

糖鎖分析メソッド集
糖鎖マップ作成のためのHPLC条件

Ver. 20180111

By S. Natsuka

方法の概要

PA化糖を分離するためのHPLC条件。2次元マップの作成にはこの条件を用いる。

この方法を使った時に引用すべき論文

Ken Hanzawa, Noriko Suzuki, Shunji Natsuka. Structures and developmental alterations of *N*-glycans of zebrafish embryos. *Glycobiology*, **27** (3) 228-245 (2017).

1. 陰イオン交換HPLC

用途：シアル酸などによる酸性度でPA-糖鎖を分離する。組織や細胞などの糖鎖マップを作る際には、サイズと逆相HPLCに先立って必ず行う。不純物を除く目的を併せ持っている*1。

Column：東ソーTSKgel DEAE-5PW, 0.75 x 7.5 cm

Solvent A：DDW, pH 9 by diluted NH₃aq

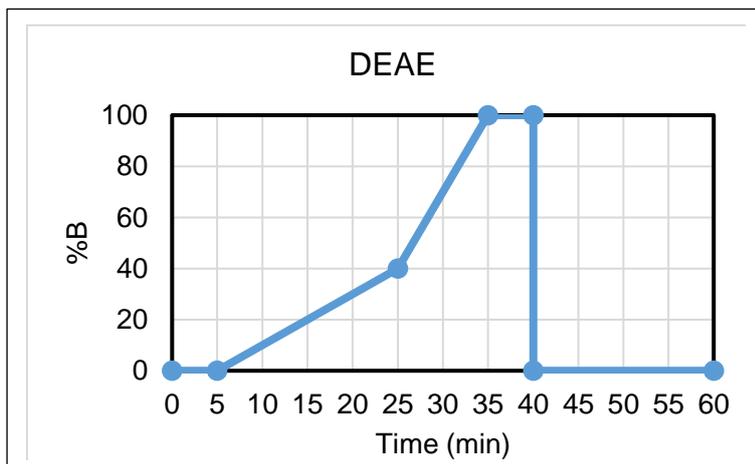
Solvent B：0.5 M 酢酸アンモニウム, pH9.0*2

Flow rate：1.0 mL/min

Excitation / Emission：310/380 nm*3

Standard：α1-acid glycoprotein, human plasma (Sigma, G9885)から調製したPA-糖鎖

Gradient：



*1 中性とモノシアロ糖鎖の間に不純物の一部が溶出する。

*2 溶離液の試薬はできるだけHPLCグレードか精密分析用グレードのものを用いる。特に水の純度は重要で、カラムの耐久時間にも大きく影響する。著者らは、イオン交換の後2回ガラス蒸留した蒸留水をさらに超純水装置に通して用いている。

*3 蛍光波長はpH依存性である。PA化糖鎖の場合、pHが6以上の時には310/380 nmを6より小さいときには315/400 nmを使用している。

2. Size-fractionation HPLC

用途：水素結合により、糖鎖の分子サイズで分画する。糖鎖マップを作る際には、時間短縮のため短いカラムで分画する。

Column：東ソーTSKgel Amide-80, 0.46 x 7.5 cm（特注品#7137）

Solvent A：アセトニトリル

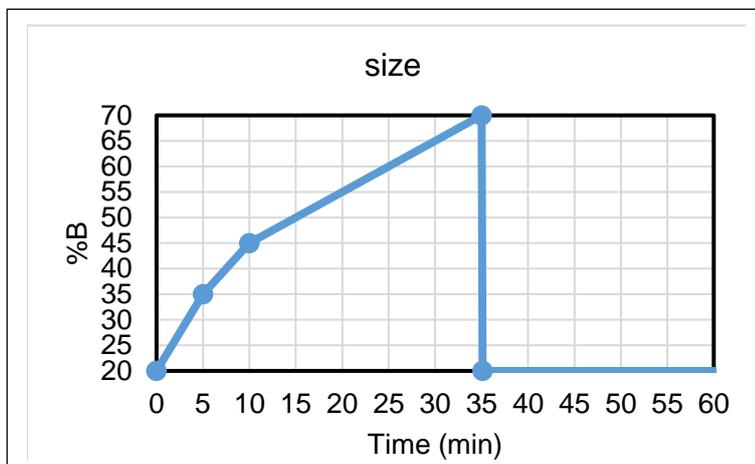
Solvent B：50 mM ギ酸アンモニウム, pH 4.4

Flow rate：0.5 mL/min

Excitation / Emission：315 / 400 nm

Standard：イソマルトオリゴ糖の混合物をPA化したもの。（「グルコースユニットへの変換法」を参照）

Gradient：



3. Reversed phase HPLC

3-1. 2次元糖鎖マップ用

用途：主として疎水相互作用によりアイソマーを分離する。使用しているカラムは、他の逆相カラムよりも特にハイマンノース型糖鎖の分離が優れている。シラノール基がキャップされていないので、親水性の相互作用による分離も加味されているためと考えられる。

