

非多孔性充填剤によるタンパク質・ペプチド・ 核酸の高性能液体クロマトグラフィー

中 谷 茂
北 村 隆 司
山 崎 洋 介
小 宮 克 夫
加 藤 芳 男

Recent Advance in High-Performance Liquid Chromatography of Proteins, Peptides, and Nucleic Acids on Non-porous Packings

Shigeru NAKATANI
Takashi KITAMURA
Yosuke YAMASAKI
Katsuo KOMIYA
Yoshio KATO

High-performance liquid chromatography on non-porous packings is an efficient tool for the rapid separation of proteins. We have recently demonstrated that the non-porous packings are also useful for the separation of peptides and nucleic acids. In the present paper, new applications of these packings to the separation of proteins, peptides and nucleic acids are reviewed briefly.

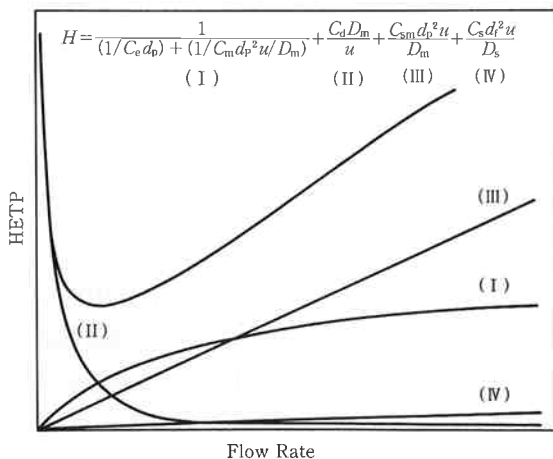
1. はじめに

近年、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) は急速に進歩し、生化学分野における分離、分析の手段として欠かせないものとなった。バイオテクノロジーの発展に伴い HPLC の有用性がますます高まるなかで、HPLC をさらに高性能化することが期待されている。遺伝子組換え産物など非常に付加価値の高い生体物質の品質管理や工程管理が必要となり、ナノグラムレベルの試料を迅速かつ高分離能で分離することが求められてい

る。

タンパク質や核酸など高分子量の物質の HPLC では細孔径の大きい充填剤を用いることにより高分離能が得られるため、生体高分子の HPLC には細孔径数百～数千オングストロームの多孔性充填剤が従来より広く用いられている。多孔性充填剤を用いた HPLC の超高性能化は粒子径を小さくすることにより試みられている。試料がカラム内を移動するとき徐々に試料のバンドが広がるが、これは移動相の流れが乱れること、移動相と固定相との間での試料の濃度平衡が成り立たないことな

どが主な原因である。これらのピーク幅を広くする要因は粒子径に依存し、粒子径を小さくすることにより分離性能は大幅に向上する²⁾。現在では粒子径 2 μm 程度の多孔性充填剤が開発されている³⁾。一方、HPLC の超高性能化のもうひとつの方法として、細孔のない非多孔性充填剤の使用が検討されている。非多孔性充填剤は1967年 Horváth ら⁴⁾ によって初めて紹介されたが、その後、多孔性充填剤の優位性が認められ、非多孔性充填剤はほとんど実用化されていなかった。しかし、最近、粒子径数 μm の非多孔性充填剤が相次いで開発され⁵⁻¹⁰⁾、多孔性充填剤よりも高性能をもつことが報告されている¹¹⁾。Fig. 1 に多孔性充填剤を用いた液体クロマトグラフィーにおける理論段相当高さ (HETP) と移動相の流速の関係を示す。HETP はカラム内での試料バンドの広がりをおよぼすパラメーターのひとつであり、HETP が小さいほど試料のピーク幅は狭く、分離能が高いといえる。HETP は図に示した4つのプロセスで起こる試料バンドの広がりによって考えることができる。これらのうち、HPLC で一般的に用いられる流速の範囲では第II項カラム軸方向の拡散と第IV項固定相中の物質移動は無視できるので、多孔性充填剤を用いた場合に試料ピークの広がりには寄与する因子は第I項移動相中のうず状拡散と物質移動および第III項ポア内部に停滞した移動相中の物質移動である。一方、非多孔性充填剤では充填剤内部での試料の拡散が起らないため、さらに第III項も無視できる。したがって、非多孔性充填剤では多孔性充填剤よりも試料ピークの広がりをおよぼすことができると考えられる。我々は先に、非多孔性イオン交換体を開発



- (I) Eddy diffusion and mobile-phase mass transfer
 (II) Longitudinal diffusion
 (III) Stagnant mobile-phase mass transfer
 (IV) Stationary-phase mass transfer

Fig. 1. Relationship between HETP and flow rate

し^{12,13)}、その基本的性質を本研究報告においても報告している¹⁴⁾。その後も我々は、逆相クロマトグラフィー用^{15,16)} および疎水性クロマトグラフィー用^{17,18)} 非多孔性充填剤を開発し、タンパク質のみならずペプチドや核酸の分離への応用を試みている。本稿では、非多孔性充填剤によるタンパク質・ペプチド・核酸の分離について述べる。

2. タンパク質の分離

(1) 純度検定への応用

Fig. 2 に我々が開発した非多孔性充填剤の模式図を示す。いずれも粒子径 2.5 μm の非多孔性親水性樹脂の表面に各種官能基を導入したものである。

Fig. 3, Fig. 4 にイオン交換クロマトグラフィー用充填剤 TSKgel DEAE-NPR をタンパク質の純度検定に用いた例を示す。ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー用充填剤 TSKgel HA-1000 によりマウス腹水からモノクローナル抗体を分離精製し (Fig. 3), TSKgel DEAE-NPR により IgG 画分の純度検定を行ったところ (Fig. 4), アルブミンやトランスフェリンなどの夾雑物はほとんど除かれていることがわかった。また, Fig. 5 に疎水性クロマトグラフィー用充填剤 TSKgel Butyl-NPR によるモノクローナル抗体の分離を示す。アルブミンやトランスフェリンは IgG に比べて疎水性が弱く、約3分という短時間で良好に分離されている。初期硫酸濃度を下げてアルブミンやトランスフェリンに対する保持力をさらに弱めることにより、さらに迅速な純度検定が可能と思われる。

Fig. 6., Fig. 7 に市販精製トリプシン標品中に存在する α -トリプシンと β -トリプシンの分離を示す。活性化

Non-Porous Packing Materials

Name	Ligand	Ligand content (mmol/ml)
DEAE-NPR	diethylaminoethyl	0.13
SP-NPR	sulfopropyl	0.08
Octadecyl-NPR	octadecyl	1.0
Butyl-NPR	butyl	0.1

