

# Tear Mucin Assay Kit (O-Glycan Assay Method)

For Research Use Only

Cat. No. MUC01

Edition Date: 2024/11/01

[www.cosmobiousa.com](http://www.cosmobiousa.com)

## 【 1 – 1 】 Background and Principle of Measurement

Mucin is a glycoprotein that is a major component of mucus, including tears, saliva, gastric fluid, and intestinal fluid. The basic structure of mucin is a core protein with a repeating structure of 10-80 amino acid residues, to which O-glycans are attached. The molecular weight of mucin ranges from 1 to 10 million, and 50-80% of it is composed of glycans. The sugar chains attached to mucins are composed of N-acetylgalactosamine (GalNAc), which is the reducing end of the sugar chain, attached to serine and threonine of the core protein, forming a branched structure with a wide variety of structures. The negatively charged ends of the mucin sugar chains keep the surface of the cornea hydrophilic (Fig. 1).

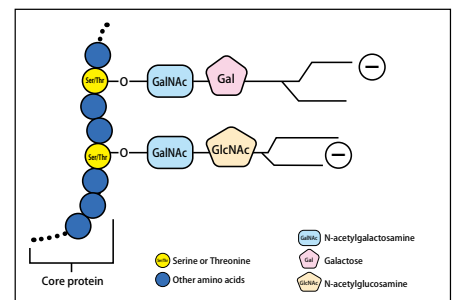


Fig. 1 Structure of Mucin

Some of these sugar chains are known to have specific recognition functions for viruses and fungi<sup>1)</sup>. Because of these properties, mucins are also known to prevent viruses, pathogens, and fungus-derived toxins from migrating beyond the corneal epithelial layer into the corneal tissue, i.e., they are positioned as a corneal barrier function substance.

In addition, mucin in tear fluid plays an important role in tear fluid stability, and a decrease in mucin is thought to lead to the onset of dry eye<sup>2),3)</sup> (Figure 2). Mucins in tear fluid can be broadly classified into secretory-type mucins and membrane-type mucins. Two types of secretory-type mucins are known: MUC5AC (secreted from conjunctival goblet cells) and MUC7 (secreted from the tear film), while membrane-type mucins include MUC1, MUC4 and MUC16 (on the cell membrane of the corneal epithelium)<sup>4)</sup>.

This kit can measure mucins in tear fluid under alkaline conditions by measuring the fluorescence intensity obtained by  $\beta$ -elimination of O-glycans from the core protein and fluorescence labeling of the reducing end of the sugar chain<sup>5),6)</sup>.

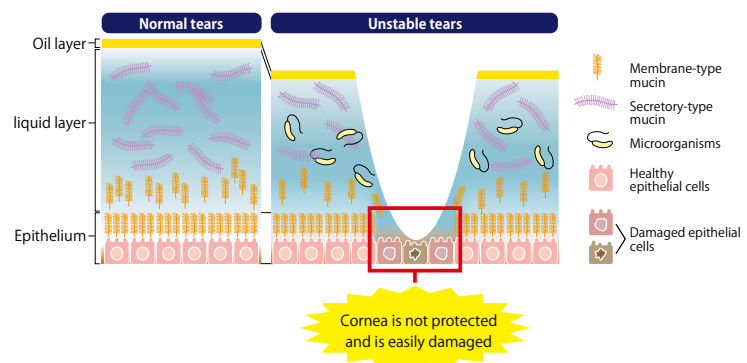
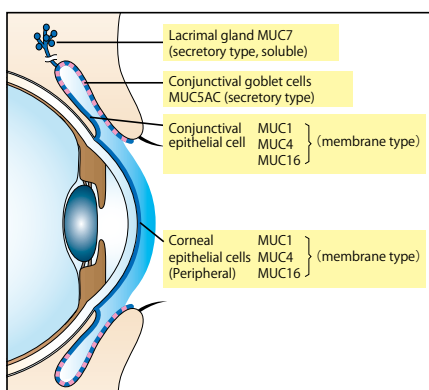


Fig. 2 Types of mucins expressed on the ocular surface and barrier function of mucins in tear fluid

## 【 1 – 2】 Kit components

Storage temperature: 4 to 10°C

This product can measure 50 samples.

