

# Cellufine™ サルフェイト

ウイルス、ウイルス由来の抗原タンパク質、血清タンパク質およびヘパリン結合性タンパク質の精製に利用できます。セルファインサルフェイトは簡単な操作で、再現性良く精製・濃縮することができます。

ウイルス精製で使用されている密度勾配超遠心分離は時間がかかる点、再現性がとりにくい点、安全性の観点から煩雑な操作が必要ですが、セルファインサルフェイトを使用することでこれらの問題を解決できます。デキストラン硫酸、コンドロイチン硫酸およびヘパリンなどを固定化した担体と比較して、コスト、リガンドの低溶出性、再現性の観点から優れた精製パフォーマンスを発揮します。結合した目的物は、イオン強度をステップワイズまたはグラジエントによって増加させるだけで容易に溶出できます。

セルファインサルフェイトの特徴を表 1 に示します。

表 1 セルファインサルフェイトの性能と特徴

|               | 特徴                                              |
|---------------|-------------------------------------------------|
| リガンド          | 硫酸エステル基                                         |
| ベース担体         | 真球セルロース粒子                                       |
| 粒径            | 40 – 130 $\mu\text{m}$ (ca. 90 $\mu\text{m}$ )  |
| 排除限界分子量       | 3kD                                             |
| 硫黄含量          | >700 $\mu\text{g/g}$ dry                        |
| 推奨操作圧力        | <0.3 MPa (およそ<300 cm/h)                         |
| タンパク質吸着量      | > 3 mg /ml (卵白リゾチーム)<br>7 mg/mL (B 型肝炎ウイルス表面抗原) |
| 推奨定置洗浄液 (CIP) | 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液                               |
| pH 安定性        | 3 – 12                                          |
| 保存方法          | 2–30 $^{\circ}\text{C}$ 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

- ・セルフアインサルフェイト
  - ・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) セルフアインサルフェイト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。
- 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。

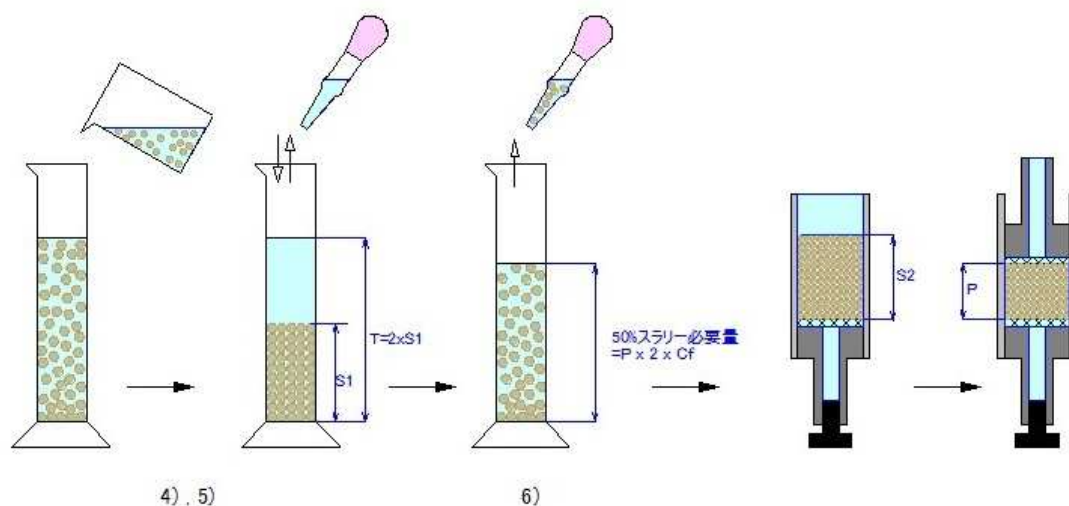


図 1 スラリー調製

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

- 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 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。

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

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。セルファインサルフェイトの Cf 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 Cf (純水で充填の場合) |
|---------------------|------------------|
| 3.2 cm × 20 cm      | 1.15～1.20        |

### 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 0.3 MPa 以下の圧力で充填液を 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 0.3 MPa 以下の圧力で通液する。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。

