

Cellufine™ ET クリーン

セルファイン ET クリーンは、セルロース粒子にポリεリジンを固定化したクロマトグラフィー充填剤です。サンプル溶液に存在するエンドトキシンを充填剤に結合させることでサンプルからのエンドトキシン除去が可能です

ET クリーンは物理的強度の高いセルロース粒子にポリεリジンを固定化しています。このポリεリジンのリジン残基のカチオンリガンドと、ポリマーの疎水領域によってミックスモードとしての相互作用をセルロース粒子に与えています。(図1) ポリεリジンは20~40個のリジンポリマーで、*Streptomyces albulus*によって発酵され、JNCにて製造しています。セルファインET クリーンは0.2 M NaOHなどの定置洗浄液に安定です。

セルファイン ET クリーンの特徴を表1に示します。

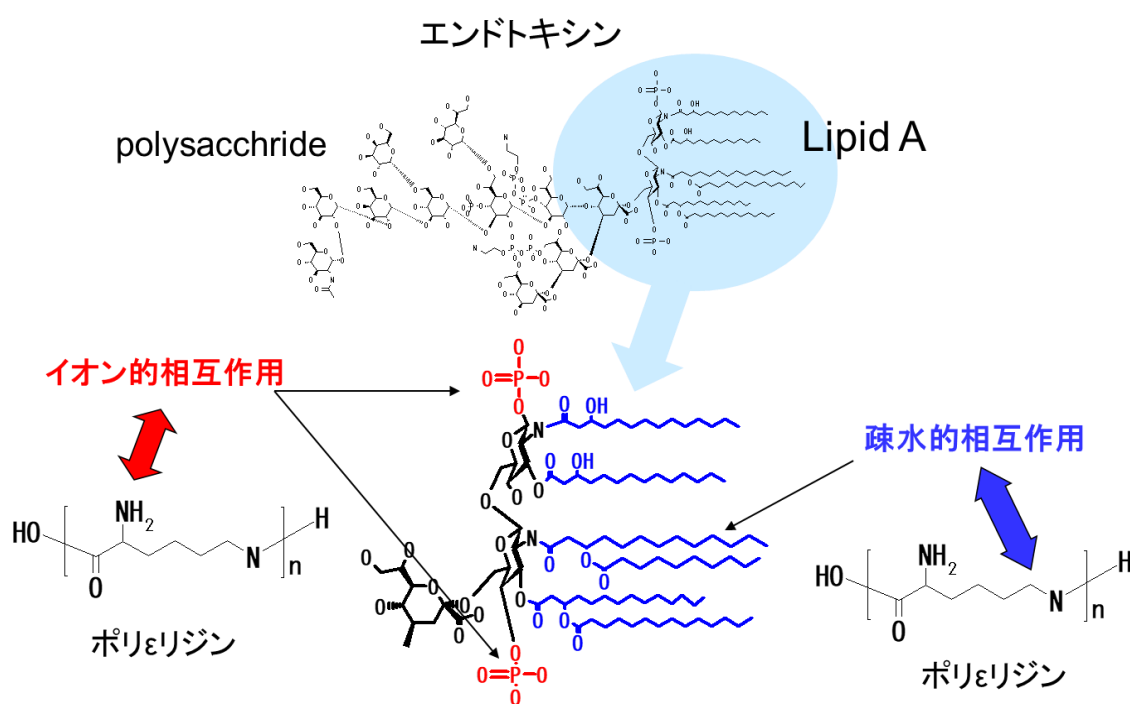


図1 エンドトキシンとポリεリジンの相互作用

表 1 セルファインETクリーンの性能と特徴

	ET クリーン S	ET クリーン L
リガンド	$\text{HO} \left[\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{O} \end{array} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{NH} \right]_n \text{H}$ ポリ ε リジン (n=20-40) pKa 約 7.6	
ベース担体	真球セルロース粒子	
粒径	40-130 μm	
排除限界分子量	2000	$>2 \times 10^6$
推奨操作圧力	$<0.30 \text{ MPa}$ ($<3000 \text{ cm/h}$)	$<0.20 \text{ MPa}$ ($<900 \text{ cm/h}$)
推奨定置洗浄 (CIP) 液	0.2mol/l NaOH、0.2mol/l NaOH in 20% EtOH、 0.2mol/l NaOH in 95%EtOH	
pH 安定性	2 ~ 13	1 ~ 13
保存方法	2~8 °C in 20 % ethanol	
タンパク質回収の特徴 (表 2 及び”推奨バッファー”を参照)	細孔が小さく浸透が少ない 低吸着・高回収	細孔が大きく浸透の可能性あり 塩添加条件で低吸着・高回収可能。
エンドトキシン吸着量 EU/mL-gel※	74×10^4	192×10^4

表 1 に記載の数値は規格値を示すものではありません。

※各充填剤 0.1mL に対し 4mL のエンドトキシン溶液 (*E. coli* 0111:B4 LPS 100~200 μg/mL) を添加、上清を分析。pH7.0 0.02M リン酸 Na バッファー μ=0.05、リムルス ES-II テスト (スタンダード: *E. coli* UKT-B, 1 endotoxin unit (EU)=250pg LPS で換算) 使用。(文献 1)

表 2 各種タンパク質溶液からのエンドトキシン吸着とタンパク質の回収率

タンパク質溶液		セルファイン ET クリーン S		セルファイン ET クリーン L	
種類	吸着前の E T 量 (pg/ml)	(0.02M PB, pH7.0, μ=0.05)		(0.02M PB+0.36M NaCl, pH7.0, μ=0.40)	
		除去後の E T 量 (pg/ml)	タンパク質回収率 (%)	除去後の E T 量 (pg/ml)	タンパク質回収率 (%)
オボアルブミン 4.6	28,000	81	99	<10	95
BSA 4.9	32,000	45	99	<10	97
ミオグロビン 6.8	4,500	18	99	<10	98
γ-グロブリン 7.4	5,600	20	99	<10	97
シトクロム C 10.6	1,500	15	99	<10	98

0.3 mL の湿潤ゲルに 2 mL のサンプル溶液 (各種タンパク質: 1 mg/ml, LPS: 各種タンパク質試薬に混入していたもの, 0.02M リン酸 Na +NaCl) を添加し上清を分析 (パッチ法)。リムルス ES-II テスト (スタンダード LPS: *E. coli* UKT-B, 1 endotoxin unit (EU) =250pg LPS で換算可能) 使用。(文献 1)

