

| | |
|------------------|---|
| Title | スクレオチドの薄層クロマトグラフィー |
| Sub Title | Thin-layer chromatography of nucleotides |
| Author | 富樫, 誠子(Togashi, Seiko) 新村, 敏子(Niimura, Toshiko) 宇田, 智子(Uda, Satoko) 中村, 勇蔵(Nakamura, Yuzo) |
| Publisher | 共立薬科大学 |
| Publication year | 1969 |
| Jtitle | 共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.14 (1969.) ,p.31- 34 |
| JaLC DOI | |
| Abstract | |
| Notes | 原報 |
| Genre | Technical Report |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000014-0031 |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

ヌクレオチドの薄層クロマトグラフィー

富樫誠子, 新村敏子, 宇田智子, 中村勇蔵

Thin-Layer Chromatography of Nucleotides
 Seiko TOGASHI, Toshiko NIIMURA, Satoko UDA,
 Yuzo NAKAMURA

Thin-layer chromatography (T.L.C.) is a more rapid and sensitive method for the separation of Nucleotides, in comparison with usually employed paper chromatography (P.P.C.).

We had made a series of comparative studies in the application for T.L.C. of 20 solvents which have been used for P.P.C. The result was very satisfactory, and iso-propanol-ammonia-water (60 : 35 : 5), and iso-Butyric acid : 0.5 N-ammonium hydroxide (10 : 6) are found to be the most effective solvents for this purpose.

K. Randerath¹⁾ によって核酸誘導体の分離同定に薄層クロマトグラフィーが用いられてから、従来用いられていたペーパークロマトグラフィーより、その迅速性、鋭敏度のすぐれ正在が注目され種々検討がなされてきた。近年とくにヌクレオチドの分析では多くの報告^{2)~6)}がみられるが、ヌクレオチドの種類、および展開溶媒、吸着剤の検討は必ずしも充分でなく、本実験では 15 種のヌクレオチドについて、従来ペーパークロマトグラフィーで好結果を得た溶媒を中心によく 20 種の展開溶媒を比較検討した。なお吸着剤はセルロースの他、セルロースのイオン交換体 2 種を用いて同様に薄層クロマトグラフィーをおこなって検討したので結果を報告する。

実験の部

検液 使用したヌクレオチド類標準品は以下のもので、各々 5% 水溶液として使用。

5'-AMP, 2'(3')AMP, 3'-5' Cyclic AMP, 5'-ADP, 5'-ATP, 5'-CMP, 2'(3')CMP, 5'-UMP, 2'(3')UMP, 5'-UDP, 5'-UDPG, UDP-N-Acetylglucosamine, 5'-GMP, 2'(3')GMP, 5'-GDP⁷⁾

吸着剤 1. アビセル-SF (旭化成) 18 g. に水 70 ml. を加え、乳鉢中でよく研和後、20×20 cm. のガラス板に厚さ 0.25 mm. の薄層を常法に従って作り、放置後 60~80°C. 20 分間乾燥して使用。2. DEAE-セルロース (生化学工業) 12 g. に水 80 ml. を加えてアビセルと同様におこなう。3. ECTEOLA-セルロース (生化学工業) を DEAE-セルロースと同様に使用。

- 1) K. Randerath : Angew. Chem., **73**, 436 (1961).
- 2) ibid **73**, 674 (1961).
- 3) K. Randerath, H. Struck : J. Chromatog., **6**, 365 (1961).
- 4) K. Randerath : Biochim. Biophys. Res. Commun., **6**, 452 (1961).
- 5) K. Randerath : Natuse **194**, 768 (1962).
- 6) K. Randerath : Angew. Chem., **74**, 484 (1962).
- 7) 5'AMP : アデノジン-5'-リン酸, 2'(3')AMP : アデノジン-2'(3')-リン酸, 3'-5' cyclic AMP : アデノジン 3'-5' cyclic リン酸, 5'-ADP : アデノジン-5'-ジリン酸, 5'-ATP : アデノジン-5'-トリリン酸, 5'-CMP : シチジン-5'-リン酸, 2'(3')CMP : シチジン 2'(3')-リン酸, 5'-UMP : ウリジン-5'-リン酸, 2'(3')UMP : ウリジン-5'-ジリン酸, 5'-UDPG : ウリジン-5'-ジリン酸グルコース, UDP-N-Acetylglucosamine : ウリジン-5'-ジリン酸-N-アセチルグルコサミン, 5'-GMP : グアノシン-5'-リン酸, 2'(3')GMP : グアノシン-2'(3')-リン酸, 5'GDP : グアノシン-5'-ジリン酸。

