ACQUITY UPLC H-Class Bio システムによる卓越した糖鎖分離

目的

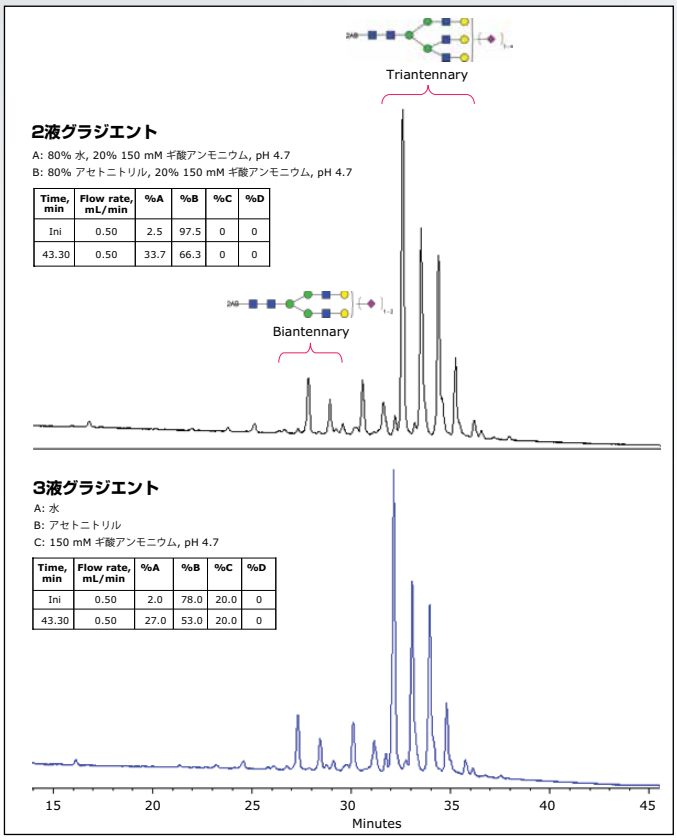
柔軟性の高い新溶媒混合テクノロジー【Auto•Blend Plus™】機能を搭載したACQUITY UPLC® H-Class Bioシステム及びHILIC モードカラムを利用し、フェチュイン由来*N*-結合型糖鎖の特性解析を行いました。

背景

きわめて複雑な糖鎖構造は、タンパク質の生物学的な役割に関与しており、規制下においては、糖鎖構造の完全なプロファイルが要求されます。また、糖タンパク質の生物学的な重要性に伴い、迅速かつ効率的であり、さらに十分な感度と再現性を有する分析法が必要とされております。糖鎖分析では、まず、様々な*N*-結合型糖鎖、*O*-結合型糖鎖を精密に分離しなければなりません。

元々、糖鎖の分離が困難であることに加え、LCでの分離後のMS検出の有無等も考慮して、移動相組成の検討を行わなければなりません。最適な分離条件を開発するためには、グラジエントの最適化のみならず、添加剤の種類やイオン強度など、多くの条件検討を実施する必要があります。要求される選択性や分離を得るための移動相条件の検討では、バイナリ送液システムの場合、非常に時間と手間のかかる作業が必要となります。検討するパラメータとしては、移動相中の有機溶媒の種類や濃度、pH、イオン強度等が挙げられます。そのための溶媒調製工程では、ミスや調製誤差が生じる可能性もあります。ACQUITY UPLC H-Class BioシステムのAuto•Blend Plusテクノロジーでは、最大4種類の溶媒をソフトウェア

Auto•Blend Plusテクノロジーを搭載したACQUITY UPLC H-Class BioシステムとGlycan Separation Technology(GST)カラムの使用により、より短時間で、より確実な糖鎖分析法の開発を実現します。



Time, min	Flow rate, mL/min	%A	%B	%C	%D
Ini	0.50	2.5	97.5	0	0
43.30	0.50	33.7	66.3	0	0

Time, min	Flow rate, mL/min	%A	%B	%C	%D
Ini	0.50	2.0	78.0	20.0	0
43.30	0.50	27.0	53.0	20.0	0

