

研究用

TaKaRa

Pyridylamination Manual Kit

説明書

本キットは、特別な PA 化装置を用いずに糖鎖を 2-アミノピリジンにより蛍光標識 (PA 化) するためのキットです。

糖鎖の還元末端残基に 2-アミノピリジンを還元アミノ化反応で結合させ、糖鎖を安定な蛍光誘導体 (PA-糖鎖) に誘導化します。(下図参照)

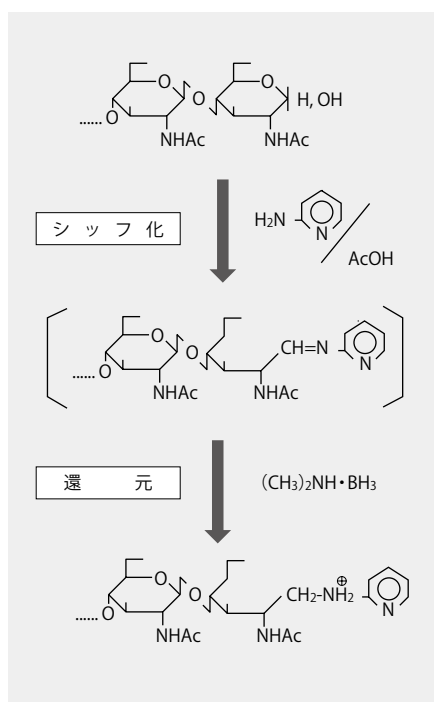
PA 化反応後、Cellulose Cartridge によるカラムクロマトグラフィーにより、PALSTATION や *GlycoTAG* などの専用機器によるエバポレーション法に劣らない効率で過剰試薬を除去し、PA 化糖鎖を回収することができます。

本キットにて得られた PA-糖鎖は蛍光基を有するので、HPLC による高感度分析が可能となります。

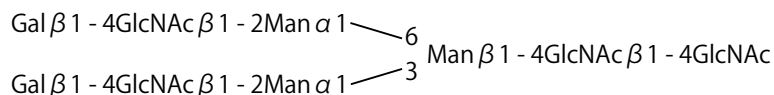
(注意) PA 化の反応効率及び Cellulose Cartridge からの回収効率は糖鎖の構造により異なります。

本キットは、二本鎖複合型 *N*-Glycan (本キットにコントロールとして添付※) について至適化しています。目的の糖鎖の構造、特に、還元末端糖残基の種類と糖鎖の分子量がコントロールと大きく異なる場合などは、あらかじめ予備実験を行い、条件を至適化することをお勧めします。本キットは、単糖の PA 化には適していません。

<糖鎖の PA 化反応>



※ 本キット添付の Biantennary sugan chain の構造



I. キットの内容 (20 反応分、但しコントロール用反応を含む)

[Package 1]

(1) 2-Aminopyridine	300 mg	2 本
(2) Borane-dimethylamine complex	100 mg	2 本
(3) Acetic acid	3 ml	1 本
(4) Biantennary sugar chain	500 pmol/50 μ l	1 本
(5) PA-Biantennary sugar chain	100 pmol/100 μ l	1 本

[Package 2]

(6) Cellulose Cartridge Column	0.5 ml	20 本
(7) Adaptor		1 個
(8) Syringe	10 ml	3 本

II. 保存

(1) ~ (5) (Package 1) ; - 20°C

(6) ~ (8) (Package 2) ; 室温

※ 適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。

III. キット以外に必要な試薬

• Butanol	特級以上	約 500 ml
• Ethanol	特級以上	約 500 ml
• Acetic acid	特級以上	約 3 ml
• Ammonium bicarbonate	75 mM 水溶液	約 500 ml
• 純水		

IV. 使用方法

A : PA 化反応

【準備】

エアオープン或いは水浴を 80°C にセットしておきます。(ヒートブロックでも可能ですが、温度が安定せずあまり良い結果が得られません。)

【試薬の調製】

• カップリング試薬

試薬 (1) (300 mg 入り) のバイアルに試薬 (3) を 100 μ l 注入し、時々 80°C で加熱しながら、十分にボルテックスを行い均一に溶解する。調製後、試薬量は約 250 μ l になる。

(注 1) 試薬 (1) はバイアル 1 本で 10 回反応分です。調製後は、密栓のできるプラスチックチューブなどに移して密閉し、- 20°C にて保存してください。調製後は 3 ヶ月以内にお使いください。

