



TOSOH

No.090

SEPARATION REPORT

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

——目 次——

| | ページ |
|-----------------------|-----|
| 1. はじめに | 1 |
| 2. 特徴 | 1 |
| 3. 分離能に対するHPLCシステムの影響 | 3 |
| 4. 分離能に対する分離条件の影響 | 4 |
| 5. 応用例 | 9 |
| 6. 使用上の注意 | 12 |
| 7. おわりに | 12 |

1. はじめに

イオン交換クロマトグラフィーでは、DNAフラグメントは主に鎖長に基づいて分離されます。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、DNAフラグメントの分離にも細孔径が1,000 Å程度のイオン交換体が用いられてきました¹⁾。しかしながら、高分離能が得られるのは短鎖のDNAフラグメントのみであり、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くまた一般的に分析時間も長く、実用的ではありませんでした。

一方、最近では、細孔のない非多孔性型粒子を基材とした充填剤が開発され、それらがタンパク質やペプチドなどの生体高分子の分離に適していることが報告されています。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ます。したがって、非多孔性充填剤では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す。当社はこれまでに各種の分離モード用の非多孔性型充填剤を開発していますが²⁾⁻⁴⁾、このうち非多孔性型イオン交換体充填カラムTSKgel DEAE-NPRを用いることにより、タンパク質のみならず、オリゴヌクレオチド⁵⁾やDNAフラグメント⁶⁾に対しても短時間で良好な分離能が得られることを示しています。今回、当社は、従来の非多孔性型イオン交換体に改良を加え、広範囲のDNAフラグメントに対する分離能を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を開発しましたのでここに紹介します。

2. 特徴

(1) カラム仕様

TSKgel DNA-NPRは、粒子径2.5 μ 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す。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ます。表-1にカラム仕様を示します。カラムサイズは、内径4.6mm、長さ7.5cmです。また、分析カラム保護用のガードカラムがあります。

(2) TSKgel DEAE-NPRとの比較

図-1に、TSKgel DNA-NPR及びTSKgel DEAE-NPRを用いて市販の1 kb DNA ladderを分離したときのクロマトグラムを示します。図中の数字はアガロースゲル電気泳動にて確認した鎖長を示します。TSKgel DNA-NPRでは分離時間約13分で広範囲の鎖長のDNAフラグメントが良好に分離されており、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ります。また、この図から、DNAフラグメントの分離は主に鎖長に基づいているものの、塩基組成も影響していることがわかります。イオン交換クロマトグラフィーでは、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りも遅れて溶出することが報告されています¹⁾。

図-2に、これらのカラムを用いて λ ファージDNAのHindIII消化物を分離したときのクロマトグラムを示します。この試料には、約2,000~23,000bpのDNAフラグメントが含まれていますが、TSKgel DNA-NPRでは、このように長鎖のDNAフラグメントに対しても、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ます。

表-1 カラム仕様

| 品名 | 品番 | カラムサイズ | 保証理論段数/カラム |
|------------------------|-------|---------------|------------|
| TSKgel DNA-NPR | 18249 | 4.6mmID×7.5cm | 7,000 |
| TSKguardcolumn DNA-NPR | 18253 | 4.6mmID×5mm | — |

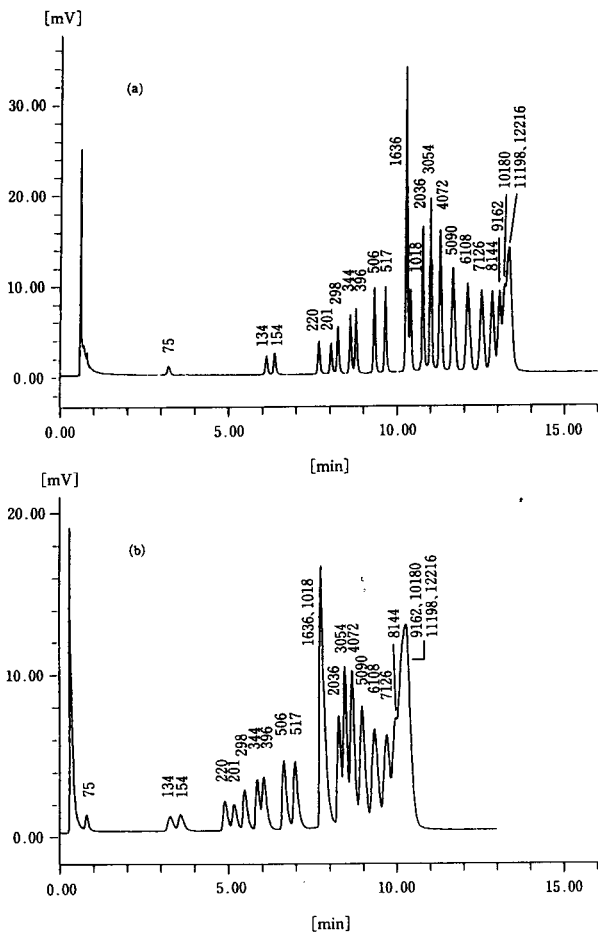


図-1 1 kb DNA ladderのクロマトグラム

カラム ; (a)TSKgel DNA-NPR (4.6mmID×7.5cm)

(b)TSKgel DEAE-NPR (4.6mmID×3.5cm)

溶離液 ; A : 0.5M NaClを含む20mMトリス-塩酸緩衝液 (pH9.0)

B : 1.0M NaClを含む同緩衝液 (pH9.0)

A/B=100/0→50/50

(20分間リニアグラジエント)

流 速 ; 0.75ml/min

温 度 ; 25℃

検 出 ; UV (260nm)、マイクロセル使用

試 料 ; 1 kb DNA ladder (2μg in 2μl)

(図中の数字は塩基対数を示す。)

