

たんぱく質、核酸の SEC 分離はこれで決まり！

TSKgel SW シリーズカラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーによる分離



サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、分析種の分子サイズに基づいて分離されるため、たんぱく質 (ペプチド含む) や核酸 (オリゴヌクレオチド、DNA、RNA) などの生体高分子の品質管理においては、精製物に含まれる二量体や凝集体など、立体異性体や不純物の分析に用いられています。溶離液には分析種を変性させないりん酸塩緩衝液やグッドバッファーが多用されますが、試料の立体構造の影響を低減し試料と充填剤との間の疎水的相互作用を抑制する目的で、界面活性剤やグアニジン等の変性剤や有機溶媒を添加した溶離液が用いられる場合があります。これらの溶離液中では、たんぱく質やペプチドは変性をうけてランダムコイル状となり、一般に多用される溶離液中と比較して分子サイズが数倍大きくなるため、SEC カラムグレードの選択に注意が必要です。

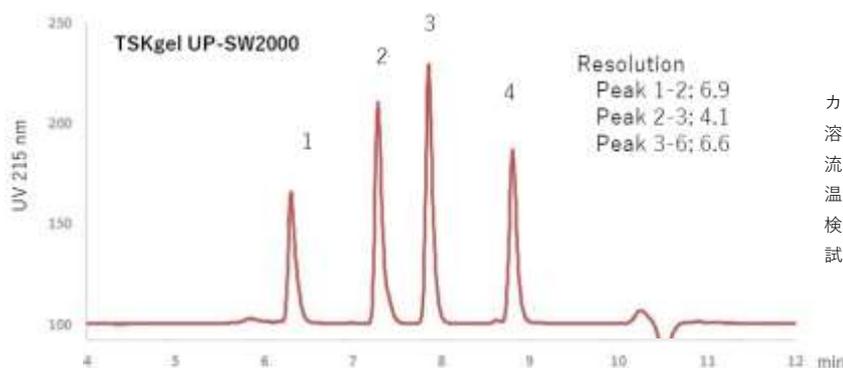
●たんぱく質、ペプチド、核酸等の SEC 分離に用いられるカラムグレード、溶離液条件と分子量分画範囲

| 試料および溶離液 | 分画分子量範囲 (至適範囲) | | | |
|---|-------------------|--|---|---|
| | カラムグレード | TSKgel G2000SW, G2000SWxL TSKgel SuperSW2000 TSKgel UP-SW2000 | TSKgel G3000SW, G3000SWxL TSKgel SuperSW3000 TSKgel UP-SW3000 | TSKgel G4000SW, G4000SWxL TSKgel UltraSW Aggregate TSKgel UP-SW Aggregate |
| ポリエチレングリコール (PEG) (溶離液は水) | | 500 - 15,000 | 1,000 - 35,000 | 2,000 - 250,000 |
| デキストラン (溶離液は水) | | 1,000 - 30,000 | 2,000 - 70,000 | 4,000 - 500,000 |
| 球状たんぱく質^a | | | | |
| 多用される緩衝液 (例) (1) 0.1 mol/L sodium phosphate buffer (pH 6.7) + 0.1 mol/L Na ₂ SO ₄ (2) 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.0) + 0.2 mol/L NaCl (緩衝液に10 - 20%の有機溶媒を添加する場合もある) | | 5,000 - 100,000 (< 70,000) | 10,000 - 500,000 (30,000 - 300,000) | 10,000 - 2,000,000 (推定) (> 300,000) |
| 変性剤 (グアニジン) を含む緩衝液 (例) 6 mol/L guanidine-HCl in 0.1 mol/L sodium phosphate (pH 6.0) | | 1,000 - 25,000 (< 10,000) | 2,000 - 70,000 (10,000 - 70,000) | 3,000 - 400,000 (> 70,000) |
| 界面活性剤 (SDS) を含む緩衝液 (例) 0.1 % SDS in 0.1 mol/L sodium phosphate (pH 7.0) | | 15,000 - 25,000 | 10,000 - 100,000 (< 60,000) | 15,000 - 300,000 (> 60,000) |
| ペプチド (ポリペプチド) 有機溶媒を含む溶離液 (例) 40 % acetonitrile in 0.1 % TFA | | 100-100,000 (推定) (300 - 20,000) | - (- 100,000 ; 推定) | - |
| 核酸 (DNA、RNA、オリゴヌクレオチド) ^b | | | | |
| 多用される緩衝液 (例) 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) + 0.3 mol/L NaCl + 1 mmol/L EDTA (緩衝液に10 - 20%の有機溶媒を添加する場合もある) | | DNA; < 80塩基対 (< 55塩基対) RNA; < 200塩基 (推定) オリゴヌクレオチド; < 100量体 | DNA; 55 - 160塩基対 (80 - 110塩基対) RNA; 180 - 360塩基 (推定) | DNA; 110 - 500塩基対 (160 - 375塩基対) RNA; 180 - 1,200塩基 (推定) |

