

核酸分離用カラム TSKgel DNA-NPR を用いたイオン交換クロマトグラフィーによるDNAフラグメントの分離

中 谷 茂
津 田 輝 彦
森 山 弘 之

Separation of DNA Fragments by High-Performance Ion-Exchange Chromatography on TSKgel DNA-NPR

Shigeru NAKATANI
Teruhiko TSUDA
Hiroyuki MORIYAMA

TSKgel DNA-NPR, a new ion-exchange column specially designed for the separation of nucleic acids, has been developed. The column packed with non-porous spherical resin-based anion-exchanger of 2.5 μm in diameter proved very useful for the separation of DNA fragments. TSKgel DNA-NPR revealed higher resolution in the separation of a wide range of DNA restriction fragments (50-23,000 base pairs) compared with a conventional non-porous anion-exchange column, TSKgel DEAE-NPR. Polymerase chain reaction (PCR) products could also be separated with high resolution. The PCR products were recovered in high yield from the column even at low level loading of sample. The detection limit of the PCR product was as low as 0.20 ng (S/N=3).

1. はじめに

DNAフラグメントの分離にはこれまでゲル電気泳動法が主に用いられてきた。HPLCによる分離も検討されており、ゲルろ過クロマトグラフィー¹⁾、イオン交換クロマトグラフィー²⁾、逆相クロマトグラフィー³⁾、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー⁴⁾などによるDNAフラグメントの分離例が報告されているが、いずれもゲル電気泳動法に比べ分離能が低く、分離時間も長い実用的ではなかった。

現在、HPLC用充填剤としては粒子全体に細孔をもつ多孔性型充填剤が広く用いられており、イオン交換クロマトグラフィーによるDNAフラグメントの分離にも細孔径が1,000 Å程度の陰イオン交換体が用いら

れてきた²⁾。しかしながら、高分離能が得られるのは短鎖のDNAフラグメントに限られ、鎖長が数百塩基対 (bp) 以上のDNAフラグメントに対しては分離能が低い。一方、我々は、細孔のない非多孔性型粒子を基材とした陰イオン交換体充填カラムTSKgel DEAE-NPRを開発し、オリゴヌクレオチド⁵⁾やDNAフラグメント⁶⁾に対して短時間で良好な分離能が得られることを示している。非多孔性型充填剤では細孔内部への試料の拡散が起こらないため、試料ピークの広がりを抑えることができ、多孔性型充填剤に比べて高分離能での高速分離が可能である。今回、我々は、分離能をさらに向上させたイオン交換クロマトグラフィー用カラムTSKgel DNA-NPRを開発したので、分離に対する諸因子の影響や各種DNAフラグメントの分離を

検討し、DNA分離手段としてのHPLCの有用性を評価した。

2. 実験

[1] カラム

カラムは分析カラムTSKgel DNA-NPR (内径4.6mm、長さ7.5cm) 及びガードカラムTSKguard column DNA-NPR (内径4.6mm、長さ0.5cm) (いずれも東ソー製) を用いた。TSKgel DNA-NPRは、粒子径 $2.5\mu\text{m}$ の非多孔性型親水性樹脂の表面にジエチルアミノエチル基を導入した陰イオン交換体が充填されたカラムであり、そのイオン交換容量はDNAフラグメントの分離に対して最適となるように調節されている。また、カラムサイズは内径4.6mm、長さ7.5cmであり、従来の非多孔性型陰イオン交換体充填カラムTSKgel DEAE-NPR (内径4.6mm、長さ3.5cm) より長く、カラム構造は低デッドボリュームとなるように設計されている。

[2] HPLCシステム

送液ポンプはCCPM-II、グラジエントミキサーはMX-8010、検出器はUV-8020、カラムオープンはCO-8020-C (いずれも東ソー製)、試料注入バルブはレオダイン製Model 7125 ($10\mu\text{l}$ サンプルループ付き) を用いた。また、送液ポンプと試料注入バルブとの間にラインフィルター ($0.45\mu\text{m}$ メンブレンフィルター付き) を装着した。システムコントロール及びデータ処理はシステムコントローラーSC-8020 (東ソー製) にて行った。検出器のセルはマイクロセル (セル容量 $2\mu\text{l}$)、あるいは標準セル (セル容量 $10\mu\text{l}$) からヒートシンク (入口側配管のコイル部) を取り除いたものを用いた。

[3] 分離条件

溶離液は塩化ナトリウムを含む 20mM トリブス塩酸緩衝液 (pH 9.0) を標準として用いた。DNAフラグメントは溶離液中の塩化ナトリウム濃度を経時的に変化させるグラジエント溶出 (高圧グラジエント方式) により分離し、波長 260nm の吸収により検出した。また、標準的流速は $0.75\text{ml}/\text{min}$ 、標準的分離温度は 25°C とした。

