



SEPARATION REPORT

TSKgel SW_{XL}シリーズについて

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 特徴	1
3. 基本的性質	5
1)理論段高さ (HETP) の流速依存性	5
2)イオンの性質	5
3)試料負荷量	6
4)タンパク質の回収率	6
4. TSKgel SW _{XL} シリーズを用いた応用例	7
5. おわりに	8

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の目覚ましい発展の中で生体高分子の分離へのHPLCの応用は、もはや当然の事とされるまでになっています。さらに最近ではこれまで軟質ゲルを用いる低速クロマトグラフィーの独壇場であった生体高分子の分取の分野にも、HPLCはその高速高性能と急速な機器の開発から着実に浸透し始めています。分離モードから言えば、既にHPLCの中で古典的な感のあるゲル透過クロマトグラフィー (GFC) をはじめ、イオン交換クロマトグラフィー (IEC)、および逆相クロマトグラフィー (RPC) が、一般的分析法として定着し、さらに最近では、疎水クロマトグラフィー (HIC) およびアフィニティクロマトグラフィー (AFC) も急速に進展しています。

当社はHPLC分野で多彩な優れたカラムあるいは充填剤を提供し、その発展に貢献してまいりました。特にGFC用カラム、TSKgel SWシリーズは世界中で広く使用され、SWを用いたGFCが標準分析法として確立されたといっても過言ではありません。

本レポートでは、このTSKgel SWシリーズを微粒粒子化さらに高性能化を追求したTSKgel SW_{XL}シリーズを開発発売いたしましたので、その特徴、基本的性質、及び若干の応用例について、述べます。

2. 特 徴

表-1にSW_{XL}シリーズの仕様を示します。表-2にポリエチレングリコール (PEG)、デキストラン、およびタンパク質の分画範囲を示します。SW_{XL}シリーズのカラムサイズは、すべて7.8mmID×30cmです。従来のSWシリーズに比べ、より小さな粒子径の充填剤を使用しているため、保証理論段数は、表-1に示したように、従来のSWシリーズの約2倍あります。

図-1および図-2に、上述の標準試料により測定したTSKgel SW_{XL}シリーズの較正曲線を示します。図-3、図-4、および図-5に標準タンパク質のSW_{XL}シリーズおよび従来のSWシリーズを用いたクロマトグラムを示します。これらのクロマトグラムから求めた分離能 (Rs) を表-3に示します。表より、SW_{XL}シリーズには、従来のSWシリーズの60cmカラムと同等またはそれ以上の分離能があることがわかります。従ってSW_{XL}シリーズを用いることによって、分離能は変えずに、分析時間を半分に短縮することができます。

タンパク質の分子量と分離能の関係を図-6に示します。図により、それぞれのカラムに至適分画範囲があることがわかります。一般的にはG2000SW_{XL}は分子量70,000以下のタンパク質G3000SW_{XL}は、分子量70,000ないし300,000のタンパク質、G4000SW_{XL}は、分子量300,000以上のタンパク質の分離に適しています。

表-1 TSKgel SW_{XL}シリーズの仕様

カラム	粒 径 (μm)	保証理論段数 (TP/カラム)	カラム寸法 (mmID×cm)
G2000SW _{XL}	5	20,000	7.8×30
G3000SW _{XL}	5	20,000	
G4000SW _{XL}	8	16,000	

理論段数測定条件

溶離液：蒸留水

流 速：1 ml/min

試 料：1%エチレングリコール20 μl

表-2 TSKgel SW_{XL}シリーズの分子量分画範囲

カラム	ポリエチレングリコール	デキストラン	タンパク質
G2000SW _{XL}	500~15,000	1,000~30,000	5,000~100,000
G3000SW _{XL}	1,000~35,000	2,000~70,000	10,000~500,000
G4000SW _{XL}	2,000~250,000	4,000~500,000	20,000~7,000,000

