

GlycanPac AXH-1 カラム ～糖鎖を高分離できるカラム～

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

Thermo Scientific™ GlycanPac™ AXH-1は、糖鎖のチャージ、サイズ、極性により分離を行うシリカを基材とした充填剤です。このカラムは、生物学的に非常に重要な糖鎖の分析用カラムで、高分離やハイスループット分析が可能です。ユニークな選択性をもつカラムで、ラベル化およびラベル化していない糖鎖を蛍光検出器やLC-MSで分析することができます。

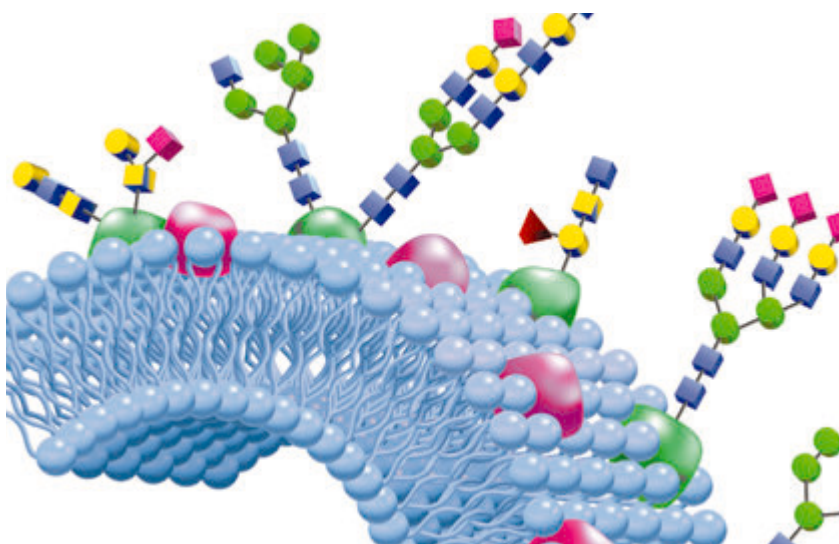
製品の特徴

- ・ チャージ、サイズ、極性を基にしたユニークな選択性
- ・ ラベル化およびラベル化していない糖鎖を高分離
- ・ 糖鎖のチャージにより糖鎖のキャラクタリゼーションと定量が可能
- ・ 蛍光検出器およびMS検出が可能
- ・ 高効率および優れたカラムの頑健性

イントロダクション

糖鎖は生体内において糖タンパク、糖脂質、プロテオグリカン等といった糖と結合した状態だけではなく、糖単体でも存在します。糖は生体および生理学的なプロセスに幅広く関与しています。このプロセスには、調節機能、細胞の伝達、遺伝子発現、細胞性免疫が含まれます。それぞれの糖鎖の役割は、構造やタンパクに結合したオリゴ糖のタイプに依存します。糖鎖の構造は、翻訳後修飾による調整や生理的条件が異なるために多様で複雑です。このため、糖鎖のキャラクタリゼーションと構造決定は困難です。

糖鎖の生物学的な機能は、構造、タンパクや脂質に結合したオリゴ糖の種類によります。オリゴ糖は2つの修飾基によりタンパクに共有結合しています。これらの共有結合はアスパラギンを介して結合しており、N結合型糖鎖と分類されています。セリンもしくはトレオニンを介して共有結合している場合はO結合型糖鎖と分類されています。N結合型およびO結合型の糖鎖は、生理活性や活性効率が糖鎖形成に影響するため、バイオ医薬品の探索段階において重要です。糖タンパク中のオリゴ糖の含有量に加えて、今後バイオ後続品の開発が進むにつれて、糖タンパク中のオリゴ糖の定量や、糖形成のコントロールの重要性が増してきています。



順相、親水性相互作用（HILIC）、イオン交換、逆相など様々なHPLC分離モードが糖鎖の分析に採用されてきました。糖鎖は親水性で高極性であるため、一般的にamide HILICカラムで、水素結合、サイズ、組成を基にした分離をします。しかし、amide HILICカラムを用いた分析による糖鎖の解析および定量においては、ある制約があり、解析を困難にしています。これは、一連の分析において糖鎖が異なるチャージの場合でも共溶出することです。GlycanPac AXH-1は糖鎖をチャージ、サイズ、極性により分離するためAmide HILICカラムでの分離の制約を克服することが可能です。このカラムはサイズや極性の違いが無くても、チャージさえ異なれば簡単に糖鎖の分離、定量を行うことができます。GlycanPac AXH-1カラムは、他の糖鎖分析用のHPLCカラムと比較して高い選択性、分離度、短い分析時間を実現します。

