

TOSOH

SEPARATION REPORT

超高性能イオン交換クロマトグラフィ用充填カラム TSKgel DEAE-NPRによる核酸の分離(II) (オリゴヌクレオチドの分離)

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. カラム使用上の注意	1
3. ホモポリマーの分離	2
4. 合成オリゴヌクレオチドの分離	6
5. おわりに	9

1. はじめに

遺伝子工学の隆盛により、現在あらゆる種類の核酸の研究がなされています。その中でも、遺伝子組み換え用DNAやDNAプローブなど、オリゴヌクレオチドの研究開発が注目されています。これらオリゴヌクレオチドは、既に全自動合成技術が確立されており、合成後の分析や分離精製が重要な課題となっています。従来の分離分析法としては電気泳動法が多用されていますが、高性能液体クロマトグラフィ(HPLC)も利用されています。当社でもTSKgel OligoDNA RPを用いた逆相クロマトグラフィによるオリゴヌクレオチドの分離をセパレーションレポートNo.051で既に報告しています。一方、最近開発された非多孔性イオン交換体TSKgel DEAE-NPRは分離時間約10分で高分離能が得られ、タンパク質や巨大核酸の分離が報告されています(セパレーションレポートNo.056、057)

本稿では、この超高性能イオン交換体TSKgel DEAE-NPRを用いたオリゴヌクレオチドの分離について報告します。

2. カラム使用上の注意

非多孔性イオン交換体TSKgel DEAE-NPRおよびTSKgel SP-NPRは、微量試料でも分離分析できる非常に高性能の充填カラムです。しかし一方では、カラムの汚れに対しても非常に敏感です。従って、これらのカラムを効率良く使用するためには、カラムの保守に対して、従来の多孔性充填剤、カラムよりも一層の注意が必要です。

(1)緩衝液

カラムは試料中の汚れからくる汚染のほか、緩衝液に使用した水や試薬中の不純物により汚染されます。従って、水には超純水、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、緩衝液はフィルター(0.22 μ mまたは0.45 μ m)で濾過したものをご使用ください。

(2)HPLCシステム

カラム内への微粒子や不純物の進入を防ぐため、カラムと送液ポンプの間にラインフィルター(0.22 μ mまたは0.45 μ m)を取り付けてください。使用中にシステムの圧力損失が150kg/cm²以上(流速1.0ml/minで)に上昇した場合は、ラインフィルターが目づまりを起こしていると考えられるので、交換してください。

(3)洗浄再生

カラムの分離能低下の原因の一つに、試料中の不純物の充填剤への吸着による劣化が考えられます。この場合、カラムをアルカリ等の溶液で洗浄すると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ください。

3. ホモオリゴマーの分離

(1) 塩の影響

図-1に重合度20までのオリゴアデニル酸の分離、図-2にポリアデニル酸加水分解物(重合度約100まで)の分離に関する塩の影響を示します。分離時間は、それぞれ8分、15分と非常に早く、しかも高分離能が得

られています。塩にNaClまたはNaClO₄を用いてもクロマトグラムはほぼ同じですが、NaClO₄の方が、溶出力が約2.5倍強いことがわかります。試料を低い塩濃度で溶出したい場合は、塩にNaClO₄を用いると有効です。

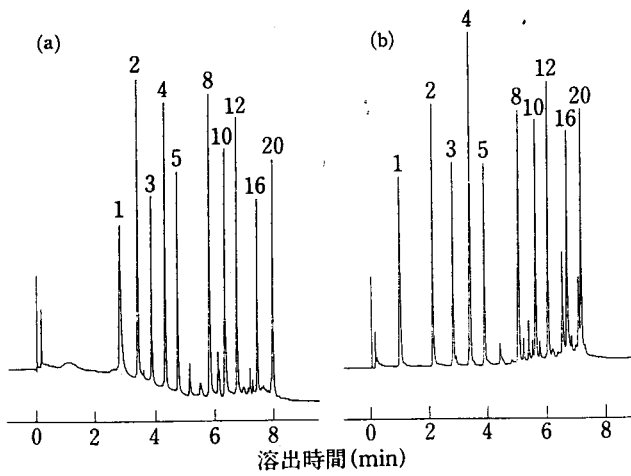


図-1 オリゴアデニル酸の分離

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm

溶離液; (a)A: 20mM トリス-HCl 緩衝液 (pH9.0)

