



LudgerTag™ DMB唾液酸释放 和标记试剂盒产品指南

产品# LT-KDMB-A1

Ludger 文件# LT-KDMB-A1-Guide-CN-v6.3

Ludger有限公司

Culham科学中心 牛津

OX14 3Eb 英国

电话: +44 1865 408 554

传真: +44 870 163 4620

邮件: info@ludger.com

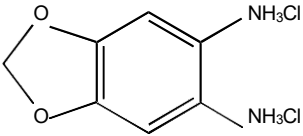
www.ludger.com

目录

页码

LT-KDMB-A1规格.....	3
试剂盒组分.....	4
所需的其他试剂和设备.....	5
标记操作的时间线.....	5
方法.....	6
参考资料和相关文献.....	10
反应机理.....	10
故障排除.....	11
担保与责任.....	12
文件修订编号.....	12

LT-KDMB-A1规格

应用	用于从糖蛋白释放唾液酸，再用DMB（1,2-二氨基-4,5-亚甲氧基苯二盐酸盐）标记。
染料属性	相对分子质量=225.07 gmol ⁻¹ 荧光， $\lambda_{ex} = 373\text{nm}$ ， $\lambda_{em} = 448\text{nm}$ 。
结构	
同物异名	DMB; 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene Dihydrochloride; 1,3-Benzodioxole-5,6-diamine Dihydrochloride; 5,6-Diamino-1,3-benzodioxole Dihydrochloride
产品描述	该试剂盒包含用于从糖蛋白释放唾液酸的试剂。通过胺环化反应，经释放的唾液酸和DMB染料结合。
样品数量	本试剂盒包含可供最多22个样品检测用的试剂和原料，包括唾液酸参照品、N-乙酰基神经氨酸和N-羟乙酸基神经氨酸定量标准品。
样品量	通常每次可以分析50-200 μg 糖蛋白。我们建议分析样品一式三份。
适合测试样品	任何从糖蛋白、糖肽或聚糖释放的唾液酸都可以标记。
储存:	零下18° C，避光保存。避免热源、光照和潮湿。如妥善保存，试剂可以稳定至少2年。
运输	该产品可以在室温下运输。
操作	确保使用的玻璃器皿、塑料器皿或者溶剂均无糖苷酶和环境中的糖类。处理样品时需佩戴无粉手套避免环境中糖类的污染。所有涉及标记试剂的步骤必须在干燥的环境中使用干燥的玻璃和塑料器皿。 一旦单个的试剂瓶被打开,里面的成分必须马上使用,多余的试剂应按当地的安全规范进行处理。
安全	仅供研究使用。不得用于人体或药用。 请阅读所有使用到的化学物的材料安全数据(MSDS's)清单。所有涉及标记试剂的步骤必须在实验室通风厨进行,使用者需佩戴个人安全保护装置,如护眼镜、实验服和防化学手套(如睛)。

试剂盒组分



每个试剂盒包括以下试剂各1瓶:

商品型号#	品名	数量
LT-DMB-01	DMB 染料	0.7 mg
LT-ACETIC2M-01	醋酸 2 Molar	2 x 1.1 mL
LT-MERCAPTO-01	巯基乙醇乙酸溶液(1.4 Molar)	500 μ L
LT-DITHIO-01	亚硫酸氢钠(还原剂)	4 mg
CM-NEUAC-01	<i>N</i> -乙酰基神经氨酸定量标准品	1 nmol
CM-NEUGC-01	<i>N</i> -羟乙酰神经氨酸定量标准品	1 nmol
CM-SRP-01	唾液酸参照品, 包括Neu5Ac, Neu5Gc, Neu5,7Ac ₂ , Neu5Gc,9Ac, Neu5,8Ac ₂ , Neu5,9Ac ₂ 和 Neu5,x,Ac ₃ (此处x表示未知乙酰基位置)。	1.25 nmol (总唾液酸)

所需的其他试剂和设备

- 恒温器, 烤箱或者相似的加热干燥器, 在唾液酸的释放时设置 80°C, 在唾液酸的标记反应 设置 50°C。
- 量程在1-1000 μL 的移液器和吸头。
- 真空离心机
- 反应小瓶(如 0.5 mL聚丙烯瓶)
- 分析级水(如 MilliQ)
- 如需重复检测, 额外的唾液酸标准品[可选]: [CM-NEUAC-01](#); [CM-NEUGC-01](#)
- 额外的唾液酸标准品 Neu5,9Ac₂[可选]: [CM-NEU5,9AC-01](#)
- 阳性对照[推荐]:

Ludger 胎球糖蛋白	GCP-FET-50U
Ludger Bioquant糖肽	BQ-GPEP-A2G2S2-10U

标记操作的时间线

LudgerTag™标记过程, 加上干燥时间和从分析样品中酸解唾液酸, 通常需要7个小时:

步骤	时间
样品制备	10分钟+干燥 (1-2小时) <i>该操作可提前1天进行</i>
唾液酸释放	3小时
DMB 标记	3.5小时
总时间:	加上干燥7小时

方法

1 样品制备

- 我们建议使用三等份试样进行分析。高度唾液酸化的糖蛋白，取样量50 μ g为宜；对于低唾液酸化样品如IgG等，取样量提高至200 μ g。
- 请注意部分蛋白质常用的盐/缓冲液可能对唾液酸分析产生干扰。这取决于样品取样量与缓冲液体积的比例(大量缓冲液会影响酸性水解时溶液的酸性)。根据我们的经验，类似PBS等缓冲液，在样品浓度高于1mg/mL、样品取样量在50-200 μ g之间，不会产生问题。
- 我们建议在样品分析过程中使用一系列的对照品：
阳性过程对照糖蛋白：胎球糖蛋白：GCP FET-50U
阳性过程定量对照糖肽：BQ-GPEP-A2G2S2-10U
阴性过程对照品：水
阴性过程对照品：样品缓冲液
- 将等量的样品和过程对照品（除非已经干燥）置于0.5 mL聚丙烯小瓶中，在真空离心机中干燥。

2 唾液酸释放

- 设定烘箱温度为80° C
- 往样品和操作对照品小瓶中加入25 μ L 2M冰醋酸溶液。
如果使用的話，不要加在以下唾液酸标样中：Neu5Ac (CM-NEUAC-01)、Neu5Gc (CM-NEUGC-01)、唾液酸参照品 (CM-SRP-01) 小瓶；或者Neu5,9Ac₂ (CM-NEU5,9,AC-01)。
- 旋涡溶解，然后短暂离心。
- 将样品和对照品置于80° C的烘箱中，培养2小时（ \pm 5分钟）。从烤箱中取出，冷却至室温。旋涡，然后短暂的离心。
- 从每个样品或操作对照转移5 μ L到0.5mL的聚丙烯小瓶中，准备用DMB标记。

如需要，经酸释放的样品可在-20° C下储存至少2天[参考1]。

3 DMB 标记

- 设定烘箱温度为50° C。
- 添加440μL巯基乙醇溶液 (LT-MERCAPTO-01) 到盛有连二亚硫酸钠 (LT-DITHIO-01) 的小瓶中，使用移液器反复抽吸混合直至固体完全溶解。
- 将上述溶液完全转移到盛有DMB 染料 (LT-DMB-01) 的小瓶中，使用移液器反复抽吸混合直至染料完全溶解。

避免标记试剂受潮和光照的影响，应在60分钟内使用。

- 将20μL标记试剂加入每个样品和过程对照品中，盖上盖子，涡旋彻底混合并短暂离心，以确保标记溶液位于瓶底部。
- 将20μL标记试剂加入每个唾液酸标样中(Neu5Ac、Neu5Gc、唾液酸参照品，如需还可加上Neu5,9Ac₂)，盖上盖子，涡旋彻底混合并短暂离心，以确保标记溶液位于瓶底部。
- 将样品、对照品和标准品置于50° C 烘箱中，暗处培养3小时。

在培养时，可以开始调整LC的检测条件用于接下来的分析 - 请参阅第4部分。

- 从烘箱中取出小瓶，加入以下试剂终止反应：往每个样品和操作对照品中加入475μL水
往每个唾液酸标准品中加入480μL水

4 LC 分析

- 稀释Neu5Ac和Neu5Gc标准品用于制作标准曲线(使用表1作为指导，因为通常Neu5Gc含量比Neu5Ac要低一些, Neu5Gc曲线范围较Neu5Ac的要低一阶)。充分混合。

