

SECによる高分子化合物の分析

堀切 智

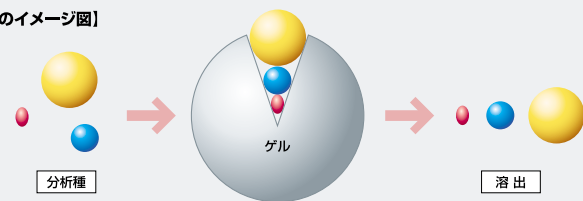
(野村化学株式会社)

はじめに

現在、バイオ医薬品普及の観点からモノクローナル抗体やDNA、RNAなどの分析法が重要視されるようになった。バイオ医薬品は、かぜ薬などのような低分子とは異なり、タンパク質や抗体が対象となる。そのため、分子量が高分子へとシフトするためワイドポアカラムが必要となる。分離モードはサイズ排除クロマトグラフィーやイオン交換、そして逆相など多くの手法が用いられる。

本研究ではサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を対象とした。SECは主にタンパク質や多糖類をはじめとする高分子化合物を対象とした分析法の一つである。溶出パターンは分子量の高い順となり、複数成分であっても個々の分子量が異なれば分離・同定において非常に簡便な方法である。これを応用して、複数のタンパク質を対象に分析を行ったので報告する。

【SECのイメージ図】

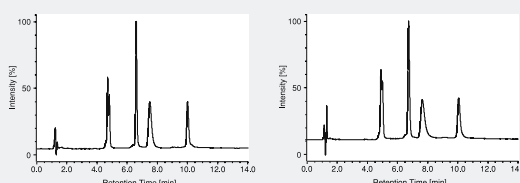


SECカラムと逆相の違い

	分離モード	バッファー	温度	溶出
SEC	サイズ排除	高濃度	室温～	アイソクラティック
逆相	疎水性相互作用	低濃度	高温	グラジエント

SECと逆相にはシステムや測定における条件が大きく異なる。SECではアイソクラティック溶出を基本としゆっくりと溶出させる傾向にあるが、逆相ではタンパク質の種類によって保持が大きく異なるため、グラジエント溶出に加え、温度・流速を上げるなどの工夫が必要となる。

逆相カラムによるタンパク質の分析例



Conditions;
 Column : **Develosil 300C8-HG-5**
Develosil 300C4-HG-5
 Mobile phase : A) Water + 0.05% TFA
 B) Acetonitrile + 0.05% TFA
 Flow rate : 1.5mL/min
 Temperature : 40°C
 Detection : UV214nm
 Sample : 1. Ribonuclease
 2. Cytochrome C
 3. HOLO-Transferrin
 4. Apomyoglobin
 Injection volume : 2.0μL

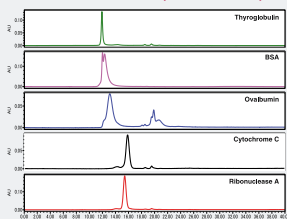
異なる細孔径および連結時におけるタンパク質のピーク形状

Develosil 100Diol-5(8.0x300)とDevelosil 300Diol-5(8.0x300mm)の比較において、細孔径の大きさに沿って保持・形状・分離が異なる。

	100Diol-5	300Diol-5	連結
チログロブリン	保持されない	やや保持される	やや保持される
BSA	ほぼ重なるピークを確認	メインピークの前に別ピークを確認	トリマー・ダイマーを認識
オボアルブミン	メインピーク以外のものと重なる	100Diolより分離する	大きく分離する
チトクロムC	メインピーク直前のピークを認識	他ピークが認識されないが保持する	保持、ピーク認識良好
リボヌクレアーゼ	他ピークとの分離良好	やや重なる	保持・分離良好

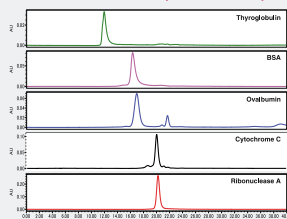
ターゲットが高分子に集中する際には、300Diol-5のみを連結させて分析することでより複雑ピークを認識すると考えられる。SECの場合、チトクロムCとリボヌクレアーゼのような分子量の近いもの同士の分析には不向きとなるが、連結本数を増やす、微粒子系充填剤を使用することで解決することができる可能性がある。

Develosil 100Diol-5(8.0x300mm)



