

Cellufine™ GCL-2000HF

セルファインGCL-2000HFはセルファインGCL-2000と同等の細孔サイズを有したゲルろ過クロマトグラフィー充填剤です。高流速で通液が可能で、優れた分離性能が特長です。

硬い真球状のセルロース粒子のため、カラム高さを積層しても良好な通液性を備えています。このため大型カラムでも使用することができます。さらにセルファインGCL-200HFは多くの化学薬品に安定のため、多様なバッファーや溶液中で操作することができます。

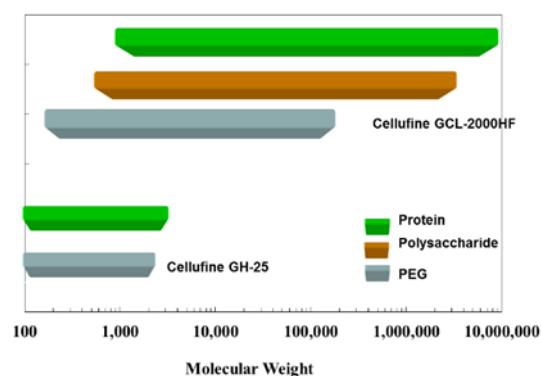


図 1 セルファイン GCL-2000HF の分画範囲

表1 セルファイン GCL-2000HFの性能と特徴

	特徴
ベース担体	真球セルロース粒子
粒径	40 - 130 μm (ca. 90 μm)
排除限界分子量	PEG 200kD、タンパク質 3,000kDa
推奨操作圧力	<0.2 MPa
pH 安定性	1 - 14
保存方法	2-8 °C in 20 % ethanol

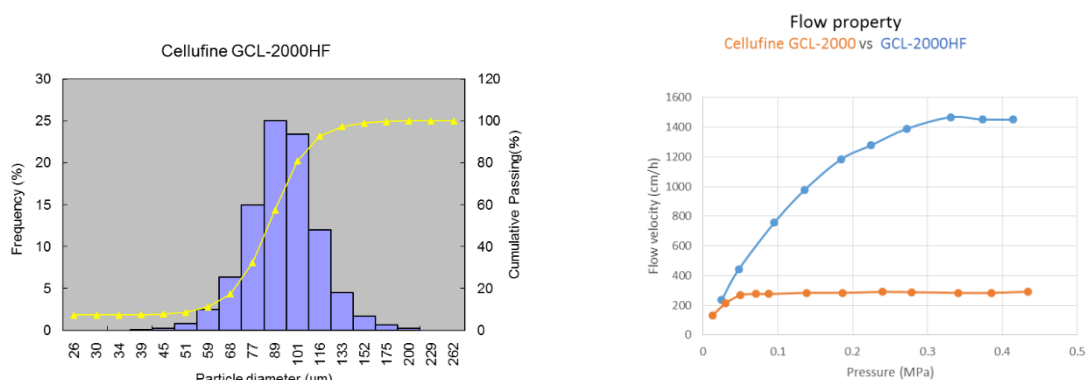


図 2 粒度分布 (左図)、及び流速特性(右図)

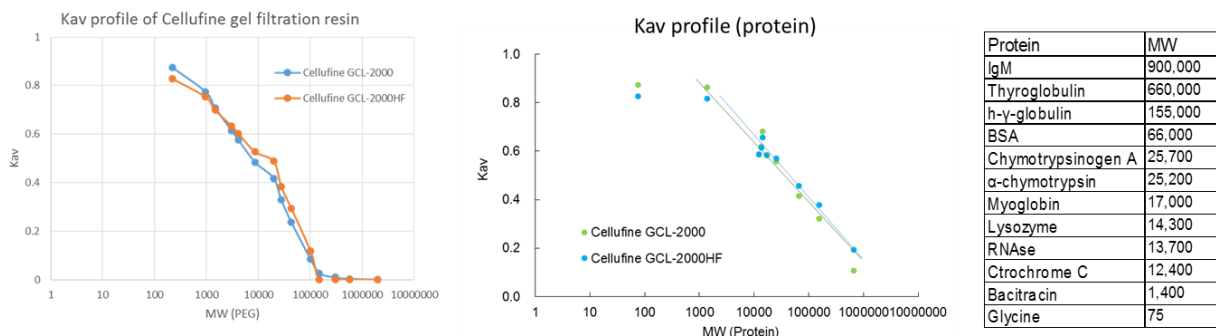


図 3 セルファイン GCL-2000HF の排除限界分子量

カラムへの充填手順

材料と必要器具

- ・セルファイン GCL-2000HF
 - ・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 GCL-2000HF 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。

