

Cellufine™ A-500

Cellufine A-200、500、800 は、タンパク質、ペプチドおよびその他の生体高分子等を濃縮・精製するための弱陰イオン交換クロマトグラフィー用充填剤です。物理的強度の高い球状セルロースの表面に DEAE（ジエチルアミノエチル）を固定化することで、イオン交換能を付加しています。

細孔径と目的物の分子量により、クロマトグラフィーに使用する充填剤を決定します。A-200 は低分子量 (<30kD) のペプチドやタンパク質、A-500 は 500kD までのタンパク質、A-800 は 1000kD までの大きな生体分子に対するクロマトグラフィーに最適です。優れた流速特性により、迅速なクロマトグラフィーを可能にします。

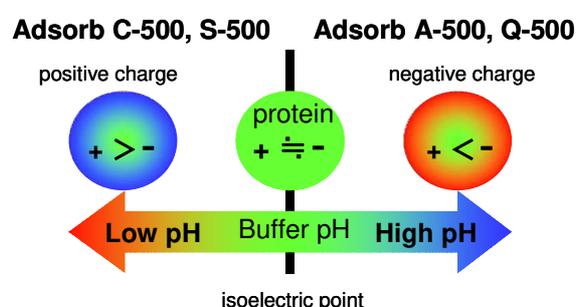


表 1 セルファインA-200、500、800の性能と特徴

	A-200	A-500	A-800
リガンド	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ -\text{R}-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{HCl}^- \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$ DEAE（ジエチルアミノエチル）基		
ベース担体	真球状、架橋セルロース粒子		
粒径	40 - 130 μm (ca. 90 μm)		
排除限界分子量 (kD)	30	500	1000
イオン交換容量 (meq/mL-gel)	0.13-0.18	0.13-0.17	0.05-0.08
推奨操作圧力	<0.2 MPa	<0.3 MPa	<0.1 MPa
膨潤度 (ml / g dry media)	6-9	8-10	12-16
動的吸着量	BSA		
	46	57	84

(mg/mL-gel)	ヒトγグロブリン	38	42	68
推奨定置洗浄液 (CIP)	0.5M 水酸化ナトリウム水溶液			
pH 安定性	2 - 12			
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

- ・ 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（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) 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。

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

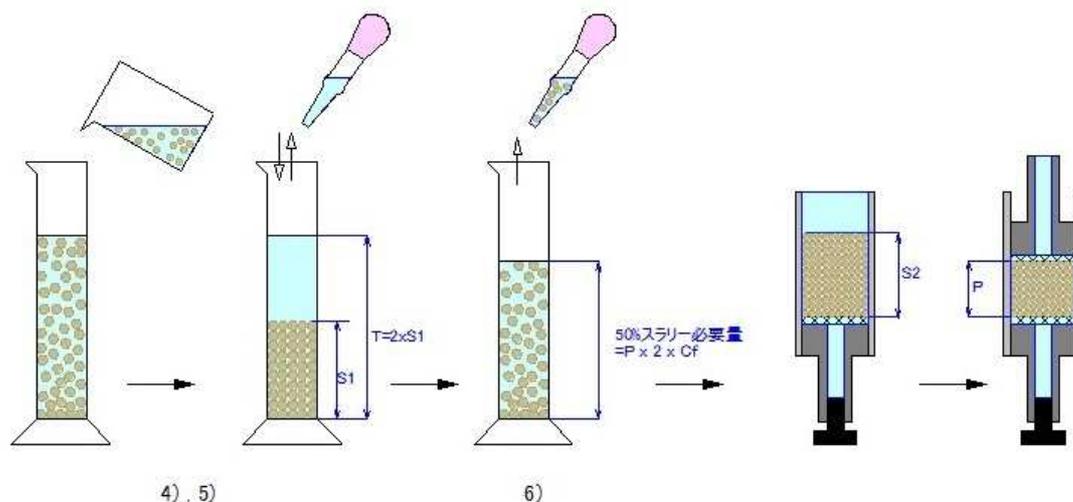


図1 スラリー調製

- 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。

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

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。

$$Cf = \text{自然沈降体積 (S2)} / \text{パッキング体積 (P)}$$

※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。Cellufine A-500 の Cf の例を以下に示します。

