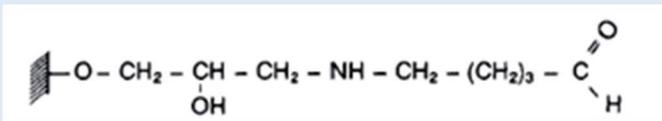


Cellufine™ ホルミル

アフィニティークロマトグラフィーは生物学的な特異的親和性を利用するために、ゲルろ過やイオン交換と比較して高い精製効率を得ることができます。従来、アフィニティリガンドを担体へ固定化するためにはCNBrやNHSで活性化したアガロースが使用されてきましたが、物理的強度が弱い、毒性が強い、不安定である等の欠点があります。これらの欠点を改良した新しい担体がセルファインホルミルです。安定性の高いセルロース骨格のため非特異的吸着が少なく、リガンドリークが少ない特長を備えています。十分な細孔サイズがあるため、大型カラムでも高流速での通液が可能です。

表1 セルファインホルミルの性能と特徴

	Cellufine Formyl
リガンド	 <p>ホルミル（アルデヒド）基</p>
ベース担体	真球状架橋セルロース粒子
粒径	125 - 210 μm
排除限界分子量 (kD)	4,000
ホルミル基量 (μmol/mL-gel)	15-20
タンパク質最大固定化量 (mg/mL-gel)	40 (タンパク質の種類と反応条件によって異なる)
スペーサー長 (原子)	8 原子
推奨操作圧力	<0.1 MPa
担体密度	0.7g/ml wet

保存液	0.01 % 2, 2-thio-bis (pyridine-1-oxide)含有 0.2M 酢酸 Na バッファー,pH3.0,
-----	--

※表 1 に記載の数値は規格値を示すものではありません。

一般的性質

- ・市販 4%架橋アガロース担体と同等の細孔サイズを備えるため、高分子リガンドを固定化できます。
- ・第一級アミノ基を持つリガンドを固定化できます。
- ・未反応のホルミル基は簡単に水酸基へと還元できるため、非特異的吸着が少なくなります。
- ・親水性スパーサーによってリガンド性能の効率化が図れます。また親水性スパーサーは非特異的吸着が少ない特長を持ちます。
- ・簡単なカップリング反応のため特別な装置を必要としません。また反応は温和に進行しますので担体へのダメージはありません。
- ・リガンドの固定化は反応時間が短く、温和な条件で反応します。
- ・担体は温度に安定性があるため高温で反応できます。
- ・未反応の担体でも長期間保存ができます。

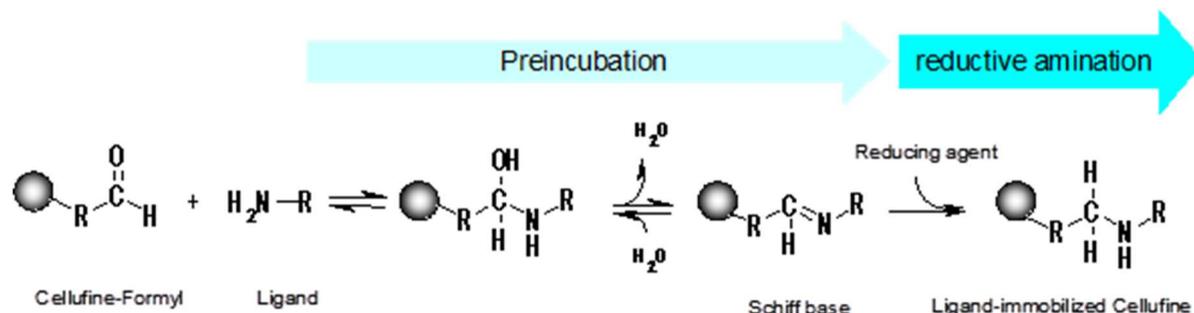
表2 セルファインホルミルの固定化分子と精製例

固定化分子	精製対象
抗体	抗原
抗原	抗体
プロテイン A, G	抗体
レクチン	炭化水素、糖タンパク質
サイトカイン	レセプター
各種酵素	基質/反応物

カップリングの機構

セルファインホルミルは、リガンドの第一級アミン基と反応してシッフ塩基錯体を形成します。穏やかな還元剤を使用して、シッフ塩基を安定した共有結合に変換します。還元剤は、妥当な反応速度を生み出すように選択する必要があります。ジスルフィド結合の還元などによってタンパク質リガンドを損傷する場合、または担体のアルデヒド基を還元する場合は強くない還元剤を選択します。

