

Cellufine™ MAX ブチル HS

セルファイン MAX ブチル HS は、ブチル基を表面に固定化した疎水相互作用クロマトグラフィー充填剤です。従来の MAX ブチルと比較して高濃度にブチル基を固定化されています。

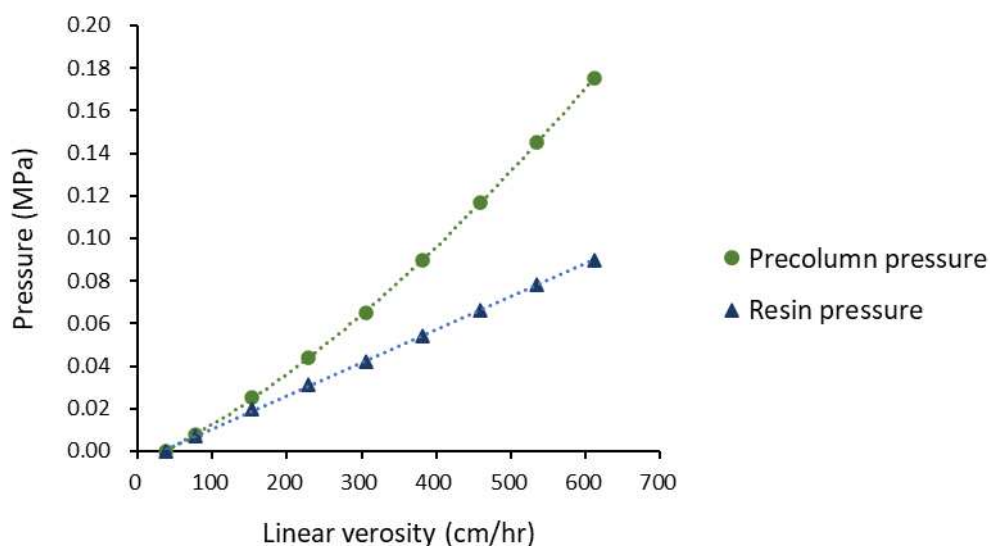
セルファイン MAX ブチル HS は疎水性タンパク質のクロマトグラフィー精製に使用します。多くのタンパク質には疎水性アミノ酸残基があります。これらアミノ酸と充填剤のブチル基が疎水相互作用して吸着します。疎水相互作用に影響される因子は、塩濃度、温度、pH、有機溶媒、界面活性剤などがあります。タンパク質の吸着には通常、高イオン強度で行われます。一方、低塩濃度でタンパク質を溶出します。このような条件はイオン交換クロマトグラフィー充填剤とは逆の吸着機構となります。それゆえイオン交換クロマトグラフィーとは異なる分離挙動となるメリットがあります。ブチル基を固定化した充填剤にはセルファイン MAX ブチルがありますが、セルファイン MAX ブチル HS は、高濃度にブチル基が固定化されています。この設計によって、特に多糖ワクチンの精製に効果を発揮します。

表 1 セルファイン MAXブチルHSの特徴

特徴	
製品名	セルファイン MAX ブチル HS
リガンド	ブチル基
ベース担体	高度架橋セルロース粒子
粒径	40 - 130 μm (ca. 90 μm)
BSA 吸着量 (mg/ml)	13
BSA 溶出効率 (%)	36
排除限界分子量 (kDa)	1,000
pH 安定性	2 - 13
操作圧力	< 0.3 MPa
保存液	20 % EtOH、スラリー状