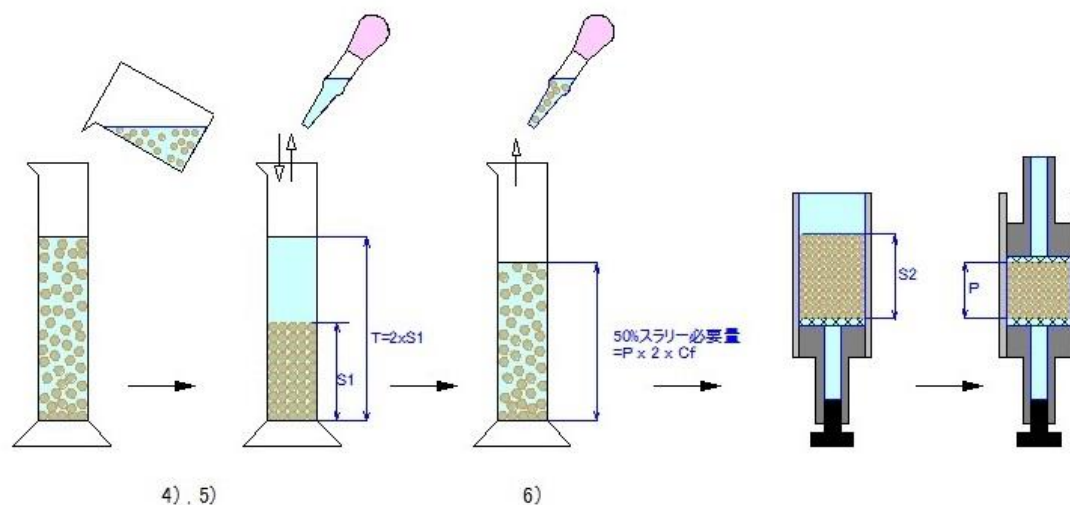


図 4 スラリー調製

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

- 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。

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

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。可動栓カラムを使用し Cf 値を調節してください。セルフライン GCL-2000HF の Cf の例を以下に示します。*40～100cm カラム高さの手動による充填の場合 Cf=1.05 になるように充填する。

推奨 Cf*
1.10 ~ 1.15

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 0.2 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 0.2 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。

