

MonoSpin C18を用いたペプチド・タンパク質の前処理 ～エタノール溶出で回収率UP～

生体中の重要な構成要素であるタンパク質は、疎水性の違いに基づいて分離を行うことができるため、同定・不純物の分析・定量などにHPLCが使用されます。生体試料を分析する際にはマトリクスの影響を軽減するために前処理による精製が必要となります。

精製の方法として、逆相またはイオン交換基を修飾した固相に吸着し、60%程度のアセトニトリルやメタノール含有溶媒または塩などで行うのが一般的です。しかし、タンパク質の分配の遅さ、担体への吸着の強さなど様々なファクターの影響により、高い回収率が得られない場合も多くあります。また、有機溶媒濃度を上げ過ぎるとタンパク質が変性し、回収率が著しく低下します。

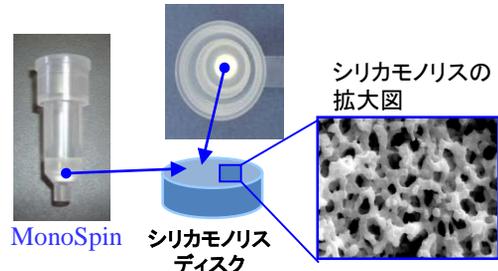
今回は、生体試料などの少量サンプルの扱いに便利なMonoSpinを用いた精製を行いました。精製過程で、有機溶媒の種類変更が溶出時の選択性や回収率が変わることが判りました。エタノールを用いた溶出で最も良い結果が得られましたので、ご紹介します。(Y.Yui, S.Ota)

MonoSpin とは？

MonoSpin シリーズは、均一な連続孔を持つシリカモリスを用いたスピナラムです。空隙率の高いシリカモリスを担体として用いているので、遠心操作だけで通液させることができます。そのため、短時間の簡便な操作で試料の精製・濃縮を行うことができます。また、ベッドボリュームが小さく液切れも良いので、試料量が少ない場合にも適しています。