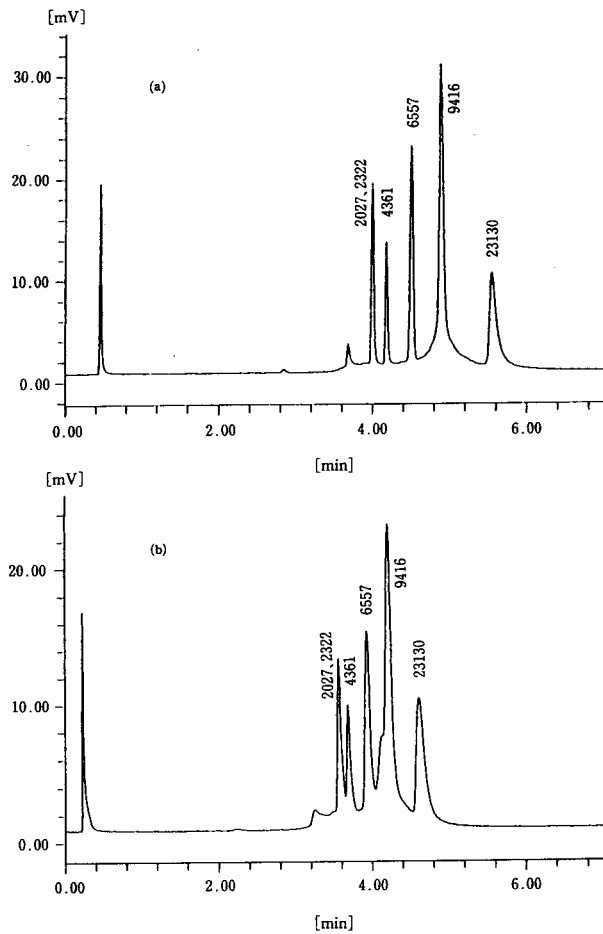


図-2 λファージDNAのHindIII消化物のクロマトグラム

カラム ; (a)TSKgel DNA-NPR (4.6mmID×7.5cm)

(b)TSKgel DEAE-NPR (4.6mmID×3.5cm)

溶離液 ; A : 0.5M NaClを含む20mMトリス-塩酸緩衝液 (pH9.0)

B : 1.0M NaClを含む同緩衝液 (pH9.0)

A/B=100/0→0/100

(10分間のリニアグラジエント)

流 速 ; 1.0 ml/min

温 度 ; 25℃

検 出 ; UV (260nm)、マイクロセル使用

試 料 ; λファージDNAのHindIII消化物 (1μg in 4μl)

3. 分離能に対するHPLCシステムの影響

高性能のカラムを使用する場合、その性能を十分に発揮するためにHPLCシステムを最適化する必要があります。TSKgel DNA-NPRは充填剤の高性能化により分離性能の向上を達成していますが、配管や検出器セルの容量が大きいと、カラム外での試料ピークの広がりが大きくなり、カラム自体の性能がそなわれます。

(1) 配管容量の影響

表-2に、分離能に対する配管容量の影響を示します。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ませんが、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ており、カラム出口側のデッドボリュームが分離能に影響していることがわかります。

(2) 検出器セルの影響

表-3に、分離能に対する検出器セルの影響を示します。検出器はUV-8020を用い、セルはマイクロセル、標準セル(ヒートシンク装着、標準仕様)、標準セルよりヒートシンクを除去したものを用いました。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%以下でした。一方、ヒートシンク付の標準セルでは配管によるデッドボリュームが大きいため、マイクロセルに比べて分離能は約30%低下しました。このように、TSKgel DNA-NPRを使用する場合にはデッドボリュームの小さいセルを用いる必要があります。ただし、セル容量が小さいと検出感度が低下するので(上記マイクロセルを用いた場合、標準セルの約1/3~1/2の感度)、微量試料の高感度分析にはセル入口側配管の容量をできるだけ小さくした(ヒートシンクを除いた)標準セルが適していると思われます。

表-2 分離能に対する配管容量の影響

| | 配管 | | | 分離能* | | |
|--------------------|--------|--------|--------------|-------------|-------------|---------------|
| | 内径(mm) | 長さ(cm) | 容量(μ l) | 134bp/154bp | 506bp/517bp | 5090bp/6108bp |
| インジェクター /カラム間** | 0.1 | 20 | 1.57 | 2.03 | 4.00 | 2.72 |
| | 0.1 | 40 | 3.14 | 2.02 (0) | 3.88(3) | 2.80 (0) |
| | 0.25 | 60 | 29.45 | 1.98 (2) | 3.98(2) | 2.53 (7) |
| カラム /検出器間*** | 0.1 | 20 | 1.57 | 2.01 (1) | 3.85 (4) | 2.64 (3) |
| | 0.1 | 40 | 3.14 | 1.95 (4) | 3.53(12) | 2.59 (5) |
| | 0.25 | 60 | 29.45 | 1.67(18) | 2.96(26) | 2.20(19) |

* ()内はインジェクター/カラム間0.1mmID×20cmのときの分離能に対する低下率。

**カラム/検出器間はマイクロセル入口側配管(0.1mmID×20cm、標準仕様)を直接接続した。

***インジェクター/カラム間は0.1mmID×20cmを用い、カラム/検出器間はオシネユニオン(0.35mmID)を用いて、セル入口側配管にそれぞれの配管を接続した。

試料: 1kb DNA ladder(2 μ g in 2 μ l)

分離条件: 図1と同じ

表-3 分離能に対する検出器セルの影響

| 検出器セル | セル容量 (μ l) | セル入口側配管 | | | 分離能* | | |
|----------------|--------------------|---------|--------|--------------|-------------|-------------|---------------|
| | | 内径(mm) | 長さ(cm) | 容量(μ l) | 134bp/154bp | 506bp/517bp | 5090bp/6108bp |
| マイクロセル | 2 | 0.1 | 20 | 1.57 | 1.93 | 3.51 | 2.30 |
| 標準セル(ヒートシンク除去) | 10 | 0.1 | 20 | 1.57 | 1.90 (2) | 3.24 (8) | 2.15 (7) |
| 標準セル(ヒートシンク除去) | 10 | 0.1 | 40 | 3.14 | 1.84 (5) | 3.21 (9) | 2.21 (4) |
| 標準セル(ヒートシンク装着) | 10 | 0.25 | 100 | 49.09** | 1.38(28) | 2.47(30) | 1.84(20) |

