

TOSOH

# SEPARATION REPORT

## 高速イオン交換クロマトグラフィ用充填カラム TSKgel CM-5PWについて (TSKgel SP-5PWとの比較)

### ——目 次——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel CM-5PWの基本的性質	1
2-1. 滴定曲線	1
2-2. タンパク質結合量	2
2-3. タンパク質の回収率	2
2-4. 試料負荷量	3
3. タンパク質分離の応用例	3
4. おわりに	5

## 1. はじめに

イオン交換クロマトグラフィは、タンパク質等の生体高分子の分離精製的手段として広く使用されてきています。また、ここ数年、高性能化が一層進んでおり、種々の基材による高性能イオン交換クロマトグラフィ用充填剤が市販されてきています。当社からも、生体高分子用高性能イオン交換クロマトグラフィ用充填剤として、化学的に非常に安定な親水性ポリマ基材のTSKgel DEAE-5PW、TSKgel SP-5PWが既に販売され、好評のうちに使用されてきています。

さらに、昭和61年12月より、高性能カチオン交換クロマトグラフィ用充填剤として、強カチオン用TSKgel SP-5PWに加え、弱カチオン用TSKgel CM-5PWを新たに販売しています。

このレポートでは、TSKgel CM-5PWの基本的性質と若干のタンパク質分離の応用例を、TSKgel SP-5PWとの比較を交えて紹介します。(TSKgel SP-5PWについては、セパレーションレポートNo.030も併せてご参照ください。)

## 2. TSKgel CM-5PWの基本的性質

TSKgel CM-5PWは、高速水系ゲル濾過クロマトグラフィ用充填剤TSKgel G5000PWにカルボキシメチル (CM) 基を導入した高性能弱カチオン交換クロマトグラフィ用充填剤です。

親水性ポリマを基材としているため、化学的安定性に非常に優れています。ポアサイズも約1000Åと大きいので高分子量のタンパク質にも適応することができます。

### 2-1 滴定曲線

図-1にTSKgel CM-5PWの滴定曲線を示しました。参考のため、図-2にTSKgel SP-5PWの滴定曲線を併せて示しています。低pH側で両者は異った曲線を示しています。

