



SEPARATION REPORT

超高性能イオン交換クロマトグラフィー用充填カラム TSKgel DEAE-NPRによる核酸の分離(I) (巨大DNAおよびRNAの分離)

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. カラム使用上の注意	1
3. 巨大DNAの分離	2
4. RNAの分離	5
5. おわりに	6

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、分子生物学の分野でも広く利用されるようになり、遺伝子産物はもちろんのこと、合成オリゴヌクレオチドやDNAフラグメント、プラスミド等の分離精製に応用されています。一方、電気泳動と同程度の高い分離能が短時間で得られるような充填剤の開発が望まれています。

最近、一般的な充填剤とは異なり、充填剤にポア(穴)のない非多孔性ポリマゲルを基材としたイオン交換クロマトグラフィー用充填カラムTSKgel DEAE-NPRが開発され、タンパク質の分離に良好な結果が得られています(セパレーションレポートNo056参照)。この非多孔性充填剤には、ポアがないため、試料は充填剤外部表面だけの相互作用により分離されます。このため試料ピークの広がりを小さく抑えることができます。

粒子径 $2.5\mu\text{m}$ という微細粒子を用いているため、分離時間わずか10分以内で非常に高い分離が得られ、いわゆる超高性能液体クロマトグラフィーが可能となりました。

このレポートでは、この非多孔性充填剤TSKgel DEAE-NPRを用い巨大DNAおよびRNAの分離について報告いたします。なお、オリゴヌクレオチドの分離については、続報(II)(セパレーションレポートNo058)で報告いたします。

2. カラム使用上の注意

非多孔性イオン交換クロマトグラフィー用充填カラムTSKgel DEAE-NPRおよびTSKgel SP-NPRは、微量試料でも分離分析できる非常に高性能の充填カラムです。しかし一方では、カラムの汚れに対しても非常に敏感です。従って、これらのカラムを効率良く使用するためには、カラムの保守に対して、従来の多孔性充填剤カラムよりも一層の注意が必要です。

(1)緩衝液

カラムは試料中の汚れからくる汚染のほか、緩衝液に使用した水や試薬中の不純物により汚染されます。従って、水には超純水、HPLC用蒸留水、注射用蒸留水などを使用し、試薬類はHPLC用グレードまたは特級品を使用し、緩衝液はフィルタ($0.22\mu\text{m}$ または $0.45\mu\text{m}$)で濾過したものをご使用ください。

(2)HPLCシステム

カラム内への微粒子や不純物の進入を防ぐため、カラムと送液ポンプの間にラインフィルタ($0.22\mu\text{m}$ または $0.45\mu\text{m}$)を取り付けてください。使用中にシステムの圧力損失が $150\text{kg}/\text{cm}^2$ 以上(流速 $1.0\text{ml}/\text{min}$ で)に上昇した場合は、ラインフィルタが目づまりを起こしていると考えられるので、交換してください。

(3)洗浄再生

カラムの分離能低下の原因の一つに、試料中の不純物の充填剤への吸着による劣化が考えられます。この場合、カラムをアルカリ等の溶液で洗浄すると回復することがあります。詳細については、カラムに添付されている取扱説明書を参照してください。

3. 巨大DNAの分離

(1) DNAフラグメントの分離

図-1に ϕ X-174 RF DNAのHae III消化物のクロマトグラムを示します。72-310塩基対(base pair: bp)の分離は、従来の多孔性充填剤とほとんど同じですが、603-1,353bpの大きいフラグメントが良く分離されています。分離時間はわずか12分です。

図-2に巨大DNAフラグメントの分離を示します。試料は λ DNAのHind III消化物です。溶離条件は0.5Mから1.0Mへの10分間リニアグラジエントを用いています。分離はわずか5分で終了し、a、b、c、d、eの5つのシャープなピークが見られます。フラグメント全体の回収率は85%でした。

各ピークの電気泳動図を図-3に示します。ピークaは2,027と2,322bpのフラグメントの混合物ですが、残りのピークb、c、d、eは、全て1つのフラグメント4,361、6,557、9,416、23,130bpに対応し、塩基対数の小さい順に溶出していることがわかります。この結果から、1,000bp以上の巨大フラグメントでも、大きさが約1.5倍違えば、わずか5分で分離できることがわかりました。

