

Application News

No. B79

MALDI-TOF 質量分析法

バイオ医薬品中の糖鎖評価法の検討 2 – N-glycan 分析に必要な前処理の検討 –

タンパク質性のバイオ医薬品の多くは真核生物由来の培養細胞で生合成されます。そのため、合成されたタンパク質はほとんどの場合、糖鎖が結合した糖タンパク質として存在します。この糖タンパク質に結合している糖鎖は主に N 結合型糖鎖 (N-glycan) と O 結合型糖鎖 (O-glycan) に大別され、それぞれ多様で複雑な分岐構造を持っています。

糖鎖の構造は糖タンパク質の機能や安定性に影響を与えることが知られています。そのため培養環境の変化などにより、合成した糖タンパク質に結合している糖鎖の構造が変化してしまうと、糖タンパク質自身の機能や安定性に想定外の変化が起こってしまう可能性があります。このような可能性は、特にバイオ医薬品の開発・製造においては重大な問題に繋がりがかねないため、糖鎖構造が変化しているか否かをモニターすることが品質を管理する上で重要な項目となります。

糖鎖構造の変化を正しく分析・評価するためには、本来の糖鎖構造がしっかりと把握されている必要がありますが、糖鎖分析では前処理方法が様々に存在する上、標準化もされていないため、同じ糖タンパク質であっても前処理方法の違いにより糖鎖分析の結果が異なってしまう可能性があります。

本稿では、N-glycan 分析の際に広く用いられている前処理方法のいくつかを比較し、それらが分析結果にどのような影響をおよぼすのかを検討した結果を報告します。

S. Nakaya

糖タンパク質からの N-glycan 切り出し

前処理法の比較検討に用いる糖タンパク質には、市販の IgG と RNase B および α 1-Acid Glycoprotein の 3 種類を用いました。まず、各サンプルを PD-10 カラム (GE ヘルスケア) により脱塩して凍結乾燥後、10 mg/mL となるように水に再溶解したものを 5 μ L 量り取りました。これに 200 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2, 2.5 μ L)、5% SDS 溶液 (1.25 μ L)、0.5 M DTT 溶液 (1.25 μ L)、水 (6 μ L) を加えてよく攪拌し、65 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱して糖タンパク質を変性させました。その後、サンプル溶液を氷冷してから 5% NP-40 溶液 (5 μ L) を加えて攪拌し、さらに PNGaseF (0.5 mU/ μ L, 4 μ L, Takara Bio) を加えて 37 $^{\circ}$ C で 18 時間反応させ、糖タンパク質から N-glycan を切り出しました。

遊離 N-glycan 精製法の比較

N-glycan の切り出し処理を行った反応溶液には、使用した酵素の他に緩衝液成分やその他の低分子化合物 (SDS や DTT) といった夾雑物が含まれており、通常はこれらの夾雑物を取り除く処理が必要とされます。そこで本実験では、現在主に用いられている遊離糖鎖精製法として、1. 逆相系固相抽出法、2. カーボングラファイト固相抽出法、3. 限外ろ過法、4. エタノール沈殿法、5. 処理なし、を比較しました。各精製法での処理手順は表 1~5 に示しました。

表 1 逆相系固相抽出での精製手順

Step	処理内容
1	Oasis [®] HLB 1cc あるいは Supel select HLB 1cc にメタノール (1 mL)、水 (1 mL) を通す。
2	反応溶液 (25 μ L) に水 (200 μ L) を加えてよく攪拌する。
3	2 の溶液をカラムに注入する。
4	反応溶液を入れていたチューブを 10%メタノール (200 μ L) で洗いこみ、この溶液をカラムに注入。カラムから排出された溶液は回収する。
5	4 の作業を繰り返す。
6	10%メタノール (500 μ L) をカラムに注入する。
7	カラムから溶液を全て排出して回収する。
8	4~7 の処理で回収した溶液を全て合わせ、室温で減圧乾固する。

表 2 カーボングラファイト固相抽出での精製手順

Step	処理内容
1	Supelclean ENVI-Carb SPE bed wt.100 mg にアセトニトリル (1 mL)、水 (3 mL) を通す。
2	反応溶液 (25 μ L) をカラムに注入する。
3	反応溶液を入れていたチューブを水 (1 mL) で洗いこみ、この溶液をカラムに注入。
4	水 (2 mL) をカラムに通す。
5	カラム出口に 0.22 μ m マイレクス-LG フィルターを装着する。
6	20 mM 酢酸トリエチルアミンを含む 50%アセトニトリル (1 mL) で糖鎖を溶出する。
7	溶出した糖鎖溶液を室温で減圧乾固する。

表3 限外ろ過での精製手順

Step	処理内容
1	水 (0.5 mL) をリザーバー [Protein Concentrators PES、10K MWCO、0.5 mL (RNaseB、 α 1-Acid Glycoprotein 用) または 30K MWCO、0.5 mL (IgG 用)] に加え、15,000×g で 10 分間遠心してろ過膜を洗浄する。
2	通過した溶液とリザーバーに残った溶液を全て捨てる。
3	水 (400 μ L) をリザーバーに加え、反応溶液 (25 μ L) をさらに加える。
4	反応溶液を入れていたチューブを水 (100 μ L) で洗いこみ、この溶液をリザーバーに加える。
5	15,000×g で 15 分間遠心し、膜を通過した溶液を回収する。
6	水 (200 μ L) をリザーバーに加え、15,000×g で 15 分間遠心し、膜を通過した溶液を回収する。
7	水 (200 μ L) をリザーバーに加え、15,000×g で 10 分間遠心し、膜を通過した溶液を回収する。
8	5~7 の処理で回収した溶液をすべて合わせ、室温で減圧乾固する。