カラムテクノロジー

GlycanPac AXH-1カラムはミックスモード表面化学を基に、弱陰イオン交換（WAX）とHILICの保持メカニズムを併せもつので、理想的な選択性と分離能をもちます。弱陰イオン交換機能は、マイナスにチャージした糖鎖の保持と選択性を有します。HILICモードは極性と分子サイズにより同じチャージをもつ糖鎖の分離に寄与します。その結果、GlycanPac AXH-1は他の糖鎖分析用カラムにない可能性があります。これに加えて、このカラムはサイズや極性に差がなくてもチャージを基にして様々な糖鎖を分離することが可能です。チャージを基にした分離は正確な定量をする場合に適していて、他のHPLCカラムには無い特徴です。GlycanPac AXH-1カラムは、LC-蛍光検出とLC-MSを使用できる緩衝液（例えば酢酸アンモニウムやギ酸アンモニウム）とアセトニトリルを使用することができます。表面化学によりカスタマイズされているので、中性およびチャージした糖鎖をMSで使用できる程度の低い緩衝液濃度で分析できます。様々な分析条件の検討方法や最適化の方法がありますが、移動相の緩衝液濃度、pH、温度、溶媒比率、グラジエント等の検討項目があります。

GlycanPac AXH-1のシリカ基材は、球状の高純度シリカです。1.9 μm や3.0 μm 粒子径の充填剤の双方をご用意していますので、HPLCでもUHPLCでもご使用いただけます。GlycanPac AXH-1カラムには様々な内径があるので、分離、スルーブット、装置に合せてお選びいただけます。

LCと蛍光検出器による糖鎖アプリケーション

GlycanPac AXH-1カラムは、生体試料中のチャージの有無にかかわらず糖鎖の定性、定量、構造解析に使用できます。Figure 1は、GlycanPac AXH-1(1.9 μm 2.1x150 mm)を使用したフェチュイン(ウシ胎児血清中の糖タンパク)中の中性および酸性2ABラベル化N-glycanの分離を示しています。糖鎖の溶出順序は様々な糖鎖の断片に応じてグループになっています。中性の糖鎖の溶出時間が一番速く、monosialylated (モノシアル酸付加物)、disialylated (ジシアル酸付加物)、trisialylated (トリシアル酸付加物)、tetrasialylated (テトラシアル酸付加物)、そしてpentasialylated (ペンタシアル酸付加物)の順に溶出します。それぞれの糖鎖は陰イオン交換の機能により保持されます。それぞれのグループ内の糖鎖が同じチャージをもつため、サイズおよび極性の差をHILICモードにより分離します。これは、異なるチャージをもつ糖鎖を2ABでラベル化し、これらの糖鎖を全く同じ分析方法で分析したデータ(Figure 2)とMSの結果が同じであることから説明できます。Figure 3はFigure 1と同じサンプルをGlycanPac AXH-1(3.0 μm 2.1x150 mm)で分析した場合のデータです。1.9 μm と比較して、3.0 μm 粒子径のGlycanPac AXH-1のバックプレッシャーが50%低く、良好な分離が得られています。汎用HPLCで3.0 μm 粒子径のGlycanPac AXH-1が十分なパフォーマンスを発揮することをご確認ください。

