

インスリン製造用 r-トリプシン固定化担体

概要

インスリン製造に使用される組換えトリプシンをセルロース粒子に固定化した酵素固定化担体です。トリプシンはセルロース粒子に共有結合しているため、トリプシン活性はフリー体よりも極めて安定しています。この特徴からトリプシン酵素の繰り返し使用による製造比例費の削減が期待できます。

r-トリプシン固定化担体の特徴

リガンド	組換えトリプシン (豚由来トリプシン E.coli で製造)
ベース担体	セルロース粒子
粒径	平均 90 μ m
酵素活性	> 2,000 BAPNA (Benzyl-DL-arginine-p-nitroanilide) U/ml
保存液	PBS - 50% グリセロール

開発品の取扱い方について

r-トリプシン固定化担体は開発品となります。クロマトグラフィー充填剤セルフアインは ISO 9001 により品質が保証されていますが、本品は開発中につき、品質が変更される可能性があります。

本品は販売しておりません。開発品として少量のサンプル提供を行っております。本品を製造用途で検討してみたい企業様 (医薬品製造、診断薬、その他製造等)、研究者様におかれましては、その旨ご同意頂き、用途を勘案の上、サンプルをご提供させていただきます。

サンプルに関するお問い合わせは下記までご連絡下さい。

JNC 株式会社

ライフケミカル事業部

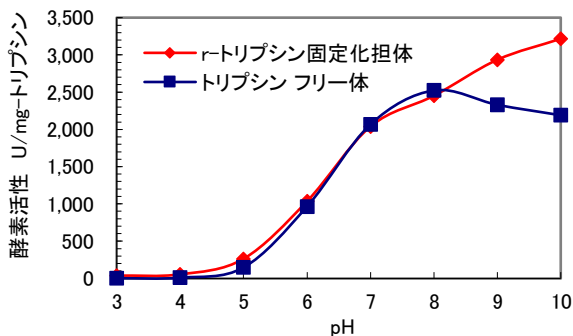
東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号
TEL : 03-3243-6150 Fax : 3-3243-6219
e-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp
<http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>

■ pH 条件に依存しない優れた酵素活性

測定条件

反応バッファー: pH3~10のバッファー + 10 mM CaCl₂
 測定温度: 25 °C,
 酵素基質: BAPNA (Benzoyl-DL-arginine-p- nitranilide)

r-トリプシン固定化担体の酵素活性を pH 条件ごとに評価しました。トリプシンを担体に固定化することで pH 10 などの高アルカリ性条件下でもトリプシン活性を維持しました。一方でトリプシン フリー体は pH 8 で至適活性となり、それ以降の高 pH 条件では活性が低くなりました。

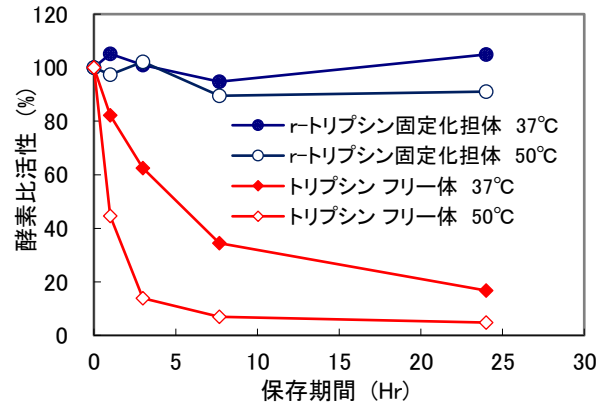


■ 高温条件での優れた耐久性

測定条件

反応バッファー: 50 mM Tris-HCl 10 mM CaCl₂ (pH 8.0)
 保存温度: 37°Cまたは50°C
 酵素基質: BAPNA

r-トリプシン固定化担体はフリー体と比較して高温条件でも使用できます。50°Cの高温条件でもトリプシン活性を維持していました。一方でフリー体は 37°Cにおいても経時変化で活性を失いました。これはトリプシンフリー体が自己消化することで失活していくことが原因です。r-トリプシン固定化担体はトリプシンを担体に固定化することで自己消化を抑えていることが判ります。