カラムサイズの例 (直径×ベッド高さ)	推奨 Cf (純水で充填の場合)
3.2 cm × 20 cm	1.10~1.20

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 0.15~0.25MPa 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 0.15~0.25MPa 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。

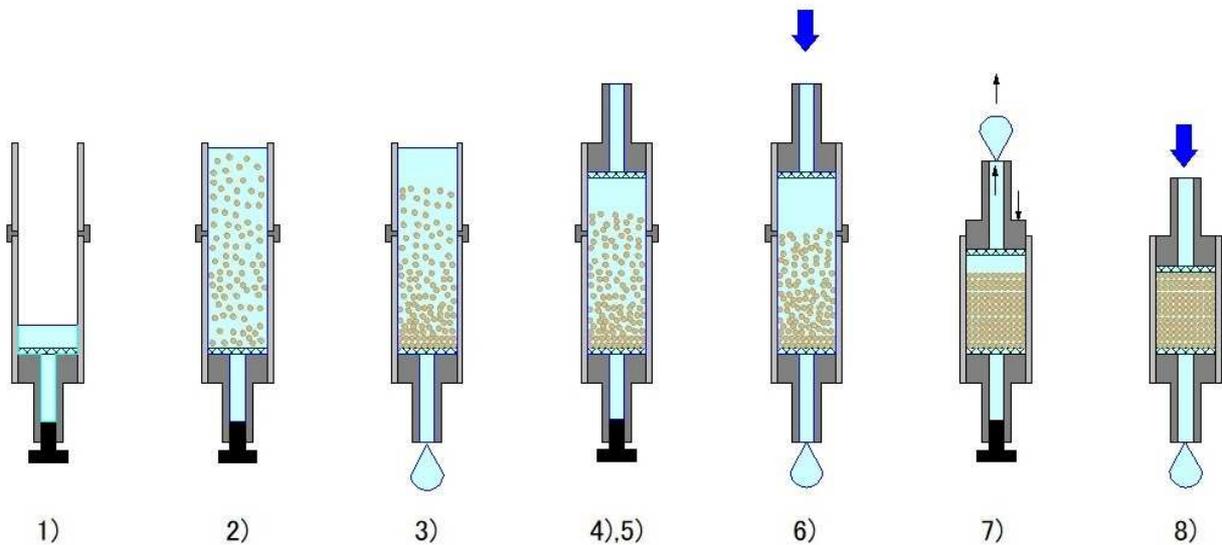


図 2 カラム充填の手順

- 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 (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) 吸着バッファーで、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ください)
- 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。

※一般的な使用法と反対に、不純物を吸着させて目的物質を通過させる方法もあります。

推奨バッファー

一般的に、セルファイン陰イオン交換体への吸着は、pH 6.0~8.5 の範囲で比較的低いイオン強度 (例えば 0.1 M NaCl 以下) で起こります。陰イオン交換では、吸着バッファーは目的サンプルの等電点よりも pH 値を 1 以上高く設定します。結合した成分は、塩濃度の高い緩衝液で段階的に溶出するか、直線的な塩濃度勾配で溶出することにより分離されます。

吸着バッファー: 0.02~0.05 M リン酸ナトリウム (pH 7.5) または、トリス-塩酸 (pH 8.0) バッファー

溶出バッファー: 吸着バッファーに 0.1~2.0 M の NaCl を加えたものを使用する。5~10CV の容量で、グラジエントにより NaCl 濃度を最終的に 0.5 M 程度まで増加させる。目的サンプルが溶出されない場合には更に高濃度の NaCl を流すか、pH を変更する。

