



TOSOH

SEPARATION REPORT

超高性能疎水クロマトグラフィ用充填カラム TSKgel Butyl-NPRによるタンパク質の分離

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. カラム使用上の注意	1
3. 基本的性質	2
4. おわりに	6

1. はじめに

近年、疎水クロマトグラフィ(HIC)はタンパク質の分離、分析に広く利用されるようになりました。HICにおけるタンパク質の分離機構は、タンパク質の疎水性部分と充填剤の疎水性リガンドとの疎水性相互作用がそれぞれのタンパク質によって異なることに基づいています。一般に、疎水性相互作用は高イオン強度下で強くなりますので、HICでは、高濃度の塩を含む移動相中でタンパク質を充填剤の疎水性リガンドに吸着させ、移動相中の塩濃度を下げるによりタンパク質を溶出します。HICと同様に試料と充填剤の疎水性相互作用に基づく分離機構をもつクロマトグラフィとして逆相クロマトグラフィ(RPC)があります。RPCでは移動相に有機溶媒を加えることにより移動相の極性を下げて試料を溶出しますので、多くの場合、タンパク質は変性状態で分離されます。これに対して、HICでは試料は塩溶液で溶出されますので、タンパク質を温和な条件で分離することができます。HICは、古くから使用されているゲル濾過クロマトグラフィ(GFC)やイオン交換クロマトグラフィ(IEC)とは異なる分離機構をもっているため、これらの手段を併用することによりタンパク質の分離精製を効率的に行うことができます。また、従来ではタンパク質分画からの核酸の除去はGFCにより行われていましたが、タンパク質の疎水性に比べて核酸の疎水性が極めて低いため、HICにより容易に除去できます。さらに、HICでは高濃度の塩を含む溶液中で分離が行われるため、IECのように試料の脱塩が不要です。このような背景から、HICによるタンパク質の分離が盛んに行われるようになり、最近では他の分離モードと同様に、HICの高速化、高性能化が達成されました。なかでも当社が開発した高性能HIC用多孔性充填剤TSKgel Phenyl-5PWおよびTSKgel Ether-5PW(セパレーションレポートNo.031、032、043参照)は多くのタンパク質に対して優れた分離能を示しました。

ところで、現在では高性能液体クロマトグラフィ(HPLC)は生化学分野における重要な分離手段となり、今後、さらに高速化、高性能化が期待されています。これまでに広く使用されている多孔性充填剤を用いたHPLCの超高速化、超高性能化は充填剤の粒子を微小化することにより試みられています。一方、当社は充填剤の細孔をなくし、しかも微粒子化することにより超高速化、超高性能化したIEC用充填剤(セパレーションレポートNo.056、057、058、参照)およびRPC用充填剤(セパレ

ーションレポートNo.063参照)を開発しました。これらの非多孔性充填剤では、充填剤内部への試料の拡散が起こらないため、試料ピークの広がりを抑えることができます。したがって、非多孔性充填剤は多孔性充填剤よりも高い分離能を有します。

本稿では、HIC用として新たに開発された非多孔性充填剤TSKgel Butyl-NPRの基本的性質について紹介します。

2. カラム使用上の注意

非多孔性HIC用充填カラムTSKgel Butyl-NPRは、微量試料でも分離分析できる非常に高性能のカラムです。しかし、一方ではこのカラムは汚れに対しても非常に敏感です。したがって、このカラムを効果的に使用するためには、カラムの保守に対して、従来の多孔性充填カラムよりも一層の注意が必要です。

(1) 溶離液

カラムは試料中の汚れによる汚染のほか、溶離液に使用した水や試薬中の不純物により汚染します。したがって、水は超純水、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て下さい。また、溶離液はフィルタ(0.22 μ mまたは0.45 μ m)で濾過したものを使用して下さい。

(2) HPLCシステム

溶離液グラジエントは、デッドボリュームが小さく、高精度で再現性の高い高圧(吐出)グラジエント方式をおすすめします。また、カラム内への微粒子や不純物の進入を防ぐため、インジェクションバルブと送液ポンプの間にフィルタアッセイ(品番14594)と0.45 μ mフィルタ(品番06280)を取り付けて下さい。流速1.0ml/minで送液した際、システムの圧力損失が180kg/cm²以上に上昇した場合は、ラインフィルタが目づまりを起こしていると考えられますので、フィルタを交換して下さい。