该项操作可以在液相色谱柱调节时进行。

比	稀释因子	Neu5Ac 标准品(μL)	水 (μL)	Neu5Gc 标准品(μL)	水 (μL)
1:0	1	200	0	-	-
1:1	2	100	100	100	100
1:4	5	40	160	40	160
1:9	10	20	180	20	180
1:49	50	10	490	10	490
1:99	100	10	990	10	990
1:999	1000	20 从 1:99 (预混合)	180	20 从 1:99 (预混合)	180
1:4999	5000	-	-	10 从 1:49 (预混合)	990

表 1. 标准品稀释方案

- 用水稀释样品1比10（比例1： 9）（20 μ L样品加180 μ L水）。
- 用水以的比例稀释过程对照品（以及Neu5,9Ac2，如果使用的话）1比10（比例1： 9）。
- 切勿稀释唾液酸参照品(SRP)。

备注：如果已知样品的唾液酸化水平较低（如 μ gG），则不要用水稀释。如果发现液相色谱峰面积不在标准曲线范围内，则配置更浓的样品，或者延长标准曲线。

样品在10° C下避光的自动进样器内可以至少保持72小时的稳定[参考2]。

- 准备液相系统。应确保溶剂线提前调节好。溶剂A=乙腈:甲醇:水 9： 7： 84
溶剂B=乙腈
荧光：激发波长： 373 nm； 发射波长： 448nm 柱温 = 30° C； 进样温度= 10° C

时间 (min)	流速 mL/min	%A	%B
0	0.5	100	0
19	0.5	100	0
19.5	0.5	10	90
23.5	0.5	10	90
24	0.5	100	0
30	0.5	100	0

表 2. 使用LudgerSep-R1柱(4.6 x 150 mm, 3 μ m 颗粒)LS-R1-4.6x150 进行30分钟HPLC分析的操作方法。
进样量 = 25 μ L

时间 (min)	流速 mL/min	%A	%B
0	0.25	100	0
7	0.25	100	0
7.5	0.25	10	90
8	0.25	10	90
8.5	0.25	100	0
15	0.25	100	0

表 3. 进行15分钟UHPLC分析的操作方法, 使用LudgerSep-uR 柱(2.1 x 100 mm, 1.9 μ m 颗粒) LS-UR2-2.1x100。
进样量 = 5 μ L。

- 使用适当的方法（按表2使用Ludgersep-R1柱进行高压液相色谱分析，或按表3使用Ludgersep-UR2柱进行超高压液相色谱分析）空进样2到3次调节色谱柱。然后进一个系统空白水样，检查基线是否稳定。如果没有，则继续进水样直到基线稳定，或在重新调整柱效前，使用10%A和90%B冲洗30分钟。

- 接下来进行2次以上SRP唾液酸参照品，直到谱图重叠。HPLC图谱应与图1类似，UHPLC图谱则与图2相近。不过，保留时间会因LC系统而异。
- LC系统现已准备就绪，可进行样本分析。我们建议按以下顺序进样（表4）：

SRP
Neu5Gc 稀释液，用于绘制标准曲线
Neu5Ac 稀释液，用于绘制标准曲线
过程对照标准品(胎球蛋白；GPEP；水；缓冲液)。
样品
Neu5Gc 稀释液，用于绘制标准曲线
Neu5Ac 稀释液，用于绘制标准曲线
SRP

表 4.进样顺序

5 验收标准

- SRP的图谱在样品组开始和结束时重叠，且偏移量最多在± 0.1 分钟。
- 对于Neu5Gc和Neu5Ac，校正曲线的 R^2 值>0.99。
- 遵循企业内部标准操作规范，Ludger对于胎球蛋白分析验收标准为252 到 377 nmol/mg 蛋白质(例如 34 μ g胎球蛋白 50U酶活)[参考3]。该验收标准随着更多GCP-FET-50U内部数据的收集，会进一步更新。在参考文献3列明了验收标准的历史数据，并附有详细的解释。
- Ludger企业内部对于GPEP-A2G2S2分析验收标准为5.6 到 8.4 nmol (由定量NMR测定± 20%)