B: A + 1 M NaCl

(b)A: 20mM トリス-HCl 緩衝液 (pH9.0)

B: A + 0.4 M NaClO₄

(a)(b)共にA→Bリアグラジエント (20分)

流速; 1.5ml/min

温度; 25°C

検出; UV (260nm)

試料; オリゴアデニル酸 pd (A) n (nは図中記載)

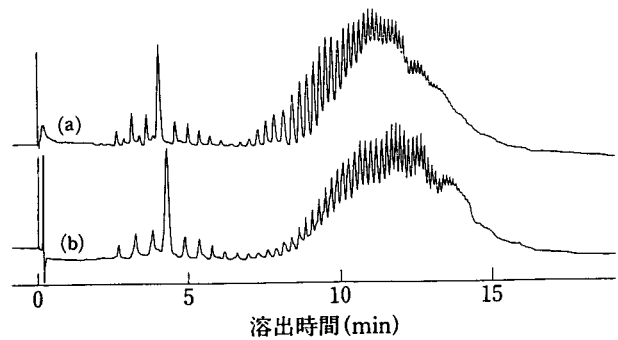


図-2 ポリアデニル酸加水分解物の分離

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm

溶離液; (a)A: 20mM トリス-HCl 緩衝液 (pH9.0)

+ 0.25 M NaCl

B: 20mM トリス-HCl 緩衝液 (pH9.0)

+ 1 M NaCl

(b)A: 20mM トリス-HCl 緩衝液 (pH9.0)

+ 0.09 M NaClO₄

B: 20mM トリス-HCl 緩衝液 (pH9.0)

+ 0.39 M NaClO₄

(a)(b)共にA→Bリアグラジエント (60分)

流速; 1.5ml/min

温度; 25°C

検出; UV (260nm)

試料; ポリアデニル酸 加水分解物 (17mer~ca.100mer)

図-3に塩基の違うホモテトラマーの分離における塩の影響を示します。ホモテトラマーは塩基がA、C、T、Gの順で溶出し、ヌクレオチド中のG含量が多いと吸着力が強くなる傾向があります。NaClO₄の塩濃度をNaClの塩濃度の2.5分の1にしても、分離はNaClほど良くありません。したがって一般的には、塩基組成にもとづく分離にはNaCl、大きさにもとづく分離にはNaClO₄を用いるのが有効と考えられます。

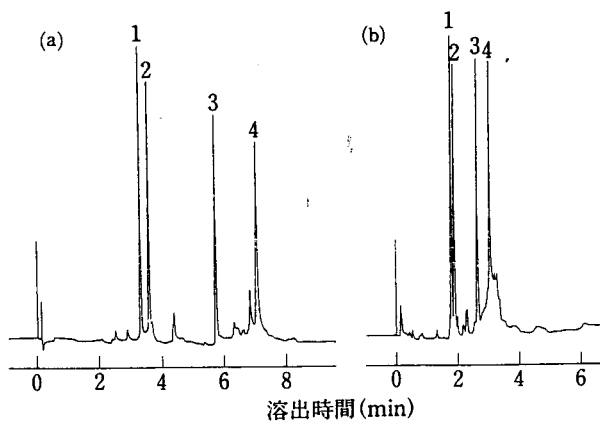


図-3 ホモテトラマーの分離

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
 溶離液；(a)A：20mM 1.3-ジアミノプロパン-HCl
 緩衝液(pH10.5)
 B：A + 1 M NaCl
 (b)A：20mM 1.3-ジアミノプロパン-HCl
 緩衝液(pH10.5)
 B：A + 0.4M NaClO₄
 (a)(b)共にA→Bリニアグラジエント(20分)
 流速；1.5ml/min
 温度；25°C
 検出；UV(260nm)
 試料；1. pd(A)₄(0.1μg) 2. pd(C)₄(0.2μg)
 3. pd(T)₄(0.1μg) 4. pd(G)₄(0.4μg)

(2)pHの影響

表-1にオリゴアデニル酸の分離におけるpHの影響を示します。pH7.5からpH10.5で調べたところ、pH8.5で最も良い分離能が得られました。また、ここではデータを示していませんが、pH7.5と低いところではピーク形状や回収率が悪く、pH8.5ないしpH10.5では良好な結果が得られました。

