

取扱説明書

疎水相互作用クロマトグラフィー充填剤

セルファイン フェニル EX

概要

セルファイン フェニル EX は疎水性タンパク質のクロマトグラフィー精製に使用します。多くのタンパク質には疎水性アミノ酸残基があります。これらアミノ酸と充填剤のフェニル基が疎水相互作用して吸着します。疎水相互作用に影響される因子は、塩濃度、温度、pH、有機溶媒、界面活性剤などがあります。タンパク質の吸着は通常、高イオン強度で行われます。一方、低塩濃度でタンパク質を溶出します。このような条件はイオン交換クロマトグラフィー充填剤とは逆の吸着機構となります。それゆえイオン交換クロマトグラフィーとは異なる分離挙動となるメリットがあります。

またセルファイン フェニル EX はモノクローナル抗体の凝集体の除去に好適に使用できます。6 mS/cm 程度の低い電気伝導度で、モノクローナル抗体の製造で生じる凝集体の除去に優れた性能を発揮します。

物理的・化学的特徴

	セルファイン フェニル EX	(参考) セルファイン MAX フェニル	(参考) セルファイン MAX フェニル LS
ベース基材	架橋セルロース	高度架橋セルロース	高度架橋セルロース
粒子形状	真球	真球	真球
粒径 (μm)	ca. 40 - 130	ca. 40 - 130	ca. 40 - 130
リガンドタイプ	フェニル基	フェニル基	フェニル基
BSA 吸着量 (mg/ml)	13	14	6
BSA 溶出効率 (%)	30	40	90
pH 安定性	2 - 13	2 - 13	2 - 13
操作圧力	< 0.2 MPa	< 0.3 MPa	< 0.3 MPa
供給形態	20 % EtOH、スラリー状	20 % EtOH、スラリー状	20 % EtOH、スラリー状

流速特性

セルファイン フェニル EX は架橋されているため高流速で使用できる特徴がある。

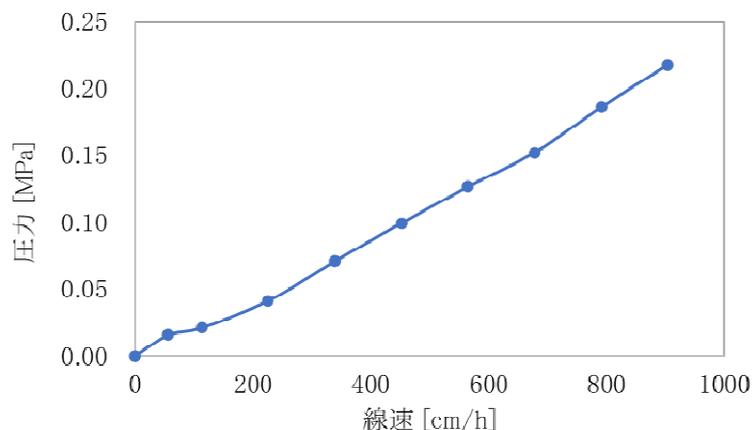


図1 セルファイン フェニルEXの流速特性
 カラム: 内径2.6 cm x 高さ19.3 cm
 移動相: 純水、23~25 °C
 コンプレッションファクター: 1.35
 システム圧力を除いた樹脂にかかる圧力を掲載。

モデルタンパク質の分離挙動

下図はセルファイン フェニル EX のモデルタンパク質の分離挙動を示している。セルファイン フェニル EX はリガンド濃度が高く設計された充填剤である。このためモデルタンパク質は低塩濃度で溶出される。

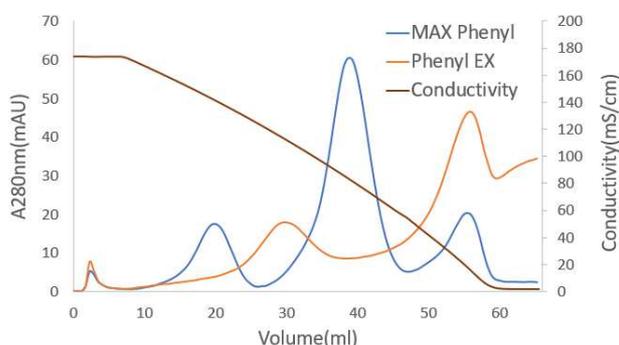


図2 モデルタンパク質の分離挙動
 カラム: 内径6.6 mm × 高さ50 mm
 バッファーA: 10 mMリン酸バッファー (pH 7)
 バッファーB: 10 mMリン酸バッファー (pH 7) + 1.5 M硫酸アンモニウム
 タンパク質: リボヌクレアーゼA, リゾチーム, キモトリプシノーゲンA

