

糖鎖分析メソッド集

糖組成分析

Ver. 20110727

Written by S. Natsuka

方法の概要

アルドース単糖^{注1}をピリジルアミノ化（PA化）してHPLCで分析する方法。通常のPA化反応では、長鎖のオリゴ糖まで定量的に反応が進むように大過剰量の試薬を加えるが、単糖は反応性が高いので、比較的少量の試薬と、より穏やかな条件で反応させる。また、過剰試薬の除去に溶媒抽出やC18カートリッジ等を用いると単糖の収率が悪いので、減圧留去とホウ酸スピンカラムにより行う。

注1. ケトースを蛍光標識する場合は、次の論文を参照。

Hasehira K, Nakakita S, Miyanishi N, Sumiyoshi W, Hayashi S, Takegawa K, Hirabayashi J. (2010) A comprehensive HPLC analytical system for the identification and quantification of hexoses that employs 2-aminobenzamide coupling. *J. Biochem.*, **147** (4) 501-509.

この方法を使った時に引用すべき論文

1. Suzuki J, Kondo A, Kato I, Hase S, Ikenaka T. (1991) Analysis by high-performance anion-exchange chromatography of component sugars as their fluorescent pyridylamino derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 283-284.
(単糖のPA化法に関する論文)
2. Natsuka S. (2011) Convenient purification method for pyridylamino monosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75** (7) 1405-1407.
(PA-化単糖の精製法に関する論文)

Sample

↓ 0.5 mL of 5 M TFA

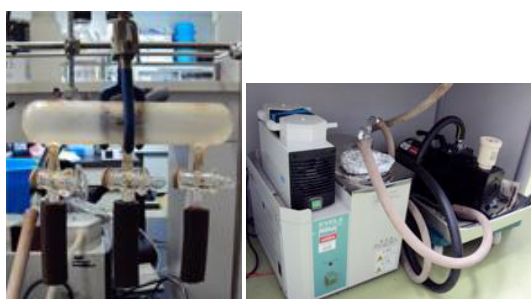
↓ 100°C, 4 h

↓ Dry *in vacuo* *1

↓ Dry *in vacuo* with 200 μ L of MeOH,
twice

↓ 10 μ L of 50 μ M rhamnose
(as a internal standard)

↓ Dry *in vacuo*



減圧乾固するための装置

チューブを繋ぐゴム管とコック(左)

オイルポンプと冷却トラップ(右)

↓ 200 μL of MeOH/pyridine (9:1, v/v), 50 μL of Ac₂O

↓ Room temperature, 30 min, occasionally stirring

↓ Dry *in vacuo*

↓ 100 μL of DDW

↓ Transfer to PAtion tube

↓ Lyophilize

monosaccharides

↓ 10 μL of PA-reagent (~50 μmol
2-aminopyridine) *²

↓ 90°C, 20 min

↓ Evaporate by Palstation at 60°C, 20 min
under N₂ stream

↓ 10 μL of reduction reagent *³

↓ 80°C, 35 min

↓ Evaporate by Palstation with 20 μL of MeOH and 40 μL of toluene at 50°C, 10
min under N₂ stream

↓ Evaporate by Palstation with 50 μL of toluene at 50°C, 10 min under N₂
stream, 4-times

↓ Dissolve in 0.5 mL of 0.2 M ammonia solution

↓ Load on pre-treated PBA SpinColumn *⁴

↓ c.f.g., 5,000 rpm, 2 min

↓ Wash with 0.5 mL of 0.2 M ammonia solution (10,000 rpm, 1 min)

↓ Elute with 0.5 mL of 1% AcOH (10,000 rpm, 1 min)

↓ Lyophilize

↓ 100 μL of DDW

PA-monosaccharides

↓ Borate-chelating anion-exchange HPLC

(→ 「還元末端分析」の項を参照)



Palstation (TakaraBio)

*¹ 真空ポンプで減圧にしたラインに繋ぎ、試験管をタッピングしながら蒸発乾固させる。

*² PA-reagent

┌ 100 mg 2-aminopyridine
├ 47 μl AcOH
└ 60 μl MeOH

*3 reduction reagent

10 mg $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$

170 μl AcOH

*4 Pre-treatment of PBA spin column

MonospinPBA spin column (GL Science)

↓ 0.5 mL of 1% AcOH

↓ cfg., 10,000 rpm, 1 min

↓ 0.5 mL of 0.2 M ammonia solution

↓ cfg., 10,000 rpm, 1 min

↓ Discard effluents