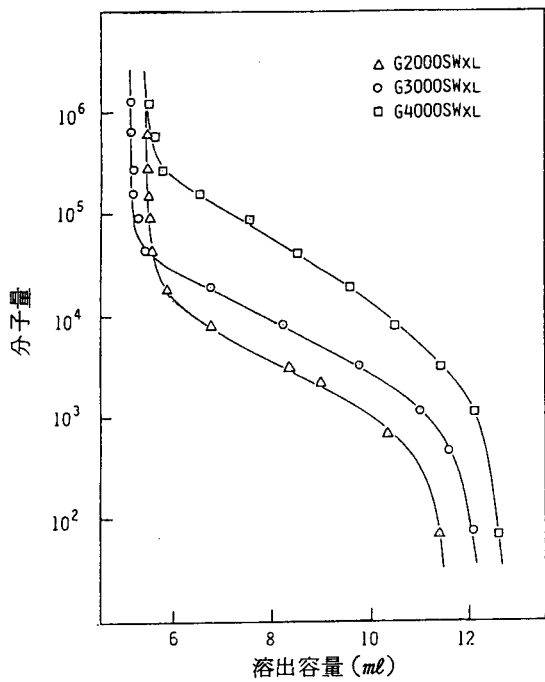


図-1 PEGによる校正曲線

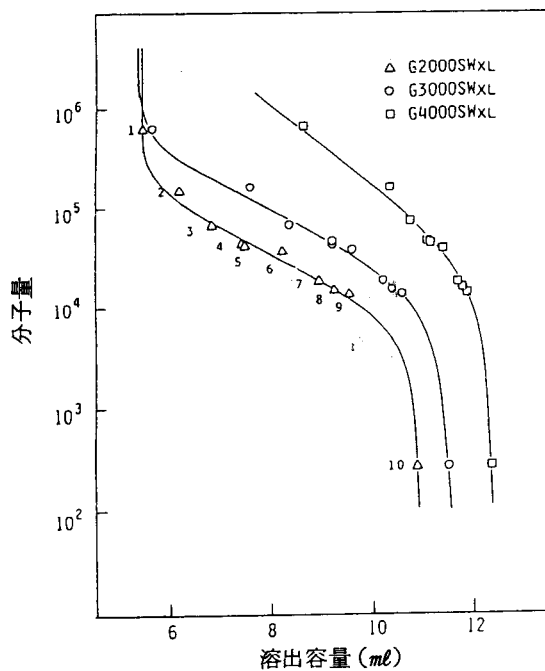


図-2 タンパク質による校正曲線

カラム; TSKgel SW_{XL}シリーズ(7.8mmID×30cm)

溶離液; 0.05M リン酸緩衝液(pH 7)

+0.3M NaCl

流速; 1ml/min

温度; 25°C

検出; UV(220nm)

試料; 1.チログロブリン 2.γ-グロブリン
 3.牛血清アルブミン 4.オプアルブミン
 5.ペルオキシダーゼ 6.β-ラクトグロブリン
 7.ミオグロビン 8.リボヌクレアーゼA
 9.チトクロムC 10.グリシン4量体

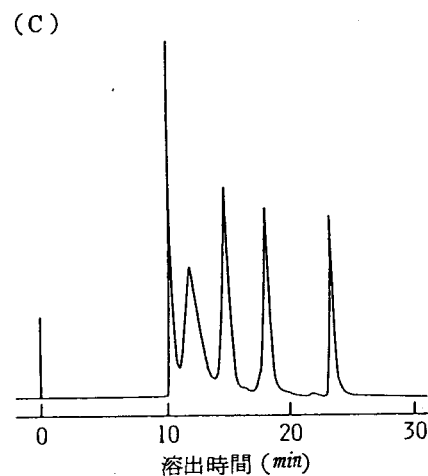
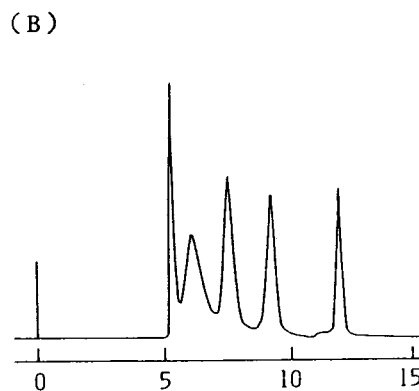
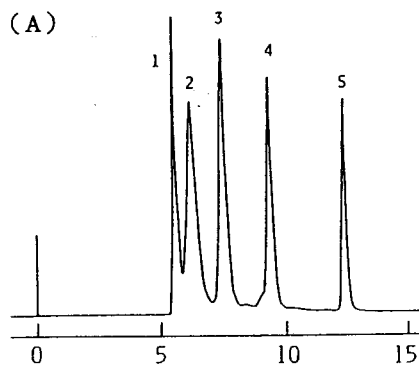


図-3 SW_{XL}シリーズ及びSWシリーズの比較(1)

カラム; (A)TSKgel G2000SW_{XL} 7.8mmID×30cm

(B)TSKgel G2000SW 7.5mmID×30cm

(C)TSKgel G2000SW 7.5mmID×60cm

溶離液; 0.05M リン酸緩衝液(pH 7)

+0.3M NaCl

流速; 1ml/min

温度; 25°C

検出; UV(220nm)

