

アジレントの弱陽イオン交換カラムを使用したタンパク質分離の最適化

アプリケーションノート

バイオ医薬品

著者

Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

概要

弱陽イオン交換固定相が含まれるカラムを正電荷を持つタンパク質の分離に使用すると、分離の改善に効力を発揮します。特に注目すべきは、移動相の溶離液の pH を調整することで得られる選択性の違いです。1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムに設置した Agilent バイオ WCX カラムと Agilent Buffer Advisor ソフトウェアを使用して対象となるパラメータを調べ、これらのパラメータを変化させることで対象化合物の分離能を最適化できる方法を確認します。

はじめに

タンパク質などの複雑な生体分子には、N および C 末端など、酸性および塩基性の側鎖官能基を持つ多くのアミノ酸が含まれます。これらの残基は、ほとんどの場合は強度が弱いため、分子の有効電荷は周囲環境の pH によって異なります。より一般的な強陽イオン交換吸着剤 (通常は、pH 2~12 の一般的な動作範囲で負の電荷を保持するスルホプロピル基を持つ) とは異なり、弱陽イオン交換カラムはカルボキシル基を持っています。したがって、中程度の pH (pH 4~6) ではイオン化のレベルが大きく変化し、イオン強度の影響も受けます (図 1)。



Agilent Technologies

WCX 滴定曲線
(高イオン強度)

WCX 滴定曲線
(低イオン強度)

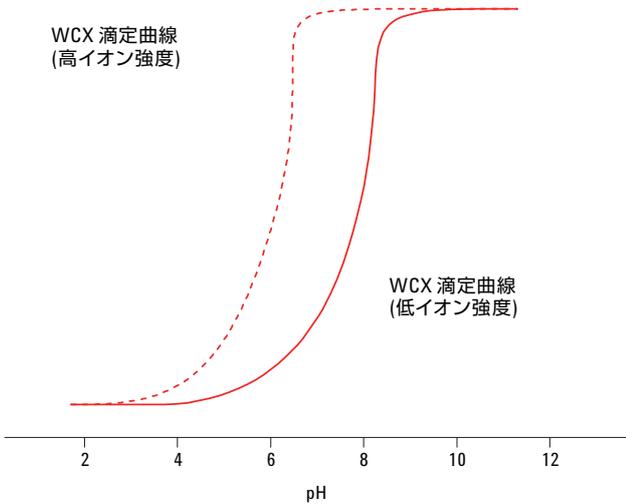


図 1. 弱陽イオン交換器の一般的な滴定曲線

これは、Agilent バイオ WCX およびバイオ MAb 製品シリーズを構成する、ポリマ機能層がグラフトされた強固で架橋率が高い非多孔質ポリスチレンビーズに特に当てはまります。

溶質分子を保持するためには、これらのビーズが正の有効電荷を持ち、吸着剤が負の有効電荷を持っている必要があります。したがって、弱陽イオン交換カラムの通常の動作範囲は、一般に pH 5.5~8.5 の (ただし、塩基性対象化合物ではこれよりも高くなる) 強陽イオン交換カラムと比べて非常に狭くなります。

ここでは、Agilent バイオ WCX カラムの性能と選択性を迅速かつ容易に最大限まで引き上げることのできるハードウェアおよびソフトウェアツールを使用して、タンパク質の分離能力を向上できること示しました。

材料および実験方法

Agilent バイオ IEX カラムには、機能性親水性ポリマ層がグラフトされた強固なポリマ系非多孔質粒子が充てんされています。この強固な粒子が、全多孔質粒子の拡散制限により生じるバンドの広がり効果を軽減することで、高い分離能と高い分離効率が提供されます。化学結合された親水性コーティングが非特異的な結合の効果を大幅に軽減し、高いレベルの回収率を実現します (図 2)。

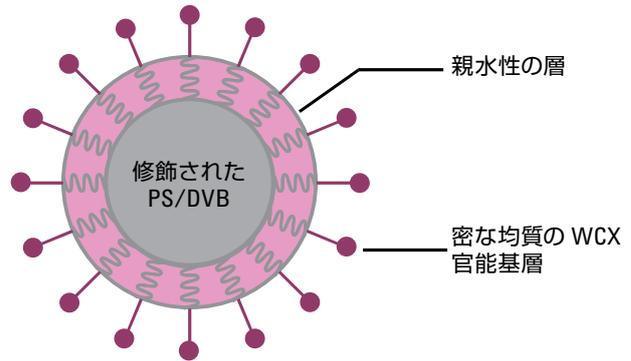


図 2. Agilent バイオ IEX の粒子の組成

Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC ポンプのクォータナリチャネル機能を使用し、二水素オルトリン酸ナトリウム溶液と水素オルトリン酸二ナトリウム溶液をさまざまな割合で混合して、既知のイオン強度と pH を持つ緩衝液の組成を調製しました。この方法は、 NaH_2PO_4 および Na_2HPO_4 の原液を使用して pH 5.8~8.0 のゼーレンセン緩衝液を調製するとき使用する一般的なラボ技術に類似しています (1969 年 Dawson らが言及)。

