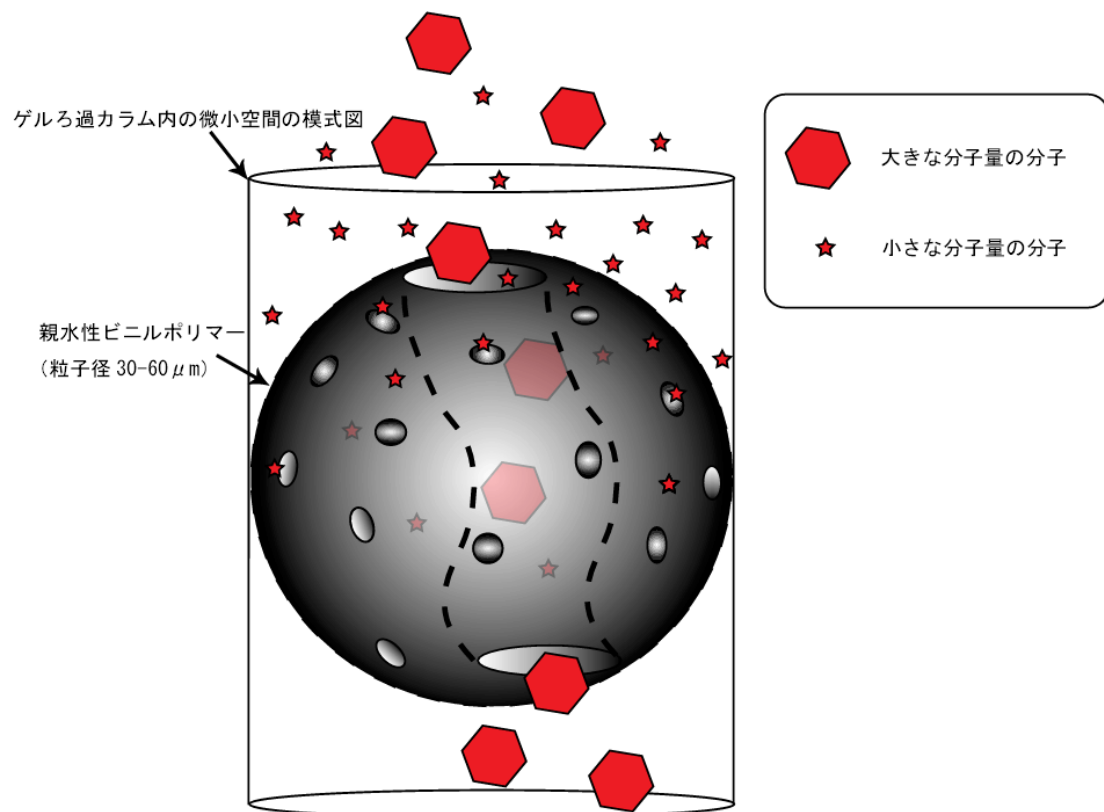


生物科学実験 I

低圧ゲルろ過カラムによる カラムクロマトグラフィーの理論と実践



2009 年 4 月 22 日～2009 年 5 月 14 日

目次

1. 実習目的
2. 注意点
3. 各班のデータは全員のもの
4. 採点法
5. 提出レポートの内容
6. 実習日程
7. 班分け
8. 組み立てるカラムの説明
9. 各班にお配りしたカラム工作部品のチェック表
10. サンプル(Ⅰ.カラムチェック用、Ⅱ.実習本番用)
11. カラム工作、サンプルのアプライ、フラクションの回収
などの説明
12. 今回の分子篩（ふるいにかける、のふるい）クロマトグ
ラフィーに用いたレジンの説明
13. クロマトグラフィーにおける分離能力の評価法
14. データを共有するための作業について

