

Title	ヌ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、鋭敏度のすぐれていること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約 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 : Nature **194**, 768 (1962).

6) K. Randerath : Angew. Chem., **74**, 484 (1962).

7) 5'AMP : アデノシン-5'-リン酸, 2'(3') AMP : アデノシン-2'(3')-リン酸, 3'-5' cyclic AMP : アデノシン 3'-5' cyclic リン酸, 5'-ADP : アデノシン-5'-ジリン酸, 5'-ATP : アデノシン-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³⁾ 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 develop 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 develop 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' ^{Cyclic} AMP		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 develop 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はいずれの吸着剤を用いても優れた分離能力が認められ, 数種ヌ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. 糖ヌ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.