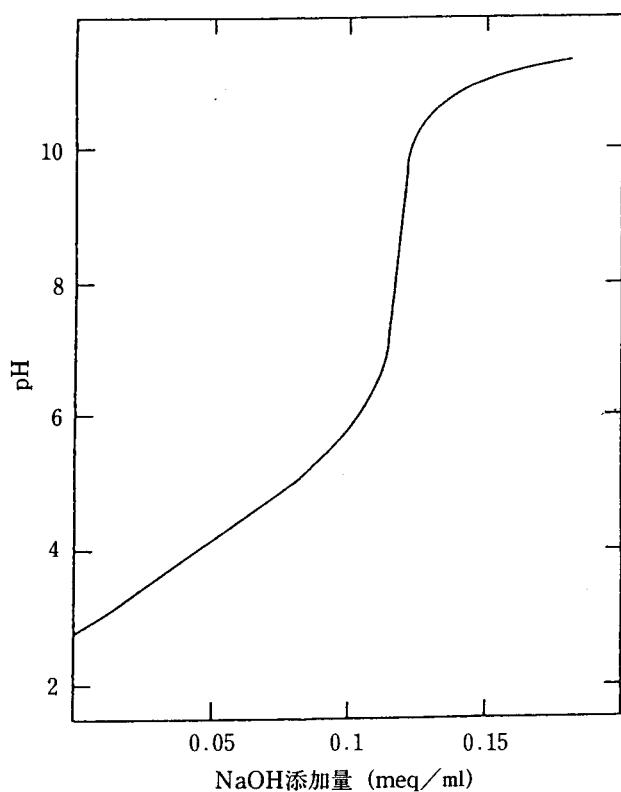


図-1 TSKgel CM-5PWの滴定曲線

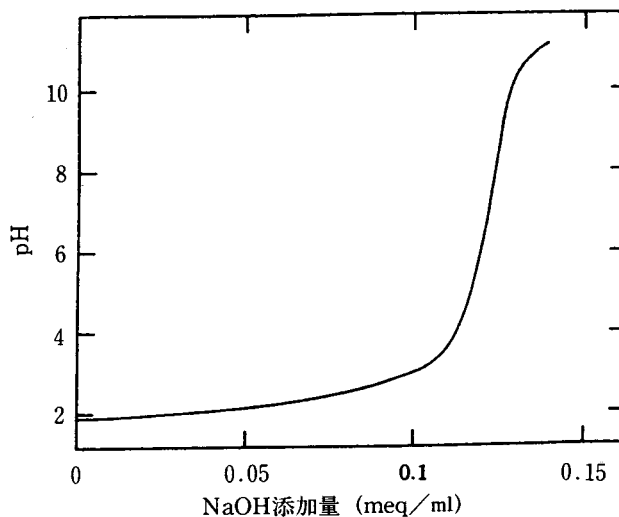


図-2 TSKgel SP-5PWの滴定曲線

## 2-2 タンパク質結合量

TSKgel CM-5PW及びTSKgel SP-5PWのタンパク質結合量について調べた結果を表-1に示しました。両者共結合量はほぼ同程度で約40~50mg/mlです。

## 2-3 タンパク質の回収率

タンパク質の回収率について検討した結果を表-2に示しました。何れのタンパク質も、ほぼ90%以上と高い回収率を示しています。

表-1 タンパク質結合量

タンパク質	結合量 (mg/ml)	
	TSKgel CM-5PW	TSKgel SP-5PW
ヘモグロビン	46	43
リゾチーム	48	54

表-2 タンパク質の回収率

タンパク質	回収率 (%)	
	TSKgel CM-5PW	TSKgel SP-5PW
γ-グロブリン	89	98
ヘモグロビン	102	96
トリプシノーゲン	105	101
α-キモトリプシノーゲンA	100	98
α-キモトリプシン	101	104
ミオグロビン	96	88
リゾチーム	96	95
リボヌクレアーゼA	99	100
チトクロムC	100	103

## 2-4 試料負荷量

図-3のクロマトグラムに示すリボヌクレアーゼA及び $\alpha$ -キモトリプシノーゲンAの分離能R (RN, CT) により試料負荷量について検討した結果を図-4に示しました。

0.5mg~1.0mg程度までは、殆んど分離能を低下させずに試料を注入することができます。

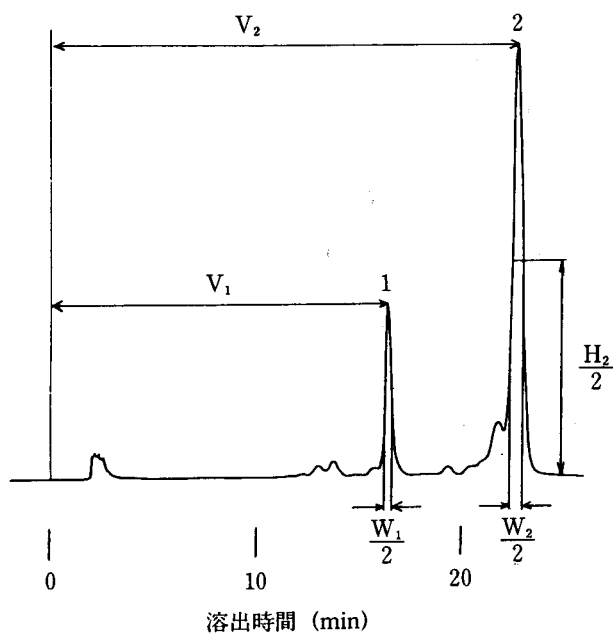


図-3 リボヌクレアーゼAと $\alpha$ -キモトリプシノーゲンAの分離  
 溶離条件；カラム；TSKgel CM-5PW 7.5mmID×7.5cm

溶離液；A 20mMリン酸緩衝液(pH7.0)  
 B A+0.5M NaCl  
 A→B リニアグラジエント(60min)