展開溶媒⁸⁾ A, iso-PrOH : NH₄OH : H₂O (60 : 35 : 5). B, Sat. (NH₄)₂SO₄ : iso-PrOH : 0.5 M·CH₃COONH₄ (80 : 20 : 19). C, (NH₄)₂SO₄ 5 g. に iso-PrOH 5 ml. を加え全容 100 ml. とする. D, MeOH : Conc·HCl : H₂O (70 : 20 : 10). E, MeOH : EtOH : Conc·HCl : H₂O (50 : 25 : 6 : 19). F, EtOH : 1M·CH₃COONH₄ (pH 7.5) (7.5 : 3). G, PhOH : tert-BuOH : HCOOH : H₂O (84 : 6 : 10 : 100). H, アセトン : 25 W/V% トリクロル酢酸 (75 : 25). I, 70 ml. の tert-BuOH を 13.2 ml の定沸点 HCl に加えて 100 ml. とする. J, 0.15 M·NaCl. K, イソ酪酸 : 0.5 N·NH₄OH (5 : 3). L, イソ酪酸 : NH₄OH (比重 0.90) : H₂O (66 : 2 : 32). M, 0.01 N·HCl. N 0.02 N·HCl. O, 0.03 N·HCl. P, 0.04 N·HCl. Q, tert-Amy OH : HCOOH : H₂O (3 : 2 : 1). R, n-BuOH : アセトン : AcOH : 5% NH₄OH : H₂O (4.5 : 1.5 : 1 : 1 : 2). S, n-PrOH : テトラヒドロフルフリルアルコール : 0.08 M. クエン酸カリウム緩衝液 (pH 3.2) (2 : 1 : 1). T, iso-Amy OH-5% NaHPO₄. U, メチルエチルケトン : tert-BuOH : AcOH (88% 以上) : H₂O : Conc. HCl (22.5 : 22.5 : 35 : 19 : 1) 以上 () 内は容積比で表わす.

展開 薄層の下端より 1.5 cm に検液をスポットし, 溶媒蒸気を飽和した展開槽中で約 10 cm. 展開後, 室温に放置, あるいは温風乾燥によって溶媒を除去した.

検出 2537Å の紫外線を照射してスポットの位置を定め, 各々の Rf 値を求めた.

Rf 値については 3 回以上の実験の平均値を求めた.

結 果

1. 吸着剤として微結晶セルロースであるアビセル SF を使用した場合は, かなりの好結果が得られ, 使用した展開溶媒 21 種類のうち, 15 種のヌクレオチドを殆ど分離して定性に適すると思われるものは A から L までの 12 種類であった. 各々の Rf 値は表 1 に示す通りである. (Table 1)
このなでも溶媒 AK は特に優れた分離能力が認められる. またアデニン系, グアニン系, シチジン系, ウリジン系の塩基の異なるヌクレオチド間では溶媒 BDEIJK が分離に適している. 溶媒 B はアデニール酸, グアニール酸に, 溶媒 C はアデニール酸, シチジール酸に, 溶媒 I はグアニール酸, ウリジール酸に, 溶媒 F はウリジール酸, シチジール酸に, 溶媒 E はウリジール酸の分離に各々適していると思われる.

