

アフィニティークロマトグラフィー充填剤

セルファイン ホルミル

テクニカルデータシート



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 メール: cellufine@jnc-corp.co.jp

<http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>

概要

抗体、抗原、アフィニティリガンド、酵素等の固定化担体

プロセススケールのアフィニティクロマトグラフィーの進展に伴って、大規模スケールに適した新世代のクロマトグラフィー充填剤と新しい固定化技術の必要性が生じています。従来から使用されてきた担体は、その物理的強度の弱さから大型カラムでは流速特性が悪化して使用することが困難でした。また一般的に活性化担体として使用されてきた **CNBr** 活性化担体は固定化の不安定性や非特異的吸着が報告されています。アガロースを基材とした担体は操作条件が温和であっても多糖鎖が切断されて深刻なリガンドリークを引き起こすことが報告されてきました。セルファインの固定化担体は簡単にプロセススケールに利用できる最新の固定化担体です。セルファインは硬い真球状のセルロース粒子で、アフィニティクロマトグラフィー充填剤として十分な細孔サイズと固定化量を備えた担体です。このため大型カラムで高流速での通液が可能です。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。

特長

- ラボスケールやプロセスカラムで高流速による通液が可能で、プロセス時間の短縮化が可能です。
- 固定化反応が安定した反応のためリガンドリークが低い特長を持ちます。
- 優れた物理的強度を備えます。環境への負荷が低い固定化反応です。
- リガンドを多く固定化することができます。
- 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。
- 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。

特長	
担体	架橋セルロース
排除限界分子量	4,000kD
粒径	125 - 210 μ m
粒子形状	真球状
担体密度	0.7g/ml wet
収縮性 / 膨潤性	イオン強度や pH 条件の変更に伴う収縮や膨潤は見られない。
化学安定性	塩類、ノニオン性界面活性剤、有機溶媒で使用する事ができる。0.1M HCl および 0.5M NaOH に耐性がある。注意) 固定化するリガンドによってはこれらの条件では不安定な可能性がある。
物理的強度	ペリスタルティックポンプや様々な攪拌方法に耐性がある。
オートクレーブ耐性	pH 7 のバッファーにおいて 121℃、30 分のオートクレーブに耐性がある。
最大固定化量	40mg/ml のタンパク質を固定化できる。固定化量はタンパク質の種類と反応条件によって異なる。
操作圧力	< 0.1 MPa
保存液	セルファイン ホルミル = 0.01 % 2, 2-thio-bis (pyridine-1-oxide)

担体	活性化基	スペーサー長 (原子)	活性化基濃度 (μ mol/ml)
セルファインホルミル	ホルミル基 (アルデヒド基)	8	15 - 20

圧力 / 流速の特性

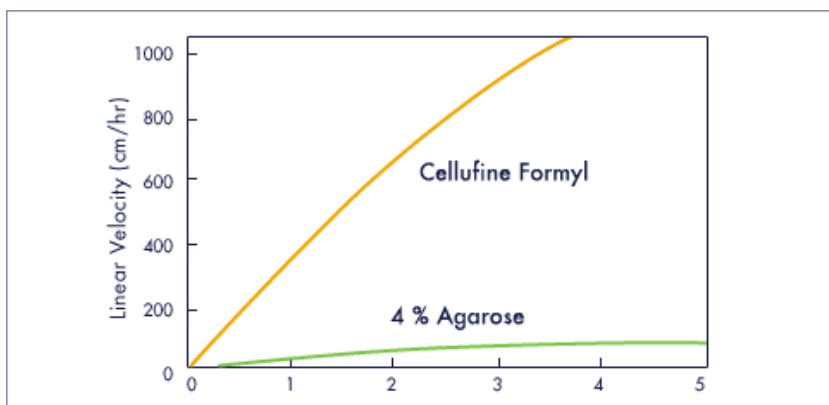


Figure 1
Pressure/flow characteristic of Cellufine Formyl
versus 4 % cross-linked agarose gel