[4] 試薬及び試料

溶離液は特級試薬及び超純水を用いて調製し、 $0.22\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターにてろ過した後を使用した。試料は市販DNAフラグメント及びpolymerase chain reaction (PCR) 産物を用いた。

3. 結果及び考察

[1] TSKgel DEAE-NPRとの比較

TSKgel DNA-NPR及びTSKgel DEAE-NPRを用いて 1kb DNA ladderを分離したときのクロマトグラムをFig. 1に示す。図中の数字はゲル電気泳動にて確認した鎖長を示す。TSKgel DNA-NPRでは分離時間約14分で広範囲の鎖長のDNAフラグメントが良好に分離され、従来の非多孔性型イオン交換体充填カラムに比べて分離能が大幅に向上していることがわかった。また、DNAフラグメントはほぼ鎖長の順に溶出しており、この分離がおもに鎖長に基づいていることが示唆された。しかしながら、従来の陰イオン交換体での結果と同様に塩基組成の影響が認められA-T含量の高いDNAフラグメントは鎖長から予想されるよ

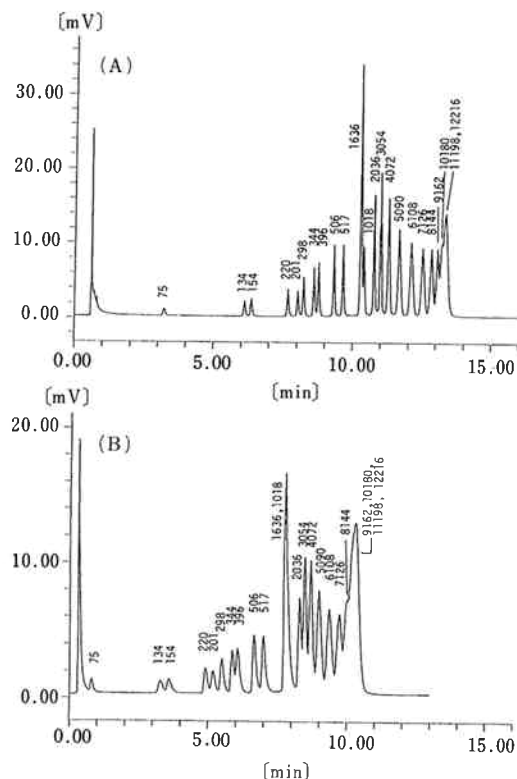


Fig. 1 Chromatograms of 1kb DNA ladder ($2\mu\text{g}$ in $2\mu\text{l}$).

The separations were performed on (A) a TSKgel DNA-NPR column ($4.6\text{mm I.D.} \times 7.5\text{cm L}$) and (B) a TSKgel DEAE-NPR column ($4.6\text{mm I.D.} \times 3.5\text{cm L}$) with a 20min linear gradient from 0.5 to 0.75M NaCl in 20mM Tris-HCl buffer (pH9.0) at a flow rate of $0.75\text{ml}/\text{min}$ and 25°C . DNA fragments were detected at 260nm with a $2\mu\text{l}$ flow cell. Numbers on the peaks are the chain lengths of DNA fragments in base pairs.

Table 1 Effect of void volume in the connecting tube on the resolution of DNA fragments

	Tube dimension			Resolution		
	I.D. (mm)	Length (cm)	Volume (μ l)	134bp/154bp	506bp/517bp	5090bp/6108bp
(A) Injector-Column	0.1	20	1.57	2.03	4.00	2.72
	0.1	40	3.14	2.02	3.88	2.80
	0.25	60	29.45	1.98	3.93	2.53
(B) Column-Detector	0.1	20	1.57	2.01	3.85	2.64
	0.1	40	3.14	1.95	3.53	2.59
	0.25	60	29.45	1.67	2.96	2.20

1kb DNA ladder (2μ g in 2μ l) was separated on a TSKgel DNA-NPR column under the conditions in Fig.1. The resolution was calculated from peak widths and elution volumes of each pair of DNA fragments. In (A) the connecting tube dimension between the column and the detector was 0.1mm I.D. \times 20cmL and in (B) the tube dimension between the injector and the column was 0.1mm I.D. \times 20cmL.

