

SEPARATION REPORT

高性能・高吸着容量イオン交換クロマトグラフィー用カラム TSKgel[®] SuperQ-5PW とその応用

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel SuperQ-5PW の基本的性質	1
2 - 1. 総イオン交換容量	1
2 - 2. たんぱく質吸着容量	1
2 - 3. 化学的安定性	1
2 - 4. 回収率	1
2 - 5. 分離能	2
3. 分離能への溶離条件の影響	3
3 - 1. 試料負荷量の影響	3
3 - 2. 測定流速の影響	5
3 - 3. グラジエント時間の影響	5
3 - 4. 試料溶液中の塩濃度の影響	5
4. 応用例	7
4 - 1. モノクローナル抗体の分離	7
4 - 2. 卵白の分離	7
4 - 3. ウレアーゼの分離	7
4 - 4. リポキシダーゼの分離	7
5. TSKgel SuperQ-5PW から TOYOPEARL [®] SuperQ-650 へのスケールアップ	8
6. おわりに	9

1. はじめに

たんぱく質の分離、精製的手段としてイオン交換クロマトグラフィーは、その操作性、適用範囲の広さから幅広く利用されています。今回、新しく開発した TSKgel SuperQ-5PW は TSKgel G5000PW に四級アンモニウム基を導入した強アニオン交換体であり、従来のイオン交換体に比べ高い吸着容量及び回収率と優れた分離能を有しています。ここでは、TSKgel SuperQ-5PW の基本的性質及びたんぱく質分離への応用例を紹介します。

2. TSKgel SuperQ-5PW の基本的性質

2-1. 総イオン交換容量

TSKgel SuperQ-5PW は、水系 GPC 用充填剤 TSKgel G5000PW に 4 級アンモニウム基を導入した強アニオン交換体で、総イオン交換容量は 0.15 ± 0.02 eq/L-gel です。

2-2. たんぱく質吸着容量

表-1 は、分子量の異なるたんぱく質の吸着容量をカラムに通液した状態（動的吸着容量）で調べた結果です。TSKgel SuperQ-5PW の牛血清アルブミン（BSA）での吸着容量は、現行の TSKgel DEAE-5PW が 40 ± 5 eq/L-gel であるのに対し約 2 倍強の 100 ± 20 eq/L-gel です。また、高分子量のたんぱく質に対しても高い吸着容量を有しています。吸着されたたんぱく質の脱着は 0.5 mol/L NaCl を含む 50 mmol/L トリス塩酸緩衝液（pH 8.6）で行いましたが、いずれのたんぱく質も回収率は 100 % でした。

表-1 TSKgel SuperQ-5PW におけるたんぱく質の動的吸着容量

タンパク質	吸着容量 (g/L) *
IgG	15
BSA	100
Trypsin inhibitor	136

* 動的吸着容量は、前端分析法より求めた。

カラムサイズ；7.5 mm I.D.×7.5 cm、流速；1.0 mL/min、試料；20 g/L

2-3. 化学的安定性

表-2 に、TSKgel SuperQ-5PW を 0.5 mol/L NaOH 及び 0.5 mol/L HCl 中に 25 °C で 10 日間浸せきしたときのイオン交換容量及び牛血清アルブミンの吸着容量を示します。10 日経過後、0.5 mol/L NaOH 及び 0.5 mol/L HCl 中ともにイオン交換容量及び牛血清アルブミンの吸着容量に変化は見られませんでした。次に、カラムで 0.5 mol/L NaOH 水溶液を通液、洗浄を繰り返し行いました。0 回及び 15 回目のクロマトグラムを図-1 に示します。

結果からわかるように TSKgel SuperQ-5PW カラムを 0.5 mol/L NaOH 水溶液で通液、洗浄してもカラムの性能（溶出容量及び分離能）には低下は見られませんでした。またたんぱく質の吸着容量にも変化は見られませんでした。したがって、TSKgel SuperQ-5PW は酸、アルカリに対して安定であり、たんぱく質の粗精製試料や細胞培養液などを分離した後のカラムの汚染に対して酸、アルカリによる洗浄、再生または CIP（Clean in place）を行うことができます。

2-4. 回収率

カラムを 50 mmol/L トリス塩酸緩衝液（pH 8.6）で 30 分平衡化した後、各種たんぱく質を注入し吸着させ、1 分後、0.5 mol/L NaCl を含む 50 mmol/L トリス塩酸緩衝液（pH 8.6）で脱着した溶出液を分光光度計（吸光度 280 nm）で測定し、回収率を求めました。結果を表-3 に示します。現行の TSKgel DEAE-5PW と同様にいずれのたんぱく質も回収率は定量的でした。

表-2 アルカリおよび酸浸せき（25 °C、10 日間）における TSKgel SuperQ-5PW の化学的安定性

イオン交換体	溶液	イオン交換容量	
		浸せき前	浸せき後
TSKgel SuperQ-5PW	0.5 mol/L HCl	0.15	0.15
TSKgel SuperQ-5PW	0.5 mol/L NaOH	0.15	0.14

イオン交換体	溶液	BSA吸着容量	
		浸せき前	浸せき後
TSKgel SuperQ-5PW	0.5 mol/L HCl	111	111
TSKgel SuperQ-5PW	0.5 mol/L NaOH	111	112

2-5. 分離能

表-4に、各種イオン交換体におけるたんぱく質（オブアルブミン／トリプシンインヒビター）の分離能の比較を示します。表から明らかなように、TSKgel SuperQ-5PWは、非常に高い分離能を示しています。そのため、より短いグラジエント時間でも高分離能が得られます。

図-2に標準たんぱく質4種類、カーボニックアンヒドラーゼ（牛赤血球）、トランスフェリン（ウシ）、オブアルブミン（ニワトリ卵）、トリプシンインヒビター（大豆）を分離したクロマトグラムを示します。