カラムへの充填手順

材料と必要器具

- ・セルファイン ET クリーン S または L
 - ・カラム、アダプター、リザーバー
 - ・ポンプ
 - ・ろ過装置（ガラスフィルターやブフナーロート、吸引瓶）
 - ・メスシリンダー
 - ・充填液（純水または塩溶液※、バッファー※）
 - ・充填評価で使用する移動相（純水または塩溶液※、バッファー※）
 - ・充填評価で使用するマーカー（1-2 % (v/v) アセトンまたは 1M NaCl 溶液）
- ※ 塩溶液は 0.1M NaCl 溶液など低塩濃度溶液、 バッファーは吸着バッファーなどを使用してください。

スラリーの調製

- 1) セルファイン ET クリーンのボトルを室温にして数回振り、ボトル内のスラリーを均一にする。
- 2) ガラスフィルターで吸引ろ過し、5 倍容量の充填液で 3 回洗浄する。保存剤の 20% エタノールを除去する。洗浄は必要に応じてデカンテーションでも良い。

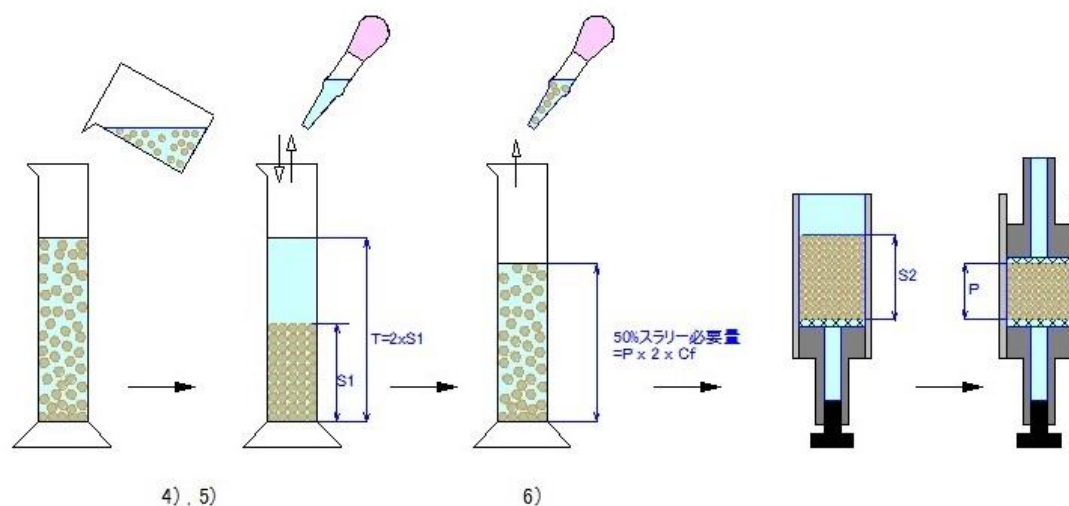


図2 スラリー調製

- 3) 最後の洗浄が終了したらビーカーに移し、50～60%スラリーになるように充填液を加えて懸濁し、減圧下で 30 分～40 分脱気する。その際にマグネチックスターラーで緩やかに攪拌すると効果的に脱気できる。

- 4) スラリーをメスシリンダーに入れて、4 時間以上静置する。この操作によって自然沈降体積を測定し、正確なスラリー濃度を確認する。

$$\text{スラリー濃度 (\%)} = \text{自然沈降体積 (S1)} / \text{全体積 (T)} \times 100$$

- 5) スラリー濃度が 50%になるように充填液量を調節する。T = 2 x S1 の時にスラリー濃度は 50%になります。
- 6) カラムへ充填するスラリー量は以下の計算式で求められる。

$$50\% \text{スラリー必要量} = (\text{パッキング体積 (P)} \times 2) \times C_f$$

Cf はコンプレッションファクターで、以下の式で導かれる。

$$C_f = \text{自然沈降体積 (S2)} / \text{パッキング体積 (P)}$$

※パッキング体積は目標とするカラムの体積です。

Note: 充填剤のコンプレッションファクターCf は充填効率に重要な因子です。可働栓カラムを使用し Cf 値を調節してください。セルファイン ET クリーンの Cf の例を以下に示します。

ET クリーン	推奨 Cf
S	約 1.1
L	約 1.2

カラムの充填

- 1) カラムを組み立てる。カラム出口を開けた後、充填液を加えながら下部フィルターに残存している空気を除く。空気が入らないように充填液はカラム底部から 1cm 程度は残しておく。
- 2) カラム出口を閉め、空気が充填剤間に入り込まないように注意しながら、スラリーを一気にカラム内に注ぎ込む。
- 3) カラム出口を開けて充填剤を沈降させる。充填剤が沈降すると、充填剤の方が早く沈降するため液面が透明になる。液面から 2~3cm まで充填液が透明になったら流出口を閉じる。
- 4) 注意深く充填液をカラム上部まで満たす。このとき沈降している充填剤が浮き上がらないようにする。
- 5) 上部アダプターとカラム液面の間に空気が入らないように上部アダプターをカラムに

設置する。上部アダプターの O リングを閉め、上部アダプターを下げ上部アダプター内の空気を抜く。

- 6) カラムをポンプにつなぎ、充填液を 30～60 分通液して充填剤を沈降させる。その際、ET クリーン S は 0.3MPa 以下、ET クリーン L は 0.2MPa 以下で通液する。

Note: 充填時のカラム内の圧力>充填後の操作圧となる線速で実施すること。

- 7) 充填剤の高さが安定した後、通液を止める。次いでカラム出口を閉じる。その後カラム上部の流入口の配管を外す。ゆっくりと上部アダプターを充填剤の表面まで下げていく。このときカラム内の充填液はカラム入口から逆流して流れ出る。
- 8) 空気が入らないように配管に液を満たした状態で上部アダプターに配管を接続したあと、下部アダプターのカラム出口を開いて通液する。その際、ET クリーン S は 0.3MPa 以下、ET クリーン L は 0.2MPa 以下で通液する。この操作で充填剤が圧縮されて上部アダプターの間で隙間ができるようなら上部アダプターを下げて充填剤に密着するよう調節する。
- 9) 最終的なカラム高さからカラム体積を計算する。計画していたカラム体積より多い場合、上部アダプターを下げて調節していく。一方で計画していたカラム体積よりも低い場合、カラムに投入する前のスラリー濃度が低いか、ゲルが圧縮されすぎている可能性があるため、抜き出して再度充填する。

