

SEPARATION REPORT

高性能・高吸着容量イオン交換クロマトグラフィー用カラム TSKgel[®] SuperQ-5PW とその応用

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel SuperQ-5PW の基本的性質	1
2 - 1. 総イオン交換容量	1
2 - 2. たんぱく質吸着容量	1
2 - 3. 化学的安定性	1
2 - 4. 回収率	1
2 - 5. 分離能	2
3. 分離能への溶離条件の影響	3
3 - 1. 試料負荷量の影響	3
3 - 2. 測定流速の影響	5
3 - 3. グラジエント時間の影響	5
3 - 4. 試料溶液中の塩濃度の影響	5
4. 応用例	7
4 - 1. モノクローナル抗体の分離	7
4 - 2. 卵白の分離	7
4 - 3. ウレアーゼの分離	7
4 - 4. リポキシダーゼの分離	7
5. TSKgel SuperQ-5PW から TOYOPEARL [®] SuperQ-650 へのスケールアップ	8
6. おわりに	9

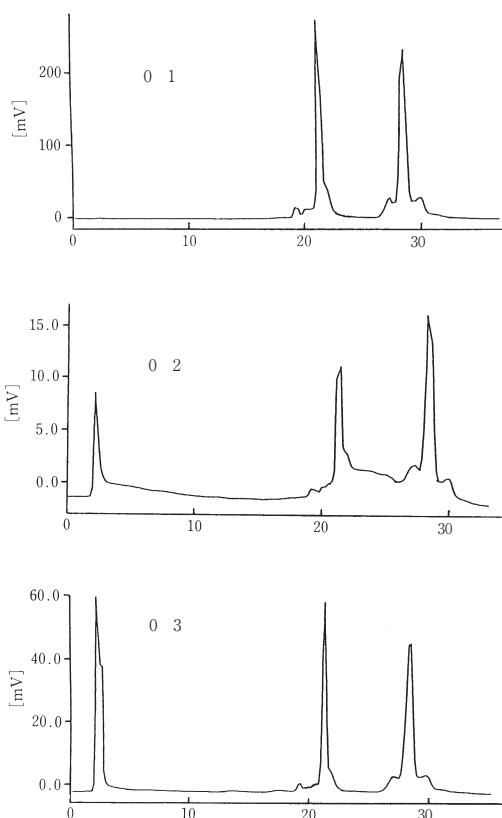


図-8 試料溶液中の塩濃度の影響 (1)

カラム：TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. × 7.5 cm
 溶離液；A：50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3)
 B：A + 0.5 mol/L NaCl
 A → B リニアグラジエント (60分)

流 速：1.0 mL/min

温 度：25 °C

検 出：UV (280 nm)

試 料：オブアルブミン、トリプシンインヒビター (各 0.5 mg in 500 μL)
 試料中の塩濃度は 0.1、0.2、0.3 mol/L NaCl

図-9 試料溶液中の塩濃度の影響 (2)

条件は図-7に同じ

ただし、試料は (1) 各 1 g/L、100 μL
 (2) 各 2 g/L、500 μL
 (3) 各 10 g/L、100 μL
 (4) 各 10 g/L、500 μL

試料中の塩濃度は、0.1 mol/L NaCl

4. たんぱく質の分離 (応用例)

4-1. モノクローナル抗体の分離

図-10、図-11 にマウス腹水中からそれぞれ異なるモノクローナル抗体 (IgG₁) を、試料注入量を変えて分離した例を示します。試料注入量は 100 μ L から 5,000 μ L まで変化させました。図-10 では、注入量 1000 μ L まで、ほぼ同じクロマトグラムが得られています。また得られたモノクローナル抗体画分をサイズ排除クロマトグラフィー (TSKgel G3000SW_{XL}) で純度検定したところ、共に純度 92 % と高純度な標品が得られていることがわかりました。また注入量 5,000 μ L では、若干不純物ピークの混入が見られますが、良好な分離が得られています。尚、得られたモノクローナル画分の純度は 89 % でした。