表4 エタノール沈殿での精製手順

Step	処理内容
1	エタノールを-20℃で冷却しておく。
2	反応溶液 (25 μ L) に冷エタノール (3 倍量) を加えて軽く攪拌した後、-20℃で3時間放置する。
3	15,000×g で 10 分間遠心し、上清を回収する。
4	回収溶液を室温で減圧乾固する。

表5 精製処理なし

Step	処理内容
1	反応溶液 (25 μ L) を室温で減圧乾固する。

表1~5に示した各手順で処理した遊離 *N*-glycan に、糖鎖標識試薬溶液を加えて蛍光標識を行いました。標識試薬溶液には、まず 15 mg の 2-Aminobenzamide (2-AB, Sigma-Aldrich) に 300 μ L のジメチルスルホキシド/酢酸 (7:3) 溶液を加え、この溶液 200 μ L を 12 mg のシアノ水素化ホウ酸ナトリウムに加えてよく攪拌したものを使用しました。標識反応では、乾固した糖鎖試料に標識試薬溶液 (5 μ L) を加えて 37℃で 18 時間の反応を行いました。

2-AB 標識した *N*-glycan は、表6に示す手順で固相抽出による精製を行った後、50 μ L の 50%アセトニトリル水溶液を加えて再溶解したものを分析サンプルとしました。分析には MALDI-TOF MS および LC を用いました。

表6 親水性相互作用固相抽出による 2-AB 標識 *N*-glycan 精製手順

Step	処理内容
1	Oasis® HLB 1cc に 95%アセトニトリル (1 mL) を通す。
2	反応溶液 (5 μ L) にアセトニトリル (95 μ L) を加えてよく攪拌してカラムに注入。
3	反応溶液を入れていたチューブを 95%アセトニトリル (0.5 mL) で洗いこみ、この溶液をカラムに注入。
4	95%アセトニトリル (2 mL) をカラムに通す。
5	20%アセトニトリル (0.5 mL) をカラムに通し、2-AB 標識 <i>N</i> -glycan を溶出する。
6	溶出溶液を室温で減圧乾固する。

■ 各種遊離糖鎖精製法で得られた 2-AB 標識 *N*-glycan の MALDI-TOF MS 分析

分析サンプル溶液 (0.5 μ L) を MALDI ターゲットプレートに搭載しました。さらに、搭載したサンプル溶液の上に 0.5 μ L の MALDI 用マトリックス溶液を重層して乾燥させた後、卓上型 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” (図1) を用いて測定しました。尚、MALDI 用マトリックスには 5 mg 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB, Shimadzu GLC) を 50%アセトニトリル/0.05%TFA 水溶液 (500 μ L) に溶解したものを使用しました。



図1 卓上型 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” 外観

各前処理を行った IgG を測定したところ、逆相系固相抽出処理および限外ろ過処理を行った場合には 2-AB 標識 *N*-glycan が Na⁺アダクトイオンとして検出されましたが、カーボングラファイト固相抽出処理やエタノール沈殿処理を行った場合には、標識された *N*-glycan だけでなく、還元末端がアミノ化されている未標識 *N*-glycan も強く検出されました。尚、遊離糖鎖の精製処理を行わなかったものについては、検出されたイオンは 2-AB 標識 *N*-glycan ですが、H⁺アダクトイオンが主要イオンでした (図2)。