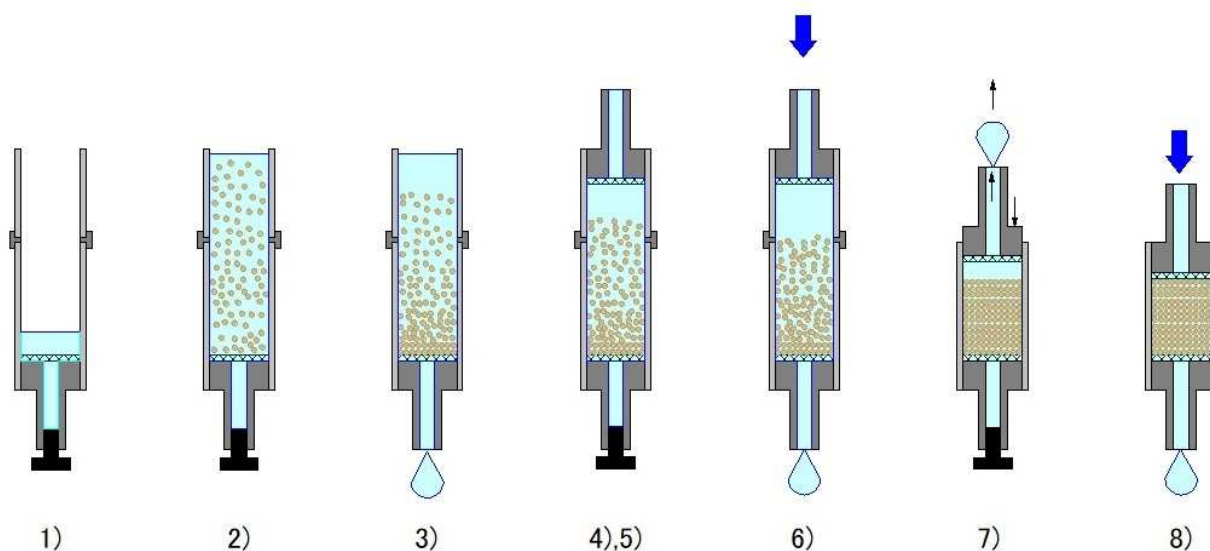


図 2 カラム充填の手順

### 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。

## 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) 溶出バッファーで吸着された目的物質を溶出する。

### 推奨バッファー

**吸着バッファー:** 0.01 M リン酸 Na + 0.1 M NaCl pH 7.5 を使用する。用途によっては他のバッファーを使用することもできる。一般的にタンパク質の吸着の強さは pH とイオン強度によって変化する。不純物の結合を弱める目的で、バッファーのイオン強度を少し高くすることもできる。ノニオン性の界面活性剤 (Tween®20, Triton® X など) も不純物の溶出性を高めることができる。

**溶出バッファー:** 吸着バッファーに 1~2 M の NaCl または KCl を加える。最適な塩濃度はグラジエント溶出による予備検討で確定させる。分取クロマトグラフィーにおいてはステップワイズで溶出させることが一般的である。

## 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

線速 300 cm/h で純水を流した場合の圧力は 0.3 MPa 以下で操作可能。  
(直径 45 cm×23cm ベッド高さ、Cf 値 1.20 で充填のカラムを使用)

## 再生と脱パイロジェン

2~3 M の高塩濃度の NaCl 含有バッファーを用いて再生と脱パイロジェンを行う。もし不十分なら 3~10 カラム体積 (CV) の 0.05~0.15 N NaOH で洗浄後に、2~3 M NaCl 含有バッファーで pH 9 になるまで洗浄する。次いで吸着バッファーで洗浄して次の操作に備える。

## 定置洗浄 (CIP)

再生と同じ操作で、イオンの吸着した物質を洗浄したのち 0.1mol/L の NaOH をカラム体積の 5 倍程度流す（推奨流速 30-60cm/h）。その後、吸着バッファーで平衡化する。

## 安定性

使用する pH は 3~12 の範囲で、使用温度は 2~30℃を推奨する。中性付近の緩衝液中で 121℃、30 分のオートクレーブが可能。

## 推奨保存方法

未開封の製品は 2~30℃ 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 2~30℃で保存されることを推奨します。

## 応用事例

ラボスケールカラムでのインフルエンザウイルスの吸着テストの事例を紹介します。インフルエンザウイルスを培養した鶏卵由来漿尿液を 70mL のセルファインサルフェイトカラムにロードした結果を表 2 と図 1, 2 に示します。86%のウイルス活性を維持したまま回収することができ、約 40 倍まで濃縮されました。宿主由来のタンパク質と DNA は 10%程度まで低減できました。