試料; 1.チログロブリン 2.γ-グロブリン
 3.オプアルブミン 4.リボヌクレアーゼA
 5. p-アミノ安息香酸

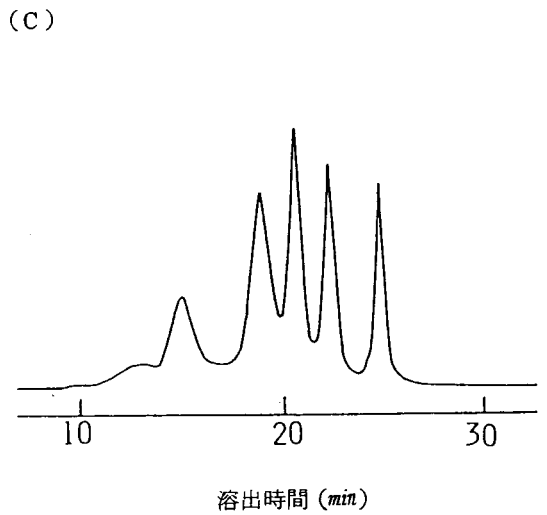
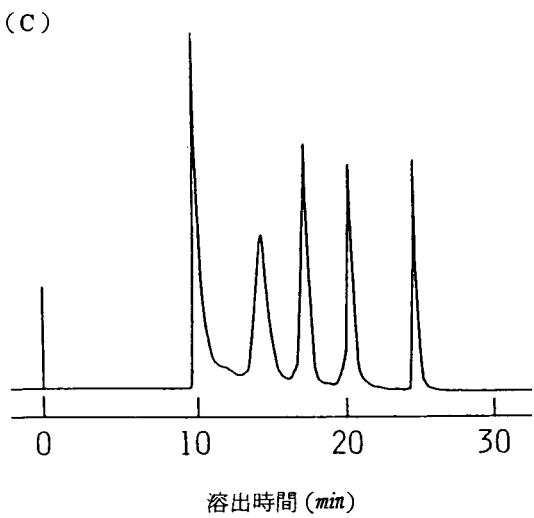
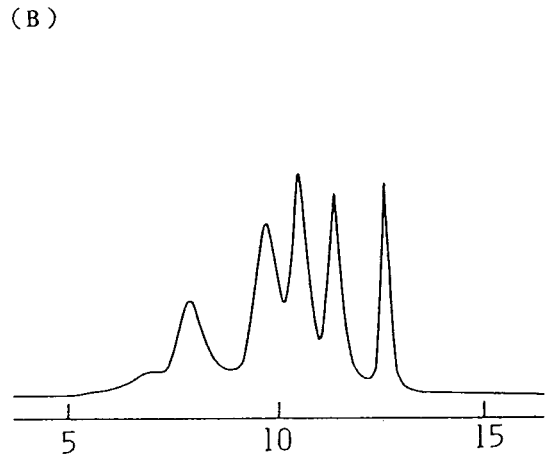
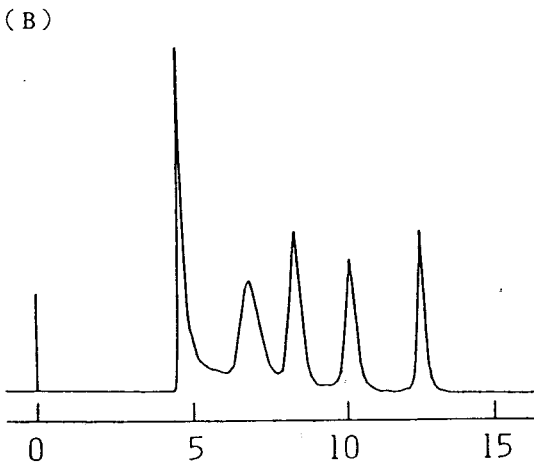
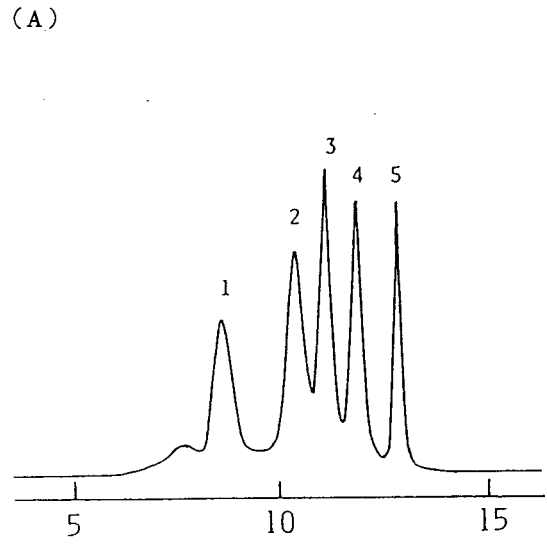
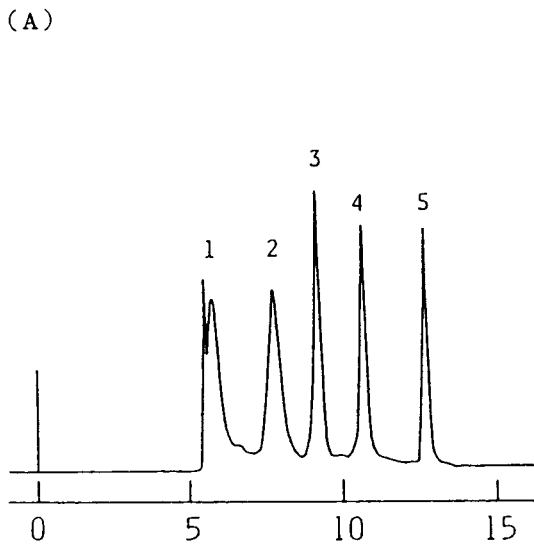