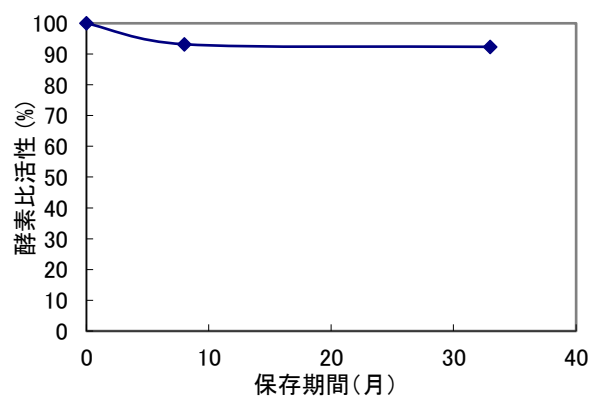


■ 長期間の優れた保存安定性

保存条件

- ・保存液 : PBS + 50%グリセロール
- ・保存温度 : 4 °C
- ・測定方法
 反応バッファー : 50 mM Tris-HCl 10 mM CaCl₂ (pH 8.0)
 反応温度 : 25°C
 酵素基質: BAPNA

r-トリプシン固定化担体は優れた保存安定性を示します。冷蔵保存 (4°C) で、33 カ月に渡ってトリプシン活性を維持していました。



■有機溶媒中でのトリプシン活性

測定条件

反応バッファー: 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH8.0

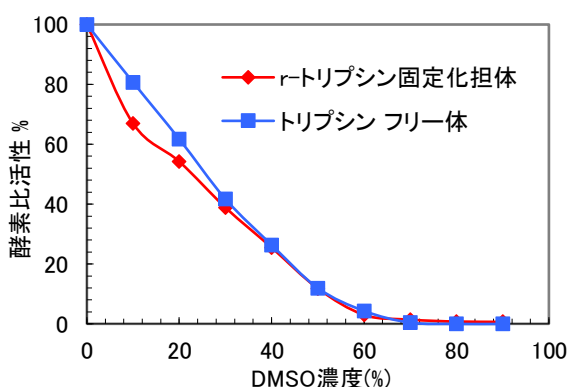
+ 0~90%濃度の有機溶媒

測定温度: 25 °C

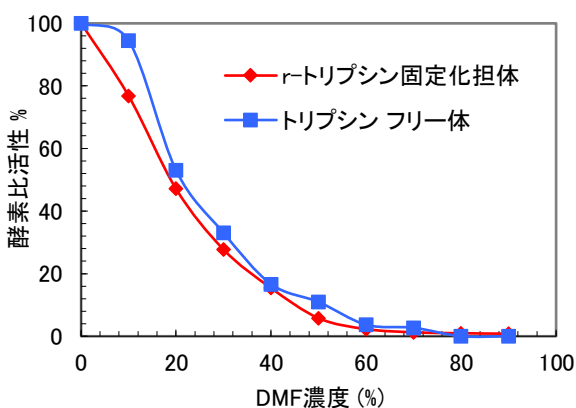
酵素基質 : BAPNA

インスリン製造に使用される有機溶媒にはジメチルスルホキシド (DMSO)、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) およびアセトニトリルなどがあります。これら有機溶媒中でもフリー体と同様のトリプシン活性を示します。この結果からインスリン製造用トリプシン酵素の代替品として r-トリプシン固定化担体が好適に使用できることが判ります。

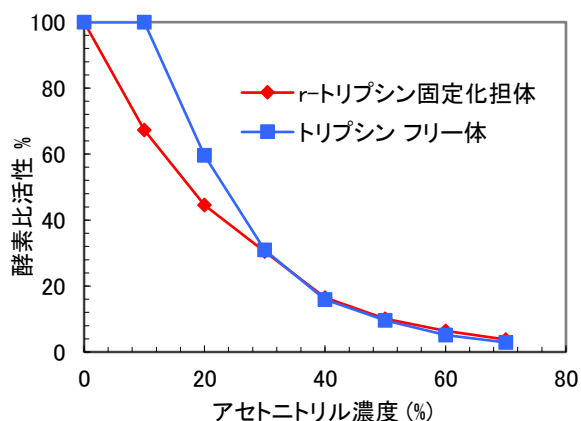
<DMSO>



<DMF>



<アセトニトリル>



■r-トリプシン固定化担体の定置洗浄

カラムに r-トリプシン固定化担体を充填して、定置洗浄の繰り返し試験を評価しました。

測定条件

カラム: 0.5 cm I.D. x 5 cm (1 ml)