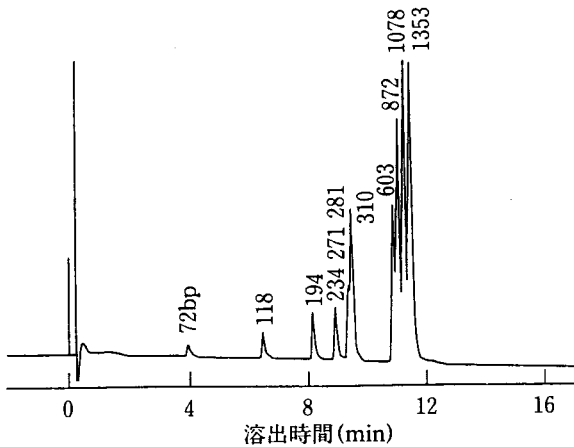


図-1 ϕ X-174 RF DNAのHae III 消化物の分離

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID \times 3.5cm

溶離液; A: 20mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 9)

B: A + 0.5M NaCl

A \rightarrow B リニアグラジエント (50分)

流速; 1.0ml/min

温度; 25 $^{\circ}$ C

検出; UV (260nm)

試料; ϕ X-174 RF DNAのHae III 消化物 (1.25 μ g)

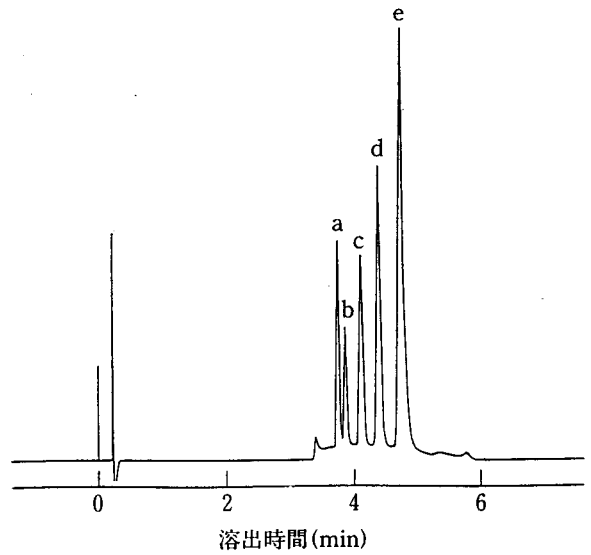


図-2 λ DNAのHind III 消化物の分離

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID \times 3.5cm

溶離液; A: 20mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 9) + 0.5M NaCl

B: 20mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 9) + 1.0M NaCl

A \rightarrow B リニアグラジエント (10分)

流速; 1.0ml/min

温度; 25 $^{\circ}$ C

検出; UV (260nm)

試料; λ DNAのHind III 消化物 (2 μ g / 4 μ l)

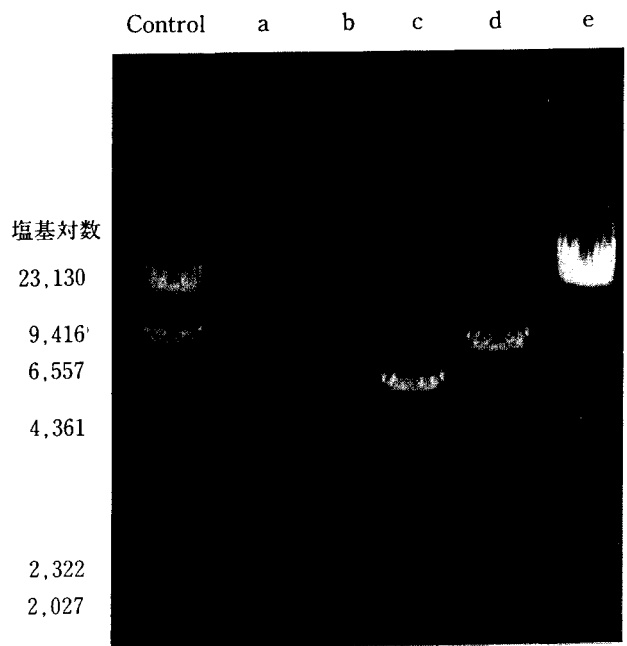


図-3 図-2で得られた各画分のアガロースゲル電気泳動図

control; 分離前の試料

a~e; 図-2の各画分

図-4にDNAフラグメントのカラムからの溶出位置と塩基対数の関係を示します。約300bp以上のフラグメントでは、溶出位置と塩基対数の間に、ほぼ直線関係が見られます。ややばらつきが見られますが、塩基組成の影響が考えられます。