図-4 SW_{XL}シリーズ及びSWシリーズの比較(2)

カラム ; (A) TSKgel G3000SW_{XL} 7.8mmID×30cm

(B) TSKgel G3000SW 7.5mmID×30cm

(C) TSKgel G3000SW 7.5mmID×60cm

他の溶離条件は、図-3に同じ

図-5 SW_{XL}シリーズおよびSWシリーズの比較(3)

カラム ; (A) TSKgel G4000SW_{XL} 7.8mmID×30cm

(B) TSKgel G4000SW 7.5mmID×30cm

(C) TSKgel G4000SW 7.5mmID×60cm

他の溶離条件は図-3に同じ

表-3 SW_{XL}シリーズ及びSWシリーズの分離能(Rs)の比較

試料	Rs		
	G2000SW _{XL}	G2000SW 30cm	G2000SW 60cm
チログロブリン	2.43	1.57	2.24
γ-グロブリン	3.13	2.24	2.48
牛血清アルブミン	6.44	2.93	5.00
ペルオキシダーゼ	9.07	5.76	8.03
ミオグロビン	12.98	5.19	6.61
チトクロムC	2.89	1.50	2.23
グリシン4量体			

試料	Rs		
	G3000SW _{XL}	G3000SW 30cm	G3000SW 60cm
チログロブリン	4.13	4.35	6.33
γ-グロブリン	3.73	2.30	3.46
牛血清アルブミン	7.14	4.23	6.14
ペルオキシダーゼ	8.29	5.66	9.31
ミオグロビン	8.53	4.30	6.49
チトクロムC	1.68	1.34	2.46
グリシン4量体			

試料	Rs		
	G4000SW _{XL}	G4000SW 30cm	G4000SW 60cm
チログロブリン	3.19	2.77	3.07
γ-グロブリン	1.54	1.28	1.95
牛血清アルブミン	3.31	1.98	3.11
ペルオキシダーゼ	2.99	2.77	3.69
ミオグロビン	3.28	2.35	2.07
チトクロムC	0.69	0.70	0.75
グリシン4量体			

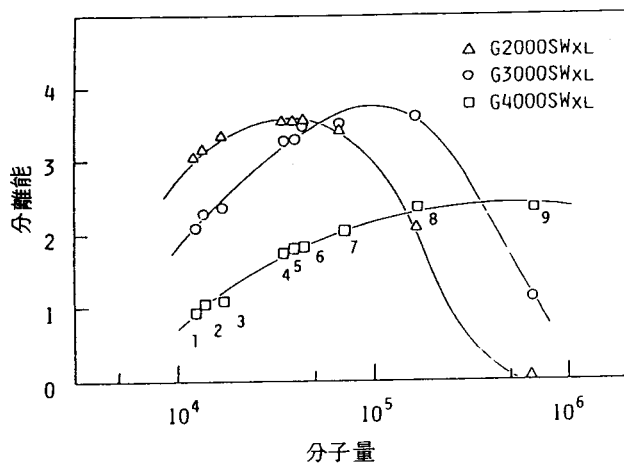


図-6 分子量と分離能の関係

カラム; TSKgel SW_{XL}シリーズ 7.8mmID×30cm

溶離液; 0.05M リン酸緩衝液(pH 7)

+0.3M NaCl

流速; 1 ml/min

温度; 25°C

検出; UV(220nm)

試料; 1.チトクロムC 2.リボヌクレアーゼA
 3.ミオグロビン 4.β-ラクトグロブリン
 5.ペルオキシダーゼ 6.オプアルブミン
 7.牛血清アルブミン 8.γ-グロブリン
 9.チログロブリン

3. 基本的性質

3-1 理論段高さ (HETP) の流速依存性

流速の理論段高さ (HETP) への影響は、充填剤の粒子径、試料の分子の大きさ、溶離液の粘度などに依存します。代表的な例として、ウシ血清アルブミンとミオグロビンを、SW_{XL}シリーズと従来のSWシリーズにおけるHETPの流速依存性を図-7に示します。