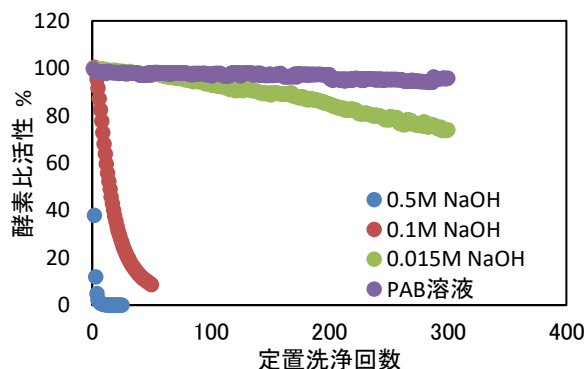
酵素基質: BAPNA

測定温度: 25 °C

活性測定: 酵素比活性 = (n サイクル目の切断基質ピーク面積) / (1 サイクル目の切断基質ピーク面積) × 100

カラムプログラム

平衡化	5 CV	50mM Tris-HCl, 10mM CaCl ₂ , pH8.0
サンプルロード	10 μl	10mM BAPNA in DMSO
溶出	5 CV	平衡化バッファー 検出 PDA 検出器 410 nm
定置洗浄	5 CV	NaOH (0.015 M, 0.1 M, 0.5 M)または PAB 液: 132mM リン酸, 184mM 酢酸, 2.4%(v/v) ベンジルアルコール (pH1.6)
洗浄	5 CV	平衡化バッファー



一般的にクロマトグラフィーカラムの定置洗浄は水酸化ナトリウム (NaOH) が使用されています。r-トリプシン固定化担体はタンパク質の r-トリプシンを固定化しているため NaOH に対する耐久性は低いという、タンパク質固定化担体に見られる一般的な特徴を有します。しかし 0.015 M NaOH で定置洗浄した場合、200 回の繰り返し試験で 85% の活性を維持していました。また酸性の定置洗浄液 PAB 液を使用した試験では 300 回の定置洗浄サイクル後も活性を維持していました。

■ リジンバッファー(pH12)での繰り返し使用性

測定条件

カラム: 0.5 cm I.D. x 5 cm (1 ml)

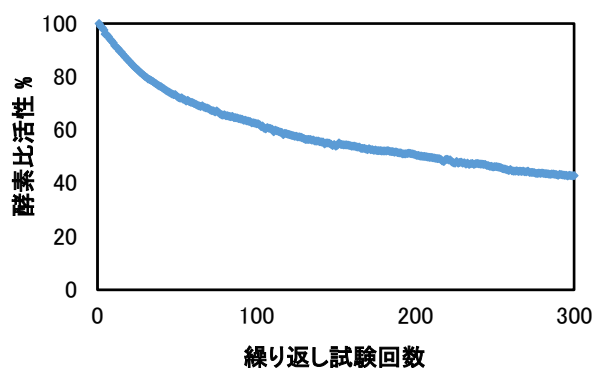
酵素基質: BAPNA

測定温度: 25 °C

活性測定: 酵素比活性 = (n サイクル目の切断基質ピーク面積) / (1 サイクル目の切断基質ピーク面積) × 100

カラムプログラム

平衡化	5 CV	0.1 M リジンバッファー (pH12)
サンプルロード	10 μl	10mM BAPNA in DMSO
溶出	5 CV	平衡化バッファー 検出 PDA 検出器 410 nm
定置洗浄	5 CV	PAB 液: 132mM リン酸, 184mM 酢酸, 2.4%(v/v)ベンジルアルコール (pH1.6)
洗浄	5 CV	平衡化バッファー