低圧ゲルろ過カラムによるカラムクロマトグラフィーの 理論と実践

担当教員： 塚田 幸治（旧 進化生命システム学）
小野 比佐好（生物資源工学）
馬場 健史（生物資源工学）

Teaching Assistant: 中山 泰宗、小林 志寿、
松原 惇起、古賀 祐介

1. 実習目的

生物を理解するためには、形態と分類学・生態学・遺伝子解析と遺伝学・系統樹・遺伝子発現調節システムの解析・成分分析・生体高分子（タンパク質）の機能解析・生体内代謝系の解析・生体分子間相互作用や情報伝達システムの解析・生体シミュレーション解析・生物学的モデルシステム（人工）に見出される特性の抽出、などさまざまな切り口があり、そのどれもが興味深くて多くの意義深い発見ができると期待されます。本実習では生物の仕組みや成り立ちを知るために古くから用いられている技術でありながら、応用範囲が非常に広く、特に有機化学・生化学的な分析手法として今でも多くの分析技術の基礎となっているカラムクロマトグラフィー法を体験していただきます。

具体的には、タンパク質やその他の物質をその分子量で分離するゲルクロマトグラフィーを選択しています。この実習のユニークな点は、必ずしも全員が上手くいくとは限らない、ということです。なぜなら、みなさんが自分たちの実習で用いる分離装置（カラム）を実際に組み立てるわけですから、上手に出来ていない場合はその後の実習にも影響します。普段、研究者はこのような状況の中で日々研究をしていますので、皆さんもこの実習期間で体験していただきたいと思います。失敗したとしても「うまくやらないと研究は失敗する」という重要な教訓を学ぶことができるわけです。自分で作製した装置の出来具合を他の班の装置と比較したり、実際に自作の分離装置を用いてタンパク質の分子量推定を行ったりしてクロマトグラフィー法の特性を理解しましょう。皆さんの作製するカラムが上手く出来るよう祈っております（スタッフ一同）。

2. 注意点

実験中はさまざまな危険が身の回りにあります。普段の生活態度よりも手足の動作を注意深くする必要があります。いつも周囲に気を配ることで、思わぬ事故や怪

我を防ぎましょう。ガラス器具は当然割れやすいし、割れれば手足や目を怪我する危険があります。金属でできた器具は重いものであれば、足に落とすと骨折の恐れもあり、落とさなくても不注意でガラス器具を破損させるかもしれません。すべての器具に何らかの危険が隠れていますので、その危険を事前に察知する能力を持たなければ、将来研究を続けていくことが出来なくなる可能性が高いことを認識してください。それから、**実習室内は飲食厳禁**です。

3. 各班のデータは全員のもの

研究成果として分析実験の結果を提示する場合は、科学的に説得力のある（たまたま得られたデータそのままではなく、誰がいつ再現実験を行っても得られるデータの範囲とともに示す）ことが求められます。カラムクロマトグラフィーでは、横軸に時間や溶出体積、縦軸に観測値（UV 吸収の度合いや濃度など）をプロットしたグラフ（クロマトグラム）を作成します。一般的に、クロマトグラムは典型的な 1 つを提示すればよいのですが、クロマトグラフィー法の結果から得られたデータ（回収率、推定分子量、各分子の混合比など）を示す場合には、分離実験自体を複数回行うことが求められます。本実習では、その時間はありません。しかし、他のすべての班のデータも共有することで複数回の分離実験が行われたのと同じことになります。

4. 採点法

出席点 60%、レポート 40%

一つでもレポートを提出していない場合は、「不可」とする。

出欠は 13 時 00 分に実習が始まってすぐに調べます。毎日実習開始から実習内容に関するこまかな説明があり、この解説はその日の実習にとって大事なものですので遅刻しないようにしてください。遅刻の場合は出席点が減点されます。

5. 提出レポートの内容

本年度から実習内容が大きく変わったため、皆さんが提出するレポートにはお手本となるような先輩のレポートは存在しません。従って、以下に列挙します要素を全てそろえたレポートを各自が作成してください。ただし、班に分かれた実習ですので、全ての主な測定データは班員みんなで共有してください。主なデータは実習中に適宜ホワイトボードに記入してもらいます。

- ◇ （背景・目的）実習の背景の勉強と理解度をアピールしてください
- ◇ 実験方法の多くは「テキスト参照」とし、詳細に書く必要はない
- ◇ （結果 1）自分の班で工作したカラムの性能を示す主要データの表