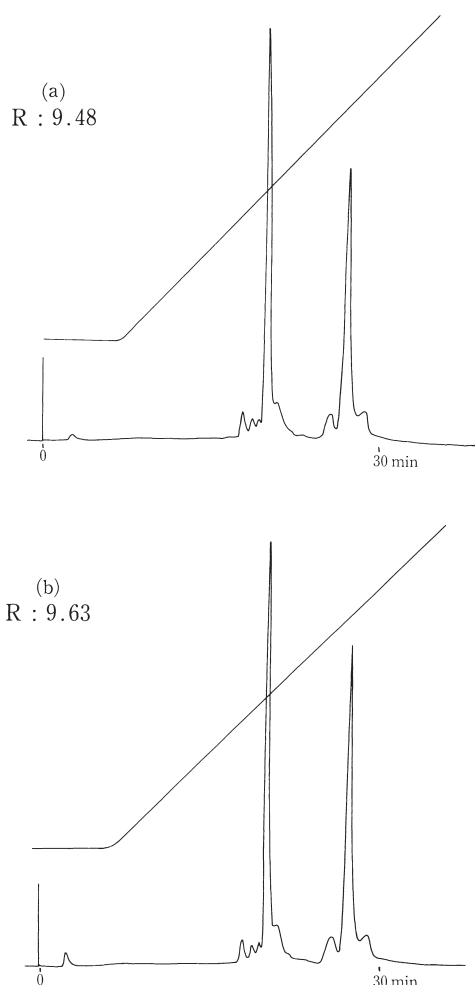


図-1 TSKgel SuperQ-5PWにおける化学的安定性
(0.5 mol/L NaOHによるCIP洗浄)

カラム：TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. × 7.5 cm
 溶離液：A：50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6)
 B：A + 0.5 mol/L NaCl
 A→Bリニアグラジエント (60分)

流速：1.0 mL/min

温度：25℃

検出：UV (280 nm)

試料：オブアルブミン (1 mg)、トリプシンインヒビター (1 mg)、100 μL

カラム洗浄：0.5 mol/L NaOHを1.0 mL/minでカラム容積の10倍量通液し、そのままカラムを封入、放置(1日)。翌日、カラムを蒸留水でカラム溶出液が中性になるまで洗浄。その後緩衝液でカラムを平衡化し、たんぱく質の分離能測定。

(a) 0日目 (カラム洗浄前)

(b) 15日目 (カラム洗浄15回後)

表-3 TSKgel SuperQ-5PWにおけるたんぱく質の回収率

Protein	Recovery (%)
Thyroglobulin	101
IgG	106
Bovine serum albumin	101
Hemoglobin	99
Ovalbumin	106
β-Lactoglobulin	105
Trypsin inhibitor	100
Myoglobin	101

Each protein of 0.4 mg was applied to Super Q-5PW column (7.5 mm I.D. × 7.5 cm) in 0.05 mol/L tris-HCl buffer (pH 8.6) and the absorbed protein was desorbed in 0.05 mol/L tris-HCl buffer (pH 8.6) containing 0.5 mol/L NaCl

表-4 各種イオン交換体における分離能の比較

Column	Column size	Resolution(OVA/STI)
TSKgel SuperQ-5PW	7.5 mm I.D. × 7.5 cm	11.05 (8.44)*
	5 mm I.D. × 5 cm	8.10
TSKgel DEAE-5PW Glass	5 mm I.D. × 5 cm	5.58
A社 パーフュージョンQタイプ	6.4 mm I.D. × 3 cm	4.61
A社 Qタイプ	5 mm I.D. × 5 cm	5.85

溶離条件は図-1に順ずる。

*: 30分リニアグラジエント

3. 分離能への溶離条件の影響

3-1. 試料負荷量の影響

試料にオブアルブミン（ニワトリ卵）とトリプシンインヒビター（タイズ）及び β -ラクトグロブリン（Bovine Milk）を用い、注入量を変えて試料負荷量を調べました。結果を図-3、図-4に示します。この実験における最大試料負荷量の150 mg及び100 mgでも、たんぱく質は十分吸着分離されています。試料によって異なりますが、ピークの形状や溶出位置が大きく変化しない試料負荷量はオブアルブミンとトリプシンインヒビターの混合物で約100 mg、 β -ラクトグロブリンで約40 mgでした。

次に、各種イオン交換体における大量試料負荷時における分離の比較を図-5に示します。カラム容量1 mLに対し、40 mgのたんぱく質試料を負荷した場合、TSKgel SuperQ-5PWのみが、正常なクロマトグラムを示しています（図-2参照）。その他のイオン交換体では、試料のオーバーロードによる偽ピークの出現が顕著となっています。

以上のように、TSKgel SuperQ-5PWでは、100 mg以上のたんぱく質負荷（カラムサイズ：7.5 mm I.D. × 7.5 cm）でも十分な保持と分離能が得られます。そのため分析カラムサイズで、セミ分取が行えます。

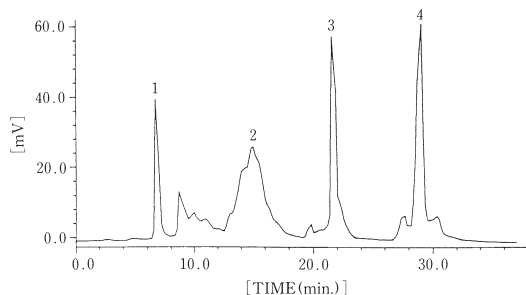


図-2 たんぱく質混合物の分離

条件は、図-1に同じ

ただし 試料：1. カーボニックアンヒドラーゼ（2 mg）
2. トランスフェリン（4 mg）
3. オブアルブミン（5 mg）
4. トリプシンインヒビター（5 mg）
注入量 100 μ L

