

# Cellufine™ MAX フェニル/フェニル LS

セルファイン MAX フェニル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。

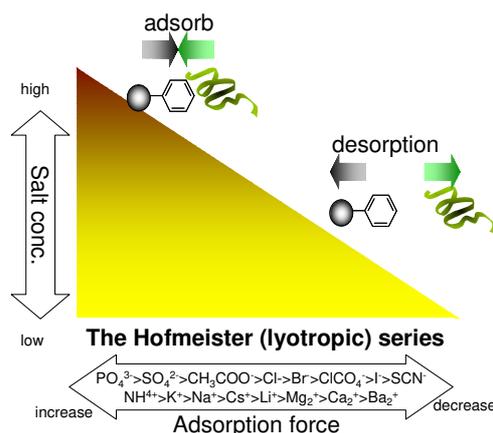
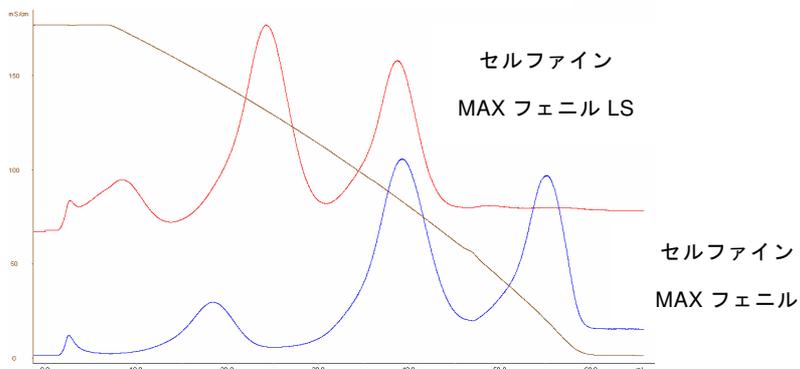


表 1 セルファイン MAX フェニル/フェニル LS の性能と特徴

	Cellufine MAX フェニル	Cellufine MAX フェニル LS
リガンド	<p>フェニル基</p>	
ベース担体	高度架橋セルロース	
粒径	40 - 130 μm (ca. 90 μm)	
排除限界分子量 (kD)	1000	
BSA 吸着量 (mg/mL-gel)	11	4
BSA 溶出効率 (%)	40	90
IgG 10%動的吸着量 (mg/mL-gel)	31	19
推奨操作圧力	<0.3 MPa	
pH 安定性	2 - 13	
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。

下図はセルファイン MAX フェニルシリーズのモデルタンパク質の分離挙動を示しています。セルファイン MAX フェニル LS はリガンド濃度を低く設計した充填剤となります。

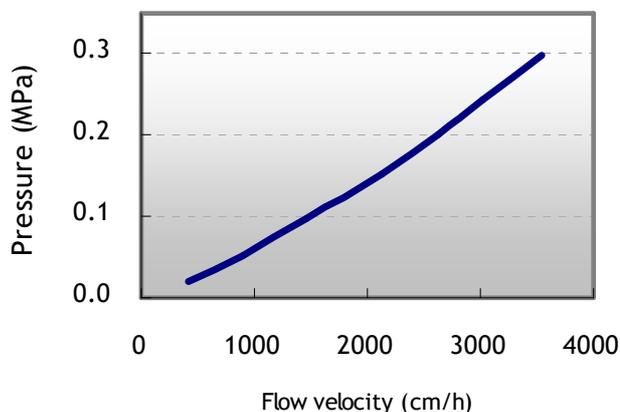


カラム： 内径 6.6mm × 高さ 5cm

タンパク質： リボヌクレアーゼ A、リゾチーム、 $\alpha$ -キモトリプシノーゲン A

溶出： 10 mM リン酸バッファー (pH7.0) 1.5M → 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  グラジエント

また、セルファイン MAX フェニルシリーズは硬度に架橋されており、高流速で使用できる特徴があります。



カラム： 内径 2.2cm x 高さ 20 cm、温度： 24±1 °C、移動相： 純水

## カラムへの充填手順

### 材料と必要器具

- ・ 充填剤
- ・ 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（水またはバッファー）
- ・ 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）