- ✧ (結果2) **自分の班**のテストサンプルの分離状況 (グラフ)
- ✧ (結果3) **自分の班**の本サンプルの分離状況 (グラフ) とサンプルに含まれていたタンパク質の推定分子量
- ✧ (結果4) **全 12 班**の分離結果から、他の班のデータ (シトクロム c とヘモグロビンのデータを基にブルーデキストラン、それぞれ混合されていたタンパク質、フェリシアン化カリウム (グルコース) の分離状況) をまとめた図 (6 ページの図を参照) を作成し、サンプルに混ぜられていたタンパク質の特徴や分離実験の結果から分子量を推定してみる。測定誤差にも言及すること。
- ✧ (考察) 自分の班の作製したカラムの性能を他の班のカラムと比較し評価する、どのように工夫したらカラムの性能をより高く発揮できるであろうか、一般にタンパク質の分子量をより正確に求めたい場合にはどうすればよいか、などについて考察する。

6. 実習日程

4 月 22 日 : 実習の流れと全体像の解説 およびカラムの工作

充填のためのロート取り付けまで。水漏れの無いように。

P10 の 1 コマ目の作業。おおよそ 15 時あたりまでには終わる。

4 月 23 日 : カラムの完成と平衡化の開始

前日に組んだカラムに、およそ 50 cm までレジンを充填する。

出来上がったカラムの流速をチェックする。十分な流速を確保。

移動相を一晩中流しておきカラムを平衡化する。

4 月 24 日 : テストサンプルの分離実験、[解説] 酵素反応速度論

カラムに変化がないか目視で確認し、流速を再度確認する。

その後、チェックサンプルを流し始める。これはカラムの出来具合をチェックする意味もあります。サンプルのアプライ前にも流速を測定します。(もしここで異常が見つかった場合は TA が作製したカラムを使用していただきます。ただし、希望者には GW 明けにカラム工作を再挑戦できる時間があります。)

溶出には 3 時間以上かかるので、分離が済むまでの間に酵素反応速度論の基礎を解説します。途中退出は原則禁止。この分離が終了するまでにおおよそ 18 時あたりまで覚悟してください。フラクションは蒸発が激しくないように丁寧にラップをして

低温室に保管する。

4月27日：カラムチェック用サンプルの各フラクションの分析

ブルーデキストランの溶出位置：ゲル粒子外の溶液の体積 V_0
フェリシアン化カリウムの位置：グルコースの溶出位置を推定するとともに、ゲル粒子内に含まれている溶液量も含めたカラム容積 V_i の目安とする。測定が終わったフラクション試験管を次の実習に使えるように水洗しておく。実験台の上で乾燥。

4月28日：予備日

5月8日：実習本番用サンプルの分離実験。[解説] 分離理論と理論段数

最初に流速チェック。GW 前と変わらなければ OK。今度はタンパク質とグルコースも混合されたサンプルを分離する。これも溶出には3時間かかる。溶出している間に TA から理論段数の解説をします。おおよそ18時当たりまで覚悟してください。フラクションは蒸発が激しくないように丁寧にラップをして低温室に保管する。

5月11日：各フラクションの分析。

620 nm の吸光度を測定し、デキストランの溶出位置を決める。続けて 410 nm の吸光度を測定し、ヘム関連タンパク質のヘモグロビン、シトクロム c の溶出位置 V_e を決める（クロマトグラムの作成）。また、カラムチェックサンプルの分離実験でフェリシアン化カリウムが溶出していた
あたりのフラクションにグルコースが溶出していると考える。

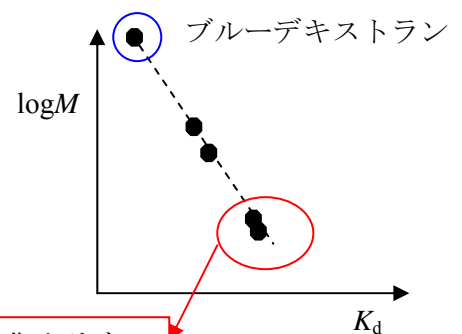
$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i} \quad (1)$$