一方、図-4に塩基の異なるホモテトラマーの分離におけるpHの影響を調べた結果を示します。pH9.0よりpH10.5の方が分離帯が広く、良い結果が得られました。以上の結果から、オリゴヌクレオチドを重合度の差にもとづいて分離する場合はpH8.5ないしpH9.5、塩基の違いによる分離にはpH10.5付近の溶離液を使用するのが良いと考えられます。

表-1 オリゴアデニル酸分離におけるpHの影響

試料	分離能			
	pH7.5	pH8.5	pH9.5	pH10.5
pd(A) ₄ /pd(A) ₅	8.0	8.6	7.2	6.0
pd(A) ₁₀ /pd(A) ₁₂	6.6	7.5	6.4	7.1
pd(A) ₁₆ /pd(A) ₂₀	7.4	7.9	7.0	7.2

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
 溶離液；A：20mM トリス-HCl緩衝液(pH7.5、8.5、9.5)
 A'：20mM 1.3-ジアミノプロパン-HCl緩衝液(pH10.5)
 B：(A or A') + 1 M NaCl
 A or A'→Bリニアグラジエント(20分)
 流速；1.5ml/min
 温度；25°C
 検出；UV(260nm)
 試料；図-1に同じ

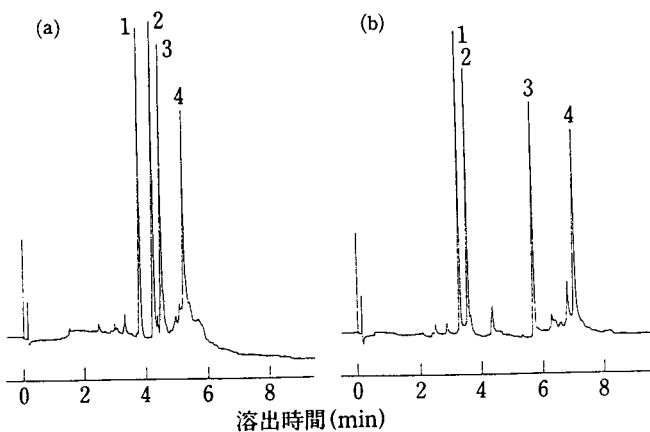


図-4 ホモテトラマー分離におけるpHの影響

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm

溶離液；(a)A：20mM トリス-HCl緩衝液 (pH9.0)

B：A + 1 M NaCl

(b)A：20mM 1.3-ジアミノプロパン-HCl

緩衝液 (pH10.5)

B：A + 1 M NaCl

(a)(b)共にA→Bリアグラジエント (20分)

流速；1.5ml/min

温度；25°C

検出；UV (260nm)

試料；1. pd(A)₄ 2. pd(C)₄

3. pd(T)₄ 4. pd(G)₄

(3)回収率

表-2 にオリゴアデニル酸16量体0.1 μ gおよび12量体ないし18量体の混合物0.5 μ gを用いた回収率を示します。いずれも微量な注入量でも高い回収率が得られています。

表-2 オリゴヌクレオチドの回収率

試料	回収率 (%)
pd(A) ₁₆ (0.1 μ g)	93
[pd(A) ₁₂ ~pd(A) ₁₈]混合物 (0.5 μ g)	96

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm

溶離液；A：20mM トリス-HCl緩衝液 (pH9.0)

B：A + 1 M NaCl

A→Bリアグラジエント (20分)

流速；1.5ml/min

温度；25°C

検出；UV (260nm)

分離条件；図-1(a)と同じ

(4)試料負荷量

図-5 にオリゴアデニル酸16量体のピーク幅の試料負荷量依存性を示します。試料負荷量約0.2 μ gまでは、ピーク幅は一定ですが、それ以上になるとピークは広がっていきます。したがって、最高の分離能を得るための最大試料負荷量は、高純度試料については約0.2 μ g、不純物の多い合成オリゴヌクレオチドなどの試料では、その10倍から30倍の数 μ gと考えられます。しかしこの値は、TSKgel DEAE-NPRにおけるタンパク質の試料負荷量と比較すると約100倍も小さい値です。

