

## 受託解析サービス仕様書



〒225-0012

横浜市青葉区あざみ野南 1-3-3

(株)グライコテクニカ 横浜事業所

TEL: 045-913-5803 FAX: 045-511-8570

## 1. GlycoStation Reader™ システム

### 1) システム構成

GlycoStation Reader™ システムは以下の図にある LecChip™ と GlycoStation Reader™ 1200 及び解析ソフトの ToolsPro より構成されております。



LecChip™



GlycoStation Reader™ 1200

### 2) プロファイリング基本原理

#### ① 45 種類のレクチン

レクチンとは「糖鎖を特異的に認識するタンパク質の総称です（除く、抗体、酵素）」です。レクチンの種類によって糖鎖に結合するエピトープ構造が異なっており、レクチンの結合パターン（プロファイリングパターン）を見ることでよって糖鎖にどのような構造上の特徴があるかを識別できます。

次の表にある厳選された 45 種類のレクチンをスライドガラスにスポット状に並べて固定したものが LecChip™ です。次の表はそれらレクチンが認識する特異的な糖鎖を簡易的に大分類した表です。これがレクチンのすべての糖鎖結合性を表すものではないことにご注意下さい。

Edited by M. Yamada, 8/21/2007

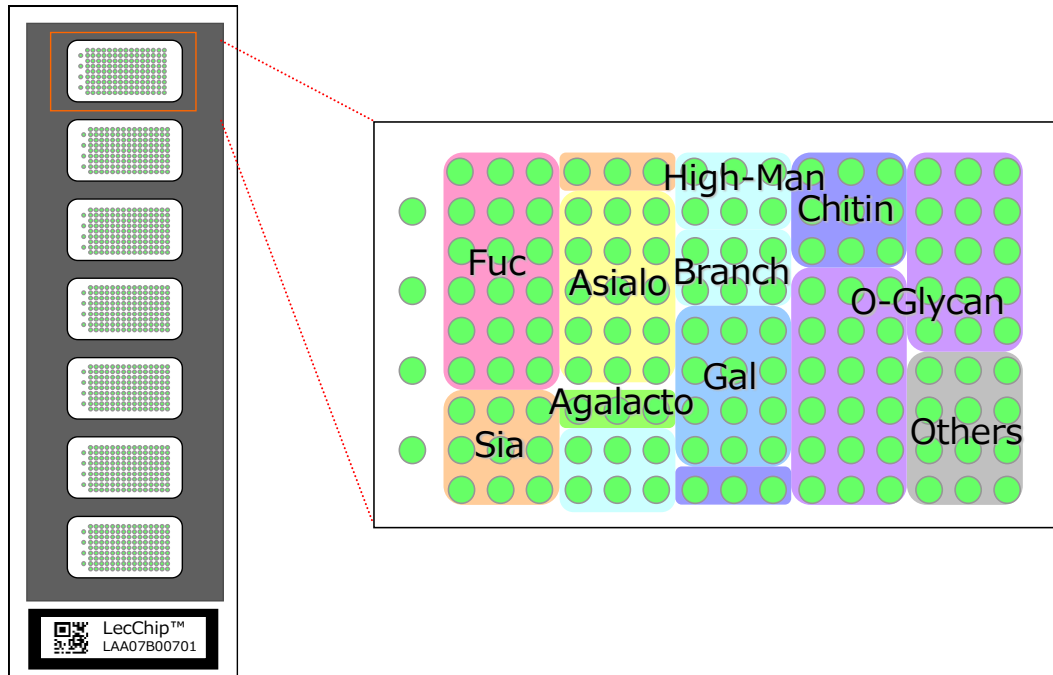
Lectin No.	Lectin	Reported specificity
1	LTL	Fuca1-3(Galb1-4)GlcNAc, Fuca1-2Galb1-4GlcNAc
2	PSA	Fuca1-6GlcNAc, a-D-Glc, a-D-Man
3	LCA	Fuca1-6GlcNAc, a-D-Glc, a-D-Man
4	UEA-I	Fuca1-2Galb1-4GlcNAc
5	AOL	Fuca1-6GlcNAc (core fucose)
6	AAL	Fuca1-6GlcNAc, Fuca1-3(Galb1-4)GlcNAc
7	MAL	Siaa2-3Galb1-4GlcNAc
8	SNA	Siaa2-6Gal/GalNAc
9	SSA	Siaa2-6Gal/GalNAc
10	TJA-I	Siaa2-6Gal/GalNAc
11	PHAL	tri/tetra-antennary complex-type N-glycan
12	ECA	Galb1-4GlcNAc
13	RCA120	Galb1-4GlcNAc
14	PHAE	bi-antennary complex-type N-glycan with outer Gal and bisecting GlcNAc
15	DSA	(GlcNAcb1-4) <sub>n</sub> , Galb1-4GlcNAc
16	GSL-II	agalactosylated tri/tetra antennary glycans, GlcNAc
17	NPA	High-Mannose, Mana1-6Man
18	ConA	High-Mannose, Mana1-6(Mana1-3)Man
19	GNA	High-Mannose, Mana1-3Man
20	HHL	High-Mannose, Mana1-3Man, Mana1-6Man
21	ACG	Siaa2-3Galb1-4GlcNAc
22	TxLCI	Mana1-3(Mana1-6)Man, bi- and tri-antennary complex-type N-glycan, GalNAc
23	BPL	Galb1-3GalNAc, GalNAc
24	TJA-II	Fuca1-2Galb1-> or GalNAcb1-> groups at their nonreducing terminals
25	EEL	blood group B antigen, Gala1-3Gal
26	ABA	Galb1-3GalNAc
27	LEL	GlcNAc trimers/tetramers
28	STL	GlcNAc oligomers, oligosaccharide containing GlcNAc and MurNAc
29	UDA	GlcNAcb1-4GlcNAc, Mixture of Man5 to Man9
30	PWM	(GlcNAcb1-4) <sub>n</sub>
31	Jacalin	Galb1-3GalNAc, GalNAc
32	PNA	Galb1-3GalNAc
33	WFA	GalNAcb1-4GlcNAc, Galb1-3(-6)GalNAc
34	ACA	Galb1-3GalNAc
35	MPA	Galb1-3GalNAc, GalNAc
36	HPA	a-linked terminal GalNAc
37	VVA	a-linked terminal GalNAc, GalNAca1-3Gal
38	DBA	blood group A antigen, GalNAca1-3GalNAc
39	SBA	a- or b-linked terminal GalNAc, GalNAca1-3Gal
40	Calsepa	Mannose, Maltose
41	PTL-I	a-linked terminal GalNAc
42	MAH	Siaa2-3Galb1-3(Siaa2-6)GalNAc
43	WGA	chitin oligomers, Sia
44	GSL-I A4	a-linked GalNAc
45	GSL-I B4	a-linked Gal