カラムへの充填方法

1. 目的のカラム体積になるように充填する体積を計算する。
 - (a) 充填カラム体積 = カラム断面積 (cm²) x カラム高さ (cm)
 - (b) 必要となるカラム沈降体積 = 充填カラム体積 x (1.2~1.3)
2. 純水で充填剤を洗浄する (バッファーでも良い)。
3. 純水、0.1M NaCl または適切な充填バッファーで 40 - 60 % (v/v) スラリーを調製する。
4. 緩やかに攪拌する。必要であれば脱気しながら攪拌する (室温、1時間)。
5. カラム準備
 - (a) カラム供給業者の取扱説明書に従ってカラムを準備する。

- (b) カラムフィルターは空気を除去するため、充填バッファーまたは 20%エタノールで湿らせておく。
- (c) 充填バッファーをカラムに加え、カラム出口からバッファーが出ることを確認する。
カラム底部から 0.5~1 cm の高さ程度まで充填バッファーが流れたら、カラム出口を閉める。
6. 気泡を発生させないように注意しながらスラリーをカラムに注ぎ込む。容量によっては充填用リザーバーを準備する。
 7. カラム上部フィルターを装着する。このとき気泡を入れないように注意すること。
 8. カラム出口を開けて使用流速の 20~30%高い流速で溶出バッファーを 10 分間、ポンプで通液する。注意：カラムの限界圧力は超えないようにすること。
 9. 通液時のカラム高さをマークしておく。次いでポンプを停止して、カラム出口を閉止する。
 10. 上部フィルターの配管を外す。上部フィルターの入口を開けた後、上部フィルターをマークした位置まで下げて、ゲルを圧縮させる。
あらかじめカラム高さを設定している場合は、沈降体積の 1.30-1.35 倍をカラムに充填して、所定の高さまで圧縮する。
 11. 気泡が入らないように上部フィルターへ配管を接続する。サンプルをロードする前に 10 カラム体積 (CV) の吸着バッファーを通液してカラムを平衡化する。

固定長カラムへの充填方法

1. 目的のカラム容量になるように充填する体積を計算する。
 - (a) 充填カラム体積 = カラム断面積 (cm²) x カラム高さ (cm)
 - (b) 必要となるカラム沈降体積 = 充填カラム体積 x (1.30-1.35)注意：充填用リザーバーを使用する場合、目的のカラム体積になるように十分な充填剤を準備すること
2. 純水でゲルを洗浄する (バッファーでも良い)。
3. 純水または充填バッファー (高塩濃度) で 40 - 60 % (v/v) スラリーを調製する。
4. 室温で緩やかに攪拌する。必要であれば脱気しながら攪拌する (室温、1 時間)。
5. カラム準備
 - (a) カラム供給業者の取扱説明書に従ってカラムを準備する。
 - (b) カラムフィルターは空気を除去するため、充填バッファーまたは 20%エタノールで湿らせておく。
 - (c) 充填バッファーをカラムに加え、カラム出口からバッファーが出ることを確認する。
カラム底部から 0.5~1 cm の高さ程度まで充填バッファーが流れたら、カラム出口を閉める。
6. 気泡を発生させないように注意しながらスラリーをカラムに注ぎ込む。容量によっては充填用リザーバーを準備する。
7. リザーバー用の上部フィルターを装着する。
8. カラム出口を開けて使用流速の 20~30%高い流速で充填バッファーを 10 分間、ポンプで通液する。注意：カラムの限界圧力は超えないようにすること。

9. ポンプを停止して、カラム出口を閉止する。
10. 上部フィルターの配管を外す。充填用リザーバーを外す。必要であれば過剰な充填剤を充填用リザーバーから取り除いておくこと。
11. 上部フィルターを装着した後、気泡が入らないように上部フィルターへ配管を接続する。サンプルをロードする前に10カラム体積(CV)の吸着バッファーを通液してカラムを平衡化する。

使用方法

1. 一般的な疎水相互作用クロマトグラフィーとして使用する場合

操作流速

通液時は0.2 Mpa以下での使用を推奨する。一般的に、低流速で吸着、溶出工程を行い、洗浄や再生工程では高流速で使用する。

カラムの準備

2～5 CVの溶出バッファーで平衡化する。次いで同量の吸着バッファーで洗浄する。一般的な吸着バッファーは50 mMリン酸Na, pH 7.0 + 0.5～2.5 M硫酸ナトリウムまたは硫酸アンモニウムまたは塩化ナトリウムを推奨する。吸着の強さは、塩濃度、pH、温度に影響する。一般的に、高塩濃度の塩を使用すると高吸着量となる。溶出は塩濃度を下げることで達成される。さらに情報を得たい場合は文献などを参考にすること。