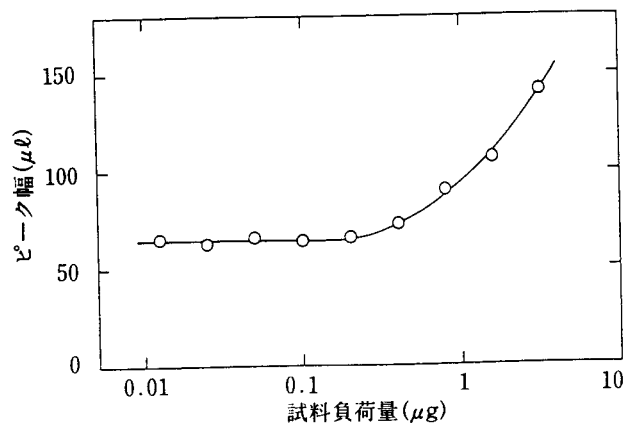


図-5 試料負荷量

分離条件；図-1(a)と同じ

試料；pd(A)₁₆

(5) 分離能の流速依存性

図-6にホモアデニル酸の分離における流速の影響を示します。4量体と5量体の分離は流速1.5ml/min以上ではほぼ一定になりますが、10量体と12量体の分離では流速2ml/minでも徐々に分離能は向上しています。しかしカラムの耐久性および圧力損失を考えると、流速1.5ml/minが最適であると考えられます。

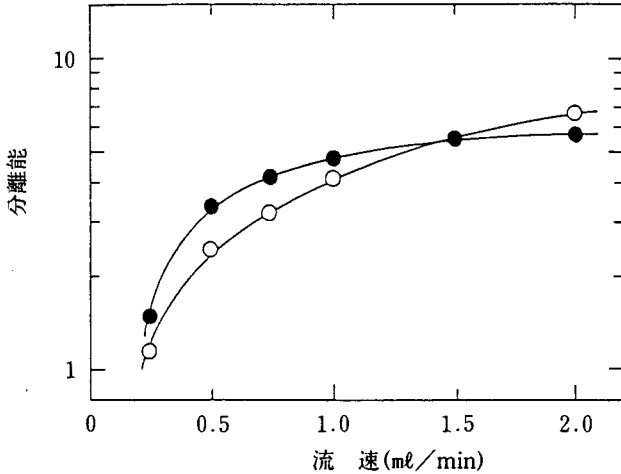


図-6 分離能の流速依存性

分離条件；流速を除き図-1(a)と同じ

分離能；●：pd(A)₄/pd(A)₅

○：pd(A)₁₀/pd(A)₁₂

(6) 分離能のグラジエント時間依存性

図-7にホモアデニル酸の分離におけるグラジエント時間の影響を示します。分離能はグラジエント時間が長くなるにつれて向上しますが、20分以上では大きな変化は見られず、グラジエント時間は一般的には20分ないし60分(NaCl濃度勾配は50mM~17mM/minに相当)が有効と考えられます。

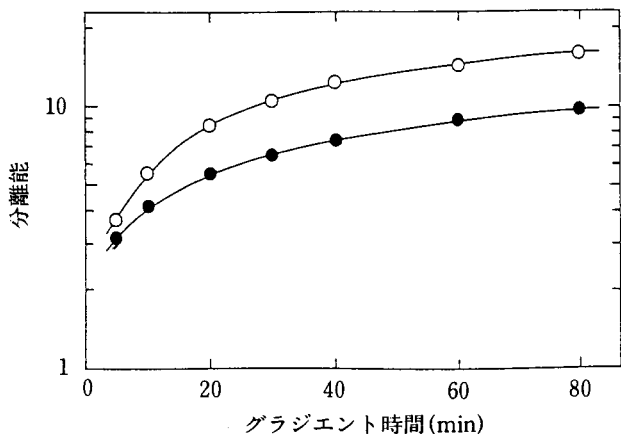


図-7 分離能のグラジエント時間依存性

分離条件；グラジエント時間を除き図-1(a)と同じ

分離能；●：pd(A)₄/pd(A)₅

○：pd(A)₁₆/pd(A)₂₀

(7) カラム長さの影響

図-8にホモアデニル酸の分離におけるカラム長さの影響を示します。30量体までは、グラジエント開始時の塩濃度が高いためカラム長さの影響はほとんどありませんが、それ以上の重合体では、カラムを2本使用した方が、かなり良い分離を示しました。しかしカラムを3本使用しても、それ以上の分離能は得られず、使用時の圧力損失も大きい(流速1ml/minで約300kg/cm²)ので、カラムの連結は2本までが適当と思われる。

