

糖鎖分析メソッド集  
N-Glycan mini-prep

Ver. 20231018

Written by S. Natsuka

**方法の概要**

微量サンプルのための PA 化 N-結合型糖鎖調製法。組織切片などの夾雑物の多いサンプルから、微量の糖鎖を検出できるように、精製法を組み合わせている。

**PA 化法を使った時に引用すべき論文**

1. Hase S, Ikenaka T, Matsushima Y. (1978) Structure analysis of oligosaccharides by tagging of the reducing sugars with a fluorescent compound. *Biochem Biophys Res Commun*, **85** (1) 257-263. (PA 化のオリジナル論文)
2. Kuraya N, Hase S. (1992) Release of O-linked sugar chains from glycoproteins with anhydrous hydrazine and pyridylation of the sugar chains with improved reaction conditions. *J Biochem*, **112** (1) 122-126. (シアル酸が外れない改良型 PA 化反応の報告)

**この方法を使った時に引用すべき論文**

Natsuka S, Hirohata Y, Nakakita S-i, Sumiyoshi W, Hase S. (2011) Structural analysis of N-glycans of the planarian, *Dugesia japonica*. *FEBS J*. **278**, 452-460.

**プロトコル**

1 – 2 mg dry sample (without water and salt) in screw cap tube with Teflon seal, 1.3 x 10 cm

↓ 0.2 mL of hydrazine, 100°C, 12 h

↓ evaporation *in vacuo*

↓ co-evaporation *in vacuo* with 100  $\mu$ L toluene, 3 times

↓ chill on ice

↓ 210  $\mu$ L of acetic anhydride in sat.NaHCO<sub>3</sub>aq, chilled on ice

(10  $\mu$ L acetic anhydride + 250  $\mu$ L sat.NaHCO<sub>3</sub>aq, mixed in glass tube)

↓ on ice, 5 min, occasionally mixing

↓ 210  $\mu$ L of acetic anhydride in sat.NaHCO<sub>3</sub>aq, chilled on ice

(10  $\mu$ L acetic anhydride + 250  $\mu$ L sat.NaHCO<sub>3</sub>aq, mixed in glass tube)



- ↓ on ice, 25 min, occasionally mixing
- ↓ 1 g of Dowex 50x2 (H<sup>+</sup>), mix well, pH to 3
- ↓ pour into mini-column (BioRad econo column, 1.0 x 5 cm)
- ↓ wash with 5 mL DDW
- eluate in spitz tube
- ↓ lyophilize
- ↓ 100  $\mu$ L x 2, DDW
- ↓ transfer to PAtion tube (Takara Bio Inc.)
  - 蓋裏のシールが、剥がれやすいので注意。
- ↓ lyophilize
- ↓ 20  $\mu$ L PAtion reagent, 90°C, 60 min
  - (138 mg 2-aminopyridine + 50  $\mu$ L AcOH)
  - 完全に混和するようにドライヤー等で加熱して混ぜる。これが PA 化法の一歩のコツ。
- ↓ 70  $\mu$ L of reduction reagent, 80°C, 35 min
  - (50 mg Me<sub>2</sub>NH·borane, 20  $\mu$ L AcOH, 12.5  $\mu$ L DDW)
- ↓ 150  $\mu$ L of DDW
  - 必ず有機溶媒よりも先に DDW を加える。
- ↓ 200  $\mu$ L phenol/chloroform extraction, twice
  - (phenol : chloroform = 1 : 1, DDW saturated)
- ↓ 200  $\mu$ L chloroform extraction
- water layer
- ↓ lyophilize
- ↓ gel filtration, TSK gel HW-40F, 1.0 x 8 cm (6.3 mL)
  - BioRad econo column, 1.0 x 10 cm
  - 10 mM AcONH<sub>4</sub>, pH 6.0
  - 70 drops / fraction, in  $\phi$ 1 x out  $\phi$ 2 mm PTFE tube (~2 mL)



カラムとフラコレ

Fr. 1 – 5

- ↓ check by size-fractionation HPLC
  - 目的の PA-糖鎖を含む画分を確かめるために、数 $\mu$ L をサイズ分画 HPLC で分析する。オリゴ糖は、おおよそ Fr. 2 と 3 に回収される。
- fractions containing N-glycans
- ↓ lyophilize
- ↓ 0.8 mL 0.28% NH<sub>3</sub>aq, 70°C, 60 min in Pierce vial
  - 再アセチル化の際に少量の O-アセチル化が起こるので、弱塩基性下で加熱して O-アセチル基を外す。

↓ lyophilize

↓ 1 mL of 50 mM AcONH<sub>4</sub>, pH 7.0

↓ load to graphite carbon cartridge (GL-Pak Carbograph, 300mg)

wash with 5 mL of CH<sub>3</sub>CN

equilibrated with 5 mL of 50 mM AcONH<sub>4</sub>, pH 7.0

↓ wash with 5 mL of 50 mM AcONH<sub>4</sub>, pH 7.0

↓ elute with 5 mL of 60% CH<sub>3</sub>CN in 50 mM AcONH<sub>4</sub>, pH 7.0

溶媒は加圧せず自然落下で行う。

↓ concentrate by Concentrator

凍るようになるまでアセトニトリルを飛ばす。

↓ lyophilize

↓ 100  $\mu$ L DDW

PA-N-glycans