### スラリーの調製

- 1) 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。

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

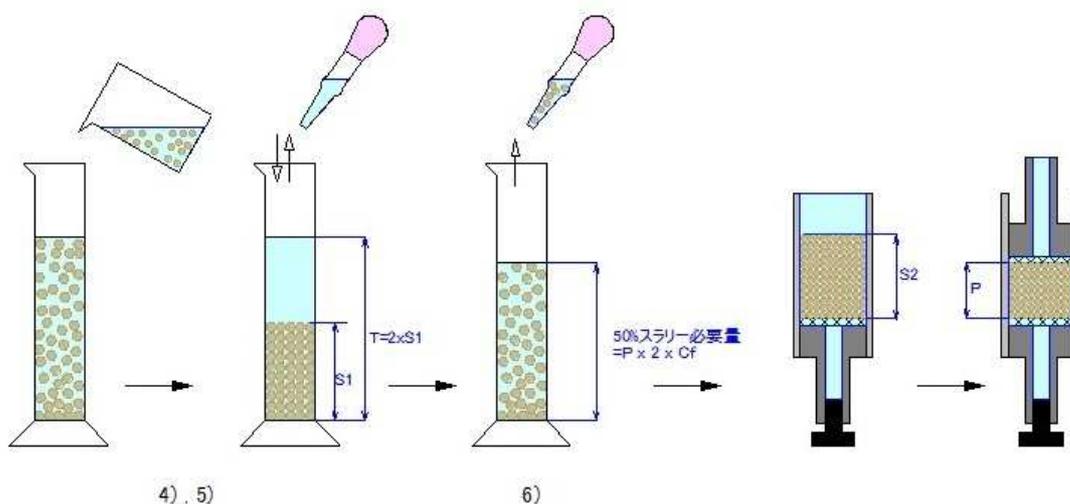


図 1 スラリー調製

- 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 S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。

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

$C_f$  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 $C_f$ は充填効率に重要な因子です。可働栓カラムを使用し $C_f$ 値を調節してください。 $C_f$ の例を以下に示します。

### カラムの充填

カラムサイズの例 (直径×ベッド高さ)	MAX フェニル及び MAX フェニル LS
約 10.0 cm × 20.0cm	1.15~1.25

- 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 <0.30MPa の背圧で充填液を 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 $<0.30\text{MPa}$ の背圧で通液する。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。