K_d と $\log M_r$ との関係をプロットし、ゲルクロマトグラフィーの特性を示すグラフを作成する（右図）。そして、分析用サンプルに含まれていたタンパク質の分子量を推定し、ヘモグロビンかシトクロム c かを決定。

(1)式の V_0 , V_i は

4月27日の実習内容参照。

フェリシアン化カリウム
またはグルコース



5 月 12 日：各フラクションの分析の続き。カラム工作再挑戦の予備日。
カラムの分解、レジンの回収。後片付け。この日で、実習に用
いた器具はほとんどすべて撤収させる。

5 月 13 日：実習室に集合し、班員で実習結果について討論。
TA などに疑問点を訊く。他班と結果を交換し、分離結果を共有
する。これを元に、レポートの準備をおこなう。カラムを用い
た分離実験の結果を全員で共有する作業日。

5 月 14 日：総合討論会。
各班の作製したカラムのうち、もっともできのよいカラムは？
またもっともうまく出来ていないカラムはどれか？
その根拠はなにか。性能の悪いカラムを改善する作戦は？

7. 班分け

班番号						
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						

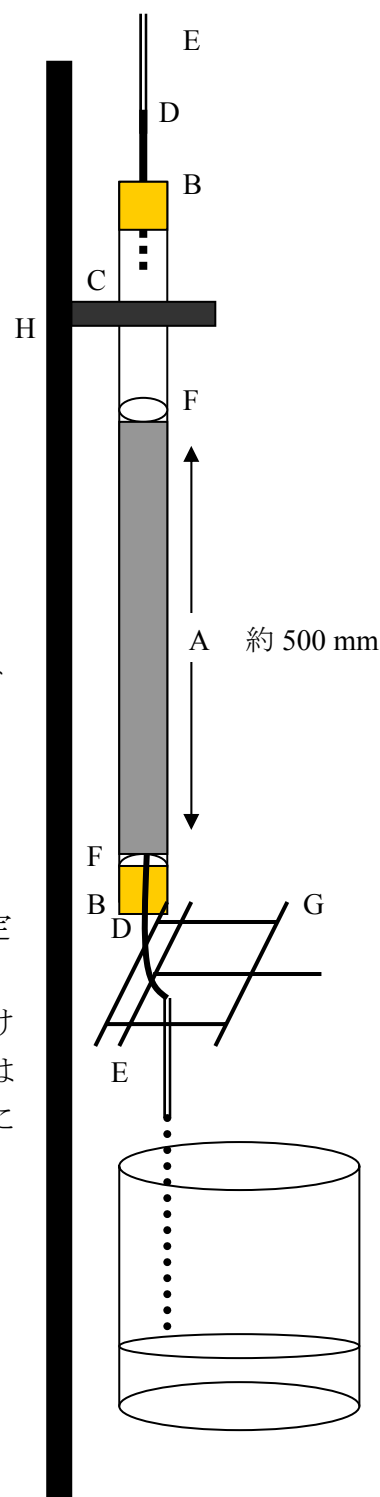
8. 組み立てるカラムの説明

- A. トヨパール HW-50F (粒径約 45 μm)
($0.85 \times 0.85 \times \pi \times 50 = 113 \text{ ml/column}$)
- B. シリコン栓 (No. 3 または No. 4)
- C. ガラス管 (内径 1.7 cm × 長さ 60 cm)
- D. テルモ 18G 注射針
- E. シリコンチューブ (外径 2mm、内径 1mm)
- F. ろ紙 (ワットマン) をカラム内径程度に切る。
- G. ピンチコック 2つ (上下に 1つずつ)
- H. スタンド、クランプ
(G. ゲルを充填するときに用いるペリスタポンプ)
- I. フラクションコレクター

右図には描かれていないが、下部のチューブ E に更に、
J. フラクションコレクターに連結する (固め) チューブ
(外径 2mm、内径 1mm)
を連結して、フラクションを集める。

流速について

0.3~0.5 ml/min が目標。これが分離実習の所要時間を決定する静水圧でこれを実現するには、床にカラムを置き、緩衝液 (ビーカー) を実験台上におくことで高低差をつけて実現させます。従って、実習中に室内を移動する際には自分の班、もしくは他の班のカラムを転倒させないように十分注意してください。