Column size: 4.6 mm I.D. \times 3.5 cm

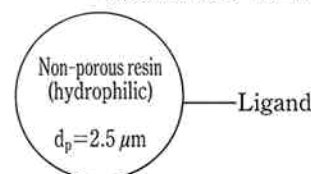


Fig. 2 Schematic representation of TSKgel NPR Series

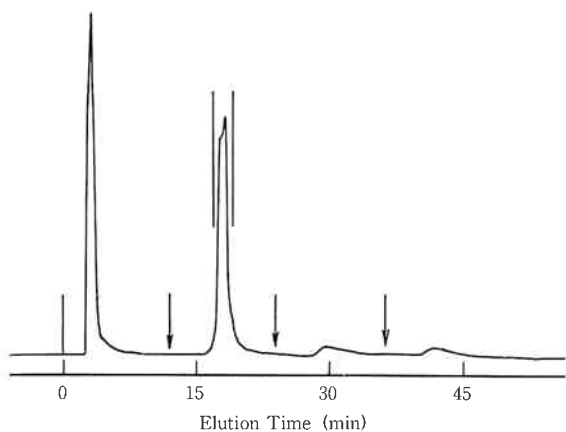


Fig. 3 Separation of monoclonal antibody from ascites fluid by high-performance hydroxyapatite chromatography on TSKgel HA-1000

Column : TSKgel HA-1000 (75×7.5 mm I.D.+10×6 mm I.D.)

Sample : anti-chicken 14 K lectin, ascites fluid (1.52 mg in 0.1 ml)

Elution : step gradient of sodium phosphate (pH 5.8) from 60 to 150 mM at 12 min, followed by 300 mM at 24 min and 500 mM at 36 min

Flow rate: 1.0 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (280 nm)

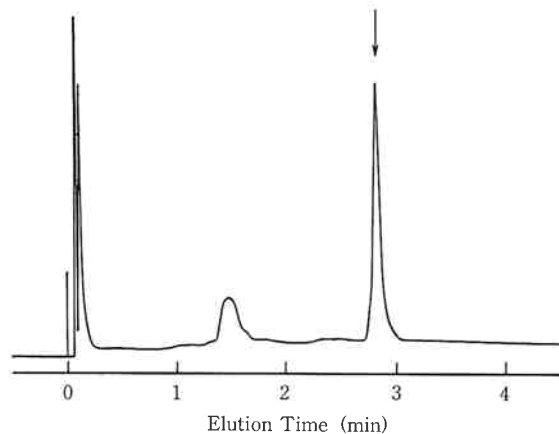


Fig. 5 Separation of monoclonal antibody (IgG₁) from ascites fluid by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Butyl-NPR

Column : TSKgel Butyl-NPR (35×4.6 mm I.D.)

Sample : anti-chicken 14 K lectin, ascites fluid (38 μg in 2.5 μl)

Elution : 10 min linear gradient of ammonium sulfate from 1.5 M to 0 in 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0)

Flow rate: 1.0 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (280 nm)

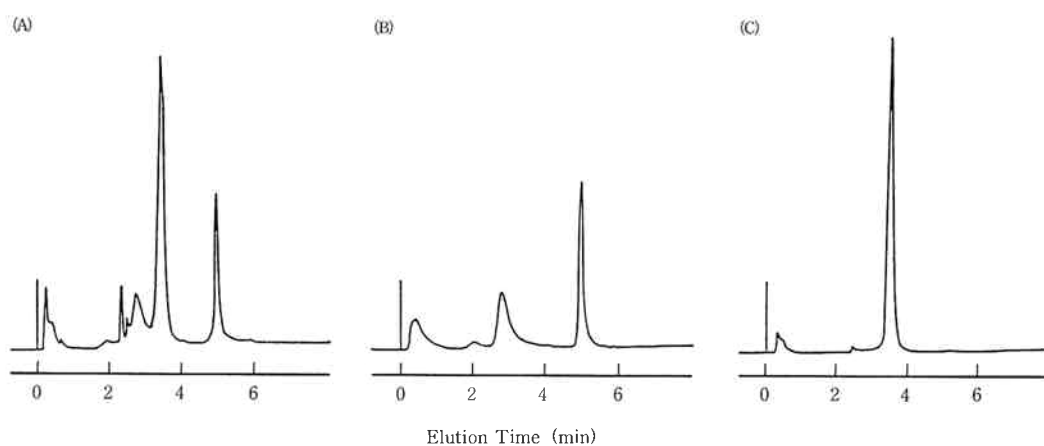


Fig. 4 Purity check of monoclonal antibody fraction obtained from TSKgel HA-1000 by high-performance ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR

Column : TSKgel DEAE-NPR (35×4.6 mm I.D.)

Sample : anti-chicken 14 K lectin, A. ascites fluid (76 μg in 5 μl), B. unbound fraction (100 μl), C. bound IgG fraction (100 μl)

Elution : 10 min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (280 nm)

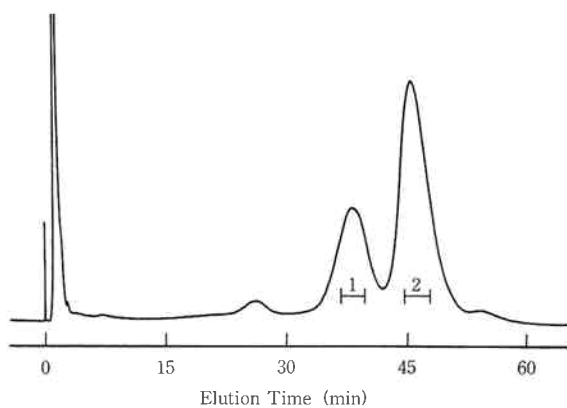


Fig. 6 Separation of trypsin by affinity chromatography on TSKgel STI-5PW

Column : TSKgel STI-5PW (40×6 mm I.D.)

Sample : bovine pancreas trypsin (0.5 mg)

Eluent : A; 0.1 M citrate-phosphate buffer+0.5 M NaCl (pH 7.0),
B; 0.1 M citrate-phosphate buffer+0.5 M NaCl (pH 3.0)

Elution : A→B 60 min linear gradient

Flow rate: 0.8 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (280 nm)

型高性能アフィニティークロマトグラフィー用充填剤 TSKgel Tressyl-5PW に大豆トリプシンインヒビターを固定化した充填剤を用いて、 α -トリプシンと β -トリプシンを分離後 (Fig. 6), TSKgel Butyl-NPR により純度検定を行った (Fig. 7)。その結果、 α -トリプシン画分 (フラクション 1) にはわずかながら β -トリプシンが含まれるが、 β -トリプシン画分 (フラクション 2) はほぼ均一であることがわかった。

また、Fig. 8 に逆相クロマトグラフィー用充填剤 TSKgel Octadecyl-NPR をタンパク質の純度検定に用いた例を示す。試料は精製プロテイン A であるが、これはディスク電気泳動でシングルバンドしか検出されない高純度品として市販されているものである。しかし、この図に示すようにメインピークの後ろに小さなピークが検出され、均一標品でないことがわかった。以上のように、非多孔性充填剤により短時間で高分離能が得られ、タンパク質の純度検定を迅速に行うことができる。

〔2〕 食品タンパク質の分離

Fig. 9, Fig. 10 に食品中に含まれるタンパク質の分析例を示す。近年、大豆タンパク質などの植物性タンパク質が加工食品の原料として広く用いられている。Fig.