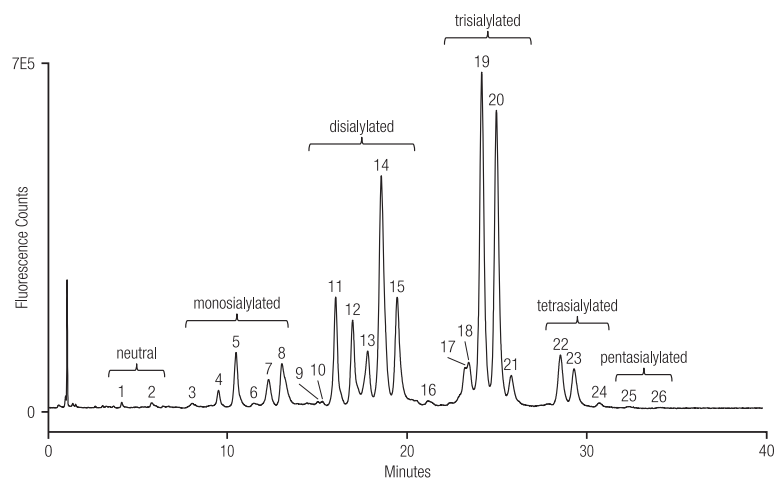


Figure 1: フェチイン(ウシ胎児血清中の糖タンパク)中の2ABラベル化N-glycanをチャージ、サイズ、極性により分離

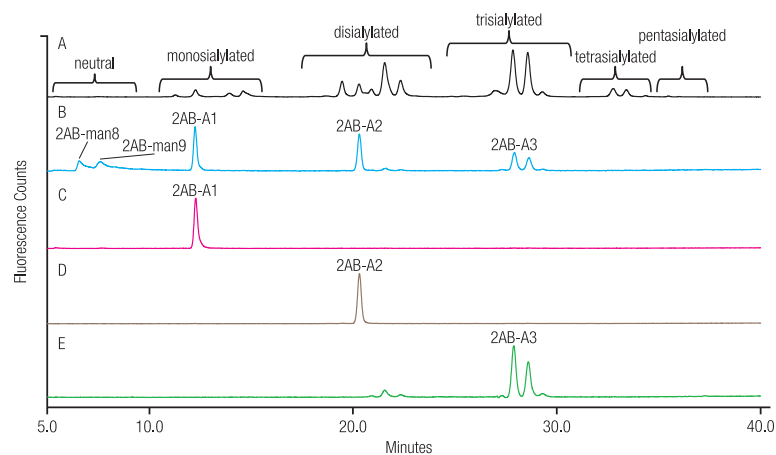


Figure 2: 2AB ラベル化N-glycan標品と、2AB ラベル化フェチイン中N-glycan

カラム: **GlycanPac AXH-1 (1.9 μ m)**
 カラムサイズ: 2.1 $\times$ 150 mm
 移動相A: アセトニトリル (100%)
 移動相B: 水
 移動相C: 乳酸アンモニウム水溶液 (100 mM, pH=4.4)
 流速: 0.4 mL/min
 注入量: 50 Pmoles
 カラム温度: 30°C
 検出: 蛍光 320/420 nm
 サンプル: フェチイン(ウシ胎児血清中の糖タンパク)中の2ABラベル化N-glycan

Time (min)	% A	% B	% C	流速 (mL/min)	Curve
-10	78	20	2	0.4	5
0	78	20	2	0.4	5
30	70	20	10	0.4	5
35	60	20	20	0.4	5
40	50	20	30	0.4	5

カラム: **GlycanPac AXH-1 (1.9 μ m)**
 カラムサイズ: 2.1 $\times$ 150 mm
 移動相A: アセトニトリル (100%)
 移動相B: 水
 移動相C: 乳酸アンモニウム (100 mM, pH=4.4)
 流速: 0.4 mL/min
 注入量: 10 Pmoles (それぞれの糖鎖の濃度)
 カラム温度: 30°C
 検出: 蛍光 320/420 nm
 サンプル: フェチイン(ウシ胎児血清中の糖タンパク)中の2ABラベル化N-glycan。
 2AB man8, 2AB Man9, 2AB A1, 2AB A2, 2AB A3

Time (min)	% A	% B	% C	流速 (mL/min)	Curve
-10	78	20	2	0.4	5
0	78	20	2	0.4	5
30	70	20	10	0.4	5
35	60	20	20	0.4	5
40	50	20	30	0.4	5

カラム: **GlycanPac AXH-1 (3.0 μ m)**
 カラムサイズ: 2.1 $\times$ 150 mm
 移動相A: アセトニトリル (100%)
 移動相B: 乳酸アンモニウム (50 mM, pH=4.4)
 流速: 0.4 mL/min
 注入量: 50 Pmoles
 カラム温度: 30°C
 検出: 蛍光 320/420 nm
 サンプル: フェチイン(ウシ胎児血清中の糖タンパク)中の2ABラベル化N-glycan