9. 各班にお配りしたカラム工作部品のチェック表

<input type="checkbox"/> ガラス瓶に入ったゲル (100 ml 相当)	1 本
<input type="checkbox"/> 長さ 60 cm のガラス管	1 本
<input type="checkbox"/> シリコン栓 (穴なし)	1 個
<input type="checkbox"/> シリコン栓 (針あり)	2 個
<input type="checkbox"/> 大型プラスチックロート	1 個
<input type="checkbox"/> パラフィルム (15 cm ぐらい)	2 枚
<input type="checkbox"/> シリコンチューブ (やわらかい)	2 本
<input type="checkbox"/> テフロンチューブ (比較的固い)	1 本
<input type="checkbox"/> ピンチコック	2 個
<input type="checkbox"/> スタンド (ムッフ 2 個・クランプ 2 個)	1 本
<input type="checkbox"/> 移動相用の三角フラスコ (300 ml)	1 個
<input type="checkbox"/> 廃液溜め用のプラスチックビーカー	1 個
<input type="checkbox"/> フラクションコレクター	1 台
<input type="checkbox"/> 光学セル	1 個
<input type="checkbox"/> ろ紙	2 枚

10. サンプル

I. カラム充填チェックサンプル : 0.4 ml をアプライ

6.5 mg/ml ブルーデキストラン ($M_r=2,000,000$)

大きな分子量の代表

10 mg/ml フェリシアン化カリウム ($M_r=329$)

小さな分子量の代表

II. 分析用サンプル : 0.4 ml をアプライ

6.5 mg/ml ブルーデキストラン ($M_r=2,000,000$)

10 mg/ml ヘモグロビン ($M_r=64,500$)

もしくは 2 mg/ml シトクロム c ($M_r=12,500$)

10 mg/ml グルコース ($M_r=180$)

各班ヘモグロビンかシトクロム c かは不明です。

カラムで分離し、分子量推定から判断してください。

各フラクションの分析は以下のように吸光度測定で行う。

Abs. at 620 nm for ブルーデキストラン

Abs. at 410 nm for フェリシアン化カリウム

Abs. at 410 nm for ヘモグロビンもしくはシトクロム c

Abs. at 500 nm for グルコース定量 (実習前半と同様)

12. 今回の分子篩（ふるいにかける、のふるい）クロマトグラフィーに用いたレジンの説明

より実習を理解するために一度、下記の東ソーの URL のサイトを調べてみてください。ゲルろ過カラムによる分離の様子アニメーションが見られます。また、下記の記述はこのサイトの内容を引用させていただいております。

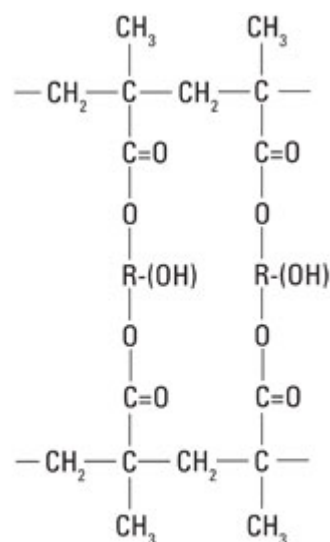
<http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/ServiceSupport/TechSupport/ResourceCenter/PrinciplesofChromatography/SizeExclusion/>

上記のサイトで実習に用いたゲルろ過レジンは以下のようで紹介されています。

Toyopearl HW-50 is a hydroxylated methacrylic polymer for size exclusion chromatography of proteins between 500-80,000 Da.