(3) 洗浄再生

カラムの分離性能の低下の原因のひとつとして、試料中の不純物の充填剤への吸着によるカラムの劣化が考えられます。このような場合、カラムをアルカリ性水溶液で洗浄すると、分離性能が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下さい。

3. 基本的性質

(1) タンパク質混合物の分離

図-1に非多孔性充填剤TSKgel Butyl-NPRによる市販タンパク質の混合物の分離例を示します。溶離液中の硫酸アンモニウム濃度を2.3Mから0Mまで12分間で直線的に減少させて試料を溶出しました。約8分という非常に短時間で高分離能が得られました。

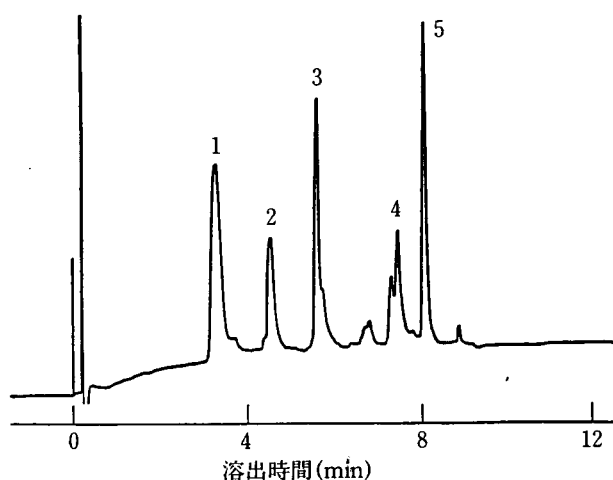


図-1 TSKgel Butyl-NPRによるタンパク質混合物の分離

溶離液；A：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)

+2.3M硫酸

B：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)

A→B リニアグラジエント(12分)

流速；1.0ml/min

温度；25℃

検出；UV(280nm)

試料；1. ミオグロビン(4 μg) 2. リボヌクレアーゼ(4 μg) 3. リゾチーム(1.5 μg)
4. α-キモトリプシン(3 μg) 5. α-キモトリプシノーゲン(2 μg)

図-2に非多孔性充填剤TSKgel Butyl-NPRと従来の多孔性充填剤TSKgel Phenyl-5PWおよびTSKgel Ether-5PWとのタンパク質混合物の分離能の比較を示します。それぞれ標準的な溶離条件で分離しました。非多孔性充填剤TSKgel Butyl-NPRのほうが、より微量の試料(約1/30~1/10)を短時間で高分離能で分離できます。

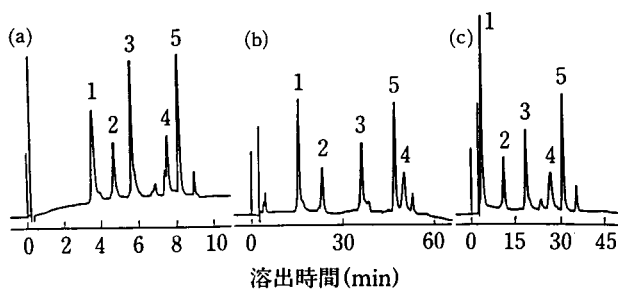


図-2 非多孔性充填剤と多孔性充填剤との比較

(a) カラム；TSKgel Butyl-NPR

4.6mmID×3.5cm

溶離条件；図-1に同じ

(b) カラム；TSKgel Phenyl-5PW

7.5mmID×7.5cm

溶離液；A：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)

+1.8M硫酸

B：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)

A→B リニアグラジエント(60分)

(c) カラム；TSKgel Ether-5PW

7.5mmID×7.5cm

溶離条件；(b)に同じ

試料；(a)図-1に同じ

(b)、(c) 1. ミオグロビン(50 μg)

2. リボヌクレアーゼ(100 μg)

3. リゾチーム(50 μg)

4. α-キモトリプシン(50 μg)

5. α-キモトリプシノーゲン

(50 μg)

(2) 分離能に対する流速の影響

図-3にタンパク質の分離能に対する流速の影響を検討した結果を示します。流速が低い範囲では流速の上昇に伴い分離能が向上しています。しかし、流速1.0ml/min以上では分離能の流速依存性は小さくなります。また、ミオグロビンとリボスクレアーゼの場合には流速1.0ml/min以上では分離能はわずかに低下しています。図-4は流速0.5ml/minおよび1.0ml/minでのタンパク質の分離のクロマトグラムを示します。流速が高いほど分離に要する時間は短くなりますが、溶出してくる試料は、より希釈されます。以上の結果から、分離能、試料の希釈および分離時間を考慮すると、流速は1.0ml/min程度が最適と思われます。

