

SEPARATION REPORT

TSKgel OligoDNA RPによる 核酸分離のための条件検討

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel OligoDNA RPの基本的性質	1
2-1. 流速と分離能について	2
2-2. グラジエント時間と分離能について	2
2-3. 溶離液組成について	3
2-4. 有機溶媒について	4
2-5. イオン対試薬の添加効果について	5
2-6. 試料負荷量について	6
2-7. 測定温度について	6
3. 応用例	7
4. おわりに	8

1. はじめに

核酸の液体クロマトグラフィによる分析は、これまでにDNAやRNAといった高分子領域においては、ゲル濾過クロマトグラフィ (GFC) やイオン交換クロマトグラフィ (IEC) が、又、核酸代謝物やヌクレオシド、ヌクレオチドといったような低分子物質や、オリゴマのような中分子量域においてはイオン交換クロマトグラフィや逆相クロマトグラフィ (RPC) がそれぞれ有効な分離手段として利用されています。

核酸を取り巻く研究開発が盛んに行なわれている今日、核酸関連物質の分析は極めて重要な研究テーマとなっています。本レポートでは特にオリゴマ領域の核酸分離用の逆相充填カラムとして設計されたTSKgel OligoDNA RPの特徴、基本的性質、および応用例について紹介します。

2. TSKgel OligoDNA RPの基本的性質

表-1にTSKgel OligoDNA RPの仕様を示します。TSKgel OligoDNA RPは、孔径250オングストローム、粒径5ミクロンの球状シリカゲルの表面にオクタデシル基を導入した逆相充填カラムです。

TSKgel OligoDNA RPは特にオリゴマ領域の核酸分離用に設計されており、孔径は、汎用の逆相担体に比べ大きく、又、炭素量も適量導入されています。以下、TSKgel OligoDNA RPの基本的性質について述べます。

表-1 TSKgel OligoDNA RPの仕様

カラム	粒 径	理論段数*	カラム寸法
	(μm)	(TP/カラム)	(mmID \times cm)
TSKgel OligoDNA RP	5	7,000	4.6 \times 15
TSKgel OligoDNA RP	5	7,000	7.8 \times 15

*条件；溶離液：50% CH₃CN

流 速：1.0ml/min

試 料：ナフタレン

2-1 流速と分離能について

流速と分離能の関係を図-1および図-2に示します。オリゴデオキシアデニル酸を試料とし、カラム内径4.6mm、及び7.8mmについて調べました。いずれの場合も流速とともに分離能が向上していることが分かります。しかし、7.8mm径カラムにおいては、線速が7cm/minを超えると分離能が低下し始めました。本カラムの最適線速は、6cm/min前後と考えられます。

2-2 グラジエント時間について

グラジエント時間と分離能との関係を図-3に示します。同一流速下では、グラジエント時間とともに分離能は向上していることが分かります。これは溶離液中の有機溶媒の増加はゆるやかであるほど分離が良くなることを示しています。

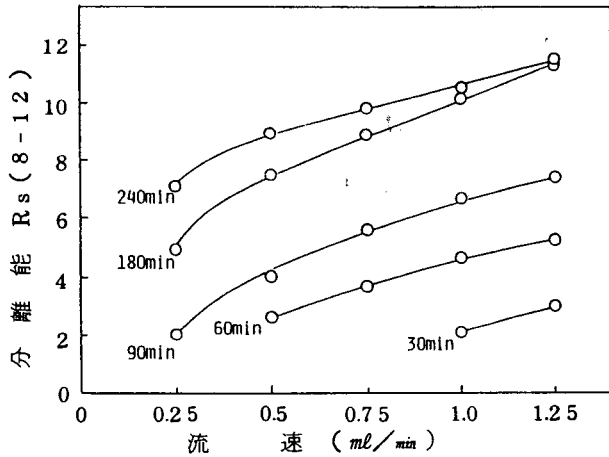


図-1 流速の分離能への影響(1)

溶離条件；カラム寸法：4.6mmID×15cm

溶離液：A, アセトニトリル/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0) = 2/98

B, アセトニトリル/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0) = 25/75

A→Bリニアグラジエント
(時間は図中に記載)