SW_{XL}シリーズではHETPは、流速の増大に対し、HETPがあまり変化しないのに対し、SWシリーズでは、HETPの流速依存性が大きくなっています。これはSW_{XL}シリーズにおいて充填剤の粒子径が小さくなっているためです。

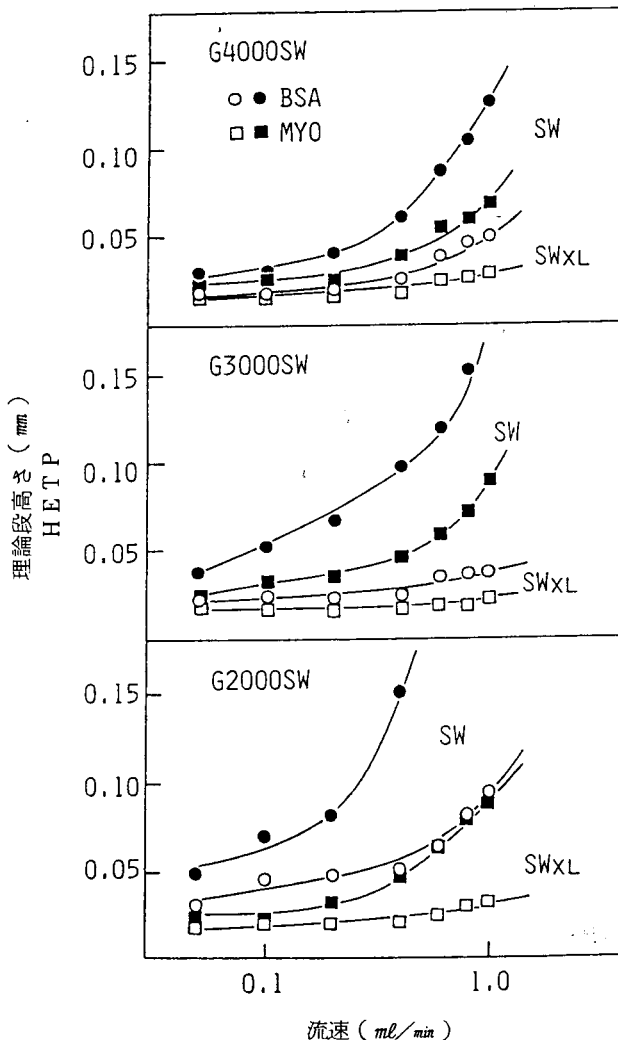


図-7 理論段高さ (HETP) の流速依存性

カラム；○、□SW_{XL} シリーズ

●、■SW シリーズ

溶離液；0.05M リン酸緩衝液 (pH 7)

+0.3M NaCl

試料；BSA：牛血清アルブミン

MYO：ミオグロビン

3-2 イオンの性質

シリカゲルをベースとした充填剤は、若干のシラノール基を有しています。シラノール基は中性の溶液中では負に荷電しています。一方、試料となるタンパク質には溶液中で正に荷電する塩基性タンパク質や、負に荷電する酸性タンパク質、そして電荷をもたない中性タンパク質の三種類があります。このため、充填剤と試料の間にイオンの相互作用が生じます。

図-8にタンパク質の溶出容量の塩濃度依存性を示しました。塩基性タンパク質であるチトクロムCの溶出容量は塩濃度が0.2M以下ではSW_{XL}シリーズおよび従来のSWシリーズ共に増大し、チトクロムCが充填剤と結合していくことを示しています。一方、酸性タンパク質であるウシ血清アルブミンやオブアルブミンは、塩濃度が低くなるにつれて、充填剤とのイオンの反発のため、溶出容量は減少します。また荷電しない中性タンパク質であるミオグロビンの溶出容量は変化しません。

このように充填剤とタンパク質や核酸などの生体高分子間では塩濃度が低い場合はイオンの相互作用が生じます。従ってその作用を消すには、溶離液中に0.2ないし0.5 Mの塩を添加することが望ましいと考えられます。

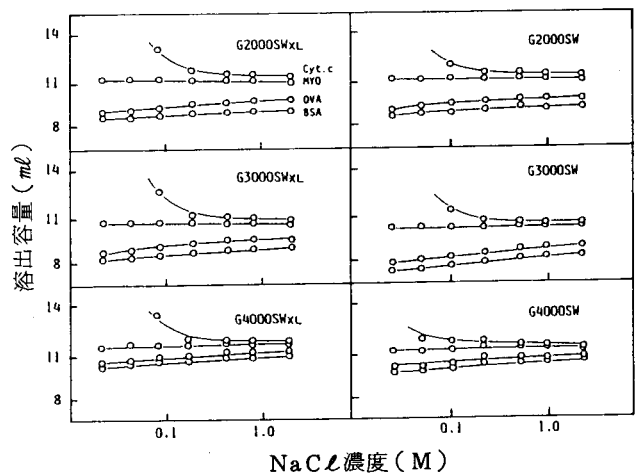


図-8 溶出容量の塩濃度依存性

溶離液；0.05M リン酸緩衝液 (pH 7)