Component	Volume	Quantity	Precautions for handling
Elution Buffer	30mL	1	Wear protective equipment such as glasses and gloves when handling, and take care to avoid contact with the body.
Slurry for spin column	45mL	1	
Standard solution GalNAc 100 µg/mL	1mL	1	
Reagent A	0.3mL	1	
Reagent B	1.5mL	1	
Stop solution	15mL	1	
Empty column	-	50	
Centrifuge tube	-	50	

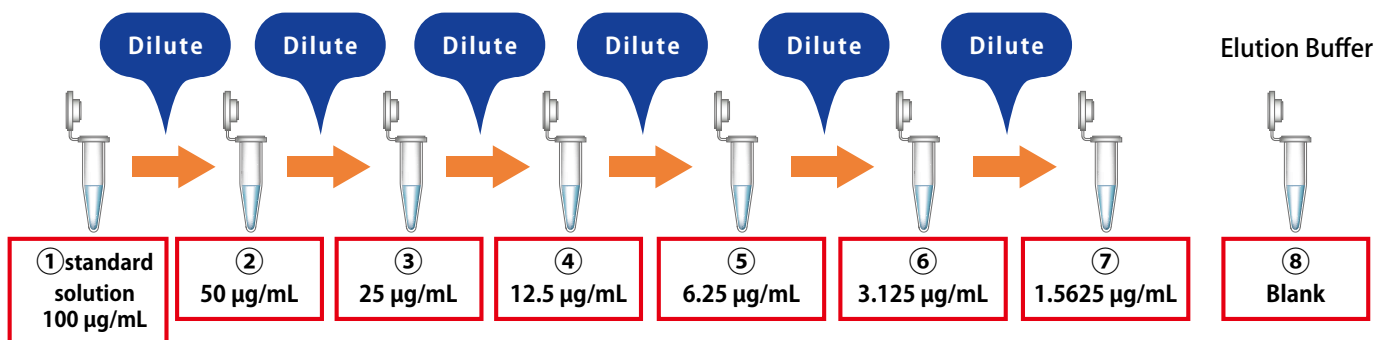
## What to prepare

- Schirmer test strips
- Micro test tubes (2.0 mL, 1.5 mL, 0.5 mL)
- A fluorescence spectrophotometer (using a microcell) or a fluorescence plate reader is required.
- When using a fluorescence plate reader, please prepare a 96 well black plate

## 【II – 1】 Preparation of standard solution

Dilute the standard solution (N-acetylgalactosamine 100 µg/mL) with the extraction solution as follows.

- ① 100 µg/mL   ② 50 µg/mL   ③ 25 µg/mL   ④ 12.5 µg/mL   ⑤ 6.25 µg/mL   ⑥ 3.125 µg/mL   ⑦ 1.5625 µg/mL  
⑧ Blank(Elution Buffer)



Number the tubes from ② to ⑧ and dispense 500 µL of the extract into a new 1.5 mL micro tube.

Take 500 µL from ① and add it to ②, and mix well. Take 500 µL from ② and add to ③. Repeat the same procedure up to ⑦ to make a standard solution. The blank in ⑧ is the Elution Buffer only.

The prepared standard solution can be stored at 4°C for 3 weeks.

## 【II – 2】 Sample Preparation Method

Collect tear fluid for 5 minutes using Schirmer test strips. When storing the collected tear fluid on Schirmer test strips, place the strips in 2.0 mL microtubes and store at 4°C to avoid freezing. If stored for a long period of time, store at -20°C or below.