試料：オリゴデオキシアデニル酸
p(dA) 8、12

検出：UV(260nm)

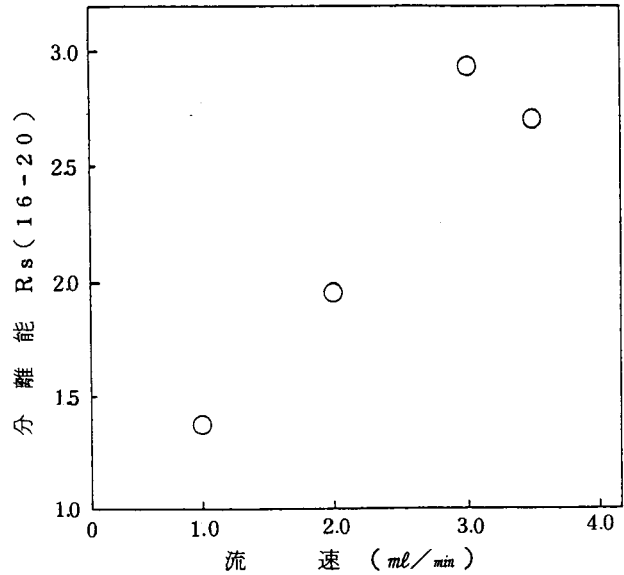


図-2 流速の分離能への影響(2)

溶離条件；カラム寸法：7.8mmID×15cm

溶離液：A, アセトニトリル/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0) = 5/95

B, アセトニトリル/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0) = 25/75

A→Bリニアグラジエント(90min)

試料：オリゴデオキシアデニル酸
p(dA) 16、20

検出：UV(260nm)

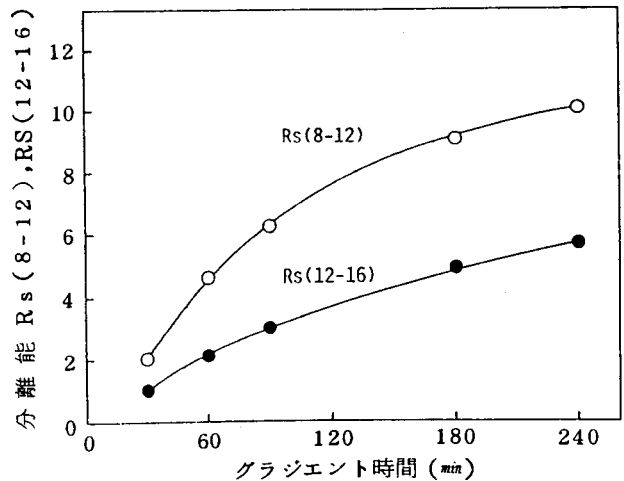


図-3 グラジエント時間の分離能への影響

溶離条件；カラム寸法：4.6mmID×15cm

溶離液：図-1に同じ

試料：オリゴデオキシアデニル酸
p(dA) 8、12、16

流速：1.0ml/min

検出：UV(260nm)

2-3 溶離液組成について

溶離液組成の選択は核酸試料の選択性に関し、又、特に分取クロマトグラフィにおいて重要な因子です。即ち、溶離液組成により核酸試料の分離に大きな差が認められることや、更には、目的のフラクションから、純度の高い目的試料を簡便に得るために単純な溶離液を選択する必要があるからです。

図-4に、各種溶離液をもちいたオリゴデオキシアデニル酸の溶出挙動を示しました。

酢酸アンモニウム系において、溶離液組成の濃度を減少すると、分離能の低下と溶出位置の変化が見られました。酢酸アンモニウム無添加系では、正常なピークがえられず、又、数mM程度では十分なピーク形状を得ることができません。そのため少なくとも10~20mM以上の濃度が必要であり、更に、濃度が高いほど再現性も向上します。