2. 吸着剤として, イオン交換セルロースである DEAE-セルロースを使用した場合は, アビセル SF に比べると展開時間が更に短縮されるのが大きな利点である. 分離安定性に適すると思わ

8) 展開溶媒の文献

- A～B L.Josefsson : Biochem. Biophys-Acta., **72**, 133 (1963).
- C “薄層クロマトグラフィー第 2 集” (1964) 南江堂
- D～E K.S.Kirby : Biochem. Biophys. Acta., **18**, 575 (1955).
- F A.C.Paladini, L.F.Leloir : Biochem. J., **51**, 426 (1952).
- G P.Boulanger, J.Montreuil : Bull. Soc. chim. biol., **33**, 784 (1951).
- H S.Burrows, et al. : Nature., **170**, 800 (1952).
- I E.Visher, E.Chargaff : J.Biol. Chem., **176**, 703 (1948).
- J K.Randerath : Angew-chem., **73**, 674 (1961).
- K B.Magasanik, et al. : J.Biol. Chem., **186**, 37 (1950).
- L H.E.Wade, P.M.Morgan : Biochem. J., **60**, 264 (1955).
- M～P K.Randerath : Angew. Chem., **74**, 484 (1962).
- Q K.Randerath : Biochim. Biophys. Res. Commun., **6**, 452 (1961).
- R K.Randerath, H.Struck : J.Chromatog., **6**, 365 (1961).
- S D.C.Carpenter : Anal. Chem., **24**, 1203 (1952).
- T C.E.Carter : J.Am. Chem. Soc., **72**, 1466 (1950).
- U K.S.Kirby : Biochem. Biophys.

Table 1 Rf Values of Nucleotides on Avicel SF Layers

| Nucleotide | Solvent | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L |
|-----------------|---------|------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5'AMP | | 0.22 | 0.53 | 0.65 | 0.52 | 0.36 | 0.11 | 0.82 | 0.59 | 0.32 | 0.84 | 0.54 | 0.66 |
| 2'3'AMP | | 0.30 | 0.52 0.46 | 0.60 | 0.55 | 0.41 | 0.15 | 0.84 | 0.56 | 0.28 | 0.72 | 0.64 | 0.75 |
| 3'-5'Cyclic AMP | | 0.76 | 0.46 | 0.45 | 0.40 | 0.68 | 0.40 | 0.86 | 0.35 | 0.25 | 0.71 | 0.60 | 0.76 |
| 5'ADP | | 0.21 | 0.58 | 0.74 | 0.54 | 0.40 | 0.08 | 0.92 | 0.20 | 0.28 | 0.87 | 0.44 | 0.53 |
| 5'ATP | | 0.10 | 0.63 | 0.81 | 0.42 | 0.35 | 0.07 | 0.96 | 0.15 | 0.23 | 0.94 | 0.40 | 0.46 |
| 5'CMP | | 0.15 | 0.74 | 0.84 | 0.53 | 0.44 | 0.14 | 0.88 | 0.70 | 0.36 | 0.84 | 0.51 | 0.56 |
| 2'3'CMP | | 0.20 | 0.76 | 0.88 | 0.47 | 0.42 | 0.20 | 0.94 | 0.63 | 0.33 | 0.87 | 0.53 | 0.62 |
| 5'UMP | | 0.12 | 0.79 | 0.87 | 0.68 | 0.68 | 0.16 | 0.94 | 0.63 | 0.64 | 0.86 | 0.35 | 0.42 |
| 2'3'UMP | | 0.19 | 0.77 | 0.88 | 0.75 | 0.73 | 0.23 | 0.87 | 0.59 | 0.77 | 0.89 | 0.38 | 0.48 |
| 5'UDP | | 0.11 | 0.80 | 0.92 | 0.71 | 0.65 | 0.10 | 0.87 | 0.40 | 0.58 | 0.95 | 0.32 | 0.31 |
| 5'UDPG | | 0.24 | 0.86 | 0.96 | 0.69 | 0.55 | 0.25 | 0.91 | 0.20 | 0.55 | 0.97 | 0.23 | 0.30 |
| 5'UDPNAcG | | 0.30 | 0.86 | 0.95 | 0.68 | 0.55 | 0.32 | 0.92 | 0.25 | 0.5 | 0.97 | 0.24 | 0.26 |
| 5'GMP | | 0.08 | 0.65 | 0.54 | 0.42 | 0.29 | 0.06 | 0.81 | 0.42 | 0.24 | 0.76 | 0.23 | 0.33 |
| 2'3'GMP | | 0.12 | 0.60 | 0.57 | 0.46 | 0.31 | 0.07 | 0.84 | 0.41 | 0.30 | 0.72 | 0.34 | 0.42 |
| 5'GDP | | 0.06 | 0.68 | 0.72 | 0.43 | 0.28 | 0.05 | 0.88 | 0.13 | 0.20 | 0.80 | 0.25 | 0.27 |