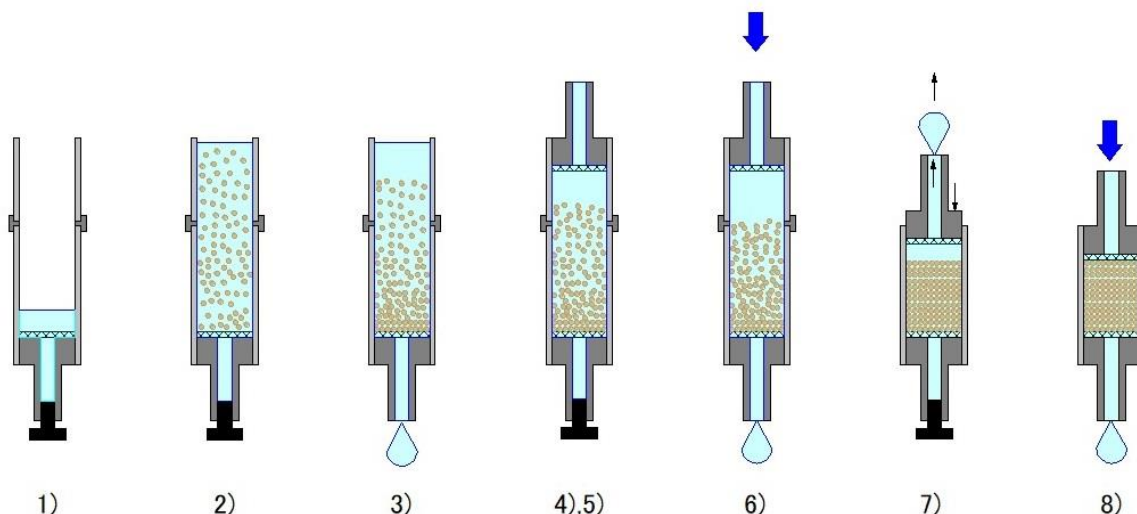


図 3 カラム充填の手順

充填状態の評価

カラム充填効率は付録 1 に記載されるように HETP、非対称性 (As) を確認することで評価する。

カラムの脱パイロジェンと平衡化

- 1) カラム体積の 5 倍量 (5CV) のアルカリ溶液を流した後に送液をやめ、以下の時間静置する。

アルカリ溶液	エンドトキシン除去に必要な時間
0.2 mol/L NaOH	16 時間または終夜
0.2 mol/L NaOH in 20 % EtOH	3 – 5 時間
0.2 mol/L NaOH in 95 % EtOH	1 時間

- 2) エンドトキシンを除去した水（パイロジェンフリー水：PF 水）を 5CV 程度流す。溶出液が中性になれば、溶出液中のエンドトキシンを LAL 法等で測定しエンドトキシンの除去を確認する。
- 3) エンドトキシンを取り除いた吸着バッファを 5CV 程度流し、カラムを平衡化する。セルファイン ET クリーンを使用すると低エンドトキシンバッファを簡単に調製することができる。（付録 3 参照）

操作ガイドライン

一般的な使用方法

- 1) “カラムの脱パイロジェンと平衡化” を実施し、カラムからエンドトキシンを除去したのち吸着バッファで平衡化する。
- 2) 吸着バッファに溶解されたサンプルをロードする。
- 3) エンドトキシン除去処理後のサンプル液として溶出液を回収し、エンドトキシンの含有量とサンプル量を測定する。
- 4) “カラムの脱パイロジェンと平衡化” を実施し、カラム内のエンドトキシンを除去する。

推奨バッファ

吸着バッファ：

PF 水または 0.01 M～0.05 M リン酸 Na バッファ または Tris-HCl バッファに、0.1～0.4 M NaCl を加えたものを使用する。

目的タンパク質の等電点 (pI) よりバッファ pH を低く設定すると、ET クリーンに対するタンパク質の吸着を軽減できます。pI の低い酸性タンパク質は ET クリーンに吸着する可能性が高いですが、塩濃度を高くする、細孔径の小さい ET クリーン S を使用する等で吸着を軽減できます（図 4）。目的タンパク質は pI 付近では ET クリーンに吸着し難い傾向にあります。

Note: ET クリーンでエンドトキシンを除去する最適条件は付録 4 “ET クリーン エンド

トキシン除去実験法（バッチ法）”で設定することができます。目的タンパク質の等電点と推奨バッファーおよび充填剤の選択の例は以下になります。

目的タンパク質の等電点	吸着バッファー条件	推奨する充填剤
4.0-6.5 (酸性タンパク質)	pH5-7、NaCl 濃度 0.1-0.4 M	ET クリーン S
7.0-10.5 (中性または塩基性タンパク質)	pH7-9、NaCl 濃度 0.1-0.4 M	ET クリーン L

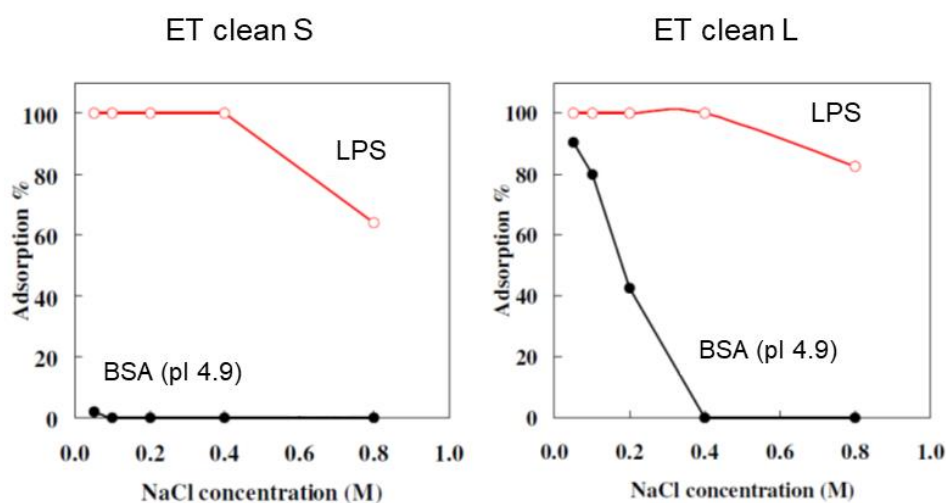


図 4 BSA (Mw 66kDa) の吸着に対する塩濃度の影響

0.2 g の湿潤ゲルに 2 ml のサンプル溶液 (BSA: 500 μ g/ml, LPS: *E. coli* 0111:B4 100 ng/ml, pH 7.0 PB, NaCl:0.05-0.8 (M)) を添加し上清を分析 (バッチ法)