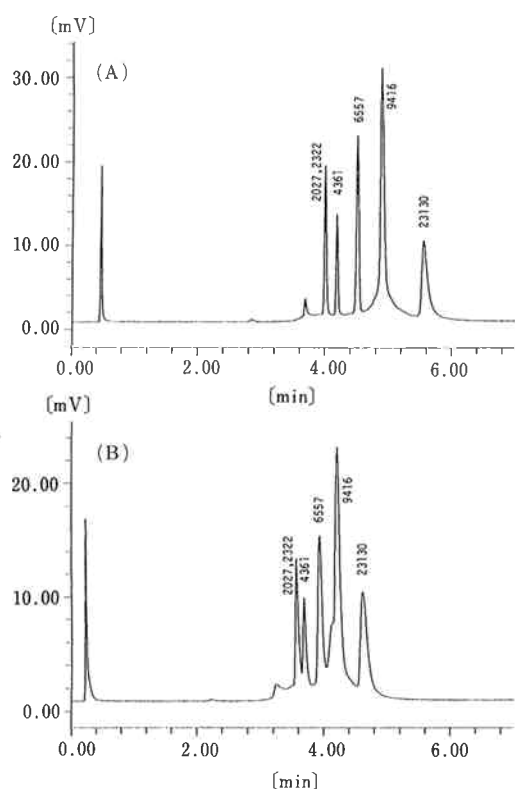


Fig. 2 Chromatograms of λ DNA/*Hind*III digest (1μ g in 4μ l).

The separations were performed on (A) a TSKgel DNA-NPR column (4.6mm I.D. \times 7.5cmL) and (B) a TSKgel DEAE-NPR column (4.6mm I.D. \times 3.5cmL) with a 10min linear gradient from 0.5 to 1.0M NaCl in 20mM Tris-HCl buffer (pH9.0) at a flow rate of 1.0ml/min and 25°C. DNA fragments were detected as in Fig.1. Numbers on the peaks are the chain lengths of DNA fragments in base pairs.

りも遅れて溶出した²⁾。

これらのカラムを用いて λ ファージDNAの*Hind*III消化物を分離したときのクロマトグラムをFig. 2に示す。このように約2,000~23,000bpと長鎖のDNAフラグメントに対しても、TSKgel DNA-NPRでは約6分という短時間で従来のカラムよりも高い分離能が得られた。

[2] 分離能に対するHPLCシステムの影響

カラムが高性能化するに従い、配管容量や検出器セル容量などカラム外での試料ピークの広がりを支配する因子や検出器レスポンス(応答速度)などが分離に与える影響が大きくなる。そこで、HPLCシステムの最適化をはかるためDNAフラグメントの分離能に対するHPLCシステムの影響を調べた。

(1) 配管容量の影響

分離能に対する配管容量の影響をTable 1に示す。インジェクター/カラム間の配管容量は分離能に対してほとんど影響しなかったが、カラム/検出器間では配管容量の増加にともない分離能が低下し、カラム出口側のデッドボリュームが分離能に大きく影響していることがわかった。

(2) 検出器セル容量の影響

マイクロセル、標準セル(ヒートシンク装着、標準仕様)および標準セルよりヒートシンクを除去したものを、分離能に対する検出器セルの影響を調べた結果をTable 2に示す。ヒートシンクを除去した標準セルではマイクロセルに対する分離能の低下率は10%以下であった。一方、ヒートシンク付の標準セルではマイクロセルに比べて分離能は約30%低下し、高分離能を得るためにはデッドボリュームの小さいセルを用いる必要があることがわかった。しかしながら、マイ

Table 2 Effect of cell volume on the resolution of DNA fragments

Cell	Cell Volume (μ l)	Tube dimension between the column and the cell			Resolution		
		I.D. (mm)	Length(cm)	Volume(μ l)	134bp/154bp	506bp/517bp	5090bp/6108bp
Micro flow cell	2	0.1	20	1.57	1.93	3.51	2.30
Standard flow cell (without a heat sink)	10	0.1	20	1.57	1.90	3.24	2.15
Standard flow cell (without a heat sink)	10	0.1	40	3.14	1.84	3.21	2.21
Standard flow cell (with a heat sink)	10	0.25	100	49.09	1.38	2.47	1.84

1kb DNA ladder (2μ g in 2μ l) was separated on a TSKgel DNA-NPR column under the conditions in Fig.1. The resolution was calculated as in Table1.

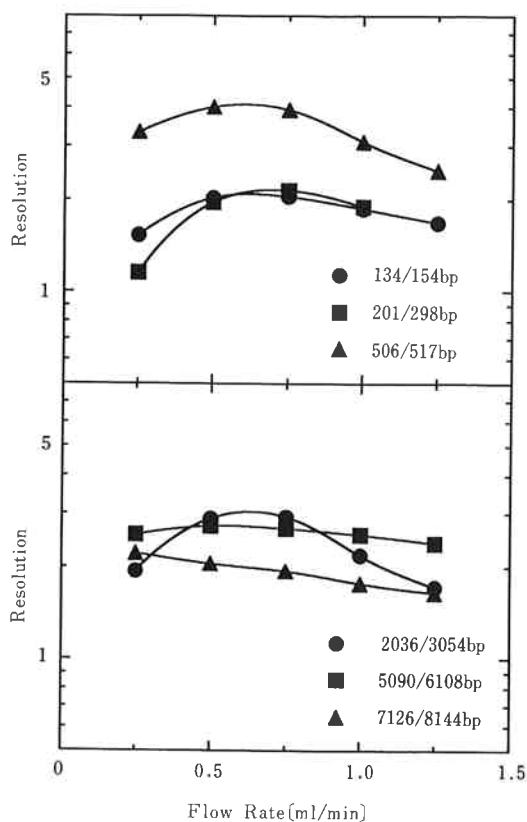


Fig. 3 Dependence of the resolution on flow rate under the constant gradient time in the separation of DNA fragments.