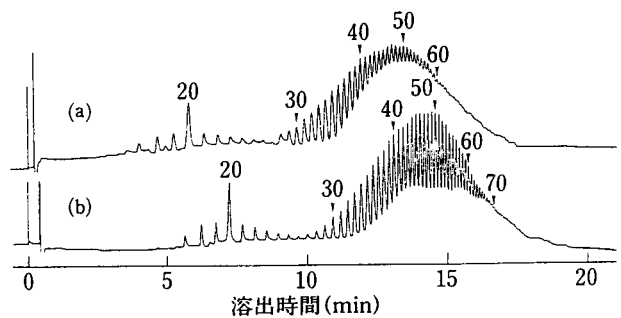


図-8 カラム長さの影響

カラム；(a)TSKgel DEAE-NPR

4.6mmID×3.5cm×1

(b)TSKgel DEAE-NPR

4.6mmID×3.5cm×2

溶離液；A：20mM トリス-HCl 緩衝液(pH9.0)

+0.25M NaCl

B：20mM トリス-HCl 緩衝液(pH9.0)

+1M NaCl

A→Bリニアグラジエント(60分)

流速；1.0ml/min

温度；25℃

検出；UV(260nm)

試料；ポリアデニル酸(16mer~ca.100mer)加水分解物

(8) 温度の影響

25℃から45℃の間では分離能に変化はありませんが、それ以上の温度では分離能が低下したり回収率が低くなりました。また低温（5℃）でも分離能が低下するという結果が得られています。

(9) 有機溶媒の添加

アセトニトリルを30%まで添加することで若干溶出位置を早めたり、ピーク形状を良くする場合がありますが、ほとんど影響はありませんでした。

4. 合成オリゴヌクレオチドの分離

図-9に塩基組成が同じで塩基配列の違う3種類のLinker（オリゴヌクレオチド）の分離を示します。d(GCGATCGC) (Linker Pvu I) および d(CGAGCTCG) (Linker Sac I) は分離されませんでした。d(GCAGCTGC) (Linker Pvu II) は他のLinkerとは異なる溶出位置を示しました。したがって塩基組成が同じでも、塩基配列が違えば分離できる可能性があります。

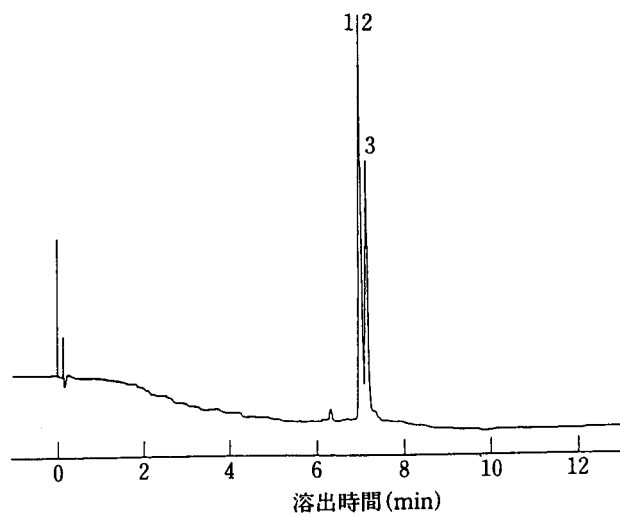


図-9 合成オリゴヌクレオチドの分離(1)

分離条件；図-3(a)と同じ

- 試料； 1. d(GCGATCGC) (Linker Pvu I)
2. d(CGAGCTCG) (Linker Sac I)
3. d(GCAGCTGC) (Linker Pvu II)