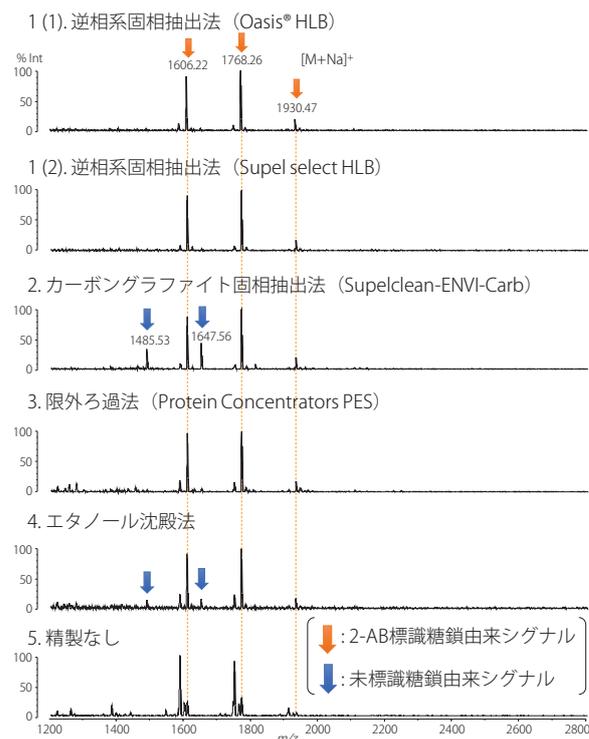


図2 IgG 由来 *N*-glycan の MALDI-TOF マススペクトル

RNaseB についても、IgG と同様にカーボングラファイト固相抽出とエタノール沈殿処理の場合に未標識糖鎖のイオンが強く検出されました (図3)。

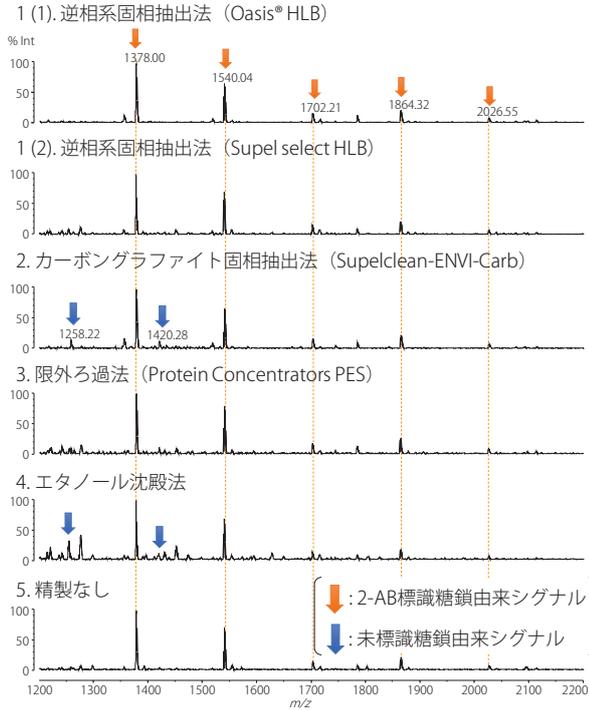


図3 RNaseB由来 N-glycanのMALDI-TOFマスペクトル

α 1-Acid Glycoprotein では、未標識糖鎖のシグナルは確認できませんでしたが、限外ろ過処理のみでシアル酸が結合している3本鎖 N-glycan の相対的イオン強度が弱くなりました。また、シアル酸のカルボキシル基の-OHが-ONaに置換したと考えられる22 mass 違いのシグナルが多数検出されました (図4)。

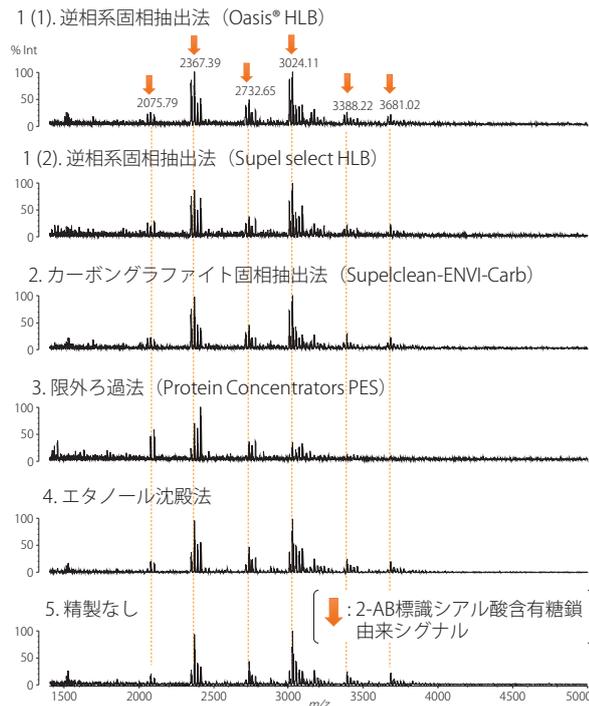


図4 α 1-Acid Glycoprotein由来 N-glycanのMALDI-TOFマスペクトル

■ 各種遊離糖鎖精製法で得られた2-AB標識 N-glycanのLC分析

各分析サンプル溶液を2 μ L ずつ使用し、HILIC-amide カラムを用いて表7に示す条件でLC分析を行いました。

表7 遊離糖鎖精製法比較でのLC分析条件

Instrument	: Nexera™ X2
Column	: TSKgel® Amide-80, 2.0 μ m 150 mm L 2 mm I.D. (東ソー)
Mobile phase A	: 100 mM Ammonium formate (pH 4.5)
Mobile phase B	: Acetonitrile
Total flow rate	: 0.25 mL/min
Concentration of mobile phase B	: 0~2 min: 75%, 2~50 min: 75→50%
Column temp.	: 45 °C
Detection	: Fluorescence (Ex 330 nm, Em 420 nm)

LC分析の結果、IgG、RNaseBにおいては各前処理間でクロマトグラムの大きな違いは見られませんが、シアル酸を複数含む α 1-Acid Glycoproteinでのみ限外ろ過処理サンプルで他の処理法と大きく異なるクロマトグラムが得られました。各前処理法それぞれで得られたクロマトグラムピークの面積を比較したグラフを図5~7に示しました。

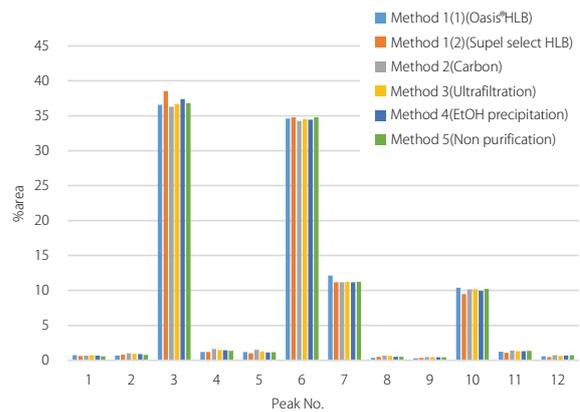
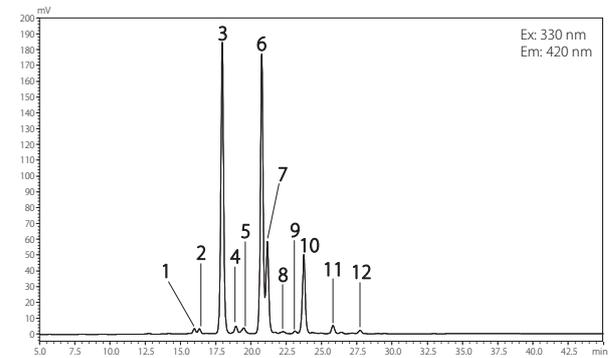


図5 IgG由来 N-glycanの蛍光クロマトグラム例(上)と各遊離糖鎖精製法のピーク面積比較(下)