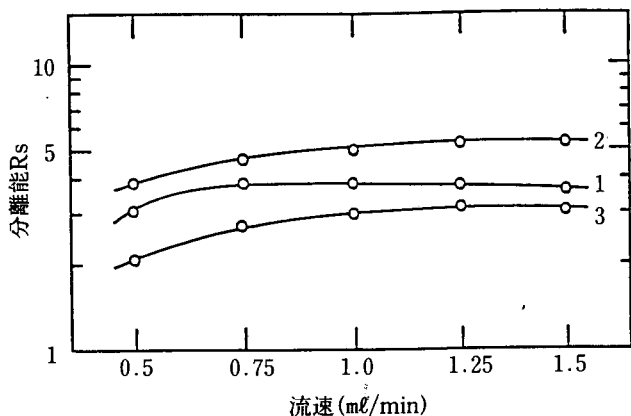


図-3 分離能の流速依存性

溶離条件；図-1に同じ(流速を除く)

流速；0.5~1.5ml/min

試料；1. ミオグロビンとリボスクレアーゼ
2. リボスクレアーゼとリゾチム
3. α -キモトリプシンと α -キモトリプシノーゲン

分離能；上記のそれぞれの組のタンパク質のピーク幅と溶出容量から算出

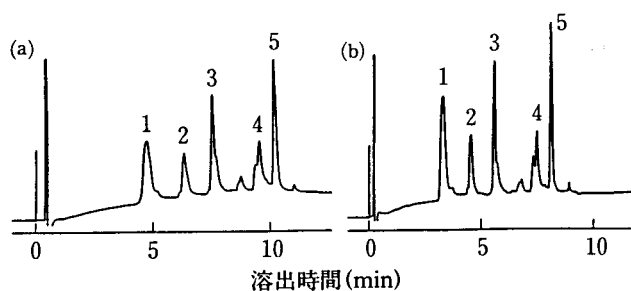


図-4 タンパク質の分離に対する流速の影響

溶離条件；図-1に同じ(流速を除く)

流速；(a) 0.5ml/min (b) 1.0ml/min

試料；図-1に同じ

(3) 分離能に対するグラジエント時間の影響

図-5にタンパク質の分離能のグラジエント時間依存性を示します。ミオグロビンとリボスクレアーゼの分離能を除き、短いグラジエント時間の範囲ではグラジエント時間が長くなるにしたがい分離能は向上していますが、グラジエント時間15分以上では分離能のグラジエント時間依存性は小さくなっています。一方、ミオグロビンとリボスクレアーゼの場合、グラジエント時間が長くなるにしたがい分離能は低下しています。図-6はグラジエント時間5分および15分のときのタンパク質混合物の分離のクロマトグラムを示しますが、グラジエント時間が短いほど分離に要する時間は短く、試料の希釈も抑えられます。以上のことから、グラジエント時間は10~15分が良いと思われます。

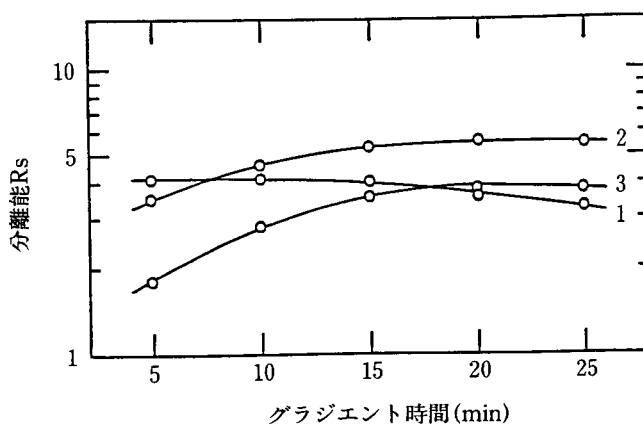


図-5 分離能のグラジエント時間依存性

溶離条件；図-1に同じ(グラジエント時間を除く)

グラジエント時間；5~25分

試料；図-3に同じ

分離能；図-3と同様にして算出

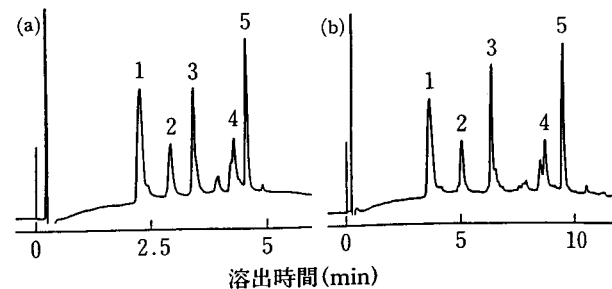


図-6 タンパク質の分離に対するグラジエント時間の影響

溶離条件；図-1に同じ(グラジエント時間を除く)