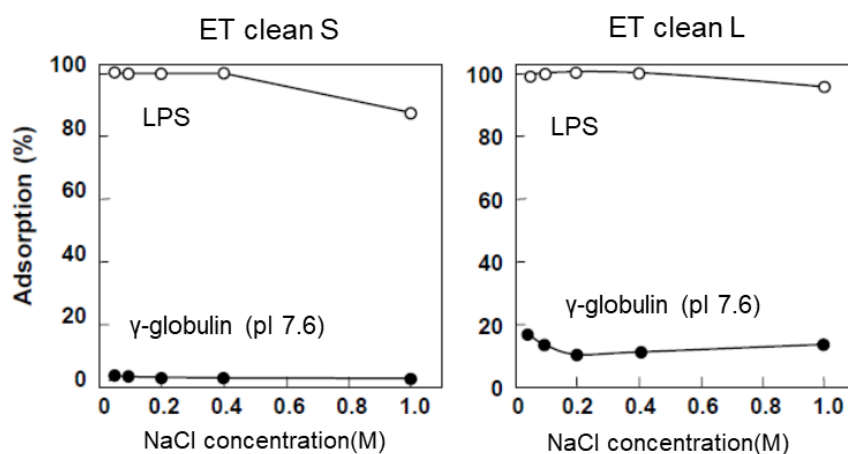


図 5 γ グロブリン (Mw160kDa) の吸着に対する塩濃度の影響

0.2 mL の湿潤ゲルに 2 ml のサンプル溶液 (γ グロブリン: 500 μ g/ml, LPS: *E. coli* UKT-B 100 EU/ml, pH 7.0 PB, NaCl:0.05-1.0 (M)) を添加し上清を分析 (バッチ法)

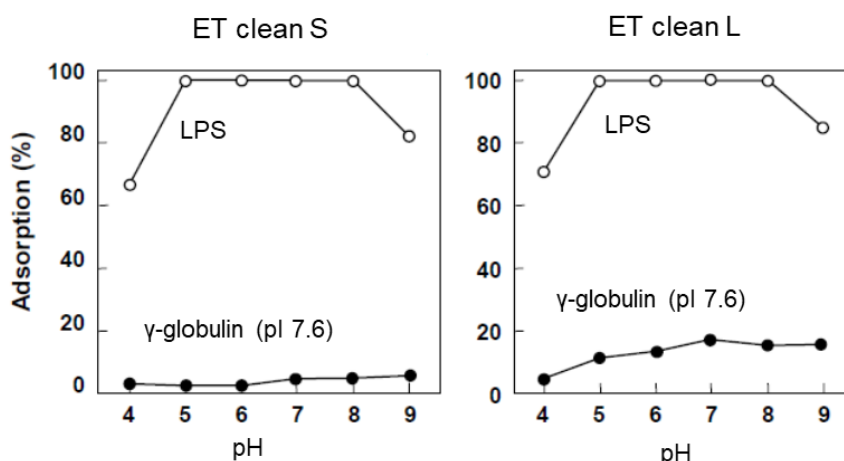


図6 エンドトキシン (LPS) の吸着に対する pH の影響

0.2 mL の湿潤ゲルに 2 mL のサンプル溶液 (γグロブリン: 500 μg/ml, LPS: *E. coli* UKT-B 100 EU/ml, pH 4-9, イオン強度 μ: 0.05) を添加し上清を分析 (バッチ法)

溶出バッファー: 吸着バッファーに 1~2M の NaCl を加え、グラジエント溶出により 0.5 M 程度まで塩濃度を増加させて溶出する (5~10 CV)。目的サンプルが溶出されない場合には、更に高濃度の NaCl を流すか、バッファーの pH を変える。NaCl の直線的グラジエントの他にも、NaCl 濃度のステップワイズ溶出や pH グラジエント、pH ステップワイズによる溶出も可能です。

サンプルの準備とサンプルロード

サンプルのイオン強度は吸着バッファーと同等かそれ以下に調製し、濃度は 1~20 mg/ml を推奨します。低濃度またはサンプル量が少量過ぎる場合、回収できない場合があります。不溶物は遠心分離かフィルターによって除去し、必要であれば、脱塩フィルターや透析、セルファイン GH-25 などの脱塩カラムでバッファー交換してください。

推奨する操作流速

線速 10~50 cm/h を推奨します。

安定性

使用する pH は 2~13 の範囲で、使用温度は 4~25℃を推奨します。オートクレーブによる滅菌は推奨しません。5 回の再生は可能です。

推奨保存方法

未開封の製品は 2～8° C で保管してください。凍結しないでください。開封後のスラリーおよびカラムの状態、20%エタノールに置換して 2～8°C で保存されることを推奨します。

参考文献

- 1) Masayo Sakata, PhD, Yoshihisa Yamaguchi, Chuichi Hirayama, PhD, Ivars Bemberis, Masami Todokoro, PhD, Masashi Kunitake, PhD, Minoru Nakayama, BioPharm International, 2005, Volume 18, Issue 1

ご注文情報

製品名	容量	カタログ No.
セルファイン ET クリーン L	5 x 1 mL (ミニカラム)	20051
	1 x 5 mL (ミニカラム)	20015
	10 mL	681 984 324
	50 mL	681 984 326
	500 mL	681 984 328
セルファイン ET クリーン S	5 x 1 mL (ミニカラム)	20151
	1 x 5 mL (ミニカラム)	20115
	10 mL	682 985 324
	50 mL	682 985 326
	500 mL	682 985 328

購買/技術サポート

(北米)

JNC America Incorporated
555 Theodore Fremd Avenue, Suite C-206
Rye, NY 10580 USA
TEL: 914-921-5400
FAX: 914-921-8822
E-mail: cellufine@jncamericany.com

