

生体高分子脱塩用カラム TSKgel BioAssist DSの 特性とその応用

科学計測事業部 セパレーションセンター 村中 和昭
荒木 康祐
東京研究所 新材料・無機分野 山中 麻帆
科学計測事業部 セパレーションセンター 三苫 惠民

1. はじめに

近年、バイオテクノロジーの発展に伴い、タンパク質、核酸など生体構成物質の分析、分取には種々の方法が提案されている。その中でも液体クロマトグラフィーを用いた分析、分取手法は古くから行われている手法であるが、対象化合物の広さ、自動化の容易さ、操作の容易さ、そして実用的な感度と迅速性などの面において、液体クロマトグラフィーに変わる分析、分取手法は提案されておらず、今後も発展していくものと考えられる。

タンパク質等の生体高分子を精製する際には、タンパク質を溶解している溶媒を置換する操作が必要な場合が多くある。特に液体クロマトグラフィーを用い精製を行う場合には、様々なモードのクロマトグラフィーを組み合わせる使用の場合がほとんどであり、使用するモードに合わせて試料を溶解している溶媒を調製する必要がある。特に試料溶液中の塩強度を下げる用途が多いことから、これに用いられる液体クロマトグラフィーカラムは“脱塩カラム”と称されている。

溶媒を置換する方法としては、半透膜や限外濾過膜を用いる方法やサイズ排除クロマトグラフィーに基づく液体クロマトグラフィー手法が知られている。液体クロマトグラフィーによる方法は、一度に処理できる

処理量には劣るものの、迅速さ、容易さ、試料安定性などの面で優れた手法である。

これまで市販されている“脱塩カラム”充填剤としては、架橋多糖系充填剤やポリアクリルアミド充填剤が知られているが、これらは脱塩性能に優れるものの、機械的強度に劣るという欠点があり、当社では昨年度親水性アクリルアミド粒子の機械的強度を改善したTSKgel BioAssist DSを上市した。本報告では充填剤の基本構造及び特性について紹介する。

2. TSK-gel BioAssist DSの概要

2.1 基材合成技術

BioAssist DSカラム充填剤は、親水性多孔質ポリアクリルアミド微粒子を基材として用いている。従来アクリルアミド粒子は、モノマー溶解性の関係から逆相懸濁法やスプレードライ法などの製造法が報告されている。BioAssist DS充填剤は油溶性アクリルアミドモノマーを懸濁重合した後、親水化する工程を採用することにより、粒子径単分散粒子製造法であるシード重合法を採用できたこと、親水化工程において高度架橋構造を構築したことにより、粒子径単分散であり、かつ従来品と比較し機械的強度が大幅に改善された親水性アクリルアミド粒子となっている。

表1 TSKgel BioAssist DSカラムの使用

| | |
|-------------|---|
| 粒子径 | 15um (単分散) |
| 排除限界分子量 | ca. 3000 (PEG換算値) |
| Porosity | ca. 60% |
| 基材 | 高架橋度ポリアクリルアミド |
| pH range | 4-11 (長期)、3-12 (短期) |
| Column Size | 4.6mmID x 15cm (2.5mL)、10mmID x 15cm (11.8mL) PEEK |
| Flow-rate | 1.0 (4度) 1.5mL/min (25度) for 4.6mmID column 3.0 (4度) 4.0mL/min (25度) for 10mmID column |

2.2 機械的強度

BioAssist DS脱塩カラムは、その主用途として、タンパク質などの精製において、前段階の液体クロマトグラフィー手法により分画された多数の溶出分画を連続的に脱塩または溶媒置換し、次の液体クロマトグラフィー手法に適した溶液とする様な使用方法に適したカラムとして設計されている。この様な使用方法においては、高塩濃度溶媒と低塩濃度溶媒が交互にかつ連続的に注入されるため、使用される溶媒に対して膨潤収縮の小さい特性が要求され、また短時間の連続注入を繰り返すことへの耐久性が要求される。

これまで市販されている脱塩カラム充填剤は水中で膨潤した架橋多糖や低架橋度ポリアクリルアミド粒子であったため、機械的強度が弱く、連続使用には適さない物であった。BioAssist DSカラムはポリアクリルアミド側鎖間を親水性化合物で架橋した構造を有しているため、従来の脱塩カラム充填剤と比較し遙かに高い機械的強度を有している。

図1に市販脱塩充填剤とBioAssist DS充填剤を同じサイズのカラムに充填し、送液流速を変えて送液圧力を計測した結果を示した。充填剤粒子径が大きく異なるため、市販充填剤の送液圧力は低く表示されているが、低い圧力において充填剤が潰れ送液圧力が急上昇する現象が見られた。BioAssist DS充填剤は計測範囲において圧力上昇傾向は見られるものの充填剤が潰れるような現象はみられておらず、従来充填剤と比較して機械的強度が大きく改善されていることが確認できた。