^aデータは、文献：Handbook of Size Exclusion Chromatography, 1995, Chromatographic Science Series, edited by J. Cazesおよび文献：Y. Kato, LC.GC, 1: 540 (1983)等をもとに作成

^b核酸の分画範囲は、核酸の二次構造、立体構造等により異なる。また500塩基対以上の核酸の分析には、TSKgel G5000PWxL, G6000PWxL, G-DNA-PWなどが多用される。

●有機溶媒を含む溶離液を用いたペプチドの分離例



カラム ; TSKgel UP-SW2000 (4.6 mm I.D. x 30 cm)

溶離液 ; 40 % acetonitrile in 0.1 % TFA

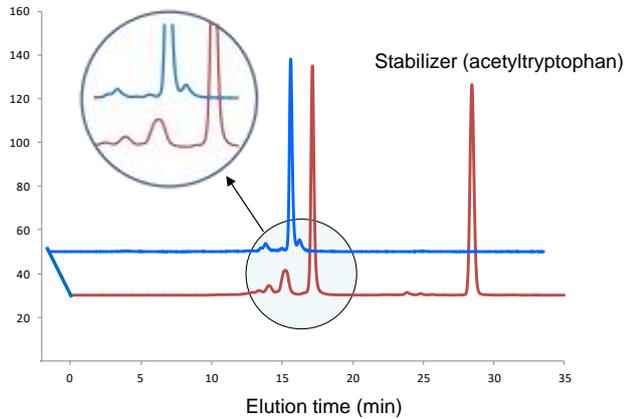
流速 ; 0.35 mL/min

温度 ; 25 °C

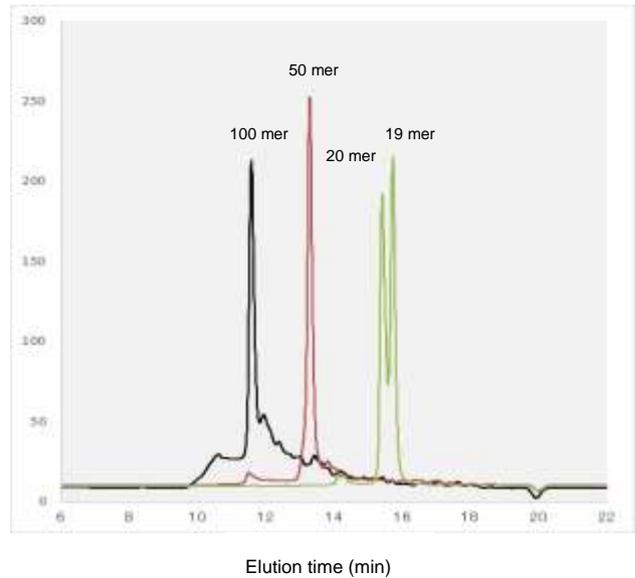
検出 ; UV (215 nm)

試料 ; 1. Aprotinin (6,512 Da), 2. Big gastrin (human, 3,949 Da),
3. Bombesin (1,620 Da), 4. Oxytocin (1,007 Da)