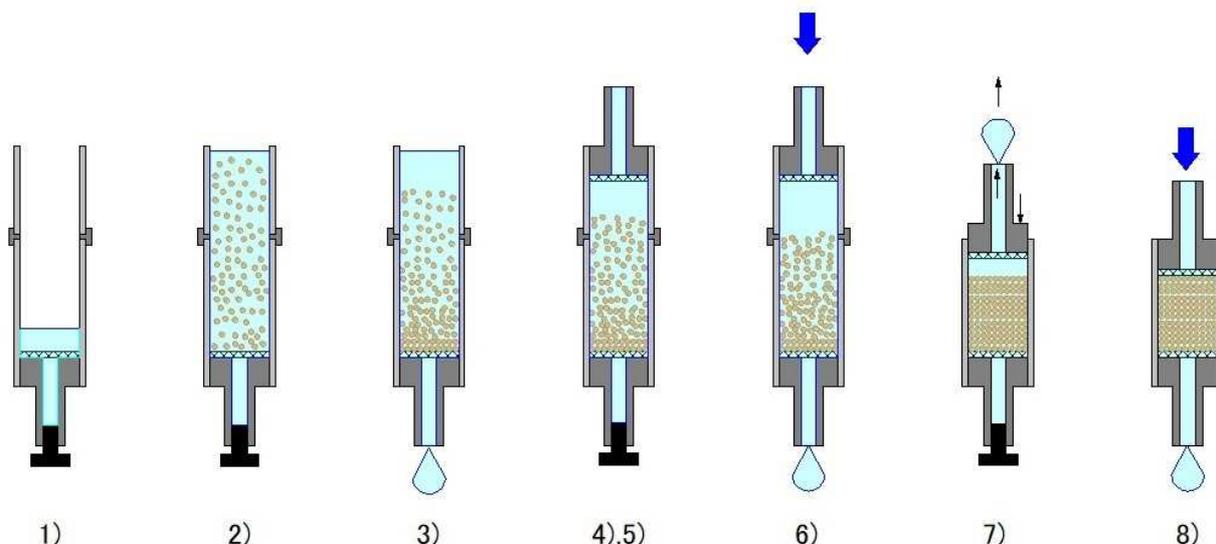


図2 カラム充填の手順

- 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。

### 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 ( $A_s$ ) 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) 2-5 CV の溶出バッファー（低塩濃度）で平衡化する。次いで同量の吸着バッファーで洗浄する。
- 2) 吸着バッファーに溶解されたサンプルをロードする。

- 3) 未吸着の不純物を除去するため、吸着バッファーで数 CV 洗浄する。
- 4) 吸着した目的物質を溶出バッファーで溶出する。

## 推奨バッファー

**吸着バッファー:** 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。

**溶出バッファー:** 吸着バッファーと同じバッファーで低塩濃度 (0.5M 以下) のものを使用する。ステップワイズやグラジエントで溶出を行う。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。

## 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に 1~20 mg/ml になるように溶解する。不溶物は遠心分離かフィルターによって除去する。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。一般的に吸着の強さは、セルファイン MAX フェニル > MAX フェニル LS > ブチルとなっている。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。

## 推奨する操作流速

MAX フェニル  $\leq 800\text{cm/h}$  (0.3MPa 以下)

MAX フェニル LS  $\leq 1200\text{cm/h}$  (0.3MPa 以下)

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。

## 再生と脱パイロジェン

2~5 CV の 0.5 M NaOH 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。

## 定置洗浄 (CIP)

0.5M の NaOH での洗浄が可能です。

## 安定性

使用する pH は 2~13 の範囲で、使用温度は 2~30°C を推奨する。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。オートクレーブは水に懸濁した後 121°C 20 分で処理が可能です。

## 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。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  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  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、0.02 % アジ化ナトリウム水溶液か、20 % エタノールを含む中性バッファで、2 - 25°C で保存する。保証期限は製造から 5 年となります。

## 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*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998

## ご注文情報

	容量	カタログ No.
セルファイン MAX フェニル	1 mL x 5 (ミニカラム)	20700-51
	5 mL x 5 (ミニカラム)	20700-55
	100 mL	20700
	500 mL	20701
	5 L	20702
	10 L	20703
セルファイン MAX フェニル LS	1 mL x 5 (ミニカラム)	20800-51
	5 mL x 5 (ミニカラム)	20800-55
	100 mL	20800
	500 mL	20801
	5 L	20802
	10 L	20803

## 購買/技術サポート

(北米)

JNC America Incorporated  
411 Theodore Fremd Avenue, Suite 206 South  
Rye, NY 10580 USA  
TEL: 914-921-5400  
FAX: 914-921-8822  
E-mail: cellufine@jncamericany.com

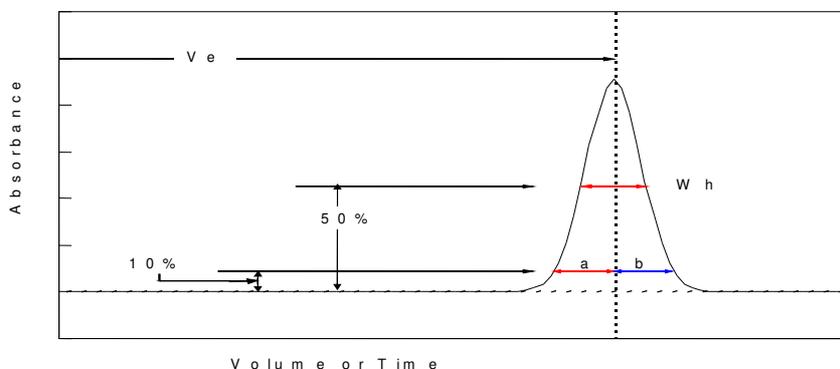
(日本、アジア、その他)