+NaCl

流速；1 ml/min

試料；Cyt. C：チトクロムC

MYO：ミオグロビン

OVA：オブアルブミン

BSA：牛血清アルブミン

3-3 試料負荷量

図-9にウシ血清アルブミンの分離における理論段高さ (HETP) の試料負荷量依存性を示しました。図-6でも示した通り従来のSWシリーズに比べSW_{XL}シリーズの方が、HETPは全般的に低いのですが、試料負荷量は、共に250 μ gまではほとんど変わりません。SW_{XL}シリーズには、従来のSWシリーズ同様の試料負荷量があります。

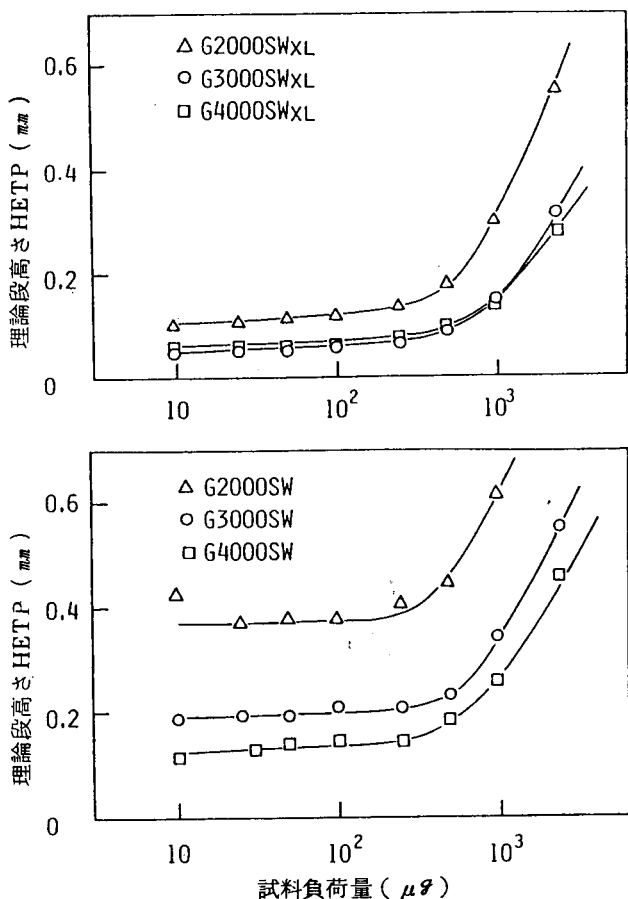


図-9 試料負荷量 (一定注入量での) の理論段高さへの影響

3-4 タンパク質の回収率

表-4に、種々の試料負荷量でのタンパク質の回収率を示しました。G2000SW_{XL}およびG3000SW_{XL}では試料負荷量に関係なくリボスクレアーゼ、チログロブリン、 γ -グロブリンは、ほぼ定量的に回収されました。その他、ミオグロビン、チトクロムC、キモトリプシノーゲン、リゾチーム、トリプシンインヒビタも定量的に回収されました。G4000SW_{XL}では、リボスクレアーゼ、 γ -グロブリンおよび、その他上述の5種類のタンパク質は定量的に回収されました。しかしチログロブリンについては試料負荷量が少ない (1 μ g) 場合、回収率が低下しています。

SW_{XL}シリーズでは、ほとんど全てのタンパク質が試料負荷量に関係なく定量的に回収されますが、例外的に、試料負荷量の少ない場合、回収率の低下するタンパク質もあります。(従来SWシリーズでも同じような結果が得られます。)

表-4 タンパク質の回収率(%)

	試料負荷量 (μ g)				
	1	5	10	50	100
G2000SW _{XL}					
リボスクレアーゼA	95	83	96	98	94
チログロブリン	107	92	101	-	-
γ -グロブリン	103	109	116	98	107
G3000SW _{XL}					
リボスクレアーゼA	96	97	97	95	94
チログロブリン	92	97	101	99	91
γ -グロブリン	106	103	97	97	108
G4000SW _{XL}					
リボスクレアーゼA	104	106	103	103	94
チログロブリン	78	90	91	102	101
γ -グロブリン	91	90	107	97	104