- ・ カラム : ID22 mm×185 mm ⇒70mL
- ・ 使用バッファー  
 平衡化 : 0.01M リン酸バッファー, pH7.4  
 洗浄 1、2 : 0.01M リン酸バッファー, pH7.2  
 溶出 : 0.01M リン酸バッファー, 3 M NaCl, pH7.0
- ・ 流速 : 1 mL/min
- ・ ウイルス株 : Vac-2
- ・ 漿尿液量 : 940mL

表 2 インフルエンザウイルスの精製結果

|      | Volume<br>ml | Total HA-Titer<br>HA (recovery %) | Total Protein<br>μg (recovery %) | DNA<br>ng (recovery %) |
|------|--------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| アプライ | 940          | 9,625,600 (100)                   | 184,494 (100)                    | 611,560 (100)          |
| パス   | 1213         | 194,000 (2)                       | 157,259 (85)                     | 490,340 (80)           |
| 溶出   | 25           | 8,257,536 (86)                    | 14,855 (8)                       | 62,800 (10)            |

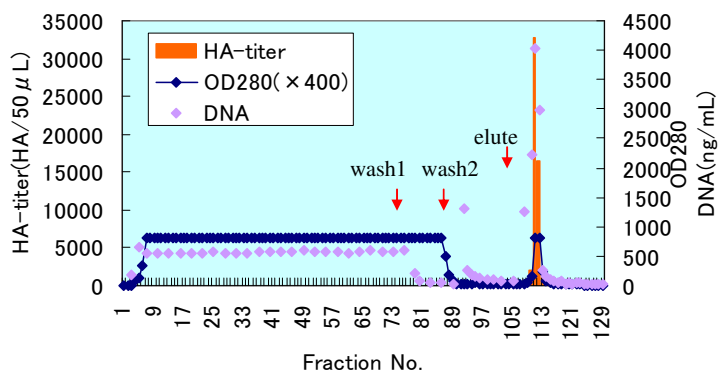


図 3 クロマトグラム

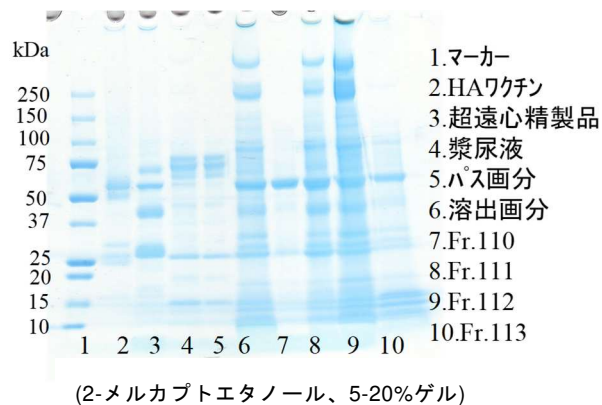


図 4 SDS-PAGE による精製度の評価

## ご注文情報

| 製品名              | 容量               | カタログ No.    |
|------------------|------------------|-------------|
| セルファイン<br>サルフェイト | 5 x 1 mL (ミニカラム) | 19845-51    |
|                  | 1 x 5 mL (ミニカラム) | 19845-15    |
|                  | 10 mL            | 676 943 324 |
|                  | 50 mL            | 19845       |
|                  | 500 mL           | 19846       |
|                  | 5 L              | 19847       |
|                  | 10 L             | 19849       |

## 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

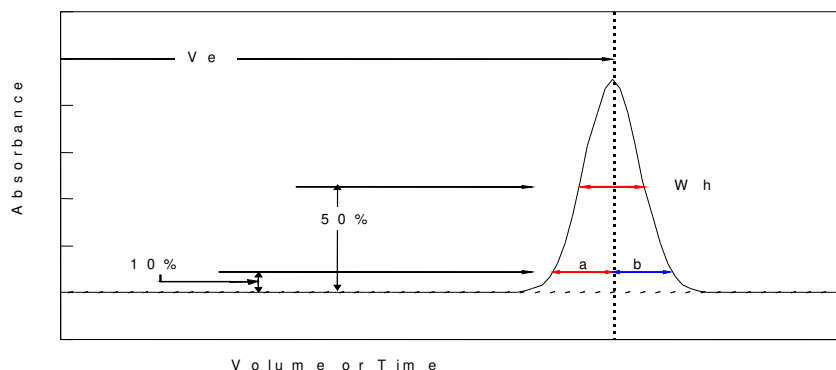
(日本、アジア、その他)

