

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。組織切片などの夾雜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.

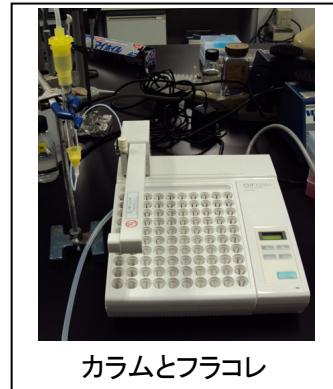
プロトコル

- 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 μ L toluene, 3 times
- ↓ chill on ice
- ↓ 210 μ L of acetic anhydride in sat.NaHCO₃aq, chilled on ice
(10 μ l acetic anhydride + 250 μ l sat.NaHCO₃aq, mixed in glass tube)
- ↓ on ice, 5 min, occasionally mixing
- ↓ 210 μ L of acetic anhydride in sat.NaHCO₃aq, chilled on ice
(10 μ l acetic anhydride + 250 μ l sat.NaHCO₃aq, mixed in glass tube)



左:ヒドラジン分解チューブ
右:PA 化用チューブ

- ↓ on ice, 25 min, occasionally mixing
- ↓ 1 g of Dowex 50x2 (H^+), 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 μL 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 μL PAtion reagent, 90°C, 60 min
(138 mg 2-aminopyridine + 50 μl 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。
- ↓ 70 μL of reduction reagent, 80°C, 35 min
(50 mg $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{borane}$, 20 μl AcOH, 12.5 μl DDW)
- ↓ 150 μL of DDW
必ず有機溶媒よりも先に DDW を加える。
- ↓ 200 μL phenol/chloroform extraction, twice
(phenol : chloroform = 1 : 1, DDW saturated)
- ↓ 200 μL 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_4 , pH 6.0
70 drops / fraction, in $\phi 1 \times \text{out } \phi 2$ 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 μL 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_3aq , 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。



カラムとフラコレ

↓ lyophilize
↓ 1 mL of 50 mM AcONH₄, pH 7.0
↓ load to graphite carbon cartridge (GL-Pak Carbograph, 300mg)
 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 by Concentrator
 凍るようになるまでアセトニトリルを飛ばす。
↓ lyophilize
↓ 100 □L DDW
PA-*N*-glycans