操作は遠心法です。

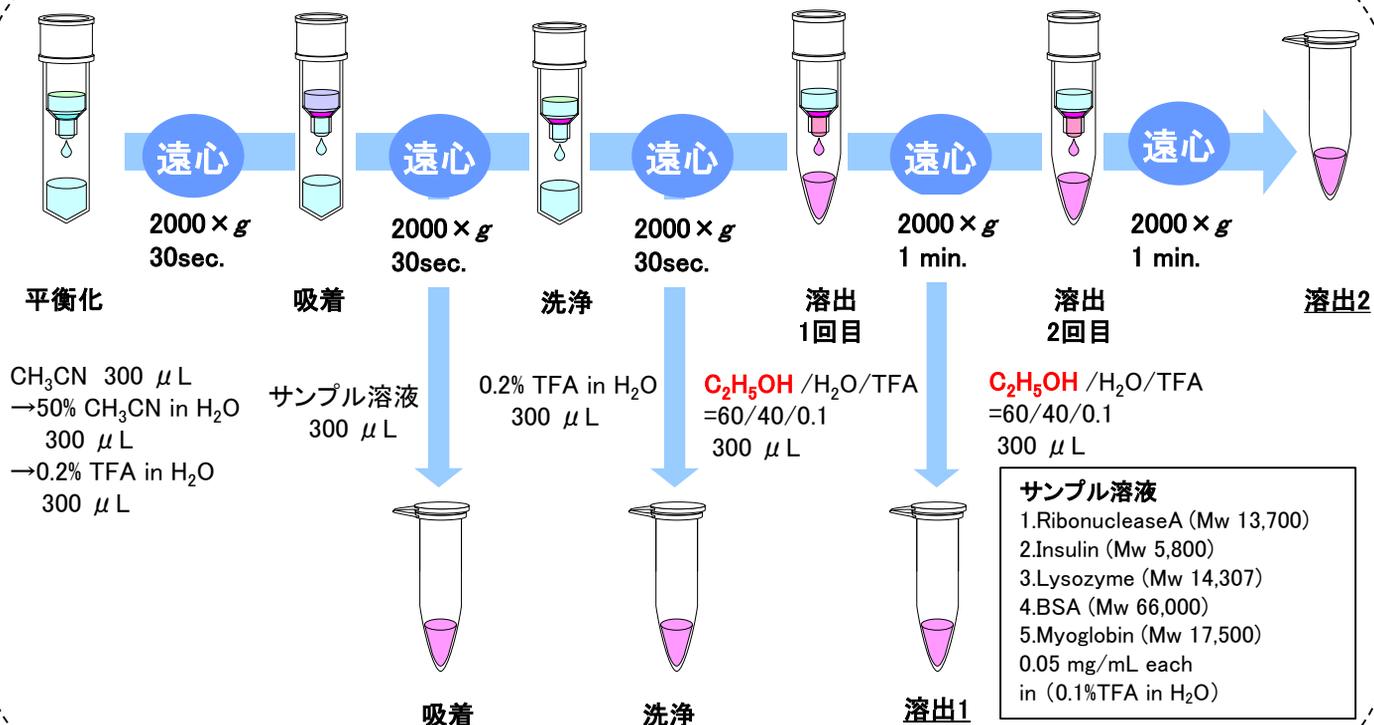


MonoSpin シリカモリスディスク

シリカモリスの拡大図

MonoSpin C18による精製手順

溶出にエタノールを使用しました。