Time (min)	% A	% B	流速 (mL/min)	Curve
-10	77	23	0.4	5
0	77	23	0.4	5
5	77	23	0.4	5
55	65	35	0.4	5

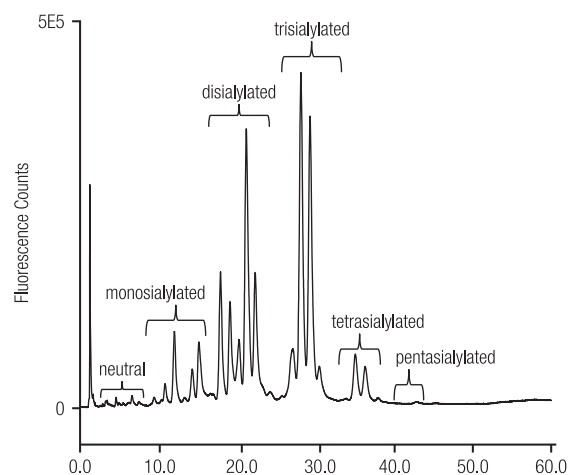


Figure 3: フェチイン(ウシ胎児血清中の糖タンパク)中の2ABラベル化N-glycanを、3 μ m GlycanPac AXH-1を使用して分析した場合のクロマトグラム

LC/MSによる糖鎖分析

GlycanPac AXH-1カラムを使用して糖鎖をチャージ、サイズ、極性を基にして分離すると精度良く分析できるため、LC/MSによる糖鎖分析において非常に有用です。Figure 4は、フェチュイン中2AB ラベル化N-glycanを1.9 μm GlycanPac AXH-1と市販の1.7 μm amide HILICを使用して、ネガティブモードで分析した場合の比較です。(MSのスキャン範囲は40-2200 Da) この分析では、双方のカラムが推奨する分析方法で測定を行いました。SimGlycan®ソフトウェアを使用してMS/MSのフラグメントデータを解析し、それぞれの糖鎖構造を決定しました。Table 1に、構造決定できた糖鎖を示します。これらのデータは、明らかに市販の1.7 μm amide HILICよりGlycanPac AXH-1カラムの方が選択性と分離の観点において優位な結果を示しています。市販の1.7 μm amide HILICでは、糖鎖の様々なチャージの違いを分離することができませんでした。