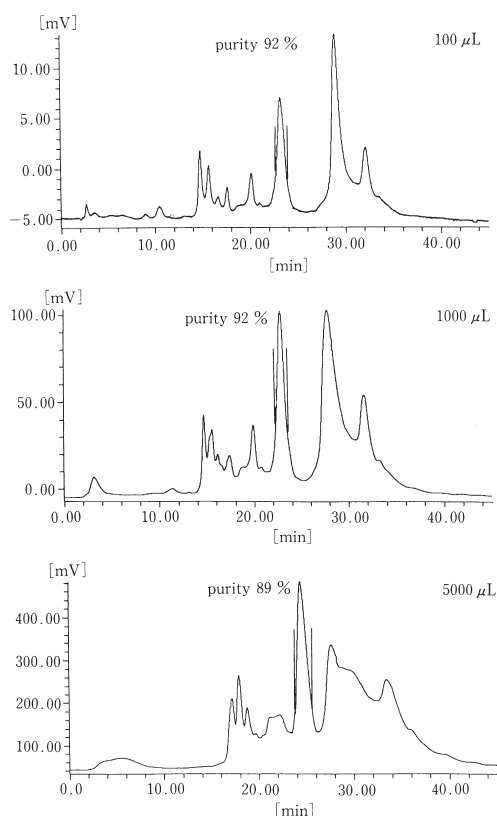


図-10 マウスモノクローナル抗体 A (IgG₁) の分離

カラム：TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. \times 7.5 cm

溶離液：A：20 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5)

B：A + 0.5 mol/L NaCl

A \rightarrow B リニアグラジエント (60分)

流速：1.0 mL/min

温度：25 $^{\circ}$ C

検出：UV (280 nm)

試料：マウス腹水 (\times 3)、緩衝液で希釈後、マイシヨリディスクでろ過

注入量 100、1,000、5,000 μ L

※ IgG₁ 画分の純度は、サイズ排除クロマトグラフィーによるピーク面積より求めた。

図-11 の別のモノクローナル抗体の分離では、マウス腹水中の不純物も、非常に良好に分離できており、注入量 5,000 μ L でも、得られたモノクローナル抗体の純度は、94 % と、分析レベルと同様な高純度のものが得られています。そのためこの試料については、さらに大量の試料注入も可能と思われます。