図-10, 11, 12, 13に全自動DNA合成装置で合成されたオリゴヌクレオチド17mer, 48mer, 49merおよび72merの分離を示します。いずれも分離時間は、わずか10分でした。17merおよび49merでは不純物が少なく収率よく合成が行われていることがわかります。しかし48merや72merでは目的のオリゴヌクレオチドのほかに、かなりの不純物が含まれ、合成があまりうまく行われていないことがわかります。一般的には、塩基数が多くなるほど不純物も多くなる傾向があります。図-14に合成オリゴ

ヌクレオチド (15mer) の分離におけるpHの影響を示します。図-4と同様に、やや高いpH (pH10.5)で、主ピークが不純物と良く分離されています。

このようにTSKgel DEAE-NPRを用いると、合成されたオリゴヌクレオチドの純度チェックが、わずか10分で行え、電気泳動法による純度チェックに代用できることがわかります。また溶出ピークをフラクションすれば、合成オリゴヌクレオチドをさらに精製することも可能です。

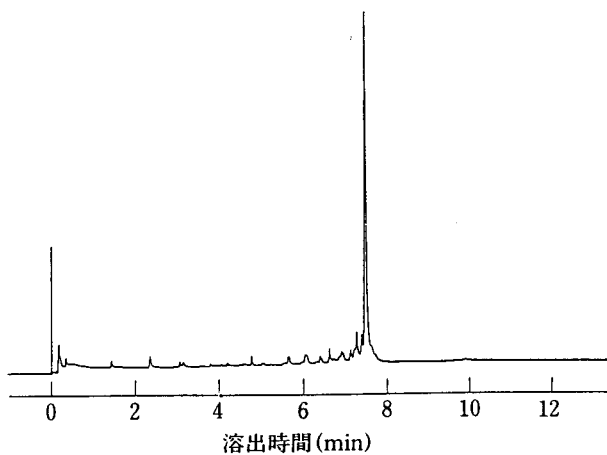


図-10 合成オリゴヌクレオチドの分離(2)

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
 溶離液；A：20mM トリス-HClO₄ 緩衝液 (pH9.0)
 B：A+0.4M NaClO₄
 A→Bリニアグラジエント (20分)
 流速；1.5ml/min
 温度；25℃
 検出；UV (260nm)
 試料；合成オリゴヌクレオチド17mer
 (1 μg in 12 μl)
 d(GTAAAACGACGGCCAGT)

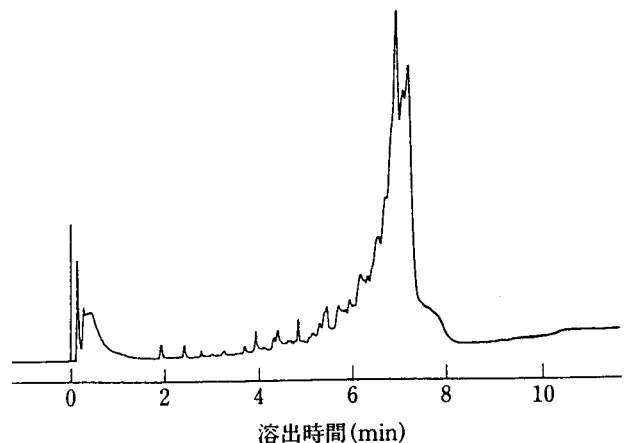


図-11 合成オリゴヌクレオチドの分離(3)

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
 溶離液；A：20mM 1.3-ジアミノプロパン-HClO₄
 緩衝液 (pH10.5)
 B：A+0.4M NaClO₄
 A→Bリニアグラジエント (20分)
 流速；1.5ml/min
 温度；25℃
 検出；UV (260nm)
 試料；合成オリゴヌクレオチド48mer
 (6 μg in 4 μl)
 d(AGCTAGTCACGTA CTGATGCATC
 GGACTGATCGCATGCTAGTACGTC
 A)

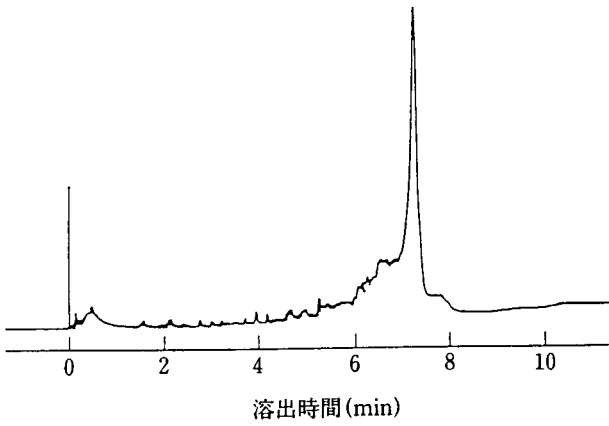


図-12 合成オリゴヌクレオチドの分離(4)