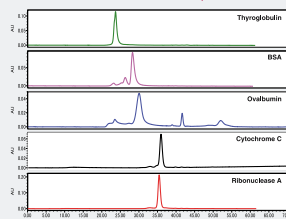
Conditions;
 Column : **Develosil 100Diol-5 (8.0x300mm)**
 Mobile phase : 150mM Sodium phosphate, pH7.0 +0.3M NaCl
 Flow rate : 0.5mL/min
 Temperature : Ambient
 Detection : UV220nm
 Sample : 1. Thyroglobulin (M.W.=670,000)
 2. BSA (M.W.=67,000)
 3. Ovalbumin (M.W.=45,000)
 4. Cytochrome C (M.W.=12,000)
 5. Ribonuclease A (M.W.=12,700)
 Injection volume : 10μL
 System : Waters alliance

Develosil 300Diol-5(8.0x300mm)



Conditions;
 Column : **Develosil 300Diol-5 (8.0x300mm)**
 Mobile phase : 150mM Sodium phosphate, pH7.0 +0.3M NaCl
 Flow rate : 0.5mL/min
 Temperature : Ambient
 Detection : UV220nm
 Sample : 1. Thyroglobulin (M.W.=670,000)
 2. BSA (M.W.=67,000)
 3. Ovalbumin (M.W.=45,000)
 4. Cytochrome C (M.W.=12,000)
 5. Ribonuclease A (M.W.=12,700)
 Injection volume : 10μL
 System : Waters alliance

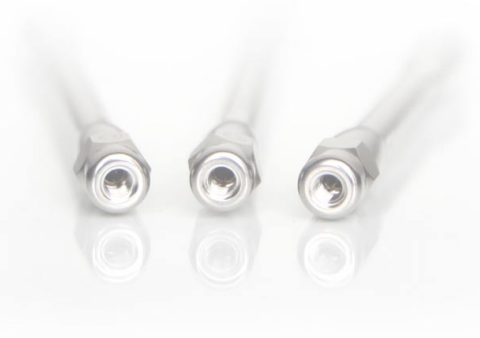
Develosil 300Diol-5 +100Diol-5(8.0x300mm x 2)



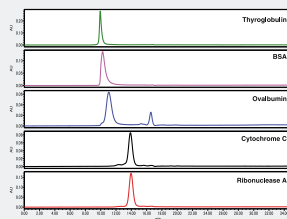
Conditions;
 Column : **Develosil 300Diol-5 +100Diol-5 (8.0x300mm)**
 Mobile phase : 150mM Sodium phosphate, pH7.0 +0.3M NaCl
 Flow rate : 0.5mL/min
 Temperature : Ambient
 Detection : UV220nm
 Sample : 1. Thyroglobulin (M.W.=670,000)
 2. BSA (M.W.=67,000)
 3. Ovalbumin (M.W.=45,000)
 4. Cytochrome C (M.W.=12,000)
 5. Ribonuclease A (M.W.=12,700)
 Injection volume : 10μL
 System : Waters alliance

微粒子系充填剤におけるピーク

本研究では100Diolおよび300Diolの3μm充填剤を調製し、これをタンパク質の分析に適用させた。粒子径を5μmから3μmへ変更することにより、さらなるシャープなピーク形状および分離の改善が期待できる。

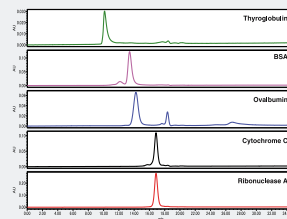


Develosil 100Diol-3(4.6x250mm)



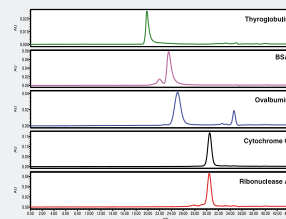
Conditions;
 Column : **Develosil 100Diol-3 (4.6x250mm)**
 Mobile phase : 150mM Sodium phosphate, pH7.0 +0.3M NaCl
 Flow rate : 0.17mL/min
 Temperature : Ambient
 Detection : UV220nm
 Sample : 1. Thyroglobulin (M.W.=670,000)
 2. BSA (M.W.=67,000)
 3. Ovalbumin (M.W.=45,000)
 4. Cytochrome C (M.W.=12,000)
 5. Ribonuclease A (M.W.=12,700)
 Injection volume : 3.3μL
 System : Waters alliance