リン酸緩衝液系では、酢酸アンモニウム系に比べ溶出位置の変化は小さいが、分離が劣る傾向にあり、また揮発性でないため、分取目的の使用には不適當です。

酢酸-トリエチルアンモニウム系では、上述の緩衝液系に比べ、全く溶出位置が異なります。溶出位置は大幅に遅れ、又、分離能は大幅に向上しました。これはトリエチルアミンがイオン対として作用し、ヌクレオチドの見かけの疎水性を増加させたために溶出位置を遅らせ、又、選択性を向上させたと考えられます。

このように分離能を向上させたい場合には、溶離液としてトリエチルアミン、トリプロピルアミン等のアルキルアミンの酢酸塩を用いると、分離能の改善が期待できます。しかしその反面、アルキル基が長鎖になるとフラクションからの除去が困難となるため、分取目的の分析では、考慮が必要です。このような場合、上述した緩衝液系の他に、ギ酸アンモニウム系などの、より溶離液から除去しやすい緩衝液系を選択する必要があります。

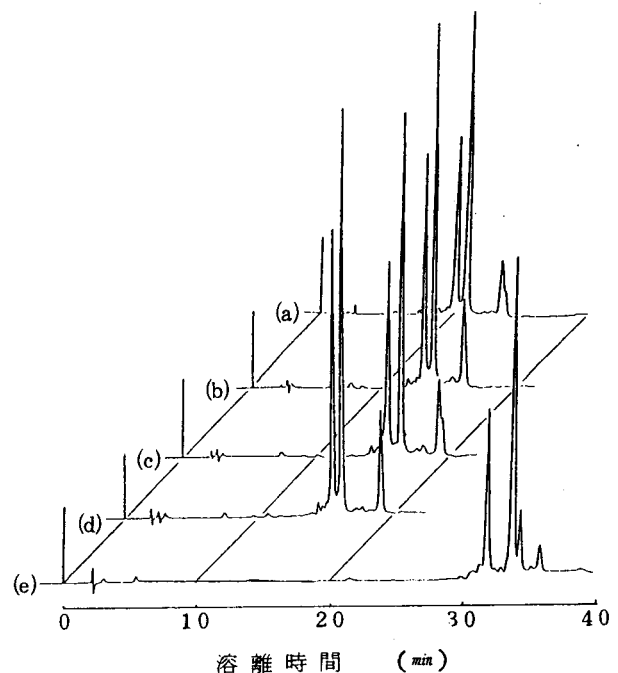


図-4 各種溶離液による溶出挙動

溶離条件；カラム寸法：4.6mmID×15cm

溶離液：A、アセトニトリル／緩衝液
(pH7.0) = 5 / 95

B、アセトニトリル／緩衝液
(pH7.0) = 25 / 75

A→Bリニアグラジエント (90 min)

緩衝液：(a)25mM酢酸アンモニウム

(b)50mM酢酸アンモニウム

(c)0.1M酢酸アンモニウム

(d)0.1Mリン酸

(e)0.1M酢酸トリエチルアンモニウム

流速：1.0ml/min

試料：オリゴデオキシアデニル酸

p(dA)16、20

2-4 有機溶媒について

逆相クロマトグラフィで用いられる有機溶媒は、一般にメタノール、アセトニトリル、及びiso-プロパノールであり、いずれの溶媒を用いても核酸オリゴマの測定を行なうことができます。しかし、測定の際には、それぞれの溶媒の特性を把握した上で選択する必要があります。

表-2に各種有機溶媒を用い同一条件下で、オリゴデオキシアデニル酸を測定した結果を示しました。メタノール系では、他の系に比較して溶出位置が遅れ、また分離能は向上しています。一方、iso-プロパノール系では溶出が早く、また分離能は大幅に低下しています。アセトニトリル系と同様の溶出位置とするためには、メタノール系及びiso-プロパノール系ではそれぞれ有機溶媒の初期濃度が約17%及び2.5%が必要であり、分離能は、アセトニトリル系に比べ、同程度かそれ以下でした。又、測定圧はアセトニトリル系に比較し、他の系では1~2割高くなり、操作上の注意が必要となります。

表-2 有機溶媒の影響

有機溶媒	圧力 (kg/cm ²)	溶出時間		分離能 Rs (16-20)
		上段p(dA)16	下段p(dA)20	
メタノール	93*	64.46		3.62
		67.70		
アセトニトリル	83	14.98		2.41
		15.74		
iso-プロパノール	93	3.65		0.65
		4.03		