(注 2) カップリング試薬は常温以下では凝固する場合がありますので注意してください。また、粘度が高いため適宜加熱しながら攪拌すると比較的容易に攪拌できます。

・還元試薬

還元試薬は、プラスチックチューブに試薬 (2) を 20 mg 秤量し、試薬 (3) を 100 μ l 加えて均一に溶解し調製する。

(注 3) 試薬 (2) は吸湿性なので、秤量時には、まず試薬瓶を室温に戻した後に湿度の低い場所にて秤量してください。秤量はすばやく行い、秤量後は蓋をしっかりと閉め、パラフィルムなどで覆ってください。

(注 4) 還元試薬は用時調製です。調製したその日のうちに使用してください。

【反応】

1. 糖鎖試料 (50 pmol ~ 50 nmol) をスクリーキャップ付 1.5 ml プラスチックチューブに入れ、凍結乾燥或いは濃縮遠心などにより十分乾燥させる。

(注 5) 糖鎖試料は、塩類、タンパク質、脂質などを極力除去したものをご用意ください。標識前の糖鎖の精製には、Cellulose Cartridge Glycan Preparation Kit (製品コード 4403) による精製や、ゲルろ過などのカラムクロマトグラフィーを行うのが一般的です。

2. 試料にカップリング試薬を 20 μ l 添加し、良く攪拌後、80℃にて 1.5 時間反応する。

(注 6) 水浴を用いて加熱する場合には、蓋の周囲をパラフィルムやテフロンシールでしっかりと覆い、反応系に水分が入り込まないように注意してください。また、反応後は外壁の水分を十分にふき取ってから蓋を開けてください。

3. 反応液に還元試薬を 20 μ l 添加し、良く攪拌後、80℃にて 1 時間反応する。

4. 反応後速やかに PA 化糖鎖の精製を行う。

(注 7) すぐに精製を行わない場合は、反応液を - 20℃以下にて保存し、1 週間以内に精製を行ってください。

B : PA 化糖鎖の精製 (操作は室温 (20℃ ~ 25℃) で行ってください)

【準備】PA 化糖鎖精製用の溶媒の作製

溶媒 1 : Butanol/Ethanol/Water/Acetic acid, 4 : 1 : 0.97 : 0.03 (容量比)

溶媒 2 : Ethanol/75 mM Ammonium Bicarbonate, 1 : 2 (容量比)

(注 1) 一回の精製に溶媒 1 を約 25 ml、溶媒 2 を約 15 ml 使用します。

(注 2) 溶媒は用時調製してください。保存する場合には、密栓できる容器中で高温を避けて保存し、1 週間以内に使用してください。

【精製】

1. カートリッジの前処理

- カートリッジにアダプターを装着する。
- シリンジに精製水を 10 ml 吸入しアダプターに装着してカートリッジを洗浄する (送液は毎秒 2 ~ 5 滴ぐらい)。この操作を少なくとも 3 回繰り返す。最後はシリンジで空気を送りカートリッジ内の精製水を押し出す。
- シリンジに溶媒 2 を 10 ml 吸入しアダプターに装着してカートリッジを洗浄する (送液は毎秒 2 ~ 5 滴ぐらい)。最後はシリンジで空気を送りカートリッジ内の溶媒を押し出す。
- シリンジに溶媒 1 を 10 ml 吸入しアダプターに装着してカートリッジを平衡化する (送液は毎秒 2 ~ 5 滴ぐらい)。最後はカートリッジ充填剤の上端に溶媒がわずかに残った状態にする。

2. 試料溶液の調製

- a) 反応液 (40 μ l) に溶媒 1 を 1 ml を添加し、十分に攪拌する。試料溶液の遠心操作は行わないこと。

(注 3) タンパク質等の沈殿が生じる場合がありますが遠心分離などせず懸濁液のままカラムにアプライしてください。

(注 4) 攪拌した試料溶液が明らかに 2 層分離している場合、溶媒 1 で試料溶液を希釈することで均一化できる場合がありますが、溶媒 1 を 5 ml 添加しても 2 層分離する場合は糖鎖以外の夾雑物、特に塩類の濃度がかなり高く、PA 化反応がきちんとできていない可能性があります。その場合は、再乾固後、ゲルろ過による脱塩を行い、再度 PA 化反応を行うことをお勧めします。