Remarks) These data were collected from lectin vendors and reports found by internet searches.

# LecChip™

レクチップには下図左の様にガラスの上にゴム製のラバーが貼られており、7つのウェルが形成されています。各ウェルの容量は、100 $\mu$ Lです。

下図右の拡大図のように同じフォーマットで厳選された 45 種類のレクチンが 3重にスポットされています。



詳細なレクチンの配列は以下の様になっています。

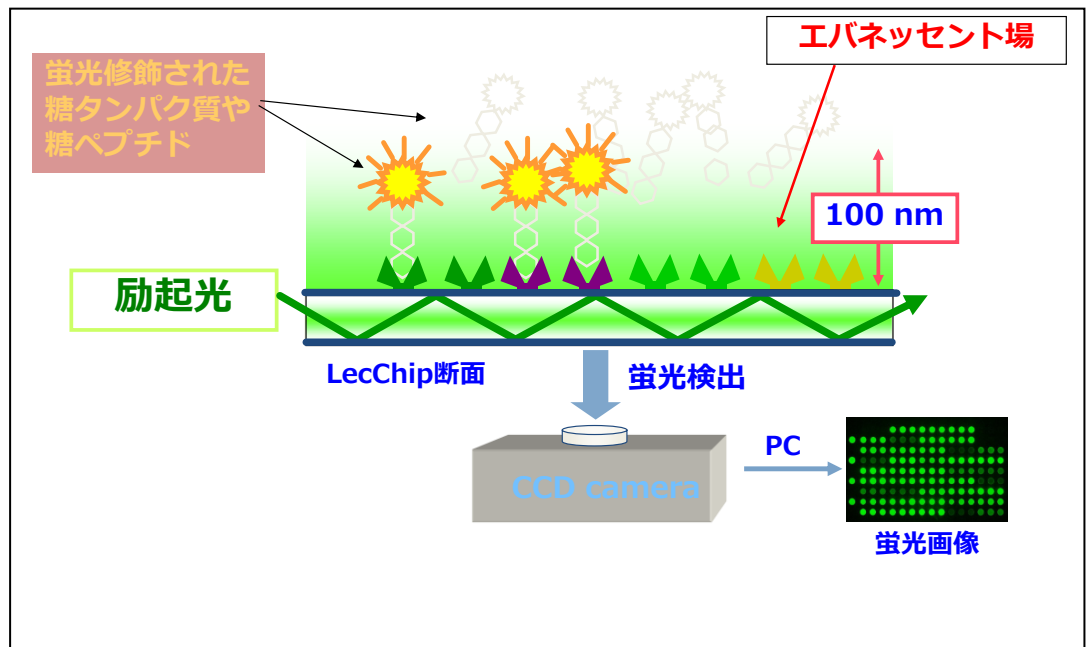
### LecChip™ Ver.1.0

1. LTL	10. TJA-I	19. GNA	28. STL	37. VVA
2. PSA	11. PHAL	20. HHL	29. UDA	38. DBA
3. LCA	12. ECA	21. ACG	30. PWM	39. SBA
4. UEA I	13. RCA120	22. TxLC I	31. Jacalin	40. Calsepa
5. AOL	14. PHAE	23. BPL	32. PNA	41. PTL I
6. AAL	15. DSA	24. TJA-II	33. WFA	42. MAH
7. MAL	16. GSL II	25. EEL	34. ACA	43. WGA
8. SNA	17. NPA	26. ABA	35. MPL	44. GSL-I A4
9. SSA	18. ConA	27. IEL	36. HPA	45. GSL-I B4

③ GlycoStation Reader<sup>TM</sup> 1200

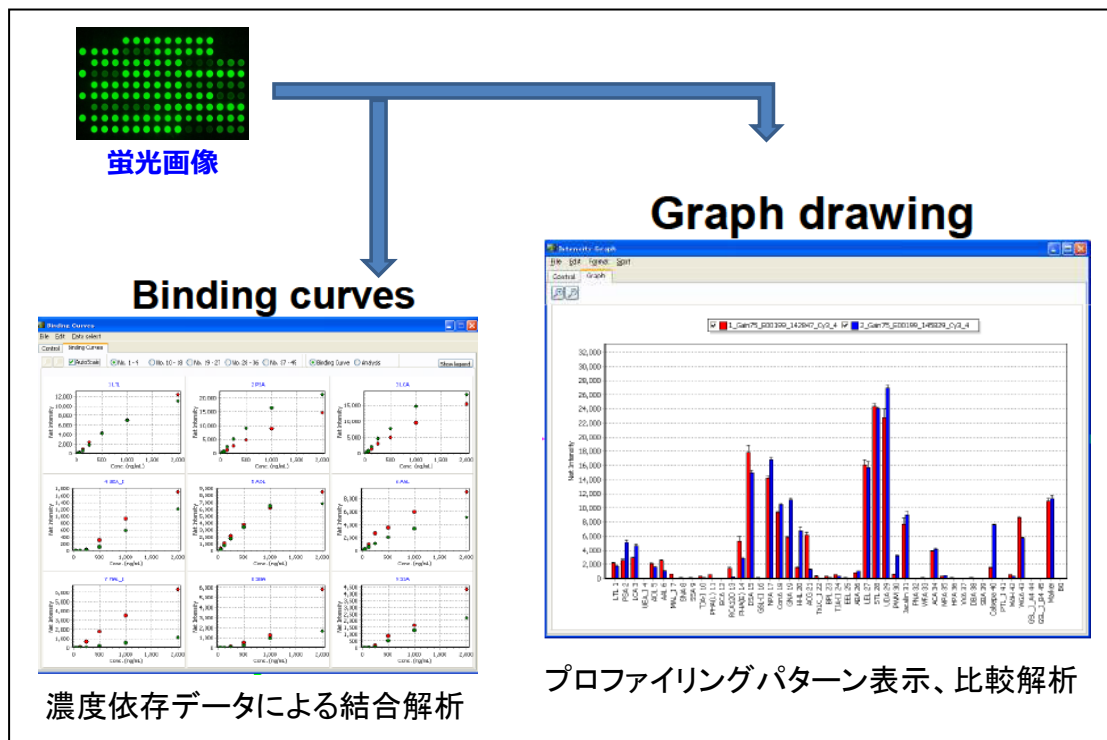
LecChip<sup>TM</sup> 専用開発されたプロファイラー (i.e., スキャナー) が GlycoStation Reader 1200 です。

糖鎖とレクチン間の結合力は比較的に弱いため、DNA アレイや抗体アレイで行われているようにアレイ上で結合反応後に洗浄操作をしてしまうと、糖鎖とレクチンの弱い結合が切れてしまいます。基板界面から 200nm ほど浸み出すエバネッセント波を蛍光の励起光とすることで洗浄操作をしなくても、スライドガラスに固定化されたレクチンと結合している蛍光標識糖鎖の蛍光だけを高い S/N 比で検出します。



④ ToolsPro

GlycoStation Reader 1200 で得られた蛍光画像を分析し、下図にあります Binding Curves や比較糖鎖プロファイリング図へ転換するソフトが GlycoStation™ ToolsPro です。



## 2. 具体的なプロトコル

### 糖鎖プロファイリング解析

#### 1. 解析対象

培養細胞、生検組織切片、パラフィン固定組織切片、血清、尿、培養上清液、ミルクなど多種多様なサンプルに対応可能にて、それぞれのサンプルに対応した前処理を適用します。基本プロトコル自体は非常に簡単であり、タンパク質量と Cy3 のラベリングが基本となります。

#### 2. 解析手順（生検試料の例）

- 2-1. PBS-Tx に 1/100 量の Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free(×100)を加え、混合
- 2-2. 生検試料をホモジナイズ用のサンプルチューブに入れ、2-1 溶液 200uL を生検組織に加えて、30~60 秒間ホモジナイズ
- 2-3. 2-2 試料に 2-1 溶液 300uL を加え、1 分間の超音波処理
- 2-4. 14000×g、5 分間、4℃で遠心して、上清（可溶画分）を回収
- 2-5. Micro-BCA 法にてタンパク質濃度を測定し、PBS にて 50ug/mL に調整
- 2-6. 20uL の 2-5 試料と Cy3 Mono-Reactive dye 100ug Labeling を混合し、室温、暗所で 1 時間反応
- 2-7. 脱塩カラムを 1500×g、1 分間、4℃で遠心
- 2-8. 2-7 脱塩カラムに TBS 300uL をアプライし、1500×g、1 分間、4℃で遠心
- 2-9. 2-8 を 2 回繰り返し
- 2-10. 2-9 脱塩カラムに 2-6 試料全量と TBS 25uL をアプライし、1500×g、2 分間、4℃で遠心し、未反応の Cy3 を除去
- 2-11. Probing Solution で 2ug/mL から 1/2 の 7 段階希釈系列を調整
- 2-12. LecChip を -20℃から融解し、Probing Solution でウェル内表面を 3 回洗浄
- 2-13. 2-11 で希釈調整した試料を LecChip にアプライし、20℃で一晩シェーカーで攪拌しながら反応
- 2-14. GlycoStation Reader 1200 にて測定し、GlycoStation Tools Pro にて蛍光画像を数値化

#### 3. 解析手順（細胞ペレットの例：Whole Cell Lysate）

- 3-1. PBS と TritonX-100 を混合して PBS-T(1%TritonX-100)を調整し、細胞ペレットに PBS-T=1mL を入れてピペティングし、1min 超音波で破碎、4℃、14000xg、5min 遠心して上清液を回収する
- 3-2. micro-BCA 法にてタンパク質濃度を測定し、PBS にて 50ug/mL に調整
- 3-3. 20uL の 3-1 試料と Cy3 Mono-Reactive dye 100ug Labeling を混合し、室温、暗所で 1 時間反応
- 3-4. 脱塩カラムを 1500×g、1 分間、4℃で遠心
- 3-5. 3-4 脱塩カラムに TBS 300uL をアプライし、1500×g、1 分間、4℃で遠心
- 3-6. 上記を 2 回繰り返し

- 3-7. 3-6 脱塩カラムに 3-3 試料全量と TBS 25uL をアプライし、1500×g、2 分間、4℃で遠心し、未反応の Cy3 を除去
- 3-8. Probing Solution で 2ug/mL から 1/2 の 7 段階希釈系列を調整
- 3-9. LecChip を -20℃から融解し、Probing Solution でウェル内表面を 3 回洗浄
- 3-10. 3-8 で希釈調整した試料を LecChip にアプライし、20℃で一晩シェーカーで攪拌しながら反応
- 3-11. GlycoStation Reader 1200 にて測定し、GlycoStation Tools Pro にて蛍光画像を数値化

本プロトコル例は、Whole Cell Lysate を前提としたものですが、分画キットを用いて膜タンパク質成分のみを抽出し、その糖鎖プロファイリングすることなども可能です。

### 3. 納品物

#### 1. 基本プランの場合：

レクチン名と糖鎖結合特異性に関する資料一式、数値データ一式（エクセル表にエクスポート）を納品物として納品

#### 2. レポートオプションを採用頂いた場合：

比較糖鎖プロファイリング解析を行い、サンプル間の糖鎖の違い、ご要望に応じてクラスタリング解析、ROC 解析なども行い、解析結果を上記 1 のデータに加えてレポートとして納品

以上