* ()内はマイクロセル使用時の分離能に対する低下率。

**ヒートシンクの容量を含む。

試料: 1kb DNA ladder(2 μ g in 2 μ l)

分離条件: 図1と同じ

(3) 検出器レスポンスの影響

表-4に、分離能に対する検出器レスポンス（応答速度）の影響を示します。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りますが、ピーク幅が広くなり、分離能が極端に低下します。したがって、TSKgel DNA-NPRの性能を十分に発揮するためにはレスポンスを速くすること（50msecに設定）が必要です。また、これにともないデータ処理装置のデータ取込間隔（サンプリングピッチ）も100msec以下に設定し速くする必要があります。

4. 分離能に対する分離条件の影響

(1) 流速の影響

図-3に、グラジエント時間一定下での分離能の流速依存性を示します。一般に、クラジエント時間が一定の場合、すなわち単位時間当りの塩濃度勾配が一定の場合、流速が速いほど高分離能が得られます。しかし、この図からわかるように、TSKgel DNA-NPRによるDNAフラグメントの分離においては鎖長によって高分離能を得るための最適流速があります。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、5,000bp以上のDNAフラグメントに対しては流速0.25~0.5ml/minで分離能は最大となりました。

図-4に、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示します。図より明らかなように鎖長が2,000bp以下のDNAフラグメントは流速の上昇ともない分離能は低下しました。一方、2,000bp以上の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りました。

(2) 塩濃度勾配の影響

図-5に、分離能に対する塩濃度勾配の影響を示します。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ます。しかしながら、この図からわかるように、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ます。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りました。

(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りました。また、45℃以上では分離能、回収率ともに極端に低下しました。図-6に、分離能に対する温度の影響を示します。分離能が最大となる温度は鎖長により異なり、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、300~2,000bpのDNAフラグメントに対しては35℃付近で分離能は最大となりました。

表-4 分離能に対する検出器レスポンスの影響

| レスポンス (sec) | 分離能* | | |
|----------------|-------------|-------------|---------------|
| | 134bp/154bp | 506bp/517bp | 5090bp/6108bp |
| 0.05 | 2.08 | 4.16 | 2.80 |
| 1 | 1.71(18) | 3.08(26) | 2.40(14) |
| 3 | 1.20(42) | 2.03(51) | 1.82(35) |

* ()内はレスポンス0.05secのときの分離能に対する低下率。

試料：1kb DNA ladder (2μg in 2μl)

分離条件：図1に同じ

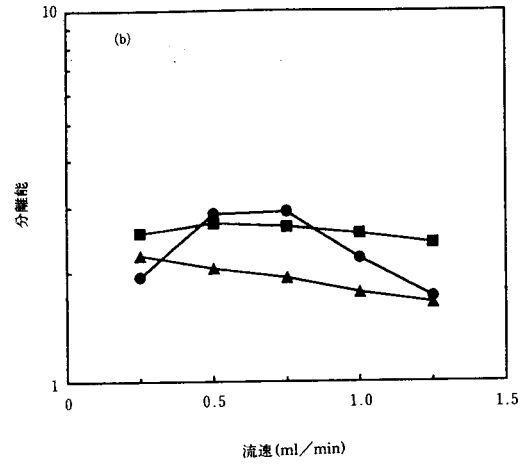
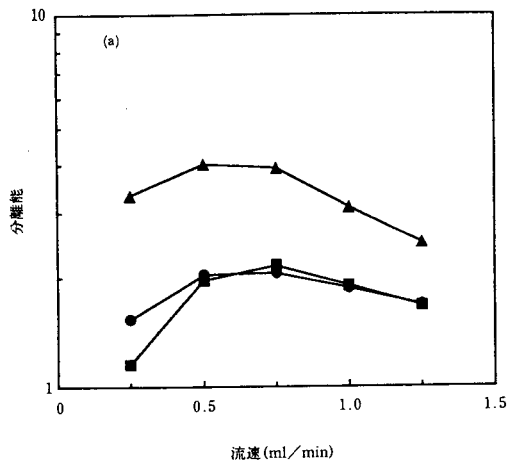


図-3 分離能の流速依存性(グラジエント時間一定)

試料; 1 kb DNA ladder (2 μ g in 2 μ l)

分離条件; 流速を除き図-1に同じ

流速; 0.25~1.25ml/min

(a)●: 134bp/154bp、■: 201bp/298bp、▲: 506bp/517bp

(b)●: 2036bp/3054bp、■: 5090bp/6108bp、▲: 7126bp/8144bp

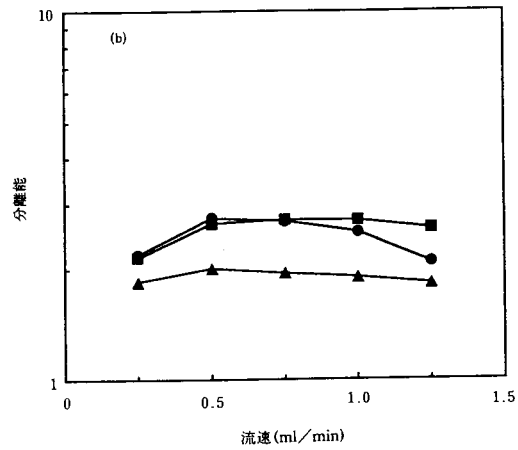
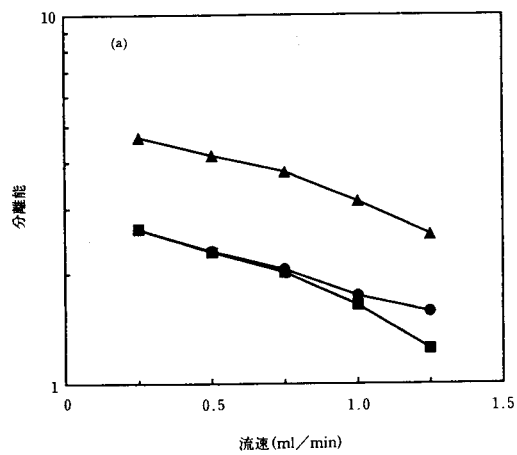


