

# Cellufine™ フォスフェイト HC

セルファイン フォスフェイト HC はタンパクキナーゼ、制限酵素、ヌクレアーゼ、ポリメラーゼなどの核酸関連タンパク質などを精製するアフィニティークロマトグラフィー充填剤です。真球状のセルロース粒子にリン酸エステル基がリガンドとして修飾されています。従来のセルファイン フォスフェイトと比較して細孔サイズを制御することで分子量の大きな蛋白質の吸着量を向上させました。特に T7 RNA ポリメラーゼなど高分子酵素の精製に有効な次世代のクロマトグラフィー充填剤です。

表 1 セルファイン フォスフェイト HCの特徴

	セルファイン フォスフェイト	セルファイン フォスフェイト HC
リガンド	リン酸エステル基	リン酸エステル基
ベース担体	セルロース粒子	セルロース粒子
粒径 (μm)	40 - 130	40 - 130
排除限界分子量 (KDa)	30~40	150
イオン交換容量 (meq/mL-gel)	0.3 - 0.8	0.2 - 0.8
リゾチーム吸着量 (mg/mL-gel)	140	-
BSA 吸着量 (mg/mL-gel)	-	100
推奨操作圧力 (MPa)	<0.2	<0.2
pH 安定性	5 - 12	5 - 12
保存方法	2-8 °C in 20 % ethanol	2-8 °C in 20 % ethanol

※表 1 に記載の数値は規格値を示すものではありません。

## カラムへの充填手順

### 材料と必要器具

- ・ 充填剤
- ・ 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) 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。
- 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。

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

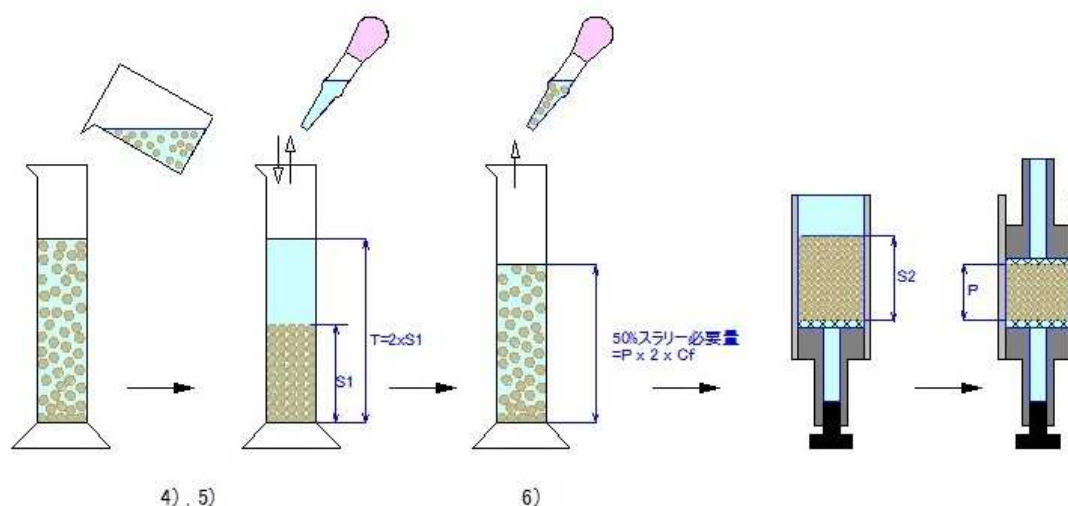


図 1 スラリー調製

- 5) スラリー濃度が 50%になるように充填液量を調節する。  $T = 2 \times S$  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。

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

$C_f$  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 $C_f$ は充填効率に重要な因子です。可働栓カラムを使用し $C_f$ 値を調節してください。セルファイン フォスフェイト HCの $C_f$ の例を以下に示します。

カラムサイズの例 (直径×ベッド高さ)	推奨 $C_f$ (純水で充填の場合)
5.0 cm × 21.7 cm	約 1.30

### 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、最初に <0.2MPa の背圧で充填液を 30~60 分通液して充填剤を沈降させる。

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 $<0.20\text{MPa}$ の背圧で通液する。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。