この工程を容易にするために、プロトタイプソフトウェアプログラムであるアジレントの Buffer Advisor を使用しました (図 3)。適切な緩衝液条件と原液の組成を入力する (または、ソフトウェアが提案する最適な原液と、必要な濃度を作成するための配合を使用する) と、クォータナリポンプで使用するために必要なグラジエントテーブルがソフトウェアによって計算されます。

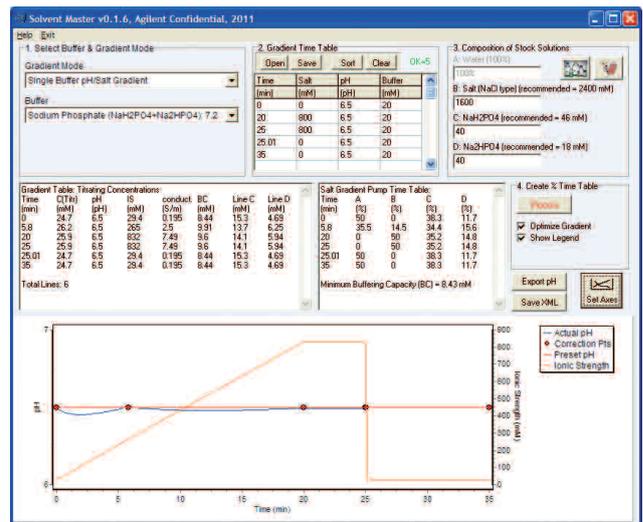


図 3. プロトタイプの Agilent Buffer Advisor ソフトウェアのスクリーンショット

条件

カラム	Agilent バイオ WCX、NP10、4.6 x 250 mm Agilent バイオ WCX、NP5、4.6 x 250 mm
移動相	A: 水 B: 1.6 M NaCl C: 40.0 mM NaH ₂ PO ₄ D: 40.0 mM Na ₂ HPO ₄ C および D を事前に指定された割合で混合することにより、希望の pH 範囲で 20 mM の緩衝液を生成しました。
グラジエント	0~50% B、0~20 分 50% B、20~25 分 0% B、25~35 分
流量	1.0 mL/min
温度	周囲温度
注入量	10 µL
サンプル	卵アルブミン、リボヌクレアーゼ A、 シトクローム c、リゾチーム
サンプル濃度	2 mg/mL (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液中、pH 6.0)
検出	UV、220 nm
機器	Agilent Infinity 1260 バイオイナートクォータナリ LC システム

結果と考察

標準塩グラジエント (0~800 mM、0~20 分) を使用し、pH 値の範囲 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 で 4 つの標準タンパク質のリテンションタイムを測定しました。この結果を図 4 にまとめます。これは、弱陽イオン交換カラムの代表的な結果です。タンパク質の溶出順序はその等電点 (pI) によって決まります。かなり低い pI (pI 4.5) を持つ卵アルブミンは、弱陽イオン交換カラムに保持されないという理由から選択しました。

この他に、リボヌクレアーゼ A (pI 9.6、Tanford & Hauenstein, 1956)、シトクローム c (pI 10.0~10.1、Barlow & Margoliash, 1966) およびリゾチーム (pI 11.0、MacRitchie & Alexander, 1963) を標準として選択しました。

4 つのタンパク質標準のリテンションタイムと分離能の両方に与える pH の影響は、図 5a および 5b のクロマトグラムにより明確に現れています。ただし、弱陽イオンカラムを使用して性能を最適化するには、移動相の pH とイオン強度の両方を考慮する必要があります。