●ヒト血清アルブミンおよび合成オリゴヌクレオチドの分離例



カラム ; TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. x 30 cm)
 溶離液 ; 0.05 mol/L sodium phosphate buffer (pH 6.8) + 0.2 mol/L NaCl
 流速 ; 0.16 mL/min
 温度 ; 25 °C
 検出 ; UV (280 nm)
 試料 ; ヒト血清アルブミン
 Cohn fraction (青線)、組換え体 (赤線)



カラム ; TSKgel UP-SW2000 (4.6 mm I.D. x 30 cm)
 溶離液 ; 0.05 mol/L sodium phosphate buffer (pH 6.7) + 0.3 mol/L NaCl
 + 0.05 % NaN₃
 流速 ; 0.2 mL/min
 温度 ; 25 °C
 検出 ; UV (260 nm)
 試料 ; 粗合成オリゴヌクレオチド (19 mer, 20 mer, 50 mer, 100 mer)

●たんぱく質、ペプチド、核酸の SEC 分離に関する技術資料 (テクニカルノート、セパレーションレポート)

- | | |
|--|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1) テクニカルノート (TSKgel) No. 1、SEC カラムを性能アップしよう! 2) テクニカルノート (TSKgel) No. 2、UHPLC-SEC カラムはこれで決まり! 3) テクニカルノート (TSKgel) No. 3、抗体の SEC 分析はこれで決まり! 4) テクニカルノート (TSKgel) No. 7、抗体医薬品の品質特性分析はこれで決まり! 5) テクニカルノート (TSKgel) No. 8、PEG 化バイオ医薬品の分析はこれで決まり! 6) テクニカルノート (TSKgel) No. 13、超高速、高分離 SEC 分析はこれで決まり! 7) テクニカルノート (TSKgel) No. 14、ウイルス関連医薬品の分析はこれで決まり! 8) テクニカルノート (TSKgel) No. 15、ウイルスベクターの分析はこれで決まり! 9) テクニカルノート (TSKgel) No. 16、プラスミド DNA の分析はこれで決まり! 10) テクニカルノート (TSKgel) No. 20、アデノ随伴ウイルス (AAV) の分析はこれで決まり! 11) セパレーションレポート No. 18、TSKgel SW タイプによるタンパク質の測定 12) セパレーションレポート No. 24、高速ゲル濾過カラム (TSKgel SW タイプおよび PW タイプ) の応用 - 生体高分子を中心として - 13) セパレーションレポート No. 46、TSKgel SW_{XL} シリーズについて | <ol style="list-style-type: none"> 14) セパレーションレポート No. 47、TSKgel G6000PW によるプラスミドの分離 15) セパレーションレポート No. 50、TSKgel による膜タンパク質の分離 16) セパレーションレポート No. 52、TSKgel を用いたスケールアップについて (HPLC から MPLC へ) 17) セパレーションレポート No. 62、TSKgel G3000SW_{XL} を用いた高性能ゲル濾過クロマトグラフィーによる IgG とアルブミンの分離 (静注用 IgG 製剤分離への応用) 18) セパレーションレポート No. 73、TSKgel を用いたゲル濾過 (サイズ排除) クロマトグラフィーによるペプチドの分離 19) セパレーションレポート No. 74、TSKgel を用いたモノクローナル抗体の分離 20) セパレーションレポート No. 95、TSKgel SuperSW シリーズについて 21) セパレーションレポート No. 113、抗体分析用 SEC カラム TSKgel SuperSW mAb および TSKgel UltraSW Aggregate について 22) セパレーションレポート No. 116、高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW3000 について 23) セパレーションレポート No. 120、高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW2000 について 24) セパレーションレポート No. 122、高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW Aggregate について |
|--|---|

※上記の技術資料には、弊社ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/lit.jp> からアクセスできます



※ "TSKgel" は日本等における東ソー株式会社の登録商標です
 ※ 掲載のデータ等はその数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください

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 バイオサイエンスG | ☎(06) 6209-1948 | 〒541-0043 | 大阪市中央区高麗橋4-4-9 |
| 名古屋支店 バイオサイエンスG | ☎(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 |

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>
 HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>
 お問い合わせE-mail hlc@tosoh.co.jp