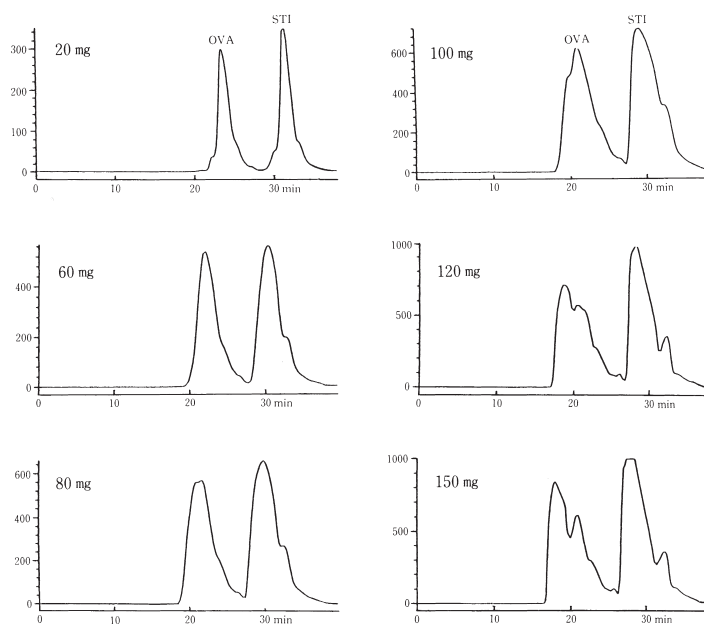


図-3 TSKgel SuperQ-5PWを用いたたんぱく質分離における試料負荷量の影響(1)

カラム：TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. × 7.5 cm
溶離液：A：50 mmol/L トリス塩酸緩衝液（pH 8.3）
B：A + 0.5 mol/L NaCl
A→B リニアグラジエント（60分）

流速：1.0 mL/min

温度：25℃

検出：UV（280 nm）

試料：オブアルブミン、トリプシンインヒビター（各10 g/L）、2～7.5 mL

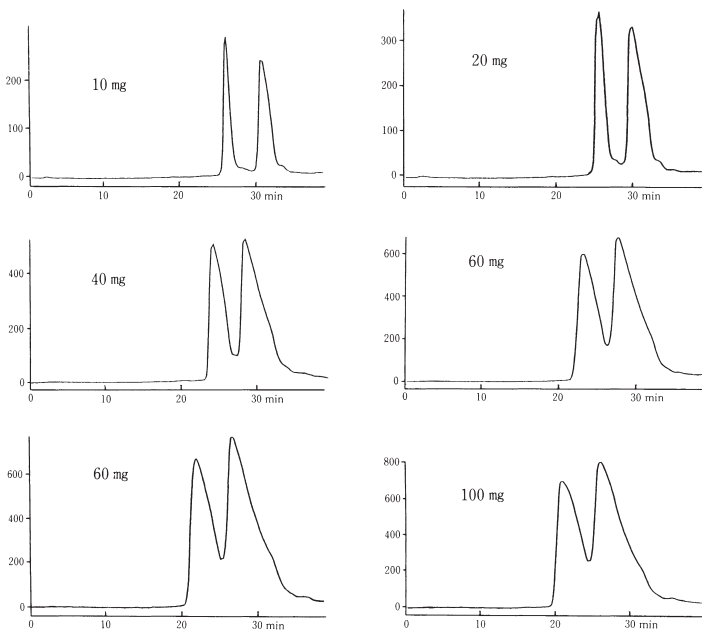


図-4 TSKgel SuperQ-5PW を用いたたんぱく質分離における試料負荷量の影響 (2)

カラム：TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. × 7.5 cm
 溶離液：A：20 mmol/L ピペラジン緩衝液 (pH 6.0)
 B：A + 0.3 mol/L NaCl
 A → B リニアグラジエント (60分)
 流速：1.0 mL/min
 温度：25 °C
 検出：UV (280 nm)
 試料：β-ラクトグロブリン (20 g/L)、0.5 ~ 5 mL