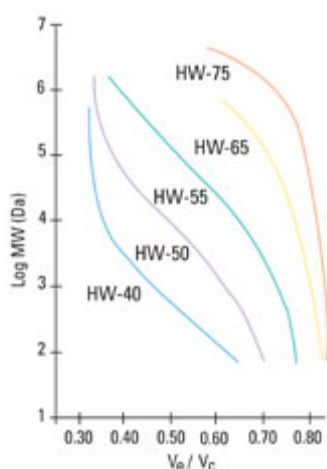
このレジンは右のような化学構造を基本単位とするポリマーからできている粒子です。今回実習で用いた HW-50F では 45 μm です。100 ml でおよそ 5000 円です。

45 μm の粒子には、小さな穴が無数にあります。その穴の直径によって、分離できる分子量の範囲が変わります。



Note: R = Hydroxylated Aliphatic Group

下の図は、Toyopearl のラインアップ間における分離能を比較したものです。

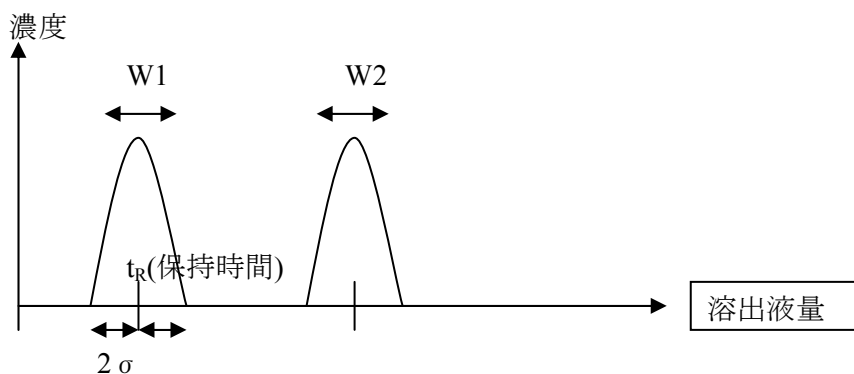


Column: 22mmID x 30cm
Sample: protein standards
Elution: 0.06M phosphate buffer (pH 7.0) in 0.06M KCl
Legend: V_e = elution volume V_c = column volume

HW-40 は 50 \AA 、HW-50 は 125 \AA 、HW-55 は 500 \AA 、HW-65 は 1000 \AA 、HW-75 は > 1000 \AA の直径の穴が空いています。この小さな穴のサイズによって、よりよい分離ができる分子量の範囲、いわばそのカラムの適用範囲が決まります。

今回の実習で用いた Toyopearl HW-50F はシトクロム c やヘモグロビンの分子量を分離することができますが、HW-40 や HW-65 ではあまり分離できないことが読み取れます。

13. クロマトグラフィーにおける分離能力の評価法



溶出体積：V

間隙体積：V_i

固定相体積：V_s

分布定数：K_D（＝固体相における溶質濃度÷移動相における溶質濃度）

分布計数：D_V（＝K_D×V_s/V_i）

カラム体積：X

質量分布比：D_m

$$V = V_i + K_D V_s = V_i + D_V X = V_i (1 + D_m)$$

カラムの長さ：L

移動相の線速度：F

$$t_R = \frac{L}{F} (1 + D_m)$$

理論段数：n

ピーク幅：W (=4σ)

ピークの半値幅：W_{0.5}

$$n = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{V}{W} \right)^2 = \frac{16}{1.7^2} \left(\frac{V}{W_{0.5}} \right)^2$$

$$t_0 = L/F$$

有効理論段数：N

$$N = \left(\frac{t_R - t_0}{\sigma} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R - t_0}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{\frac{L}{F} D_m}{W} \right)^2$$

14. データを共有するための作業について

班で 2 人を選出し、自分の班の実習結果（テスト、本サンプル）を管理し、班員から要請のあったデータや図を作製する中心的な役割を担当する。担当者は実習期間中に分離実験の結果をその場でエクセル上のグラフを班員に示すための PC を持参するか、グラフ用紙に適宜データをプロットする。TA が持参する USB メモリーにデータシートを提出してください。

データファイル名は、

Test_班番号.xls

Result_班番号.xls

としてください。

実習期間中に専用 USB メモリー（実習期間中 TA が持っています）にデータをコピーしてください。5 月 13 日には、USB メモリーに提出された各班のデータをこれらのファイルを共有してください。レポート作成のときにシトクロム c とヘモグロビンの分子量推定に用いるデータとして必要です。

学籍番号 :

氏名 ;