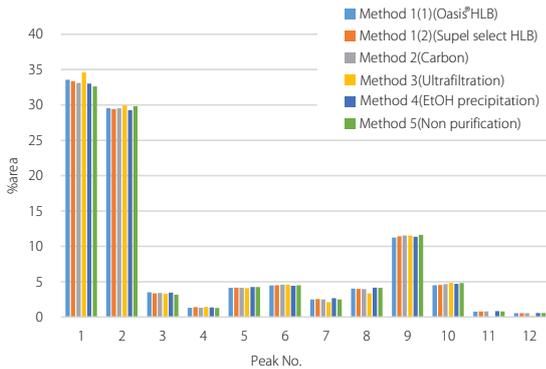
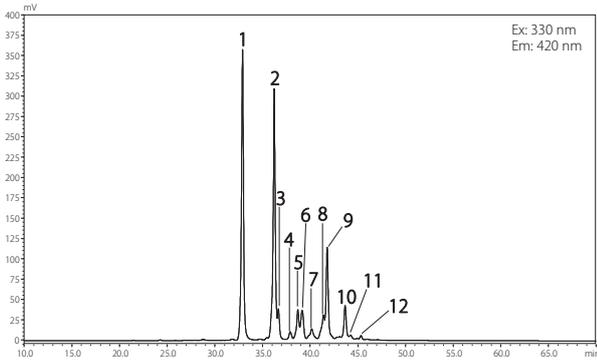


図6 RNaseB由来 N-glycanの蛍光クロマトグラム例(上)と各遊離糖鎖精製法のピーク面積比較(下)

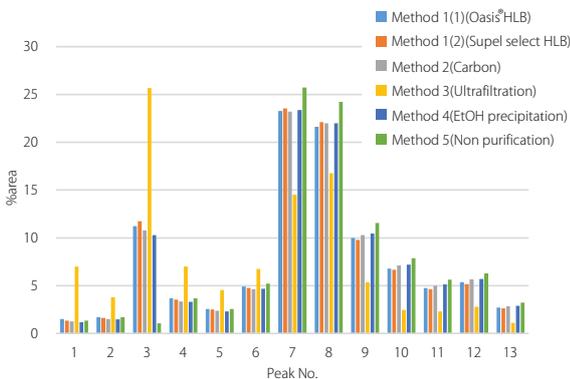
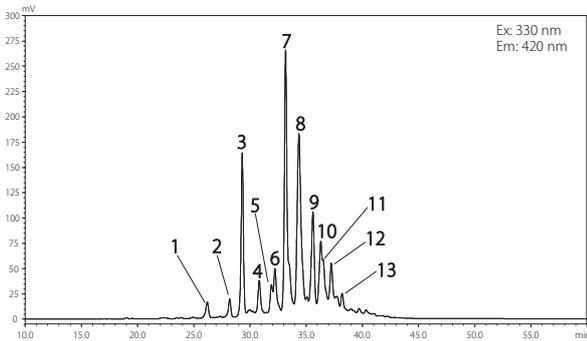


図7 α 1-Acid Glycoprotein由来 N-glycanの蛍光クロマトグラム例(上)と各遊離糖鎖精製法のピーク面積比較(下)

遊離糖鎖精製法を比較した結果から、シアル酸を持たない N-glycan を糖タンパク質から切り出す場合、切り出し後の糖鎖精製法は逆相系やカーボングラファイトを用いた固相抽出であっても、限外ろ過やエタノール沈殿であっても同様の糖鎖プロファイルが得られることがわかりました。

一方で α 1-Acid Glycoprotein のように、シアル酸を複数含む分子量の大きな N-glycan が含まれる場合、限外ろ過による遊離糖鎖精製では、分子量の大きな N-glycan が抽出しきれないケースがあることがわかりました。

また、今回の糖鎖切り出しに使用した程度の量の緩衝液や界面活性剤、還元剤などであれば、あらかじめ PD-10 などで糖タンパク質を脱塩しておけば、糖鎖切り出し後の精製が必要ないこともわかりました。

N-glycan 誘導体化条件の比較

糖タンパク質から切り出した N-glycan は、そのままでは感度などの点で分析が難しいため、糖鎖を蛍光試薬などで誘導体化して感度良く分析できるようにする必要があります。しかしながら、このような誘導体化の多くは通常高温環境下で実施されるため、反応過程での糖鎖の分解などに注意しなければなりません。

そこで、現在広く使用されている 2-aminobenzamide (2-AB、Sigma-Aldrich) と 2-aminobeizoic acid (2-AA、Sigma-Aldrich) の2つの蛍光試薬を用いた誘導体化(標識)法について、その反応条件の違いによる糖鎖の分解の程度を比較しました。今回比較した 2-AB 標識、2-AA 標識それぞれの処理条件を表 8~10 に示しました。

尚、糖タンパク質から切り出した N-glycan は、まず Oasis® HLB 1cc を用いた固相抽出法により精製した後に誘導体化を行い、誘導体化糖鎖の精製には、前出の表 6 に示した固相抽出を用いました。但し、ホウ酸を用いた 2-AA 標識別法(表 10)では、誘導体化後の精製に固相抽出カートリッジを用いた際にカートリッジが目詰まりを起こしてしまい処理が行えなかったため、表 11 に示すゲルろ過法を用いました。

表 8 N-glycan の 2-AB 標識法の処理条件

2-AB 標識 (65 °C, 3 hrs) 2-AB 標識 (37 °C, 18 hrs)	
Step	処理内容
1	2-AB (15 mg) にジメチルスルホキシド/酢酸 (7:3) 溶液 (300 μ L) を加えて加温しながら試薬を溶かす。
2	シアノ水素化ホウ酸ナトリウム (12 mg) に 1 の溶液 (200 μ L) を加える。
3	乾固した遊離糖鎖に 2 の誘導体化試薬溶液 (5 μ L) を加えてよく混和し、37 °C で 18 時間または 65 °C で 3 時間反応させる。

表 9 N-glycan の 2-AA 標識法の処理条件

2-AA 標識 (65 °C, 3 hrs) 2-AA 標識 (37 °C, 18 hrs)	
Step	処理内容
1	2-AA (15 mg) にジメチルスルホキシド/酢酸 (7:3) 溶液 (300 μ L) を加えて試薬を溶かす。
2	シアノ水素化ホウ酸ナトリウム (12 mg) に 1 の溶液 (200 μ L) を加える。
3	乾固した遊離糖鎖に 2 の誘導体化試薬溶液 (5 μ L) を加えてよく混和し、37 °C で 18 時間または 65 °C で 3 時間反応させる。