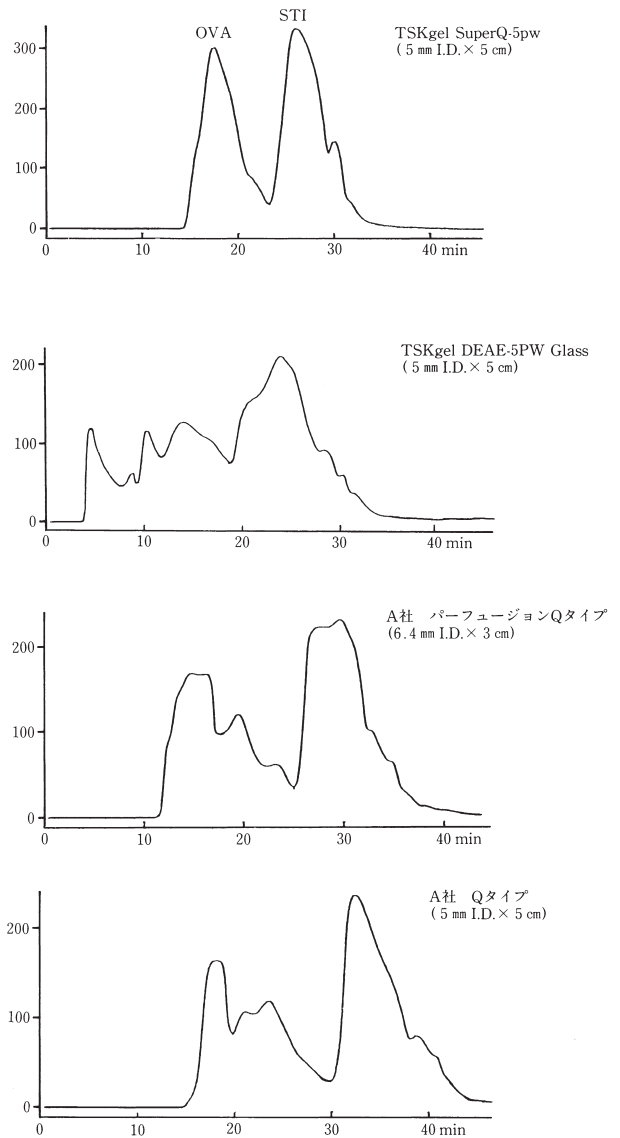


図-5 大量試料負荷における各種イオン交換体での分離比較

カラム：TSKgel SuperQ-5PW (5 mm I.D. × 5 cm)
 TSKgel DEAE-5PW Glass (5 mm I.D. × 5 cm)
 A社 パーフュージョンQタイプ (6.4 mm I.D. × 3 cm)
 A社 Qタイプ (5 mm I.D. × 5 cm)
 カラム容積は全て 1.0 mL
 溶離液：A：50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3)
 B：A + 0.5 mol/L NaCl
 A → B リニアグラジエント (60分)
 流速：0.8 mL/min
 温度：25 °C
 検出：UV (280 nm)
 試料：オブアルブミン (20 mg)、トリプシンインヒビター (20 mg)、注入量 2 mL

3-2. 測定流速の影響

グラジエント時間を一定にし、測定流速を 0.25、0.5、1.0 mL/min と変えてオブアルブミンとトリプシンインヒビターを分離したクロマトグラムを図-6 に示します。調べた流速範囲では流速が速いほど分離時間が短く（溶出が早く）、高分離能が得られます。

3-3. グラジエント時間の影響

測定流速を一定（1.0 mL/min）にし、30分、60分、120分とグラジエント時間を変えてオブアルブミンとトリプシンインヒビターを分離したクロマトグラムを図-7 に示します。グラジエント時間が長いほど高分離能が得られますが、グラジエント時間を長くすると分析に要する時間が長くなり、また、試料の希釈が大きくなります。したがってグラジエント時間は 30～60分が適当と思われる。

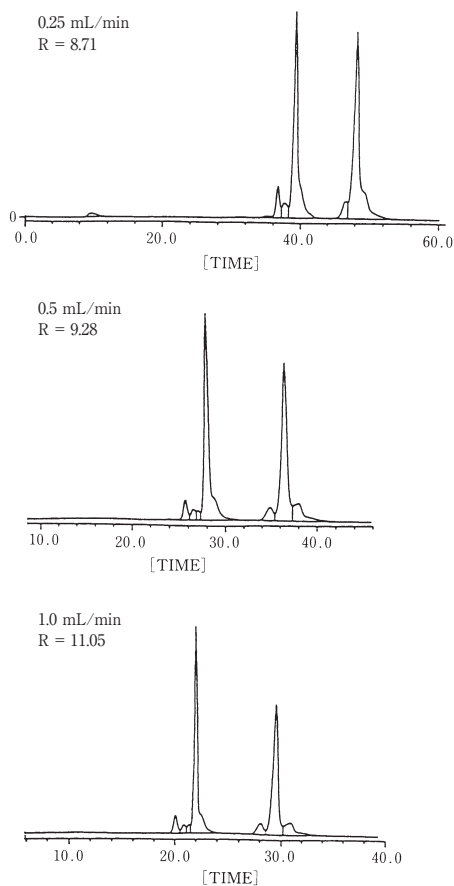


図-6 たんぱく質分離における流速の影響
カラム：TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. × 7.5 cm
条件は図-1 に同じ
ただし 流速；0.25、0.5、1.0 mL/min

3-4. 試料溶液中の塩濃度の影響

試料にオブアルブミンとトリプシンインヒビターを用い塩を含む 50 mmol/L トリス塩酸緩衝液（pH 8.6）で溶解し、試料溶液中の塩を 0.1 mol/L、0.2 mol/L、0.3 mol/L と変えてその溶液をカラムに注入したたんぱく質の溶出挙動を調べました。図-8 に TSKgel SuperQ-5PW の試料溶液中の塩濃度を変えたときのクロマトグラムを示します。図からもわかるように 0.1 mol/L NaCl ではたんぱく質の溶出に変化は見られませんが、0.2 mol/L 以上になると素通り（Vo）付近にピークが見られるたんぱく質が漏れ始めてきて、塩濃度が上がるにつれてオブアルブミンとトリプシンインヒビターのピーク面積が小さくなってきます。図-9 に試料溶液中の塩濃度を 0.1 mol/L NaCl して負荷量を 0.2～10 mg まで変化させたときのクロマトグラムを示します。塩濃度が 0.1 mol/L NaCl では負荷量を上げてても分離は低下せず Vo 付近のたんぱく質の溶出も見られません。したがって TSKgel SuperQ-5PW の試料溶液中の塩濃度は 0.1 mol/L 以下を推奨します。

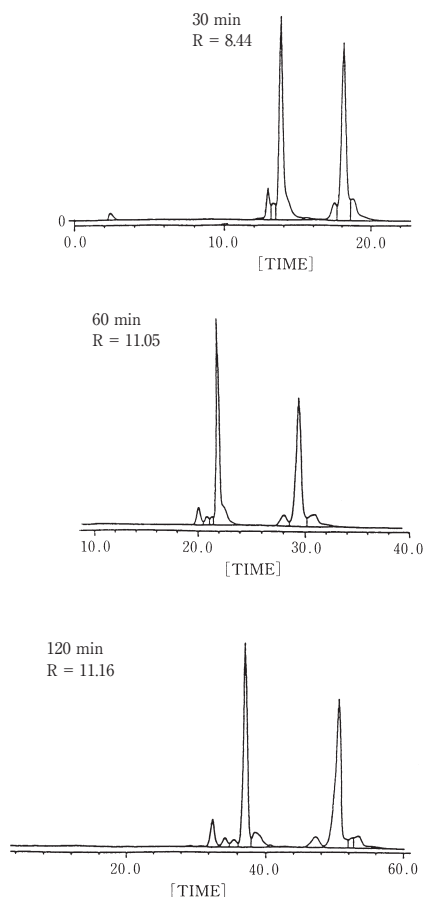


図-7 たんぱく質分離におけるグラジエント時間の影響
カラム：TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. × 7.5 cm
条件は図-1 に同じ
ただしグラジエント時間；30、60、120分

