



TOSOH

SEPARATION REPORT

TSKgel Phenyl-5PWによる蛋白質の 疎水クロマトグラフィ —— 溶離条件の影響について ——

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 溶出量への溶離条件の影響	1
1) 塩の種類	1
1) 溶離液のpH	1
3) 有機溶媒の添加及び種類	1
3. 蛋白質回収率への溶離条件の影響	2
1) 流速及びグラジエント時間	2
2) 溶離液の初期硫酸濃度	2
3) 溶離液のpH	3
4) 有機溶媒の添加濃度	3
4. 分離能への溶離条件の影響	3
1) 流速及びグラジエント時間	3
2) 溶離液の初期硫酸濃度	5
3) カラムサイズ	5
5. おわりに	6

1. はじめに

TSKgel Phenyl-5PWは、温和な条件で蛋白質の疎水クロマトグラフィを行なうことが出来、しかも高分離能が得られる点に特長がある。ここでは、TSKgel Phenyl-5PWを用いて疎水クロマトグラフィを行なう場合の蛋白質の溶出量、回収率、及び分離能への溶離条件の影響について検討した結果を紹介する。

2. 溶出量への溶離条件の影響

2-1 塩の種類

一般に疎水クロマトグラフィでは塩濃度のグラジエント溶出によって溶離が行なわれる。表-1は、疎水クロマトグラフィで使用される代表的な塩について、蛋白質の溶出量への塩の種類の影響を検討した結果である。各種塩について同じ塩濃度からグラジエント溶出を行なったときの蛋白質の溶出量は硫酸ナトリウムを用いた場合が最も大きくなり、硫酸、りん酸カリウムでは同程度の溶出量を示した。このように、使用する塩の種類によって蛋白質の溶出量が異なってくるので適当な塩を選択する必要がある。一般的には溶解度が大きい硫酸の使用が便利である。

表-1

Elution Volume of Proteins in Hydrophobic Interaction Chromatography on TSKgel Phenyl-5PW with 30 min Linear Gradient of Decreasing Ammonium Sulfate, Sodium Sulfate or Potassium Phosphate Concentration

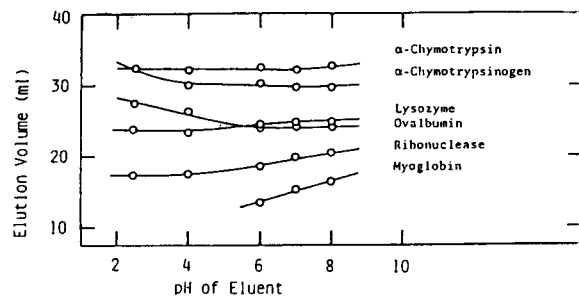
Protein	Elution volume(ml)								
	Ammonium sulfate			Sodium sulfate			Potassium phosphate		
	1.0 M	1.5 M	2.0 M	1.0 M	1.5 M	2.0 M	1.0 M	1.5 M	
Cytochrome-C	2.55	2.70	7.95	2.40	5.37	14.70	2.25	2.55	
Myoglobin	3.39	8.07	15.60	4.20	15.18	20.40	2.85	7.50	
Ribonuclease A	3.90	13.50	19.80	9.00	18.72	23.16	6.15	13.41	
Lysozyme	11.85	20.10	24.69	17.94	24.99	27.81	14.58	20.70	
α -Chymotrypsinogen	23.10	27.18	29.58	25.20	29.58	31.08	23.07	26.70	
α -Chymotrypsin	26.70	30.06	32.10	28.86	32.28	33.39	26.22	29.49	

Proteins were chromatographed on TSKgel Phenyl-5PW(7.5 x 7.5 mm I.D.) at a flow rate of 1 ml/min with 30 min linear gradient of ammonium sulfate, sodium sulfate or potassium phosphate concentration from 1.0, 1.5 or 2.0 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0).

2-2 溶離液のpH

図-1は、溶離液のpHを2.5—8.0まで変化させてグラジエント溶出を行なった時の蛋白質の溶出量へのpHの影響について検討した結果である。ここで用いた試料では、溶出量へのpHの影響はそれほど大きくなかった。

しかし、卵アルブミンとリゾチームではpH5.0以下で、又、 α -キモトリプシノーゲンと α -キモトリプシンでは、pH2.5以上で溶出量が異なってくるため、分離が可能となる。このように、試料によっては、溶離液のpHを変えることによって、分離を改良出来る場合がある。



Dependence of elution volume on the pH of eluent in hydrophobic interaction chromatography of proteins on TSKgel Phenyl-5PW.

Column size: 7.5 x 7.5 mm I.D.
Elution: 30 min linear gradient of $(NH_4)_2SO_4$ concentration from 2 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer
Flow rate: 1 ml/min Temperature: 25°C
Detection: UV absorbance at 280 nm

図-1

2-3 有機溶媒の添加及び種類

表-2は、最終溶離液に、各種アルコール及びアセトニトリルを5%添加して、グラジエント溶出を行なった時の、蛋白質の溶出量への有機溶媒の添加と種類の影響を検討した結果である。いずれの有機溶媒でも、ほとんどの試料について溶出量が小さくなり、イソプロパノールを使用した場合、最も早く溶出された。図-2は、粗精製のフェレドキシンNADP還元酵素の分離をした例である。クロマトグラム(B)では、クロマトグラム(A)に比較して、各ピークの溶出位置が早くなり、かつシャープになっていることがわかる。又、図-3は最終溶離液に尿素を添加して、市販のリポキシダーゼを分離した例

表-2

Elution Volume of Proteins in Hydrophobic Interaction Chromatography on TSKgel Phenyl-5PW with 30 min linear gradient from 0.1 M phosphate buffer containing 2 M ammonium sulfate(pH 7.0) to 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) containing 5% organic solvent.

Protein	Elution volume (ml)					
	Buffer	CH ₃ OH	C ₂ H ₅ OH	iso-C ₃ H ₇ OH	n-C ₄ H ₉ OH	CH ₃ CN
Cytochrome C	7.95	8.16	8.10	5.73	8.25	8.43
Myoglobin	15.54	15.15	14.55	11.85	---	15.15
Ribonuclease	19.80	18.90	18.15	14.70	18.06	18.84
Lysozyme	24.69	23.10	21.90	18.18	22.35	22.50
α -Chymotrypsinogen	29.67	28.80	27.90	25.14	26.40	28.50
α -Chymotrypsin	32.13	30.15	27.90	25.14	28.95	28.50

であるが、同様な効果があった。このように、最終溶離液に有機溶媒等を添加することによって、溶出パターンが変わり、分離を改良できることがある。

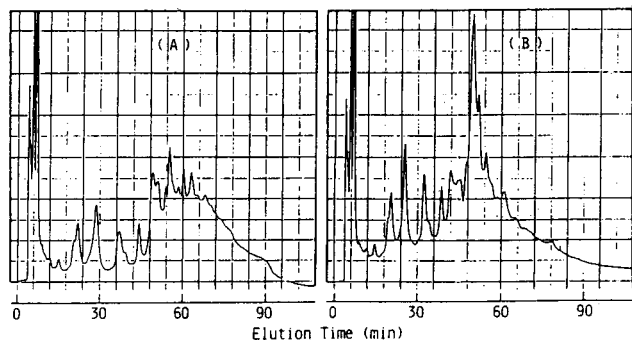


図-2 Separation of crude ferredoxin NADP reductase by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

Column size: 75 x 7.5 mm I.D. Sample loading: 3 mg in 0.1 ml
 Elution: A, 60 min linear gradient from 0.1 M phosphate buffer containing 1.5 M ammonium sulfate (pH 7.0) to 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)
 B, 60 min linear gradient from 0.1 M phosphate buffer containing 1.5 M ammonium sulfate (pH 7.0) to 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 10 % 2-propanol
 Flow rate: 0.5 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at 280 nm

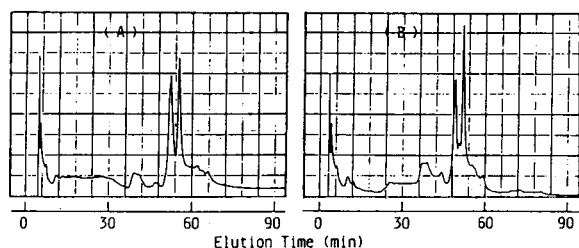


図-3 Separation of commercial lipoxidase by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

Column size: 75 x 7.5 mm I.D. Sample loading: 1 mg in 0.1 ml
 Elution: A, 60 min linear gradient from 0.1 M phosphate buffer containing 1.5 M ammonium sulfate (pH 7.0) to 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)
 B, 60 min linear gradient from 0.1 M phosphate buffer containing 1.5 M ammonium sulfate (pH 7.0) to 0.1 M phosphate buffer containing 2 M urea (pH 7.0)
 Flow rate: 0.5 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at 280 nm

3. 蛋白質回収率への溶離条件の影響

3-1 流速及びグラジエント時間

表-3、4は、蛋白質回収率への流速及びグラジエント時間の影響を検討した結果である。いずれの場合も、硫

表-3 Recovery of Proteins from TSKgel Phenyl-5PW Observed at Various Flow Rates

Protein	Recovery(%)		
	0.25 ml/min	0.5 ml/min	1.0 ml/min
Cytochrome-C	98	98	96
Myoglobin	97	78	66
Ribonuclease A	95	95	92
Lysozyme	101	104	97
Ovalbumin	97	96	88
α-Chymotrypsin	94	88	78
Trypsin inhibitor	95	97	89
α-Chymotrypsinogen	94	92	89

Proteins of 0.5 mg each were adsorbed in 0.1 M phosphate buffer containing 1.8 M ammonium sulfate (pH 7.0) and desorbed with 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration to 0 at a flow rate of 0.25, 0.5 or 1 ml/min.

表-4

Recovery of Proteins from TSKgel Phenyl-5PW Observed with Various Gradient Times

Protein	Recovery(%)		
	1 min	30 min	60 min
Cytochrome-C	101	96	96
Myoglobin	101	84	66
Ribonuclease A	104	98	92
Lysozyme	92	95	97
Ovalbumin	110	106	88
α-Chymotrypsin	109	89	78
Trypsin inhibitor	100	95	89
α-Chymotrypsinogen	99	92	89

Proteins of 0.5 mg each were adsorbed in 0.1 M phosphate buffer containing 1.8 M ammonium sulfate (pH 7.0) and desorbed with 1, 30 or 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration to 0 at a flow rate of 1 ml/min.

安濃度の1.8Mから0Mへのグラジエント溶出を行なった時の結果であるが、蛋白質回収率は、流速が低くなるにしたがって、又、グラジエント時間が短くなるにしたがって、高くなる傾向を示す。したがって、特に回収率が問題となる場合には、流速とグラジエント時間の選定に注意する必要がある。

3-2 溶離液の初期硫酸濃度

表-5は蛋白質回収率への溶離液の初期硫酸濃度の影響を検討した結果である。初期硫酸濃度を0.5-2.5Mまで変化させて、それぞれの濃度から0Mへのグラジエント溶出を行なった結果では、初期硫酸濃度の影響による一般的な傾向は見られなかった。

表-5

Recovery of Proteins from TSKgel Phenyl-5PW Observed at Various Ammonium Sulfate Concentrations in Initial Buffer

Protein	Recovery(%)			
	0.5 M	1.0 M	1.8 M	2.5 M
Cytochrome-C	99	100	96	78
Myoglobin	98	95	66	70
Ribonuclease A	101	99	92	98
Lysozyme	99	96	97	100
Ovalbumin	97	83	88	86
α-Chymotrypsin	97	70	78	90
Trypsin inhibitor	98	72	89	94
α-Chymotrypsinogen	93	92	89	101

Proteins of 0.5 mg each were adsorbed in 0.1 M phosphate buffer containing 0.5, 1.0, 1.8 or 2.5 M ammonium sulfate (pH 7.0) and desorbed with 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration to 0 at a flow rate of 1 ml/min.

3-3 溶離液のpH

表-6は、蛋白質回収率への溶離液のpHの影響を検討した結果である。溶離液のpHが5.0-8.0においては、ミオクロビンを除いて、蛋白質回収率へのpHの影響は、ほとんど見られなかったがミオグロビンのように試料によっては、あるpHで特異的にカラムに吸着され溶出しなくなる場合もあるので注意しなければならない。

表-6

Recovery of Proteins from TSKgel Phenyl-5PW Observed at Various pH

Protein	Recovery(%)		
	5.0	7.0	8.0
Cytochrome-C	100	96	95
Myoglobin	--	66	75
Ribonuclease A	95	92	99
Lysozyme	98	97	100
Ovalbumin	88	88	95
α -Chymotrypsin	90	78	86
Trypsin inhibitor	90	89	93
α -Chymotrypsinogen	94	89	94

Proteins of 0.5 mg each were adsorbed in 0.1 M phosphate buffer containing 1.8 M ammonium sulfate (pH 5.0, 7.0 or 8.0) and desorbed with 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration to 0 at a flow rate of 1 ml/min.

3-4 有機溶媒の添加濃度

有機溶媒としてイソプロパノールを用い、最終溶離液に2-10%添加して溶出を行なった時、蛋白質回収率への有機溶媒添加濃度の影響を検討した結果を表-7に示す。イソプロパノールの添加濃度が2-5%までは、蛋白質回収率は一般的に高くなる傾向を示すが、7%以上では逆に低くなる傾向を示すものもある。したがって有機溶媒を添加した溶離液を用いて分離を行なう場合には、有機溶媒の濃度を適当に調節する必要がある。一般的には数%程度が良い。

表-7

Recovery of Proteins from TSKgel Phenyl-5PW Observed at Various 2-Propanol Concentrations in Final Buffer

Protein	Recovery(%)				
	0%	2%	5%	7%	10%
Cytochrome-C	96	101	100	96	97
Myoglobin	66	79	79	40	25
Ribonuclease A	92	97	98	100	95
Lysozyme	97	95	102	96	100
Ovalbumin	88	94	92	93	90
α -Chymotrypsin	78	91	92	95	84
Trypsin inhibitor	89	93	92	90	90
α -Chymotrypsinogen	89	105	101	93	90

Proteins of 0.5 mg each were adsorbed in 0.1 M phosphate buffer containing 1.8 M ammonium sulfate (pH 7.0) and desorbed with 60 min linear gradient to 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0, 2, 5, 7 or 10% 2-propanol at a flow rate of 1 ml/min.

4. 分離能への溶離条件の影響

4-1 流速及びグラジエント時間

図-4~11は、標準蛋白質の混合物を用いて分離を行なった時の分離能への流速及びグラジエント時間の影響を検討した結果である。グラジエント時間が一定の場合、分離能は流速依存性を示し、低い流速で良い分離が得られる。又、その場合、グラジエント時間が長いほど流速依存性が大きくなる傾向を示す。グラジエントボリュームが一定の場合も同様な傾向を示した。

一方、流速が一定の場合、分離能はグラジエント時間に依存し、時間が長いほど良い分離が得られ、グラジエント時間が比較的短い範囲でその傾向が著しい。又、その場合の流速は低いほどグラジエント時間依存性が大きくなる。

これらの結果から、高分離能を得るためには、流速を下げ、グラジエント時間を長くする方が良いが、分析時間が長くなるので実際にはこれらの妥協点で流速とグラジエント時間を選定する。

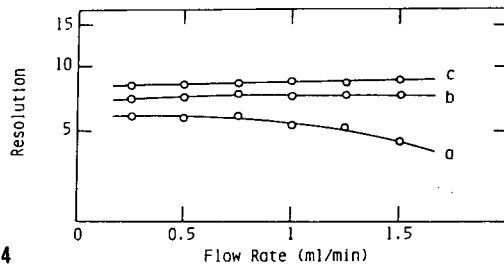


図-4

Dependence of resolution on flow rate with constant gradient time in high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

Proteins were separated with 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 1.8 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0).

a: myoglobin/ribonuclease b: ribonuclease/lysozyme
c: lysozyme/ α -chymotrypsinogen

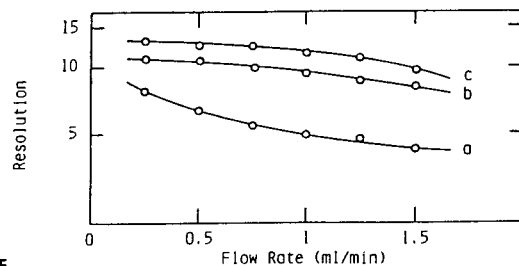
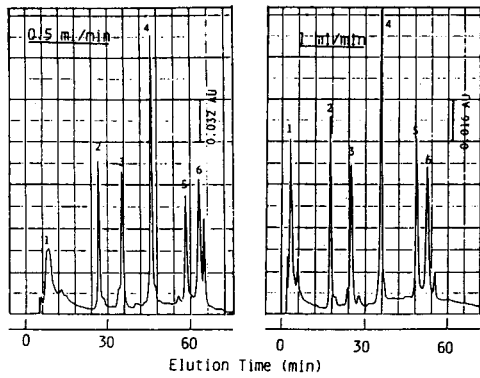


図-5

Dependence of resolution on flow rate with constant gradient time in high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

Proteins were separated with 240 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 1.8 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0).

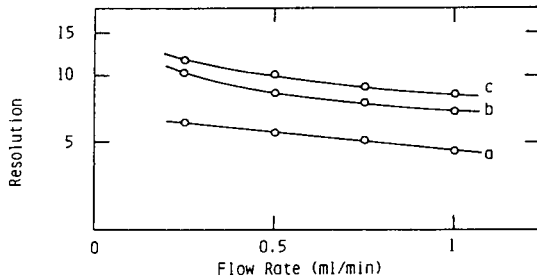
a: myoglobin/ribonuclease b: ribonuclease/lysozyme
c: lysozyme/ α -chymotrypsinogen



8-6

Separation of a protein mixture by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

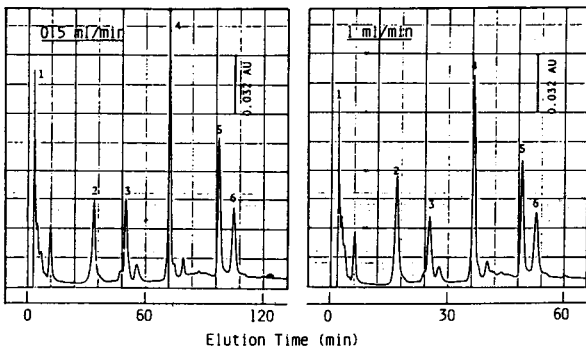
Column size: 75 x 7.5 mm I.D.
 Sample: 1. Cytochrome-C, 2. Myoglobin, 3. Ribonuclease, 4. Lysozyme,
 5. α -Chymotrypsinogen, 6. α -Chymotrypsin
 Elution: 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 1.8 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)
 Flow rate: 0.5 ml/min or 1 ml/min
 Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at 280 nm



8-7

Dependence of resolution on flow rate with constant gradient volume(60 ml) in high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

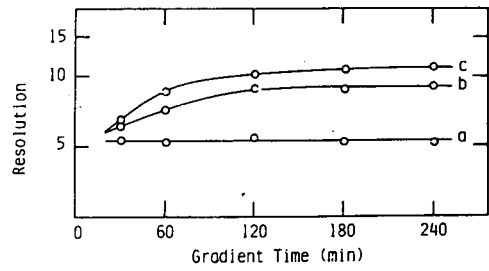
Proteins were separated with 60 - 240 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 1.8 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0).
 a: myoglobin/ribonuclease b: ribonuclease/lysozyme
 c: lysozyme/ α -chymotrypsinogen



8-8

Separation of a protein mixture by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

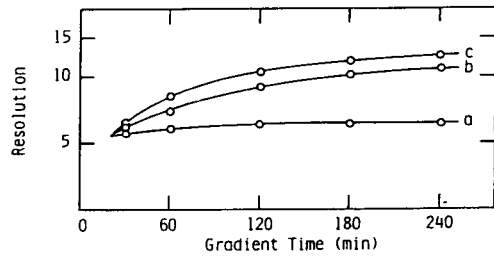
Column size: 75 x 7.5 mm I.D.
 Sample: 1. Cytochrome-C, 2. Myoglobin, 3. Ribonuclease, 4. Lysozyme
 5. α -Chymotrypsinogen, 6. α -Chymotrypsin
 Elution: 60 min or 120 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 1.8 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)
 Flow rate: 0.5 ml/min(120 min) or 1 ml/min(60 min)
 Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at 280 nm



8-9

Dependence of resolution on gradient time in high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW. Proteins were separated with 30 - 240 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 1.8 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 1 ml/min.

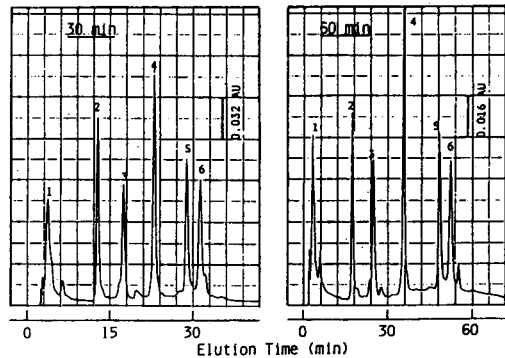
a: myoglobin/ribonuclease b: ribonuclease/lysozyme
 c: lysozyme/ α -chymotrypsinogen



8-10

Dependence of resolution on gradient time in high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW. Proteins were separated with 30 - 240 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 1.8 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 0.5 ml/min.

a: myoglobin/ribonuclease b: ribonuclease/lysozyme
 c: lysozyme/ α -chymotrypsinogen



8-11

Separation of a protein mixture by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

Column size: 75 x 7.5 mm I.D.
 Sample: 1. Cytochrome-C, 2. Myoglobin, 3. Ribonuclease, 4. Lysozyme
 5. α -Chymotrypsinogen, 6. α -Chymotrypsin
 Elution: 30 min or 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 1.8 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)
 Flow rate: 1 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at 280 nm

4-2 溶離液の初期硫酸濃度

図-12~14は、分離能への溶離液の初期硫酸濃度の影響を検討した結果である。溶離液の初期硫酸濃度を1.0-3.0Mに変化させて、それぞれの濃度から、いずれも流速1.0ml/min、グラジエント時間60分で分離を行なったときの分離能の初期硫酸濃度依存性は試料によって異なり一般的な傾向は見られなかった。又、それぞれの硫酸濃度から、流速1.0ml/minにおいて、塩濃度勾配を一定にして分離を行なった場合、蛋白質はいつも同じ塩濃度で溶出される。(クロマトグラム上平行移動する)又、分離能もよく似た結果であった。

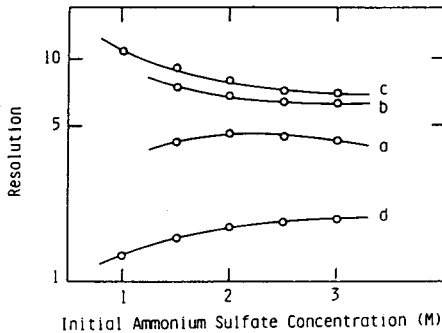


図-12 Dependence of resolution on ammonium sulfate concentration in initial buffer in high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW. Proteins were separated with 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 1-3 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 1 ml/min.

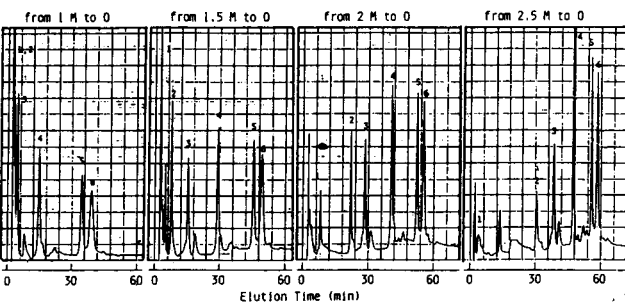


図-13 Separation of a protein mixture by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW. Column size: 75 x 7.5 mm I.D. Sample: 1. Cytochrome C, 2. Myoglobin, 3. Ribonuclease, 4. Lysozyme, 5. α -Chymotrypsinogen, 6. α -Chymotrypsin. Elution: 60 min linear gradient of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration from 1.0, 1.5, 2.0 or 2.5 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). Flow rate: 1 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at 280 nm (0.16 AUFS)

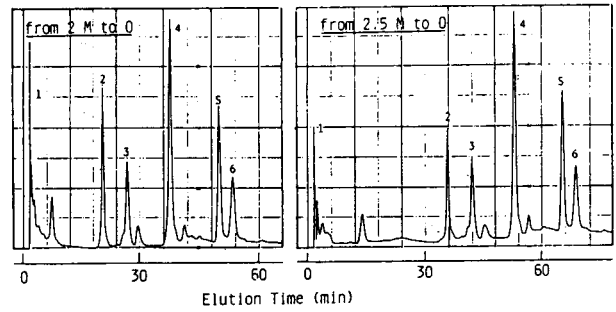


図-14 Separation of a protein mixture by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW. Column size: 75 x 7.5 mm I.D. Sample: 1. Cytochrome-C, 2. Myoglobin, 3. Ribonuclease, 4. Lysozyme, 5. α -Chymotrypsinogen, 6. α -Chymotrypsin. Elution: 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 2 M to 0 or 75 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 2.5 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). Flow rate: 1 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at 280 nm

4-3 カラムサイズ

図-15は、分離能へのカラム長さの影響を検討した結果である。カラムサイズが75×7.5mm IDのカラムを2本連結して分離を行なった場合、カラム1本のときよりも、ピークがシャープになり、わずかに分離能が向上する。しかし、各ピークの溶出位置が遅くなることが認められた。このように、分離を改良するためには、カラムを長くするのも有効な手段であろう。

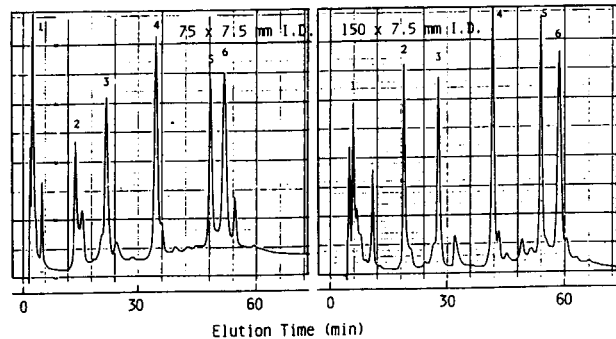


図-15 Separation of a protein mixture by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW. Column size: 75 x 7.5 mm I.D. or 150 x 7.5 mm I.D. Sample: 1. Cytochrome C, 2. Myoglobin, 3. Ribonuclease, 4. Lysozyme, 5. α -Chymotrypsinogen, 6. α -Chymotrypsin. Elution: 60 min linear gradient of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration from 1.7 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). Flow rate: 1 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at 280 nm

5. おわりに

以上、TSKgel Phenyl-5PWによる疎水クロマトグラフィの一般的な溶離条件の影響について紹介した。

一般に疎水クロマトグラフィでは、分離しようとする試料の疎水性を予測することが比較的難しく、溶離条件の選定は試行錯誤に頼る場合が少なくない。このような場合、ここで紹介したデータが溶離条件選定のために活用できれば幸いである。