図-4 分離能の流速依存性(グラジエント容量一定)

試料; 1 kb DNA ladder (2 μ g in 2 μ l)

分離条件; 流速及びグラジエント時間を除き図-1に同じ

流速; 0.25~1.25ml/min

グラジエント時間: 60~12分

(グラジエント容量15mlとなるようにグラジエント時間を調節)

(a)●: 134bp/154bp、■: 201bp/298bp、▲: 506bp/517bp

(b)●: 2036bp/3054bp、■: 5090bp/6108bp、▲: 7126bp/8144bp

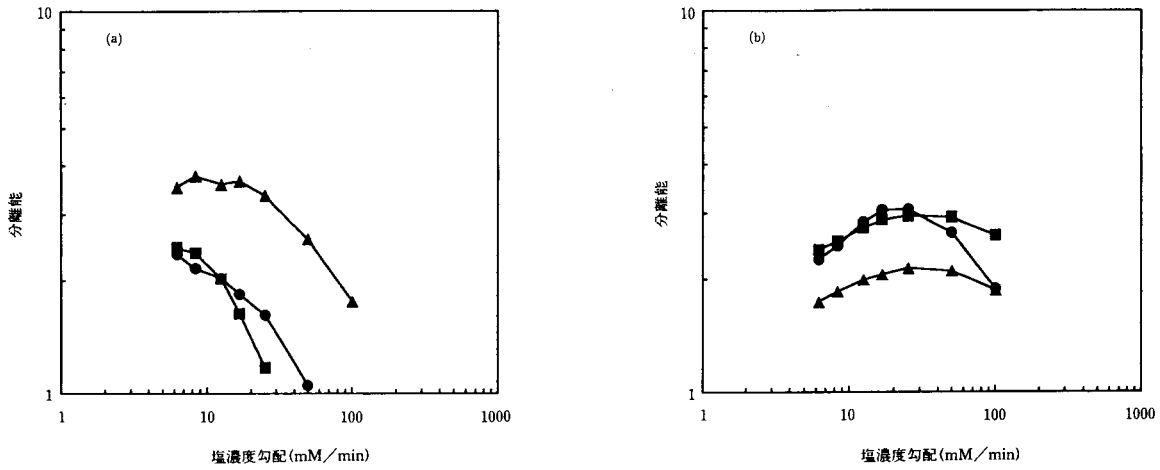


図-5 分離能の塩濃度勾配依存性

試料；1 kb DNA ladder (2 μ g in 2 μ l)

分離条件；グラジエント時間を除き図1と同じ

グラジエント時間；2.5~40分(塩濃度勾配：100~6.3mM/min)

(a)●：134bp/154bp、■：201bp/298bp、▲：506bp/517bp

(b)●：2036bp/3054bp、■：5090bp/6108bp、▲：7126bp/8144bp

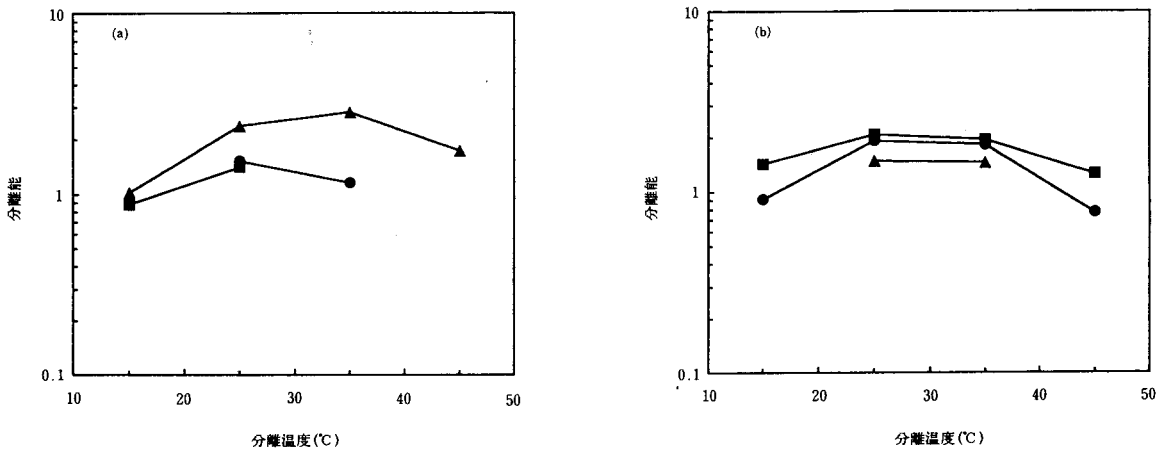


図-6 分離能の温度依存性

試料；1 kb DNA ladder (2 μ g in 2 μ l)

分離条件；分離温度を除き図1と同じ

分離温度；15~45°C

(a)●：134bp/154bp、■：201bp/298bp、▲：506bp/517bp

(b)●：2036bp/3054bp、■：5090bp/6108bp、▲：7126bp/8144bp

(4) 溶離液pHの影響

図-7に、pHの異なるトリス-塩酸緩衝液を用いて1 kb DNA ladderを分離したときのクロマトグラムを示します。pH 7~9の範囲ではpHの低下にともない溶出が遅くなりました。pH 8とpH 9では分離能はほとんど同等でしたが、pH 8以下では回収率が低下したため、pH 9付近が適当と思われます。なお、TSKgel DNA-NPRは親水性樹脂を基材としているため、化学的に安定であり、pH 2~12の範囲で使用できます。