表 10 *N*-glycan の 2-AA 標識別法の処理条件

2-AA 標識別法 (80 °C, 1 hrs) 2-AA 標識別法 (37 °C, 18 hrs)	
Step	処理内容
1	メタノール (100 mL) に酢酸ナトリウム三水和物 (4 g) とホウ酸 (2 g) を加える。
2	1 の試薬溶液 (1 mL) に 2-AA (30 mg) とシアノ水素化ホウ酸ナトリウム (30 mg) を加える。
3	乾固した遊離糖鎖に 2 の誘導体化試薬溶液 (100 μL) を加えてよく混和し、37 °C で 18 時間または 80 °C で 1 時間反応させる。

表 11 2-AA 標識別法で処理した誘導体化 *N*-glycan の精製手順

Step	処理内容
1	ゲルろ過カラム (PD MiniTrap G-10) に水 (10 mL) を通す。
2	誘導体化糖鎖溶液に水 (50 μL) を加えて混合した後、カラムに注入する。
3	水 (2 の液量と合わせて 700 μL となる分量) で誘導体化糖鎖溶液のチューブを洗いこみカラムに注入する。
4	水 (0.5 mL) をカラムに流し、溶出溶液を回収する。
5	回収溶液を減圧乾固する。

■ 各種誘導体化条件で標識した *N*-glycan の LC 分析

一般的な条件 (65 °C, 3 hrs あるいは 80 °C, 1 hr) で誘導体化反応を行って得られた 2-AB 標識 *N*-glycan および 2-AA 標識 *N*-glycan と、37 °C で 18 hrs の反応を行って得られたものをそれぞれ、50 %アセトニトリル水溶液に溶解した後、2 μL を HILIC-amide カラムを用いて表 12 に記載した条件で分析しました。

表 12 誘導体化条件比較での LC 分析条件

Instrument	: Nexera™ X2
Column	: TSKgel® Amide-80, 2.0 μm 150 mm L 2 mm I.D. (東ソー)
Mobile phase A	: 100 mM Ammonium formate (pH 4.5)
Mobile phase B	: Acetonitrile
Total flow rate	: 0.25 mL/min
Concentration of mobile phase B	: 0~2 min: 75 %, 2~50 min: 75→50 %
Column temp.	: 45 °C
Detection	: Fluorescence Ex 330 nm, Em 420 nm (2-AB) Ex 350 nm, Em 425 nm (2-AA)

2-AB 標識、2-AA 標識それぞれのサンプルを分析した結果、中性糖鎖を主要な *N*-glycan として持つ IgG (図 8) や RNase B (図 9) では、反応条件による糖鎖プロファイルの違いはほとんど見られませんでした。複数のシアル酸を含む酸性糖鎖を主な *N*-glycan に持つ α 1-Acid Glycoprotein (図 10) では、37 °C での反応に対して、65 °C (2-AB/2-AA 標識) や 80 °C (2-AA 標識) での反応の場合、クロマトグラムのピーク No.7 や No.10 に見られるように、部分的にシアル酸が外れてしまうものが多く生じることがわかりました。

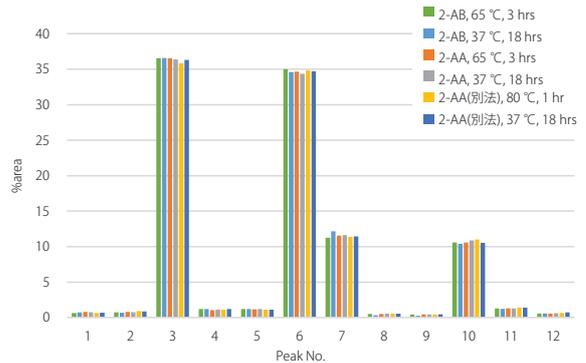
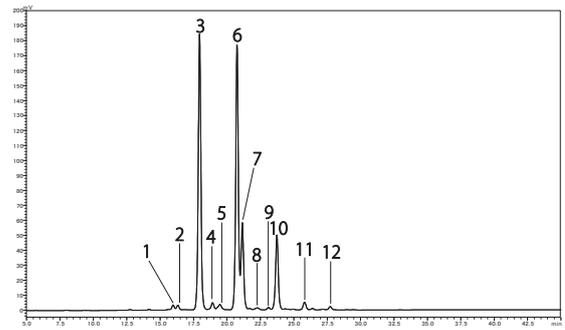


図 8 IgG 由来 *N*-glycan の蛍光クロマトグラム例 (上) と各誘導体化処理条件の糖鎖ピーク面積比較 (下)

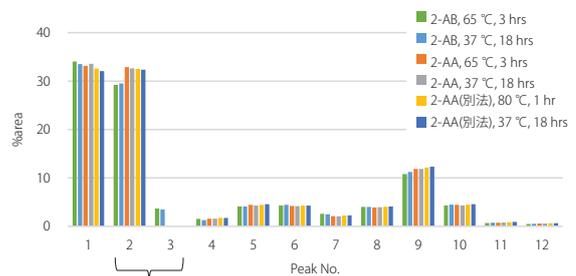
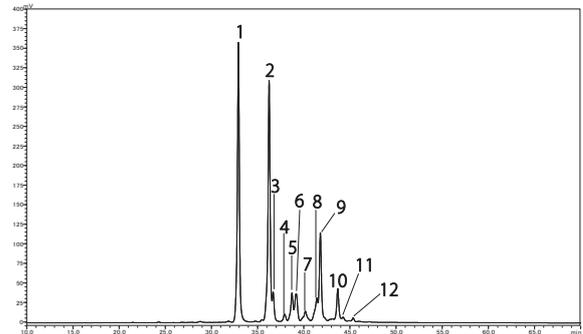