グラジエント時間；(a) 5分 (b) 15分

試料；図-1に同じ

(4) 分離能に対する初期溶離液の硫酸アンモニウム濃度の影響

疎水クロマトグラフィでも使用される塩は硫酸アンモニウム(硫安)、硫酸ナトリウム、リン酸カリウムなどです。なかでも硫安は溶解度が高く、タンパク質を変性させることが少ないため最もよく使われます。図-7に分離能に対する初期溶離液の硫安濃度の影響を示します。いずれも流速1.0ml/minでそれぞれの濃度の硫安を含む初期溶離液から硫安を含まない最終溶離液まで12分

間のグラジエントで分離しました。ミオグロビンとリボスクレアーゼの分離能を除き、初期硫安濃度が低いほど分離能が向上しています。図-8に初期硫安濃度が2.0M、2.25M、2.5Mのときのタンパク質混合物の分離のクロマトグラムを示します。初期硫安濃度が低いほどタンパク質の保持容量は小さくなり、分離に要する時間が短くなります。しかし、ピーク幅はわずかに広がります。また、初期硫安濃度1.75M以下ではミオグロビンはカラムに保持されずにボイドボリュームの位置に溶出しました。

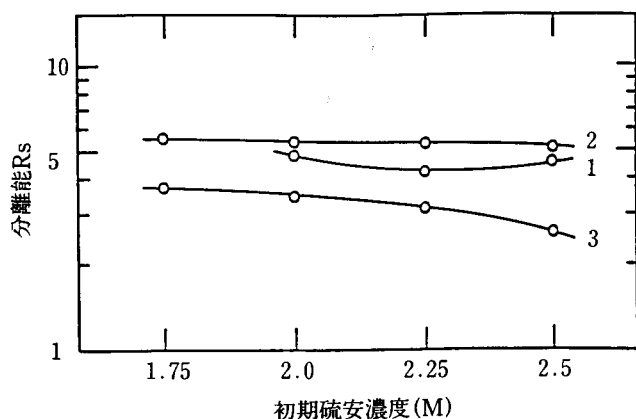


図-7 分離能の初期硫安濃度依存性

溶離液； A：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)
+1.75~2.5M硫安
B：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)
A→B リニアグラジエント(12分)

流速；1.0ml/min

温度；25℃

検出；UV(280nm)

試料；図-3と同じ

分離能；図-3と同様にして算出

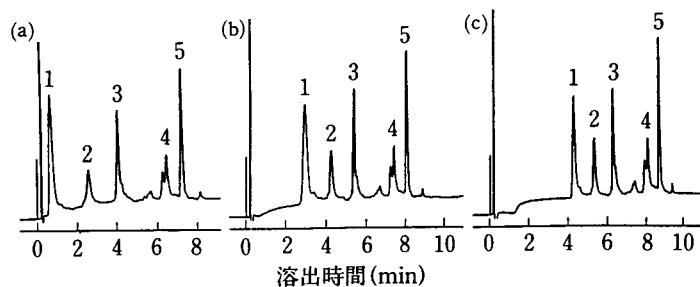


図-8 タンパク質の分離に対する初期硫安濃度の影響

溶離液； A：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)

(a)+2.0M硫安

(b)+2.25M硫安

(c)+2.5M硫安

B：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)

A→B リニアグラジエント(12分)

流速；1.0ml/min

温度；25℃

検出；UV(280nm)

試料；図-1と同じ

(5) 試料負荷量

図-9にピーク幅に対する精製タンパク質の試料負荷量の影響を示します。試料によって多少異なりますが、試料負荷量2~5 μg まではほぼ一定のピーク幅が得られました。したがって、分離能を低下させない最大の試料負荷量は2~5 μg であると言えます。また、図-10に粗製タンパク質の分離能に対する試料負荷量を検討した結果を示します。試料は粗製フォスフォグルコースイソメラーゼを用いました。試料負荷量25 μg と100 μg とではクロマトグラムにはほとんど変化は見られず良好に分離