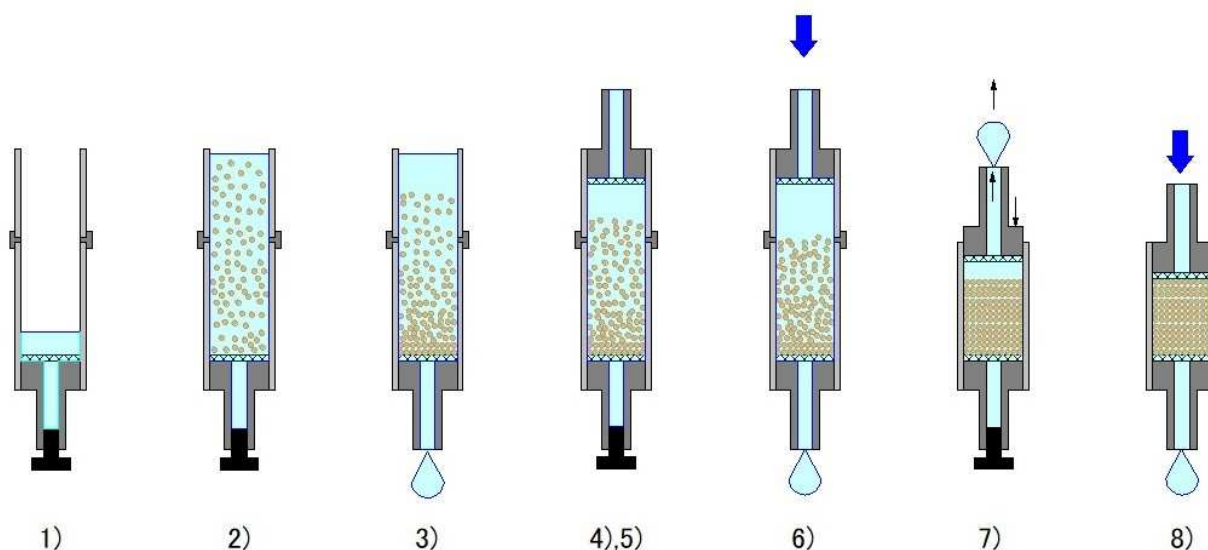


図2 カラム充填の手順

- 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。

### 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。

### 操作ガイドライン

#### 一般的な使用方法

- 1) 吸着バッファーで、カラムを平衡化する。(通常、カラム体積 (CV) の3~5倍量必要、UVや電気電動度のベースラインの安定で確認してください)

- 2) 吸着バッファーに溶解されたサンプルをロードする。
- 3) 未吸着の不純物を除去するため、吸着バッファーで数 CV 洗浄する。
- 4) 吸着した目的物質を溶出バッファーで溶出する。

## 推奨バッファー

**吸着バッファー:** 10~50mM リン酸ナトリウムバッファー、pH7 を使用する。トリスや酢酸などのバッファーも使用できる。一般的に吸着性は pH やイオン強度の影響を受ける。非特異的に吸着している夾雑物を除去する目的で、イオン強度を高くする場合がある。溶出性を向上させるために、ノニオン性の界面活性剤 (Tween®20、Triton® X など) を加えることがある。

**溶出バッファー:** 吸着バッファーに 1~2 M NaCl または KCl を加える。溶出の塩濃度を決める際には、事前にグラジエント溶出によって最適な塩濃度を定める。

## サンプルの準備とサンプルロード

サンプルは吸着バッファーに 1~20 mg/ml になるように溶解する。不溶物は遠心分離かフィルターによって除去する。必要であれば、脱塩フィルターや透析、セルファイン GH-25 などの脱塩カラムでバッファー交換しても良い。

## 推奨する操作流速

50~250cm/h

## 再生と脱パイロジェン

高イオン強度のバッファー (2.0~3.0 M NaCl) を用いる。不十分な場合は 3~10 カラム体積の 0.2 M NaOH で洗浄後に 2.0~3.0 M NaCl を含むバッファーで pH が 9 以下になるまで洗浄する。次いで吸着バッファーで平衡化する。

## 安定性

使用する pH は 5~12 の範囲で、使用温度は 2~30°C を推奨する。オートクレーブは推奨しません。

## 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。2 週間以内であれば、バルクおよびカラムの状態に 1M NaCl を含むバッファーでの保存が可能です (2~8°C)。長期保存する場合は、20 %エタノール水溶液で保存して下さい。未開封時の保証

期限は製造日から5年となります。

## 参考文献

Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 00, No. 00 1-8

Rachel Macmaster, Svetlana Sedelnikova, Patrick J. Baker, Edward L. Bolt1, Robert G. Lloyd1 and John B. Rafferty

RusA Holliday junction resolvase: DNA complex structure—insights into selectivity and specificity

## ご注文情報

	容量	カタログ No.
セルファイン フォスフェイト HC	1 mL x 5 (ミニカラム)	19400-15
	5 mL x 1 (ミニカラム)	19400-51
	10 mL	19400
	50 mL	19401
	500 mL	19402
	5 L	19403
	10 L	19405

## 購買/技術サポート

(北米)

JNC America Incorporated  
411 Theodore Fremd Avenue, Suite 206  
South Rye, NY10580  
TEL: 914-921-5400  
FAX: 914-921-8822  
E-mail: cellufine@jncamericany.com