流速特性

セルファイン MAX ブチル HS は流速特性に優れた製品特性を持っている。



カラム：内径 10 cm × 高さ 20 cm

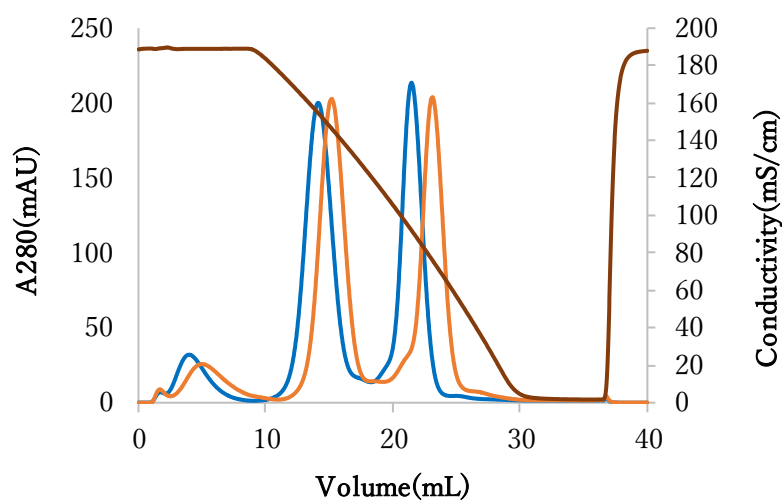
コンプレッションファクター：1.30

温度：24±1 °C

移動相：純水

疎水性の強さ

下図はセルファイン MAX ブチル HS のモデルタンパク質の分離特性を示している。この結果から疎水性の強さは MAX ブチル HS > MAX ブチルの順となっている。



カラム：内径 6.6mm × 高さ 5cm
タンパク質：リボヌクレアーゼ A、リゾチーム、 α -キモトリプシノーゲン A
溶出：10 mM PB (pH7.0)、グラジエン

Cellufine MAX Butyl Cellufine MAX Butyl HS
Conductivity

OI_MAX_Butyl_HS_V2_J

カラム充填方法

1. 目標のカラム容積になるように、必要な体積を計算します。
 - (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 1.25-1.33
2. 純水または充填バッファー（例えば 50 mM リン酸 Na, 1 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0）で 40～60 % (v/v) スラリーを調製します。
3. 軽く攪拌するか、真空にして脱気します。
4. カラム出口を閉じた状態で、注意深くスラリーをカラムに注ぎます。カラム充填体積によっては、リザーバーが必要になる場合があります。
5. 上部フィルターを開いて空気を抜きながら、可動栓をスラリー表面まで挿入して固定化します。
6. カラム出口を開いて、操作流速より 20～30%早い速度で溶出バッファーの送液を開始します。ベッドが安定したら、カラム出口を閉じます。次いで上部フィルターを開放した状態で、可動栓をベッドの表面まで下げます。サンプルをロードする前に、10 CV（カラム体積）の吸着バッファーで平衡化します。

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します。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用います。
2. サンプルをロードします。
3. 吸着していない不純物を除去するために、吸着バッファーを用いて 5 CV で洗浄します。
4. 溶出バッファーで吸着した標的分子を溶出します。

一般的な操作手順の概要を以下の表 2 に示します。 pH、緩衝液、塩、流速などの各条件は、目的に応じて最適化できます。

表 2 セルフアイン MAX ブチル HS の一般的な使用手順

工程		CV	各工程の解説
1	平衡化	3 - 10	カラム内バッファーの pH と導電率が必要なサンプルロードバッファーと同じであることを確認する。 50 mM リン酸 Na, pH 7.0 + 0.5～2.5 M 硫酸ナトリウム
2	サンプルロード	任意	カラムへのサンプルロード a) フロースルーまたは b) クロマトグラフィーの結合および溶出モードで使用する。
3	洗浄	5	吸着バッファーを使用する。
4	溶出	3 - 7	10 mM リン酸ナトリウムバッファー, pH 7.0
5	定置洗浄	3 - 10	0.5 M NaOH

推奨バッファー

吸着/サンプルロードバッファー: 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です。吸着の強さは、塩濃度、pH、温度に影響されます。一般的に、高塩濃度の塩を使用すると高吸着量となります。

溶出バッファー: 溶出は塩濃度を下げます。低塩濃度バッファー (0.5 M 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います。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ります。