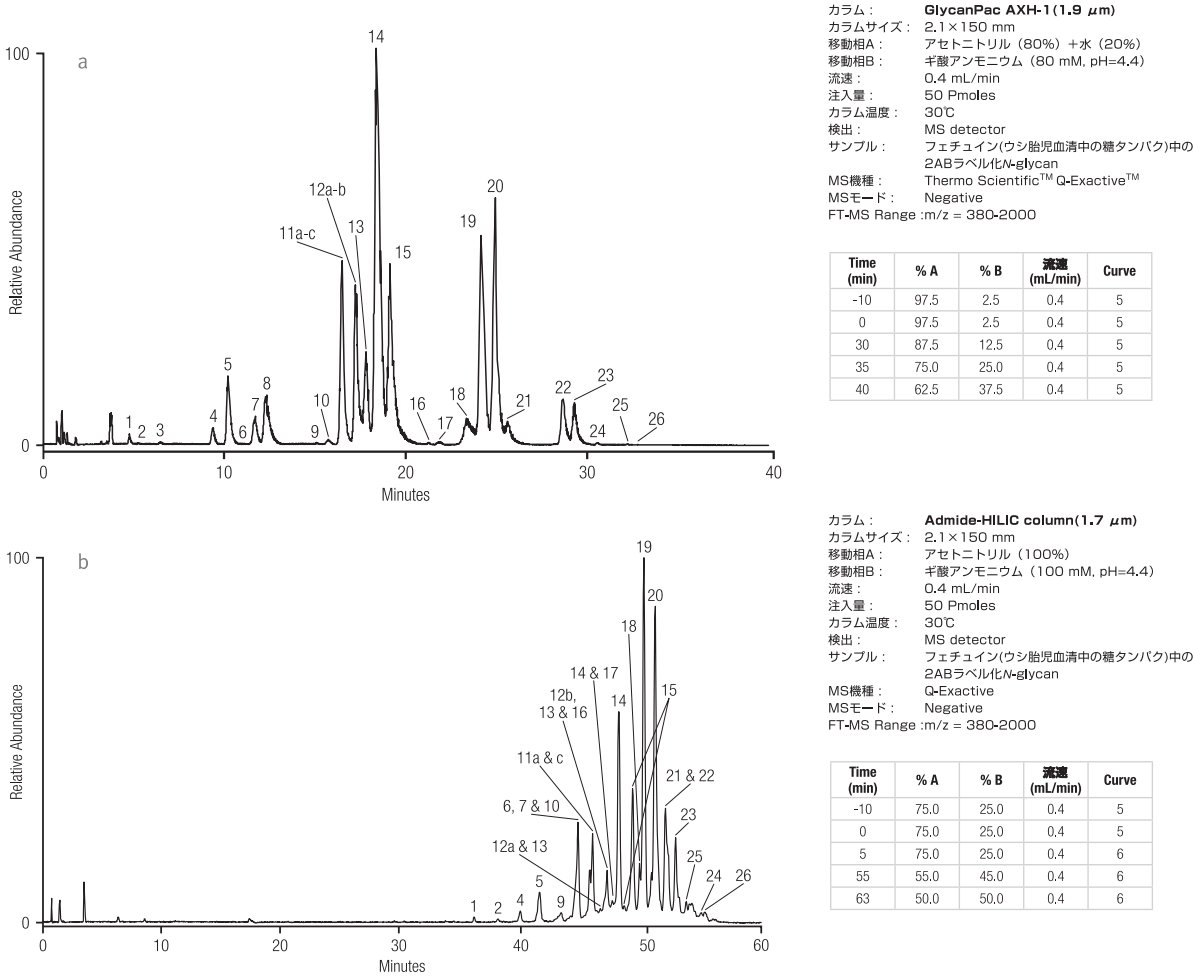


Figure 4a :GlycanPac AXH-1 (1.9 μm)を使用して、フェチュイン(ウシ胎児血清中の糖タンパク)中の2ABラベル化N-glycanをMSで検出した場合のクロマトグラム

Figure 4b :市販のamide-HILIC (1.7 μm)を使用して、フェチュイン(ウシ胎児血清中の糖タンパク)中の2ABラベル化N-glycanをMSで検出した場合のクロマトグラム

ピーク	構 造	糖鎖のチャージ (2ABラベル除外)	精密質量 (2ABラベル含む)
1		0	1760.6609
2		0	1906.7188
3	未知	未知	未知
4		-1	2051.7563
5		-1	2051.7563
6		-1	2416.8885
7		-1	2416.8885
8		-1	2416.8885
9		-2	2342.8518
10		-2	2342.8518
11a		-2	2342.8518
11b		-2	2488.9097
11c		-2	2358.8467
12a		-2	2342.8518
12b		-2	2358.8467
13		-3	2707.9839
14		-3	2707.9839
15		-3	2707.9839

Table 1 :フェチュイン(ウシ胎児血清中の糖タンパク)中の
2ABラベル化N-glycanの構造



ピーク	構 造	糖鎖のチャージ (2ABラベル除外)	精密質量 (2ABラベル含む)
16		-3	2633.9472
17		-3	2633.9472
18		-3	2999.0794
19		-3	2999.0794
20		-3	2999.0794
21		-3	2999.0794
22		-4	3290.1748
23		-4	3290.1748
24		-4	3655.3070
25		-5	3581.2702
26		-5	3946.4024