### 【III】 Assay method

- 1 Fold a small piece of Schirmer test paper, press it into the bottom of a 2.0 mL micro tube, add 200  $\mu\text{L}$  of the extract solution, and mix it with a test tube mixer for 30 seconds. Extract at room temperature for 1 hour, stirring occasionally, while the Schirmer test strips are fully immersed in the extraction solution.
- 2 During the 1-hour extraction, prepare an empty column for purification. After the slurry gel filtration carrier has been well stirred, 800  $\mu\text{L}$  is placed in the Empty column and set in a centrifuge tube without lid. Centrifuge at  $800 \times g$  for 10 minutes at room temperature using a swinging rotor centrifuge. At this time, remove any liquid in the centrifuge tube (see Figure 3).
- 3 Charge 50  $\mu\text{L}$  of the extract from the Schirmer test paper obtained in step 1 to the top of the gel in the Empty column prepared in step 2. Centrifuge at  $800 \times g$  for 10 minutes at room temperature. Collect the eluted solution in a centrifuge tube. Approximately 50  $\mu\text{L}$  of the eluted solution can be collected, this solution is used as the sample solution (see Figure 3).
- 4 Take 20  $\mu\text{L}$  of Sample Mucin Solution and Standard Solution and add in a 0.5 mL microtest tube. Just before use, mix Reagent A: Reagent B at a ratio of 1:5 (v/v)\* 1, add 24  $\mu\text{L}$  of this solution, mix, and then heat at  $100^\circ\text{C}$  for 30 minutes.
- 5 Allow the mixture to leave at room temperature, and after confirming once it has cooled to room temperature, add 200  $\mu\text{L}$  of the reaction stopper solution and stir.
- 6 Dispense 100  $\mu\text{L}$ /well onto a black plate, and measure at excitation wavelength of 336 nm and fluorescence wavelength of 383 nm with a fluorescence plate reader (if a fluorescence plate reader is not available, measure one sample at a time with a fluorescence spectrophotometer using a micro cell).
- 7 Create a standard curve (4-parameter logistic curve: 4PL) from the fluorescence values of the standard solution and calculate the concentration of mucin in the sample solution

\* Use the mixture of Reagent A and Reagent B immediately.