3. 試料溶液のアプライ

- a) 試料溶液を十分に攪拌し、アダプターをはずしたカートリッジシリンダー内に注入する。

- b) アダプター、空気を吸入したシリンジの順に装着し、試料溶液をシリンジの空気でゆっくりと押し出す (毎秒 1 滴)。カートリッジが涸れないように注意しながら試料溶液が充填剤の上端ぎりぎりになったところで止める。

(注 5) カラムからの溶出液は、念のために分析結果が出るまで捨てずにプラスチックチューブなどに回収してください。下記 4 の洗浄液についても同様です。

- c) 反応チューブを 1 ml の溶媒 1 で洗いこみ、カートリッジシリンダー内に注入し、上記 b 項の要領で液をカラムに通す。

4. カートリッジの洗浄シリンジに溶媒 1 を 10 ml 吸入し、アダプターに装着して途中カートリッジが涸れないように注意しながらカートリッジを洗浄する (送液は毎秒 1 滴ぐらい)。最後にシリンジで空気を 2 ml 程度送りカートリッジ内の溶媒を押し出す。

(注 6) サンプル溶液量が標準の液量を超える場合、サンプル溶液と洗浄液 (溶媒 1) の総和が 12 ml になるように洗浄液量を調整してください。

5. 糖鎖の溶出

- a) アダプターをはずし、カートリッジ内に溶媒 2 を 2 ml 注入する。

- b) アダプター、空気を吸入したシリンジの順に装着し、シリンダー内の溶媒をシリンジの空気でゆっくりと押し出し (毎秒 1 滴)、溶出液を 1.5 ml プラスチックチューブ (1 ml ずつ 2 本に分ける) または 5 ml 程度の試験管等で回収する。最後は空気でカートリッジ内の溶媒を押し出す。

- c) 溶出液は遠心濃縮器等を用いて乾固し、HPLC 分析に供する。

(注 7) PA 化糖鎖の HPLC 分析については、弊社ウェブカタログの製品ページ_技術情報をご参照ください。

(注 8) このカートリッジは使い捨てです。

V. コントロール実験

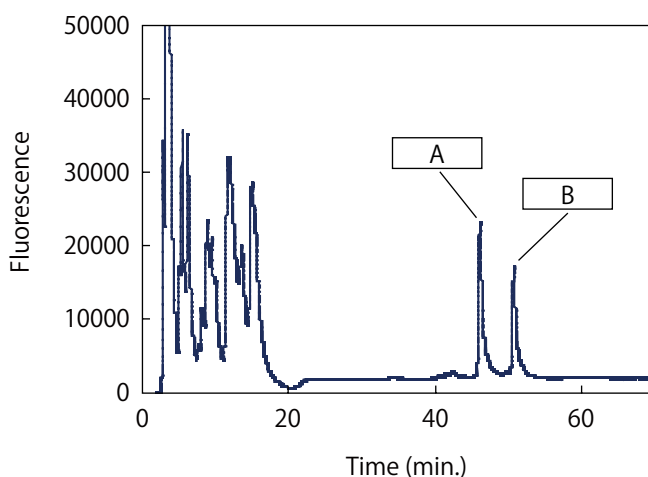
試薬 (4) Biantennary Sugar Chain を 10 μ l (100 pmol) とり、上記のとおり PA 化反応、PA 化糖鎖精製を行ないます。得られた PA 化糖鎖を HPLC にて分析し、試薬 (5) PA-Biantennary Sugar Chain と比較して PA 化収率をチェック確認します。(注) 本キットは、コントロール反応を含めて 20 回反応分です。コントロール実験の回数分だけサンプル反応回数が減少しますのでご了解ください。

■ Pyridylation Manual Kit を使用して PA 化した糖鎖の HPLC 分析例

【方法】

本キットを用いて PA 化を行った Biantennary Sugar Chain を十分乾燥させた後に、100 μ l の蒸留水を加えて溶解し、そのうちの 5 μ l に内部標準物質 PA-Sugar Chain 003 (製品コード 4103) 5 μ l (5 pmol) を加えて HPLC で分析を行った。

【分析結果】



A : PA 化 Biantennary sugar chain (Biantennary Sugar Chain を本キットで PA 化したもの)

B : 内部標準物質 PA-Sugar Chain 003 (製品コード 4103) *

* : 本キットには含まれていません。

HPLC 条件

Column : TSKgel Amide-80 (4.6 $\times$ 250) (東ソー社製)

Solvent A : 500 mM Acetic acid-Triethylamine (pH7.3) /CH₃CN/H₂O (10/75/15)

Solvent B : 500 mM Acetic acid-Triethylamine (pH7.3) /CH₃CN/H₂O (10/50/40)

Gradient : 0% B for 15 min., and then 0 - 100% B/50 min.