溶離条件；溶離液：A, 有機溶媒/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0)=5/95
 B, 有機溶媒/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0)=25/75
 A→Bリニアグラジエント(90min)

流速：1.0ml/min

試料：オリゴデオキシアデニル酸

*初期圧力

図-5に初期アセトニトリル濃度のオリゴデオキシアデニル酸の分離能、および溶出位置に及ぼす影響を示しました。初期アセトニトリル量の増加とともに溶出位置は減少していますが、分離能については増大しており、アセトニトリル6%付近で最大を示しました。このことは、ゆるやかなアセトニトリル濃度の増加により分離能を向上できることを示しています。しかし、6%以上では初期アセトニトリル濃度が高すぎるため、試料は固定相と十分な相互作用ができず早く溶出したため、低分離能となったと考えられます。このように、わずかな組成の相違により分離能が大きく変化することが分かります。

以上のように、有機溶媒の選択には、目的物質の溶出に適した種類と濃度を考慮する必要があります。

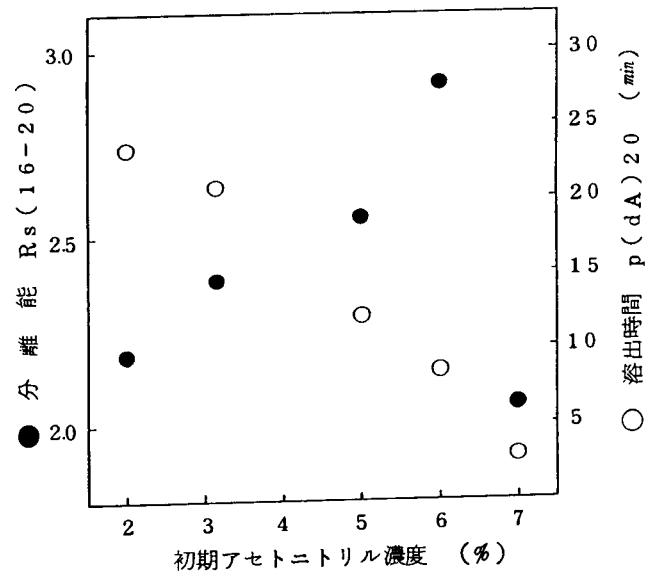


図-5 初期アセトニトリル濃度の分離能・溶出時間への影響

溶離条件；カラム寸法：4.6mmID×15cm

溶離液：A, アセトニトリル/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0)=
 $x/100-x$

B, アセトニトリル/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0)=
 $25/75$

A→Bリニアグラジエント(90min)

試料：オリゴデオキシアデニル酸
 p(dA)16, 20

流速：1.0ml/min

検出：UV(260nm)

2-5 イオン対試薬の添加効果について

先にも述べましたように(2-3 溶離液組成について)、オリゴヌクレオチドとイオン対を形成する化合物は、オリゴヌクレオチドの溶出挙動に大きく影響を与えます。

表-3 にイオン対試薬(リン酸n-テトラブチルアンモニウム)添加の、オリゴデオキシアデニル酸の溶出挙動への影響を示しました。無添加系に比べ、添加した系においては大幅に溶出位置が遅れ、しかも分離能はかなり改善されています。又、イオン対試薬の濃度についても、わずかな添加で影響が大きく、ヌクレオチドの分離に関して重要な因子であることが分かります。

しかしながら、分取を目的とする場合、試料からのイオン対試薬の除去が必要となるため、主として分析主体の使用になります。イオン対試薬を用いた場合、カラムの洗浄などによるイオン対の除去は一般的には困難であり、元のカラム性能(特に保持力について)を期待できないことがあります。又、イオン対試薬添加系では、核酸の本来有する疎水性に比べ、イオン対部分の疎水性が著しく大きいため、核酸塩基間の差異が小さくなり、塩基配列の異なったヌクレオチドの分離が困難になります。