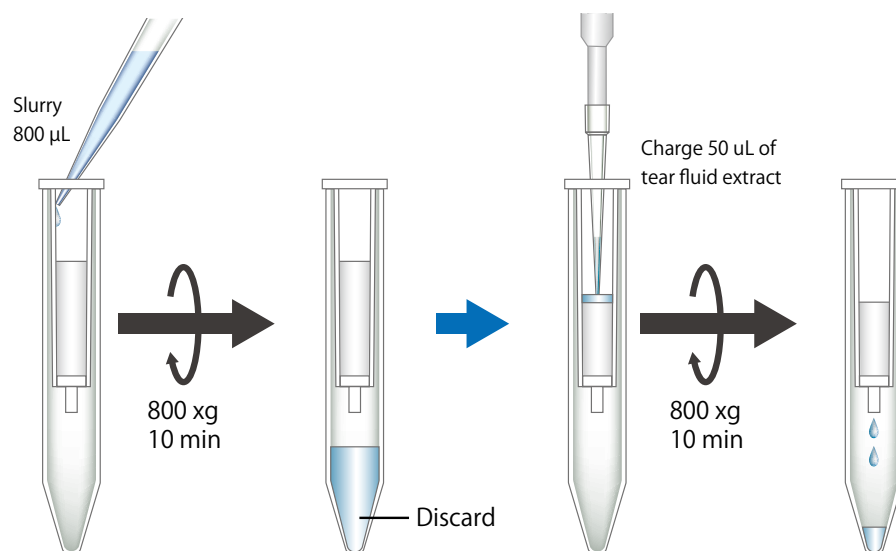


Fig. 3 Purification method by spin column

## 【IV】 Standard curve

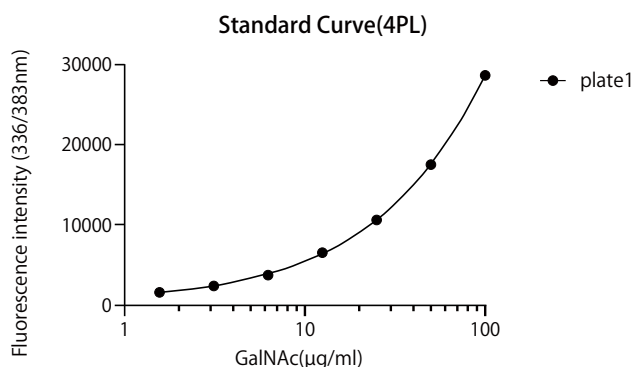
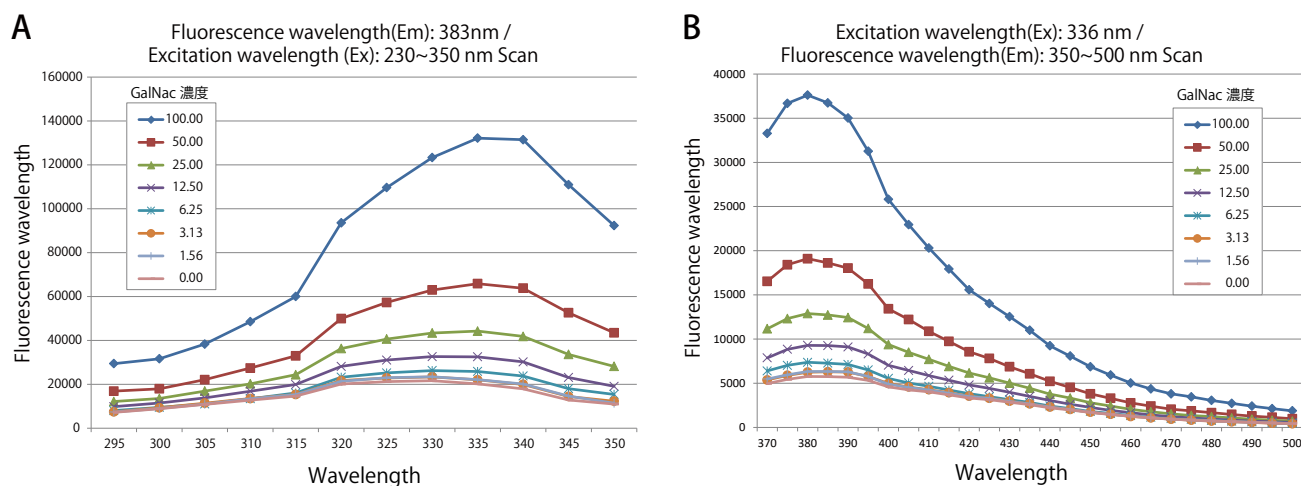


Fig. 4 Standard Curve (4PL)

## 【V】 Reference data



Reference data 1 Changes in excitation and fluorescence wavelengths in standard solutions at various concentrations

**A:** Excitation spectrum for fluorescence wavelength (Em) 383 nm

**B:** Fluorescence spectrum for excitation wavelength (Ex) 336 nm

The recommended measurement wavelengths are Ex 336 nm and Em 383 nm, but in the case of fluorescence plate readers that use interference filters, it may not be possible to measure at the recommended measurement wavelengths depending on the half-value bandwidth of the filter.

In this case, please increase the wavelength difference between the excitation wavelength and the fluorescence wavelength and measure.

## 【VI】 References

---

- [1] Gipson IK, Hori Y, Argüeso P. Character of Ocular Surface Mucins and Their Alteration in Dry Eye Disease. *Ocul Surf.* 2004;2(2):131-148.
- [2] Argüeso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, Keutmann HT, Dana MR, Gipson IK. Decreased Levels of the Goblet Cell Mucin MUC5AC in Tears of Patients with Sjögren Syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(4):1004-1011.
- [3] Uchino Y, Uchino M, Yokoi N, et al. Alteration of Tear Mucin 5AC in Office Workers Using Visual Display Terminals: The Osaka Study. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(8):985-992.
- [4] Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Zhan Q, Feldman ST, Gipson IK. Expression of secretory mucin genes by human conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(8):1684-1692.
- [5] Honda Susumu, Matsuda Yoshikazu, Takahashi Masaye, Kakehi Kazuaki, Ganno Shigetake. Fluorimetric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide and application to automated analysis of carbohydrates as borate complexes. *Anal Chem.* 1980;52(7):1079-1082.
- [6] Crowther RS, Wetmore RF. Fluorometric assay of O-linked glycoproteins by reaction with 2-cyanoacetamide. *Anal Biochem.* 1987;163(1):170-174.



COSMO BIO Co., LTD.