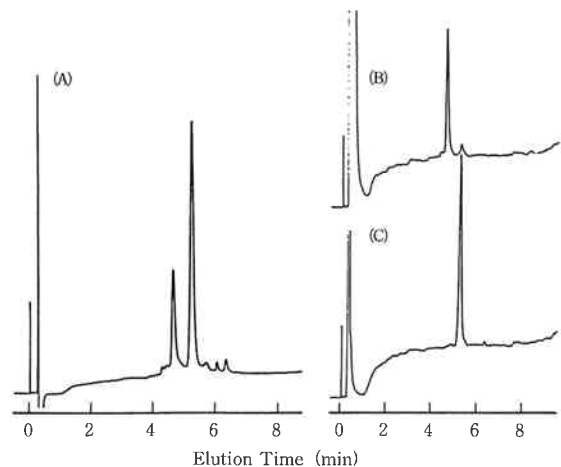


Fig. 7 Separation of trypsin by hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Butyl-NPR

Column : TSKgel Butyl-NPR (35×4.6 mm I.D.)

Sample : bovine pancreas trypsin; (A) original sample (10 μ g), (B) fraction 1, (C) fraction 2

Elution : 10 min linear gradient of ammonium sulfate from 2 to 0 M in 20 mM Tris-HCl buffer, pH.7.5

Flow rate: 1.0 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (280 nm)

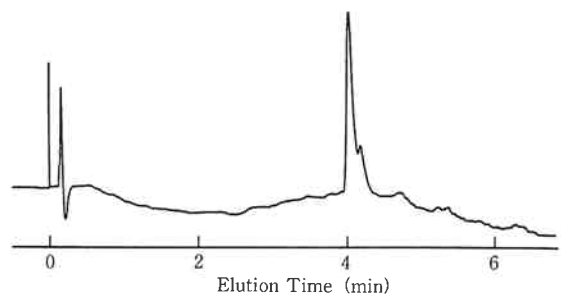


Fig. 8 Separation of protein A by reversed-phase chromatography on TSKgel Octadecyl-NPR

Column : TSKgel Octadecyl-NPR (35×4.6 mm I.D.)

Sample : *Staphylococcus aureus* protein A

Elution : 10 min linear gradient of acetonitrile from 15 to 80% in 5 mM HClO₄

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (220 nm)

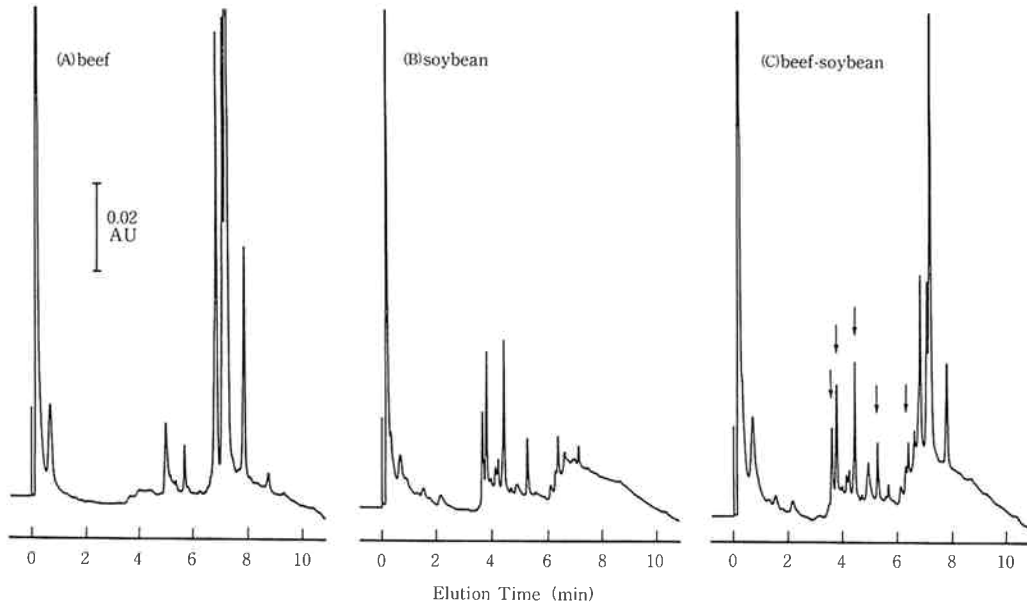


Fig. 9 Separation of beef-soybean protein mixture by reversed-phase chromatography on TSKgel Octadecyl-NPR

Column : TSKgel Octadecyl-NPR (35×4.6 mm I.D.)

Sample : (a) beef protein (20 μg in 18 μl), (b) soybean protein (10 μg in 6 μl), (c) beef-soybean protein mixture (10 μg each)

Elution : 10 min linear gradient of acetonitrile from 5 to 80% in 100 mM HClO₄

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (220 nm)

Arrows indicate characteristic peaks of soybean protein.

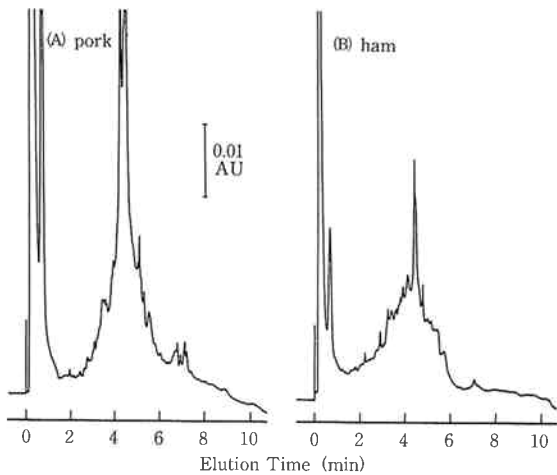


Fig. 10 Separation of food protein by reversed-phase chromatography on TSKgel Octadecyl-NPR

Column : TSKgel Octadecyl-NPR (35×4.6 mm I.D.)