Develosil 300Diol-3(4.6x250mm)



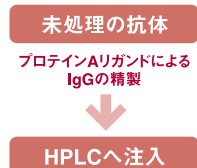
Conditions;
 Column : **Develosil 300Diol-3 (4.6x250mm)**
 Mobile phase : 150mM Sodium phosphate, pH7.0 +0.3M NaCl
 Flow rate : 0.17mL/min
 Temperature : Ambient
 Detection : UV220nm
 Sample : 1. Thyroglobulin (M.W.=670,000)
 2. BSA (M.W.=67,000)
 3. Ovalbumin (M.W.=45,000)
 4. Cytochrome C (M.W.=12,000)
 5. Ribonuclease A (M.W.=12,700)
 Injection volume : 3.3μL
 System : Waters alliance

Develosil 300Diol-3 +100Diol-3(4.6x250mm x 2)



Conditions;
 Column : **Develosil 300Diol-3 +100Diol-3 (4.6x250mm)**
 Mobile phase : 150mM Sodium phosphate, pH7.0 +0.3M NaCl
 Flow rate : 0.17mL/min
 Temperature : Ambient
 Detection : UV220nm
 Sample : 1. Thyroglobulin (M.W.=670,000)
 2. BSA (M.W.=67,000)
 3. Ovalbumin (M.W.=45,000)
 4. Cytochrome C (M.W.=12,000)
 5. Ribonuclease A (M.W.=12,700)
 Injection volume : 3.3μL
 System : Waters alliance

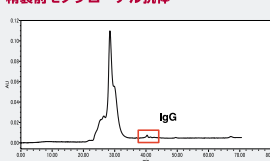
抗体からのIgG精製



■試薬: シグマアルドリッチ社製
 Monoclonal Anti-Goat/Sheep IgG_Peroxidase antibody produced in mouse (P/N: A9452)

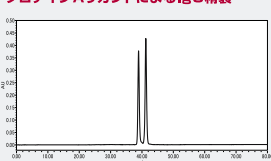
■IgG精製キット: 同仁化学社製
 IgG Purification Kit-A (P/N: AP01)

精製前モノクローナル抗体



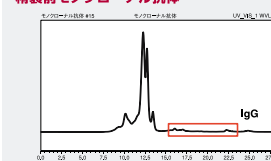
Conditions;
 Column : **300Diol-5 +100Diol-5(各8.0x300mm)**
 Mobile Phase : 150mM Na₂HPO₄pH7.0 +0.3M NaCl
 Flow rate : 0.5mL/min
 Temp. : Ambient
 Detection : UV220 nm
 Injection vol. : 10.0 μL
 Sample : mAB(2.2mg/mL)
 System : Waters alliance

プロテインAリガンドによるIgG精製



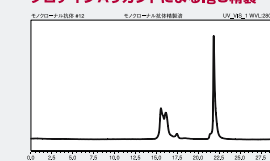
Conditions;
 Column : **300Diol-5 +100Diol-5(各8.0x300mm)**
 Mobile Phase : 150mM Na₂HPO₄pH7.0 +0.3M NaCl
 Flow rate : 0.5mL/min
 Temp. : Ambient
 Detection : UV220 nm
 Injection vol. : 10.0 μL
 Sample : Purified IgG
 System : Waters alliance

精製前モノクローナル抗体



Conditions;
 Column : **Thermo Fisher SCIENTIFIC MAbPac SEC-1 (4x300mm)**
 Column P/N : 074696
 Mobile Phase : 150mM Na₂HPO₄pH7.0 +0.3M NaCl
 Flow rate : 0.5mL/min
 Temp. : Ambient
 Detection : UV280 nm
 Injection vol. : 10.0 μL
 Sample : mAB(2.2mg/mL)
 System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish-H

プロテインAリガンドによるIgG精製



Conditions;
 Column : **Thermo Fisher SCIENTIFIC MAbPac SEC-1 (4x300mm)**
 Column P/N : 074696
 Mobile Phase : 150mM Na₂HPO₄pH7.0 +0.3M NaCl
 Flow rate : 0.5mL/min
 Temp. : Ambient
 Detection : UV280 nm
 Injection vol. : 10.0 μL
 Sample : Purified IgG
 System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish-H