【JAPAN】

TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,  
KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN  
Phone: +81-3-5632-9610  
FAX: +81-3-5632-9619  
URL: <https://www.cosmobio.co.jp/>



COSMO BIO USA

【Outside Japan】

2792 Loker Ave West, Suite 101  
Carlsbad, CA 92010, USA  
email: [info@cosmobioua.com](mailto:info@cosmobioua.com)  
URL: [www.cosmobioua.com](http://www.cosmobioua.com)  
Phone/FAX: (+1) 760-431-4600

一般研究用キット

# Tear Mucin Assay Kit (O-Glycan Assay Method)

## 涙液ムチン測定キット

Cat. No. MUC01

2024年11月1日作成

[www.cosmobio.co.jp](http://www.cosmobio.co.jp)

### 【1-1】背景と測定原理

ムチン (Mucin) は糖タンパク質の一種で涙、唾液、胃液、腸液などの粘液の主成分です。ムチンの基本構造は 10-80 アミノ酸残基のくり返し構造を持つコアタンパクに O 型糖鎖が結合した糖タンパク質です。分子量は 100 万～1000 万であり、その 50～80% が糖鎖で占められています。ムチンに結合している糖鎖はコアタンパク質のセリンおよびスレオニンに糖鎖の還元末端である N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が結合し、その構造は多様性に富んだ分岐構造を形成しています。ムチンの糖鎖の末端がマイナスに荷電していることによって角膜表面は親水性に保たれています (図 1)。

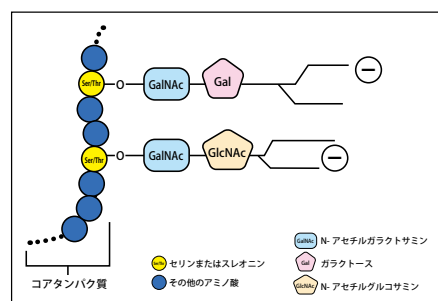


図 1 ムチンの構造

またこれらの糖鎖の一部にはウイルスや菌体を認識する特異的な認識機能を有していることが知られています<sup>1)</sup>。このような性質から角膜上においては、ウイルス、病原菌、および菌体由来の毒が角膜上皮層を超え組織に移行することを阻する働き、すなわち角膜のバリア機能物質としても位置付けられています。

また、涙液中のムチンは、涙液の安定性に重要な役割を持っており、ムチンの減少がドライアイの発症につながると考えられています<sup>2),3)</sup> (図 2)。涙液中のムチンは大きく分けて分泌型ムチンと膜型ムチンに分類することができ、分泌型ムチンは MUC5AC (結膜杯細胞から分泌)、MUC7 (涙線から分泌) の 2 種類があり、膜型ムチンは MUC1、MUC4、MUC16 (角膜上皮の細胞膜上) などが知られています<sup>4)</sup>。

本キットはアルカリ条件下で、コアタンパク質から O-グリカンを経脱離すると同時に糖鎖還元末端に蛍光ラベルさせることで得られる蛍光強度を測定することにより、涙液中のムチンを測定することができます<sup>5)</sup>。