図 9 RNaseB 由来 *N*-glycan の蛍光クロマトグラム例 (上) と各誘導体化処理条件の糖鎖ピーク面積比較 (下)

2AA標識*N*-glycanをHILIC-amideで分析した際ピークが分離しなかった

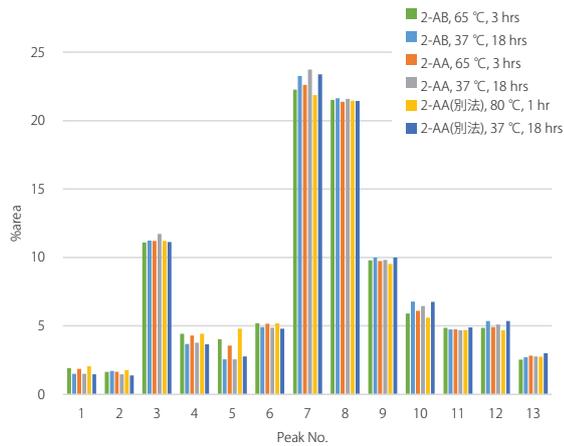
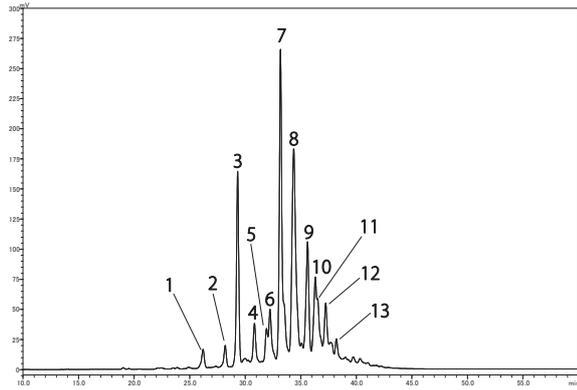


図 10 α 1-Acid Glycoprotein 由来 *N*-glycan の蛍光クロマトグラム例 (上) と各誘導体化処理条件の糖鎖ピーク面積比較 (下)

■ 誘導体化 *N*-glycan 精製法の比較

N-glycan を蛍光標識試薬などで誘導体化する際には、大過剰の標識試薬やその他の反応試薬を使用します。その為、一般に誘導体化反応後には過剰試薬の除去を行うこととなります。この過剰試薬の除去方法については、現在では親水性相互作用を利用した固相抽出法やゲルろ過法、またはアセトン沈殿法などが用いられています。

そこで、これらの方法を比較し、精製法が異なっても同じ糖鎖プロファイルが得られるのかどうかを確認しました。

今回の比較では、糖タンパク質から切り出した *N*-glycan を、Oasis® HLB 1 cc による固相抽出法で精製した後、37 °C で 18 時間の反応により 2-AB 標識したものについて、上述の 1) 固相抽出法、2) ゲルろ過法、3) アセトン沈殿法の 3 種類に加え、処理を行わない場合をあわせて 4 種類のケースを考慮しました。

各精製法の手順については表 13~16 に記載しました。

表 13 親水性相互作用固相抽出による過剰試薬除去手順

Step	処理内容
1	Oasis® HLB 1 cc に 95 % アセトニトリル (1 mL) を通す。
2	誘導体化糖鎖溶液 (5 μ L) にアセトニトリル (95 μ L) を加えてよく攪拌し (final conc: 95 %アセトニトリル)、カラムに注入する。
3	誘導体化糖鎖溶液を入れていたチューブを 95 % アセトニトリル (0.5 mL) で洗いこみ、この溶液をカラムに注入。
4	95 %アセトニトリル (2 mL) をカラムに通す。
5	20 %アセトニトリル (0.5 mL) をカラムに通し、誘導体化糖鎖を溶出する。
6	溶出溶液を減圧乾固する。

表 14 ゲルろ過による過剰試薬除去手順

Step	処理内容
1	PD MiniTrap G-10 に水 (10 mL) を通す。
2	誘導体化糖鎖溶液に水 (50 μ L) を加えて混合した後、カラムに注入する。
3	水 (2 の液量と合わせて 700 μ L となる分量) で誘導体化糖鎖溶液のチューブを洗いこみカラムに注入する。
4	水 (0.5 mL) をカラムに流し、溶出溶液を回収する。
5	回収溶液を減圧乾固する。

表 15 アセトン沈殿による過剰試薬除去手順

Step	処理内容
1	誘導体化糖鎖溶液にアセトン (1 mL) を加えてよく混合する。
2	15,000 \times g で 10 分間遠心する。
3	デカンテーションにより上清を除去し、残渣を乾燥させる。

表 16 過剰試薬除去なし

Step	処理内容
1	誘導体化糖鎖溶液を減圧乾固する。

■ 各種誘導体化糖鎖精製法で得られた 2-AB 標識 *N*-glycan の LC 分析

各誘導体化糖鎖精製法により精製した 2-AB 標識 *N*-glycan と未精製の 2-AB 標識 *N*-glycan をそれぞれ 50 %アセトニトリル水溶液に溶解し、各サンプルを 2 μ L ずつ使用して HILIC-amide カラムを用いた表 17 に示す条件で LC 分析を行いました (図 11~16)。

表 17 誘導体化条件比較での LC 分析条件

Instrument	: Nexera™ X2
Column	: TSKgel® Amide-80, 2.0 μ m 150 mm L 2 mm I.D. (東ソー)
Mobile phase A	: 100 mM Ammonium formate (pH 4.5)
Mobile phase B	: Acetonitrile
Total flow rate	: 0.25 mL/min
Concentration of mobile phase B	: 0~2 min: 75 %, 2~50 min: 75→50 %
Column temp.	: 45 °C
Detection	: Fluorescence (Ex 330 nm, Em 420 nm)