分取クロマトグラフィーにおいてはステップワイズで溶出させることが一般的であるが、最適な溶出塩濃度はグラジエント溶出による予備検討で確定する。

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。サンプル量は、イオン交換容量や標準タンパク質の吸着量を参考にして設定しますが、高分離を求める場合は、吸着容量の10-20%が適当です。

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、脱塩フィルターや透析、セルファイン GH-25 などの脱塩カラムでバッファー交換しても良い。

推奨する操作流速

50~200cm/h

再生と脱ピロジェン

5CV の1~3 M NaCl 含有バッファーを用いて再生を行う。もし不十分なら3~10CV の0.1 M NaOH で洗浄後、1~3 M NaCl 含有バッファーで洗浄する。次いで吸着バッファーで平衡化し、次の操作に備える。

ピロジェンフリーのカラムが必要な場合は、5 CV の0.2M NaOH 水溶液でカラムを洗浄し、16 時間または終夜放置する(0.2 M NaOH-20% EtOHであれば3~5時間、0.2 M NaOH-90% EtOH であれば1時間でよい)。ピロジェンフリーの溶出バッファーを使用して洗浄後、エンドトキシン濃度を確認したのち使用する吸着バッファーで平衡化する。

定置洗浄(CIP)

再生と同じ操作でイオンの吸着した物質を洗浄したのち、0.2 M のNaOH を5CV 流す(推奨流速30-60cm/h)。汚れが著しい場合は0.5M のNaOH で5CV 流す。その後、吸着バッファーで平衡化する。

疎水性の強い物質を洗浄するためには、70%のEtOH や30%IPA で洗浄する。この場合、グラジエントで溶媒の濃度を変化させることでカラムに気泡が発生することを避ける。

※有機溶剤を使用する場合、カラムに気泡が発生しやすくなる。発生した場合は再度カラムの充填が必要となるため注意が必要。

安定性

使用する pH は2~12 の範囲で、使用温度は2~30°Cを推奨する。低濃度の塩を含有した中性バッファーに浸漬した状態で、121°C、20 分のオートクレーブが可能です。

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。開封後のスラリ

— およびカラムの状態、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。
保証期限は製造から5年となります。

ご注文情報

	容量	カタログ No.
セルファイン A-200	1 mL x 5 (ミニカラム)	19611-51
	100 mL	676 980 327
	500 mL	19611
	5 L	19612
	10 L	676 980 335
セルファイン A-500	1 mL x 5 (ミニカラム)	19805-51
	5 mL x 5 (ミニカラム)	19805-55
	100 mL	675 980 327
	500 mL	19805
	5 L	19806
	10 L	675 980 335
セルファイン A-800	1 mL x 5 (ミニカラム)	19865-51
	5 mL x 5 (ミニカラム)	19865-55
	100 mL	673 980 327
	500 mL	19800
	5 L	19801
	10 L	673 980 335

購買/技術サポート

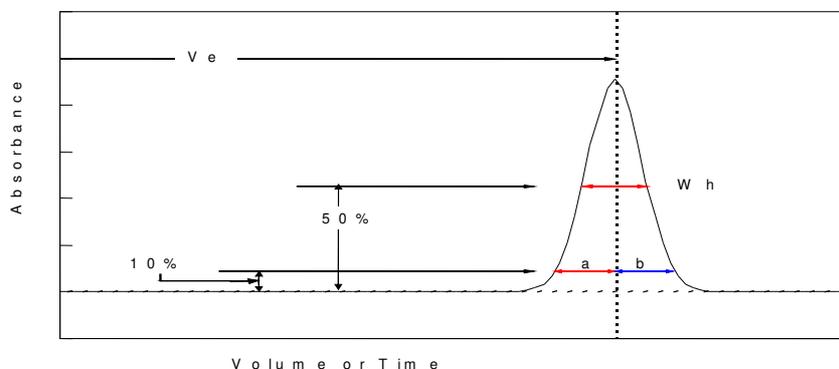
(北米)
JNC America Incorporated
411 Theodore Fremd Avenue, Suite 206
South Rye, NY 10580 USA
TEL: 914-921-5400
FAX: 914-921-8822
E-mail: cellufine@jncamericany.com