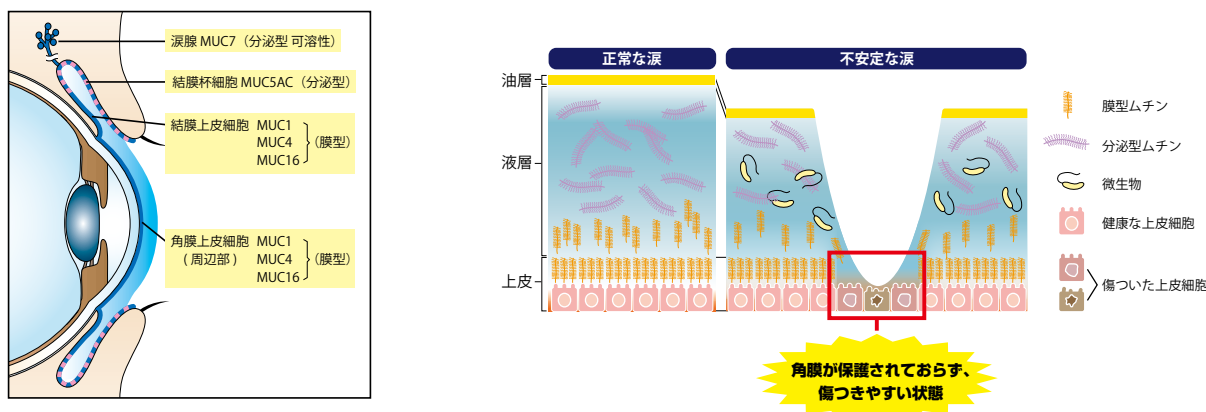


図 2 眼表面に発現しているムチンの種類と涙液のムチンによるバリア機能

**【1-2】キット構成** 本製品は 50 検体を測定できます。

保存温度：4～10℃

内 容	容 量	数 量	取扱上の注意
抽出液 (Elution Buffer)	30 mL	1 本	取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
ゲル濾過担体 (Slurry for spin column)	45 mL	1 本	
標準液 (Standard solution GalNAc 100 µg/mL)	1.0 mL	1 本	
試薬 A (Reagent A)	0.3 mL	1 本	
試薬 B (Reagent B)	1.5 mL	1 本	
反応停止液 (Stop solution)	15 mL	1 本	
エンプティーカーラム (Empty column)	1 mL 用	50 本	
遠心チューブ (Centrifuge tube)	—	50 本	

**ご準備いただくもの**

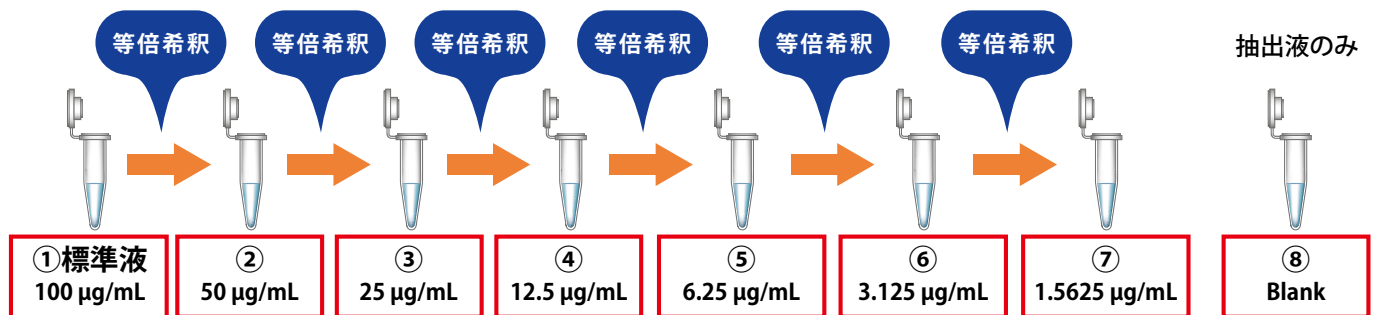
- シルマー試験紙
- マイクロテストチューブ (2.0 mL、1.5 mL、0.5 mL)
- 本製品の測定は、蛍光分光光度計 (マイクロセル使用)、もしくは蛍光プレートリーダーが必要になります。
- 蛍光プレートリーダーをご使用の際には、96 well ブラックプレートをご用意ください。



## 【II-1】標準液の調製方法

標準液 (N-アセチルガラクトサミン 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を原液として抽出液にて等倍希釈し、

- ① 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ② 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ③ 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ④ 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ⑤ 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ⑥ 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ⑦ 1.5625  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
⑧ ブランク (抽出液のみ) を調製します。



新しい 1.5 mL マイクロチューブに②～⑧まで、ナンバリングし抽出液を 500  $\mu\text{L}$  ずつ分注します。

①から 500  $\mu\text{L}$  取り②へ加え、よく混和します。②から 500  $\mu\text{L}$  取り③へ加えます。以後⑦まで同操作を繰り返し、標準液とします。⑧のブランクは抽出液のみとします。

調製した標準液は 4°C で 3 週間保存できます。

## 【II-2】試料の調製方法

シルマー試験紙を用いて涙液を 5 分間採取してください。涙液を採取したシルマー試験紙を保存する場合は 2.0 mL 用マイクロチューブ内にいれ凍結を避け 4°C で保存してください。長期間保存する場合は -20°C 以下で保存して下さい。