1kb DNA ladder (2μ g in 2μ l) was separated on a TSKgel DNA-NPR column under the conditions in Fig.1 except that the flow rate was varied between 0.25 and 1.25ml/min. The resolution was calculated as in Table1.

クロスセルでは光路長が短いために標準セルの約 $1/3$ ~ $1/2$ のピーク高さとなった。従って、微量試料を高感度で分析するためにはセル入口側配管の容量をできるだけ小さくした標準セルを用いる必要があると考えられる。

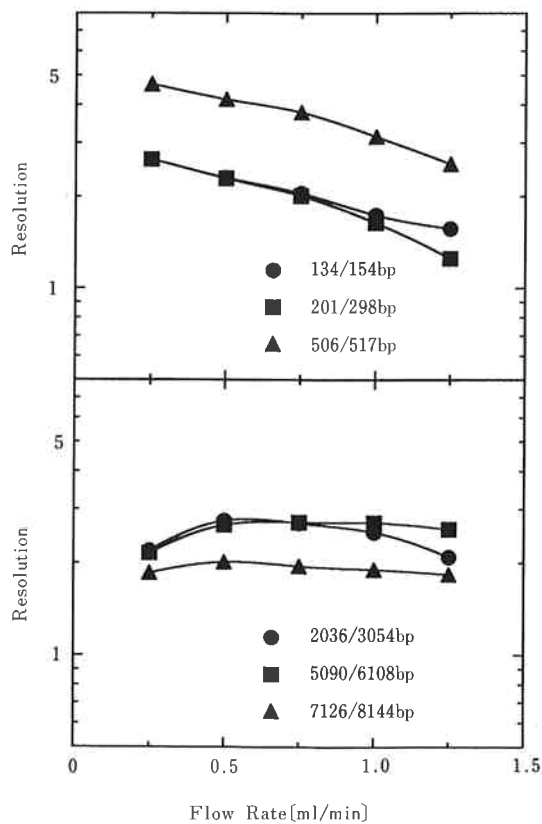


Fig. 4 Dependence of the resolution on flow rate under the constant gradient volume in the separation of DNA fragments.

1kb DNA ladder (2μ g in 2μ l) was separated on a TSKgel DNA-NPR column under the conditions in Fig.1 except that the flow rate was varied between 0.25 and 1.25ml/min and the gradient time was varied between 12 and 60min to keep the gradient volume at 15ml. The resolution was calculated as in Table1.

(3) 検出器レスポンスの影響

分離能に対する検出器レスポンス (応答速度) の影響をTable 3に示す。レスポンスを遅くするとベースラインのノイズは小さくなったが、ピーク幅が広くなり、分離能が極端に低下した。

Table 3 Effect of response of the detector on the resolution of DNA fragments

Response (sec)	Resolution		
	134bp/154bp	506bp/517bp	5090bp/6108bp
0.05	2.08	4.16	2.80
1	1.71	3.08	2.40
3	1.20	2.03	1.82

1kb DNA ladder ($2\mu\text{g}$ in $2\mu\text{l}$) was separated on a TSKgel DNA-NPR column under the conditions in Fig.1. The resolution was calculated as in Table1.

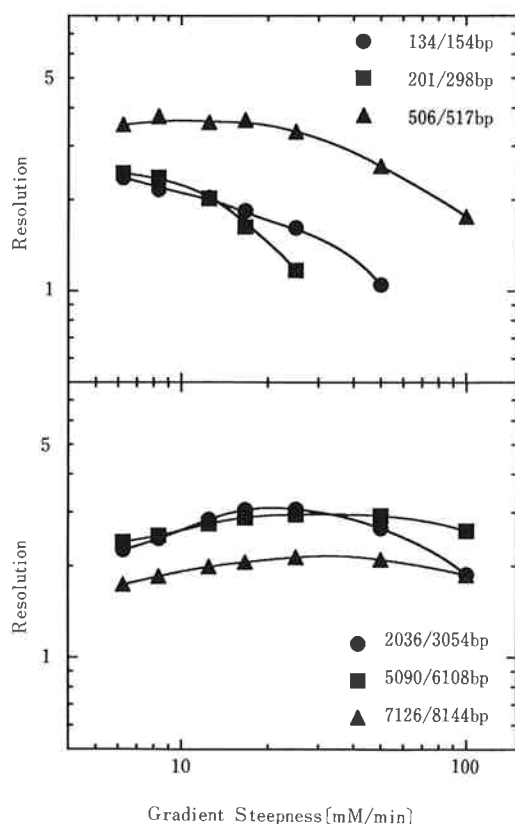


Fig. 5 Dependence of the resolution on gradient steepness in the separation of DNA fragments.