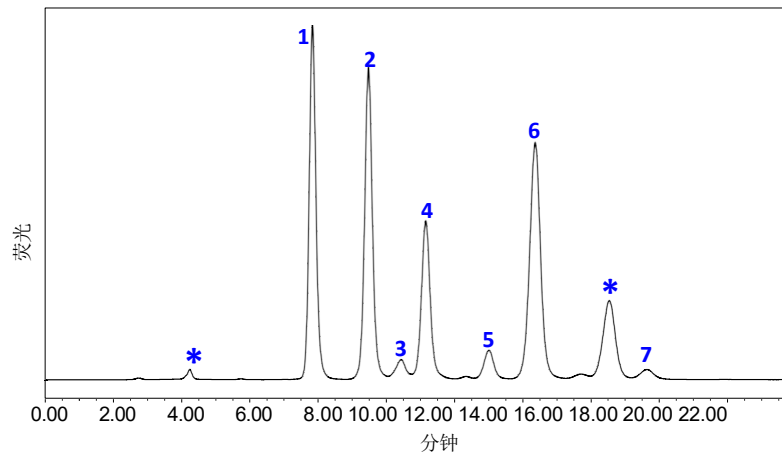


图1：DMB标记唾液酸参照品(CM-SRP-01)在LudgerSep-R1 HPLC柱跑出的液相图谱。

峰：1 = Neu5Gc；2 = Neu5Ac；3 = Neu5,7Ac₂；4 = Neu5Gc,9Ac；5 = Neu5,8Ac₂；6 = Neu5,9Ac₂；7 = Neu5,x,xAc₃(此处x表示未知乙酰基位置)；* = 试剂。

备注：此图谱仅作为示例。峰宽、分辨率和保留率与实验室高效液相色谱系统（HPLC）系统有关。

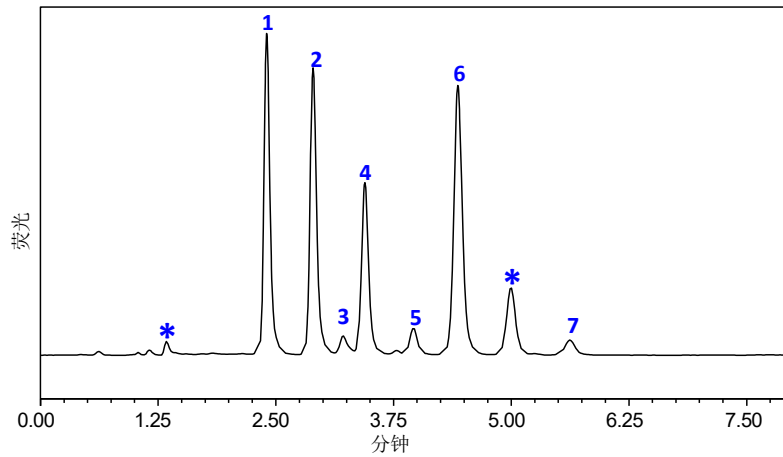


图2: DMB标记唾液酸参照品在LudgerSep-uR2 UHPLC柱跑出的液相图谱。

峰: 1 = Neu5Gc; 2 = Neu5Ac; 3 = Neu5,7Ac₂; 4 = Neu5Gc,9Ac; 5 = Neu5,8Ac₂; 6 = Neu5,9Ac₂; 7 = Neu5,x,xAc₃ (此处x表示未知乙酰基位置); * = 试剂。

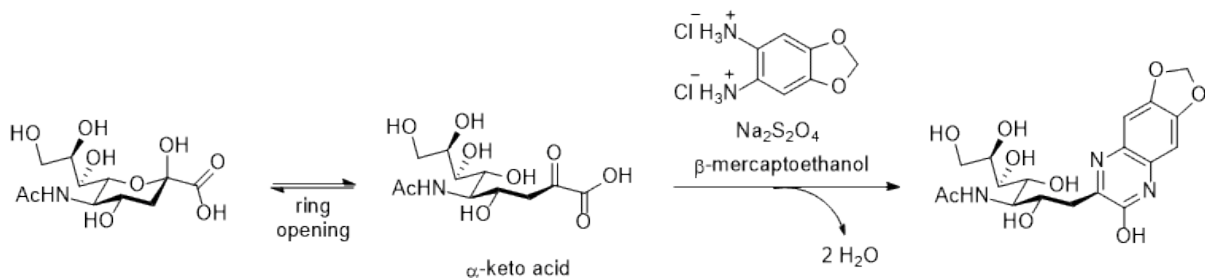
备注: 此图谱仅作为示例。峰宽、分辨率和保留率与实验室超高效液相色谱 (UHPLC) 有关。