コラム: 16 x 200mm

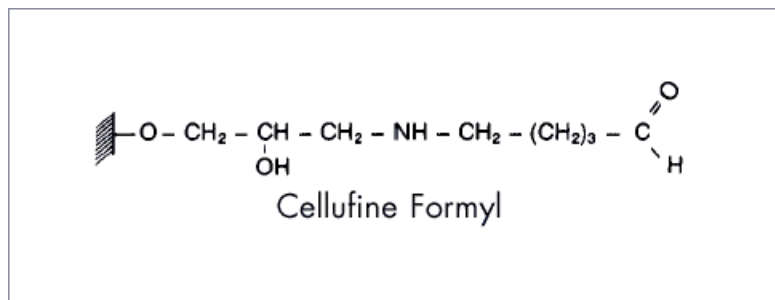


Figure 2
Partial structures of Cellufine activated supports

アプリケーション

担体	固定化分子	精製対象
セルファイン ホルミル	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

Table 1
General Applications of Cellufine Activated Supports

抗体固定化セルファインホルミルを利用した抗原の精製事例

Fig. 3はセルファインホルミルに抗体を固定化した後、抗原を大規模スケールで精製した事例を示しています。この事例では87%という高い収量と、精製度が初期の149倍という高純度を達成しました。このカラムは30カ月間使用し続け、合計で3,000Lもの血清を処理しました。この様な繰り返し使用にも拘らず性能の劣化は観察されませんでした。

担体を作製するため、抗-HBs Ag（B型肝炎表面タンパク質）を含む45Lの馬血清を、硫酸アンモニウム沈殿で濃縮しました。その後、透析を行って0.2 Mリン酸バッファー（pH 7）、0.1M NaClにバッファー置換しました。このサンプルを12Lのセルファインホルミルに加えて反応し、次いで80gの水素化シアノホウ素ナトリウムを加えて24時間反応しました。バッファーで担体を洗浄した後、カラムに充填しました。

全体の精製プロセスの流れは、HBs Ag陽性のヒト血漿を凍結融解、遠心分離、硫酸アンモニウム沈殿、およびゲルろ過クロマトグラフィーで精製したものを、今回作製したカラムで精製しました。

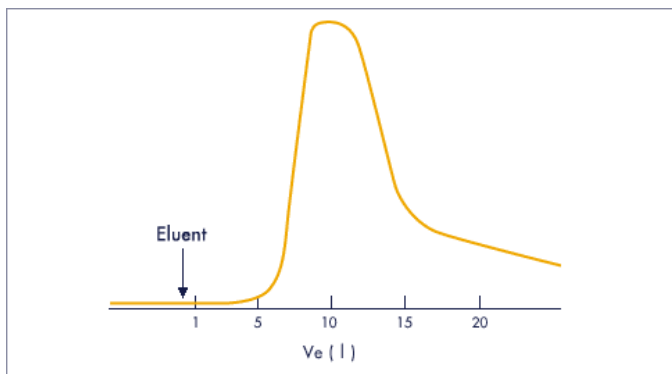


Figure 3
Purification of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) with
Cellufine Formyl immobilized antibody

サンプル: HBs Ag 陽性ヒト血漿部分精製品 1200 L
 カラム: 140 x 780mm (12 L) ウマ抗 HBs Ag 抗体固定化セルファインホルミル
 平衡化/洗浄バッファー: 0.1M NaCl, 0.2M リン酸バッファー (pH7.0) 200L
 溶出バッファー: 0.2M グリシン/HCl (pH 3)
 流速: サンプルロード/洗浄: 20 cm/ hr 、溶出: 26 cm/ hr
 精製後液量: 14 L (85 倍濃縮)
 収率: 87 %
 精製度: 149 倍

