

Cellufine™ GH-25

セルファインGH-25は、脱塩用途に設計された真球状の多孔質セルロース粒子です。排除限界分子量が3kDaのため、タンパク質は細孔内には入りません。一方で塩類などは細孔内に入るため、タンパク質溶液からの脱塩などに使用できます。

物理的強度の高い球状セルロース粒子は、カラムをほとんど圧縮せずに高流量で操作可能です。分離メカニズムは、クロマトグラフィー充填剤への試料の拡散度合の違いに基づいています。3kDを超える大きな分子はセルファインGH-25の細孔から除外され、すぐにカラムを通過します。塩のような小さな分子は細孔内に拡散するため、より長く保持されます。この原理を基に、セルファインGH-25はタンパク質溶液からアルコール、塩、洗剤、蛍光色素、糖などを除去するために使用できます。ほとんどの溶媒と互換性があり、pH 1～14の条件下で安定して使用できます。

セルファイン GH-25 の特徴を表 1 に示します。

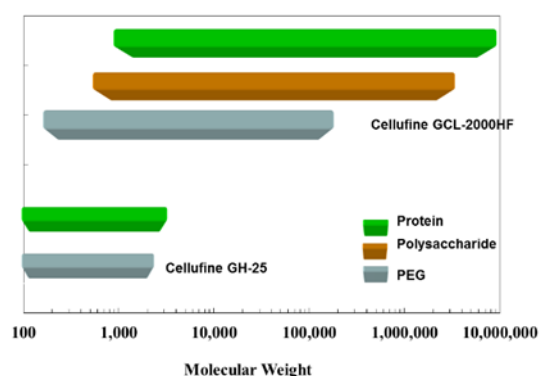


図 1 セルファイン GH-25 の分画範囲

表1 セルファイン GH-25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. 90μm)
排除限界分子量	3kD
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

※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

- ・ セルファイン GH-25
 - ・ 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 GH-25 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

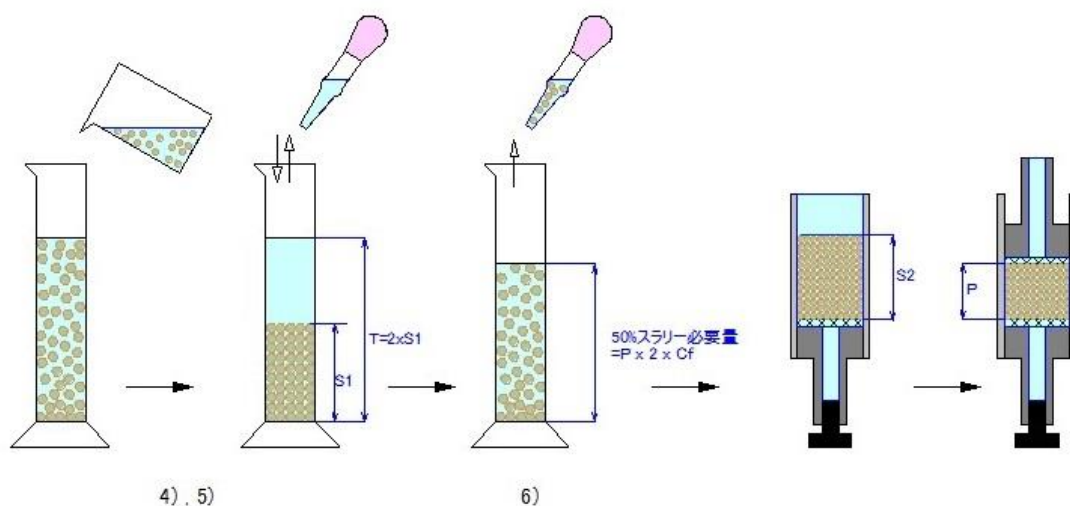


図 2 スラリー調製

降体積を測定し、正確なスラリー濃度を確認する。

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

- 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。可働栓カラムを使用し Cf 値を調節してください。