セルファインホルミルの反応速度は十分な速さですが、ほとんどのタンパク質に対して穏やかな条件で反応できます。また細かい制御も可能です。反応速度は温度で効果的に制御することができ、タンパク質の安定性を実現します。固定化反応時の有効な pH 条件は 3~10 の範囲です。



固定化効率（固定化されたりガンド量と反応に使用したりガンド量の比率）と、担体へのリガンド固定化濃度は、固定化リガンドの濃度、pH、温度を変更することで、簡単に最適化できます。標準的な固定化条件はほとんどの場合に問題なく機能しますが、最適化条件を探索することで、プロセス経済性を向上させることができます。

使用方法

材料

- ・セルファインホルミル
- ・固定化するリガンド
- ・カップリング緩衝液：第1級アミノ基を含まない緩衝液、pH4~11の範囲で、0.2Mのリン酸緩衝液、酢酸緩衝液、HEPES緩衝液、等
- ・ブロッキング緩衝液：0.2M、Tris-HCl緩衝液、pH7.0または1M glycine ethyl esterか1M ethanolamineを含む0.2Mリン酸緩衝液、pH7.0
- ・還元剤(下の一覧表を参照し選択する)

表3 還元剤の種類と特徴

還元剤名	長所	短所	注意点	使用 pH
シアノ水素化ホウ素 ナトリウム (SCBH, Sodium cyanoborohydride) NaCNBH ₃	タンパク質、アルデヒドに対し、ほとんどダメージがない。	毒物	ドラフト内使用。 廃液処理は確実に行う。	pH4 以上

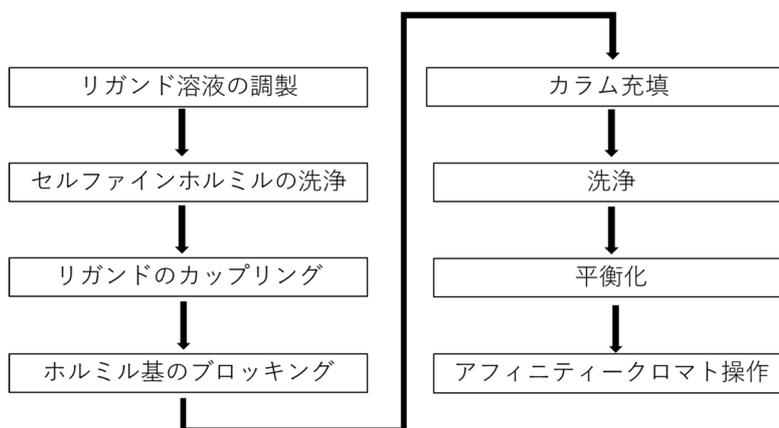
<p>トリメチル アミンボラン (TMAB, Trimethylamjne borane) (CH₃)₃NBH₃</p>	<p>毒性が弱い。 還元力が弱く、タンパク質に与えるダメージがほとんどない。</p>	<p>水に溶けにくい。 (水に対する溶解度 1.3%)</p>	<p>リガンドとセルファインーホルミルをあらかじめ 1~2 時間振とう後、TMAB を加える。</p>	<p>pH5 以上</p>
<p>水素化ホウ素 ナトリウム (SBH, Sodiumborohydr ide) NaBH₄</p>	<p>遊離アルデヒドのブロッキングが不必要。毒性が弱い。</p>	<p>還元力が強いいためホルミル基の不活化を起こす。特殊タンパク質 (S-S 結合を含む等) には使用不可。</p>	<p>TMAB と同じ。</p>	<p>pH7 以上</p>