Flow rate : 1 ml/min.

Column temperature : 40°C

Fluorescence : Ex. (310 nm), Em. (380 nm)

VI. Q&A

- Q1. 本キットで、オリゴ糖を PA 化したい。何糖から使えますか？
- A1. 本製品の場合、PA 化後の残留試薬の除去に Cellulose Cartridge Column を用いていますが、このカラムでは、3～4 糖以上の糖鎖を回収することができます。ただし、3 糖の場合は、約 30% 回収率が低下します。効率よく PA 化ができるのは、4 糖以上になります。
単糖、二糖の場合はほとんどがカラムの洗浄画分に出てくるため、残留試薬と分けることができず、精製することができませんので、単糖や二糖の PA 化にはお勧めできません。
- Q2. キットに含まれる PA-Biantennary sugar chain は別売していますか？溶媒は何ですか？
- A2. PA Sugar Chain 001（製品コード 4101）と同じ糖鎖です。溶媒は、蒸留水です。
- Q3. 調製した PA 化糖は、乾固した状態でどれくらい保存できますか？
- A3. 室温で約 1 ヶ月は安定です。長期保存の場合は、－20℃で保存してください。
- Q4. 糖タンパク質でも PA 化できますか？
- A4. 糖タンパク質のままでは PA 化できません。ヒドラジン分解などで糖鎖だけを分離してから PA 化を行ってください。
- Q5. キットに含まれるコントロールの糖鎖を用いても反応がうまくいかない。
- A5. 以下の点を確認して、再度お試しください。
- ・糖鎖サンプルをは凍結乾燥或いは濃縮遠心などにより十分乾燥して完全に水分を飛ばしてください。
 - ・カップリング試薬を溶解する際は、80℃で加温しながら完全に溶解してください。湯浴での溶解では不十分な場合は、ドライヤーなどで十分に加温して溶解してください。
 - ・還元試薬は必ず当日調製したフレッシュなものを使用してください。水分が入らないように十分注意してください。
- Q6. 糖鎖サンプルによってうまくいく時といかない時があり、結果がばらつく。
- A6. サンプルの純度が大事です。サンプル中に塩類、水分が含まれないように十分気をつけてください。PA 化前の糖鎖を Cellulose Cartridge Glycan preparation Kit（製品コード 4403/4404）で精製するのも有効です。高分子の糖ならゲルろ過、低分子糖でチャージが無ければ両イオン交換などの精製法がありますので、それぞれ適した方法で純度の高いサンプルを用意してください。
- Q7. HPLC 解析の際に、残留試薬のピークと目的のピークが重なり、うまく分離できない。
- A7. マニュアルで PA 化する本キットでは、どうしても残留試薬は完全に除去できません。通常は HPLC の初期に残留試薬のピークがでるため、目的の糖鎖とのピークは分離できるはずですが、どうしてもサンプルのピークと重なる場合は、HPLC の溶出条件を検討してください。

VII. 参考文献

- 1) Kondo, A., *et al.* (1990) *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2169.
- 2) 高橋禮子 (1990) 糖質 I・糖タンパク質 (上)、新生化学実験講座 3、日本生化学会編 (東京化学同人) 129.
- 3) Ohara, K., *et al.* (1991) *J. Chromatogr.* **586**, 35.
- 4) 高崎誠一 (1991) 糖質 I・糖タンパク質 (上)、新生化学実験講座 3、日本生化学会編 (東京化学同人) 95.
- 5) 清水佳隆、黒田泰弘、堤文彦、中田宗宏、水落次男 (1997)「セルロースカラムを用いた糖蛋白質糖鎖の高純度大量精製」第 70 回日本生化学大会発表抄録集 p913

VIII. 注意

- ・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

Takara テクニカルサポートライン

Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社