されていますが、100 μg 以上では分離能は低下しました。したがって、粗製タンパク質の場合は含まれる不純物の割合によって異なりますが、分離能を低下させない最大の試料負荷量は100 μg 程度と思われます。

以上のように、非多孔性HIC用充填剤TSKgel Butyl-NPRの最大試料負荷量は従来の多孔性HIC用充填剤に比べてかなり低く(約1/250~1/20)なっています。これはTSKgel Butyl-NPRが非多孔性のため試料との相互作用に必要な充填剤の表面積が小さいことによるものと考えられます。

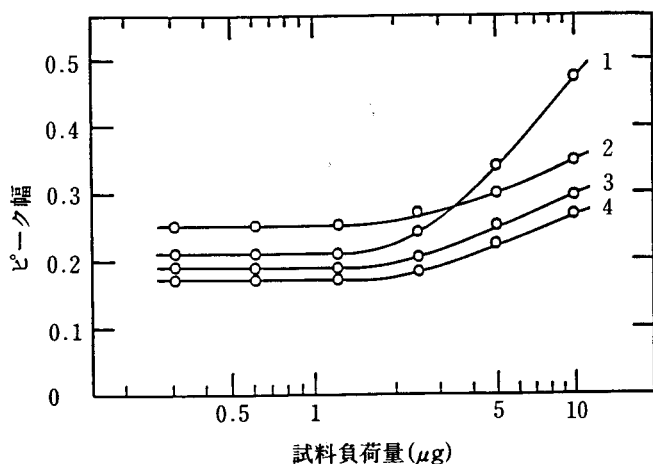


図-9 ピーク幅に対する試料負荷量の影響

溶離条件；図-1に同じ

試料；1. ミオグロビン 2. オボアルブミン
3. リゾチーム 4. α -キモトリプシノーゲン

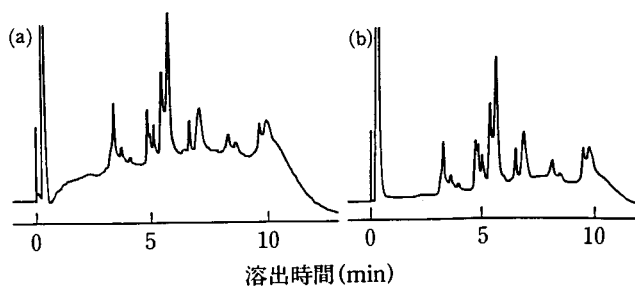


図-10 粗製試料の試料負荷量の影響

溶離液；A：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)
+1.8M硫酸

B：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)

A→B リニアグラジエント(10分)

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；UV(280nm)

試料；粗製フォスフォグルコースイソメラーゼ

(a) 25 μg (b) 100 μg

(6) タンパク質の回収率

表-1にTSKgel Butyl-NPRから溶出されたタンパク質の回収率を示します。いずれも試料負荷量は2 μ gで、標準的な溶離条件で分離しました。ここで用いたタンパク質は、微量の試料負荷量にもかかわらず、すべて高い回収率が得られました。したがって、TSKgel Butyl-NPRは微量のタンパク質の分離、分析および分取に適していると考えられます。

表-1 タンパク質の回収率

タンパク質	回収率 (%)
ミオグロビン	95
リボヌクレアーゼ	89
リゾチーム	101
α -キモトリプシン	91
α -キモトリプシノーゲン	93
トリプシンインヒビター	84
オボアルブミン	90

溶離条件；図-1に同じ

試料；各種タンパク質(2 μ g)

回収率；溶出ピークの面積から算出

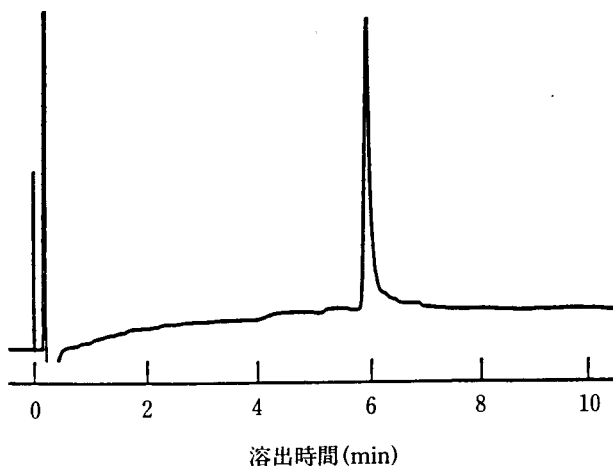


図-11 乳酸脱水素酵素の分離

溶離液；A：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)