図-5に分離能の流速依存性を示します。一般に、グラジエント時間一定の場合、分離能は流速に依存し、流速が高いほど分離能が上がります。左図の小さいフラグメントの分離に関してはほぼ同様なことが言え、流速1 ml/minまでは分離能が向上します。一方、右図の大きなフラグメントについては逆に流速が低いほうが分離能が高くなる傾向があります。しかしあまり流速を下げると回収率が低くなるという結果が得られました。

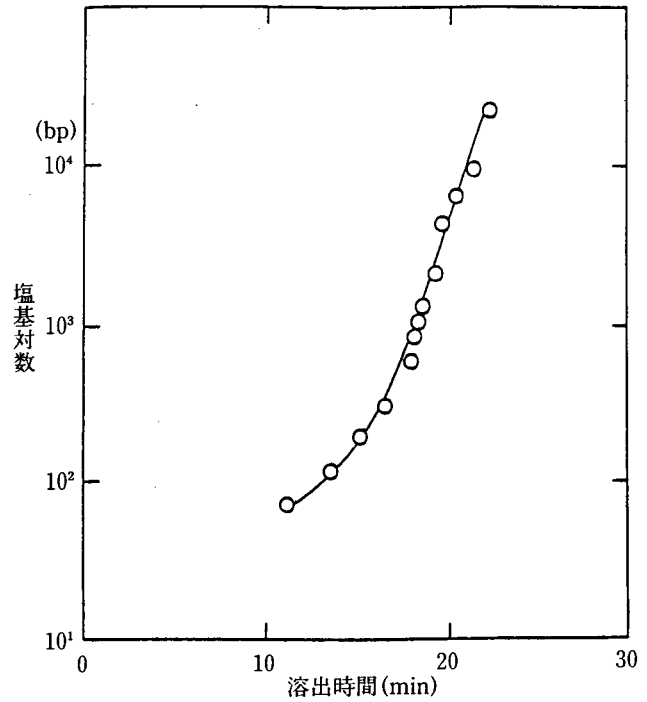


図-4 溶出時間と塩基対数との関係

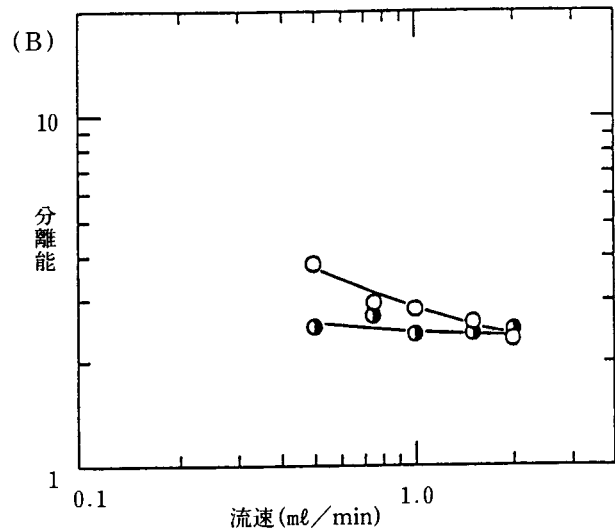
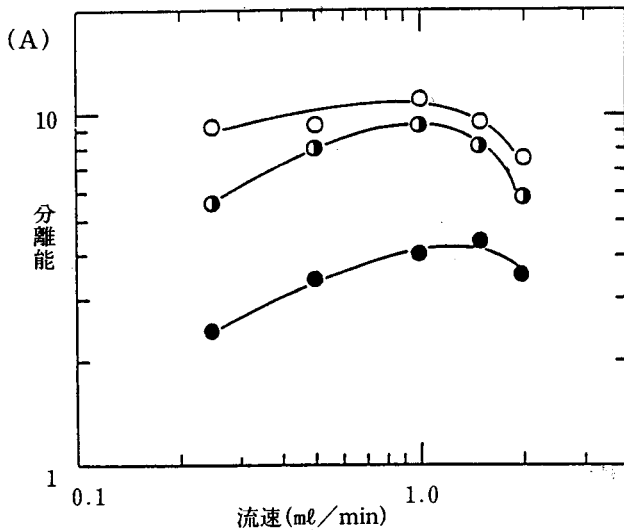