RCA 精製

セルファインホルミルは糖タンパク質のレクチンの固定化に使用できます (Fig. 4)。
 Con A (50mg) を 0.5g (wet) のセルファインホルミルに 4℃、終夜で反応させました (バッファー
 組成: メチル- α -D-マンノシド、シアノ水素化ホウ素ナトリウムの存在下で、1mM MgCl₂、1mM MnCl₂
 および 1mM CaCl₂ を含む 1ml の 0.1M 酢酸 (pH 6.4) バッファー)。

水で洗浄した後、ゲルを 4℃で一晩、NaCNBH₃ を含む 1%グルタルアルデヒド 2ml に懸濁しました。
 2 回目の水洗の後、ゲルを 1 時間室温で 2ml の 1M Tris / HCl (pH 7.4) に懸濁し、再洗浄しました。

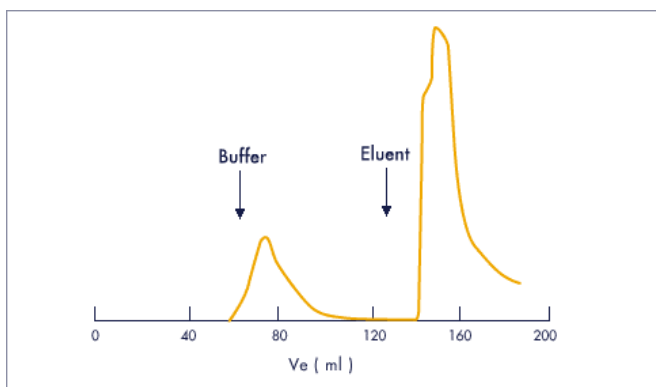


Figure 4
Purification of Ricinus communis agglutinin (RCA₁) on
Cellufine Formyl concanavalin A (Con A)

サンプル: 66ml RCA₁ (30mg/ml protein)
 カラム: 0.9 x 9mm (0.6ml)
 ConA 固定化セルファインホルミル
 スタート/洗浄 0.1M NaCl
 吸着液: 0.2M リン酸バッファー (pH 7.2)
 溶出液: 0.2M メチル- α -D-マンノシド
 流速: 12cm/hr

活性化担体の選択

セルファインの活性化担体としてセルファインホルミルがあります。安定性が高く機能性の高い担体で、反応化学とリガンド密度の制御は簡単です。

一般的なタンパク質の固定化

セルファインホルミル

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 (Fig5 を参照)。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。Table 2 に、一般的なリガンド結合のプロトコールを示します。

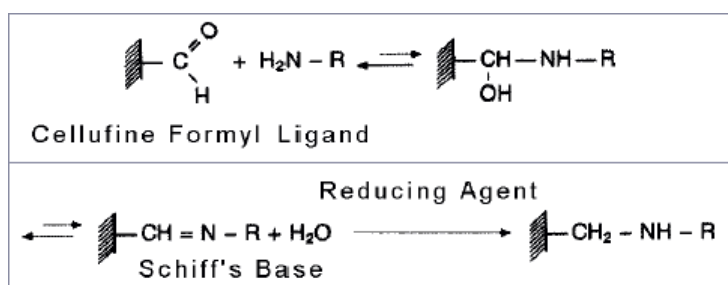


Figure 5
Cellufine Formyl Reaction Mechanism

還元剤の利用

セルファインホルミルは、安定した共有結合を形成するために還元剤を必要とします。ほとんどのすべてのアプリケーションで良好な結果を得るために、いくつかの還元剤が利用可能です。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。水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4)、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (NaCNBH_3)、および新しい非毒性の還元剤であるトリメチルアミンボラン ($(\text{CH}_3)_3\text{NBH}_3$) は効果的な還元剤です。どの還元剤でも、必要な量は通常、湿潤ゲル 1 グラムあたり 10 ミリグラム未満で使います。