ラベル化をしていない糖鎖分離

蛍光ラベル化の手法を使用せずに糖鎖をそのまま分離することが理想的です。これは時間がかかる誘導体化後に、ラベル化反応の未反応物質が存在するため、サンプルのクリーンアップも必要であるためです。GlycanPac AXH-1カラムはモノクローナル抗体やその他のタンパク中に存在する糖鎖の分離に適しています。Figure 5はGlycanPac AXH-1 (1.9 μm 2.1 x 150 mm)を使用した、フェチュイン(ウシ胎児血清中の糖タンパク)由来のN-glycanをMS検出器で使用可能な移動相による分離例を示します。非常に高い分離が得られているため、FT-MSやMS/MSフラグメントデータをとった場合に、正確な構造解析ができると予想されます。蛍光ラベル化した場合と、しない場合では明らかに異なるデータが得られます。これは糖鎖をラベル化する過程で構造が変化してしまうことを示唆します。

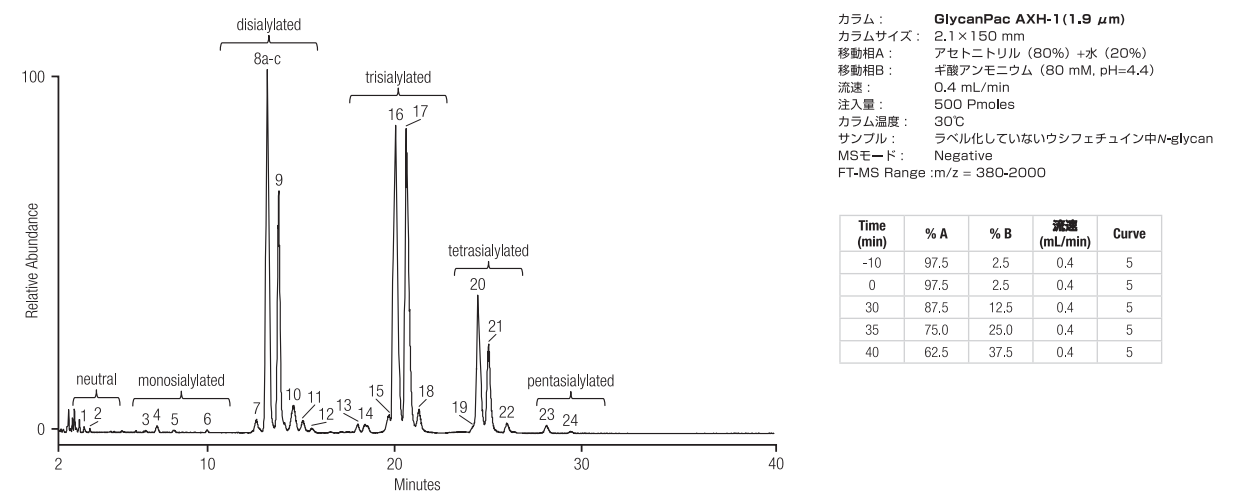


Figure 5 :LC-MSによるラベル化していないウシフェチュイン中N-glycanのクロマトグラム

チャージを基にした糖鎖の定量

それぞれのチャージを基にした糖鎖の正確な定量は、異なるバッチのタンパクや正常部位と病変部位の糖鎖を調べる場合に重要です。これに加えて、チャージを基にした糖鎖の定量は、シアリダーゼSとAによる消化の後にシアル酸結合の数を基にし、糖鎖の定量に利用できます。Figure 6は蛍光検出によるGlycanPac AXH-1 (1.9 μm 2.1 x 150 mm)によるチャージを基にした2ABラベル化N-glycanの定量分析例です。0.1 pmoIsから5 pmolesの2AB-A2糖鎖の標品を注入して検量線データを作成しました。