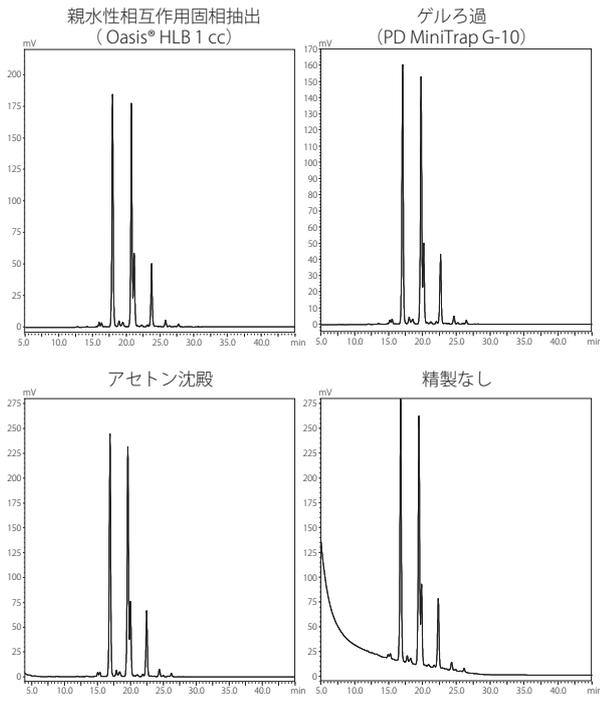


図 11 各精製法で得られた IgG 由来 N-glycan の蛍光クロマトグラム

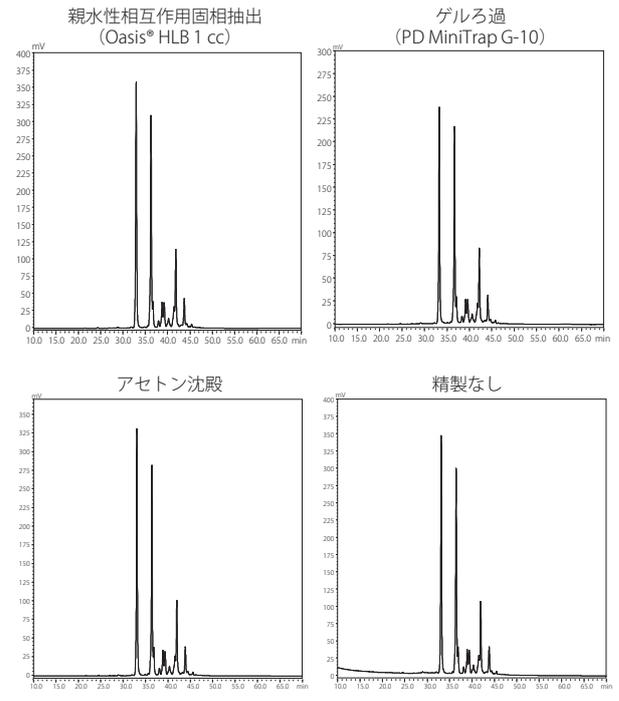


図 13 各精製法で得られた RNaseB 由来 N-glycan の蛍光クロマトグラム

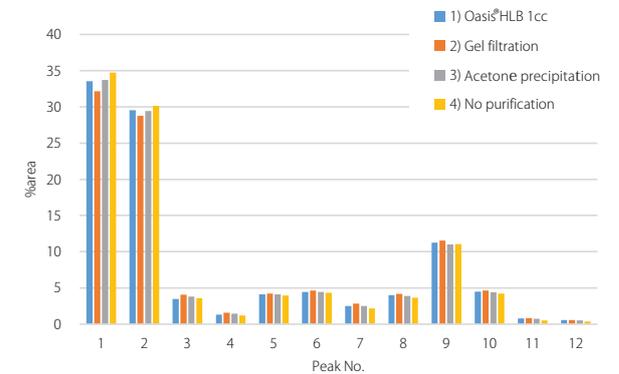
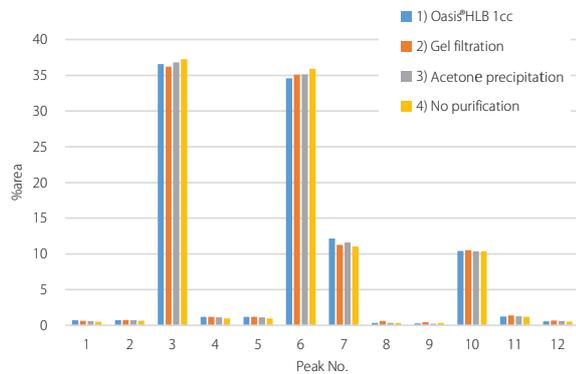
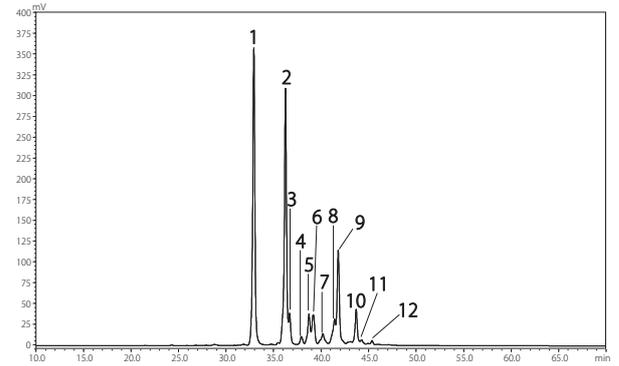
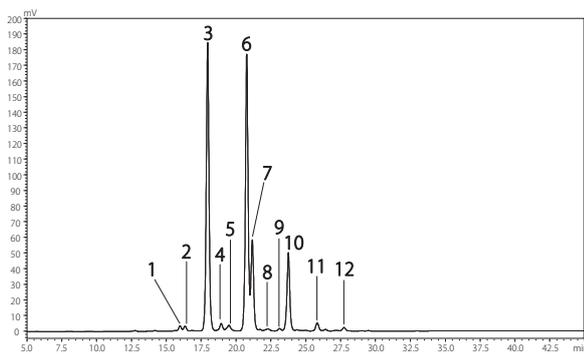