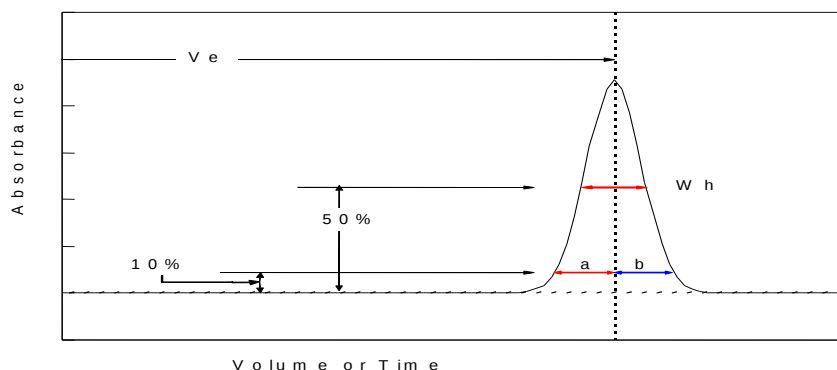
(日本、アジア、その他)

JNC 株式会社
ライフケミカル事業部
〒100-8105
東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号
新大手町ビル 9 階
Tel: +81-3-3243-6150
Fax: +81-3-3243-6219
E-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

付録 1: セルファイン充填後のカラム評価方法

カラムの充填状態は理論段プレート数 (N)、理論段数相当高さ (HETP)、非対称性 (As) などの指標を使用して評価します。これらの評価指標は、測定条件の影響を受けます。たとえばカラムの直径/高さの違い、配管、溶媒サンプル量、流速、温度などの変化などによって変化します。したがって、毎回同じ測定条件を使用してカラム充填後の評価を行って同等性を確認する必要があります。評価時の流速は 30cm/h を推奨しますが、速度を速くする事は可能です。ただし速い程理論段プレート数 (N) は低くなる傾向があります。カラムを評価するためには毎回同じ条件（流速、カラムサイズ、移動相、サンプル）で測定する必要があります。

パラメータ	条件
サンプルロード量	カラム体積の 1 -2.5%の液量
サンプル組成	1-2 % (v/v) アセトン（移動相：水）
	1 M NaCl（移動相：0.1-0.2M NaCl 溶液）
流速 (cm/h)	30 cm/h
検出器	吸光度 OD 280nm（アセトンの場合） 電気伝導度（NaCl の場合）



L	カラム高さ [cm or m]
V_e	溶出時間（または溶出体積）
W_h	ピーク高さの半値時のピーク幅
a, b	ピーク高さの 10%高さにおける (a) 中心より前半部のピーク幅 (b) 中心より後半部のピーク幅
注意	単位は合せて計算すること。