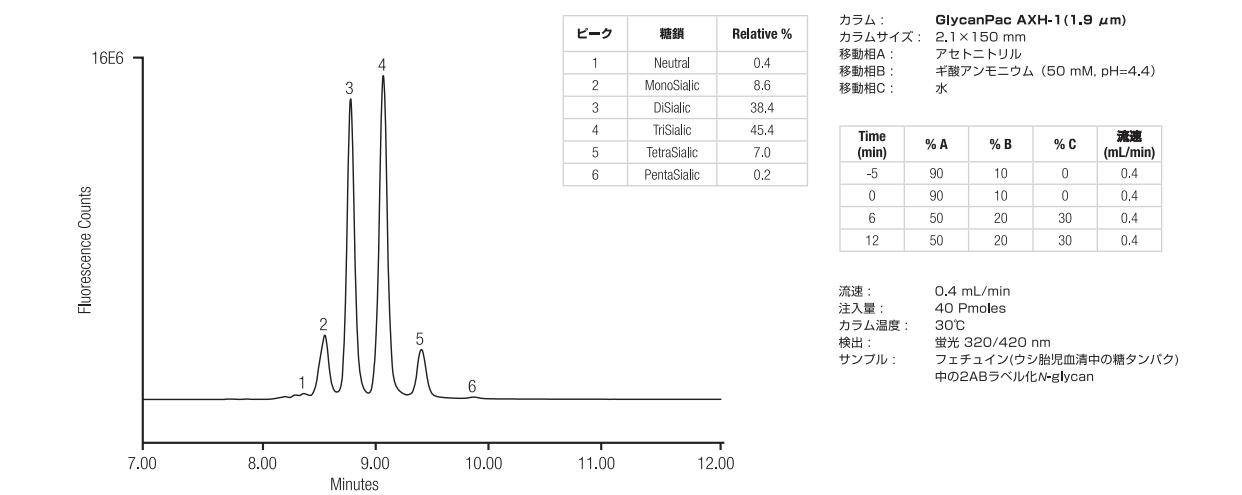


Figure 5 :ウシフェチュイン中2ABラベル化N-glycanのチャージによる分離

LC-MSによる抗体由来糖鎖の分析

抗体医薬品による治療の発展とともに、抗体由来の糖鎖の研究がなされてきました。この分野では莫大な研究がなされており、近年、難病の治療のためのモノクローナル抗体が開発されています。抗体の糖鎖は、構造と機能が異なる主な原因とされています。抗体の糖鎖の種類は製品のバッチ間差、in vivoにおける製品の安定性、そしてin vivoでのFc部位に対するエフェクター機能に影響する大きな原因となっています。FDAおよびヨーロッパの規制においては、抗体に結合する糖鎖の構造解析が重要とされており、これは糖鎖が抗体医薬品の安全性や効能を左右するためです。

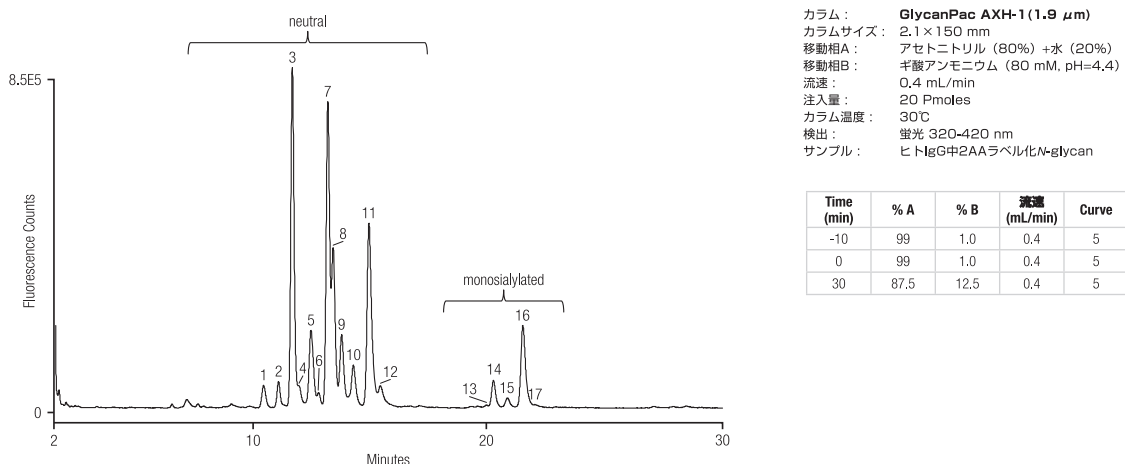


Figure 7 :ヒトIgG中2AAラベル化N-glycanの分離

Figure 7は、GlycanPac AXH-1 (1.9 μ m)を使用して、ヒトIgG抗体由来の2AAラベル化糖鎖をLC-MSで分析した場合のクロマトグラムです。MS検出器により構造決定された糖鎖をTable 2に示します。3つの異なるチャージをもつ糖鎖がヒトIgG抗体に存在し、これらは主成分として中性の糖鎖と、副成分としてmonosialylated(モノシアル酸付加物)の糖鎖が存在するという結果が得られました。