(5) 試料負荷量

図-8に、分離能に対する試料負荷量の影響を示します。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、この図の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しています。この試料の場合、鎖長によって異なりますが、試料負荷量を約10 μg まで増加させても分離能はほとんど変化していません。このことより、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）によって異なりますが、数 μg ~数十 μg と考えられます。

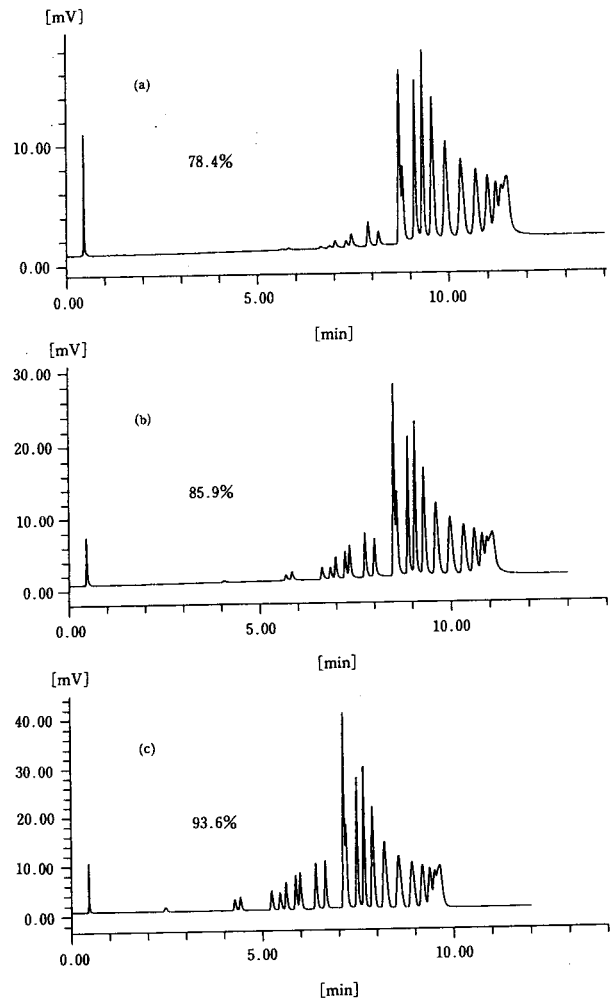


図-7 溶離液pHの影響

カラム；TSKgel DNA-NPR(4.6mmID×7.5cm)

溶離液；A：0.5M NaClを含む20mMトリス-塩酸緩衝液

B：1.0M NaClを含む同緩衝液

(a)pH7.0、(b)pH8.0、(c)pH9.0

A/B=100/0→50/50

(15分間リニアグラジエント)

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；UV(260nm)、マイクロセル使用

試料；1 kb DNA ladder(2 μg in 2 μl)

(図中の数字は回収率を示す。)

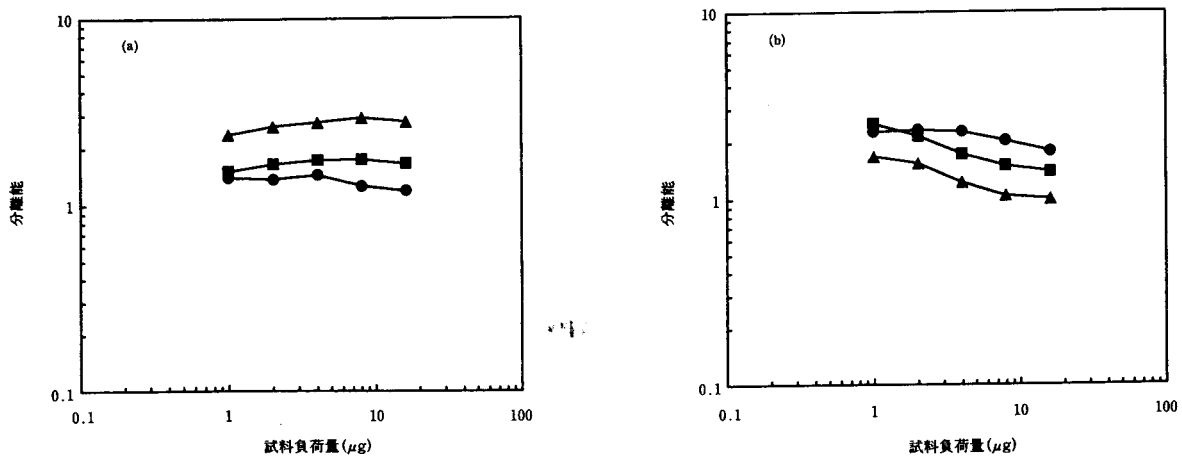


図-8 分離能の試料負荷量依存性

試料：1 kb DNA ladder

分離条件；試料負荷量を除き図1に同じ

試料負荷量；1～16 μg (1～16 μl)

(a)●：134bp/154bp、■：201bp/298bp、▲：506bp/517bp

(b)●：2036bp/3054bp、■：5090bp/6108bp、▲：7126bp/8144bp

5. 応用例

図-9に、プラスミドpBR322のHaeIII消化物のクロマトグラムを示します。この試料には、600bp以下の短鎖のDNAフラグメントが数多く含まれていますが、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されています。また、ここでは図-6で示したように分離温度を35℃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ました。

図-10及び図-11にPCR産物の分離を示します。図-10は、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です。PCR産物である290bpのDNAフラグメントは15.5分付近に溶出しています。ここではグラジエントの初期塩濃度を下げることにより、PCR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(ダイマーも含む)なども分離できました。