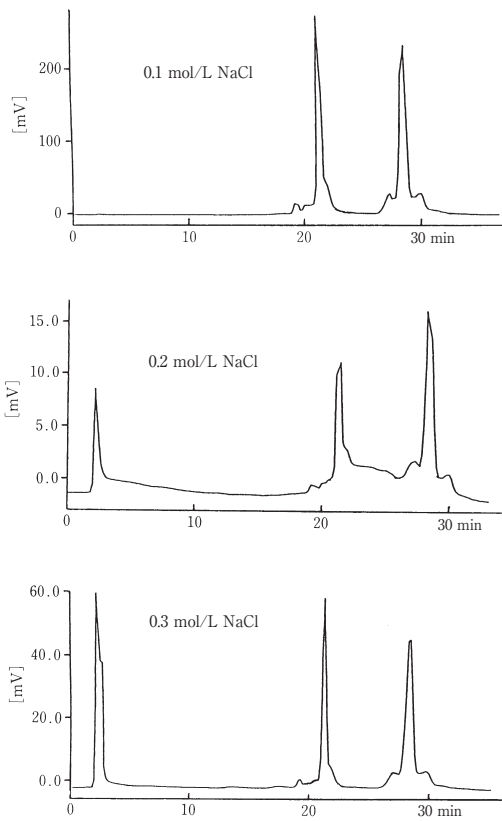


図-8 試料溶液中の塩濃度の影響 (1)

カラム：TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. × 7.5 cm
 溶離液：A：50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3)
 B：A + 0.5 mol/L NaCl
 A → B リニアグラジエント (60分)

流 速：1.0 mL/min

温 度：25 °C

検 出：UV (280 nm)

試 料：オブアルブミン、トリプシンインヒビター (各 0.5 mg in 500 μL)

試料中の塩濃度は 0.1、0.2、0.3 mol/L NaCl

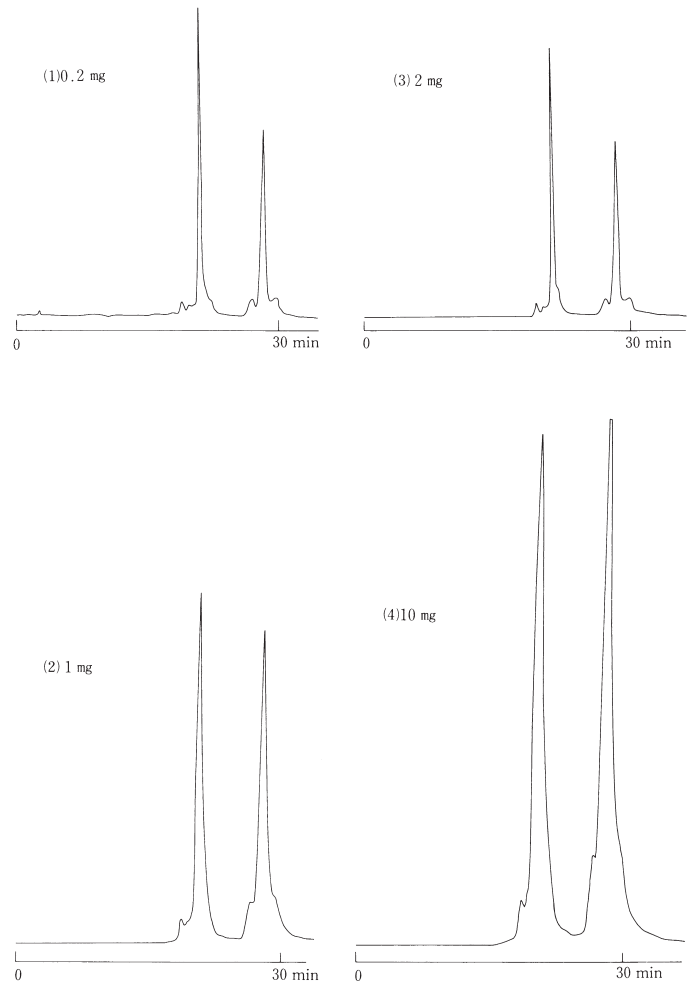


図-9 試料溶液中の塩濃度の影響 (2)

条件は図-7に同じ

ただし、試料は (1) 各 1 g/L、100 μL

(2) 各 2 g/L、500 μL

(3) 各 10 g/L、100 μL

(4) 各 10 g/L、500 μL

試料中の塩濃度は、0.1 mol/L NaCl

4. たんぱく質の分離 (応用例)

4-1. モノクローナル抗体の分離

図-10、図-11 にマウス腹水中からそれぞれ異なるモノクローナル抗体 (IgG₁) を、試料注入量を変えて分離した例を示します。試料注入量は 100 μ L から 5,000 μ L まで変化させました。図-10 では、注入量 1000 μ L まで、ほぼ同じクロマトグラムが得られています。また得られたモノクローナル抗体画分をサイズ排除クロマトグラフィー (TSKgel G3000SW_{XL}) で純度検定したところ、共に純度 92 % と高純度な標品が得られていることがわかりました。また注入量 5,000 μ L では、若干不純物ピークの混入が見られますが、良好な分離が得られています。尚、得られたモノクローナル画分の純度は 89 % でした。