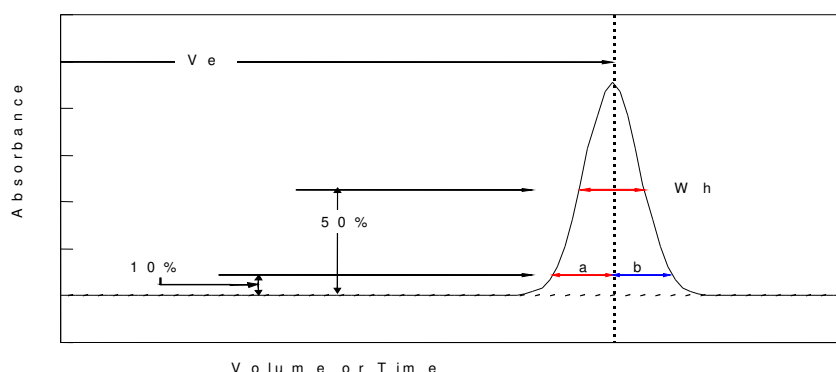
(日本、アジア、その他)

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

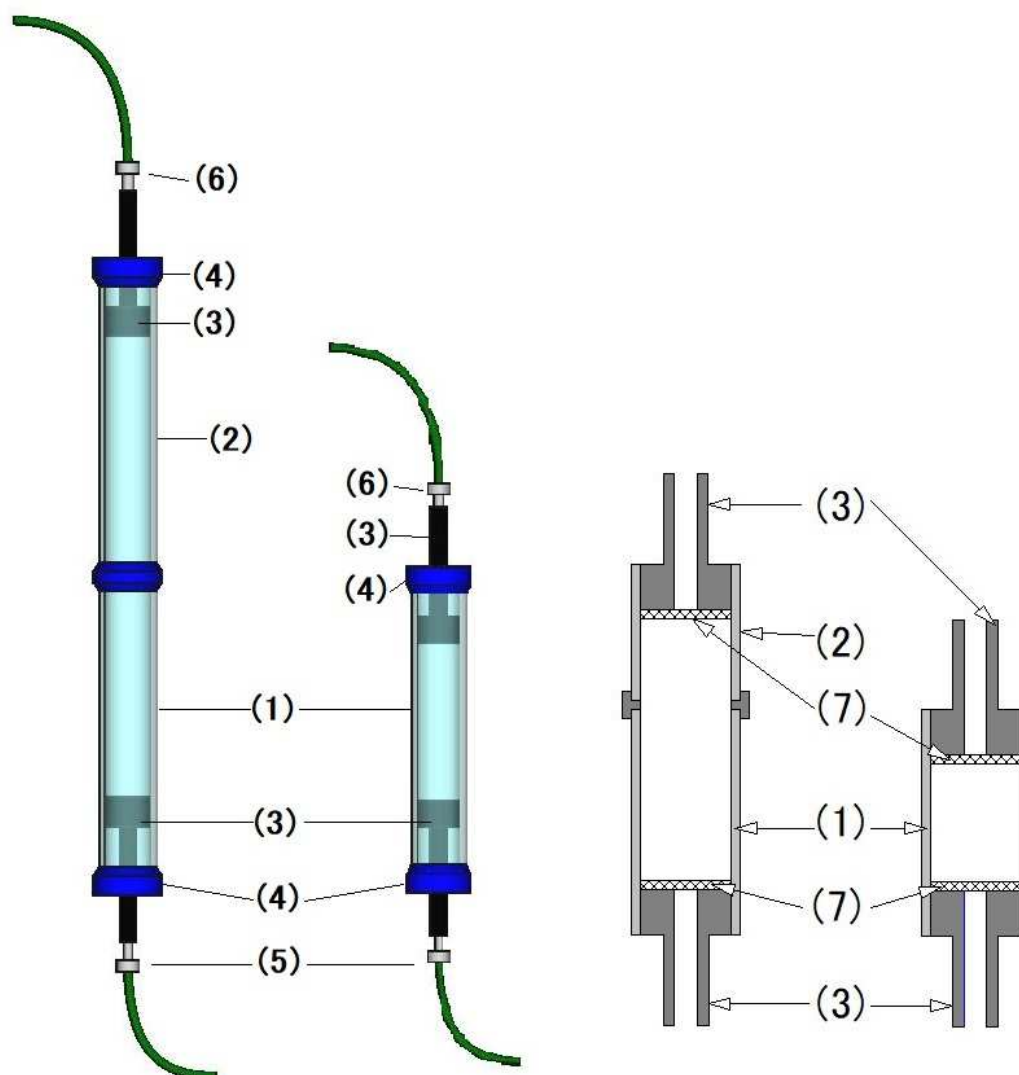
$$\text{HETP} = L/N$$

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

$$A_s = b/a$$

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。

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)		