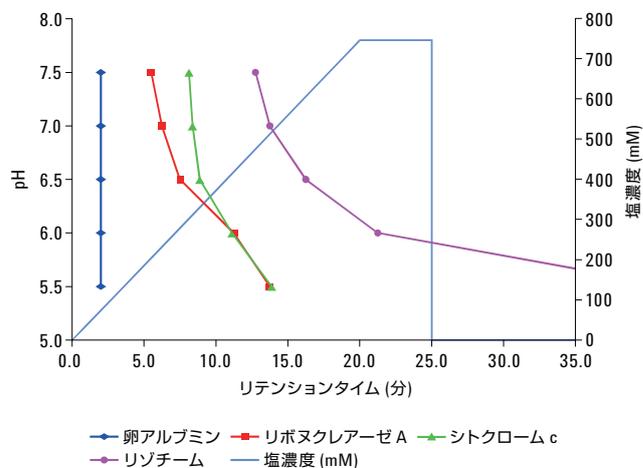


図 4. Agilent バイオ WCX 4.6 x 250 mm、10 µm カラムを使用したときのタンパク質標準のリテンションタイムに与える pH の影響

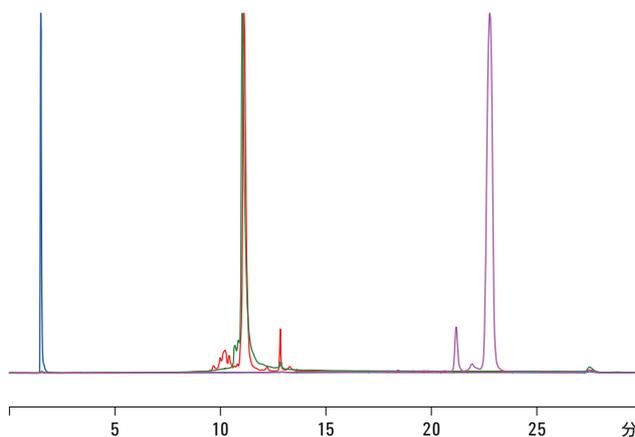


図 5a. Agilent バイオ WCX、NP10、4.6 x 250 mm カラムを使用した pH 6.0 におけるタンパク質標準の分離

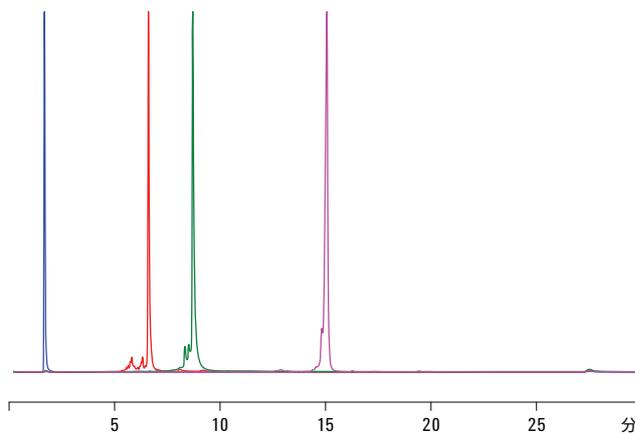


図 5b. Agilent バイオ WCX、NP10、4.6 x 250 mm カラムを使用した pH 7.0 におけるタンパク質標準の分離

図 6a、6b、および 6c に、直径 10 μm および 5 μm の粒子のわずかな違いを示します。全多孔質粒子とは異なり、拡散によって制限されるバンドの広がり、Agilent バイオ IEX 粒子の表面コーティングの厚みに取まれます。つまり、10 μm と 5 μm の粒子のリテンションタイムの違いは最小限です。

ただし、粒子サイズの違いはカラム効率と背圧に大きな影響を与えます。図 6c では、5 μm カラムのピーク応答が 10 μm カラムの倍になることを示しています。