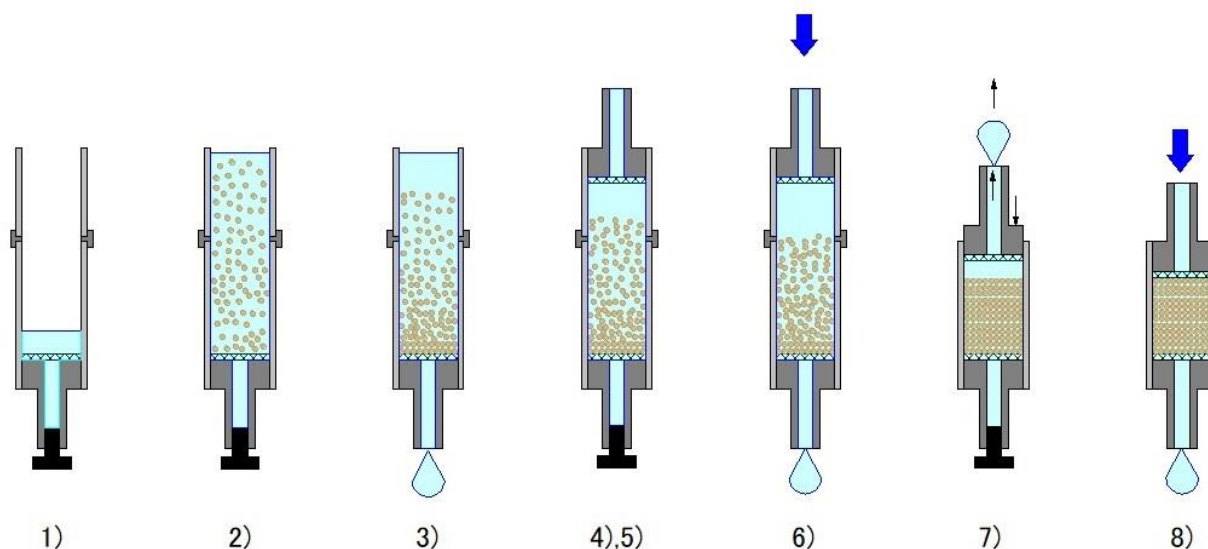


図5 カラム充填の手順

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) 使用バッファーで、カラムを平衡化する。(通常、カラム体積 (CV) の 2~5 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下さい)
- 2) 使用バッファーに溶解されたサンプルをロードする。
- 3) 不純物を除去するため、使用バッファーで数 CV 洗浄する。
- 4) 平衡化バッファーで目的物質を溶出する。

サンプルの準備とサンプルロード

サンプルは移動相で調製することが望ましいが、バッファー置換ができない場合であっ

でも使用できる。不溶物を除去するためにフィルターろ過する。分離能を向上させるためにはカラム体積の 0.1~1 %のサンプル量をロードすることが望ましい。一般的な用途ではカラム体積の 5 %をロードする。バッファー交換や脱塩を行いたい場合、カラム体積の 15~25 %をロードすることでサンプルの希釈を抑制することができる。サンプルのタンパク質濃度は 1~20 mg/ml に調製すること。

推奨する操作流速

線速 5-50 cm/h 程度で、圧力 0.2 MPa 以下で操作可能。

溶出

溶出はイソクラティックモード（単一のバッファー）で実施する。バッファーの置換を行いたい場合、目的のバッファーでカラムを平衡化した後、サンプルをロードする。

再生

カラム体積の 5 倍の 0.1 M NaOH を 5~50 cm/h で洗浄する。アルカリ洗浄液を通液した後は、純水かバッファーを通液して平衡化する。通液後の pH を測定することでカラムの平衡化を確認することができる。

安定性

pH 1~14

エタノール, メタノール, アセトンなど

8 M 尿素

6 M グアニジン塩酸塩

0.1 M HCl

0.5 M NaOH

一般的な塩 (NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ など)

一般的な界面活性剤 (SDS, Tween®, CHAPS など)

オートクレーブ: 121° C、1 bar、20 分

推奨保存方法

未開封の製品や開封後に長期保存する場合は 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では、20%エタノール、0.1M NaOH に置換して 2～8℃で 2 週間以内の保存を推奨します。保証期限は製造日より 5 年間です。

ご注文情報

製品名	容量	カタログ No.
セルフアイン GCL-2000HF	100 mL	21400
	500 mL	21401
	5 L	21402
	10 L	21403

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

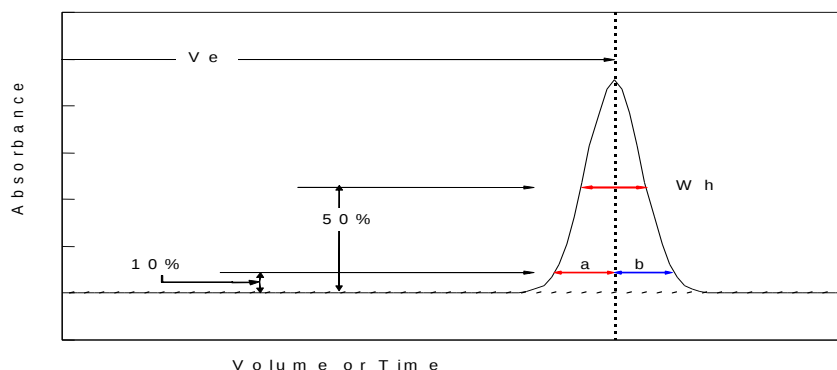
(日本、アジア、その他)