参考资料和相关文献

1. Ludger 文件: [S-GP-0048-WG-50381-Report-v1.0](#). Determination of the effect of freezing of DMB Labelled Sialic Acids.
2. Ludger 文件: [Fetuin Specifications for Sialic Acid Analysis-v2.0](#). Determination of Acceptance Criteria for Fetuin System Suitability Standard in Sialic Acid Analysis
3. Ludger 文件: [DMB-kit-Validation-Report-GP-0057-v1.0](#). Validation of the DMB kit with Ludger Standards.
4. Ludger 文件: Application note on ‘Quantitative Sialic Acid Analysis’ #APN002
5. 国家药典委员会: [通则3102唾液酸测定法](#)

反应机理

标记反应是一个两步反应过程。



1. 第一步是闭（环）形式唾液酸平衡到开环（非环）形式。
2. 第二步系多步机制，其中DMB染料的伯胺与 α -酮酸的羰基反应形成亚胺，该中间体与溶液中的还原剂反应，再与染料的其它伯胺反应。重排后生成带荧光标记的唾液酸（二亚胺）。

故障排除

1. HPLC信号低

- 酸解不完整：酸解时，我们推荐使用烘箱替代加热模块。部分加热模块会导致样品瓶中的酸蒸发，以及在瓶盖处凝结从而导致酸解不完整。我们同时推荐在酸解时使用小型样品瓶，体积不超过0.5 mL。
- 样品中的盐干扰标记：盐和缓冲液会干扰唾液酸标记法。如果怀疑可能有盐对样品产生干扰，分析前将样品透析成无盐溶剂。

2. 色谱图中游离染料峰偏高

- 这可能是由于曝光过多导致的。请确认培养是在暗处避光操作的。一旦样品标记后，最好立即送检测HPLC以避免降解，样品曝露在光照和高温的时间增长会引起非唾液酸特征峰的增加。这也可能是由液相色谱长时间使用受污染导致，见下文。
- 当DMB标记的样品在10° C避光条件下保存长达72小时，Neu5Ac和 Neu5Gc的数量表现稳定，前提是校准在相同条件下储存并立即进行分析[参考文献3]。如果这个难以实现的话，DMB标记样品可以冷冻保存最多2天[参考文献1]。

3. 液相色谱峰保留时间波动；基线不稳定

- 错误的或之前使用的LC液相溶剂。始终以相同的方式制备溶剂（例如，通过将两种溶剂混合在一起，使一种溶剂在量筒中达到一升，这与分别测量两种溶剂并在瓶子中混合不同）。等比例梯度对溶剂制备的变化特别敏感。由于蒸发，溶剂成分会随时间变化。
- 色谱柱被过量的游离染料/肽等污染，会导致保留时间偏移，谱图上出现额外的峰。对于低唾液酸化水平的样品来说，这个问题更大，因为大量的蛋白质被注射到色谱柱里。用常规洗脱溶剂和乙腈以10:90混合所得物，以正常流速清洗柱子。
- (U)HPLC系统的运行条件尚未优化。评估是否使用UHPLC的一个常见变量是“强/弱清洗”。这些对色谱法有显著的影响。常规而言，“弱洗”使用最弱的梯度条件，“强洗”使用最强的梯度条件。您需要评估其中哪一种产生的SRP峰形与产品指南相一致。我们建议开始先使用弱洗涤液进行液相色谱优化。

4. 问题标记溶液中有析出

- 尽管非常罕见，在制备DMB标记溶液（连二亚硫酸钠、巯基乙醇和DMB混合物）仍有可能发生轻微的析出。我们曾观察到此类现象，并检测了该物质对标记效率的影响，并确定析出物不会影响标记反应。

5. 唾液酸参照品(SRP)在 (U)HPLC的图谱与说明书不一致

- 请确认该参照品未用酸处理。如用酸处理，SRP图谱的仅包含Neu5Ac 和 Neu5Gc 相关的峰。

担保与责任

Ludger 保证上述产品符合所附的分析性文件。如果出现并非因不当使用而导致的产品失效，Ludger 公司将自行决定免费更换或退还货款。除担保说明承诺的之外，Ludger 不作出任何类型的明示或默示担保，包括任何隐性条件或者对适销性或特定用途适用性的隐性担保。

Ludger 不承担任何偶然、必然或意外损害的赔偿责任。本产品仅供体外研究用。

文件修订编号

Document # LT-KDMB-A1-Guide-CN-v6.3.doc