Sample : (a) pork protein (extracted at 80°C, 5 μg in 63 μl), (b) extract of ham (5 μg in 56 μl)

Elution : 10 min linear gradient of acetonitrile from 5 to 80% in 100 mM HClO₄

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (220 nm)

9 に牛肉タンパク質と大豆タンパク質を TSKgel Octadecyl-NPR で分離したときのクロマトグラムを示す。それぞれに特徴的なピークが見られ、牛肉と大豆を混合した場合にこれらのピークによって牛肉や大豆を検出できると考えられる。また、Fig. 10 に市販のハムの分析

例を示す。Fig. 10(a) は豚肉抽出液のクロマトグラム、Fig. 10(b) は豚肉、植物性タンパク質および卵タンパク質を原料としたハムの抽出液のクロマトグラムである。両者のクロマトグラムには同じ溶出位置にメインピークが見られ、このハムに豚肉が含まれていることが確かめ

られた。このように、非多孔性充填剤によるクロマトグラフィーは食品の製造工程の管理や品質管理などリアルタイムの分析結果が求められる分野にも応用できる。

(3) ナノグラム試料の分離

非多孔性充填剤には細孔がなく、表面積が小さいため、多孔性充填剤で起りやすい試料と充填剤との非特異的吸着が少ないと考えられる。したがって、ごく微量の試料でも高い回収率が得られると予想される。Table 1 に試料負荷量 400 ng のときのタンパク質の回収率を示す。いずれも非常に高い回収率が得られている^{19,20}。また、Fig. 11, Fig. 12 にタンパク質の試料負荷量とピーク面積の関係を示す。イオン交換クロマトグラフィーでは試料負荷量が 25~400 ng、逆相クロマトグラフィーでは

Table 1 Recovery of proteins with 400 ng loads

Column	Protein	Recovery (%)
DEAE-NPR	ovalbumin	103
	soybean trypsin inhibitor	98
	IgG ₁	89
SP-NPR	lysozyme	94
Octadecyl-NPR	ribonuclease A	95
	cytochrome c	102
	myoglobin	99

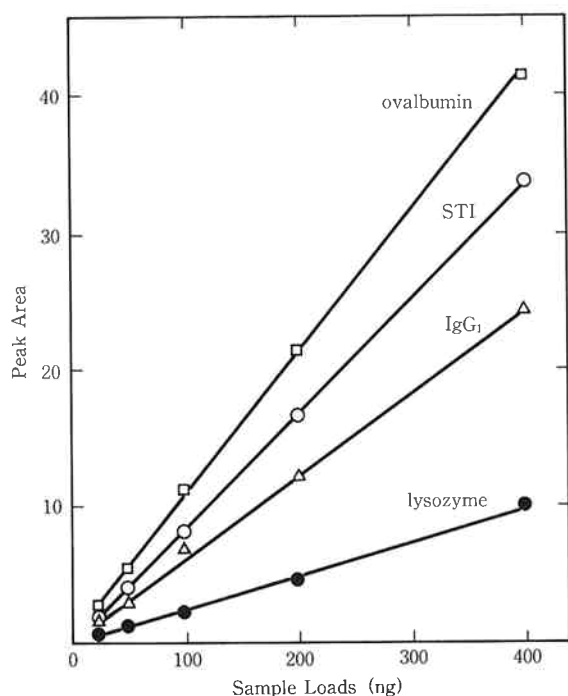


Fig. 11 Relationship between sample loads and peak area of eluate in the separation of proteins by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE and SP-NPR

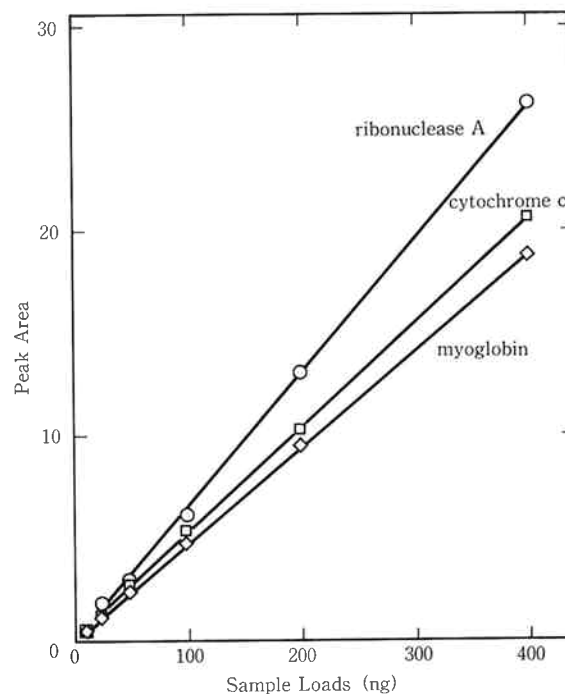


Fig. 12 Relationship between sample loads and peak area of eluate in the separation of proteins by reversed-phase chromatography on TSKgel Octadecyl-NPR

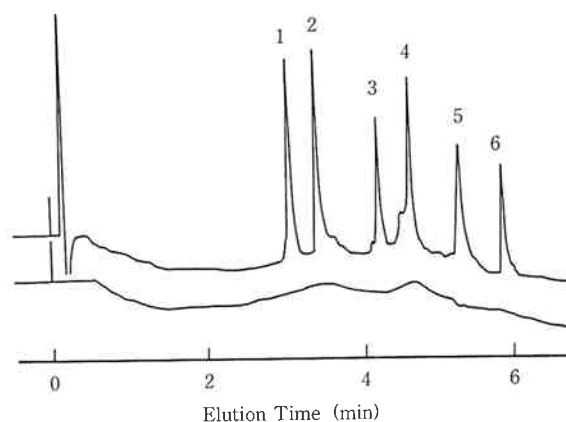


Fig. 13 Separation of a protein mixture by reversed-phase chromatography on TSKgel Octadecyl-NPR

Column : TSKgel Octadecyl-NPR (35×4.6 mm I.D.)

Sample : 1. ribonuclease, 2. insulin, 3. cytochrome c, 4. lysozyme, 5. transferrin, 6. myoglobin (50 ng each)

Elution : 10 min linear gradient of acetonitrile from 15 to 80% in 5 mM HClO₄

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (220 nm)

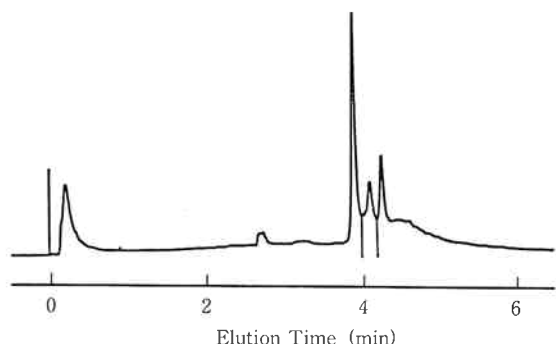


Fig. 14 Separation of hexokinase by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR

Sample loading : 500 ng
 Elution : 10 min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)
 Flow rate: 1.5 ml/min
 Temperature: 25°C
 Detection: fluorescence (ex.; 280 nm, em.; 340 nm)
 Recovery of enzymatic activity was 80%.