The time necessary to develope 10cm. (h.) 6 3 1.5 2.5 3 3 2 2 19 1.5 6.5 5

Table 2 Rf Values of Nucleotides on DEAE-Cellulose Layers

| Nucleotide | Solvent | B | C | D | E | F | H | I | J | K | L |
|-----------------|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5'AMP | | 0.62 | 0.53 | 0.64 | 0.63 | 0.13 | 0.32 | 0.3 | 0.37 | 0.54 | 0.5 |
| 2'3'AMP | | 0.56 | 0.47 | 0.68 | 0.66 | 0.16 | 0.36 | 0.27 | 0.31 | 0.60 | 0.54 |
| 3'-5'Cyclic AMP | | 0.38 | 0.34 | 0.69 | 0.57 | 0.18 | 0.35 | 0.32 | 0.50 | 0.50 | 0.55 |
| 5'ADP | | 0.72 | 0.67 | 0.68 | 0.6 | 0.10 | 0.36 | 0.25 | 0.21 | 0.42 | 0.37 |
| 5'ATP | | 0.83 | 0.65 | 0.70 | 0.53 | 0.06 | 0.38 | 0.22 | 0.19 | 0.32 | 0.17 |
| 5'CMP | | 0.86 | 0.69 | 0.70 | 0.67 | 0.12 | 0.47 | 0.33 | 0.44 | 0.42 | 0.44 |
| 2'3'CMP | | 0.81 | 0.70 | 0.76 | 0.71 | 0.18 | 0.30 | 0.37 | 0.40 | 0.47 | 0.22 |
| 5'UMP | | 0.85 | 0.71 | 0.80 | 0.58 | 0.14 | 0.63 | 0.60 | 0.52 | 0.35 | 0.23 |
| 2'3'UMP | | 0.82 | 0.73 | 0.86 | 0.67 | 0.18 | 0.75 | 0.53 | 0.58 | 0.32 | 0.32 |
| 5'UDP | | 0.92 | 0.75 | 0.78 | 0.58 | 0.13 | 0.43 | 0.50 | 0.53 | 0.21 | 0.15 |
| 5'UDPG | | 0.92 | 0.79 | 0.82 | 0.54 | 0.19 | 0.68 | 0.48 | 0.30 | 0.18 | 0.14 |
| 5'UDPNAcG | | 0.90 | 0.80 | 0.82 | 0.46 | 0.24 | 0.62 | 0.45 | 0.48 | 0.23 | 0.13 |
| 5'GMP | | 0.68 | 0.38 | 0.51 | 0.32 | 0.06 | 0.35 | 0.27 | 0.34 | 0.18 | 0.24 |
| 2'3'GMP | | 0.61 | 0.46 | 0.58 | 0.42 | 0.09 | 0.42 | 0.31 | 0.31 | 0.3 | 0.26 |
| 5'GDP | | 0.74 | 0.52 | 0.56 | 0.37 | 0.04 | 0.31 | 0.24 | 0.13 | 0.2 | 0.14 |

