

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 MAX フェニル / MAX フェニル LS

概要

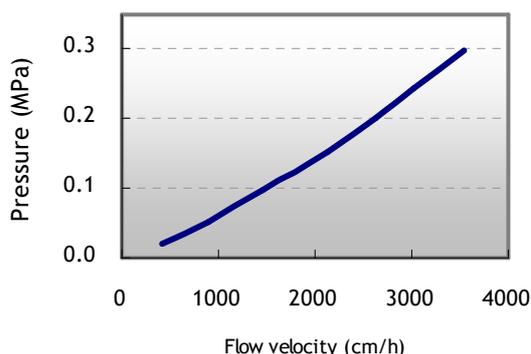
セルファイン MAX フェニルは疎水性タンパク質のクロマトグラフィー精製に使用します。多くのタンパク質には疎水性アミノ酸残基があります。これらアミノ酸と充填剤のフェニル基が疎水相互作用して吸着します。疎水相互作用に影響される因子は、塩濃度、温度、pH、有機溶媒、界面活性剤などがあります。タンパク質の吸着には通常、高イオン強度で行われます。一方、低塩濃度でタンパク質を溶出します。このような条件はイオン交換クロマトグラフィー充填剤とは逆の吸着機構となります。それゆえイオン交換クロマトグラフィーとは異なる分離挙動となるメリットがあります。

物理的・化学的特徴

	セルファイン MAX フェニル	セルファイン MAX フェニル LS
ベース基材	高度架橋セルロース	
粒子形状	真球	
粒径 (μm)	ca. 40 - 130	
リガンドタイプ	フェニル基	
BSA 吸着量 (mg/ml)	14	6
BSA 溶出効率 (%)	40	90
ポリクローナル抗体 IgG (mg/ml) 動的吸着量 (10%ブレイクスルー時)	31	19
排除限界分子量 (kDa)	1,000	
pH 安定性	2 - 13	
操作圧力	< 0.3 MPa	
供給形態	20 % EtOH、スラリー状	

流速特性

セルファイン MAX フェニルシリーズは高流速で使用できる特徴がある。



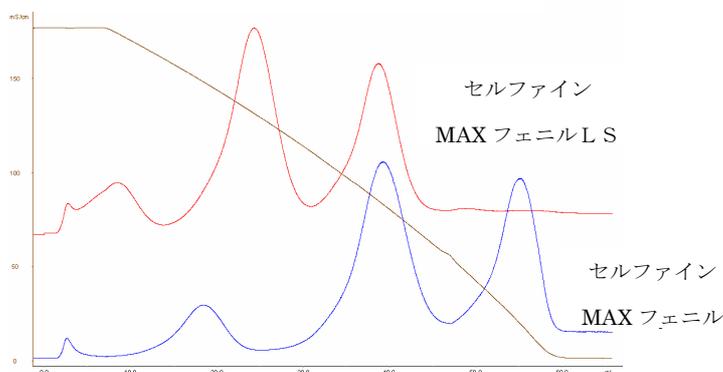
カラム: 内径 2.2cm x 高さ 20 cm

温度: 24±1 °C

移動相: 純水

モデルタンパク質の分離挙動

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る。セルファイン MAX フェニル LS はリガンド濃度を低く設計された充填剤である。



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 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

カラム充填方法

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。
2. 充填バッファー (50 mM リン酸 Na, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0) で 40 - 60 % (v/v) スラリーを調製する。
3. 緩やかに攪拌する。必要であれば脱気しながら攪拌する
4. カラム出口を閉めた後、注意深く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。
5. カラム入口を開放してカラム内の空気を出しながら、充填剤の表面まで上部フィルターを下げっていく。
6. 気泡が入らないようにポンプと上部フィルターを配管で接続し、カラム出口を開放してポンプから移動相の送液を開始する。移動相の流速は使用時の 20-30% 高流速にする。
7. カラム高さが安定した後、送液を停止して、カラム出口を閉める。その後カラム入口を開放して、上部フィルターを充填剤の表面まで下げっていく。
8. 10 カラム体積 (CV) の吸着バッファーを用いてカラムを平衡化して使用する。

使用方法

一般的な使用方法

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。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。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 > プチルとなっている。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。

操作流速と溶出

すべてのセルファイン MAX 疎水相互作用クロマトグラフィー充填剤において、0.3 Mpa 以下の使用を推奨する。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。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。

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

2 - 5 CV の 0.5 N 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。

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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ または 0.05 N NaOH を用いて常温で保存できる。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ーで、2 - 25°C で保存する。凍結させないこと。

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

ご注文の情報 (カタログ No.)

Media type	容量					
	Mini-column 1 ml x 5	Mini-column 5 ml x 5	100ml	500ml	5 lt	10 lt
Cellufine MAX Phenyl	20700-51	20700-55	20700	20701	20702	20703
Cellufine MAX Phenyl LS	20800-51	20800-55	20800	20801	20802	20803

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ホームページアドレス: <http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>