+ 2M硫酸

B：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)

A→B リニアグラジエント(10分)

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；UV(280nm)

試料；乳酸脱水素酵素(2.5 μ g)

活性回収率；90%

(7) 酵素活性の回収率

図-11、12にTSKgel Butyl-NPRから溶出された酵素の活性の回収率を検討した結果を示します。図-11は市販精製乳酸脱水素酵素2.5 μ gのクロマトグラムです。活性回収率は90%でした。また、図-12は市販粗製ペルオキシダーゼ25 μ gのクロマトグラムです。酵素活性は広い分画に溶出しましたが、回収率は80%でした。以上のように、試料負荷量が微量の場合でも、活性回収率は高く、TSKgel Butyl-NPRは微量の酵素の分離精製に適していると考えられます。

4. おわりに

以上、超高性能疎水クロマトグラフィ用充填カラムTSKgel Butyl-NPRの基本的性質について紹介しました。TSKgel Butyl-NPRは、ごく微量の試料を迅速かつ高分離能で分離できる画期的な充填カラムです。したがって、TSKgel Butyl-NPRは、医療診断分野、大量精製の工程管理あるいは細胞培養液中のタンパク質のチェックなどリアルタイムの分析が必要とされる分野に有用であると考えられます。一方、TSKgel Butyl-NPRは非多孔性のため、従来の多孔性充填剤に比べ、最大試料負荷量は少なく、大量精製には適していません。しかし、試料負荷量が非常に微量の場合でも高い回収率が得られます。したがって、TSKgel Butyl-NPRは微量試料の分離精製に適していると考えられます。

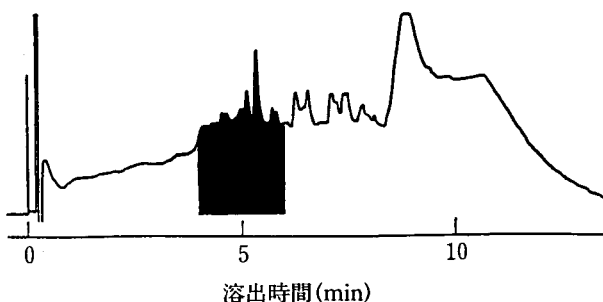


図-12 粗製ペルオキシダーゼの分離

溶離液；A：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)

+ 1.8M硫酸

B：リン酸緩衝液(pH7.0)

A→B リニアグラジエント(10分)

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；UV(280nm)

試料；粗製ペルオキシダーゼ(25 μ g)

活性回収率；81%

TSKgel Butyl-NPRによるタンパク質分離の標

準的溶離条件

HPLCシステム ⁽¹⁾	高压(吐出)グラジエントシステム
流速	1.0ml/min
硫安濃度勾配	0.15~0.23M/min
初期硫安濃度 ⁽²⁾	1.8~2.5M(試料により異なる)
最大試料負荷量 ⁽³⁾	精製品 2~5 µg 粗製品 数十~100µg(試料により異なる)
溶離液pH ⁽⁴⁾	中性付近(pH 2~12で使用可能)

- (1) インジェクションバルブと送液ポンプの間にラインフィルタ(0.45µm)を取り付けて下さい。
- (2) 目的とするタンパク質が塩析効果により沈澱せず、しかも、カラムに完全に吸着されるのに十分な濃度
- (3) 分離能を低下させない最大の試料負荷量
- (4) 水は超純水、HPLC用蒸留水あるいは注射用蒸留水を、試薬類はHPLC用グレードまたは特級品を使用して下さい。



TOSOH

東ソー株式会社 科学計測事業部

東京本社	計測販売課	☎(03)3586-9181	〒107 東京都港区赤坂1-11-39
大阪支店	科学計測課	☎(06) 344-3857	〒530 大阪市北区堂島浜1-2-6
名古屋支店	科学計測課	☎(052)211-5730	〒460 名古屋市中区錦1-17-13
福岡支店		☎(092)781-0481	〒810 福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店		☎(022)266-2341	〒980 仙台市青葉区一番町2-4-1
山口営業所		☎(0834)63-0020	〒746 山口県新南陽市開成町4560
科学計測	つくば営業所	☎(0298)55-8166	〒305 つくば市天久保1-16-10
科学計測	徳島営業所	☎(0886)23-8810	〒770 徳島市助任橋1-22
科学計測	静岡営業所	☎(054)273-1581	〒420 静岡市御幸町5-9