流速；1 ml/mm

検出；UV (280nm)

試料；1. リボヌクレアーゼA

2.  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンA

## 3. タンパク質分離の応用例

図-5から図-8まで、各種タンパク質を分離した例を示しています。参考のため、TSKgel SP-5PWで同じ試料を分離したクロマトグラムも併せて示しています。

図-5には、標準塩基性タンパク質を分離したクロマトグラムを示しました。TSKgel CM-5PWとTSKgel SP-5PWでは、ほぼ同様の分離をしています。しかし、チトクロムCのピークに注目してみるとTSKgel SP-5PWでは、2本に分かれ、TSKgel CM-5PWでは、1本になっています。これは、TSKgel CM-5PWとTSKgel SP-5PWとの選択性が若干異なるために生じた現象です。

TSKgel CM-5PWでは、チトクロムCの溶出が早くなり、 $\alpha$ -キモトリプシノーゲンAとほぼ重なってしまうためです。同様に選択性の差により、TSKgel CM-5PWではリボヌクレアーゼAも溶出が早くなっています。

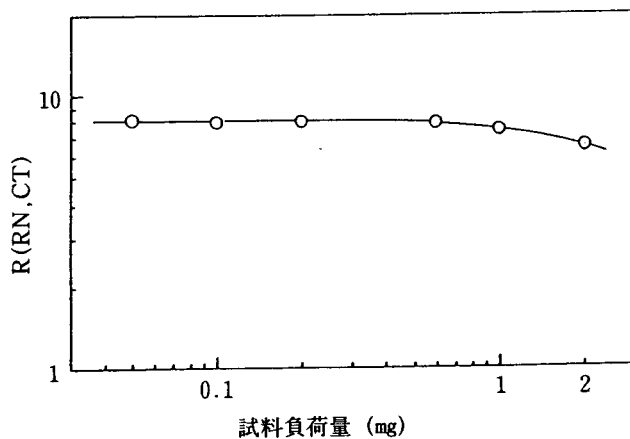


図-4 試料負荷量の分離能への影響

$$R(RN, CT) = 2(V_2 - V_1) / 1.7 \left( \frac{W_1}{2} + \frac{W_2}{2} \right)$$

図-6には、市販デオキシリボヌクレアーゼIIの、図-7には、市販プロメライン、図-8には市販パンプインの分離クロマトグラムを示しました。それぞれに、カラムの選択性の差を、大なり、小なり見るすることができます。

このように、TSKgel SP-5PWとTSKgel CM-5PWとでは、選択性に若干の違いがありますので、試料により、両者のカラムを上手に使い分けることでより良い分離を得ることができます。