計算式

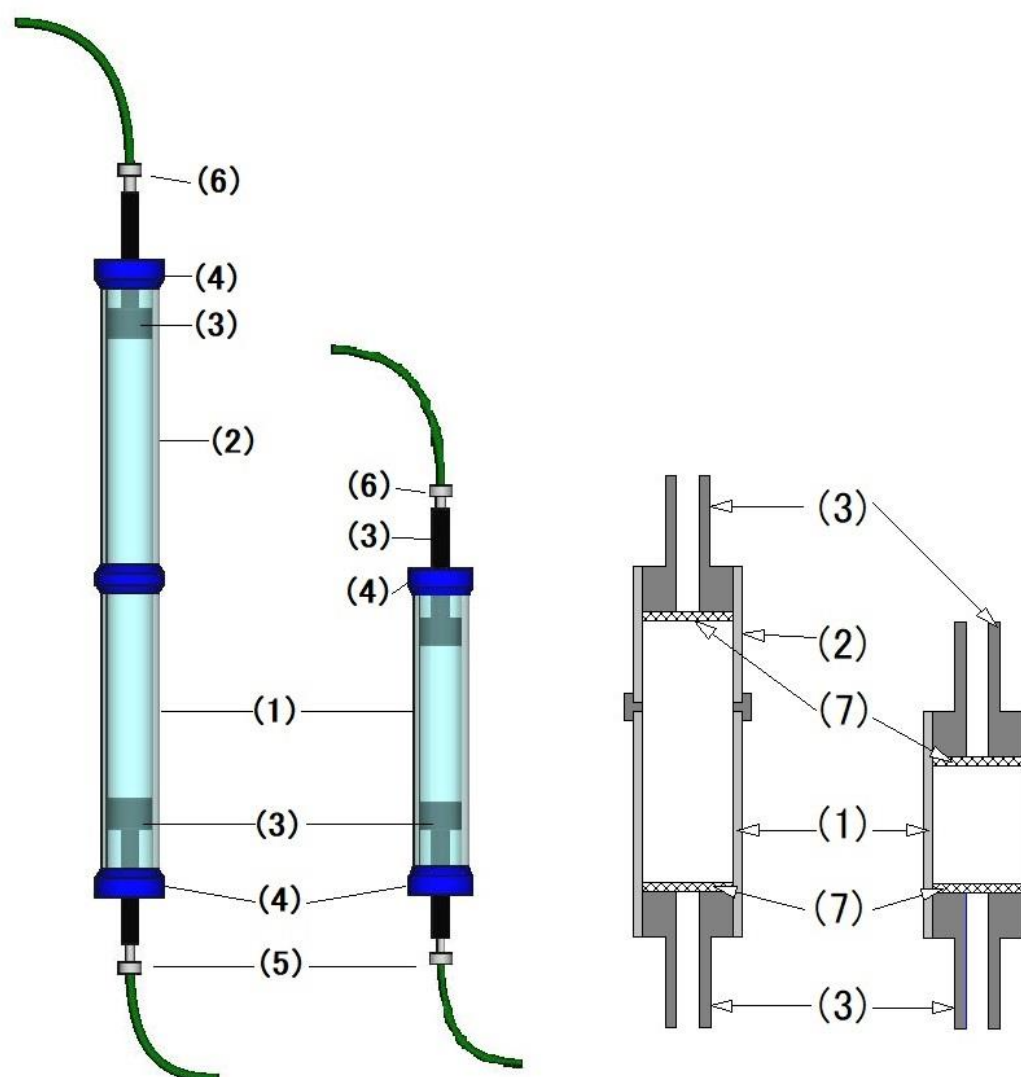
$$HETP = L/N$$

$$N = 5.54 \times (Ve/Wh)^2$$

$$As = b/a$$

一般的に、理論段数は 3,000N/m を超えていれば良好とされております。また As は 0.7 ~ 1.5 の範囲にあれば良い状態だとされております。

付録 2 : 一般的なカラムの図面



本取扱説明書では、右に示した簡単なカラム断面図をつかって説明しています。

(1)	カラムチューブ	(4)	カラムエンド
(2)	リザーバー	(5)	カラム出口
(3)	アダプター	(6)	カラム入口
(7)	フィルター（フリッツ）		

付録 3 : ET クリーンによるエンドトキシンフリーバッファの調製

ET クリーン L はバッファ中から簡単にエンドトキシンを除去できます。市販のポリミキシン固定化充填剤や陰イオン交換体のセルファイン A-500 よりも簡単に LPS を低濃度まで減少させることができます。

材料

- ・ カラム : ET クリーン L を充填したカラム (9mm I.D. x 100mm)
- ・ ポンプ : シリコンチューブ、ペリスタルティックポンプ
- ・ バッファー : 1M リン酸ナトリウムバッファー、pH 7.0 (2.6 EU/ml LPS を含む)
- ・ 乾熱滅菌ガラス試験管
- ・ LAL 試験キット : 各社のエンドトキシン測定試薬を用意する

事前洗浄

“カラムの脱ピロジェンと平衡化”を参考にしてください。

バッファのエンドトキシンフリー化

- 1) 流速 30ml/h (滞留時間 12.8 分、線速 47cm/h) でカラムにバッファを流す。
- 2) 1 CV 毎に溶出液を分取する。(CV=カラムボリューム)
- 3) LAL 試薬を使用して、溶出液中のエンドトキシン濃度の分析をする。

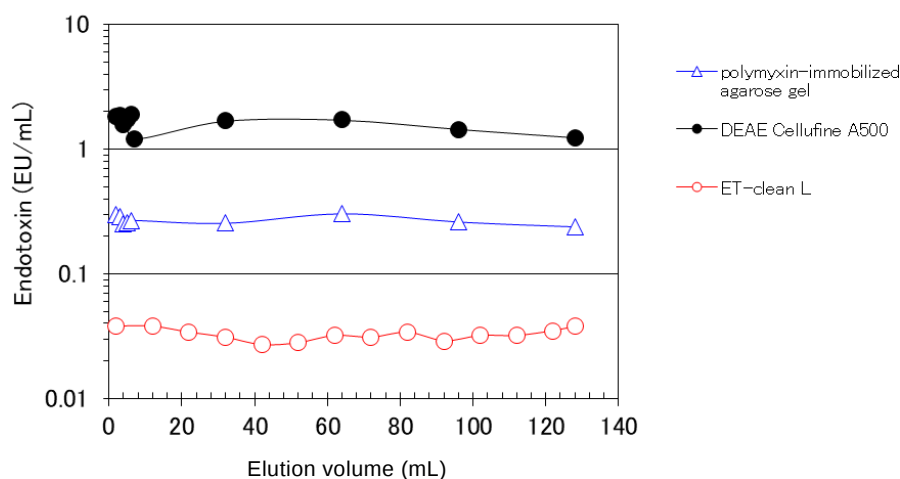


図 1 1M リン酸バッファからのエンドトキシンの除去性能の比較

付録 4：エンドトキシン除去実験法（バッチ法）

エンドトキシン除去用充填剤「ET クリーン」を用いたエンドトキシン除去実験（バッチ法）についての一般的な操作方法を紹介する。

材料

- ・ ガラスろ過器/ガラスフィルター：乾熱滅菌でエンドトキシシンフリーにできる。
- ・ 薬さじ（スパーテル）：金属製
- ・ 駒込ピペットあるいはパスツールピペット：ガラス製
- ・ 浸漬用の容器：ビーカーやガラス瓶
- ・ 保存用容器：ガラス瓶あるいはパイロジェンフリーのプラスチック容器
- ・ アルミ箔：家庭用のもので可
- ・ 三角フラスコ：10mL～20mL
- ・ シリンジ：注射用ディスポーザブルシリンジ 1～2.5mL
- ・ メンブランフィルター：シリンジ接続タイプでパイロジェンフリーのもの推奨
- ・ LAL 試験キット：各社のエンドトキシシン測定試薬を用意する
- ・ 水：実験用の超純水製造装置で作られたものを使用する場合は、事前に水のエンドトキシシンが十分に低いか調べておく必要がある。注射用蒸留水であればエンドトキシシンの心配はない。

操作

器具のエンドトキシシンフリー化操作¹

- 1) ガラス器具類は清浄に洗浄した後、乾燥させる。開口部をアルミ箔で被い 250℃/3 時間の乾熱滅菌を行う。
- 2) 金属類（スパーテルなど）は清浄に洗浄した後、乾燥させアルミ箔で被い 250℃/3 時間の乾熱滅菌を行う。
- 3) アルミ箔は、適当な大きさ（5cm 角程度）に切りそろえて、ガラス製あるいは金属製シャーレなどの容器に入れて 250℃/3 時間の乾熱滅菌を行う。

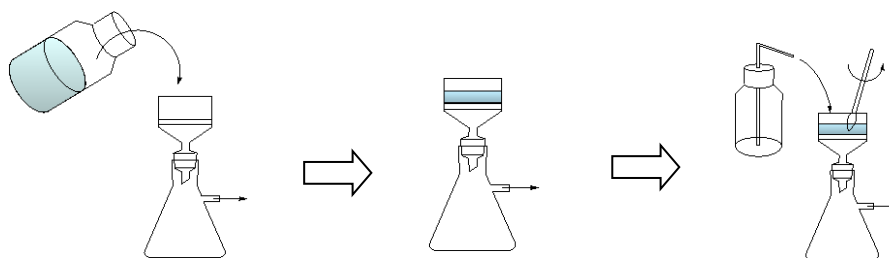
ゲルのエンドトキシシンフリー化操作

- 1) ET クリーンは 20%エタノールが保存液として入っている。まずボトルを攪拌して充填剤をスラリー化する。ガラスフィルターに適量を入れ吸引ろ過する。純水でエタノ