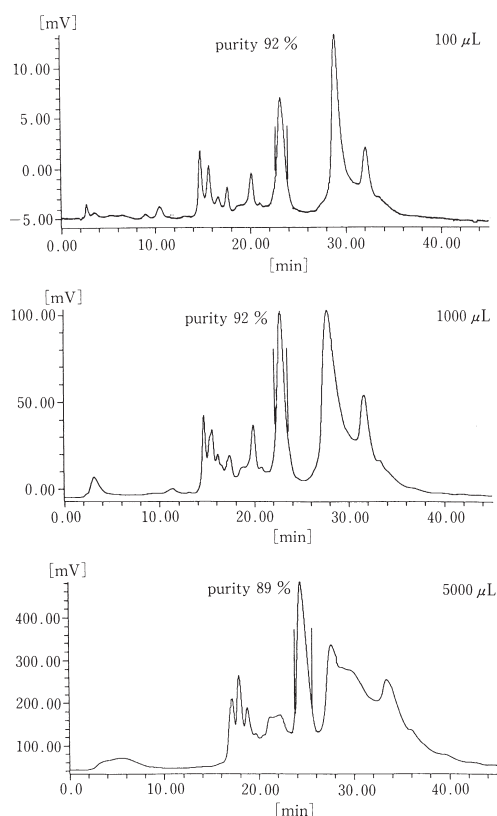


図-10 マウスモノクローナル抗体 A (IgG₁) の分離

カラム：TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. \times 7.5 cm
溶離液：A：20 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5)

B：A + 0.5 mol/L NaCl

A \rightarrow B リニアグラジエント (60分)

流速：1.0 mL/min

温度：25 $^{\circ}$ C

検出：UV (280 nm)

試料：マウス腹水 (\times 3)、緩衝液で希釈後、マイシヨリディスクでろ過

注入量 100、1,000、5,000 μ L

※ IgG₁ 画分の純度は、サイズ排除クロマトグラフィーによるピーク面積より求めた。

図-11 の別のモノクローナル抗体の分離では、マウス腹水中の不純物も、非常に良好に分離できており、注入量 5,000 μ L でも、得られたモノクローナル抗体の純度は、94 % と、分析レベルと同様な高純度のものが得られています。そのためこの試料については、さらに大量の試料注入も可能と思われます。

4-2. 卵白の分離

標準的な溶離条件でニワトリの卵白を分離した例を図-12 に示します。

4-3. ウレアーゼの分離

市販のウレアーゼ (Jack Beans) を分離した例を図-13 に示します。

4-4. リポキシダーゼの分離

市販の粗リポキシダーゼ (大豆) の分離例を図-14 に示します。

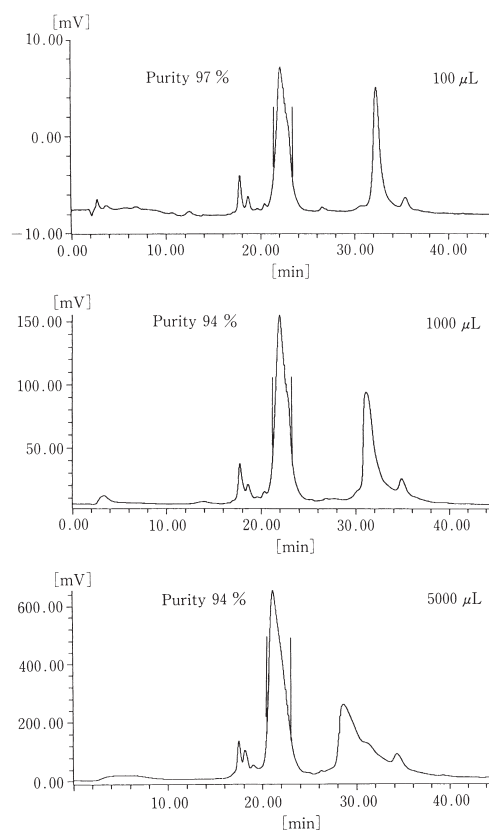


図-11 マウスモノクローナル抗体 B (IgG₁) の分離
条件は、図-9 に同じ

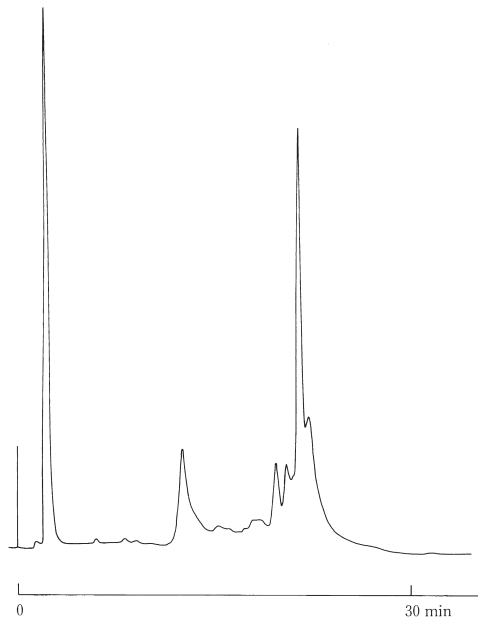


図-12 ニワトリ卵白 (Egg white) の分離
 カラム：TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. × 7.5 cm
 溶離液：A：50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6)
 B：A + 0.5 mol/L NaCl
 A→Bリニアグラジエント (60分)
 流速：1.0 mL/min
 温度：25℃
 検出：UV (280 nm)
 試料：ニワトリ卵白、1g/L、100 μL

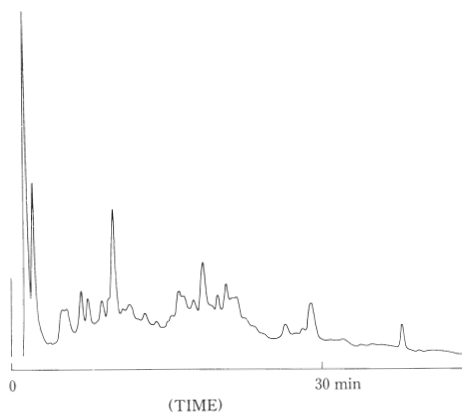


図-13 ウレアーゼ (Jack Beans) の分離
 条件は図-12に同じ
 ただし試料：10 g/L、100 μL

5. TSKgel SuperQ-5PW から TOYOPEARL SuperQ-650 へのスケールアップ

TSKgel SuperQ-5PW を用いた大量試料の分離精製に関しては分取カラム (カラムサイズ 21.5 mm I.D. × 15 cm) が用意されています。しかしさらに大量の試料分離や、工業的精製が目的の場合、HPLC 用カラムより中速クロマトグラフィー (MPLC) 用充填剤を用いた方が、有利な場合があります。