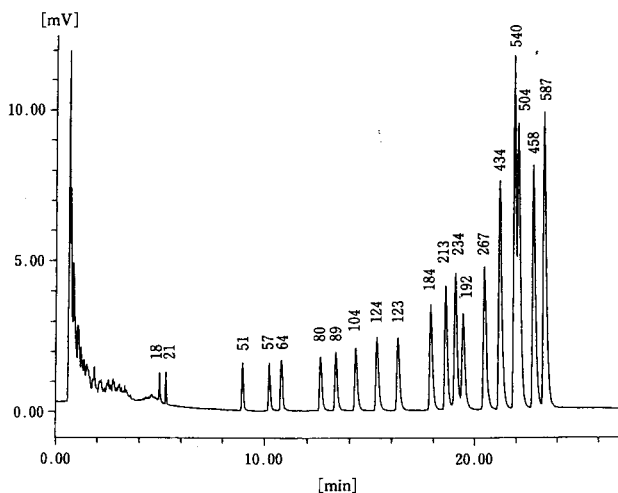


図-9 pBR322のHaeIII消化物のクロマトグラム

カラム；TSKgel DNA-NPR(4.6mmI.D.×7.5cm)

溶離液；A：トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)

B：1.0M NaClを含む同緩衝液(pH9.0)

A/B=75/25→55/45：0分→0.13分

55/45→50/50：0.13分→4分

50/50→0/100：4分→80分

(全てリニアグラジエント)

流速；0.75ml/min

温度；35℃

検出；UV(260nm)、マイクロセル使用

試料；pBR322のHaeIII消化物(2μg in 3μl)

(図中の数字は塩基対数を示す。)

図-11は、図-10のPCR産物のみをカラムに吸着させ、dNTPなどは、カラムから排除させるよう、初期溶離液の塩濃度を0.5MNaClに設定して分離したクロマトグラムです。図-10に比べ分析時間は、約10分と短くすることが可能です。また、この条件では、ほとんどのPCR産物を分析することが可能です。

図-12は、インターロイキン-1βのDNAのPCR産物のクロマトグラムです。この試料中には2種類のPCR産物が含まれていることが確認されていますが、分離時間10分でこれらが良好に分離されています。

図-13にPCR産物(精製物)の試料負荷量とピーク面積の関係を示します。試料にはB型肝炎ウイルスDNAのPCR産物(432bp)を用いました。試料負荷量とピーク面積の間には直線関係が認められ、数ng~数十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わかります。また、この試料を用いた場合の検出限界は3.8ng(S/N=3)であり、銀染色による検出を行った場合のゲル電気泳動法とほぼ同等の検出感度をHPLCにより得ることができました。

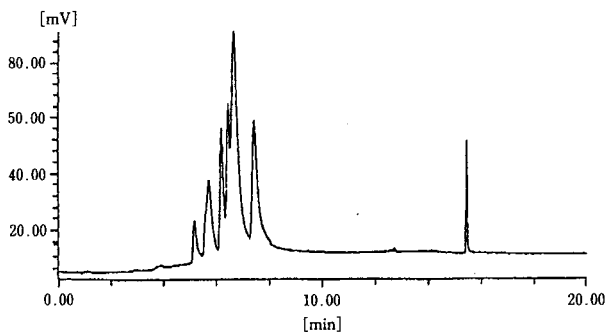


図-10 PCR産物の分離(1)

カラム；TSKgel DNA-NPR(4.6mmI.D.×7.5cm)

溶離液；A：20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)

B：1.0M NaClを含む同緩衝液(pH9.0)

A/B=100/0→0/100

(20分間リニアグラジエント)

流速；0.5ml/min

温度；25°C

検出；UV(260nm)

試料；HCV DNAのPCR産物(290bp)

標準セル使用(ヒートシンク除去)

入口側配管；0.1mmI.D.×40cm

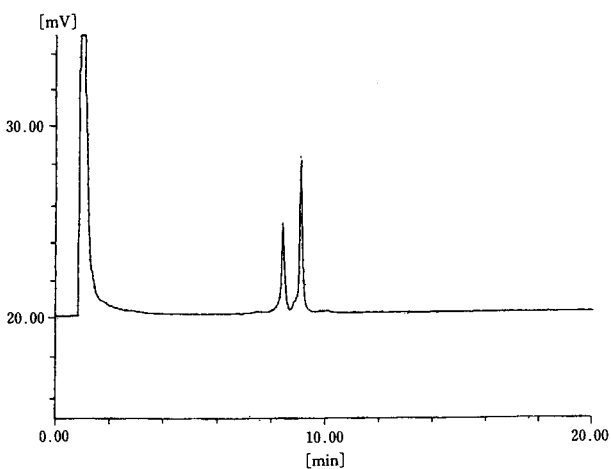


図-12 PCR産物の分離(2)

カラム；TSKgel DNA-NPR(4.6mmI.D.×7.5cm)

溶離液；A：20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)

B：1.0M NaClを含む同緩衝液(pH9.0)

A/B=50/50→25/75

(10分間リニアグラジエント)

流速；0.5ml/min

温度；25°C

検出；UV(260nm)

試料；IL-1β DNAのPCR産物(306bp)

標準セル使用(ヒートシンク除去)

入口側配管；0.1mmI.D.×40cm

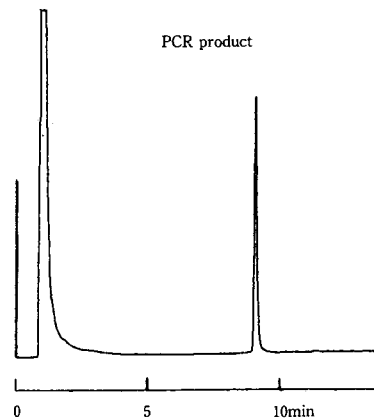


図-11 PCR産物の分離

カラム；TSKgel DNA-NPR(4.6mmI.D.×7.5cm)

溶離液；A：20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)

B：A+1M NaClを含む同緩衝液(pH9.0)