12.5~400 ng の範囲で試料負荷量とピーク面積は直線関係にあった。Table 1 に示したように、試料負荷量 400 ng での回収率はほぼ定量的であったので、イオン交換クロマトグラフィーでは約 20 ng まで、逆相クロマトグラフィーでは約 10 ng までタンパク質は定量的に回収できると考えられる。Fig. 13 に TSKgel Octadecyl-NPR による微量タンパク質の分離を示す。各試料の負荷量は 50 ng と微量にもかかわらず、シャープなピークとして溶出されている。また、Fig. 14 に TSKgel DEAE-NPR から溶出された微量の酵素の活性回収率を検討した結果を示す。試料は粗製ヘキソキナーゼ 500 ng で、ヘキソキナーゼ画分を集めて活性回収率を調べたところ80%であった。以上のように、非多孔性充填剤によるイオン交換クロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィーでは、ナノグラムレベルの試料でもシャープなピークとして分離可能であり、タンパク質の回収率や酵素活性の回収率も非常に高い。したがって、非多孔性充填剤は微量試料での純度検定や品質管理あるいは酵素などの微量分取に適していると考えられる。

3. ペプチドの分離

(1) 合成ペプチドの純度検定

Fig. 15, Fig. 16 に逆相クロマトグラフィー用充填剤 TSKgel Octadecyl-NPR による合成ペプチドの分離を

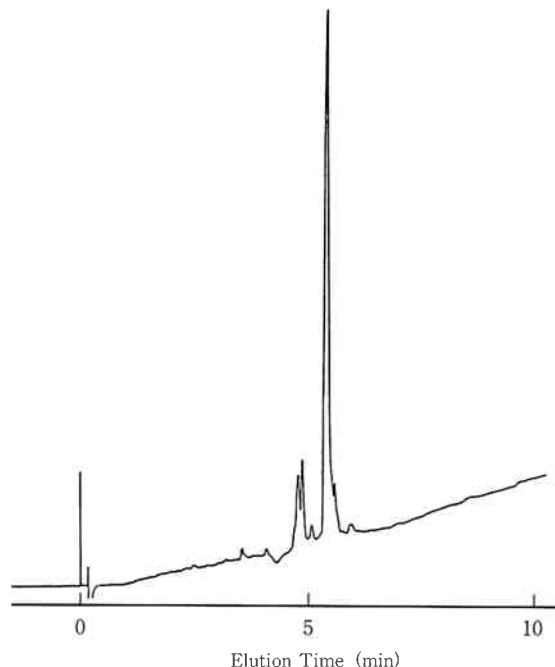


Fig. 15 Separation of synthetic peptide by high-performance reversed-phase chromatography on TSKgel Octadecyl-NPR

Column : TSKgel Octadecyl-NPR (35×4.6 mm I.D.)
 Sample : dodecapeptide (EAEDLQVG-QVCG, 10 μg in 10 μl)
 Elution : 20 min linear gradient of acetonitrile from 0 to 80% in 0.1% TFA
 Flow rate: 1.5 ml/min
 Temperature: 25°C
 Detection: UV (215 nm)

示す。Fig. 15 はアミノ酸12個からなる合成ペプチドのクロマトグラムである。不純物は少なく、収率良く合成されていることがわかる。一方、Fig. 16 はアミノ酸32個の合成ペプチドのクロマトグラムであるが、Fig. 15 のクロマトグラムに比べて不純物が多く、アミノ酸の数が増えるほど合成の収率が悪くなるのがわかる。以上のように、合成ペプチドの純度検定が数分で行うことができる。また、タンパク質の場合と同様にペプチドの場合でも、ナノグラムレベルの試料が高い回収率で回収できるので、微量の合成ペプチドの精製も可能である。

(2) ペプチドマッピングへの応用

非多孔性充填剤は表面積が小さいため、多孔性充填剤に比べて官能基の導入量は少ない。したがって、逆相クロマトグラフィーでは低分子量のペプチドなど疎水性の弱い試料に対して保持力が不十分な場合がある。このような場合、アルキルスルホン酸などの疎水性イオンペア

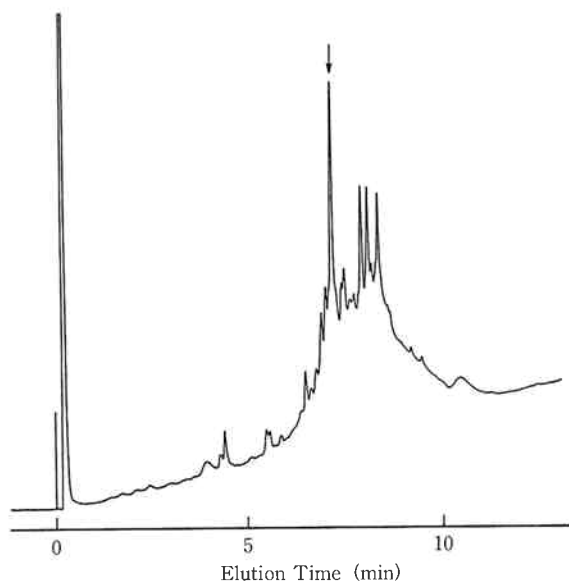


Fig. 16 Separation of synthetic peptide by high-performance reversed-phase chromatography on TSKgel Octadecyl-NPR

Column : TSKgel Octadecyl-NPR
(35×4.6 mm I.D.)

Sample : triacontadipeptide (EAEDL-
QVGQVELGGPGAGSL-
QPLALEGSLQC, 12 μ g in
12 μ l)

Elution : 20 min linear gradient of
acetonitrile from 0 to 80% in
0.1% TFA

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (215 nm)

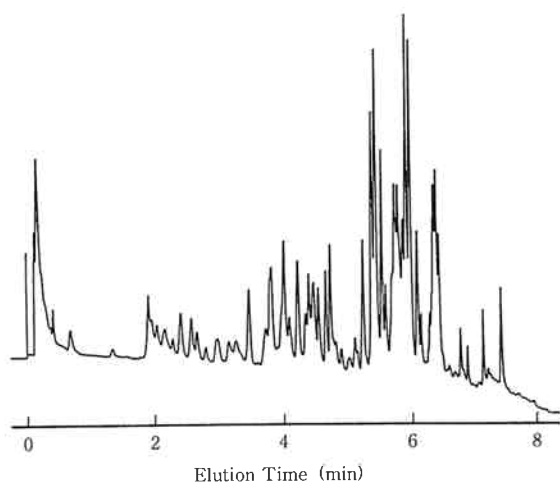


Fig. 17 Separation of tryptic digests of BSA by reversed-phase chromatography on TSKgel Octadecyl-NPR

Column : TSKgel Octadecyl-NPR
(35×4.6 mm I.D.)