1kb DNA ladder ($2\mu\text{g}$ in $2\mu\text{l}$) was separated on a TSKgel DNA-NPR column under the conditions in Fig.1 except that the gradient time was varied between 2.5 and 40min. The resolution was calculated as in Table1.

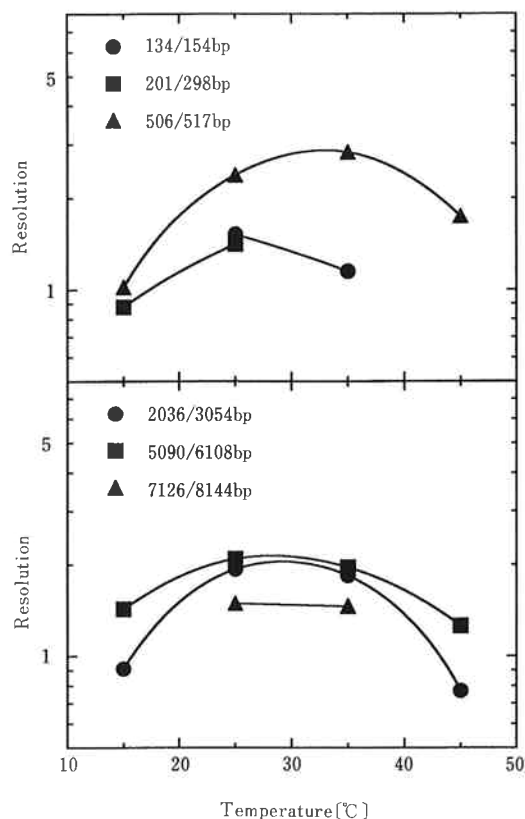


Fig. 6 Dependence of the resolution on temperature in the separation of DNA fragments.

1kb DNA ladder ($2\mu\text{g}$ in $2\mu\text{l}$) was separated on a TSKgel DNA-NPR column under the conditions in Fig.1 except that the temperature was varied between 15 and 45°C . The resolution was calculated as in Table1.

[3] 分離能に対する分離条件の影響

(1) 流速の影響

グラジエント時間一定下での分離能の流速依存性を Fig. 3 に示す。5,000bp以下のDNAフラグメントに対しては流速0.5~0.75ml/minで分離能は最大となった。一方、5,000bp以上の比較的長鎖のDNAフラグメント

の分離能に対しては短鎖のDNAフラグメントに比べて流速の影響は小さかったが、流速0.25~0.5ml/minで分離能は最大となり、鎖長によって高分離能を得るための最適流速が異なることがわかった。

グラジエント容量が一定の場合、すなわち単位液量当りの塩濃度勾配が一定の場合での分離能の流速依存

性をFig. 4に示す。2,000bp以下でのDNAフラグメントは流速の上昇とともに分離能は低下した。一方、2,000bp以上の比較的長鎖のDNAフラグメントの分離能に対しては、グラジエント時間一定下と同様に、流速の影響は小さかったが、流速0.5~0.75ml/minで分離能は最大となった。

(2) 塩濃度勾配の影響

分離能に対する塩濃度勾配の影響をFig. 5に示す。一般に、塩濃度勾配が小さい、すなわちグラジエント時間が長いほど高分離能が得られるが、TSKgel DNA-NPRによるDNAフラグメントの分離においては高分離能を得るための最適塩濃度勾配は鎖長によって異なり、1,000bp以下の短鎖DNAフラグメントに対しては5~10mM/min、1,000~5,000bpのDNAフラグメントに対しては10~30mM/min、5,000bp以上の

長鎖DNAフラグメントに対しては30~50mM/minで分離能は最大となった。しかしながら、分離能に対する流速の影響と同様に、長鎖のDNAフラグメントでは塩濃度勾配の影響は小さかった。

(3) 分離温度の影響

分離温度が15~65℃の範囲では温度の上昇とともに溶出が遅くなった。また、45℃以上では分離能、回収率ともに極端に低下した。分離能に対する温度の影響をFig. 6に示す。300bp以下及び2,000bp以上のDNAフラグメントに対しては25℃付近で分離能は最大となった。一方、300~2,000bpのDNAフラグメントに対してはわずかながら35℃付近のほうが分離能は高くなった。

(4) 溶離液pHの影響

pHの異なるトリス-塩酸緩衝液を用いて1kb DNA ladderを分離したときのクロマトグラムをFig. 7に示す。pH7~9の範囲ではpHの上昇とともに溶出が早くなった。pH8とpH9では分離能はほ