The time necessary to develope 10cm. (h.) 1.5 1 1.5 1.5 3 5.5 1 1 4 2

Table 3 Rf Values of Nucleotides on ECTEOLA-cellulose Layers

| Nucleotide | Solvent | B | C | D | E | F | H | I | J | K | L |
|---|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5'AMP | | 0.65 | 0.65 | 0.52 | 0.52 | 0.15 | 0.63 | 0.42 | 0.35 | 0.67 | 0.55 |
| 2'3'AMP | | 0.60 | 0.60 | 0.58 | 0.54 | 0.18 | 0.62 | 0.45 | 0.32 | 0.72 | 0.59 |
| 3'-5'AMP ^{Cyclic} | | 0.85 | 0.54 | 0.40 | 0.75 | 0.19 | 0.65 | 0.34 | 0.18 | 0.75 | 0.6 |
| 5'ADP | | 0.79 | 0.72 | 0.56 | 0.51 | 0.10 | 0.08 | 0.35 | 0.29 | 0.51 | 0.43 |
| 5'ATP | | 0.82 | 0.73 | 0.61 | 0.54 | 0.05 | 0.43 | 0.3 | 0.16 | 0.46 | 0.33 |
| 5'CMP | | 0.83 | 0.77 | 0.66 | 0.66 | 0.11 | 0.67 | 0.46 | 0.46 | 0.57 | 0.44 |
| 2'3'CMP | | 0.81 | 0.72 | 0.7 | 0.45 | 0.19 | 0.0 | 0.53 | 0.54 | 0.61 | 0.5 |
| 5'UMP | | 0.91 | 0.78 | 0.76 | 0.65 | 0.15 | 0.02 | 0.8 | 0.60 | 0.42 | 0.3 |
| 2'3'UMP | | 0.87 | 0.76 | 0.86 | 0.72 | 0.2 | 0.67 | 0.87 | 0.63 | 0.48 | 0.34 |
| 5'UDP | | 0.93 | 0.79 | 0.8 | 0.60 | 0.08 | 0.62 | 0.71 | 0.69 | 0.30 | 0.20 |
| 5'UDPG | | 0.91 | 0.82 | 0.8 | 0.68 | 0.25 | 0.10 | 0.67 | 0.78 | 0.27 | 0.17 |
| 5'UDPNAcG | | 0.92 | 0.83 | 0.85 | 0.57 | 0.34 | 0.01 | 0.64 | 0.78 | 0.3 | 0.14 |
| 5'GMP | | 0.74 | 0.57 | 0.48 | 0.50 | 0.07 | 0.46 | 0.4 | 0.32 | 0.31 | 0.21 |
| 2'3'GMP | | 0.72 | 0.53 | 0.52 | 0.56 | 0.08 | 0.51 | 0.29 | 0.37 | 0.42 | 0.29 |
| 5'GDP | | 0.76 | 0.60 | 0.54 | 0.50 | 0.04 | 0.10 | 0.3 | 0.34 | 0.27 | 0.20 |
| The time necessary to devellope 10cm. (h.) | | 1.5 | 1 | 1 | 1.5 | 2 | 1.5 | 5.5 | 0.8 | 3 | 4 |

れる展開溶媒の結果は表 2 に示す通りである。 (Table 2)

アビセル SF で好結果を得た溶媒 A は殆ど展開せず、ここでは BCEIJKL が良い分離能力を示す。溶媒 H はテーリングしやすく Rf 値の再現性が悪い欠点があるがウリジール酸についてはすぐれた分離能力がある。

3. 吸着剤としてイオン交換セルロースの ECTEOLA-セルロースを使用した場合は、DEAE-セルロースと同様展開時間も短く、相対的な分離能についても DEAE-セルロースを用いたときと類似の結果である。結果を表 3 に示す。 (Table 3)

即ち溶媒 IJKL はここでも分離能力のすぐれていることを示している。溶媒 J は特に展開時間が僅かで分離できる利点がある。

以上の結果から吸着剤について云えば、アビセル-SF の薄層とペーパークロマトグラフィーの Rf 値は平行であると思われるし、薄層の方が短時間に結果が得られ、試料も僅かで分離、検出することができる。DEAE あるいは ECTEOLA セルロースは更に短時間の展開で結果を得られるが、塩基の異なる場合は Rf 値の差が大きいが、モノ、ジ、トリホスフェートの陰電荷の差は少なく、この点アビセル-SF に劣る。

溶媒については K および L はいづれの吸着剤を用いても優れた分離能力が認められ、数種スクレオチドを速かに分離する目的では、溶媒 K および L とアビセル-SF を用いて溶媒 A での展開を併用するのが最も良いと考えられる。糖スクレオチドについては試料が不足であるが、約 20 種の溶媒で分離可能と思われるものは一つもなく、クロマトグラフィーでの分離は困難が予想される。