A/B=50/50→25/75

(10分間リニアグラジエント)

流速；0.5ml/min

温度；25°C

検出；UV(260nm)

試料；HCV DNA PCR product(290bp)(×20,2μl)

標準セル使用(ヒートシンク除去)

入口側配管；0.1mmI.D.×40cm

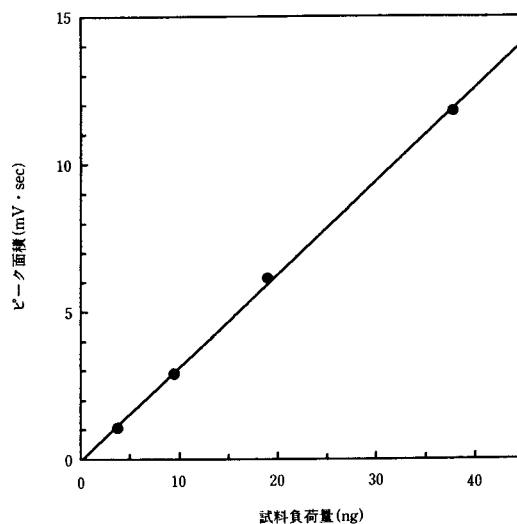


図-13 試料負荷量とピーク面積の関係

試料；HBV DNAのPCR産物(432bp)

1.89ng/μl、2~20μl

分離条件；図-11に同じ

図-14に1本鎖DNAの分離例として、ポリアデニル酸 (poly d(A)) の分離をTSKgel DEAE-NPRと比較して示します。図に示したように、TSKgel DNA-NPRでは1本鎖DNAが、約90塩基までは、ピークを確認することができます。

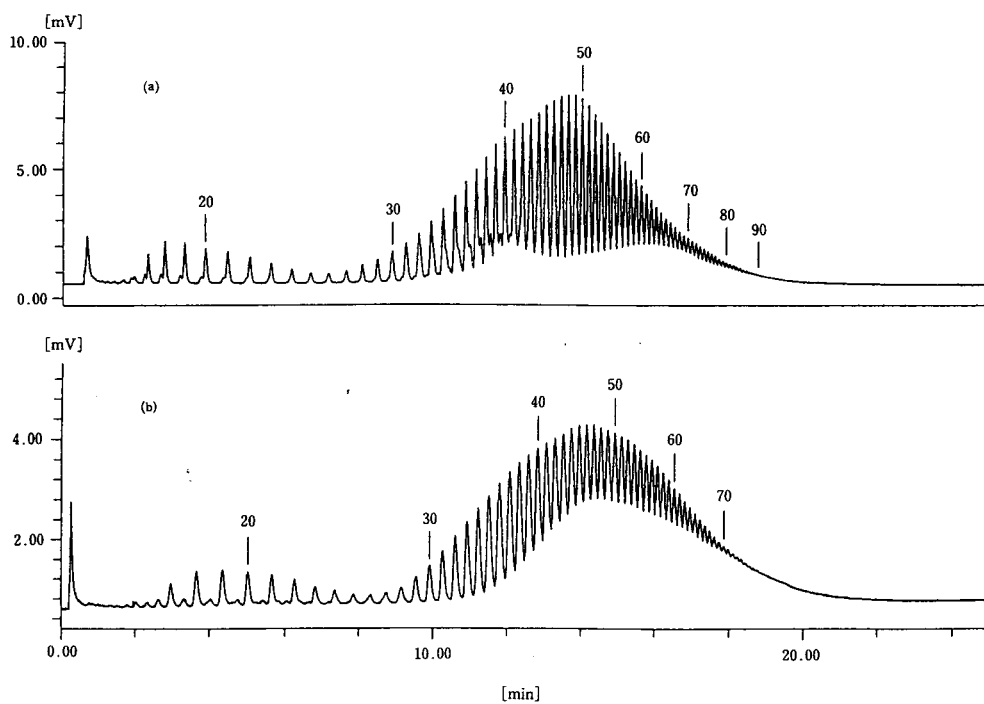


図-14 オリゴデオキシアデニル酸の分離

カラム；(a)TSKgel DNA-NPR(4.6mmI.D.×7.5cm)

(b)TSKgel DEAE-NPR(4.6mmI.D.×3.5cm)

試料；オリゴデオキシアデニル酸混合物

0.1AU(260nm), 10 μ l

溶離液；A：20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)

B：1.0M NaClを含む同緩衝液(pH9.0)

グラジエント；(a)A/B=70/30→32.5/67.5

(40分間リニアグラジエント)

(b)A/B=75/25→32.5/67.5

(40分間リニアグラジエント)

流速；(a)0.75ml/min, (b)1.0ml/min

温度；25 $^{\circ}$ C

検出；UV(260nm)

(図中の数字は鎖長を示す。)

6. 使用上の注意

(1) 溶離液

非多孔性型充填カラムは汚れに対して敏感です。充填剤表面への微量吸着成分の蓄積や微粒子による充填剤粒子間の目詰り等によりカラムの性能が低下すると再生が困難となります。したがって、溶離液に使用する水は超純水、HPLC用蒸留水、注射用蒸留水などを用い、試薬類はHPLCグレードまたは特級品を用いて下さい。また、溶離液は使用前にフィルター（0.22 μ mまたは0.45 μ m）でろ過して下さい。

(2) HPLCシステム

基本的には、汎用HPLCシステムが使用できます。ただし3.項に示したようにTSKgel DNA-NPRの性能を十分に発揮させるには、HPLCシステムに関して注意が必要です。表-5にその注意点を示します。

(3) 標準的分離条件

表-6に、TSKgel DNA-NPRによるDNAフラグメントの標準的な分離条件を示します。

7. おわりに

DNAフラグメントの分離にはこれまでゲル電気泳動法がおもに用いられてきました。HPLCはゲル電気泳動法と比較して、分離時間が短い、実験操作が簡単、定量性が高い、再現性がよい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ませんでした。しかしながら、ここに紹介しましたように、非多孔性型イオン交換体充填カラムTSKgel DNA-NPRにより、広範囲の鎖長のDNAフラグメントを短時間で高分離能で分離でき、今後はイオン交換クロマトグラフィーがDNA分析にも有効な手段となるものと思われま