¹ 乾熱滅菌した器具は温度が十分低くなってから取り出すようにしてください。

ール臭が無くなるまで、吸引ろ過する。

- 2) 0.2mol/L NaOH/20% EtOH²⁾を実験用超純水で調製する。
- 3) 水洗したガラスフィルター上の充填剤に対し、0.2mol/L NaOH/20% EtOHを完全に浸るまで加える。薬さじで軽く攪拌し、吸引ろ過する。このアルカリ洗浄を3回行う。
- 4) 吸引ろ過によってアルカリ水溶液を除去する。（吸引ろ過時間は、フィルター出口から液がほとんどでなくなる程度が適当。）充填剤を浸漬用のビーカーあるいはネジロビンへ入れ、充填剤の体積のおよそ2倍量の0.2mol/L NaOH/20% EtOHを加え、4℃～25℃で一晩（およそ3時間以上）放置する。
- 5) アルカリ中に放置した充填剤は、乾熱滅菌したガラスフィルターで再び0.2mol/L NaOH/20% EtOHでろ過洗浄（3回）を行い、PF水で中性になるまでろ過洗浄する。この段階の洗浄場所はクリーンブース、クリーンベンチなど落下菌の無い環境が望ましい。中性の確認はpH試験紙やpHメーターで行い、pH8以下を目標にする。
- 6) 使用する緩衝液を用いて、フィルター出口のpHが緩衝液と同じになるまでろ過洗浄を行い、平衡化をする。
- 7) 平衡化後のろ過液のエンドトキシンを測定しエンドトキシンフリーを確認する。最後のろ過の際は、10分～15分間吸引を続けてろ液を出し切る。この状態の充填剤で湿重量を量りその時の重さをg-wetで表す。
- 8) エンドトキシンフリーにした充填剤はすぐに秤量しバッチ実験に用いるか、乾熱滅菌した容器に移し密閉保存する。長期保存の場合は、PF水、平衡化バッファーを加えて密閉保存（4℃程度）する。



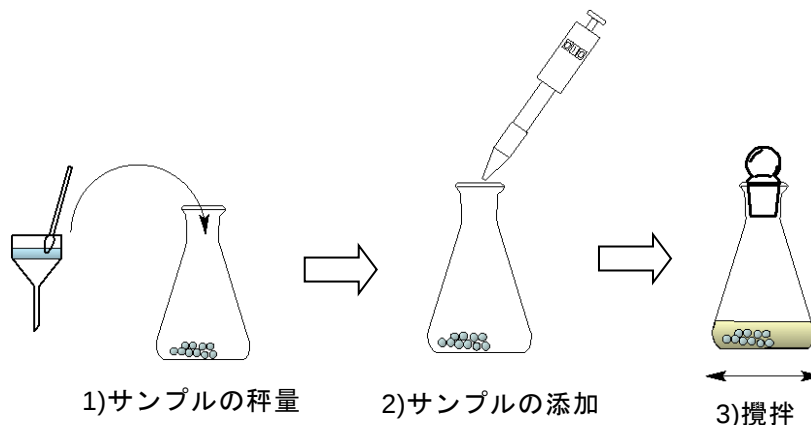
² NaOH水溶液は目に入ると失明の恐れがあるので、保護めがね（ゴーグルタイプを推奨）を着用して操作ください。20%EtOHを95%に変更すると、放置時間は1時間以上でエンドトキシンフリーにできる。

バッチ吸着実験

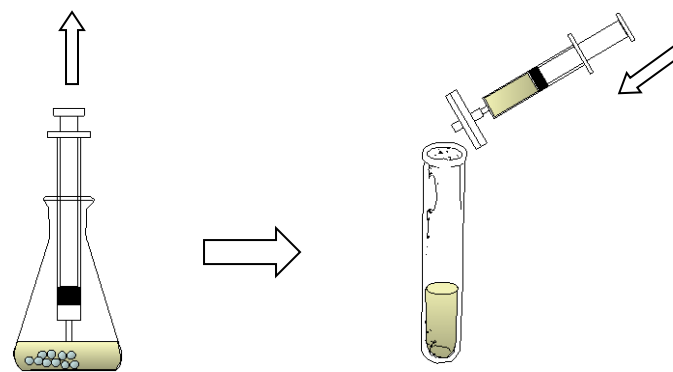
塩濃度を変えて、タンパク質の吸着量とエンドトキシンの吸着量を測定し、最適な塩濃度を設定する。

表 1 サンプル系列の例（サンプル希釈率 75%）

最終塩濃度 mol/L	サンプル mL	4M NaCl mL	PF水 mL
0.00	1.5	0.000	0.50
0.05	1.5	0.025	0.48
0.10	1.5	0.050	0.45
0.20	1.5	0.100	0.40
0.30	1.5	0.150	0.35
0.40	1.5	0.200	0.30
0.50	1.5	0.250	0.25
0.60	1.5	0.300	0.20
0.70	1.5	0.350	0.15
0.80	1.5	0.400	0.10
0.90	1.5	0.450	0.05
1.00	1.5	0.500	0.00



- 1) エンドトキシンフリーにしたゲルを、10～20mL の三角フラスコに 0.2g を量り入れる。
- 2) 表 1 で調製したサンプルを秤量したゲルに 2mL 加える。
- 3) 栓あるいは、滅菌アルミ箔で口を被い、攪拌を行う。攪拌時間は通常 2 時間で温度は 25℃で行うが、サンプルが熱に不安定の場合は低温で行う。
- 4) 注射用シリンジを使って液を吸い上げる。吸い上げた液は、シリンジに付けたメンブランフィルターでろ過する。
- 5) ろ過液は先ずエンドトキシンの定量を行い、残液でタンパク質の定量を行う。