図-5 分離能の流速依存性

A ; 試料： ϕ X-174 RF DNAのHae III 消化物

分離能：(○) 72-118 bp；(◐) 118-194 bp

(●) 194-234 bp

B ; 試料： λ DNAのHind III 消化物

分離能：(○) 9,416-23,130 bp

(◐) 6,557-9,410 bp

図-6に分離能の塩濃度勾配依存性を示します。一般に分離能は、塩濃度勾配が小さい、すなわちグラジエント時間が長い方が分離能が高くなる傾向があります。A図の小さいフラグメントの分離については同様なことが言えますが、B図の大きいフラグメントの分離では、塩濃度勾配が50mM/minすなわち10分間リニアグラジエントの場合に分離が最も良くなりました。

なぜ巨大DNAフラグメントで溶出挙動が異なるかは今のところ不明です。

図-7に巨大DNAフラグメントにおける分離能の試料負荷量依存性を示します。各フラグメント間の分離能の試料負荷量依存性が異なり、23,130-9,416bp間での最高の分離能を得るための最大試料負荷量は約10 μ gですが、その他のピーク間では数十 μ gと考えられます。

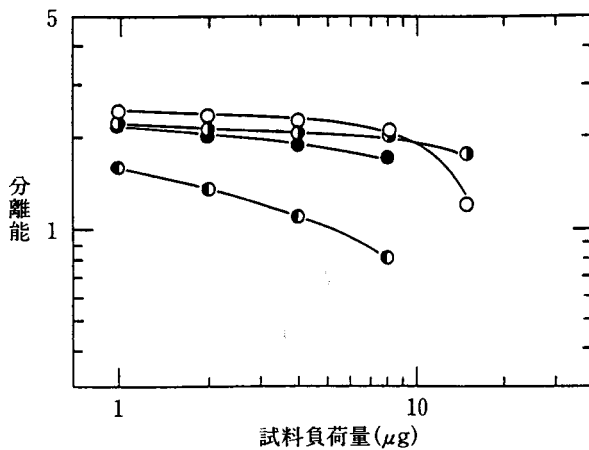


図-7 分離能の試料負荷量依存性

試料： λ DNAのHind III 消化物

分離能：(○)23,130-9,416 bp

(●) 9,416-6,557 bp

(●) 6,557-4,361 bp

(●) 4,361-2,322 bp

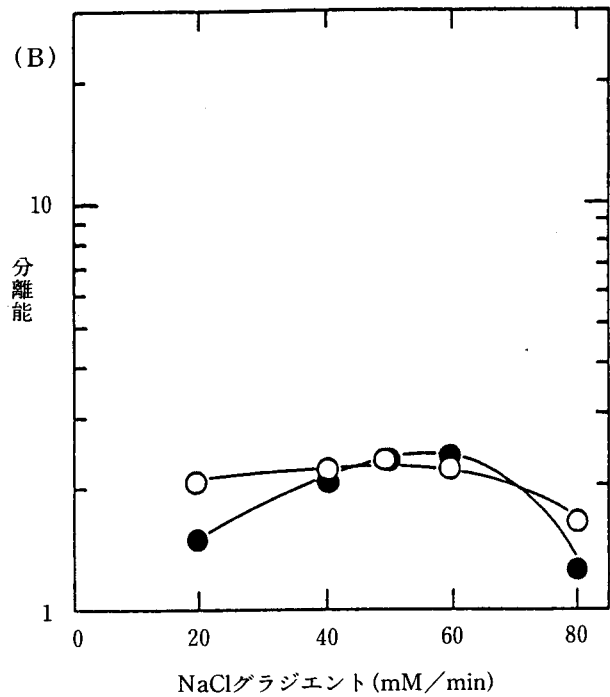
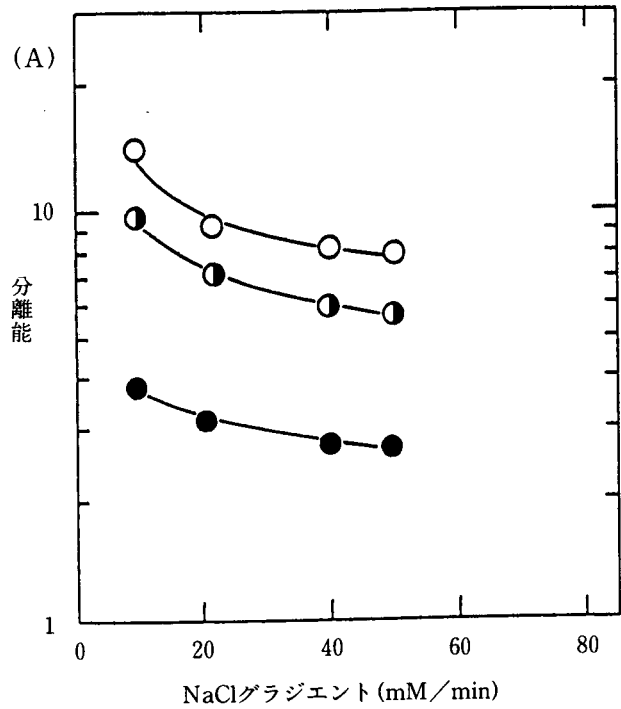