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。

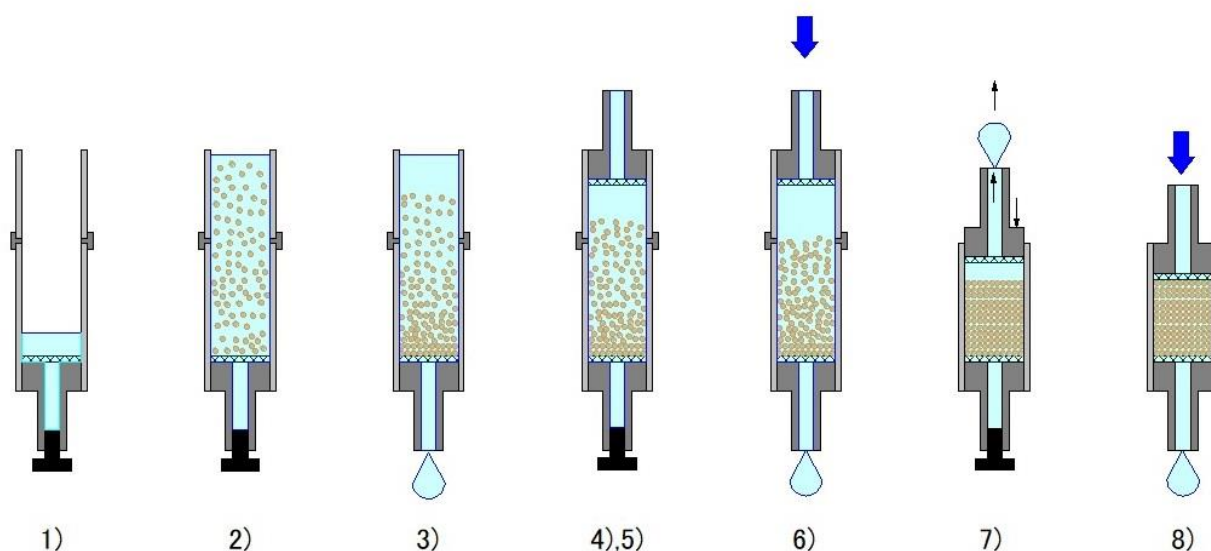


図 3 カラム充填の手順

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 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) 使用バッファーを通液して目的物質を溶出させる。

サンプルの準備とサンプルロード

サンプルは使用するバッファーに溶解する。不溶物は遠心分離かフィルターによって除去する。サンプルのロード量はカラム体積によって計算できる。分離能を向上させるためには、カラム体積の 10~30 %のサンプル量をロードすることが望ましい。ロード量に比例してサンプルの希釈が抑えられるが、塩の除去性が低下する場合がある。

推奨する操作流速

線速 100-300 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。タンパク質はカラム体積の30%のバッファーで溶出し、塩やアルコールなどはカラム体積の85%のバッファーで溶出される。

再生

2~5CVの0.1~0.5 M NaOHを50~100 cm/hの速度で流してカラムを洗浄する。数CVの純水またはバッファーで洗浄して、アルカリを除去する。カラム溶出液のpHを測定して、システムが平衡に戻ったことを確認する。

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%エタノールに置換して 2~8°C で保存することを推奨します。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.
セルファイン GH-25	5 mL × 5 (ミニカラム)	19711-55
	100 mL	670 000 327
	500 mL	19711
	5 L	19712
	10 L	670 000 335

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

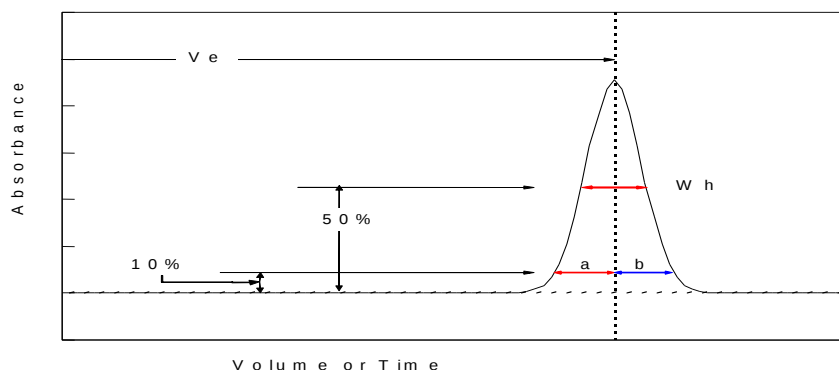
(日本、アジア、その他)