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: 03-3243-6150  
Fax: 03-3243-6219  
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]
Ve	溶出時間 (または溶出体積)
Wh	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

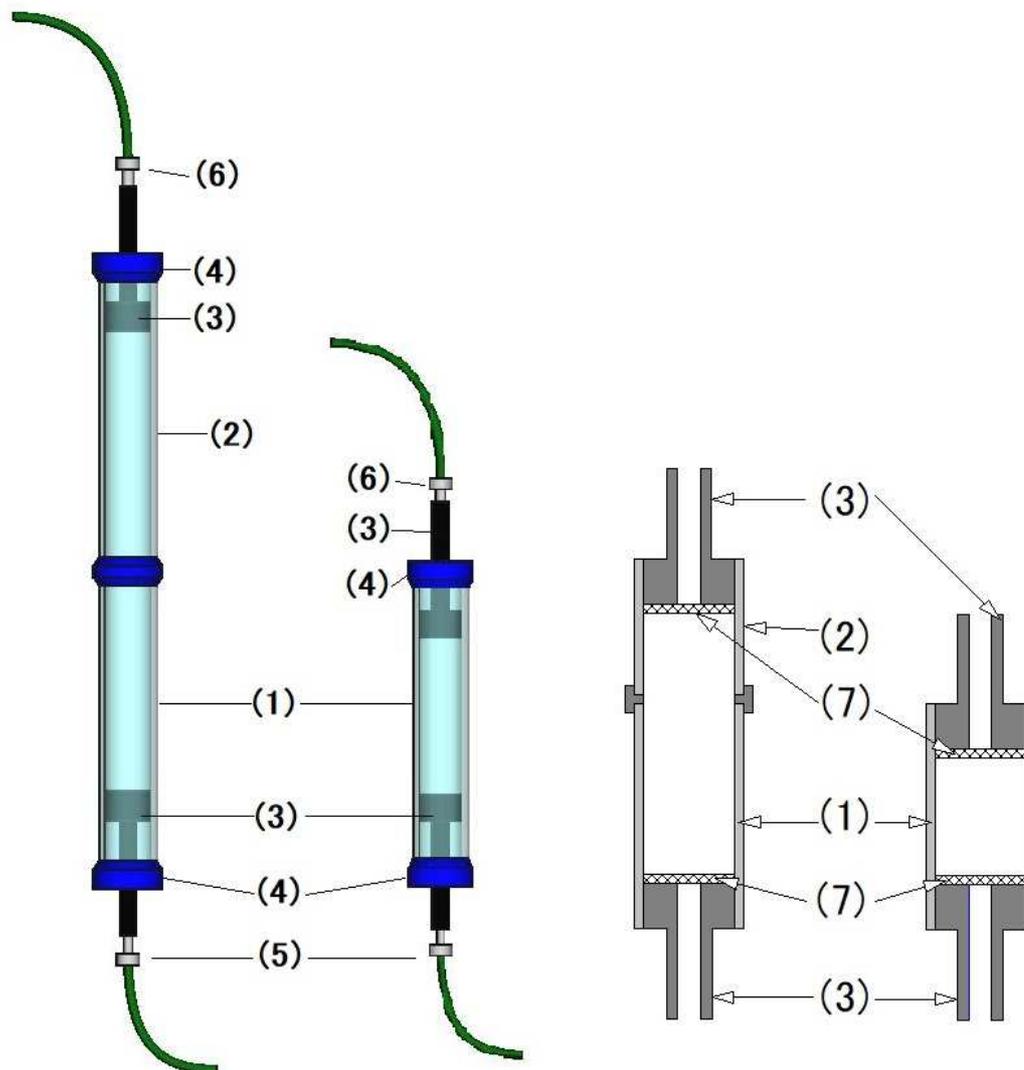
$$HETP = L/N$$

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

$$As = b/a$$

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  $A_s$  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)		