表-3 イオン対試薬の影響

リン酸テトラブチル アンモニウム(TBA) (mM)	溶出時間		分離能 Rs(16-20)
	上段p(dA) 16	下段p(dA) 20	
...	14.98	15.74	2.41
	41.00	44.80	
1	55.03	59.95	7.31
	59.95		
2.5			9.09

溶離条件; カラム寸法: 4.6mmID×15cm

溶離液: A, アセトニトリル/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0)含
TBA=5/95

B, アセトニトリル/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0)含
TBA=25/75

A→Bリアグラジエント(90 min)

流速: 1.0ml/min

試料: オリゴデオキシアデニル酸
p(dA) 16, 20

検出: UV(260nm)

2-6 試料負荷量について

図-6に、内径7.8mm、長さ15cmのカラムを用いたオリゴデオキシアデニル酸の試料負荷量と分離能の関係を示しました。16量体と20量体の分離能は、負荷量0.5units付近から低下し始め、2.5unitsで初期の約60%となりました。ピーク幅の増大による分離能の低下ですが、この時点ではピーク形状の変化—歪や割れ—は、観測されませんでした。

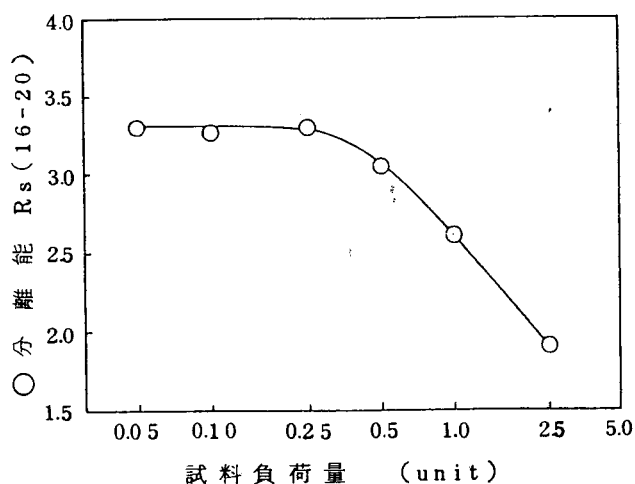


図-6 試料負荷量と分離能の比較

溶離条件；カラム寸法：7.8mmID×15cm

溶離液：A, アセトニトリル/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0) = 5/95

B, アセトニトリル/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0) = 25/75

A→Bリニアグラジエント(120 min)

試料：オリゴデオキシアデニル酸
p(dA)16、p(dA)20

流速：3.0ml/min

検出：UV(260nm)

2-7 測定温度について

測定温度とオリゴヌクレオチドの溶出位置及び分離能の関係を図-7に示します。測定温度の上昇とともに分離能は向上し、また溶出位置は反対に減少しました。測定圧力も温度とともに減少しています。このように、温度の上昇は核酸オリゴマの分離には有効な方法ですが、しかしヌクレオチドの安定性を考慮すると高い温度は避けるべきです。また図からも明らかなように、わずかな温度変化でも溶出位置の変動が観測されることから、ヌクレオチドの測定の際には、温度コントロールに十分配慮する必要があります。

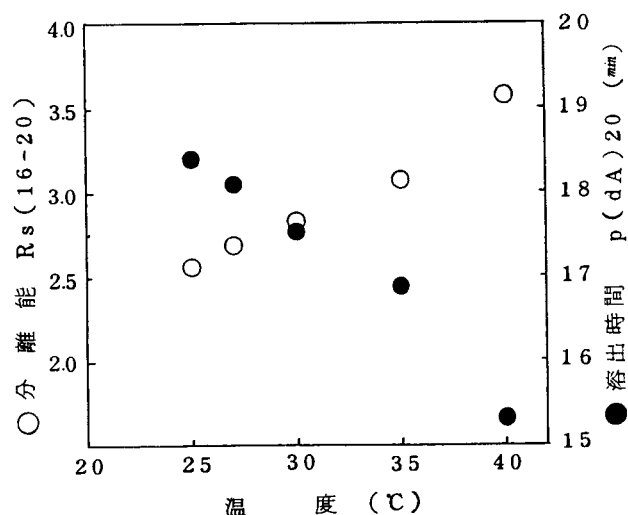


図-7 測定温度の溶出時間・分離能への影響

溶離条件；図-4(c)と同じ

3. 応用例

図-8、9及び10に合成オリゴデオキシヌクレオチドの分離例を示しました。いずれもペンタデカマ(15量体)ですが、構成される核酸塩基の種類と数の相違により溶出位置が異なることがわかります。図-11に、DNAのクロマトグラムを、図-12に転移リボ核酸(酵母)のクロマトグラムを示します。