Sample : Tryptic digests of reduced
and S-carboxymethylated
BSA (10 μ g)

Eluent A : 1 mM sodium dodecyl sulfate
in 50 mM phosphate buffer,
pH 2.8

Eluent B : 60% acetonitrile in eluent A

Elution : 10 min linear gradient from
eluent A to eluent B

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (210 nm)

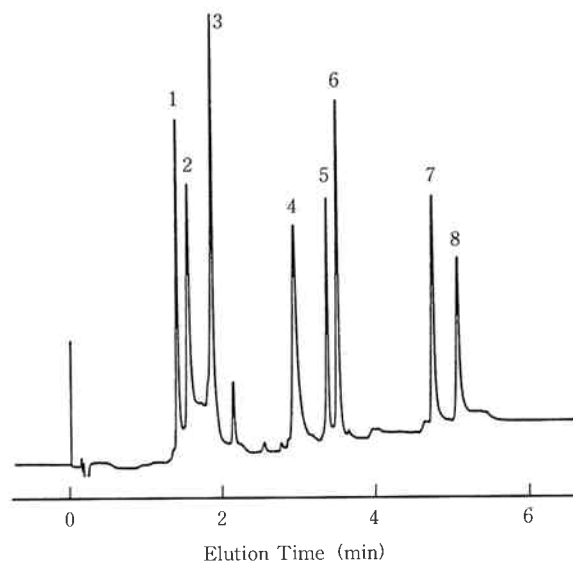


Fig. 18 Separation of peptides by ion-exchange chromatography on TSKgel SP-NPR

Column : TSKgel SP-NPR (35×4.6
mm I.D.)

Sample : 1. γ -endorphin (0.25 μ g), 2.
bombesin (0.5 μ g), 3.
calcitonin (0.25 μ g), 4.
substance P (0.5 μ g), 5.
insulin (0.5 μ g), 6. β -endorphin
(1 μ g), 7. VIP (1 μ g), 8.
parathyroid hormone (0.5 μ g)

Elution : 10 min linear gradient of
sodium sulfate from 0 to 0.15
M in a mixture of 20 mM
acetate buffer (pH 3.5) and
acetonitrile (60/40 by volume)

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (215 nm)

試薬を溶離液に加えることにより保持力が向上する。酸性条件下ではペプチドのアミノ基とアルキルスルホン酸のスルホン酸基がイオン対を形成し、ペプチドの見かけの疎水性が高くなる。この方法はイオンペアクロマトグラフィーと呼ばれる²¹⁻²³⁾。Fig. 17 に TSKgel Octadecyl-NPR を用いたイオンペアクロマトグラフィーによるプロテアーゼ消化ペプチドの分離を示す。約8分という短時間で高分離能が得られ、ペプチドマッピング法による遺伝子組換え産物の純度検定やタンパク質消化のモニタリングなど迅速な分析が求められる分野への応用が可能である。

ペプチドの分離には逆相クロマトグラフィーが主に用いられているが、低 pH 条件下での強カチオン交換体による分離も可能である。pH 3 付近の条件下ではペプチドのC末端および酸性アミノ酸のカルボキシル基は解離しておらず、N末端および塩基性アミノ酸は正の電荷を帯びている。したがって、酸性ペプチド、塩基性ペプチドとも強カチオン交換体で分離できる。Fig. 18 に TSKgel SP-NPR によるペプチドの分離を示す。約6分という短時間で高分離能で分離されている。イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーとを組み合わせることにより、タンパク質のプロテアーゼ消化物など複雑なペプチド混合物を短時間で良好に分離できると考えられる。

4. 核酸の分離

(1) 低分子量核酸の分離

核酸の分離、分析には従来よりゲル電気泳動法が広く用いられている。ゲル電気泳動法は操作が煩雑で分析時間が長いので、近年、簡便な HPLC を用いた分離も行われるようになったが、ゲル電気泳動と同程度の分離能を短時間で得るには至っていない。しかし、非多孔性充填剤を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより、オリゴヌクレオチドから巨大 DNA までの広い範囲の分子量の核酸を短時間で、しかも高分離能で分離できることがわかった²⁴⁻²⁷⁾。Fig. 19 に TSKgel DEAE-NPR によるオリゴアデニル酸の分離を示す。分離時間約8分で重合度20までのオリゴアデニル酸が高分離能で分離されている。また、Fig. 20 にポリアデニル酸の加水分解物の分離を示す。重合度約70までのオリゴアデニル酸が良好に分離されている。多孔性イオン交換体を用いた場合20時間要したが²⁸⁾、非多孔性イオン交換体により20分以内と大幅に短縮され、しかも高分離能が得られている。Fig. 21 に塩基の異なるホモテトラマーの分離を示す

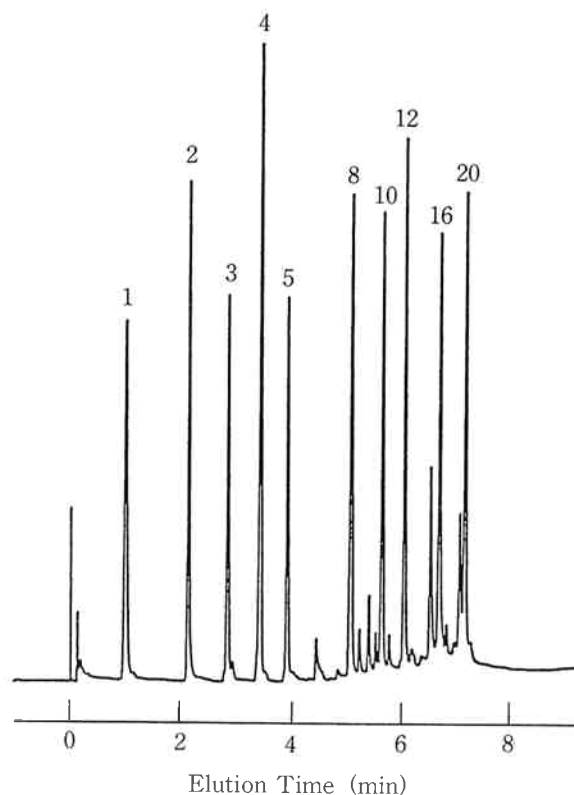


Fig. 19 Separation of a mixture of oligonucleotides by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR

Column : TSKgel DEAE-NPR (35×4.6 mm I.D.)

Sample : a mixture of oligoadenylic acids with chain length of 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 16 and 20 nucleotides (0.1 μg each)

Elution : 20 min linear gradient of NaClO₄ from 0 to 0.4 M in 20 mM Tris-HClO₄ buffer (pH 9.0)

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (260 nm)

が、約8分という短時間で高分離能で分離されている。以上のように、オリゴヌクレオチドを重合度の差、塩基組成の違いのいずれに基づいて分離する場合でも、短時間で高分離能が得られる。Fig. 22, Fig. 23 に合成オリゴヌクレオチド 17 mer, 48 mer の分離を示す。いずれも分離時間は10分以内であった。17 mer では不純物が少なく、収率良く合成されていることがわかる。しかし、48 mer では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る。このように、非多孔性イオン交換体により、合成オリゴヌクレオチドの純度検定が短時間で行うことができる。また、溶出ピークを

