

糖鎖分析メソッド集
N-Glycan midi-prep

Ver. 20231018

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。mini-prep よりも多い量のサンプルを処理できる方法。チューブや装置等は mini-prep のプロトコルを参照。

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

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

↓ 1 mL of hydrazine, 100°C, 12 h

↓ evaporation *in vacuo*

ここから Dowex50 を加えて pH を下げるまでの操作を手早く行くと、エピメリ化物の生成を抑えることができる。

↓ co-evaporation *in vacuo* with 100 μ L toluene, 5 times

↓ chill on ice

↓ 1.0 mL of acetic anhydride in sat. NaHCO₃aq, chilled on ice

(50 μ l acetic anhydride + 1.25 ml sat. NaHCO₃aq, mixed in glass tube)

↓ on ice, 5 min, occasionally mixing

↓ 1.0 mL of acetic anhydride in sat. NaHCO₃aq, chilled on ice

- (50 μ l acetic anhydride + 1.25 ml sat. NaHCO₃aq, mixed in glass tube)
- ↓ on ice, 25 min, occasionally mixing
 - ↓ 5 g of Dowex 50x2 (H⁺), mix well, pH to 3
 - ↓ pour into mini-column (BioRad econo column, 1.5 x 20 cm)
 - ↓ wash the resin with 25 mL DDW
 - eluate in 50 mL recovery flask
 - ↓ concentrate with rotary evaporator
 - ↓ transfer to screw cap tube with Teflon seal, 1.3 x 10 cm
 - ↓ lyophilize
 - ↓ 100 μ L PAion reagent, 90°C, 60 min
(138 mg 2-aminopyridine + 50 μ 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
番のコツ。PAion reagent は-20°C で保存可能。
 - ↓ 350 μ L of reduction reagent, 80°C, 35 min
(250 mg Me₂NH·borane, 100 μ l AcOH, 62.5 μ l DDW)
還元試薬は要時調製する。
 - ↓ transfer to two eppen tubes
 - ↓ wash the screw cap tube with 750 μ l of DDW
 - ↓ transfer to the two eppen tubes
 - ↓ 0.5 mL/tube phenol/chloroform extraction, twice
(phenol : chloroform = 1 : 1, DDW saturated)
 - ↓ 0.5 mL/tube chloroform extraction
 - water layer (joined)
 - ↓ 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 AcONH₄, pH 6.0
70 drops / fraction, in ϕ 1 x out ϕ 2 mm PTFE tube (~2 mL)

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 μ 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% NH₃aq (~0.15 M), 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 AcONH₄, pH 7.0

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

カートリッジの前処理は以下の通り。

pre-wash with 5 mL of CH₃CN

equilibrated with 5 mL of 50 mM AcONH₄, pH 7.0

↓ wash with 5 mL of 50 mM AcONH₄, pH 7.0

↓ elute with 5 mL of 60% CH₃CN in 50 mM AcONH₄, pH 7.0

溶媒は加圧せず自然落下で行う。

↓ concentrate with Concentrator

凍るようになるまでアセトニトリルを飛ばす。

↓ lyophilize

↓ 100 μ L DDW

PA-N-glycans