4) 吸い上げとろ過

注意事項

- ・ ブランクテストは、吸着剤ゲルの代わりにパイロジェンフリー水を 0.2mL 加えて、それ以外は同様に操作する。
- ・ 表 1 の最終イオン強度は緩衝液のイオン強度を考慮していない。事前にサンプル緩衝液濃度を 0.01~0.05mol/L 程度に調製しておく。
- ・ 4mol/L NaCl を 100mL 作る場合は 23.4g の NaCl を量りパイロジェンフリー水で 100mL にする。よりエンドトキシン濃度が低いものを調製する場合は、23.4g の NaCl を 100mL メスフラスコに量り入れて、250℃、3 時間乾熱滅菌してからパイロジェンフリー水で 100mL に溶かす。
- ・ 攪拌を効率的にするには、旋回型の攪拌やロータリー型の攪拌が有効である。また、テフロン被覆された回転子は 250℃3 時間乾熱滅菌したのちにマグネチックスターラーで攪拌することも可能である。
- ・ タンパク質の定量は紫外部 280nm の吸光度から求めるほか、各種比色定量法で求める。また活性等を測定するために、試験液が 2mL で不足する場合は表 1 の液量を適宜比例倍して実験する。その際充填剤量も同様に増やす。
- ・ この実験では試験液量と充填剤量の比率は 10 倍に設定しているが、エンドトキシン濃度によって適宜変更してよい。
- ・ pH の影響を調査する実験では、PF 水で洗浄したゲルを使用する。事前にサンプルは各 pH のバッファーに交換しておくことが必要。

付録 5 : エンドトキシン除去実験法 (カラム法)

エンドトキシン除去用充填剤「ET クリーン」を用いたエンドトキシン除去実験 (カラム法) の事例を 2 つ紹介する。

事例 1

1mL のカラムにエンドトキシンを含む牛血清アルブミン (BSA : 等電点 4.9) 溶液を送液した。溶出液を試験管に回収し、エンドトキシンと BSA 量を測定した。BSA は等電点の低い酸性タンパク質であるが、バッファーに NaCl を添加することでカラムへの吸着を低減でき、ET クリーンに吸着せずほぼ 100%回収することができた。一方で、エンドトキシンは ET クリーンに吸着し、1/1000 の濃度に低減できた。ET クリーンに対し選択的にエンドトキシンが吸着し、低エンドトキシンの BSA 溶液を得ることができた。

材料

- ・ カラム : ET クリーン L を充填したカラム (11mm I.D. × 10mm ⇒ 1mL)
- ・ ポンプ
- ・ バッファー : 50 mM リン酸バッファー pH7.0 + 0.15M NaCl
- ・ 乾熱滅菌ガラス試験管
- ・ サンプル : エンドトキシン 100EU/mL を含む BSA 1mg/mL 溶液 150mL

事前洗浄

“カラムの脱ピロジェンと平衡化”を参考にしてください。

送液条件

- ・ 流速 0.17mL/min (10cm/h)

分析条件

- ・ BSA 濃度 : Abs. 280 nm
- ・ エンドトキシン濃度 : LAL 試験法

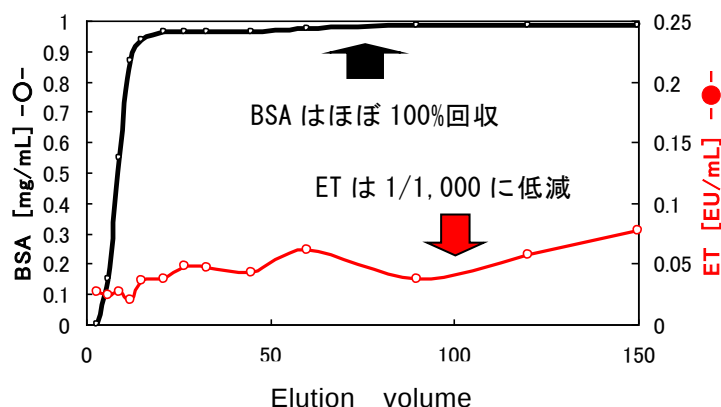


図 1 BSA 溶液からエンドトキシンの除去 (カラム法)

事例 2

9.6mL のカラムにエンドトキシンを含むリゾチーム(等電点：11)溶液を送液した。吸着バッファーによる洗浄後、NaCl を用いたグラジエント溶出を実施した。溶出液を試験管に回収し、エンドトキシンとリゾチーム量を測定した。リゾチームは ET クリーンに吸着せず回収された一方で、エンドトキシンは ET クリーンに吸着し、NaCl 濃度を上げるグラジエントによる溶出で回収された。ET クリーンに選択的にエンドトキシンが吸着し、低エンドトキシンのリゾチーム溶液を得ることができた。

材料

- ・ カラム : ET クリーン L を充填したカラム (9 mm I.D. × 100 mm ⇒ 9.6 mL)
- ・ ポンプ
- ・ 吸着バッファー: 1 mM Tris-HCl バッファー pH7.3
- ・ 溶出バッファー: 1 mM Tris-HCl バッファー pH7.3 + 1.0 M NaCl
- ・ 乾熱滅菌ガラス試験管
- ・ サンプル: エンドトキシンを含む リゾチーム 14 mg/mL 溶液 1 mL

事前洗浄

“カラムの脱ピロジェンと平衡化”を参考にしてください。

送液条件

- ・ 流速 0.5 mL/min (47 cm/h)

分析方法

- ・ リゾチーム濃度 : Abs. 280 nm
- ・ エンドトキシン濃度 : LAL 試験法

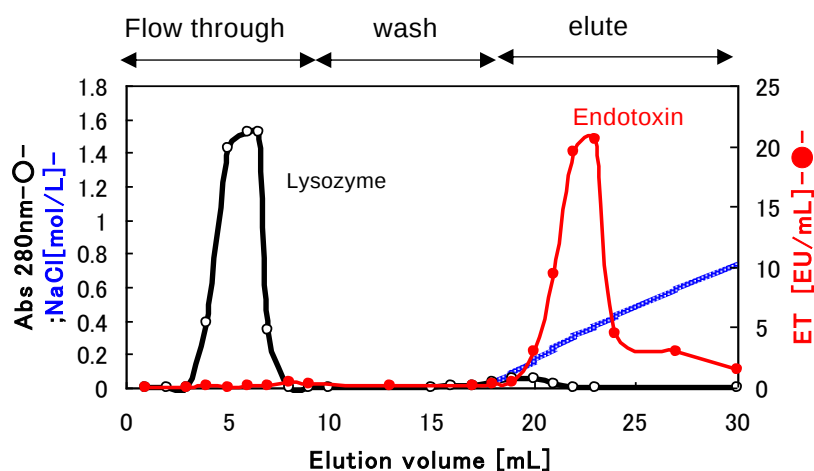


図2 リゾチーム溶液からエンドトキシンの除去(カラム法)