トリプシン処理に pH 12 のリジンバッファーを使用する場合があります。高アルカリ性での反応となりますので、酵素活性は減少します。この検討では 30 回の繰り返し使用で 80% の活性を維持しました。300 回の繰り返し使用では 43% まで活性が低下しました。

■ 50 % DMF での繰り返し使用性

測定条件

カラム: 0.5 cm I.D. x 5 cm (1 ml)

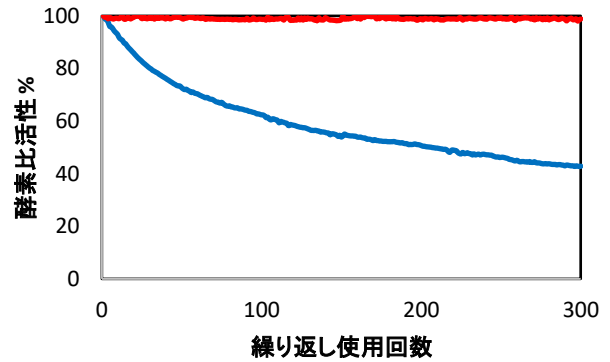
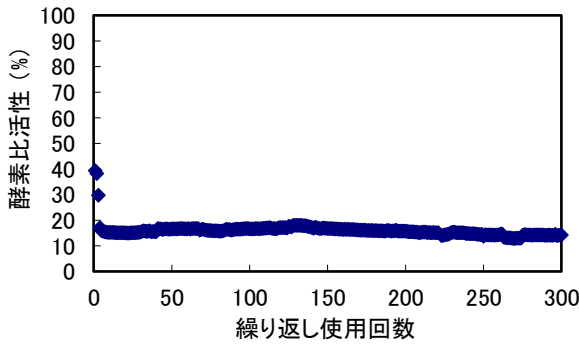
酵素基質: BAPNA

測定温度: 25 °C

活性測定: 酵素比活性 = (n サイクル目の切断基質ピーク面積) / (1 サイクル目の切断基質ピーク面積) × 100

カラムプログラム

平衡化	5 CV	50% DMF in 0.5M Tris-HCl, pH8.7
サンプルロード	10 μl	10mM BAPNA in DMSO
溶出	5 CV	平衡化バッファー 検出 PDA 検出器 410 nm
定置洗浄	5 CV	PAB 液: 132mM リン酸, 184mM 酢酸, 2.4%(v/v)ベンジルアルコール (pH1.6)
洗浄	5 CV	平衡化バッファー



基本的に 50% DMF 存在下において、トリプシン活性は 10~20% しかありません。今回のカラム充填後の繰り返し使用試験での活性も同様の挙動を取りました。

300 回の繰り返し試験後に、DMF を除いたバッファー (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8.0) でトリプシン活性を評価したところ、酵素比活性は 100% まで回復しました。この結果から 50 % DMF を使用して 300 回まで繰り返し使用してもトリプシン活性は維持されていました。

■高アルカリ性条件での繰り返し使用性

測定条件

カラム: 0.5 cm I.D. x 5 cm (1 ml)

バッファー: 0.1 M リジンバッファー (pH 9 または pH 12)

酵素基質: BAPNA

測定温度: 25 °C

活性測定: 酵素比活性 = (n サイクル目の切断基質ピーク面積) / (1 サイクル目の切断基質ピーク面積) × 100

カラムプログラム

平衡化	5 CV	0.1M リジンバッファー, pH9 または pH10
サンプルロード	10 μl	10mM BAPNA in DMSO
溶出	7.5CV	平衡化バッファー 検出 PDA 検出器 410 nm
定置洗浄	5 CV	PAB 液: 132mM リン酸, 184mM 酢酸, 2.4%(v/v)ベンジルアルコール (pH1.6)
洗浄	5 CV	平衡化バッファー

pH 9 のリジンバッファーでは 300 回繰り返し後もトリプシン活性は維持されています。一方で pH12 のリジンバッファーでは不可逆的な酵素活性の変化を引き起こし、活性は減少しました。

■アセトニトリルでの繰り返し使用性

I) 50 % アセトニトリル / トリスバッファー (pH 8)

測定条件

カラム: 0.5 cm I.D. x 5 cm (1 ml)