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

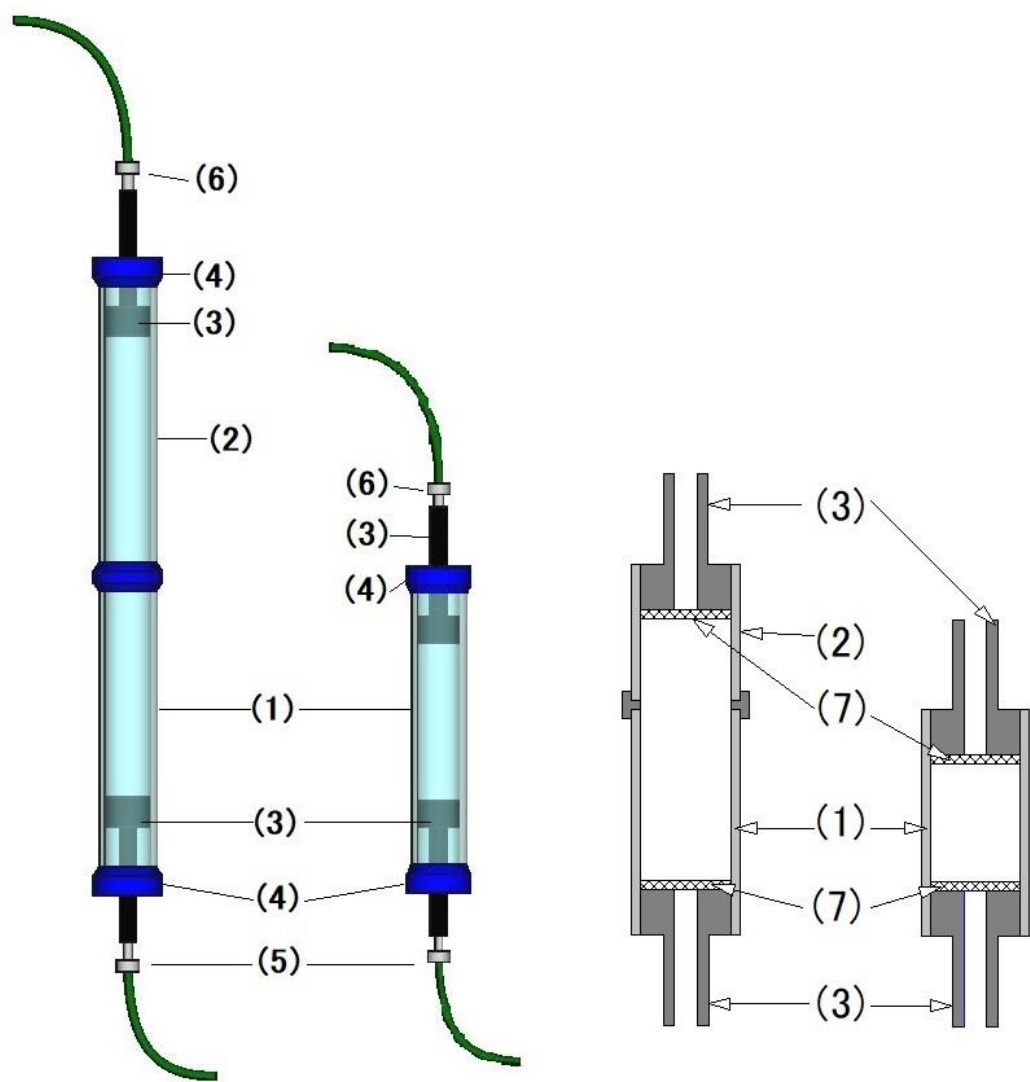
$$HETP = L/N$$

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

$$As = b/a$$

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）		