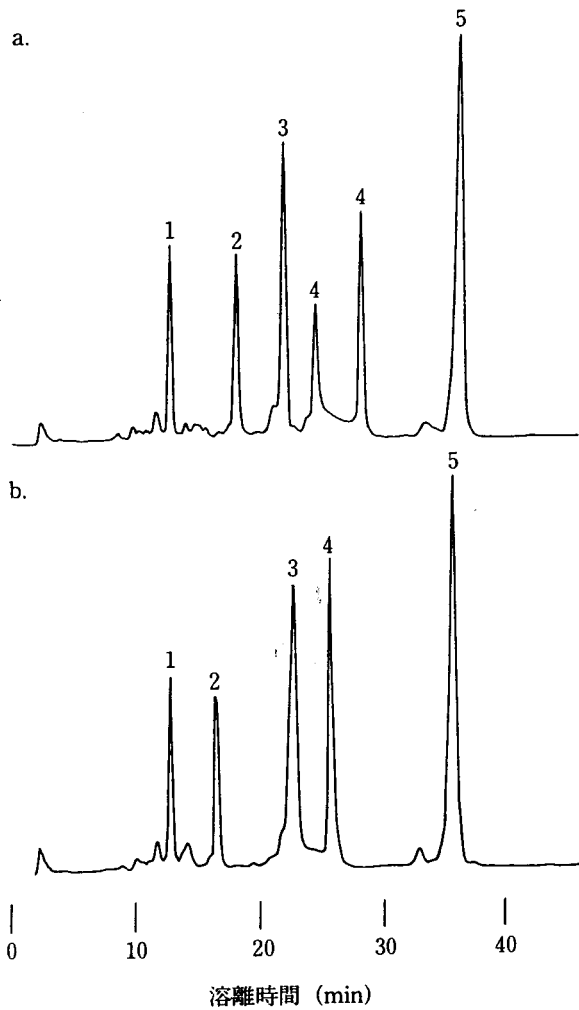


図-5 標準塩基性タンパク質の分離

溶離条件：カラム、試料を除き図-3に同じ

カラム：(a) TSKgel SP-5PW

7.5mmID×7.5cm

(b) TSKgel CM-5PW

7.5mmID×7.5cm

- 試料：1. トリプシノーゲン  
 2. リボヌクレアーゼA  
 3.  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンA  
 4. チトクロムC  
 5. リゾチーム