バッファー: 50 %アセトニトリル / 50 mM Tris バッファー, 10 mM CaCl₂ (pH 8) (V/V)

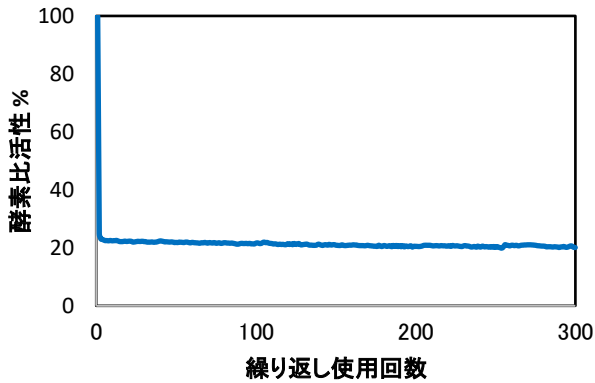
酵素基質: BAPNA

測定温度: 25 °C

活性測定: 酵素比活性 = (n サイクル目の切断基質ピーク面積) / (1 サイクル目の切断基質ピーク面積) × 100

カラムプログラム

平衡化	5 CV	50 %アセトニトリル / 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl ₂ (pH 8) (V/V)
サンプルロード	10 μl	10mM BAPNA in DMSO
溶出	7.5CV	平衡化バッファー 検出 PDA 検出器 410 nm
定置洗浄	5 CV	PAB 液: 132mM リン酸, 184mM 酢酸, 2.4%(v/v)ベンジルアルコール (pH1.6)
洗浄	5 CV	平衡化バッファー



50% アセトニトリル存在下でのトリプシン活性は20%しかありません。今回のカラム充填後の繰り返し使用試験での活性も同様の挙動を取りました。

300回の繰り返し試験後に、アセトニトリルを除いたバッファー（50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8.0）で酵素活性を評価したところ、酵素比活性は100%まで回復しました。この結果から50% アセトニトリルを使用して300回まで繰り返し使用してもトリプシン活性は維持されていました。

II) 20 % Acetonitrile / Lysine buffer (pH 10 or 12)

測定条件

カラム: 0.5 cm I.D. x 5 cm (1 ml)

バッファー: 20 %アセトニトリル / 50 mM リジンバッファー, 10 mM CaCl₂ (pH 10 または 12) (V/V)

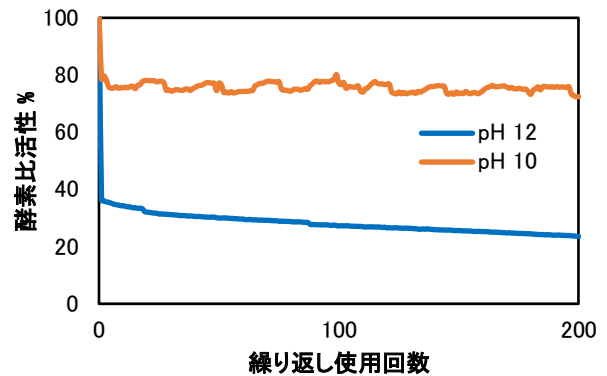
酵素基質: BAPNA

測定温度: 25 °C

活性測定: 酵素比活性 = (n サイクル目の切断基質ピーク面積) / (1 サイクル目の切断基質ピーク面積) × 100

カラムプログラム

平衡化	5 CV	20 %アセトニトリル / 50 mM リジンバッファー, 10 mM CaCl ₂ (pH 10 または 12) (V/V)
サンプルロード	10 μl	10mM BAPNA in DMSO
溶出	7.5CV	平衡化バッファー 検出 PDA 検出器 410 nm
定置洗浄	5 CV	PAB液: 132mM リン酸, 184mM 酢酸, 2.4%(v/v) ベンジルアルコール (pH1.6)
洗浄	5 CV	平衡化バッファー



20% アセトニトリル (pH 10) の条件ではトリプシン活性は80%弱を維持していました。200回の繰り返し試験後に、アセトニトリルを除いたバッファー（50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8.0）で酵素活性を評価したところ、酵素比活性は100%まで回復しました。