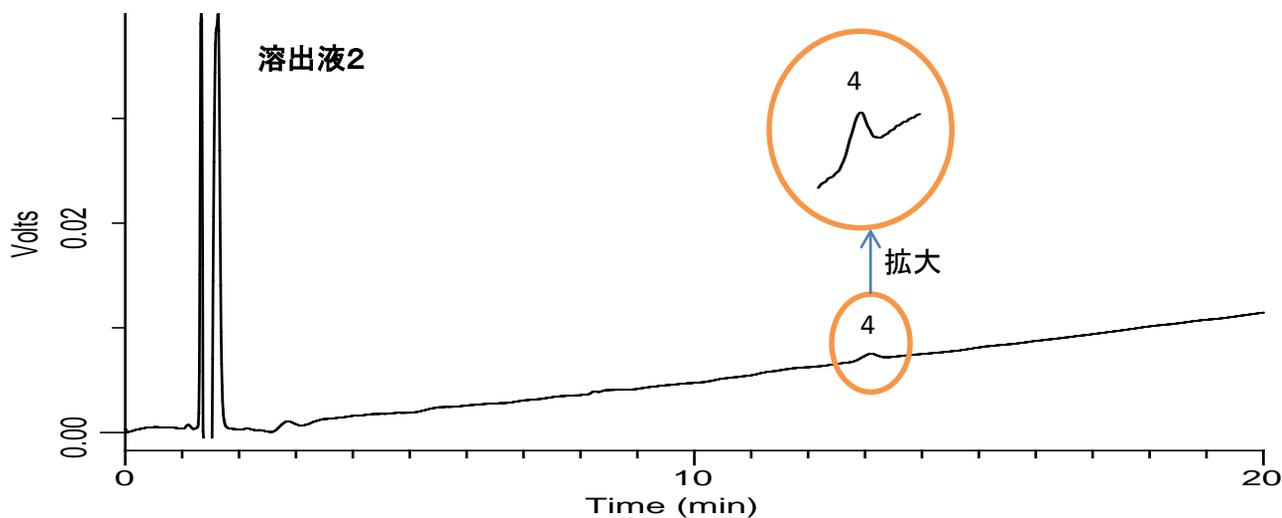
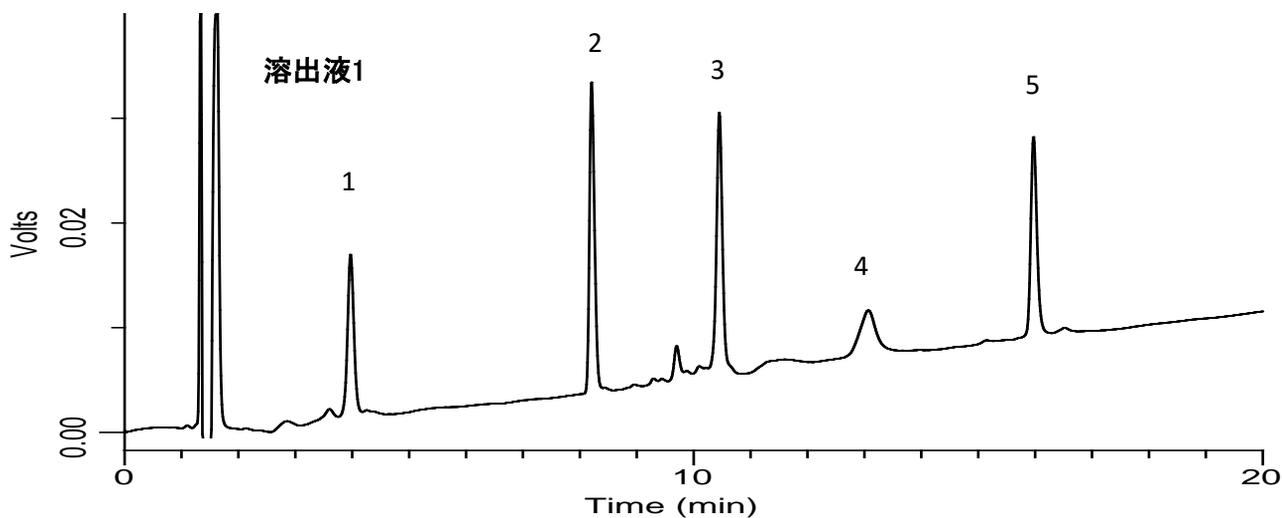
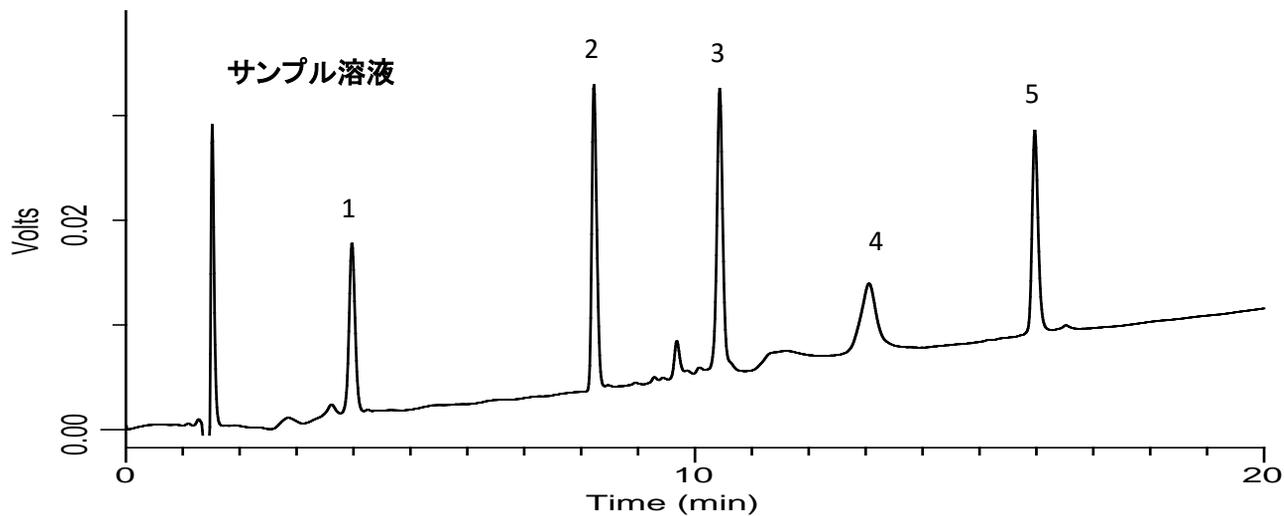