4-2. 卵白の分離

標準的な溶離条件でニワトリの卵白を分離した例を図-12 に示します。

4-3. ウレアーゼの分離

市販のウレアーゼ (Jack Beans) を分離した例を図-13 に示します。

4-4. リポキシダーゼの分離

市販の粗リポキシダーゼ (大豆) の分離例を図-14 に示します。

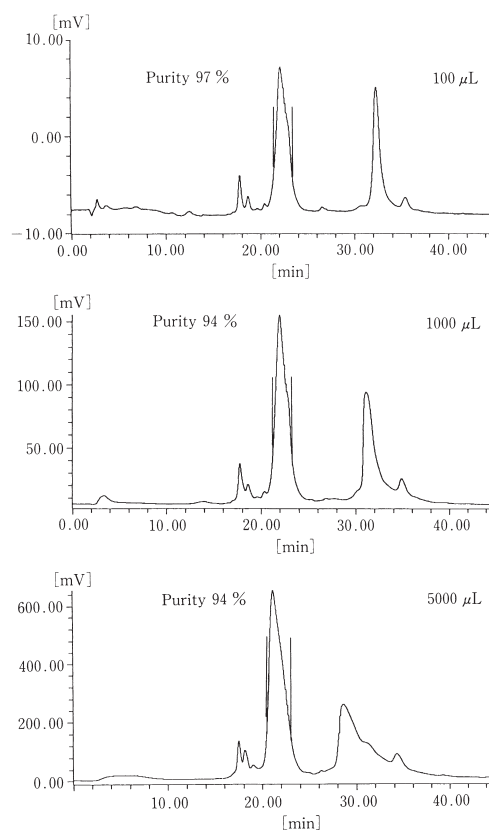


図-11 マウスモノクローナル抗体 B (IgG₁) の分離
条件は、図-9 に同じ

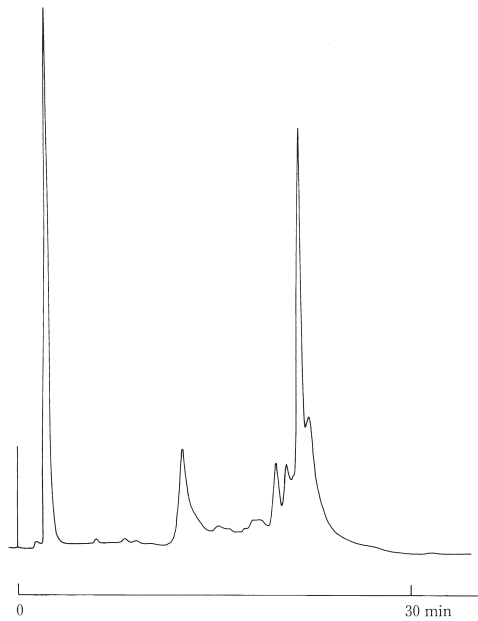


図-12 ニワトリ卵白 (Egg white) の分離
 カラム：TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. × 7.5 cm
 溶離液：A：50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6)
 B：A + 0.5 mol/L NaCl
 A→Bリニアグラジエント (60分)
 流速：1.0 mL/min
 温度：25℃
 検出：UV (280 nm)
 試料：ニワトリ卵白、1g/L、100 μL

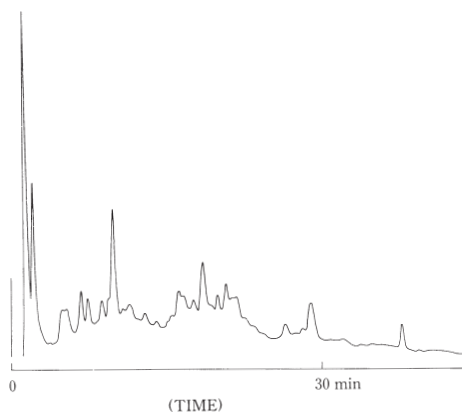


図-13 ウレアーゼ (Jack Beans) の分離
 条件は図-12に同じ
 ただし試料：10 g/L、100 μL

5. TSKgel SuperQ-5PW から TOYOPEARL SuperQ-650 へのスケールアップ

TSKgel SuperQ-5PW を用いた大量試料の分離精製に関しては分取カラム (カラムサイズ 21.5 mm I.D. × 15 cm) が用意されています。しかしさらに大量の試料分離や、工業的精製が目的の場合、HPLC 用カラムより中速クロマトグラフィー (MPLC) 用充填剤を用いた方が、有利な場合があります。

TSKgel SuperQ-5PW の場合、TOYOPEARL SuperQ-650 を用いてスケールアップが可能です。図-15に、TSKgel SuperQ-5PW と TOYOPEARL SuperQ-650S (35 μm)、TOYOPEARL SuperQ-650M (65 μm) を同一条件で分離したクロマトグラムを示します。試料の溶出位置は、ほぼ同じであり、TSKgel SuperQ-5PW と TOYOPEARL SuperQ-650 は、分離選択性がほぼ同じであることがわかります。(分離能は、充填剤の粒子径に反比例します)

次に、TOYOPEARL SuperQ-650S のグラジエント時間を変え、TSKgel SuperQ-5PW との分離能を比較しました。その結果を図-16に示します。TSKgel SuperQ-5PW (20分グラジエント) に比べ、TOYOPEARL SuperQ-650S では、150分グラジエントにより、不純物ピークの分離もかなり TSKgel SuperQ-5PW に近いものが得られています。

図-17、図-18には、TOYOPEARL SuperQ-650M を用いたスケールアップについて示します。TOYOPEARL SuperQ-650M では、HPLC に比べ、粒子径がかなり大きい (65 μm) ため、グラジエント時間を長くしたり、またカラム長さを長くすることにより、分離能を TSKgel SuperQ-5PW に近づけることが可能です。

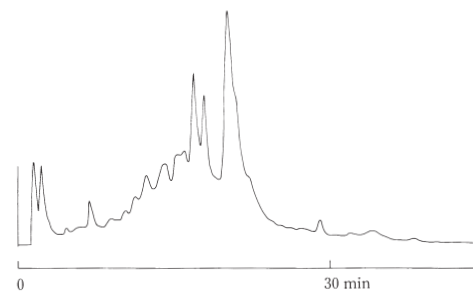


図-14 市販リポキシダーゼの分離
 条件は図-12に同じ
 ただし試料：6 g/L、100 μL

6. おわりに

たんぱく質高負荷容量高速イオン交換クロマトグラフィー用充填カラム TSKgel SuperQ-5PW の基本的性質とたんぱく質の分離例について紹介しました。TSKgel SuperQ-5PW は、分離能に優れているほか、たんぱく質の吸着容量が非常に大きく化学的安定性にも優れているため、分析レベル（分析カラム）での高純度精製やたんぱく質の粗抽出試料などの多成分試料からの大量分離・分取分離に最適です。表-5 に TSKgel SuperQ-5PW の標準使用条件を示します。また、既に分取精製用ゲルとして TOYOPEARL SuperQ-650 が上市されており、スケールアップやさらに大量処理や工業的分離精製まで対応できる商品構成となっているため生化学分野での応用、展開が期待されます。

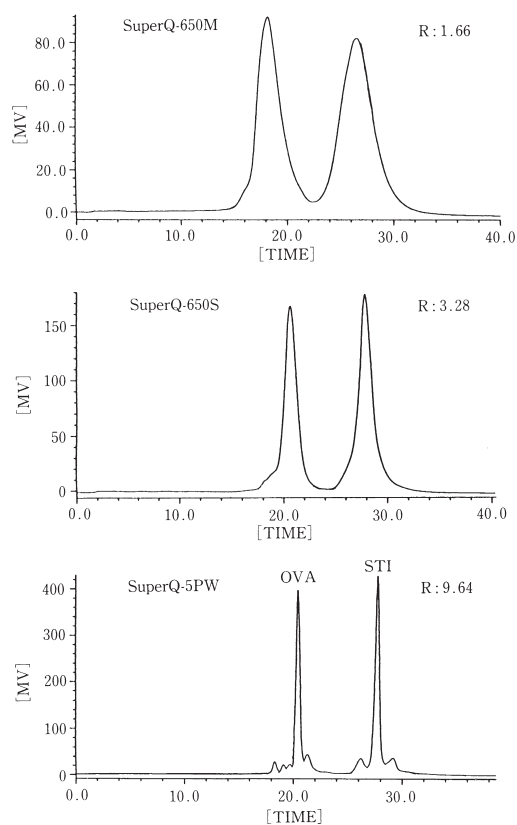


図-15 TSKgel SuperQ-5PW から TOYOPEARL SuperQ-650S へのスケールアップ (1)

カラム：TSKgel SuperQ-5PW (10 μ m)
 TOYOPEARL SuperQ-650S (35 μ m)
 TOYOPEARL SuperQ-650M (65 μ m)
 全て 7.5 mm I.D. \times 7.5 cm
 溶離液：A：50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3)
 B：A + 0.5 mol/L NaCl
 A \rightarrow B リニアグラジエント (60分)

流速：1.0 mL/min

温度：25 $^{\circ}$ C

検出：UV (280 nm)

試料：オブアルブミン (20 mg)、トリプシンインヒビター (各 1 mg)

表-5 TSKgel SuperQ-5PW の標準使用条件

カラムサイズ	7.5 mm I.D. \times 7.5 cm
溶離条件	
流速	0.5~1.0 mL/min
バッファー	20 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5~pH 8.6)
平衡化時間	カラム容量の 5 倍以上
塩濃度	0~0.5 mol/L NaCl (0~0.3 mol/L NaCl で分離能向上)
グラジエント時間	20~100分
温度	4~25 $^{\circ}$ C
検出	UV
試料	
負荷量	100 μ g ~ 200 mg
注入量	100 μ g ~ 10 mg
塩濃度	0.1 mol/L 以下 (希釈または透析)
不溶物	フィルター (マイシヨリディスクなど) でのろ過

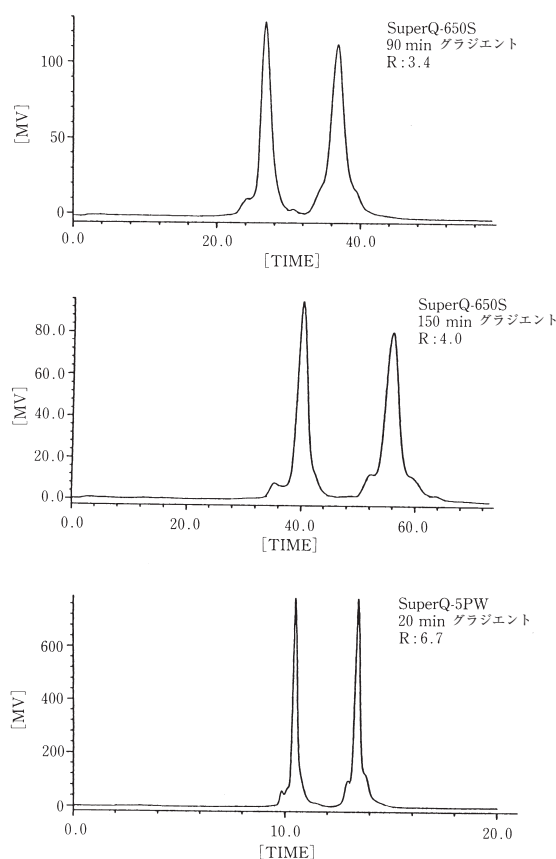


図-16 TSKgel SuperQ-5PW から TOYOPEARL SuperQ-650S へのスケールアップ (2)

条件は図-15 に同じ

ただしグラジエント時間は 20~150 min

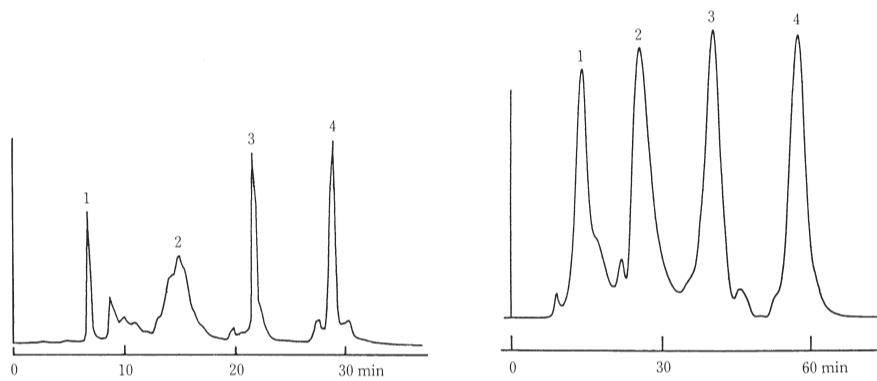


図-17 TSKgel SuperQ-5PW から TOYOPEARL SuperQ-650
へのスケールアップ (3)

カラム ; (a) TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. × 7.5 cm
(b) TOYOPEARL SuperQ-650M 16 mm I.D. × 15 cm
溶離液 ; A : 50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3)
B : A + 0.5 mol/L NaCl
A → B リニアグラジエント (a) 60 分、(b) 100 分
流 速 ; (a) 1.0 mL/min (b) 2.0 mL/min
温 度 ; 25 °C
検 出 ; UV (280 nm)
試 料 ; 1. カーボニックアンヒドラーゼ
2. トランスフェリン
3. オブアルブミン
4. トリプシンインヒビター
(試料濃度は図-2 に同じ)
(a) 1.6 mg (b) 5.4 mg

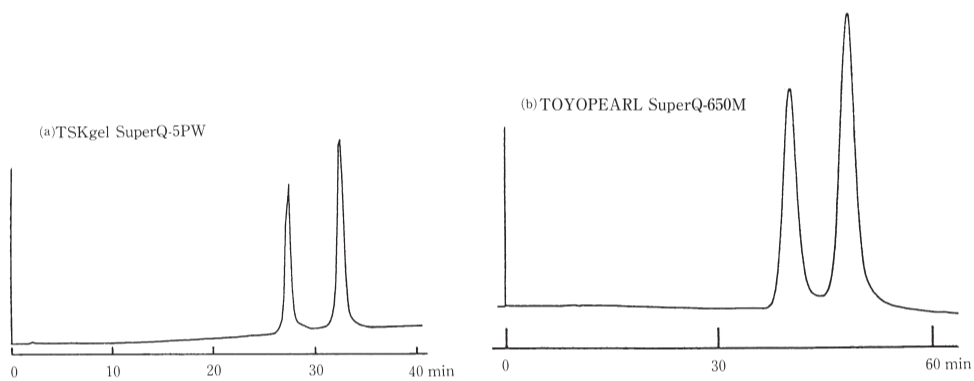


図-18 TSKgel SuperQ-5PW から TOYOPEARL SuperQ-650M
へのスケールアップ (4)

条件は図-17 に同じ
ただし試料 ; β -ラクトグロブリン
(a) 2 mg (b) 50 mg

※ “TSKgel”、“TOYOPEARL”は東ソー株式会社の登録商標です。



TOSOH

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部	☎ (03) 5427-5180	〒105-8623	東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオエス	☎ (06) 6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオエス	☎ (052) 211-5730	〒460-0008	名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店	☎ (092) 781-0481	〒810-0001	福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店	☎ (022) 266-2341	〒980-0014	仙台市青葉区本町1-11-1
カスタマーサポートセンター	☎ (0467) 76-5384	〒252-1123	神奈川県綾瀬市早川2743-1

お問い合わせe-mail tskgel@tosoh.co.jp

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>