サンプル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きます。必要に応じて不溶物をフィルター等で除去します。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します。カラムを吸着バッファーで平衡化した後、サンプルをロードします。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します。

操作流速

通液時は 0.3 MPa 以下での使用を推奨します。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します。

化学的・物理的安定性

室温で pH 2~13 の条件で安定して使用できます。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、6 M グアニジン塩酸塩および尿素) に安定です。定置洗浄は 0.5 M NaOH が使用できます。オートクレープする場合は中性 pH のバッファーに懸濁した後、20 分、121°C で処理します。

再生と脱バイロジェン

2~5 CV の 0.5 M NaOH で洗浄します。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ります。

応用事例：多糖ワクチンの精製

1. 培養

肺炎レンサ球菌 *Streptococcus pneumonia* 血清型 19F (ATCC49619) をヒツジ血液寒天培地に接種し、16 時間嫌気性条件で培養した後、2000 mL の Brain Heart Infusion 培地に接種し 37 °C で 20 時間培養した。

2. 溶菌・回収

培養液に 10%デオキシコール酸ナトリウムを添加し 37 °C で 16 時間インキュベートして溶菌した。遠心分離 (12,000 rpm, 15 分, 4 °C) し、上清を回収した。さらにこの上清を 0.45 μ m セルロースアセテートメンブレンフィルターでろ過した。ろ液を限外ろ過 (Vivaflow 200, MilliQ, MWC0 100k) により濃縮した。

3. 硫酸アンモニウム沈殿

試料に飽和溶解度の 50%に相当する硫酸アンモニウムを添加し、4 °C で 16 時間インキュベートした。ペレットを遠心分離 (12,000 rpm, 15 分, 4 °C) によりペレットを除き、上清を 0.2 μ m のメンブレンフィルターろ過を行った溶液をクロマトグラフィー用ロードサンプルとした。

4. セルフアイン MAX ブチル HS による疎水的相互作用クロマトグラフィー

以下のメソッドでクロマトグラフィーを行った。

工程	溶液	容量
平衡化	緩衝液 B	5 CV
サンプルロード	サンプル溶液	40 CV
溶出 1	緩衝液 A	10 CV
溶出 2	超純水	20 CV
洗浄	緩衝液 A	5 CV
定置洗浄	0.5M NaOH 溶液	5 CV
平衡化	超純水	20 CV

カラム: 6.7 mmID × 30 mm (1.06 mL)

流速: 0.212 mL/min (RT 5 min, 36cm/hr), 平衡化のみ 1 mL/min

緩衝液 A: 10 mM リン酸ナトリウム, pH7.0

緩衝液 B: 10 mM リン酸ナトリウム, pH7.0, 2.0 M 硫酸アンモニウム

5. 精製結果

多糖 (Ps) はアンスロン硫酸法を用いて定量した。タンパク質 (Pr) は Protein assay kit (Bio-Rad) を用いたブラッドフォード法により定量した。核酸 (NA) は BioSpec nano (Shimazu) を用いて 260 nm の吸光度を測定し、1 AU=50 μ g/mL として計算した。

	Ps μ g/mL	Ps Recovery%	Ps Purity%	Pr μ g/mL	NA μ g/mL	Pr/Ps %	NA/Ps%
ロード液	726	-	46	73	772	10	106
精製後	518	89	54	N.D.	436	0	84

保存方法

2週間以内の短期間であれば、バルクおよびカラムの状態、2 M (NH₄)₂SO₄ または 0.05 N NaOH を用いて常温で保存できます。長期保存する場合、20 %エタノールを含む中性バッファで、2～25℃で保存します。凍結させないようにして下さい。

使用期限

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

ご注文情報

製品名	パックサイズ	カタログ No.
セルファイン MAX ブチル HS	5 x 1 mL ミニカラム	22200-51
	5 x 5 mL ミニカラム	22200-55
	100 mL	22200
	500 mL	22201
	5 L	22202
	10 L	22203

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/>