カラム ; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
 溶離液 ; A : 20mM 1.3-ジアミノプロパン-HClO₄
 緩衝液 (pH10.5) + 0.35M NaClO₄
 B : 20mM 1.3-ジアミノプロパン-HClO₄
 緩衝液 (pH10.5) + 1.0M NaClO₄
 A→Bリニアグラジエント (20分)

流速 ; 1.5ml/min

温度 ; 25°C

検出 ; UV (260nm)

試料 ; 合成オリゴヌクレオチド49mer

(6 μg in 4 μl)

d(AGCTTGGGCTGCAGGTCGACTCT
 AGAGGATCCCCGGGCGAGCTCGAA
 TT)

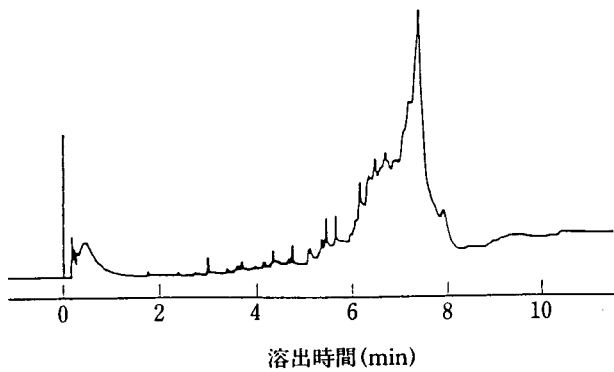


図-13 合成オリゴヌクレオチドの分離(5)

分離条件 ; 図-11に同じ

試料 ; 合成オリゴヌクレオチド72mer

(4 μg in 2 μl)

d(AGCTAGTCACGTA CTGATGCA
 TCGACTGATCGCATGCTAGTA
 CGTCACAGTCATGCGATCGTAC
 TAGCTGA)

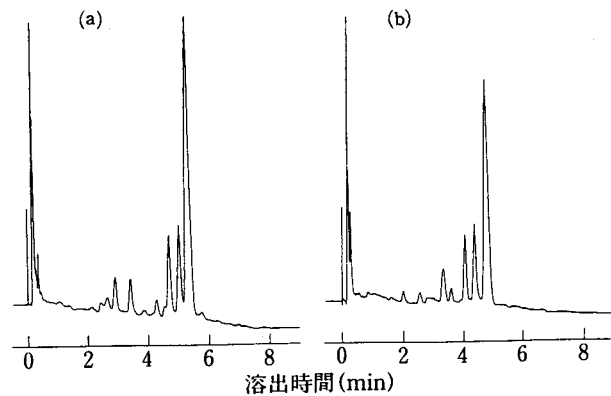


図-14 合成オリゴヌクレオチドの分離(6)

カラム ; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
 溶離液 ; (a) A : 20mM トリス-HCl 緩衝液 (pH9.0)

B : A + 1 M NaCl

(b) A : 20mM 1.3-ジアミノプロパン-HCl
 緩衝液 (pH10.5)

B : A + 1 M NaCl

(a)(b)共にA→Bリニアグラジエント (60分)

流速 ; 1.5ml/min

温度 ; 25°C

検出 ; UV (260nm)

試料 ; 合成オリゴヌクレオチド15mer

d(AACGCACACTAAACG)

5. おわりに

非多孔性イオン交換体TSKgel DEAE-NPRは分離時間わずか10分で、しかも高い分離能が得られます。応用範囲もタンパク質や巨大DNAなどの生体高分子に限らず、オリゴヌクレオチドなどの中低分子にまで広がりました。今後、非多孔性イオン交換体TSKgel DEAE-NPRやTSKgel SP-NPRによる超高性能イオン交換クロマトグラフィは、電気泳動法に代わる新しい分析法として、また微量分取法などに適用できるものと考えられます。