図 12 各精製法で得られた IgG 由来 N-glycan の糖鎖ピーク面積比較

図 14 各精製法で得られた RNaseB 由来 N-glycan の糖鎖ピーク面積比較

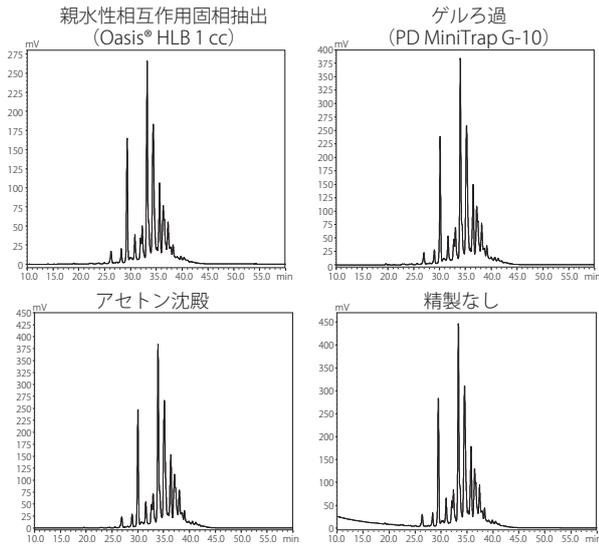


図 15 各精製法で得られた α 1-Acid Glycoprotein 由来 N-glycan の蛍光クロマトグラム

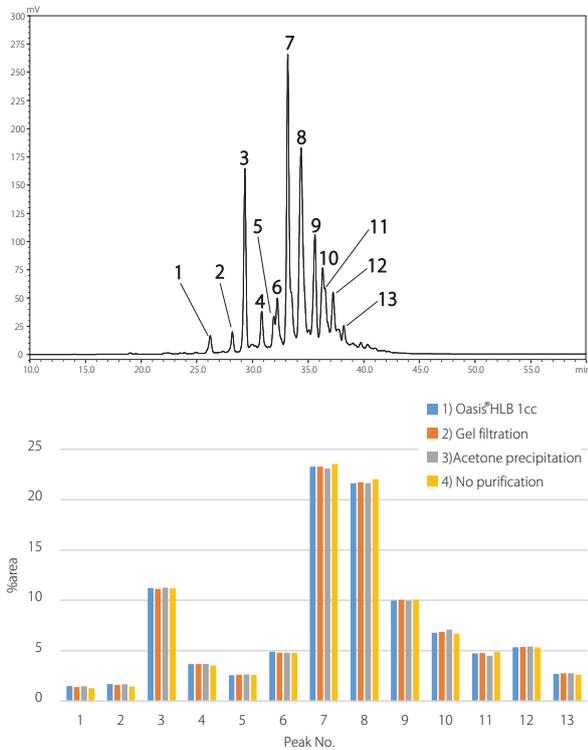


図 16 各精製法で得られた α 1-Acid Glycoprotein 由来 N-glycan の糖鎖ピーク面積比較

各種精製法で処理したサンプルを分析した結果、いずれの方法でもほぼ同様の糖鎖プロファイルが得られることが分かりました。

■まとめ

糖タンパク質から切り出した N-glycan の分析では、切り出した糖鎖の精製、糖鎖の誘導体化、誘導体化した糖鎖の精製までの3つの工程が必要になります。

今回実施した様々な前処理法の比較から、遊離糖鎖の精製工程では、誘導体化を経ても未標識体が残ってしまうことを避けるため、特に質量分析を行う場合には HLB カートリッジによる固相抽出が最適だと考えられます。但し、事前に糖タンパク質試料を脱塩処理しているような場合には、無理に遊離糖鎖の精製を行わずとも、蛍光標識による誘導体化には問題は無いと思われます。何かしらの理由によって他の手法を用いることができずに限外ろ過が必要となる場合には、ポアサイズの異なる限外ろ過膜での処理を並列で行うなどして分析結果が前処理に影響されていないかどうか注意する必要があります。

次の工程である糖鎖の誘導体化については、標識の種類に関わらず、誘導体化反応が可能である温度範囲のなかでも低温環境下で長時間の反応を行うことで、前処理工程で失われやすいシアル酸などの糖の脱離を極力抑さえ、本来の糖鎖プロファイルを得ることが可能であると考えられます。一方で、酸性糖鎖の存在しない試料を扱う場合には、反応温度が高くと糖鎖プロファイルが大きく変化することは無いため、扱う試料によっては高温短時間の反応を実施することで前処理に要する時間を節約することも可能になります。

最後の工程となる誘導体化糖鎖の精製処理では、高濃度の試料が手に入る場合には、今回の標識反応に用いた程度の量の試薬であれば、精製処理を行わずとも分析することが可能ですが、LC 分析でのベースラインの盛り上がりなどが起こりやすいため、でき得るならば精製を行うべきだと思われます。手法として確実なのは親水性相互作用固相抽出だと思われれますが、アセトン沈殿なども、簡便でローコストな処理法として十分利用することが可能だと考えられます。

謝辞

本研究は H29 年度 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の「創薬基盤推進研究事業」の支援によって行いました。

Nexera は、株式会社 島津製作所の商標です。
Oasis は、Waters Technologies Corporation の登録商標です。
TSKgel は、東ソー 株式会社の登録商標です。
MiniTrap は、GE Healthcare BioProcess R&D AB の登録商標です。