クロマトグラム

- 1. RibonucleaseA (Mw 13,700)
- 2. Insulin (Mw 5,800)
- 3. Lysozyme (Mw 14,307)
- 4. BSA (Mw 66,000)
- 5. Myoglobin (Mw 17,500)

Conditions

Column: InertSustainBio C18 (1.9 μ m, 100 \times 2.1mmI.D.)
 Eluent: A) 0.1 % TFA in H₂O
 B) 0.1 % TFA in CH₃CN
 A/B=72/28 - 20min - 45/55 - 0.1 min - 72/28 - 5 min
 Flow rate: 0.2 mL/min
 Col.Temp: 40 °C
 Detection: UV 220 nm
 Injection Vol: 2 μ L



回収率(%)

面積値による回収率(N=3)を算出しました。全体的に良好な回収率が得られました。BSAにおいては、2度の溶出によって回収率を上げることが可能ですが、吸着の工程で一部通過してしまうので、注意が必要です。

精製工程 成分名	回収率(%)			
	吸着	洗浄	溶出1	溶出2
RibonucleaseA	0	0	101.0	0
Insulin	0	0	104.9	0
Lysozyme	3.6	0	91.8	0
BSA	11.5	0	75.7	7.8
Myoglobin	0	0	99.9	0

また、アセトニトリルやメタノールを使用した溶出では、著しく回収率の悪い試料がありました。このように、使用溶媒により、回収率が大きく変わることもあります。現行メソッドで回収率が思わしくない場合、使用溶媒を変更することで、良い結果が得られる可能性があります。

アセトニトリル溶出

溶出1回目と2回目の工程でエタノールの代わりにアセトニトリルを使用しました。

精製工程 成分名	回収率(%)			
	吸着	洗浄	溶出1	溶出2
RibonucleaseA	0	0	12.8	8.4
Insulin	0	0	107.7	2.0
Lysozyme	2.5	0	93.8	8.5
BSA	9.7	0	60.9	6.3
Myoglobin	0	0	97.3	7.8

メタノール溶出

溶出1回目と2回目の工程でエタノールの代わりにメタノールを使用しました。

精製工程 成分名	回収率(%)			
	吸着	洗浄	溶出1	溶出2
RibonucleaseA	0	0	83.2	8.7
Insulin	0	0	94.8	0.9
Lysozyme	4.6	0	0	0
BSA	12.0	0	0	0
Myoglobin	0	0	0	1.3

使用製品



MonoSpin C18 Cat. No. 5010-21700 (50本)
Cat. No. 5010-21701 (100本)

※ 初期検討のためのトライアルキットもあります。

- MonoSpin カスタムキット 20: MonoSpinのラインアップから2種類各10本を組み合わせたことができるキットです。Trypsinは対象外です。(各10本入)
Cat. No. 5010-01001
- MonoSpin トライアルキット1: 農薬分析に最適です。(C18, SCX, SAX, TiO 各10本入)
Cat. No. 5010-21740
- MonoSpin トライアルキット2: 糖鎖や親水性化合物分析に最適です。(C18, Amide, CBA, NH2 各10本入)
Cat. No. 5010-21741
- MonoSpin トライアルキット3: イオン性化合物の分析に最適です。(SCX, SAX, CBA, NH2 各10本入)
Cat. No. 5010-21742

HPLC・LC/MSカラム

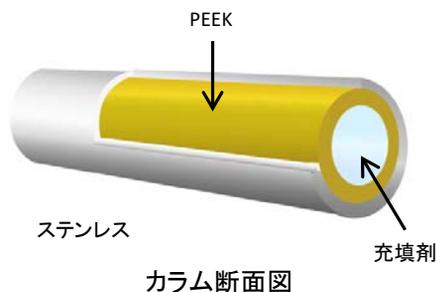
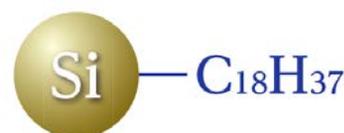
InertSustainBio C18

ペプチド・タンパク質の分析に最適なカラムです。



特長

- ・ 低分子～高分子化合物(数万程度まで)の分析に最適
- ・ リン酸基を持つような化合物の分析にも推奨
- ・ 高耐圧PEEK製ジャケットを採用



ジーエルサイエンスでは、分析ノウハウときめこまやかなフォローもお付けしたシステム提案を行っております。お近くの営業所やカスタマーサポートセンターまでお気軽にお問い合わせください。

データに起因し、直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しましても、当社が責任を負うものではありません。また、記載事項につきましては、予告無しに改訂する場合がありますので、あらかじめご了承ください。



ジーエルサイエンス株式会社

〒163-1130 東京都新宿区西新宿 6-22-1 新宿スクエアタワー 30F
TEL.03-5323-6611 FAX.03-5323-6622

※各試験法は、変更される場合がありますので、分析の前に確認されることをお勧めします。

データに起因し、直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しましても、当社が責任をおうものではありません。また、記載事項につきましては、予告無しに改訂する場合がありますので、あらかじめご了承ください。

カスタマーサポートセンターでは、ノウハウのご提供と分析に関するフォローを行なっております。お困りの際には、カスタマーサポートセンターまでお気軽にお問い合わせください。

カスタマーサポートセンター (土・日・祝除く 9:00-17:00)

☎ 04-2934-1100 ✉ info@glsc.co.jp



【アプリケーションの検索はこちら】

https://www.glsc.co.jp/technique/app/app_search.html