※SCBH には微量の SBH が含まれています。各種還元剤により一長一短があります。リガンドの性質、使用量、経済性を考慮して選択して下さい。

カップリング方法 (ゲル 1mL の調製法)

・ 洗浄

- 1) セルファイン ホルミルの容器を良く振って、均一のスラリーにする (およそ 50%スラリーになる)。
- 2) スラリーを 2 mL を計り取り、デカンテーションから過洗浄で酢酸臭がなくなるまで、純水で洗浄する。吸引ろ過によって 15 分程度放置したゲルケーキは 0.7~0.8 g がおよそ 1mL になります。



- 3) 反応容器にゲルを入れ、直ぐにカップリング操作を開始する。

・ カップリング

- 1) リガンドを含んだカップリング緩衝液を調製する。液量は 1~2mL (リガンド濃度は、” カップリングの条件” を参照) 使用する。

- 2) 1mL のゲルに対し 1~2 倍量のカップリング緩衝液を用い、プレインキュベーションとして 1 時間~2.5 時間反応させる。(SCBH を使用する場合はプレインキュベーションは必須ではない) 反応は振盪、あるいは緩やかなマグネチックスターラーでの攪拌で、リガンドの安定性に適した温度で実施する。
- 3) 還元剤 (7mg) を加え、さらに 2~16 時間反応する。(還元剤は 5~10mg を使用する。粉末の代わりに、50~100mg/mL の還元剤の溶液を 0.1mL 加えても良い。)
- 4) デカンテーション及びろ過洗浄によって、反応液をゲルから取り除き、およそ 20mL のカップリング緩衝液で数回洗浄する。必要であれば反応液と洗浄液を回収し、液中に残存するリガンド濃度を定量する。(回収液中の残存リガンドと、調製した反応液のリガンド濃度差からゲルにカップリングしたリガンド量を求める事ができる。)
- 5) 洗浄したゲルにブロッキング緩衝液を 2 mL と還元剤 7mg (※4 と同じ量) を加えて 2 時間反応させる。(還元剤が SBH の場合、ブロッキング操作は不要)
- 6) デカンテーション及びろ過洗浄によって、反応液をゲルから取り除き、カップリング緩衝液や純水で洗浄する。(洗浄にはおよそ 20mL の緩衝液か純水を使用し数回に分けて洗う)
- 7) リガンドに対して適当な緩衝液に懸濁し、低温保存する。

・アフィニティークロマトグラフィー

- 1) リガンド固定化ゲルに平衡化バッファーを加えて、40~50%程度のスラリーにし、カラムに流し込む。
- 2) 平衡化バッファーを流し、ゲルベッドを形成させる。カラムの取扱説明書に従って、ベッドサポートなどをセットして、さらに平衡化を進める。
- 3) サンプルを流して目的物質を吸着させ、吸着バッファーを流して残った不純物を洗浄する。
※アフィニティークロマトグラフィーで用いる吸着バッファー、溶出バッファーは、主にリガンドの性質に依存する。
- 4) 不純物を十分洗浄した後、溶出バッファーを流して、目的物質を回収する。
- 5) カラムの洗浄と再生を実施する

※洗浄と再生について

セルファイン自体、酸、アルカリ、有機溶媒等に対し安定であるため、洗浄、再生条件はリガンドの安定性に依存します。特にリガンドがタンパク質の場合、過酷な条件は使用できません。しかし、洗浄、再生がうまくいかないと、繰り返し使用しているうちに、汚れが蓄積し分離に影響する可能性があります。このため、ゲルを長時間反復使用する場合は、洗浄、再生を確実にを行う必要があります。リガンドが安定な酸性緩衝液とアルカリ性

緩衝液の両方あるいは一方で洗浄します。以下に一般的な洗浄、再生の方法を述べます。

約10倍量の0.5M 酢酸バッファー(pH3.0)で洗浄後、約10倍量の0.5M リン酸バッファー(pH9.0)で洗浄を行う。最後に約10倍量の平衡化(吸着)バッファーで平衡化を実施する。