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：0.1-0.4M 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

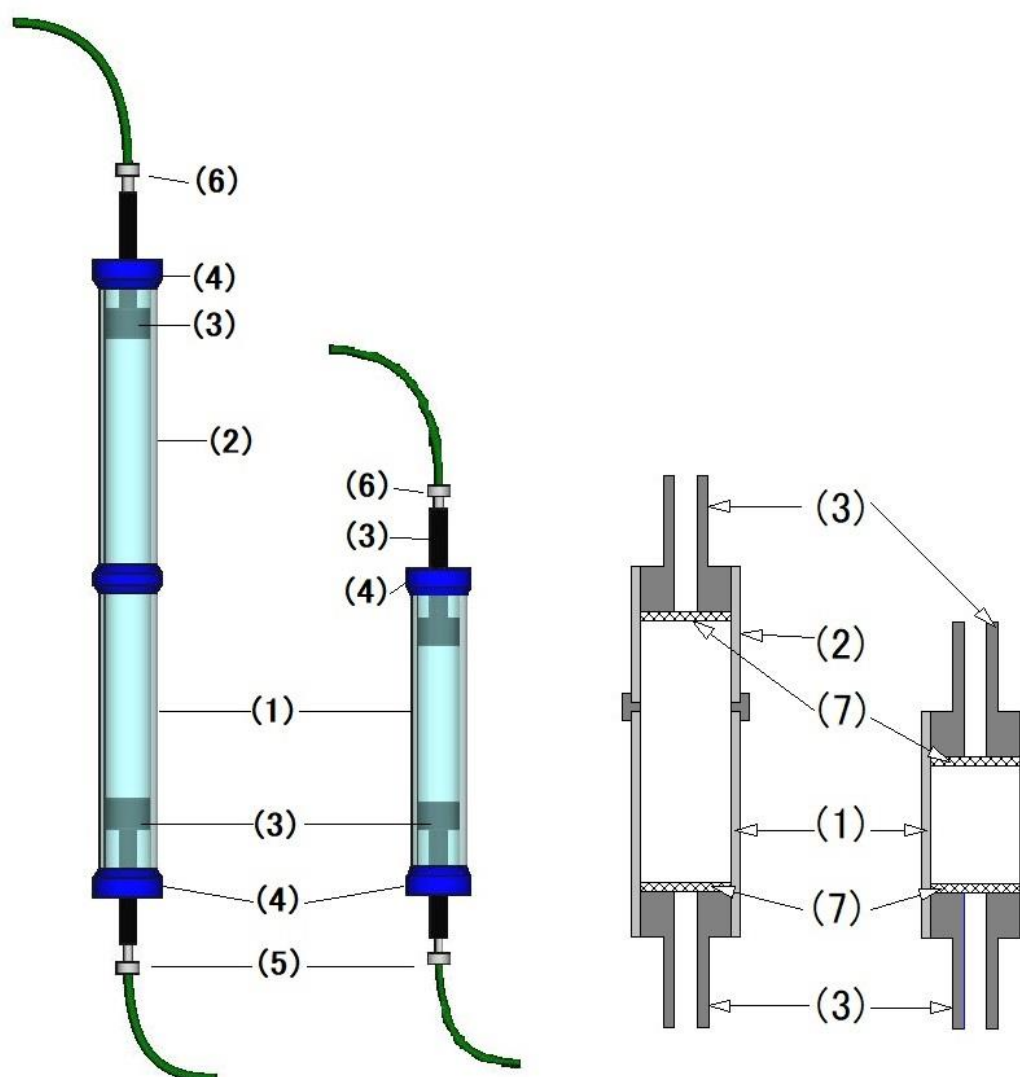
$$HETP = L/N$$

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

$$As = b/a$$

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）		