### 【Ⅲ】測定方法

- 1 シルマー試験紙を小さく折りたたみ、2.0 mL用マイクロチューブの底に押し込み、200  $\mu$ Lの抽出液を加え試験管ミキサーにて30秒間混和します。シルマー試験紙が抽出液中に完全浸漬された状態で、時々攪拌しながら1時間室温で抽出してください。
- 2 1の1時間抽出の間、精製用のエンプティーカーラムを準備します。スラリー状のゲル濾過担体を良く攪拌し均一化後、800  $\mu$ Lをエンプティーカーラム内に入れ、蓋を外した遠心チューブ内にセットします。その後スイングロータ式遠心機で800  $\times$  g、10分間室温で遠心してください。この時遠心チューブ内に溜まった液は除去してください（図3参照）。
- 3 1で得たシルマー試験紙からの抽出液50  $\mu$ Lを2で作成したエンプティーカーラム内のゲル上部にチャージし、800  $\times$  gで10分間室温で遠心してください。遠心チューブ内に溶出された溶液を回収します。チャージした量とほぼ等量の約50  $\mu$ L回収できます。この溶液を検体ムチン測定試料液とします（図3参照）。
- 4 検体ムチン測定試料液および標準液を20  $\mu$ Lとり、0.5 mL用マイクロテストチューブに入れます。使用直前に試薬A：試薬Bを1:5（v/v）の比で混合し<sup>※注1</sup>、この溶液を24  $\mu$ L加え攪拌後、100 $^{\circ}$ Cで30分間加温します。
- 5 室温で放置し、室温まで冷めたことを確認後、反応停止液を200 $\mu$ L加え攪拌してください。
- 6 ブラックプレートに100  $\mu$ L/wellで分注し、蛍光プレートリーダーにて励起波長336 nm・蛍光波長383 nmにて測定してください（蛍光プレートリーダーがない場合には蛍光分光光度計にてマイクロセルを使用して1検体ずつ測定してください）。
- 7 標準液の蛍光値より検量線（4パラメータロジスティック曲線：4PL）を作成し、検体ムチン測定試料液中のムチン濃度を算出してください。