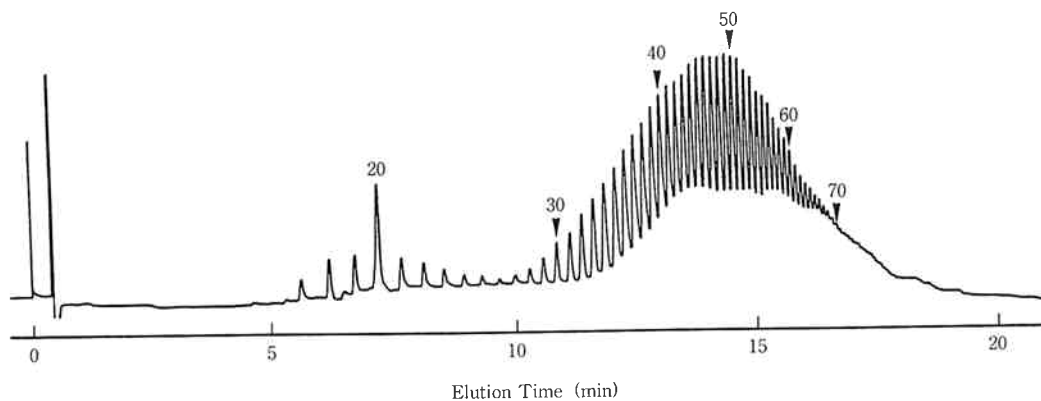


Fig. 20 Separation of oligonucleotides by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR
 Column : TSKgel DEAE-NPR (two 35×4.6 mm I.D. columns)
 Sample : hydrolysate of polyadenylic acid containing heptadecamer—ca. hectomer
 Elution : 60 min linear gradient of NaCl from 0.25 to 1 M in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0)
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 25°C
 Detection: UV (260 nm)

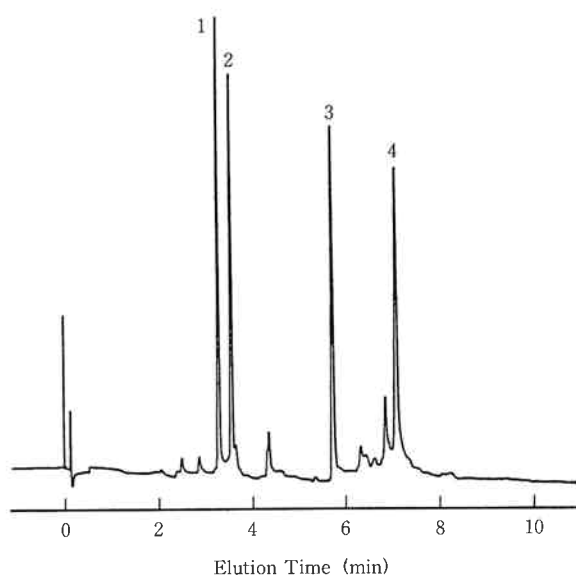


Fig. 21 Separation of oligonucleotides by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR
 Column : TSKgel DEAE-NPR (35×4.6 mm I.D.)
 Sample : 1. tetraadenylic acid (0.1 μg),
 2. tetracytidylic acid (0.2 μg),
 3. tetrathymidylic acid (0.1 μg) 4. tetraguanylic acid (0.4 μg)
 Elution : 20 min linear gradient of NaCl from 0 to 1 M in 20 mM 1,3-diaminopropane-HCl buffer (pH 10.5)
 Flow rate: 1.5 ml/min
 Temperature: 25°C
 Detection: UV (260 nm)

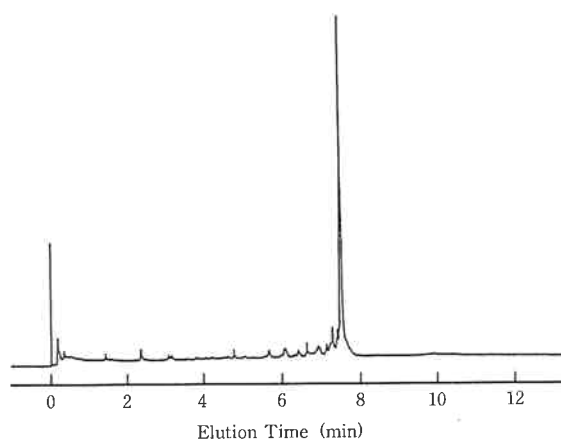


Fig. 22 Separation of synthetic oligonucleotides by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR
 Column : TSKgel DEAE-NPR (35×4.6 mm I.D.)
 Sample : synthetic oligonucleotide, 48 mer (d(AGCTAGTCA CGTACTGATGCAT CGGACTGATCGCATGCTAGTACGTCA), 6 μg)
 Elution : 20 min linear gradient of NaClO₄ from 0 to 0.4 M in 20 mM 1,3-diaminopropane-HCl buffer (pH 10.5)
 Flow rate: 1.5 ml/min
 Temperature: 25°C
 Detection: UV (260 nm)

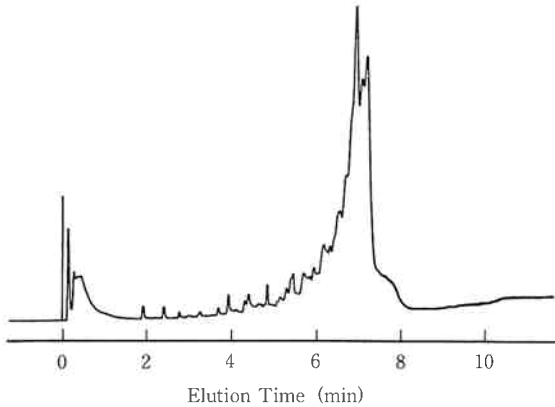


Fig. 23 Separation of synthetic oligonucleotides by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR

Column : TSKgel DEAE-NPR (35×4.6 mm I.D.)

Sample : synthetic oligonucleotide, 17 mer (dGTAAACGACGGCCAGT), 1 μg)

Elution : 20 min linear gradient of NaClO₄ from 0 to 0.4 M in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0)

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (260 nm)

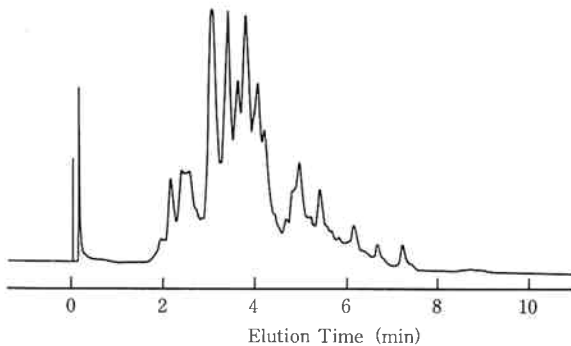


Fig. 24 Separation of tRNA from *E. coli* by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR

Column : TSKgel DEAE-NPR (35×4.6 mm I.D.)

