

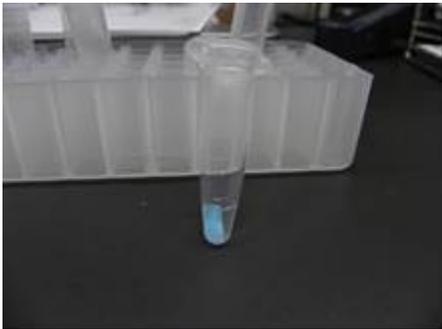
○結合型糖鎖の分析プロトコール

I. 還元β脱離

1. 染色されたバンドを SMME 膜から切りとり、500- μ L のサンプルチューブに入れる。



2. 切り取ったバンドを少量のメタノールで湿らせ、苛性ソーダ水溶液に溶解した水素化ホウ素ナトリウム溶液(500 mM NaBH₄ in 50 mM NaOH)の 40 μ L を添加し、45 °C にて 16 時間インキュベートする。



3. 氷酢酸を少しずつ添加し、反応液を中和すると同時に水素化ホウ素ナトリウムを分解する。(注意：酸を加えると激しく水素ガスが発生)
4. 陽イオン交換固相抽出カートリッジ(Oasis MCX, 3 mL, Waters, Milford, MA, USA)に反応液全量をアプライし、サンプルチューブとカートリッジを 500 μ L の蒸留水で 2 回洗浄する。流出液と洗浄液を合わせて 1.5-mL のサンプルチューブに回収し、遠心エバポレーターで濃縮乾固する。



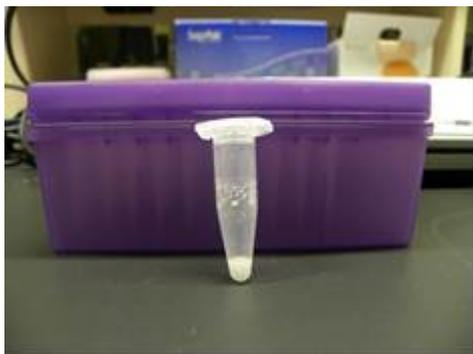
5. 1% (v/v)の酢酸を含むメタノール 100 μL をチューブに加え残渣を溶解させる。遠心エバポレーターにて濃縮乾固する。この操作を 2 回繰り返す。

II. 完全メチル化

6. 少量の水酸化ナトリウム(顆粒)をディスパーザブルのホモジナイザー(BioMasher II, Nippi Inc., Tokyo, Japan)に計りとり、80 mg/mL の濃度になるよう、1% (v/v)の蒸留水を含むジメチルスルホキシドを加える。その後、ペッスルで水酸化ナトリウムをすりつぶし泥状物にする。



7. 泥状物(50 μL)を操作 5 で得られたチューブの中に加える。
8. ドラフト内で、ヨウ化メチル (12.5 μL) をガラスキャピラリー (例 : ringcaps, Hirschmann GmbH & Co. Eberstadt, Germany)を用いてスラリーの入ったチューブに添加する。チューブに蓋をして激しく 30 分間室温にて攪拌する。白色のヨウ化ナトリウムが沈殿する。



9. チューブを氷浴上に置き、10%酢酸を 50 μ L 加える。さらに、蒸留水にて 1 mL まで希釈する。
10. 固相抽出カートリッジ SepPak-C18 cartridge (50 mg, syringe type: 1 mL, Waters, Milford, MA, USA) に希釈した溶液をアプライし、蒸留水(2 mL)にて洗浄する。
11. ドラフト内で、エアープンプを用いて、固相抽出カートリッジに空気を流して乾かす。



12. メタノール(50 μ L)を固相抽出カートリッジに添加し浸み込ませた後、50%アセトニトリル(1 mL)を用いて溶出し、新しい 1.5-mL のサンプルチューブに回収する。遠心エバポレーターで濃縮乾固する。

III. 質量分析

13. 20 μ L の 50%アセトニトリルを濃縮乾固したチューブに加え、試料を溶解する。

14. 0.5 μ L の 2,5-ジヒドロキシ安息香酸(2,5-DHB)溶液(10mg/mL in 30% ethanol)を MALDI ターゲットプレートに滴下し、自然乾燥させる。操作 13 で作成した試料溶液 0.5 μ L を乾燥した 2,5-DHB のスポットの上に滴下し、再度、自然乾燥させる。
15. 質量分析スペクトルを測定する。糖鎖は、対応するアルジトールの完全メチル化体のナトリウム付加イオンとして検出される。

参考論文

Supported molecular matrix electrophoresis: a new tool for characterization of glycoproteins.
Matsuno YK1, Saito T, Gotoh M, Narimatsu H, Kameyama A.
Anal Chem. 2009 May 15;81(10):3816-23. doi: 10.1021/ac900157c.

A Procedure for Alcian Blue Staining of Mucins on Polyvinylidene Difluoride Membranes
Weijie Dong, Yu-ki Matsuno, and Akihiko Kameyama*
Anal Chem. 2012 Oct 16;84(20):8461-6. doi: 10.1021/ac301678z.

参考資料

完全メチル化のプロトコール: JCGGDB の糖鎖実験プロトコール「完全メチル化」
<http://icggdb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t131>



〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)
TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620

● 札幌事業部 (技術的なお問い合わせ)
TEL : (0134) 61-2301 FAX : (0134) 61-2295
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp
URL : <http://www.primarycell.com/>