図-6 分離能の塩濃度勾配依存性

A；試料： ϕ X-174 RF DNAのHae III 消化物

分離能：(○) 72-118 bp

(●) 118-194 bp

(●) 194-234 bp

B；試料： λ DNAのHind III 消化物

分離能：(●) 9,416-23,130 bp

(○) 6,557-9,416 bp

(2) プラスミドの分離

図-8にプラスミドpBR322の分離クロマトグラムを示します。図には小さなピークと、メインピークにショルダーが見られプラスミド中のLinear, open circle, closed circleの混合物が分離しているものと考えられます。

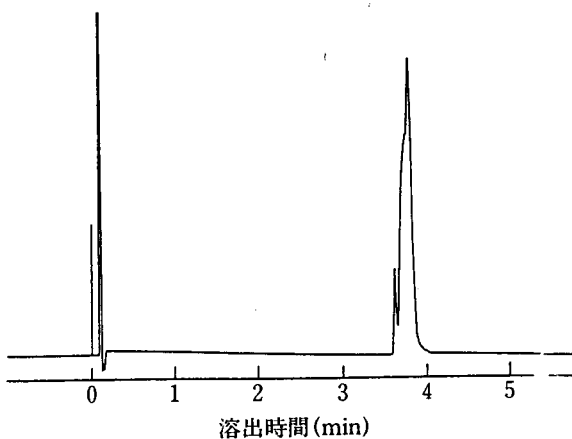


図-8 プラスミドpBR322の分離

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
溶離液; A: 20mM トリス-HCl緩衝液(pH8.0) +
0.5M NaCl
B: 20mM トリス-HCl緩衝液(pH8.0) +
1.0M NaCl
A→Bリニアグラジエント(10分)

流速; 1.5ml/min

温度; 25°C

検出; UV(260nm)

試料; pBR322(0.6μg/5μl)

4. RNAの分離

図-9、図-10に比較的小さいRNAとしてtRNAの分離、図-11、図-12に大きなRNAの分離として16S、23S rRNAの分離およびMS-2ファージRNA(3,569ヌクレオチド)の分離クロマトグラムを示します。分離時間は約10分と非常に速く、しかも高い分離能が得られています。また回収率も定量的でした。分離に関して流速やグラジエント時間の影響を調べたところ、分離能は、比較的小さいDNAフラグメント同様、一般的な流速依存性およびグラジエント時間依存性を示しました(3章参照)。しかし、かなり大きなRNAであるMS-2ファージRNAについては、巨大DNAフラグメントと同様、流速を下げたり(1ml/min以下)、グラジエント時間を長くしたりすると(30分以上)、回収率の低下が見られました。

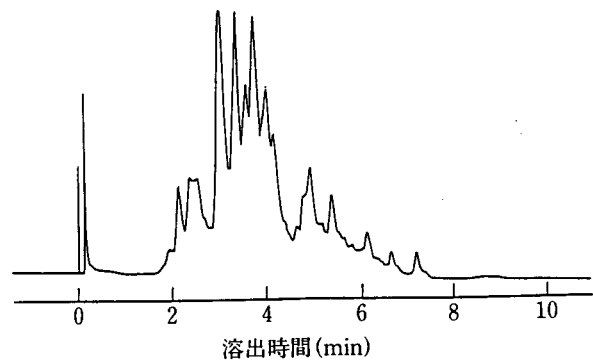


図-9 大腸菌(*E. coli*)由来tRNAの分離

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
溶離液; A: 20mM トリス-HCl緩衝液(pH7.5) +
0.35M NaCl
B: 20mM トリス-HCl緩衝液(pH7.5) +
1.0M NaCl
A→Bリニアグラジエント(40分)