TSKgel SuperQ-5PW の場合、TOYOPEARL SuperQ-650 を用いてスケールアップが可能です。図-15に、TSKgel SuperQ-5PW と TOYOPEARL SuperQ-650S (35 μm)、TOYOPEARL SuperQ-650M (65 μm) を同一条件で分離したクロマトグラムを示します。試料の溶出位置は、ほぼ同じであり、TSKgel SuperQ-5PW と TOYOPEARL SuperQ-650 は、分離選択性がほぼ同じであることがわかります。(分離能は、充填剤の粒子径に反比例します)

次に、TOYOPEARL SuperQ-650S のグラジエント時間を変え、TSKgel SuperQ-5PW との分離能を比較しました。その結果を図-16に示します。TSKgel SuperQ-5PW (20分グラジエント) に比べ、TOYOPEARL SuperQ-650S では、150分グラジエントにより、不純物ピークの分離もかなり TSKgel SuperQ-5PW に近いものが得られています。

図-17、図-18には、TOYOPEARL SuperQ-650M を用いたスケールアップについて示します。TOYOPEARL SuperQ-650M では、HPLC に比べ、粒子径がかなり大きい (65 μm) ため、グラジエント時間を長くしたり、またカラム長さを長くすることにより、分離能を TSKgel SuperQ-5PW に近づけることが可能です。

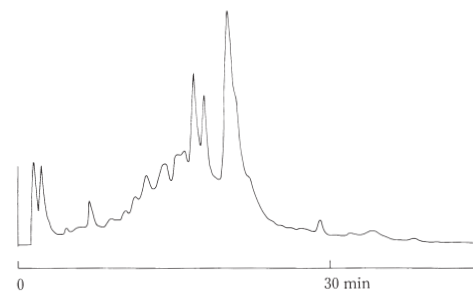


図-14 市販リポキシダーゼの分離
 条件は図-12に同じ
 ただし試料：6 g/L、100 μL

6. おわりに

たんぱく質高負荷容量高速イオン交換クロマトグラフィー用充填カラム TSKgel SuperQ-5PW の基本的性質とたんぱく質の分離例について紹介しました。TSKgel SuperQ-5PW は、分離能に優れているほか、たんぱく質の吸着容量が非常に大きく化学的安定性にも優れているため、分析レベル（分析カラム）での高純度精製やたんぱく質の粗抽出試料などの多成分試料からの大量分離・分取分離に最適です。表-5 に TSKgel SuperQ-5PW の標準使用条件を示します。また、既に分取精製用ゲルとして TOYOPEARL SuperQ-650 が上市されており、スケールアップやさらに大量処理や工業的分離精製まで対応できる商品構成となっているため生化学分野での応用、展開が期待されます。

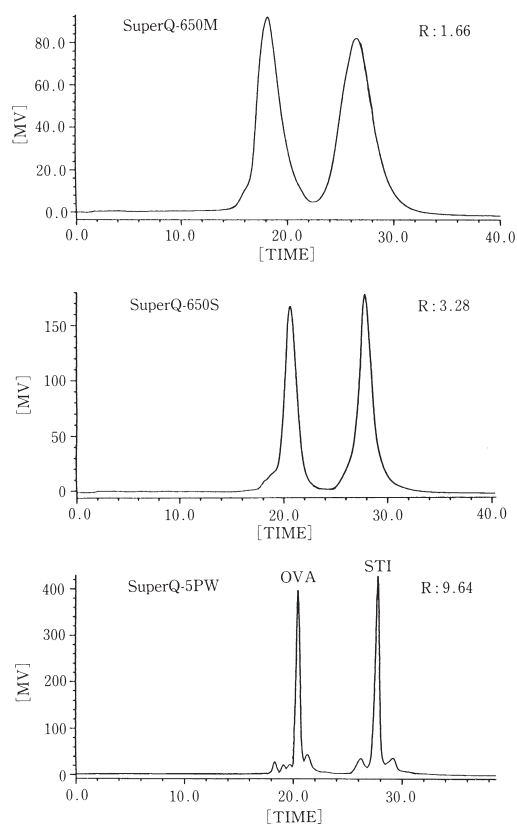


図-15 TSKgel SuperQ-5PW から TOYOPEARL SuperQ-650S へのスケールアップ (1)

カラム：TSKgel SuperQ-5PW (10 μ m)
 TOYOPEARL SuperQ-650S (35 μ m)
 TOYOPEARL SuperQ-650M (65 μ m)
 全て 7.5 mm I.D. \times 7.5 cm
 溶離液：A：50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3)
 B：A + 0.5 mol/L NaCl
 A \rightarrow B リニアグラジエント (60分)

流速：1.0 mL/min

温度：25 $^{\circ}$ C

検出：UV (280 nm)

試料：オブアルブミン (20 mg)、トリプシンインヒビター (各 1 mg)

表-5 TSKgel SuperQ-5PW の標準使用条件

カラムサイズ	7.5 mm I.D. \times 7.5 cm
溶離条件	
流速	0.5~1.0 mL/min
バッファー	20 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5~pH 8.6)
平衡化時間	カラム容量の 5 倍以上
塩濃度	0 ~ 0.5 mol/L NaCl (0~0.3 mol/L NaCl で分離能向上)
グラジエント時間	20~100分
温度	4 ~ 25 $^{\circ}$ C
検出	UV
試料	
負荷量	100 μ g ~ 200 mg
注入量	100 μ g ~ 10 mg
塩濃度	0.1 mol/L 以下 (希釈または透析)
不溶物	フィルター (マイシヨリディスクなど) でのろ過

