 및 중성 glycosphingolipid에 잘 작용한다. 또, sphingomyelin에도 잘 작용한다.

■유래

Pseudomonas sp.

■활성의 정의

이래의 조건에서 1분 동안 1 μ mol의 lyso-asialo GM1을 생성하는 효소활성을 1 U으로 한다.

■활성 측정방법

본 제품 10 nmol의 asialo GM1 및 0,8% Triton X-100을 함유하는 50 mM Sodium acetate buffer (pH6,0) 10 μ l의 반응액을 37℃에서 15분간 반응한 후 반응액을 TLC로 전개한다. Orcinol 황산으로 당지질을 발색하여 image analyzer로 분해율을 측정한다.

■ License Notice : [M18, M19]

기타 Kit 류

메뉴얼 PA화 Kit

Pyridylation Manual Kit

MSDS

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Pyridylation Manual Kit	TKR	4480	1 키트 (20 회)	512,000원

■ 내용 (20 회)

Package 1

2-Aminopyridine	2 × 300 mg
Borane-dimethylamine complex	2 × 100 mg
Acetic acid	3 ml
Biantennary sugar chain	500 pmol/50 µl
PA-Biantennary sugar chain	100 pmol/100 µl

Package 2

Cellulose Cartridge Column	20 × 0.5 ml
Adaptor	1 piece
Syringe	3 × 10 ml

■ 보존

Package 1 : - 20°C

Package 2 : 실온

■ 제품설명

본 Kit는 특별한 PA화(pyridylation) 장치를 이용하지 않고 당쇄를 2-aminopyridine으로 형광 표식 (PA화) 하기 위한 Kit이다. 당쇄의 환원 말단잔기에 2-aminopyridine을 환원 아미노화 반응으로 결합시켜 당쇄를 안정적인 형광 유도체 (PA-당쇄)로 유도화한다. PA화 반응 후 Cellulose Cartridge에 의한 column chromatography로 과잉 시약을 제거하고 PA화 당쇄를 회수할 수 있다. 본 Kit에서 얻은 PA-당쇄는 형광기를 가지고 있으므로 HPLC에 의한 고감도 분석이 가능하다.

■ 주의

PA화의 반응효율 및 Cellulose Cartridge에서의 회수 효율은 당쇄의 구조에 따라 다르다. 본 Kit는 double strand complex N - Glycan (control로 첨부)에 대해 최적화되어 있다. 목적 당쇄의 구조 특히, 환원 말단당잔기의 종류와 당쇄 분자량이 control과 크게 다른 경우에는 사전에 예비실험을 통해 조건을 최적화하는 것이 바람직하다.

■ License Notice : [M14]

고감도 Sialic acid 분석에

Sialic Acid Fluorescence Labeling Kit

MSDS

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Sialic Acid Fluorescence Labeling Kit	TKR	4400	100 회	904,000원

■ 내용

DMB Solution (2-mercaptoethanol 함유)	1 ml × 2
Coupling Solution (acetic acid, 2-mercaptoethanol, sodium hydrosulfide를 함유하는 용액)	5 ml × 2
Neu5Ac (100 µ M)	500 µl

■ 보존

- 20°C (주의 : 시약 1은 차광하여 보존)

■ 제품설명

본 제품은 sialic acid를 1, 2 - diamino - 4, 5 - methylenedioxy benzene (DMB) 로 형광표식하기 위한 Kit이다. DMB에 의한 Sialic acid의 형광표식법은 간단하고 고감도의 분석법이다. 시료 중의 유리 sialic acid를 DMB화시켜 역상 Column (PALPAK Type R)을 이용해 HPLC 분석하면 정량할 수 있다.