(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: +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: 0.2~0.4M 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

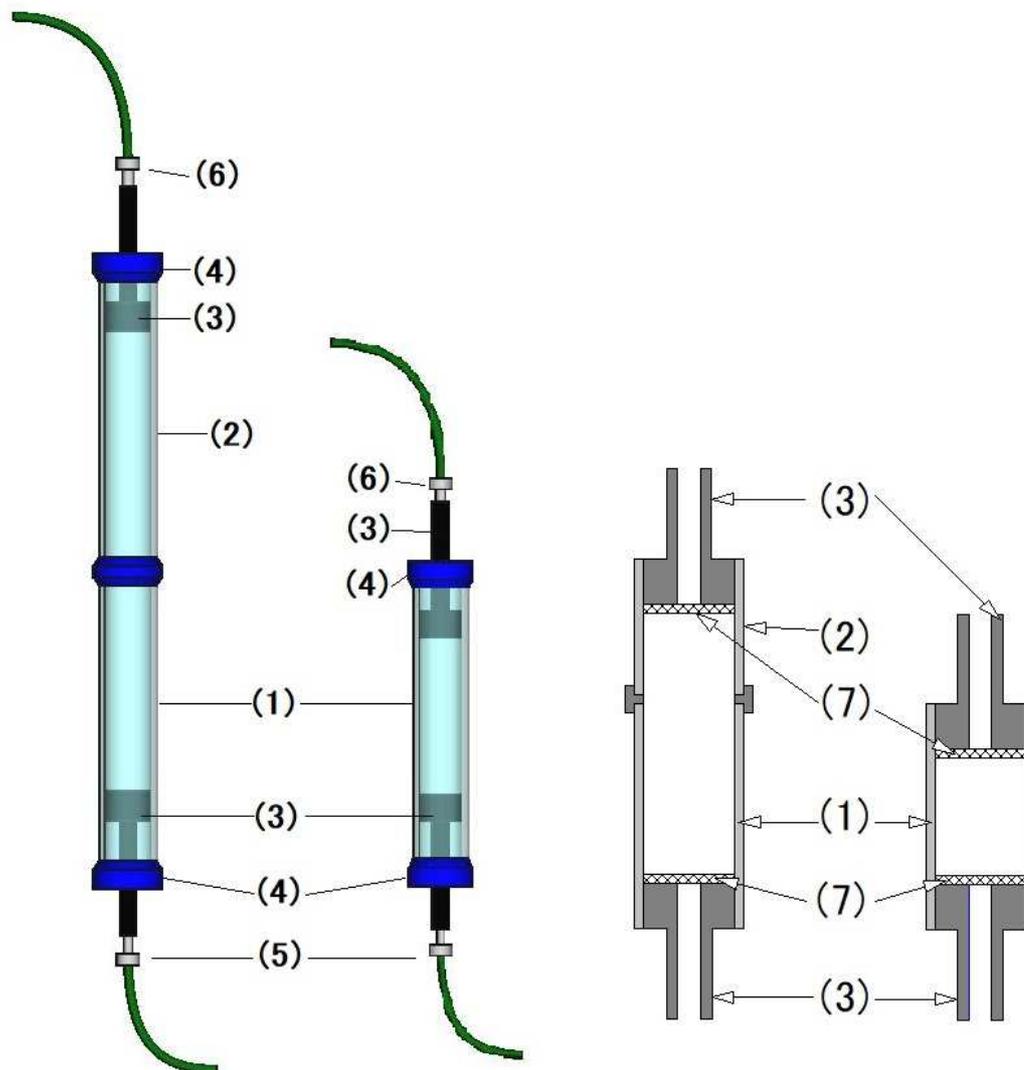
$$\text{HETP} = L/N$$

$$N = 5.54 \times (V_e/W_h)^2$$

$$A_s = b/a$$

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)		