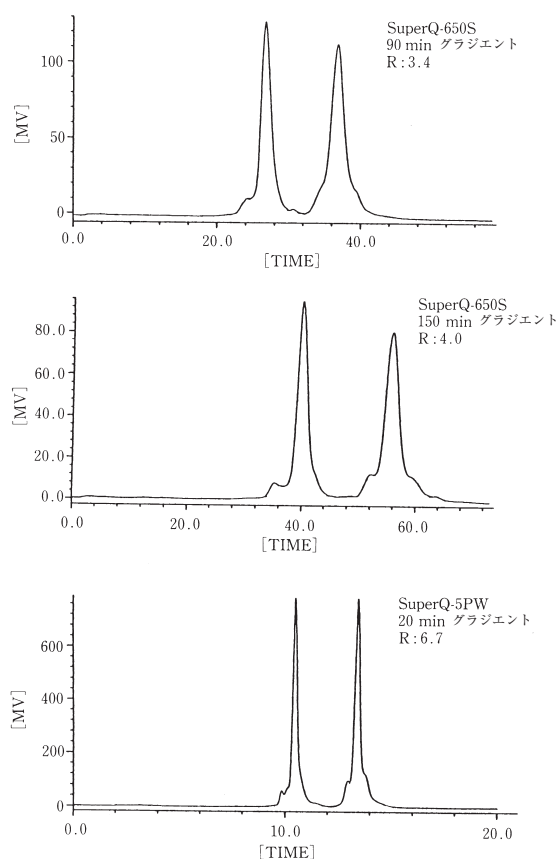


図-16 TSKgel SuperQ-5PW から TOYOPEARL SuperQ-650S へのスケールアップ (2)

条件は図-15 に同じ

ただしグラジエント時間は 20 ~ 150 min

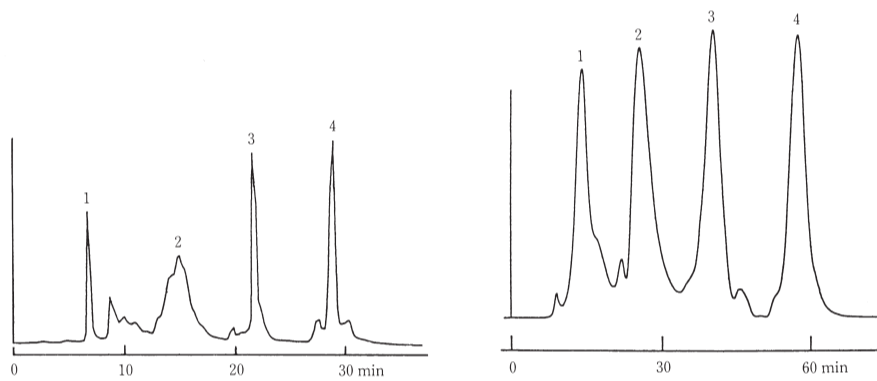


図-17 TSKgel SuperQ-5PW から TOYOPEARL SuperQ-650
へのスケールアップ (3)

カラム ; (a) TSKgel SuperQ-5PW 7.5 mm I.D. × 7.5 cm
(b) TOYOPEARL SuperQ-650M 16 mm I.D. × 15 cm
溶離液 ; A : 50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3)
B : A + 0.5 mol/L NaCl
A → B リニアグラジエント (a) 60 分、(b) 100 分
流 速 ; (a) 1.0 mL/min (b) 2.0 mL/min
温 度 ; 25 °C
検 出 ; UV (280 nm)
試 料 ; 1. カーボニックアンヒドラーゼ
2. トランスフェリン
3. オブアルブミン
4. トリプシンインヒビター
(試料濃度は図-2 に同じ)
(a) 1.6 mg (b) 5.4 mg

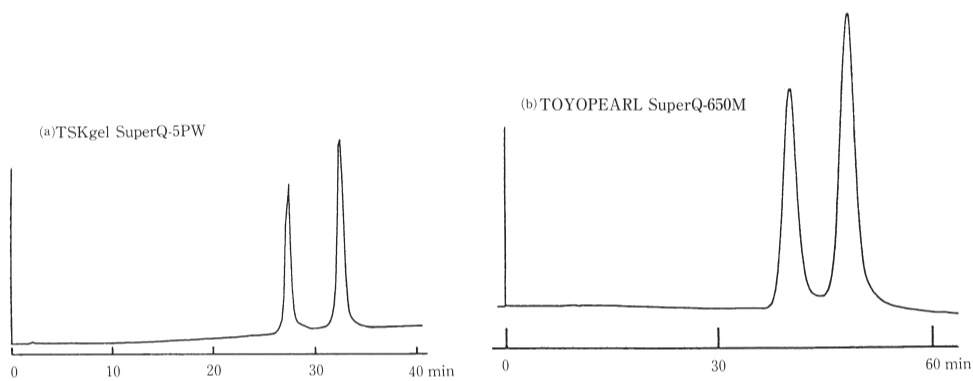


図-18 TSKgel SuperQ-5PW から TOYOPEARL SuperQ-650M
へのスケールアップ (4)

条件は図-17 に同じ
ただし試料 ; β -ラクトグロブリン
(a) 2 mg (b) 50 mg

※ “TSKgel”、“TOYOPEARL”は東ソー株式会社の登録商標です。



TOSOH

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部	☎ (03) 5427-5180	〒105-8623	東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオエス	☎ (06) 6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオエス	☎ (052) 211-5730	〒460-0008	名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店	☎ (092) 781-0481	〒810-0001	福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店	☎ (022) 266-2341	〒980-0014	仙台市青葉区本町1-11-1
カスタマーサポートセンター	☎ (0467) 76-5384	〒252-1123	神奈川県綾瀬市早川2743-1

お問い合わせe-mail tskgel@tosoh.co.jp

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>