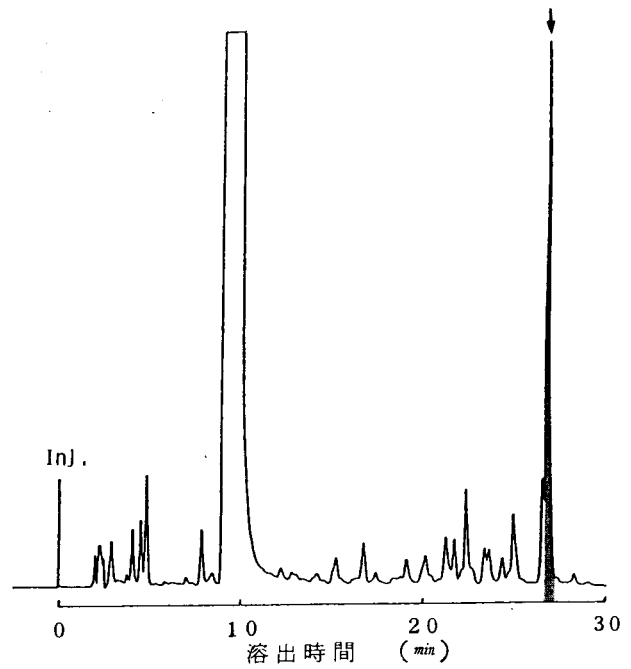


図-8 合成オリゴデオキシヌクレオチド(15量体)の分離(1)

溶離条件；図-4(c)に同じ

試料；dGATACTAACTCTCAT

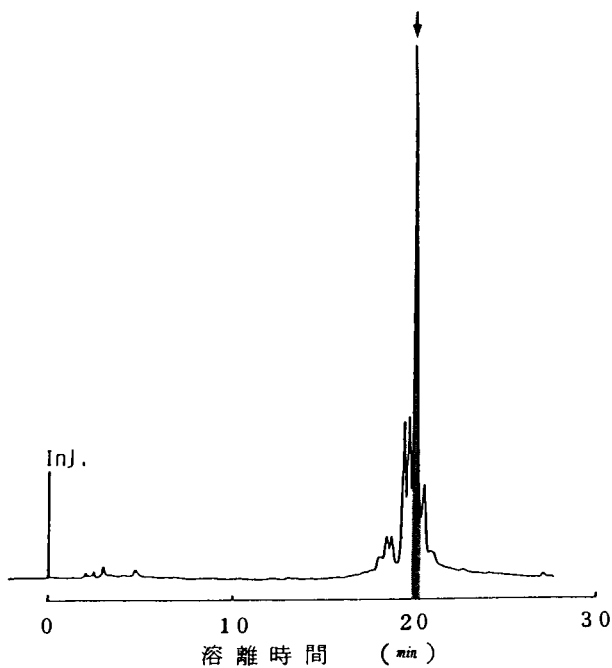


図-9 合成オリゴデオキシヌクレオチド(15量体)の分離(2)