Column：ナカライテスクCosmosil 5C18-P, 0.2 x 25 cm

Solvent A：50 mM 酢酸トリエチルアミン, pH 4.0

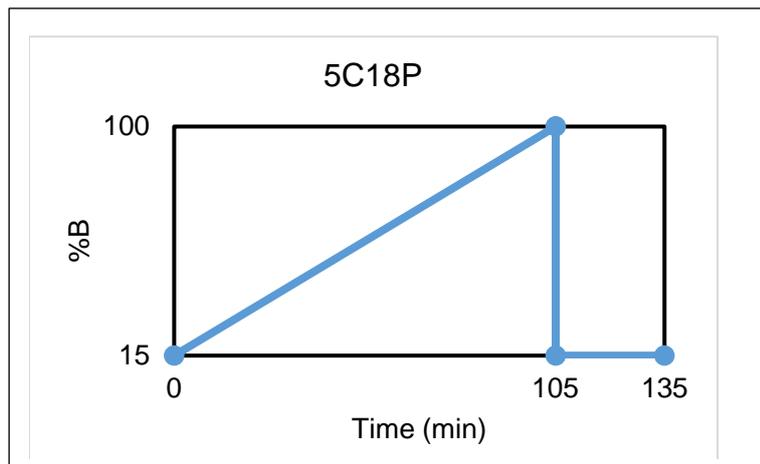
Solvent B：50 mM酢酸トリエチルアミン, pH 4.0 + 0.5% 1-ブタノール^{*4}

Flow rate：0.2 mL/min

Excitation / Emission：315/400 nm

Standard：逆相スケールスタンダード（「逆相スケールへの変換法」を参照）

Gradient :



*4 1-ブタノールには和光純薬社製の分光分析用グレードを用いる。

3-2. LC-MS 用

用途 : MS とつないでポジティブモードで分析する場合、アンモニアや TEA を溶離液に使用するとそれらのアダクトとして検出されるので感度が下がると共に解析が複雑になる。そこで溶離液に塩基を加えない条件で分析する。

Column : GLサイエンス InertSustain AQ-C18, 3 μ m, 0.21 x 15 cm

Solvent A : 0.2% ギ酸^{*5}

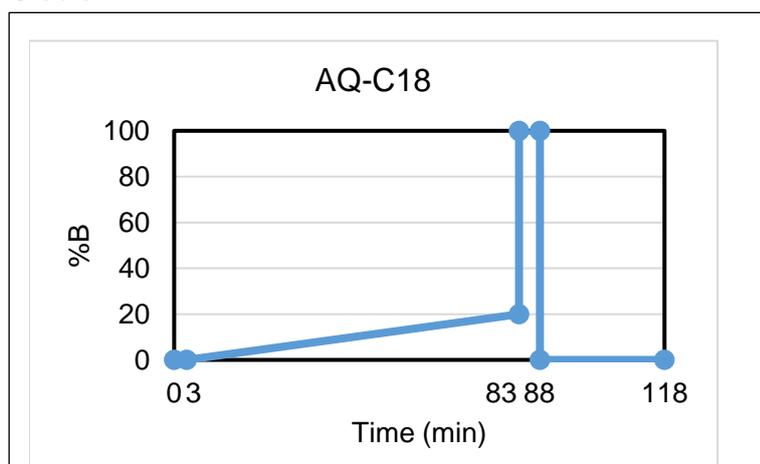
Solvent B : 20% アセトニトリル in 0.2% ギ酸

Flow rate : 0.2 mL/min

Excitation / Emission : 315/400 nm

Standard : イソマルトオリゴ糖の混合物をPA化したもの。(「グルコースユニットへの変換法」を参照)

Gradient :



*5 質量分析では HPLC 分析以上に水の純度が重要である。特に水道水由来のシロキサンの混入が MS 分析に大きく影響する。著者らは、*2 の方法で作った超純水を一昼夜以上超純水製造装置で循環させてシロキサンを除去した水を分析に用いている。