流速; 1.5ml/min

温度; 25°C

検出; UV(260nm)

試料; tRNA(*E. coli* MRE600, 4μg)

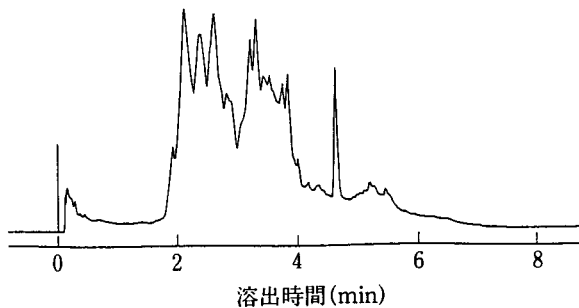


図-10 パン酵母由来tRNAの分離

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
 溶離液；A：20mM トリス-HCl緩衝液(pH7.5) +
 0.35M NaCl
 B：20mM トリス-HCl緩衝液(pH7.5) +
 1.0M NaCl
 A→Bリニアグラジエント(20分)

流速；1.5ml/min

温度；25℃

検出；UV(260nm)

試料；tRNA(パン酵母、10μg)

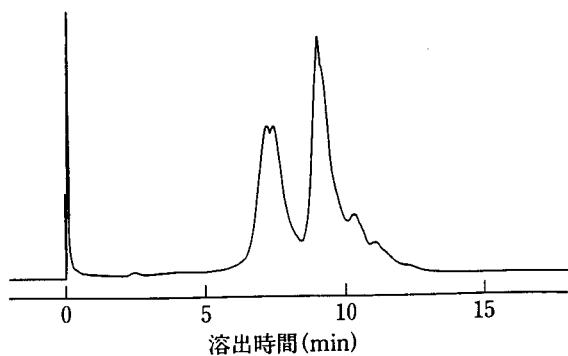


図-11 大腸菌(*E. coli*)由来16S、23S rRNAの分離

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
 溶離液；A：20mM トリス-HCl緩衝液(pH7.5) +
 0.5M NaCl
 B：20mM トリス-HCl緩衝液(pH7.5) +
 1.0M NaCl
 A→Bリニアグラジエント(60分)

流速；1.5ml/min

温度；25℃

検出；UV(260nm)

試料；16S、23S rRNA(*E. coli* R-13, 0.1 unit)

5. おわりに

充填剤にポアのない非多孔性イオン交換クロマトグラフィ用充填カラムTSKgel DEAE-NPRを用いることにより塩基対、1,000以上の巨大DNAフラグメントの分離が可能になりました。また塩基対数が約1.5倍違えば、フラグメントはほぼ完全に分離できました。RNAについても小さいtRNAから、かなり大きいファージRNAまで良好に分離できることがわかりました。分離時間も、わずか10分以内と非常に速く、TSKgel DEAE-NPRは今後電気泳動に代わる、DNAやRNAなど核酸の同定や分離精製に有用であると考えられます。

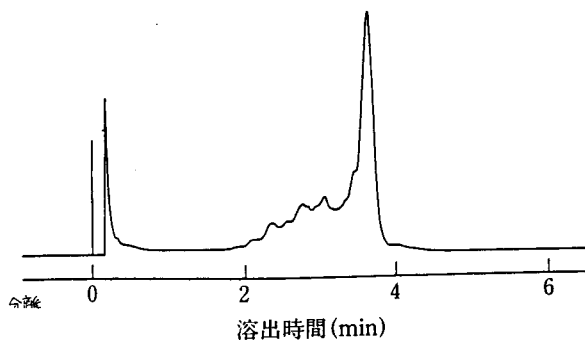


図-12 MS-2 ファージRNAの分離

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
 溶離条件；グラジエント時間を除き図-11に同じ
 グラジエント時間；15分
 試料；MS-2 ファージRNA(0.8μg)