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で置換しておくことが望ましい。必要に応じて不溶物をフィルター等で除去する。必要であればサンプルを脱塩フィルター、脱塩カラムなどで脱塩して、目的のイオン強度になるように調製する。タンパク質吸着量や回収率は充填剤によって異なる。カラムを吸着バッファーで平衡化した後、サンプルをロードする。サンプルロード後に5 CVの吸着バッファーで洗浄して未吸着物質を除去する。次いで充填剤に吸着した物質を溶出する

目的物質の溶出

目的物質の溶出は低塩濃度バッファー(0.5Mの濃度以下)のバッファーを用いて、ステップワイズ溶出やグラジエント溶出で行う。カオトロピック試薬(KSCN)、界面活性剤(オクチルグリコシド、CHAPS、Triton X、Chaps、Tween)、変性剤(グアニジン塩酸塩、尿素、エタノール)は強固に吸着したタンパク質の回収率を向上させることがある。

2. 抗体凝集体の除去で使用する場合

操作流速

通液時は0.2 Mpa以下での使用を推奨する。一般的に、低流速で吸着、溶出工程を行い、洗浄や再生工程では高流速で使用する。

カラムの準備

2~5 CV の吸着バッファーで平衡化する。吸着バッファーはリン酸塩や Tris など一般的に使われるものが使用可能であるが、塩濃度、pH は最適条件を探索することを推奨する。

サンプルの準備とサンプルロード

プロテイン A カラム後の溶出サンプルをバッファー交換や希釈、酸/塩基添加といった操作によって目的の pH、電気伝導度に調整し 0.2 μ m のフィルターでろ過する。カラムを吸着バッファーで平衡化した後、サンプルをロードする。サンプルロード液のフロースルー画分はモノクローナル抗体が存在する画分となるため回収する。サンプルロード後に 5~10 CV の吸着バッファーで洗浄する。洗浄液のフロースルー画分中にもモノクローナル抗体が存在するため回収する。

不純物の溶出

カラムに吸着した抗体凝集体や夾雑物など不純物の溶出は 10 CV の純水を用いる。定置洗浄として 0.5M NaOH, 30%イソプロパノールを 10 CV 通液する。0.5M NaOH と 30%イソプロパノールは混合したものを使用してもよい。

化学安定性および物理的安定性

室温で pH 2- 13 の条件で安定。多くの塩類 (NaCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ など)、界面活性剤 (SDS, Tween など)、その他の化学品 (70%エタノール、30%イソプロパノール、6M グアニジン塩酸塩および尿素) に安定。定置洗浄は 0.5 N NaOH が使用できる。オートクレーブする場合は中性 pH のバッファーに懸濁した後、20 分、121°C で処理する。

充填剤の再生

5~10 CV の 0.5 N NaOH, 30%イソプロパノールで洗浄する。場合によっては 2 - 5 CV の 70 % EtOH/30 %純水/0.1 M 酢酸で洗浄、次いで純水洗浄することで、吸着した脂質を除去する必要がある。強固に吸着した不純物はカオトロピック試薬 (KSCN)、界面活性剤 (オクチルグリコシド、CHAPS、Triton X、Chaps、Tween)、変性剤 (グアニジン塩酸塩、尿素、エタノール) で洗浄できることもある。

保存方法

20 %エタノールを含む中性バッファーで、2~25°C で保存する。凍結させないこと。長期で保存する場合は 4°C 程度の冷蔵保存が望ましい。

保証期限

製造日から 5 年。

参考文献

1. Harris, E.L.V. and Angal, S., *Protein Purification Methods: A practical Approach*. New York: Oxford University Press, 1989.

2. Janson, J.-C. and Ryden, L., *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998
3. Sanchayita G., Yinying T., Lynn C. and Douglas C., *mAbs* 5:5, 795-800; September/October 2013

ご注文の情報 (カタログ No.)

製品名	容量					
	ミニカラム 1 ml x 5	ミニカラム 5 ml x 5	100ml	500ml	5 lt	10 lt
セルファイン フェニル EX	22000-51	22000-55	22000	22001	22002	22003

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 メールアドレス: cellufine@jnc-corp.co.jp

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