セルファインホルミルへのカップリング

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。

1	担体を水で洗浄し、ろ過する。 リガンドを含む固定化バッファーでスラリーにする。
2	30 分～2 時間、攪拌する。
3	還元剤を加える。
4	6 時間～10 時間、攪拌する。
5	0.2M Tris / HCl (pH 7) または 1M エタノールアミンに還元剤を含むバッファーで洗浄し、残留アルデヒド基をブロックする。 次いで同馬ファーを加えて 3～5 時間、攪拌する。
6	クロマトグラフィーに使用する溶出バッファーで洗浄する。次いで平衡化バッファーで洗浄する。
7	カラムに充填して使用する。

Table 2

Typical general protocol used for ligand coupling with Cellufine Formyl

抗体の精製

活性化担体へのリガンド結合の最適化には、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）とリガンド使用量（ゲル 1 ml あたり結合するリガンドの mg）の間のトレードオフが常に伴います。精製されたりガンドが容易に入手できる場合、固定化効率は低くなりますが、リガンド固定化濃度の高い担体を作製できます。しかし一般的なケースでは、精製されたりガンドは非常に貴重であり、リガンド使用量を少なくして、固定化効率を上げる試みが重要です。また担体へのリガンド密度が低くても、立体障害を解消できることからアフィニティー吸着量が向上する場合もあります。

セルファインホルミルは固定化効率を簡単に制御できます。Fig. 8 の例では、高純度のウシ血清アルブミン（BSA）をウサギ抗ウシ血清アルブミン抗体精製のためのアフィニティリガンドとして使用しています。今回の固定化反応では、高い固定化効率（98%）を実現させました。一方で使用するリガンド濃度は抑えて反応しています。

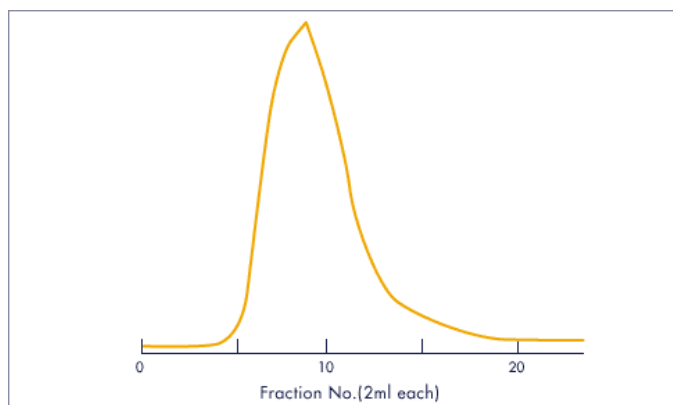


Figure 8
Purification of rabbit anti-bovine serum albumin (BSA)
antibody with Cellufine Formyl BSA

サンプル:	24ml 沈殿させたウサギ抗血清
カラム:	14 x 34mm BSA固定化セルファインホルミル(5.2ml)
平衡化:	0.05M リン酸(pH 7.4)
洗浄液:	0.05M リン酸(pH 7.4)、0.5M NaCl
溶出液:	0.2M グリシン/HCl (pH 2.25)
流速:	27cm/hr
収量:	27mg 抗体
精製倍率:	20 x

5g（湿潤ゲル）のセルファインホルミルを、0.1M リン酸（pH 7.1）で洗浄し、5ml の 4mg / ml BSA を添加して、25℃で 12 時間攪拌して BSA をセルファインホルミルに固定化しました。バッファーで洗浄した後、培地を 0.4M エタノールアミンを含む 5ml のバッファーに懸濁し、25℃で 4 時間攪拌した後、担体をバッファーで洗浄しました。固定化された BSA 濃度は約 3.0 mg / ml でした。

ご注文情報

セルフファインホルミル	
包装単位	カタログ No.
10 ml	676 944 324
50 ml	19853
500 ml	19854
5 L	19855
10 L	676 944 335

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 メール: cellufine@jnc-corp.co.jp<http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>