（上段）フェチュインから切り出した糖鎖を2-ABでラベル化し、HILICモードを用いて2液グラジエントで分析した例。

（下段）同じ糖鎖をAuto−Blend Plusテクノロジーを使用した3液グラジエントで分析した例。2液グラジエントと同等の結果が得られています。さらに3液混合の場合は事前に混合溶媒を調製する必要が無く、複雑なサンプルの場合でも簡単な分離の最適化が可能です。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

上からプログラムで任意の組成で自動混合することが可能となり溶媒調製に費やす時間が削減できます。また、この機能により再現性に大きく影響する溶媒の調製誤差を無くし、再現性の向上と共に分析法開発にかかる時間の短縮が可能となります。

ソリューション

親水性相互作用クロマトグラフィ(HILIC)モードを用いるWaters Glycan Separation Technology (GST)カラムでは2-µm以下の充てん剤を使用したUPLC カラムテクノロジーを採用することにより卓越した糖鎖の分離が可能です。HILICモードでは、逆相とは逆に親水性の高い糖鎖ほど強く保持し、水系移動相を増加させるグラジエントにより溶出します。

ACQUITY UPLC H-Class Bioシステム、Auto•Blend Plusテクノロジーの柔軟性を証明するために、ここではフェチュインから切り出した*N*-結合型糖鎖の特性分析を例に示しました。

糖鎖は2-aminobenzamide (2-AB)により蛍光標識し、蛍光検出器にて測定を行いました。きわめて高い分離が得られている2液グラジエントによる分析法を、Auto•Blend Plus 機能を用いて3液グラジエントでの分析法に移管した例を示しました。フェチュイン由来の中性糖鎖、シアル化糖鎖の両方において、選択性、分離ともに2液グラジエントによる分析結果と同等の結果が得られています。

ACQUITY UPLC H-Class Bioシステムのクォータナリ送液システムを利用して、溶媒Cに添加剤として150 mMギ酸アンモニウム（pH 4.7）をセットし、グラジエント中、一定組成で送液しました。溶媒Aは水、溶媒Bはアセトニトリルとしました。これら3液を自在に混合することにより、簡単にグラジエントの最適化を行うことができます。新たに溶媒を調製することなく、溶媒Cの送液比率を変えるだけで、分離条件を変化させることも可能です。Auto•Blend Plus テクノロジーにより、添加剤濃度、イオン強度、pHを変化させる一連の分析条件検討をプログラムしておくことにより、無人の状況で検討を進めることができ、最適な分析条件を、最短の時間で得ることができます。

ACQUITY UPLC H-Class Bioシステムでは、Auto•Blend Plusテクノロジーによる3液グラジエントを使用することで分析条件の検討にかかる時間を短縮し、頑健で、優れた分離と再現性の高い分析法を開発することが可能です。

まとめ

ACQUITY UPLC H-Class Bioシステムを使用して、糖タンパク質由来糖鎖を良好に分離することができました。Auto•Blend Plusテクノロジーにより、添加剤のストック溶液と水や有機溶媒を準備するだけで、自在に、選択性の検討、グラジエントや添加剤組成の最適化を行うことができます。さらにラボにとって負担であった溶媒調製、溶媒置換等にかかる作業、所要時間を著しく削減し、糖鎖分析の効率が向上します。Auto•Blend Plusテクノロジー機能を持つACQUITY UPLC H-Class Bioシステムをご使用いただくことにより、分析法開発にかかる時間を大きく削減し、その結果、ラボの生産性を向上させることが可能です。

適用規格：JISQ9001:2008(ISO9001:2008)
登録番号：JMAQA-331 登録日：1999年05月31日
審査登録範囲：理科学機器（液体クロマトグラフ・質量分析装置・ データ管理システム等）の輸入・販売から保守業務までのトータルサポート及び保守プランの設計・開発

Waters、ACQUITY UPLC および UPLC は Waters Corporation の登録商標です。The Science of What's Possible および Auto•Blend Plus は Waters Corporationの商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

このISO9001認証登録ロゴは、Waters Corporationのものです。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡

©2010 Waters Corporation. Produced in Japan.
2010年10月 720003605JA PDF