カップリングの条件

アフィニティークロマトグラフィー担体の調製は、カップリング時のリガンド濃度、温度、pH等の影響を受けるため、最適条件を検討する必要があります。以下に各条件について述べます。

【リガンド濃度】

Fig1. を参照下さい。

①高濃度のカップリング溶液(20mg/mL以上)を使用する場合

- ・高濃度のリガンド結合量(約15mg/mLgel以上)を得たい。
- ・目的物質が低分子であり、単位ゲル当りの目的物質の回収量を多くしたい
- ・リガンドが安く多量に干に入る。

②低濃度のカップリング溶液(20mg/mL以下)を使用する場合

- ・目的物質同志の立体障害が考えられ、低濃度のリガンド結合量(約15mg/mLgel以下)を得たい。
- ・リガンドが高価なため、カップリングに用いた量をほぼ100%利用したい。

【カップリング緩衝液のpH】

Fig2. を参照下さい。

タンパク種により最適pHが異なります。リガンドのpH安定性、利用率を考慮して選択してください。一般に、等電点より高いpHを用いることで、高い利用率が得られます。

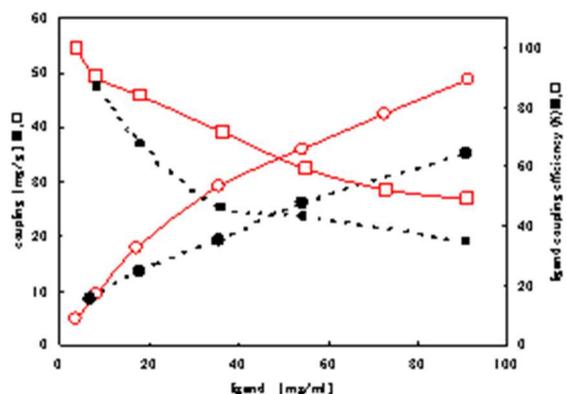


Fig.1 The effect of the concentration of ligand in the coupling reaction.

○ hγGlo. Coupling ● HSA coupling
 □ hγGlo. Coupling ratio ● HSA Coupling ratio

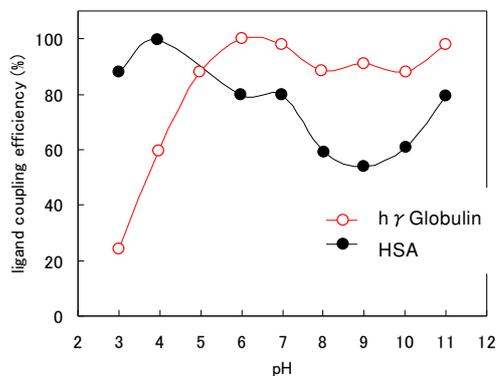


Fig.2 The effect of pH of coupling buffer on the amount of ligand coupled to the gel

【反応温度とインキュベーション時間】

Fig3. を参照下さい。

- ① 高温ではカップリング量が多くなりますが、リガンドがタンパク質の場合変性する可能性も大きくなります。リガンドに適した温度を選んで下さい。
- ② リガンドが変性し易いか、あるいは低濃度のリガンド結合量（約 10mg/mLgel）で良い場合は、インキュベーション時間は 2～4 時間で充分です。
- ③ できるだけ多量のリガンドを結合させたい場合、4 時間以上の振とう時間が望ましいです。

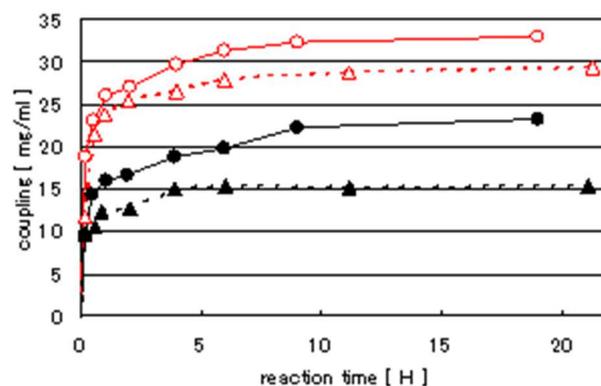


Fig3 The relation between the time for coupling reaction and the quantity of coupled protein.