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：水および吸着バッファー）        |
|           | 1 M NaCl（移動相：0.1-0.3M 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）<br>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<br>(a) 中心より前半部のピーク幅<br>(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

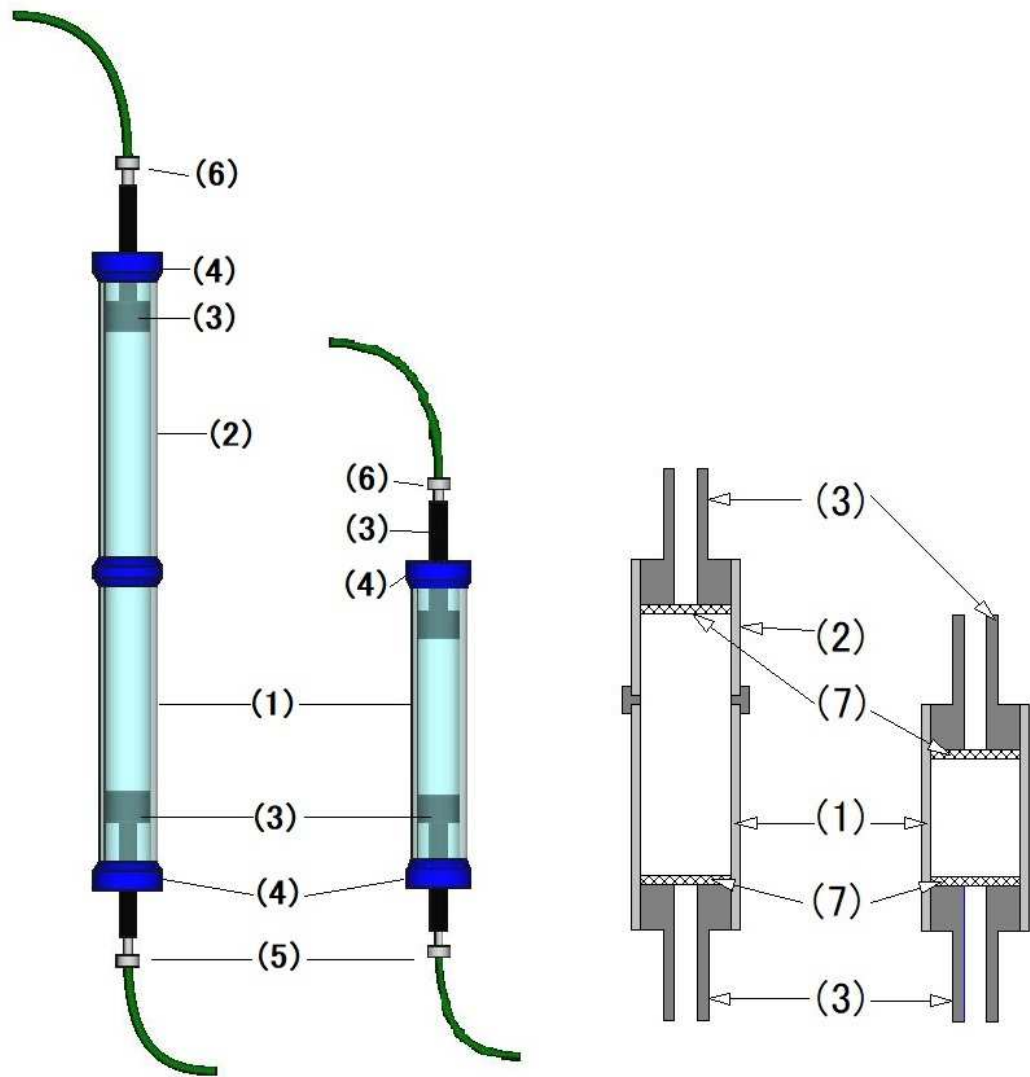
$$\text{HETP} = L/N$$

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

$$A_s = b/a$$

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。

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） |     |        |