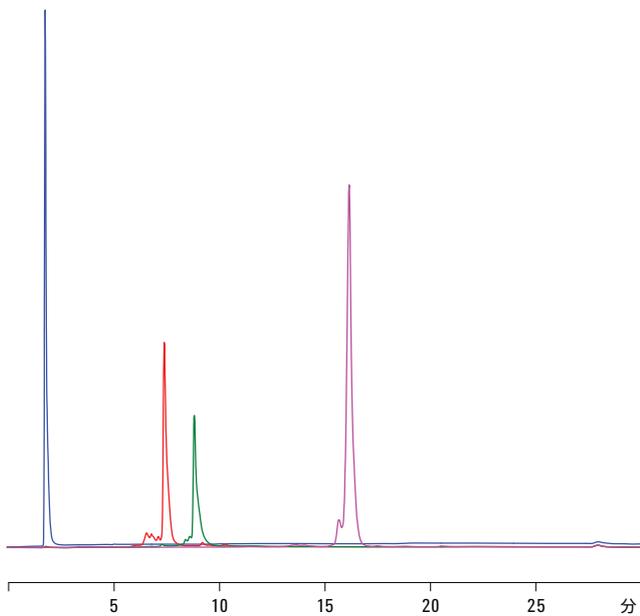


図 6a. Agilent バイオ WCX、NP10、4.6 x 250 mm カラムを使用した pH 6.5 におけるタンパク質標準の分離

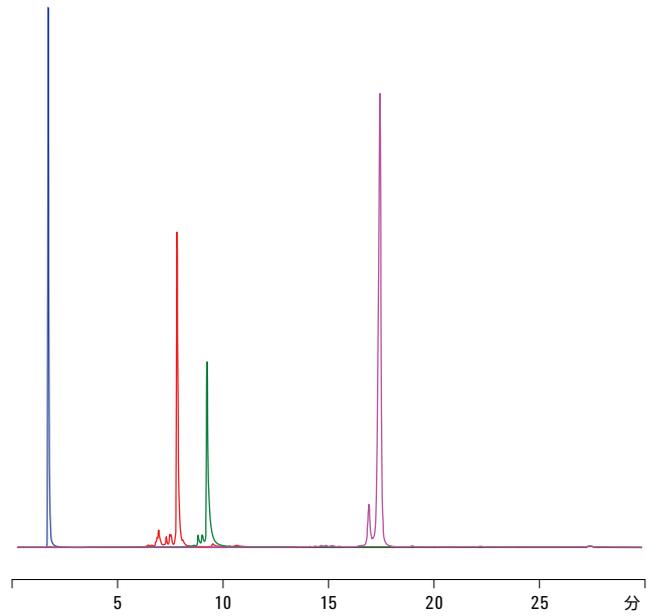


図 6b. Agilent バイオ WCX、NP5、4.6 x 250 mm カラムを使用した pH 6.5 におけるタンパク質標準の分離

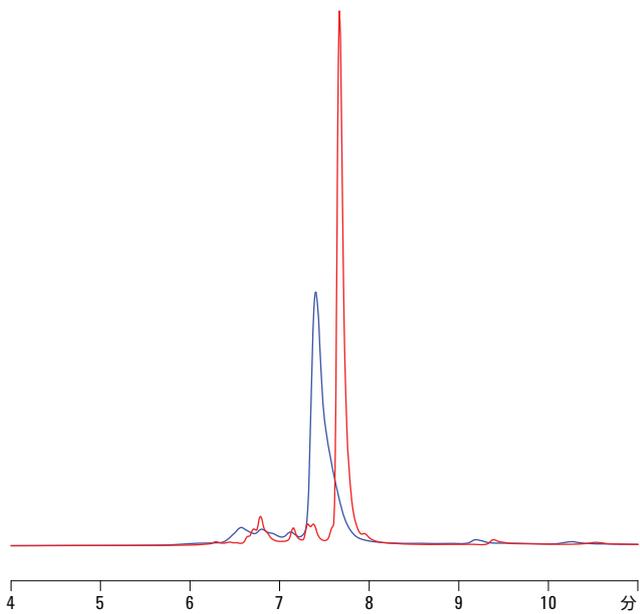


図 6c. Agilent バイオ WCX、NP10、4.6 x 250 mm カラム、pH 6.5 (青い線) と Agilent バイオ WCX、NP5、4.6 x 250 mm カラム、pH 6.5 (赤い線) のリボヌクレアーゼ A の重ね表示

結論

Agilent バイオ WCX カラムの使用時に、pH と緩衝液強度が、標準タンパク質のリテンションタイムと選択性に与える影響が明らかになりました。非多孔性粒子技術により、高性能の分離が可能になることが確認されました。今後の研究では、このような所見に基づいて、pH グランジエント分離を含む、抗体などの複雑な生体分子の分離を最適化する方法を明らかにする予定です。また、粒子サイズの小さい充てん剤を短いカラムに充てんすることにより、分析時間を大幅に短縮できることも証明していきます。

参考文献

1. Barlow, G. H.; Margoliash, E. *J. Biol. Chem.* 1966, 241, 1473-1477
2. Dawson, R. M. C.; Elliott, D. C.; Jones, K. M. *Data for Biochemical Research*; Oxford University Press: London 1969; pp. 483-500
3. MacRitchie, F.; Alexander, A. E. *J. Colloid Sci.* 1963, 18, 464-469
4. Tanford, C.; Hauenstein, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1956, 78, 5287-5291

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2011

Printed in Japan

December 22, 2011

5990-9628JAJP



Agilent Technologies