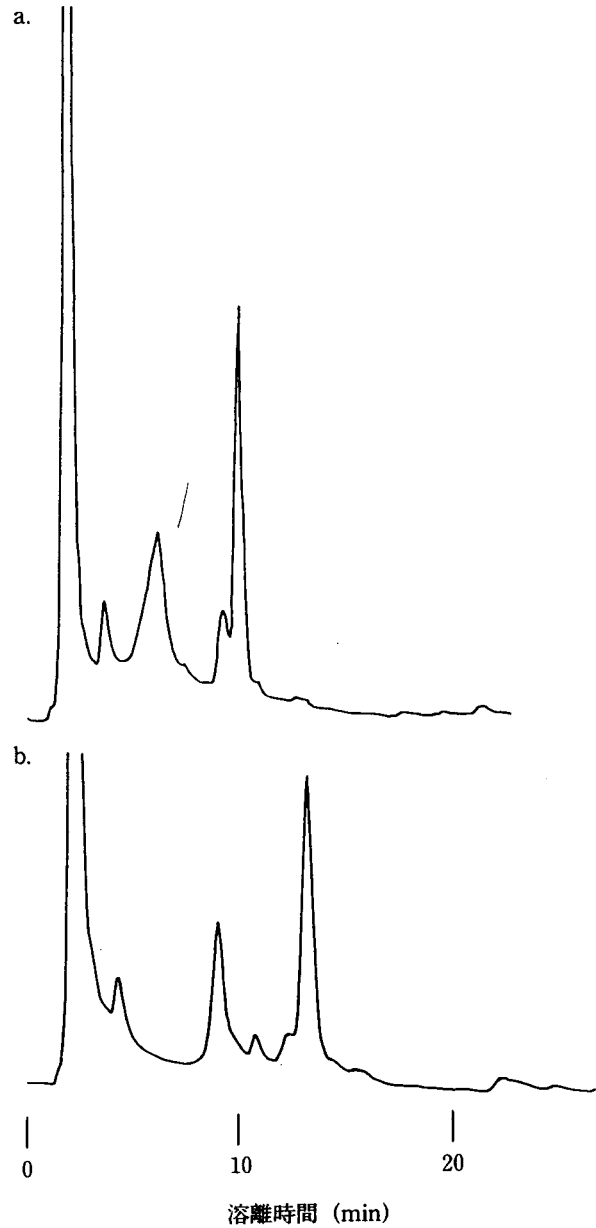


図-6 市販デオキシリボヌクレアーゼIIの分離

溶離条件：図-5に同じ

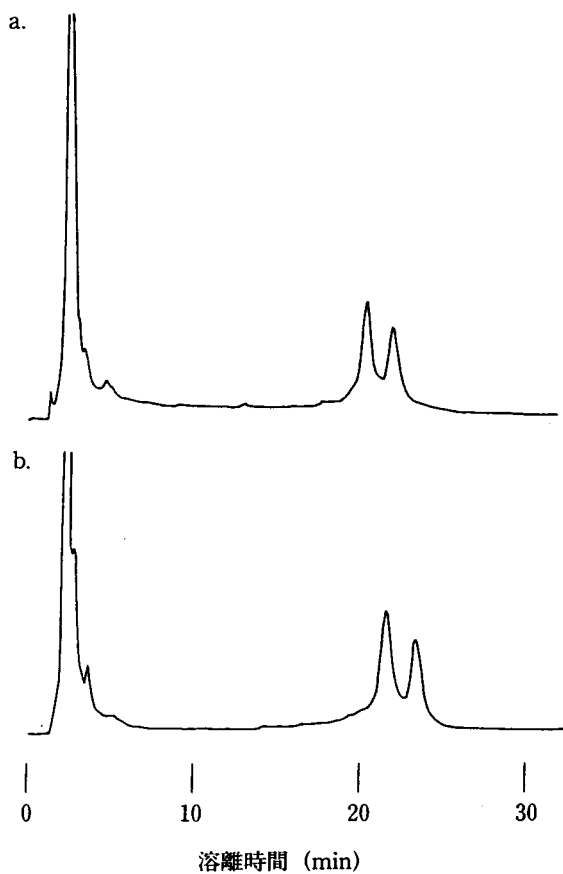


図-7 市販ブロメラインの分離

溶離条件；図-5 に同じ

#### 4. おわりに

以上、TSKgel CM-5PWについて、TSKgel SP-5PWとの比較をしながら紹介しました。TSKgel CM-5PWも高分離能で高回収率を有する高速弱カチオン交換クロマトグラフィ用充填カラムとして種々のタンパク質を含む生体高分子の分離・精製に多く利用することができます。

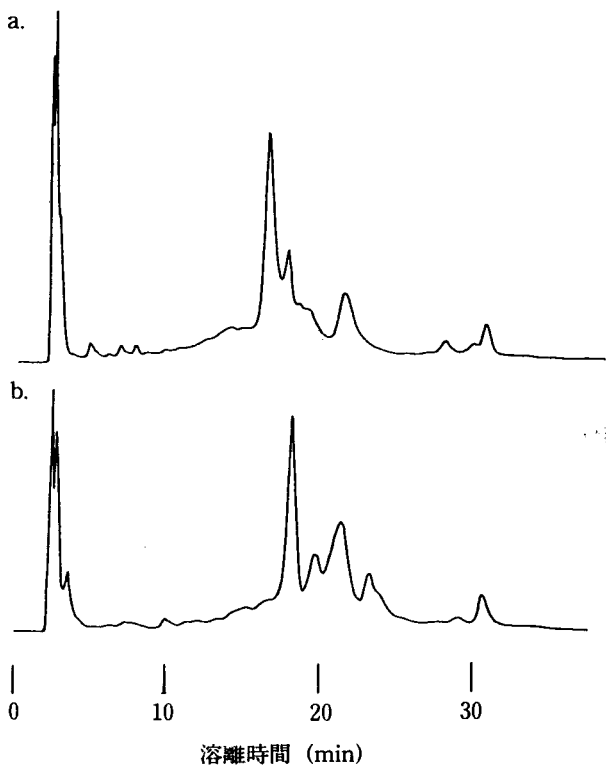


図-8 市販パピインの分離

溶離条件；図-5 に同じ