溶離条件；図-4(c)に同じ

試料；dGACTACCCAGCGGAC

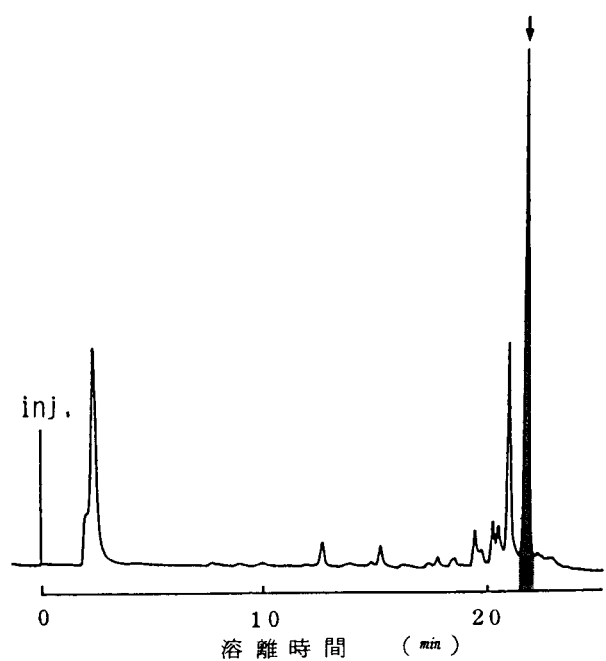


図-10 合成オリゴデオキシヌクレオチド(15量体)の分離(3)

溶離条件；図-4(c)に同じ

試料；dAACGACACTAAACGA

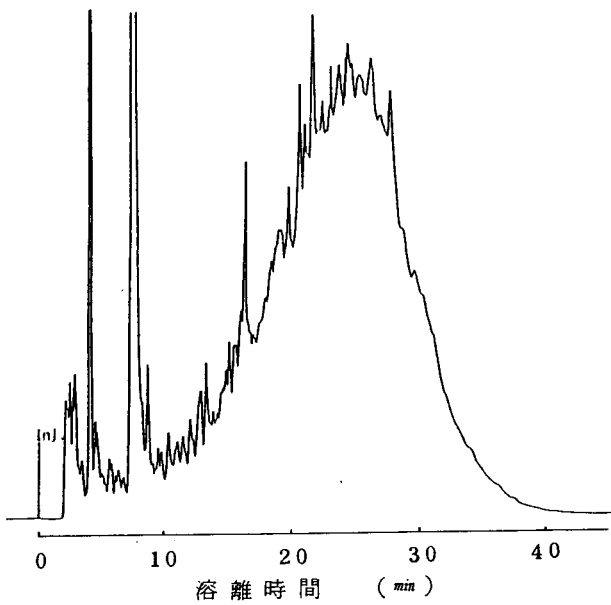


図-11 DNAの分離

溶離条件；カラム寸法：4.6mmID×15cm

溶離液：A, アセトニトリル/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0) = 2.5/97.5

B, アセトニトリル/0.1M酢酸アンモニウム(pH7.0) = 25/75

A→Bリニアグラジエント(90 min)

試料：ニシン精液由来DNA(フリー状態)

流速：1.0ml/min

検出：UV(260nm)

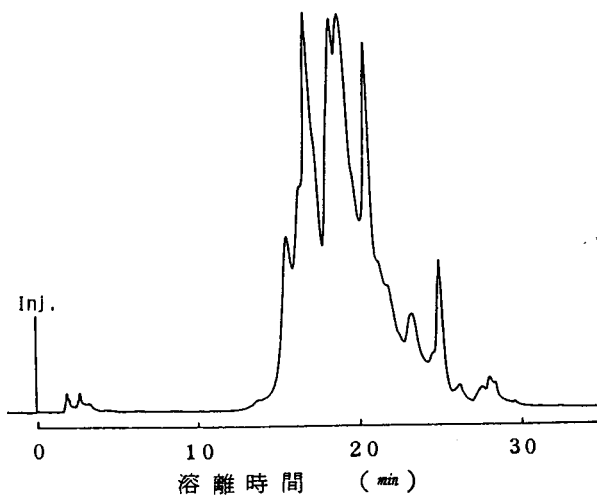


図-12 t-RNAの分離

溶離条件；グラジエント時間を除き図-1に同じ

グラジエント時間：90min

試料：パン酵母由来t-RNA

4. おわりに

TSKgel OligoDNA RPは、核酸のオリゴマ領域の専用分離カラムとして設計され、オリゴマ領域の分離に有効な孔径と炭素導入量を有しています。

核酸オリゴマの分析分取用として、今後更に本カラムの利用が期待されます。