—○— hγ Globulin(30°C) - -△- - hγ Globulin(4°C)
—●— HSA(30°C) - -▲- - HSA(4°C)

【プレインキュベーション時間】

より多くのリガンドをカップリングさせるためには、還元剤を添加するまでに、できるだけシッフ塩基を形成させておく必要があります。プレインキュベーション時間は 1.5～2.5 時間必要です。

水酸化シアノホウ素ナトリウム(SCBH)の廃液処理方法

SCBH の取扱や廃棄方法は、製造企業や試薬販売会社の MSDS を参照ください。下記に SCBH の処理方法を参考までに記載します。

注意事項

- (1) 操作はドラフト内で行う。

方法 1

- (1) SCBH 使用後の反応液と一次洗浄液をビーカーに入れる。
- (2) 次亜塩素酸カルシウムの強アルカリ溶液に、侵蝕しながら加える。この時、過剰の NaOH と次亜塩素酸カルシウムが残存するようにする。
- (3) 24 時間放置した後、廃液として処分する。

方法 2

- (1) SCBH 使用後の反応液と一次洗浄液をビーカーに入れる。
- (2) NaOH 溶液でアルカリ性にする。
- (3) これに過剰の硫酸鉄 (II) 溶液を加え、1 時間放置した後、廃液して処分する。

目的物質の準備とサンプルロード

アフィニティークロマトグラフィーに使用するサンプルの濃度は 1~10 mg/ml 程度に調製する。遠心分離またはフィルターにより不溶物を除去する。必要であれば、脱塩フィルターや透析、セルファイン GH25 等の脱塩カラムでバッファー交換を実施する。

推奨する操作流速

20-150 cm/h (<0.1MPa)

安定性

塩類、ノニオン性界面活性剤、有機溶媒で使用することができる。0.1M HCl および 0.5M NaOH に耐性がある。pH 7 のバッファーにおいて 121°C、30 分のオートクレーブに耐性がある。リガンド固定化後はリガンドの性質に依存するため、安定性は異なる可能性があります。

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。長期保存する場合は、0.2M 酢酸 Na バッファー、pH3.0 を使用し 4°C で保存して下さい。保証期限は製造から 3 年となります。

ご注文情報

	容量	カタログ No.
セルファイン ホルミル	10 mL	676 944 324
	50 mL	19853
	500 mL	19854
	5 L	19855
	10 L	676 944 335

購買/技術サポート

(北米)

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

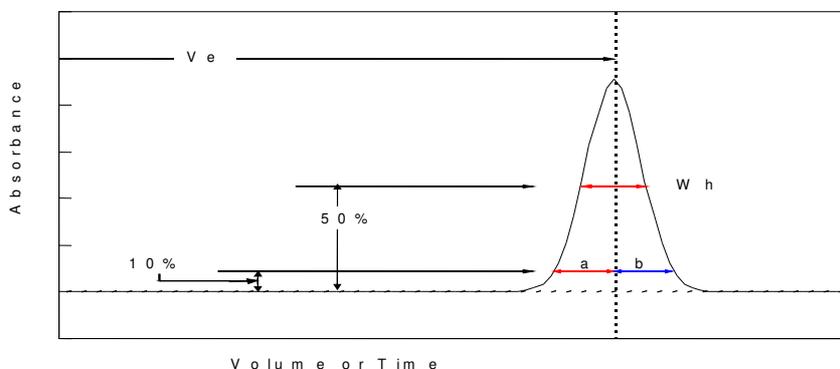
(日本、アジア、その他)

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: 03-3243-6150
Fax: 03-3243-6219
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 : 水および吸着バッファー)
	1 M NaCl (移動相 : 0.1~0.4M 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

$$\text{HETP} = L/N$$

$$N = 5.54 \times (V_e/W_h)^2$$

$$A_s = b/a$$

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 A_s 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。