ピーク	構 造	糖鎖のチャージ (2AAラベル除外)	精密質量 (2AAラベル含む)
1		0	1380.5178
2		0	1437.5393
3		0	1583.5972
4		0	1542.5706
5		0	1542.5706
		0	1786.6766
6		0	1599.5921
7		0	1745.6500
8		0	1745.6500
9	Unknown		Unknown

Table 2 :ヒトIgG中2AAラベル化N-glycanの分離。それぞれの糖鎖の構造はクロマトグラムの解析によって得られました。

ピーク	構 造	糖鎖のチャージ (2AAラベル除外)	精密質量 (2AAラベル含む)
10		0	1761.6449
11		0	1907.7028
12		0	2110.7822
13		-1	2036.7454
		-1	2052.7404
14		-1	2036.7454
15		-1	2052.7404
16		-1	2198.7983
17		-1	2401.8776



高い再現性を実現する製造工程

それぞれのGlycanPac AXH-1 カラムは、厳密な管理下で製造されるため、カラム間の再現性が良好です。またそれぞれのカラムは個別にテストされ、品質保証書とともに出荷されます。

カラムデータ

	GlycanPac AXH-1カラム (3 µm)	GlycanPac AXH-1カラム (1.9 µm)
カラム固定相	WAX と HILIC ミックスモード	WAX と HILIC ミックスモード
シリカ基材	高純度シリカ、球状、多孔性	高純度シリカ、球状、多孔性
粒子径	3 µm	1.9 µm
表面積	300 m ² /g	220 m ² /g
細孔径	120 Å	175 Å

仕様と推奨パラメーター

粒子径	内径および長さ (mm)	製品番号	耐圧 (psi)	pH 範囲	温度限界 (°C)	有機溶媒 水系移動相 耐性	推奨 流速 (mL/min)	流速限界 (mL/min)
1.9 µm	2.1 × 100 mm	082473	7,000	2.0–8.0	< 60	水系移動相は、 0–90% 使用可 アセトニトリルの 使用可	0.1–0.4	0.5
1.9 µm	2.1 × 150 mm	082472	10,000	2.0–8.0	< 60		0.1–0.4	0.5
1.9 µm	2.1 × 250 mm	082521	15,000	2.0–8.0	< 60		0.1–0.4	0.5
3 µm	4.6 × 150mm	082468	6,000	2.0–8.0	< 60		0.6–1.2	1.5
3 µm	3.0 × 150 mm	082469	6,000	2.0–8.0	< 60		0.3–0.6	0.75
3 µm	2.1 × 150 mm	082470	6,000	2.0–8.0	< 60		0.1–0.4	0.5

オーダーインフォメーション

製品名	製品番号
GlycanPac AXH-1, Analytical 3 µm, 4.6 × 150 mm	082468
GlycanPac AXH-1, Analytical 3 µm, 3.0 × 150 mm	082469
GlycanPac AXH-1, Analytical 3 µm, 2.1 × 150 mm	082470
GlycanPac AXH-1, Analytical 1.9 µm, 2.1 × 250 mm	082521
GlycanPac AXH-1, Analytical 1.9 µm, 2.1 × 150 mm	082472
GlycanPac AXH-1, Analytical 1.9 µm, 2.1 × 100 mm	082473
GlycanPac AXH-1, Guard 3 µm, 4.6 × 10 mm	082474
GlycanPac AXH-1, Guard 3 µm, 3.0 × 10 mm	082475
GlycanPac AXH-1, Guard 3 µm, 2.1 × 10 mm	082476

© 2013 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転載を禁じます。

掲載されている会社名、製品名は各社の商標、登録商標です。掲載されている価格は消費税を含んでおりません。

詳細については、販売代理店にお問い合わせください。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器・消耗品に関するお問い合わせはこちら

☎ 0120-753-670 Fax.0120-753-671

本 社 〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町3-9 C棟

大阪支店 〒532-0011 大阪市淀川区西中島6-3-14 DNX新大阪ビル

E-mail : analyze.jp@thermofisher.com

www.thermoscientific.jp

販売店

Thermo
S C I E N T I F I C
Part of Thermo Fisher Scientific