表-5 HPLCシステムの注意点

| | |
|---------|--|
| 配管 | <ul style="list-style-type: none"> ・インジェクションバルブ(またはオートサンプラー)/カラム(またはガードカラム)間：内径0.1~0.25mmの配管が使用可能。長さは40cm以下が望ましい。 ・カラム/検出器間(=セル入口側配管)：内径0.1mmの配管が最適。長さは40cm以下が望ましい。 ・接液面(両末端)の加工精度が高いものを使用する。 ※内径0.1mmの配管としては、接続パイプセット・Lタイプ(品番18186、0.1mmID×40cm、オシネ、フェラル付、2組入)が適しています。接液面がファインカット仕上げになっています。 |
| グラジエント | <ul style="list-style-type: none"> ・高圧(吐出)グラジエント方式を用いる。 ・グラジエントミキサには、ダイナミックミキサ(品番08410)または、スタティックミキサ(A)(品番08407)を使用する。 |
| ガードカラム | <ul style="list-style-type: none"> ・カラム保護のため、ガードカラムを接続する。 ※ガードカラムには接続用配管(0.1mmID×5cm、オシネ、フェラル付)が標準付属品となっています。 |
| ラインフィルタ | <ul style="list-style-type: none"> ・溶離液中の微粒子がカラム内に進入することを防ぐため、ポンプとインジェクションバルブの間にラインフィルタ(フィルタアッセムブリ：品番14594、及び0.45μmフィルター：品番06280)を取り付けるのが望ましい。 |
| 検出器 | <ul style="list-style-type: none"> ・検出器セルはできるだけデッドボリュームの少ないものを使用する。 ・UV-8020：マイクロセル(品番17545：入口側配管は、0.1mmID×20cm) 標準セル(入口側配管をLタイプ配管に変更する。) ・UV-8010：ローデッドボリュームタイプ(品番16590) 標準セル(入口側配管をLタイプ配管に変更する。) ・レスポンス：50msecに設定する。 |
| データ処理 | <ul style="list-style-type: none"> ・サンプリングピッチ：50~100msecに設定する。 |

表-6 標準的分離条件

| | |
|----------|--|
| 流速 | <p>5,000bp以下：0.5~0.75ml/min 5,000bp以上：0.25~0.5ml/min</p> |
| NaCl濃度勾配 | <p>1,000bp以上：5~10mM/min 1,000~5,000bp：10~30mM/min 5,000bp以上：30~50mM/min</p> <p>(グラジエント時間は10~30分)</p> |
| 分析温度 | <p>300bp以下及び2,000bp以上：25℃付近 300~2,000bp以上：35℃付近</p> |
| 試料注入量 | <ul style="list-style-type: none"> ・分離能を低下させない最大試料負荷量：数μg~数十μg(1μl~20μl) (試料の純度(成分数)により異なる。) ・検出限界：数ng |
| 溶離液 | <ul style="list-style-type: none"> ・pH 9 付近のトリス-塩酸緩衝液とNaClの組み合わせで一般的には問題ない。ただし、pHが低いと回収率が低下する。 ・DNaseによるDNAフラグメントの分解を防ぐためには、1mM程度のEDTAを加える。この場合、分離能はほとんど変化しないが、EDTAのピークが分離の際、溶離液中の塩濃度が0.2MNaCl程度に溶出するので注意が必要。 ・塩としてNaClO₄を用いると、塩基組成の影響が小さくなるため、NaClとは選択性が異なる可能性がある。(ただし分離能は若干低下する) |
| 洗浄 | <ul style="list-style-type: none"> ・巨大DNA(1,000bp以上)は、カラムへの吸着が強いので、グラジエント終了後には、1MNaClを含む緩衝液で5分間程度洗浄するのが望ましい。 |

参考文献

- 1) Y.Kato, M.Sasaki, T.Hashimoto, T.Murotsu, S. Fukushige and K.matsubara, J.Chromatogr., **265**(1983), 342-346
- 2) Y.Kato, T.Kitamura, A.Mitsui and T.Hashimoto, J.Chromatogr., **398**(1987), 327-334
- 3) Y.Kato, T.Kitamura, S.Nakatani and T.Hashimoto, J.Chromatogr., **483**(1989), 401-405
- 4) Y.Kato, S.Nakatani, T.Kitamura, Y.Yamasaki and T.Hashimoto, J.Chromatogr., **502**(1990), 416-422
- 5) Y.Kato, T.Kitamura, A.Mitsui Y.Yamasaki, T. Hashimoto, T.Murotsu, S.Fukushige and K.Matsubara, J.Chromatogr., **447**(1988), 212-220
- 6) Y.Kato, Y.Yamsaki, A.Onaka, T.Kitamura, T. Hashimoto, T.Murotsu, S.Fukushige and K.Matsubara, J.Chromatogr., **478**(1989), 264-268

その他核酸関連技術資料

- 1) セパレーションレポートNo46 「TSK-GEL SW_{XL}シリーズについて
- 2) セパレーションレポートNo47「TSKgel G6000PWによるプラスミドの分離」
- 3) セパレーションレポートNo51「TSKgel Oligo-DNA RPによる核酸分離のための条件検討」
- 4) セパレーションレポートNo57「超高性能イオン交換クロマトグラフィ用充填カラム TSKgel DEAE-NPRによる核酸の分離(I)」
- 5) セパレーションレポートNo58「超高性能イオン交換クロマトグラフィ用充填カラム TSKgel DEAE-NPRによる核酸の分離(II)」
- 6) セパレーションレポートNo39「PCR産物(DNA)の分離」