4. TSKgel SW_{XL} シリーズを用いた応用例

図-10、図-11にG2000SW_{XL}によるラット肝の粗抽出液の分離例、ポリペプチドの分離例を示します。図-12、図-13にG3000SW_{XL}によるテンジクネズミ胃の粗抽出液の分離例、ヒママメレクチン (RCA) の粗抽出液の分離例を示します。

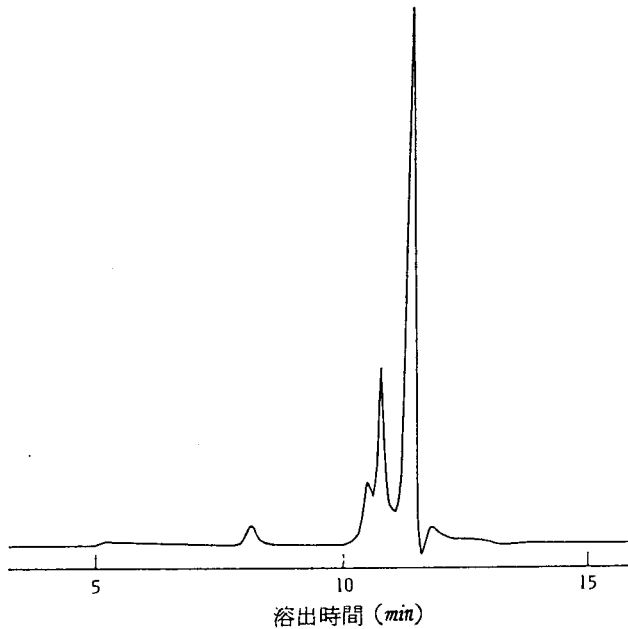


図-10 ラット肝粗抽出液 (10 μ l) の分離
 カラム; TSKgel G2000SW_{XL} 7.8mmID \times 30cm
 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7)
 +0.3M NaCl
 流 速; 1 ml/min
 温 度; 25 $^{\circ}$ C
 検 出; UV (220nm)

分離例、図-14、図-15に、G4000SW_{XL}によるホウレンソウ葉の粗抽出液の分離例、 ϕ X-174RF DNAのHae III消化物の分離例を示します。

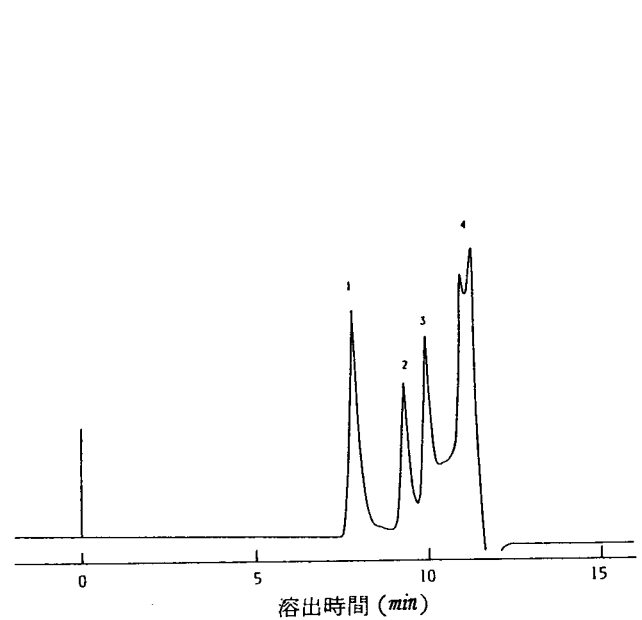


図-11 ポリペプチドの分離
 カラム; TSKgel G2000SW_{XL} 7.8mmID \times 30cm
 溶離液; 40%アセトニトリル+0.05%TFA
 流 速; 1 ml/min
 温 度; 25 $^{\circ}$ C
 検 出; UV (215nm)
 試 料; 1.チトクロムC 2.インスリン
 3. α -エンドルフィン 4.Leu-エンケファリン

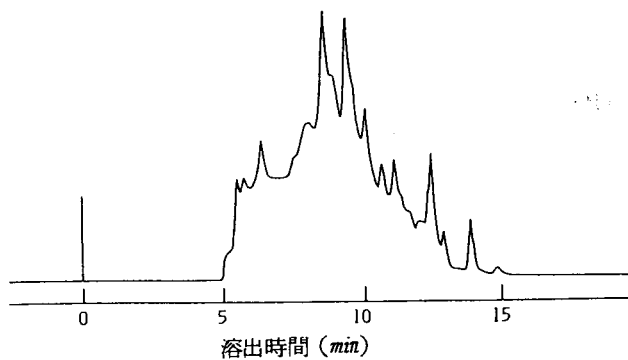


図-12 テンジクネズミ (モルモット) 胃の粗抽出液 (25 μ l) の分離
 溶離条件はカラムを除き図-10に同じ
 カラム; TSKgel G3000SW_{XL} 7.8mmID \times 30cm