Sample : tRNA (*E. coli* MRE600, 4 μg)

Elution : 40 min linear gradient of NaCl from 0.35 M to 1 M in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (260 nm)

回収することにより、さらに精製することも可能である。

Fig. 24 に比較的小さい RNA として tRNA の分離を示す。分離時間は 8 分程度で高分離能が得られており、TSKgel DEAE-NPR が tRNA の分離精製や同定にも応用できると考えられる。

(2) 巨大 DNA および巨大 RNA の分離

Fig. 25 に pBR322 の HaeIII 消化物の分離を示す。ほぼ塩基対数の小さい順に溶出しており、塩基対数が約 10% 違えば完全に分離されていることがわかる。多孔性イオン交換体を用いた分離では約 7 時間かかっていたが²⁹⁾、TSKgel DEAE-NPR により 13 分で分離可能となった。Fig. 26 に巨大 DNA フラグメントの分離例として、λDNA の HindIII 消化物の分離を示す。分離はわずか 5 分で終了し、各フラグメントはシャープなピークで溶出している。多孔性充填剤では巨大 DNA フラグメントの分離は不可能であったが、このように非多孔性充填剤を用いることにより、1,000 塩基対以上の巨大 DNA フラグメントでも大きさが約 1.5 倍違えば数分で分離できる。これは、細孔がないため試料の拡散が抑えられるという非多孔性充填剤の特徴が顕著に表われた例

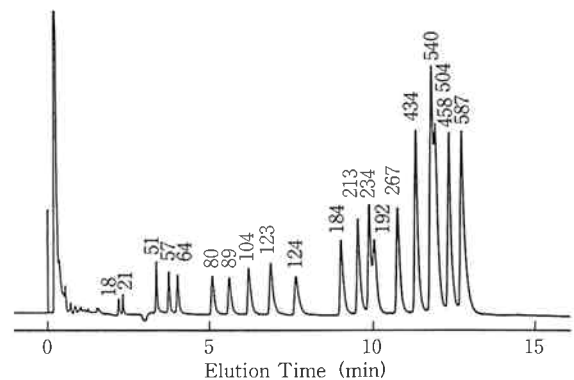


Fig. 25 Separation of pBR322-HaeIII digest by high performance ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR

Column : TSKgel DEAE-NPR (35×4.6 mm I.D.)

Sample : pBR322-HaeIII digest (4.8 μg in 8 μl)

Elution : 0.1 min linear gradient of NaCl from 0.25 M to 0.45 M followed by 2.9 min linear gradient of NaCl from 0.45 to 0.5 M and 57 min linear gradient of NaCl from 0.5 to 1.0 M in 20 mM Tris-HCl (pH 9.0)

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (260 nm)

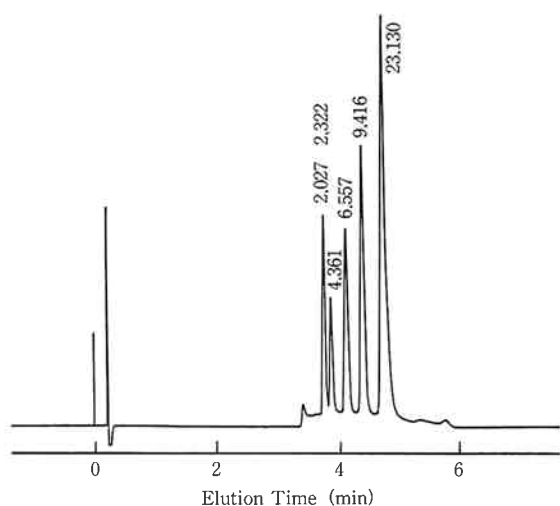


Fig. 26 Separation of λ DNA-HindIII digest by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR

Column : TSKgel DEAE-NPR
(35 \times 4.6 mm I.D.)

Sample : λ DNA-HindIII digest (2 μ g in
4 μ l)

Elution : 10 min linear gradient of
NaCl from 0.5 M to 0.1 M in
20 mM Tris-HCl (pH 9)

Flow rate: 1.0 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV absorbance at 260 nm

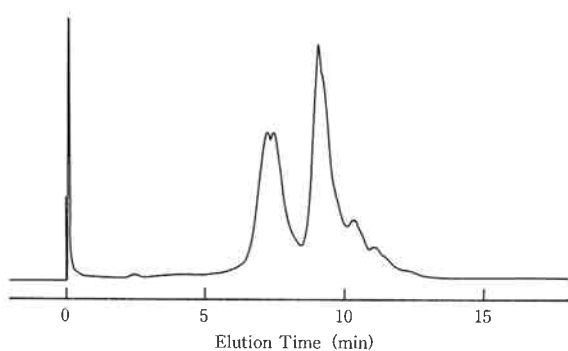


Fig. 27 Separation of rRNA from *E. coli* by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR

Column : TSKgel DEAE-NPR
(35 \times 4.6 mm I.D.)

Sample : 16 S, 23 S rRNA (*E. coli*
R-13, 0.1 unit)

Elution : 60 min linear gradient of
NaCl from 0.5 to 1 M in 20
mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)

Flow rate: 1.5 ml/min

Temperature: 25°C

Detection: UV (260 nm)

と考えられる。

Fig. 27 に巨大 RNA の分離例として、大腸菌の 16 S, 23 S rRNA の分離を示す。分離時間は10分程度で良好に分離されている。以上のように、非多孔性イオン交換体 TSKgel DEAE-NPR は広範囲の分子量をもつ核酸の分離、同定に適している。

5. おわりに

非多孔性充填剤 TSKgel NPR シリーズを用いた HPLC により、タンパク質・ペプチド・核酸を短時間で、しかも高分離能で分離でき、今後ますます応用範囲が広がるものと期待される。しかし一方では、試料に適した分離モードの選択あるいは充填剤の性能を充分に発揮させるような分離条件の選択など充填剤の使用に関する技術の確立が必要となっている。

文 献

- 1) G. Vanecek and F. E. Regnier; *Anal. Biochem.*, **121**, 156 (1982)
- 2) J. C. Giddings and K. L. Mallik; *Anal. Chem.*, **38**, 997 (1966)
- 3) N. D. Danielson and J. J. Kirkland; *Anal. Chem.*, **59**, 2501 (1987)
- 4) C. G. Horváth, B. A. Preiss and S. R. Lipsky; *Anal. Chem.*, **39**, 1422 (1967)
- 5) B. Anspach, K. K. Unger, H. Giesche and M. T. W. Hearn; "4th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides", Baltimore, December 1984, paper 103
- 6) D. J. Burke, J. K. Duncan, C. Siebert and G. S. Ott; *J. Chromatogr.*, **359**, 533 (1986)
- 7) K. Kalghatgi and C. Horváth; *J. Chromatogr.*, **443**, 343 (1988)
- 8) Y.-F. Maa and C. Horváth; *J. Chromatogr.*, **445**, 71 (1988)
- 9) R. Janzen, K. K. Unger, H. Giesche, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn; *J. Chromatogr.*, **397**, 91 (1987)
- 10) B. Anspach, K. K. Unger, J. Davies and M. T. W. Hearn; *J. Chromatogr.*, **457**, 195 (1988)
- 11) J. K. Duncan, A. J. C. Chen and C. J. Siebert; *J. Chromatogr.*, **397**, 3 (1987)
- 12) Y. Kato, T. Kitamura, A. Mitsui and T.