

糖鎖分析メソッド集

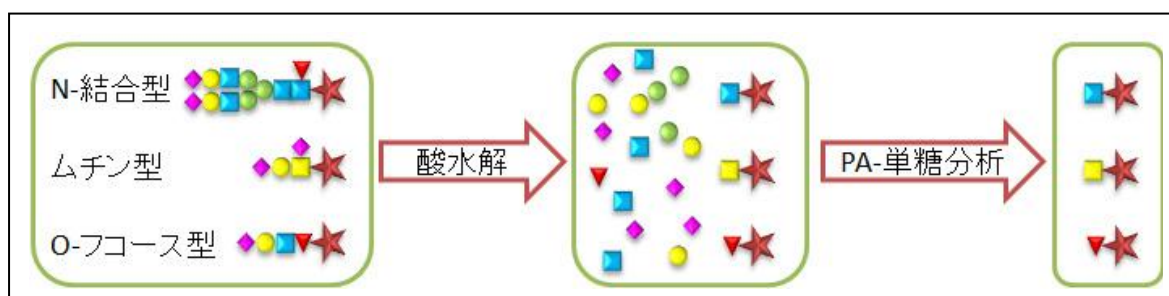
還元末端分析

Ver. 20100619

Written by S. Natsuka

方法の概要

酸水解で、PA 化糖鎖を単糖にまで分解する。還元末端だけが PA 化されているので、蛍光分析でその単糖だけ検出できる。



使用目的例

1. サンプル中に含まれる糖鎖のタイプを知りたい時
2. 単離したピークが糖鎖を含むかどうかを調べたい時
3. 各タイプの糖鎖総量を定量したい時

この方法を使った時に引用すべき論文

Makino Y, Kuraya N, Omichi K, Hase S. (1996) Classification of sugar chains of glycoproteins by analyzing reducing end oligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis. *Anal Biochem*, **238** (1) 54-59.

10 pmol – 1 nmol PA-oligosaccharide(s)

塩を含まない事。サンプル量の下限は、HPLC の感度に依存する。還元末端糖のトータルでの回収率は半分程度。

↓ lyophilize in PCR tube

↓ 100 μ L of 4 M HCl

↓ 100 $^{\circ}$ C, 4 hr

私達のラボでは、簡易型 PCR 装置を用いて、99 $^{\circ}$ C, 4 hr の条件で反応させている。

↓ Evaporate HCl by Concentrator

ある程度液量が少なくなったら、次に進む。

↓ Lyophilize



- ↓ 100 μ L of H₂O
- ↓ Lyophilize
- ↓ 100 μ L of H₂O
- ↓ Lyophilize
- ↓ 50 μ L of sat.NaHCO₃aq. (ice cold) + 2 μ L Ac₂O
アセチル化されていない PA-アミノ糖は、
蛍光がないので、再 N-アセチル化が必要。
- ↓ Mix by Vortex
- ↓ on ice, 30 min (occasionally vortex)
- ↓ 0.2 g of Dowex 50x2 (200-400 mesh) (H⁺ form)
市販の樹脂は汚いので、良く洗浄した後に使用する。
- ↓ Mix by Vortex
- ↓ Pour into mini-column (Pasteur pipet with glass wool)
- ↓ Wash with 1 mL of H₂O
- ↓ Elute with 1 mL of 1/10 diluted NH₃aq.
- ↓ Evaporate NH₃ by Concentrator
- ↓ Lyophilize
- ↓ 20 μ L of H₂O
- ↓ Borate chelating anion exchange HPLC
(1 – 5 μ L injection)
Column: TSKgel Sugar AX-I (0.46 x 15 cm)
Solvent: 90% 0.8 M K-borate, pH 9.0 / 10% CH₃CN, isocratic
Flow rate: 0.3 mL/min
Column temperature: 74°C
ex/em: 310/380 nm

HPLC の注意点 :

1. Sugar AX-I カラムは耐圧が低く、
塩濃度の低いサンプル溶液を多く
打ち込むとすぐに劣化するので、
できるだけ少量をインジェクシ
ョンする。
2. 溶離液を脱気して調製した後、直
ぐに使用すると、装置中で気泡が
多く生じる場合がある。一晩静地



コンセントレーターとダイヤフ
ラム型真空ポンプ



単糖分析専用に使っている HPLC 装置。
高温対応のカラムオーブンが必要。
溶離液の塩濃度が高いので、小まめなメン
テナンスが必須。

した後に、再度脱気して使用すると、発泡が抑えられる。

3. 溶離液の pH が徐々に上昇するので、数日以上経った後に再使用する場合は、ホウ酸で pH を調整する。