注1：試薬Aと試薬Bの混合溶液は速やかにご使用ください。

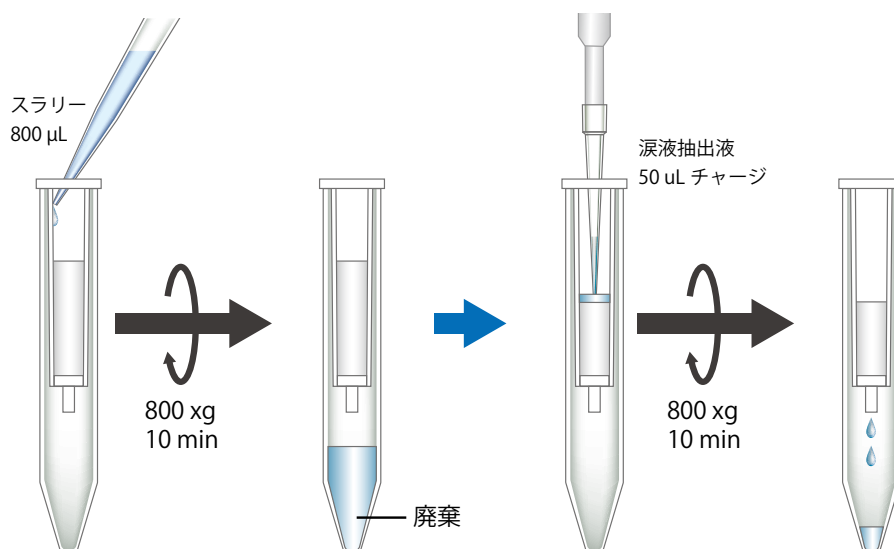


図3 スピんカラムによる精製方法

## 【IV】 検量線

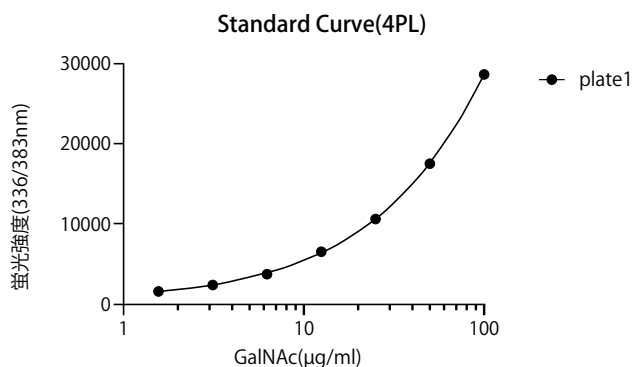
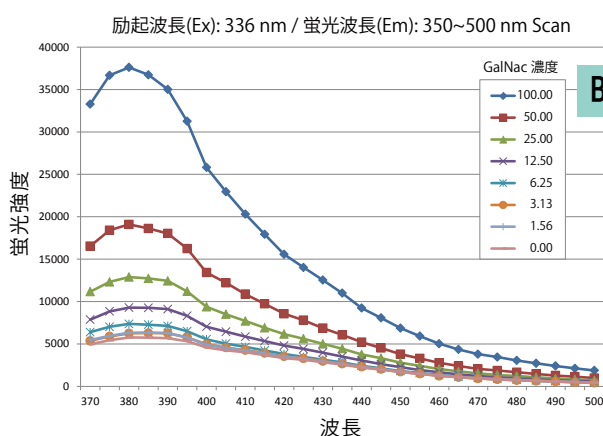
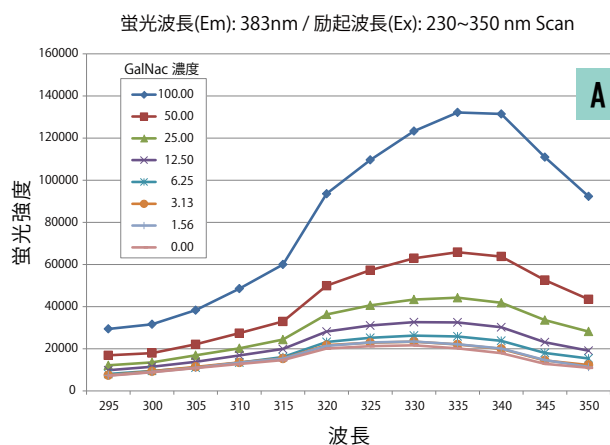


図4 検量線 (4PL)

## 【V】 参考資料



参考資料 1 各濃度の標準液における励起波長および蛍光波長の変化

**A** : 蛍光波長 (Em) 383 nm に対する励起スペクトル **B** : 励起波長 (Ex) 336 nm に対する蛍光スペクトル

推奨する測定波長は Ex 336 nm、Em 383 nm ですが、干渉フィルター方式の蛍光プレートリーダーの場合、フィルターの半値幅によって推奨測定波長で測定できない場合があります。その場合は励起波長と蛍光波長の波長差を大きくして測定して下さい。

Tear Mucin Assay Kit — 涙液ムチン測定キット —  
Cat. No. MUC01

[www.cosmobio.co.jp](http://www.cosmobio.co.jp)

## 【VI】参考文献

- [1] Gipson IK, Hori Y, Argüeso P. Character of Ocular Surface Mucins and Their Alteration in Dry Eye Disease. *Ocul Surf.* 2004;2(2):131-148.
- [2] Argüeso P, Baram M, Spurr-Michaud S, Keutmann HT, Dana MR, Gipson IK. Decreased Levels of the Goblet Cell Mucin MUC5AC in Tears of Patients with Sjögren Syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(4):1004-1011.
- [3] Uchino Y, Uchino M, Yokoi N, et al. Alteration of Tear Mucin 5AC in Office Workers Using Visual Display Terminals: The Osaka Study. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(8):985-992.
- [4] Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Zhan Q, Feldman ST, Gipson IK. Expression of secretory mucin genes by human conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(8):1684-1692.
- [5] Honda Susumu, Matsuda Yoshikazu, Takahashi Masaye, Kakehi Kazuaki, Ganno Shigetake. Fluorimetric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide and application to automated analysis of carbohydrates as borate complexes. *Anal Chem.* 1980;52(7):1079-1082.
- [6] Crowther RS, Wetmore RF. Fluorometric assay of O-linked glycoproteins by reaction with 2-cyanoacetamide. *Anal Biochem.* 1987;163(1):170-174.

12453



**コスモ・バイオ株式会社**  
COSMO BIO Co., LTD.

— 商品の価格・在庫・納期に関するお問い合わせ —  
TEL: 03-5632-9630 (受付時間 9:00 ~ 17:30)

FAX: 03-5632-9623

— 商品に関するお問い合わせ —  
TEL: 03-5632-9610 (受付時間 9:00 ~ 17:30)

FAX: 03-5632-9619

本社所在地 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル