

取扱説明書

弱陰イオン交換クロマトグラフィー充填剤
セルファイン™ MAX DEAE

概要

セルファイン MAX シリーズはセルファインクロマトグラフィー充填剤の次世代のブランドネームです。弱陰イオン交換クロマトグラフィー充填剤セルファイン MAX DEAE は動的吸着量の向上および高流速での耐圧性を備えるために、高度に架橋された粒子に表面修飾を施したベース担体を使用しています。高い性能を備えるため、ダウンストリームプロセスにおいてリードタイムの向上をもたらします。

セルファイン MAX DEAE の特長

タイプ	DEAE (ジエチルアミノエチル)
イオン交換基	弱陰イオン/ $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
ベース担体	デキストラン修飾された高度架橋セルロース粒子
粒径	ca. 40 - 130 μm (平均 90 μm)
イオン交換容量	0.12~0.22 meq /ml
操作流速	600 cm/h (0.3 MPa) I. D. 30 cm-L20 cm、移動相：純水 24 °C
動的吸着量	>120 mg BSA/ml gel
pH 安定性 (20°C、1 週間)	2 - 12
化学安定性	一般的に使用されるバッファーで安定、0.5 M NaOH に安定
保存液	20 %エタノール水溶液

カラム充填方法

- 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。
 - 充填カラム体積 = カラム断面積 (cm^2) x カラム高さ (cm)
 - 必要となるカラム沈降体積 = 充填カラム体積 x 1.2
- 純水でゲルを洗浄する (バッファーでも良い)。
- 純水、0.1M NaCl 水溶液または充填バッファーで 40 - 60 % (v/v) スラリーを調製する。
- 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)
- カラム準備
 - 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。
 - 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
 - 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。
- 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。
- カラム上部フェイルターを装着する (気泡を入れないように注意する)。
- カラム出口を開けて 1000cm/h または 0.3MPa の操作圧力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. カラム高さが安定したら、その位置をマークしておく。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。シールを緩めて上部フィルターをマークした位置まで下げていく。
11. カラム高さが安定したら上部アダプターをロックし、上部フィルターに配管を取り付けてポンプと連結する。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 1.15
 - (c) 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 (0.1 M NaCl 水溶液やバッファでも良い)
3. 純水、0.1M NaCl 水溶液または充填バッファで 40 - 60 % (v/v) スラリーを調製する。
4. 室温で緩やかに 1 時間程度攪拌する。必要であれば脱気しながら攪拌する。
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、充填バッファまたは 20%エタノールで湿らせておく。
 - (c) 充填バッファをカラムに加え、カラム出口からバッファ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。
8. カラム出口を開けて 1000cm/h または 0.3MPa の操作圧力で溶出バッファを 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) の吸着バッファを通液してカラムを平衡化する。

充填後の評価方法

付録 1 を参照のこと。

操作ガイドライン

一般的な使用方法

一般的にセルファイン MAX 陽イオン交換クロマトグラフィー充填剤は比較的低いイオン強度 (例えば 0.1M NaCl 以下) のバッファで吸着させる。また pH 条件は 6.0~8.5 の範囲内で吸着する。吸着量は吸着バッファの pH と電気伝導度に強く影響する。タンパク質が負の電荷を帯びているか等電点付近の場合に充填剤に吸着する。吸着したタンパク質等

の成分はステップワイズで高塩濃度のバッファーで溶出するか、リニアグラジエントによって溶出する

サンプルの準備とサンプルロード

サンプルに存在する不溶物を遠心分離かフィルターで取り除く。サンプル濃度は1 - 20 mg/ml になるように吸着バッファーや吸着バッファーと同等のイオン強度、pHになるようなバッファーで調製しておく。必要であればサンプルを透析、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。

推奨バッファー

吸着バッファー: 0.01 - 0.05 M リン酸NaまたはTris-HCl (pH 6.0 - 8.5)

溶出バッファー: 0.1 - 2.0 M 塩化ナトリウム入り吸着バッファー

その他の一般的なバッファーも使用可能と思われる。タンパク質の精製に関してさらに情報を得たい場合は文献などを参考にすること。

使用後の再生と平衡化

タンパク質の分離精製後、5 CVの高塩濃度バッファー (1-2 M NaCl) で洗浄する。次いで5 CV (またはpHと電気伝導度が一定になるまで) の吸着バッファーで平衡化する。

脱パイロジェン

5 CVの0.2M NaOH水溶液でカラムを洗浄し、16時間放置した後、エンドトキシンを含まない水または平衡化バッファーで洗浄する。

エンドトキシンの除去には0.2 M NaOH-20% EtOHが効果的である。さらに0.2 M NaOH-90% EtOHであれば、2時間でエンドトキシンを減少させることができる。

化学安定性および物理的安定性

以下の化学薬品に安定:

多くの塩類 (NaCl, (NH₄)₂SO₄ など)、アルコール類 (30 % (v/v) イソプロパノール, 70 % (v/v) エタノール)、尿素 (6 M) およびグアニジン-HCl (6 M)

pH 2-12 の条件で 20°C、1 週間で安定

定置洗浄 (CIP)

0.5M NaOHで10 CVの洗浄条件で、少なくとも100回後の繰り返し試験後も、性能は維持されていた。

操作流速

セルファイン MAX CMは高度に架橋されたセルロース粒子をベース基材としている。このため高流速でも安定的に使用できる。

内径2.2cm x 高さ20 cmのカラムにおいて、0.3MPa以下の操作圧力で流速1000cm/hを通過することができる。

内径30cm以上 x 高さ20 cmのカラムにおいて、0.3MPa以下の操作圧力で流速500cm/h以上を通過することができる。

保存方法

密閉した容器内で常温保存が可能。凍結しないこと。

pH2 - 12 の条件において、常温で 2 週間以内でバルクおよびカラムの状態での保存が可能。
0.5M NaOH の条件において、20℃以下の温度で 2 週間以内の保存が可能。

長期保存する場合、20%エタノールを含む中性バッファーで、2 - 25℃で保存する。

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.-G. 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.)

製品名	Pack Size					
	MC* 1mL x 5	MC 5mL x 5	100 mL	500 ml	5 L	10 L
セルファイン MAX DEAE	21000-51	21000-55	21000	21001	21002	21003

MC = ミニカラム

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

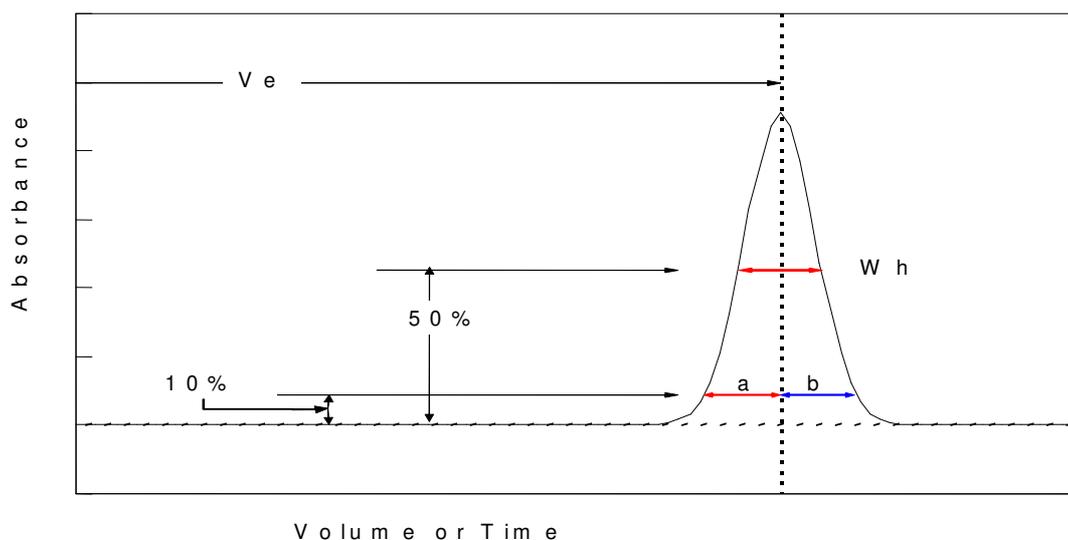
e メールアドレス: cellufine@jnc-corp.co.jp

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

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。

パラメーター	条件
サンプルロード量	カラム体積の 1 % (最大 2.5%) の液量
サンプル組成	1-2 % (v/v) アセトン または 1 M NaCl
流速	~30 cm/h (X mL/hr/column cross section)
検出器	吸光度 OD 280nm (アセトンの場合) 電気伝導度 (NaCl の場合)



計算式
 $HETP = L/N$
 $N = 5.54 \times (V_e/W_h)^2$
 $As = b/a$

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。

一般的に、N の値は大きいほど優れています (同様に、HETP の値は小さいほうが優れています。)。非対称性 (As) は 1 に近い値が理想ですが、一般に許容される値の範囲は 0.8~1.6 です。