시료를 sialidase나 산 가수분해 하므로써 sialic acid를 미리 유리해 두면 당단백질이나 당지질 등의 당쇄에 결합하고 있는 sialic acid 정량도 가능하며 검출한계는 57 fmol이다. 본 kit은 이 DMB화를 간편하게 실시하기 위한 제품으로 DMB 화에 의한 분석과 당쇄미량분석법인 pyridyl amino 화법 (PA화)과 함께 사용함으로써 sialo 당쇄의 미량정량분석을 실시할 수 있다.

O-c

기타 Kit 류

Cellulose Cartridge Glycan Preparation Kit

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
Cellulose Cartridge Glycan Preparation Kit	TKR	4403	1 kit	239,000원
Cellulose Cartridge Column Pack	TKR	4404	10 개	239,000원

■ 내용

Cellulose Cartridge Glycan preparation Kit (4403)	
Cellulose Cartridge*	5 개
Syringe (10 ml)	1 개
Adaptor	1 회

Cellulose Cartridge Column Pack (4404)	
Cellulose Cartridge*	10 개

*cartridge의 성상
 총진제 : 미세결정 cellulose
 Bed Vol. : 0.5 ml
 유속 : 전처리 시, 초당 2~5 방울
 시료 첨가·세정·용출 시, 초당 1~2 방울

■ 보존 실온

■ 제품설명

본 제품은 pyridyl amino (PA)화 전에 당쇄 시료를 정제하는 kit이다. kit안에 들어 있는 Cellulose Cartridge는 특수 처리한 미세결정 cellulose를 충전한 일회용 카트리지가 컬럼으로, 이를 이용하여 당쇄 분석 시 당단백질, 세포의 hydrazine 분해물, 효소반응물 등의 시료에서 당쇄이외의 불순물을 간단히 제거할 수 있다. 당쇄의 pyridyl amino화 (PA) 전에 본 kit를 사용하여 당쇄를 정제 (prelabel 정제) 하면 PA화 후의 HPLC에 의한 당쇄 분석에서 PA화 시약이나 불순물 유래의 peak가 대폭 감소하므로 당단백질이나 세포의 hydrazine 분해물과 같은 불순물이 많은 시료의 당쇄분석에 특히 유효하다.

표준 실험방법으로 정제가능한 당쇄는 4~5당 잔기가 안정하다. 본 제품은 GlycoTAG으로 PA화 시킨 표식 올리고당의 clean-up에도 유용하다. 당단백질의 protease 소화물 등 당펩타이드를 조제할 때도 이용할 수 있다. Cellulose Cartridge Column Pack은 위 kit의 컬럼으로만 구성된 실용팩이다.

■ License Notice : [M14]

당쇄분석용 HPLC Columns

PALPAK® 시리즈

제품명	제조사	TaKaRa Code	용량	가격
PALPAK Type R	TKR	CA8000	1 개	1,195,000원
PALPAK Type N	TKR	CA8100	1 개	615,000원
PALPAK Type R-MB	TKR	CA8400	1 개	570,000원

■ 제품설명

Pyridyl amino (PA)화 단당 및 당쇄는 역상계·순상계·이온교환계 컬럼을 사용하여 HPLC로 분석할 수 있다. TaKaRa PALPAK 시리즈는 PA화 당분석 전용으로 개발된 HPLC용 컬럼 제품이다.

- PALPAK Type R (당쇄 분석용 컬럼)
 Octadecyl기 (C₁₈)를 화학결합시킨 다공성 실리카를 충전한 역상계 HPLC용 컬럼이다.
- PALPAK Type N (당쇄 분석용 컬럼)
 Amine을 화학 결합시킨 다공성 실리카를 충전한 순상계 HPLC용 컬럼이다. 분리된 용액을 선택하므로써 이온교환 컬럼으로 사용할 수 있다.
- PALPAK Type R-MB (당쇄 분석용 컬럼)
 Octadecyl기 (C₁₈)을 화학 결합시킨 다공성 실리카를 충전한 역상계 HPLC용 minipore column이다. 미량의 시료 분리분석에 적당하다.