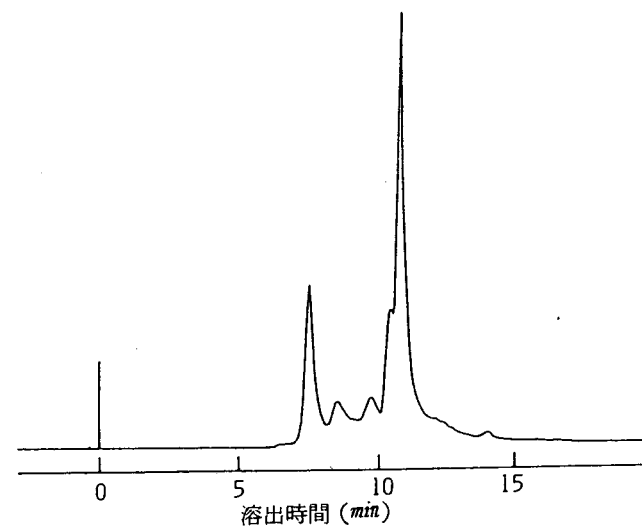


図-13 ヒママメレクチン (RCA) 粗抽出液 (25 μ l) の分離
 溶離条件は図-12に同じ

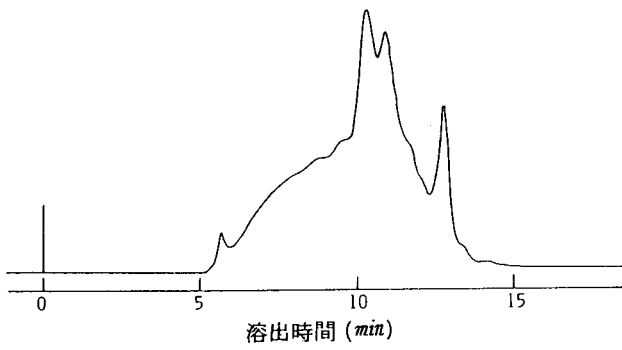


図-14 ホウレンソウ葉粗抽出液 (25 μ l) の分離
 溶離条件はカラムを除き図-10に同じ
 カラム; TSKgel G4000SW_{XL} 7.8mmID \times 30cm

5. おわりに

TSKgel SW_{XL}シリーズは従来のSWシリーズを微粒子化することにより、大幅に性能を向上させたカラムです。本カラムは30cmカラムでありながら、従来のSW60cmカラムと同等またはそれ以上の分離能を有しています。そのため測定時間は半分に短縮され、溶媒使用量も半分ですみます。一方、試料負荷量は変わらないため、試料の希釈も抑えられるなど、多くの利点を有しています。

今後、高速GFCとして、さらに高性能化されたSW_{XL}シリーズを用いる生体高分子の分離への応用が、ますます期待されています。

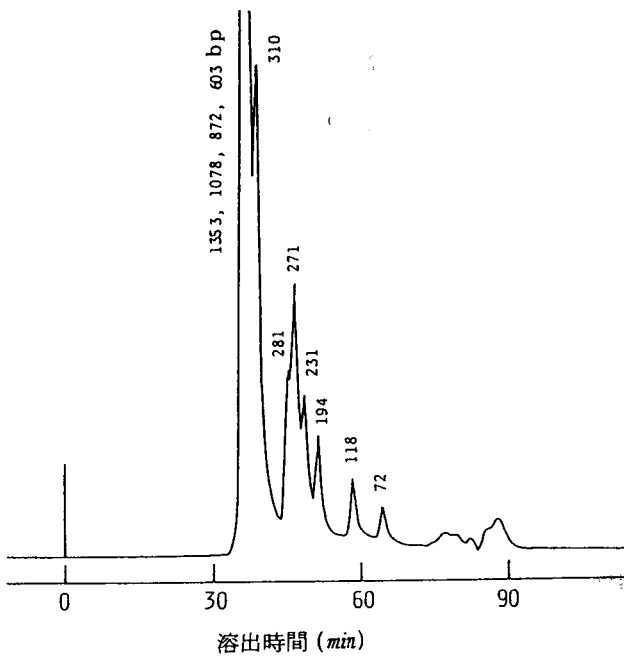


図-15 ϕ X-174RF DNAのHaeIII消化物
 (4.5 μ g/50 μ l) の分離

カラム; TSKgel G4000SW_{XL} 7.8mmID \times 30cm

溶離液; 0.05M リン酸緩衝液(pH 7)

+0.3M NaCl+ 1mM EDTA

流速; 0.15ml/min

温度; 25 $^{\circ}$ C

検出; UV (260nm)