一方で高アルカリ条件となる20% アセトニトリル (pH 12) を用いた繰り返し試験ではトリプシン活性は使用回数に依存して減少していきました。200回の繰り返し試験後に、アセトニトリルを除いたバッファー（50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8.0）でトリプシン活性を評価したところ、酵素活性は回復せず、不可逆的な変化により酵素活性が失活していました。

■ 有機溶媒中での安定性

測定条件

保存バッファー:

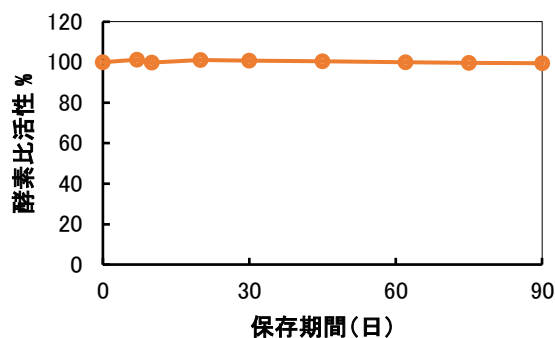
- 50 % DMF / 50 mM Tris-HCl – 10 mM CaCl₂ (pH 8)
- 50 %DMSO / 50 mM Tris-HCl – 10 mM CaCl₂ (pH 8)
- PAB 液

保存期間: 90 日、25 °C

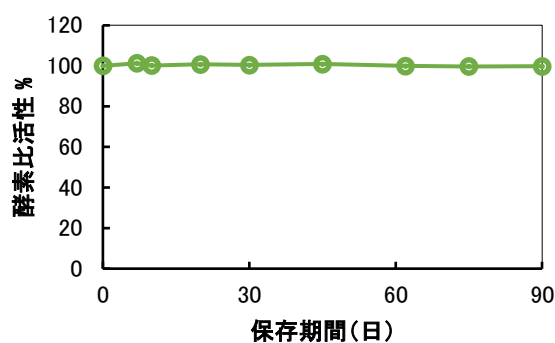
酵素活性評価:

1 ml カラムに充填。50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ (pH 8) の条件で BAPNA を基質として評価。

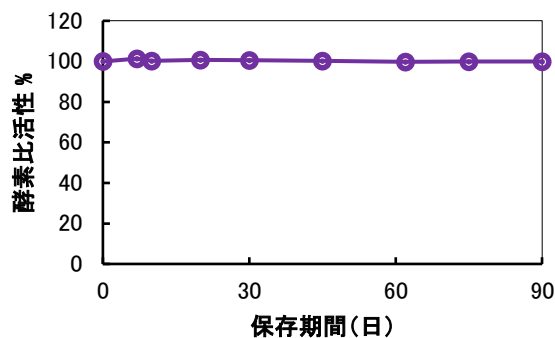
A) 50%DMF



B) 50% DMSO



C) PAB 液



それぞれの保存液で一定期間、r-トリプシン固定化担体を保存した後、トリプシン活性を評価したところ、いずれも活性は維持されていました。r-トリプシン固定化担体は有機溶媒に耐性が強い酵素固定化担体であることが判りました。

付録

トリプシン活性の測定方法

試薬:

Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA)

反応バッファー: 50 mM Tris-HCl, 10mM CaCl₂ (pH8.0)

上記のバッファーは本資料の基本条件となります。

BAPNA 溶液:

100 mM BAPNA をジメチルスルホキシドに溶解

反応停止: バッファー 33% 酢酸 (AcOH)

測定方法:

- 1) 保存液をフィルターなどで脱液して湿潤担体を準備します。
- 2) 2mL マイクロチューブに 0.2 g の湿潤担体、980 ul の反応バッファーを加え、25°C で 3 分間、緩やかに撹拌します。
- 3) 10 μL の BAPNA 溶液をマイクロチューブに加えます。
- 4) 10 分間、25°C で静置します。その後、反応停止バッファーを 200 uL 加えて反応を停止します。

再生方法:

フィルターまたはカラム内で、5~10 カラム体積分の反応バッファーで洗浄します。

保存方法

担体を PBS (pH 7) - 50% グリセロールで平衡化し、4°C で保存します。