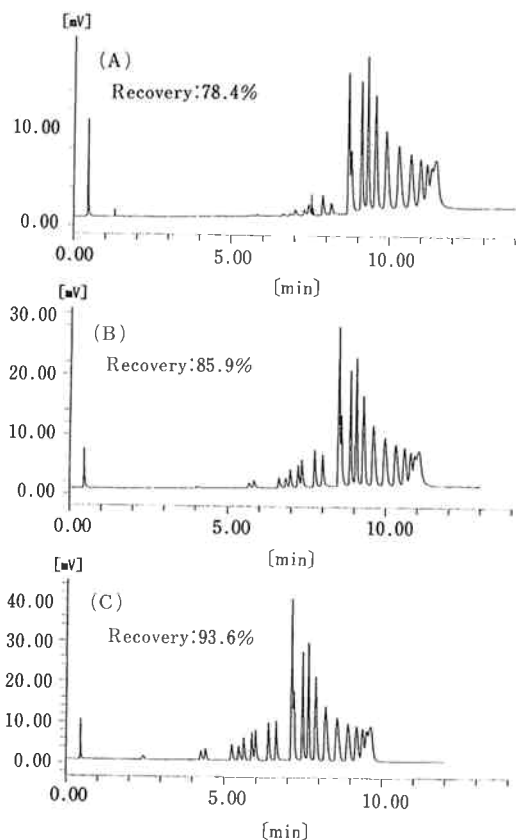


Fig. 7 Chromatograms of 1kb DNA ladder (2 μ g in 2 μ l).

The separations were performed on a TSKgel DNA-NPR column with a 15min linear gradient from 0.5 to 0.75M NaCl in 20mM Tris-HCl buffer, (A) pH7.0, (B) pH8.0 and (C) pH9.0 at a flow rate of 1.0ml/min and 25°C. DNA fragments were detected as in Fig.1. Numbers are the recoveries of DNA fragments estimated from the areas of the peaks eluted.

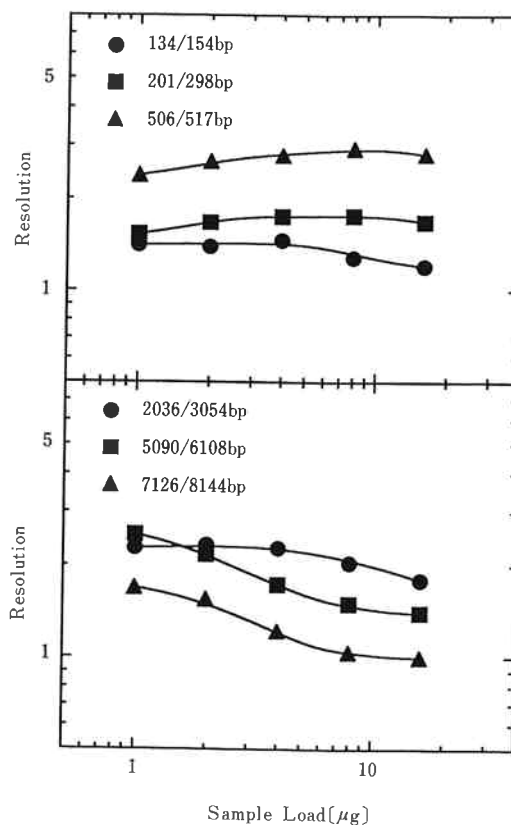


Fig. 8 Dependence of the resolution on sample load in the separation of DNA fragments.

1kb DNA ladder was separated on a TSKgel DNA-NPR column under the conditions in Fig.1 except that the sample load was varied between 1 and 16 μ g. The resolution was calculated as in Table1.

ば同等であったが、pH 8 以下では回収率が低下した。

(5) 試料負荷量の影響

分離能に対する試料負荷量の影響をFig. 8 に示す。ここで用いた試料は種々の鎖長のDNAフラグメントの混合物であるため、横軸の試料負荷量は試料中のDNAフラグメントの総量を表す。この試料の場合、鎖長によって異なるが、試料負荷量を約10 μg まで増加させても分離能の変化は小さかった。このことから、分離能を変化させない最大の試料負荷量は、試料の純度(成分数)によって異なるが、数 μg ~数十 μg であり、多孔性充填剤に比べて約1/100~1/数十とかなり少ないことがわかる。これは、非多孔性充填剤には細孔がないため、試料との相互作用に必要な表面積が小さいことが原因と考えられる。

(6) 回収率

1 kb DNA ladder及び λ ファージDNAのHindIII消化物を試料として回収率を調べた。pH 9 のトリス塩酸緩衝液を用いて1~16 μg の試料を分離したときの総ピーク面積と、カラムの代わりに内容量1 mlのステンレス管を装着したときに得られるピーク面積から回収率を算出した。その結果、1 kb DNA ladder