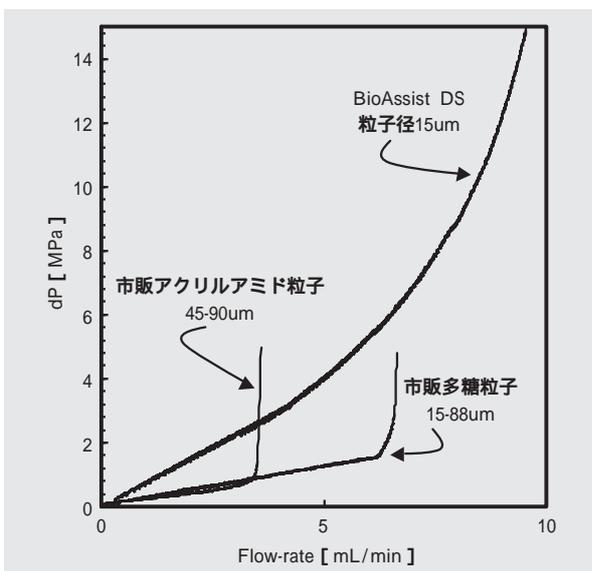


図1 各種充填剤との強度比較

2.3 脱塩特性

脱塩カラム充填剤は、脱塩しようとする試料はゲルの有する細孔に入らず、溶媒中の塩はゲルに浸漬可能であるような小さな細孔径を有している。実際の脱塩クロマトグラフィーにおいては、充填剤細孔に侵入できない分子量の大きいタンパク質は早く溶出され、充填剤細孔に侵入できる塩は、充填剤が有する細孔の容積分だけ遅く溶出される。図2にNaClを含むタンパク質溶液からの脱塩を行った例を示した。約4mLの試料中の脱塩が6分程度の短時間に可能であった。

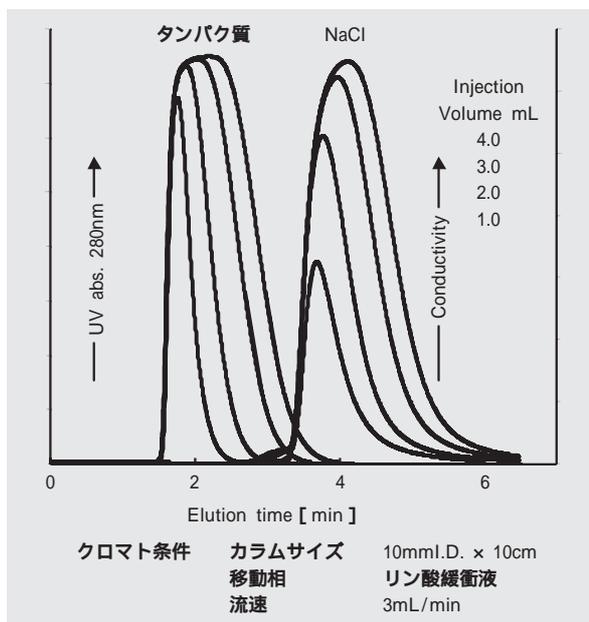


図2 NaCl含有タンパク質溶液の脱塩クロマトグラム

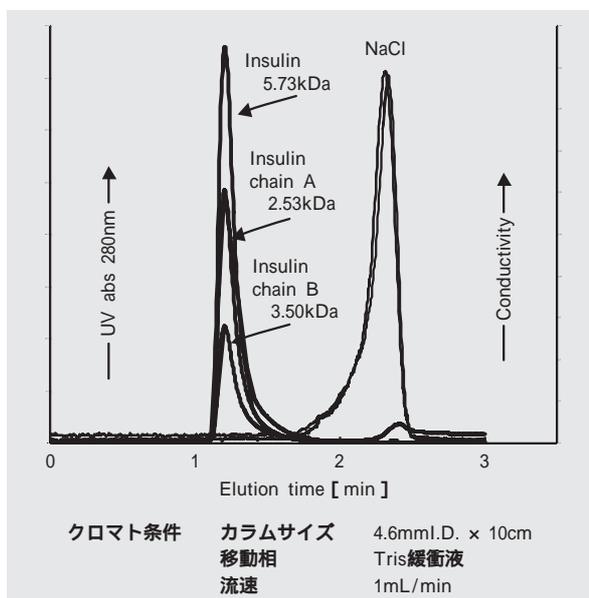


図3 NaCl含有ペプチド溶液の脱塩クロマトグラム

また図3に試料として分子量の小さいペプチドを用いた脱塩例を示した。分子量2500程度のペプチドまでは細孔内に入らず溶出された。一方、分子量1000程度のペプチドは細孔内に入るため、脱塩することはできなかった。

図4はDNA精製で使用されるCsClの脱塩例を示した例である。このときの回収率は90%以上(100ng注入時)であった。

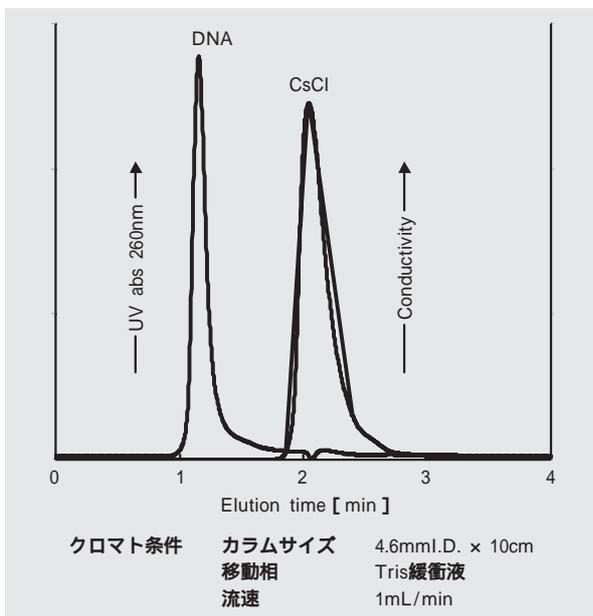


図4 CsCl含有DNA溶液の脱塩クロマトグラム

3. おわりに

タンパク質、核酸類の精製工程において実施される脱塩、溶媒交換カラムとして開発しましたTSKgel BioAssist DSは、従来困難であった高い親水性と強度を両立したカラムであり、生化学分野での精密分析、精密分取に有用なカラムである。