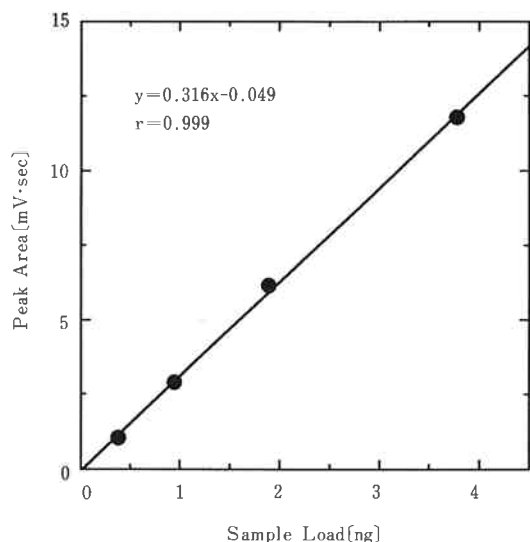


Fig. 9 Relationship between the sample load and the peak area in the separation of the DNA fragment.

PCR product of HBV DNA (from 0.38 to 3.78ng) was separated on a TSKgel DNA-NPR column with a 10min linear gradient from 0.5 to 0.75M NaCl in 20mM Tris-HCl buffer (pH9.0) at a flow rate of 0.5ml/min and 25°C. DNA fragment was detected at 260nm with a 10 μl flow cell (without a heat sink).

の回収率は93%以上、 λ ファージDNAのHindIII消化物の回収率は89%以上と良好な結果が得られた。

Fig. 9に微量試料の負荷量とピーク面積の関係を示す。試料にはB型肝炎ウイルスDNAのPCR産物を用いた。試料負荷量とピーク面積の間には良好な直線関係が認められ、数ngという微量の試料でもほぼ定量的に回収されていることが示唆された。また、検出限界は0.20ng (S/N = 3) と良好であった。このように、微量の試料でも回収率が高いのは、非多孔性充填剤には細孔がなく、表面積が小さいため、試料と充填剤との非特異的吸着が非常に少ないためと考えられる。

[4] 各種DNAフラグメントの分離

プラスミドpBR322のHaeIII消化物のクロマトグラムをFig. 10に示す。この試料には、600bp以下の短鎖のDNAフラグメントが含まれているが、このように短鎖のDNAフラグメントは塩基対数が5~10%異なれば完全に分離することができた。また、分離温度を35°Cとすることにより、234bpのフラグメントと192bpのフラグメント、540bpのフラグメントと504bpのフラグメントの分離が向上した。

Fig. 11にC型肝炎ウイルスDNAの一部をPCRで増幅した産物のクロマトグラムを示す。Fig. 11(A)ではグラジエントの初期塩濃度を下げることにより、PCR

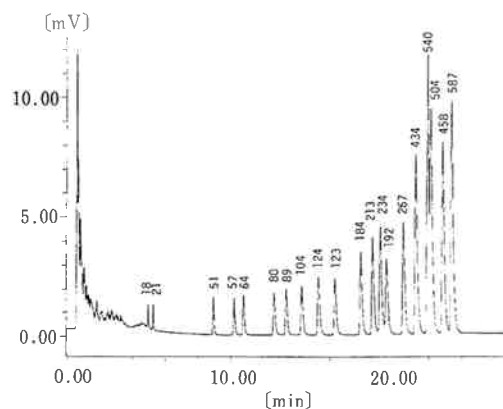


Fig. 10 Chromatogram of pBR322/HaeIII digest (2 μg in 3 μl).

The separation was performed on a TSKgel DNA-NPR column with a 0.13min linear gradient from 0.25 to 0.45M NaCl followed by a 3.87min linear gradient from 0.45 to 0.5M and a 38min linear gradient from 0.5 to 0.75M in 20mM Tris-HCl buffer (pH9.0) at a flow rate of 0.75ml/min and 35°C. DNA fragments were detected as in Fig.1. Numbers on the peaks are the estimated chain lengths of DNA fragments in base pairs.

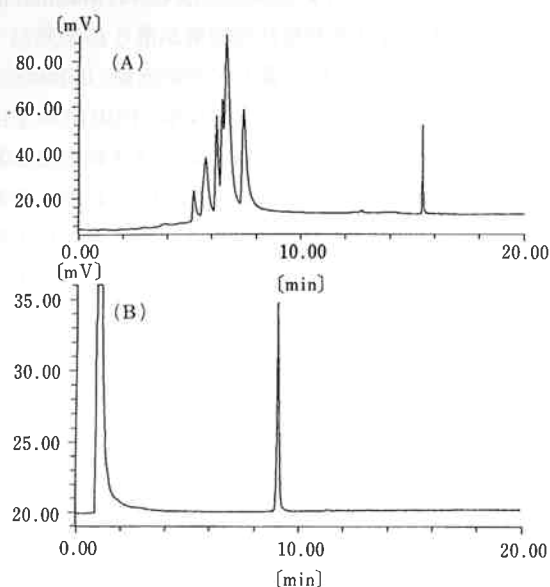


Fig. 11 Chromatograms of PCR product of HCV DNA (290bp).

The separation was performed on a TSKgel DNA-NPR column with (A) a 20min linear gradient from 0 to 1.0M NaCl and (B) a 10min linear gradient from 0.5 to 1.0M NaCl in 20mM Tris-HCl buffer (pH9.0) at a flow rate of 0.5ml/min and 25°C. DNA fragments were detected at 260nm with a 10 μ l flow cell (without a heat sink).

の基質でもあるデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP) やプライマーなどと思われるピークが5~8分に認められ、PCR産物である290bpのDNAフラグメントは15.5分付近に溶出した。また、短時間分離を行うため分離条件を最適化したところ、Fig. 11(B)に示すように約10分で分離可能であった。

Fig. 12にインターロイキン-1 β のDNAのPCR産物のクロマトグラムを示す。この試料中には2種類のPCR産物が含まれていることがゲル電気泳動により確認されているが、分離時間10分でこれらを良好に分離することができた。

4. 結 論

HPLCはゲル電気泳動法と比較して、分離後の成分の分取が簡単、回収率が高い、定量性が高い、再現性がよい、実験操作が簡単で容易に自動化できるなど多くの利点を有しているにもかかわらず、最近までは分離能がそれほど高くなく、ゲル電気泳動法には対抗できなかった。しかしながら、以上のように、非多孔性型イオン交換体充填カラムTSKgel DNA-NPRによ

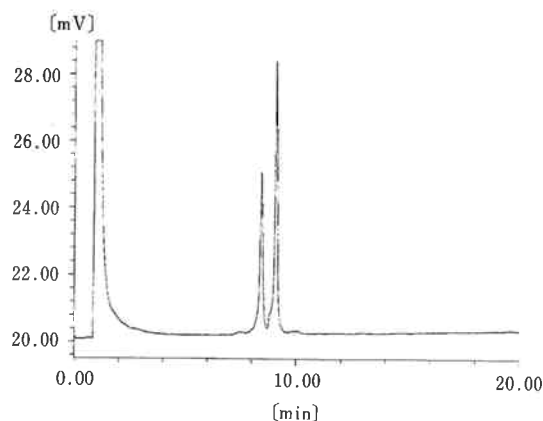


Fig. 12 Chromatogram of PCR product of Interleukin-1 β DNA (306bp).

The separation was performed on a TSKgel DNA-NPR column (4.6mm I.D. \times 7.5cmL) with a 10min linear gradient from 0.5 to 0.75M NaCl in 20mM Tris-HCl buffer (pH9.0) at a flow rate of 0.5ml/min and 25°C. DNA fragments were detected as in Fig. 11.

り、広範囲の鎖長のDNAフラグメントを数分~十数分という短時間で高分離能で分離できたことから、今後はイオン交換クロマトグラフィーがDNA分析の有効な手段となるものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) Y. Kato, Y. Yamasaki, T. Hashimoto, T. Murotsu, S. Fukushige and K. Matsubara, *J. Chromatogr.*, 320, 440-444 (1985)
- 2) Y. Kato, M. Sasaki, T. Hashimoto, T. Murotsu, S. Fukushige and K. Matsubara, *J. Chromatogr.*, 265, 342-346 (1983)
- 3) S. Eriksson, G. Glad, P.-A. Pernemalm and E. Westman, *J. Chromatogr.*, 359, 265-272 (1986)
- 4) Y. Yamasaki, A. Yokoyama, A. Ohnaka, Y. Kato, T. Murotsu and K. Matsubara, *J. Chromatogr.*, 467, 299-303 (1989)
- 5) Y. Kato, T. Kitamura, A. Mitsui, Y. Yamasaki, T. Hashimoto, T. Murotsu, S. Fukushige and K. Matsubara, *J. Chromatogr.*, 447, 212-220 (1988)
- 6) Y. Kato, Y. Yamasaki, A. Onaka, T. Kitamura, T. Hashimoto, T. Murotsu, S. Fukushige and K. Matsubara, *J. Chromatogr.*, 478 (1989), 264-268



著 者

氏名 中 谷 茂

Shigeru NAKATANI

入社 昭和63年4月1日

所属 科学計測事業部

ゲル製造部

セパレーションセンター

副主任研究員



著 者

氏名 津 田 輝 彦

Teruhiko TSUDA

入社 平成2年3月16日

所属 科学計測事業部

ゲル製造部

セパレーションセンター

研究員



著 者

氏名 森 山 弘 之

Hiroyuki MORIYAMA

入社 昭和55年4月1日

所属 科学計測事業部

ゲル製造部

セパレーションセンター

センター長