

Cellufine™ MAX Q-hv

セルファイン MAX Q-hv は強陰イオン交換クロマトグラフィー充填剤です。核酸・多糖・ウイルス粒子などサイズの大きい生体分子に適したリガンド設計をしています。

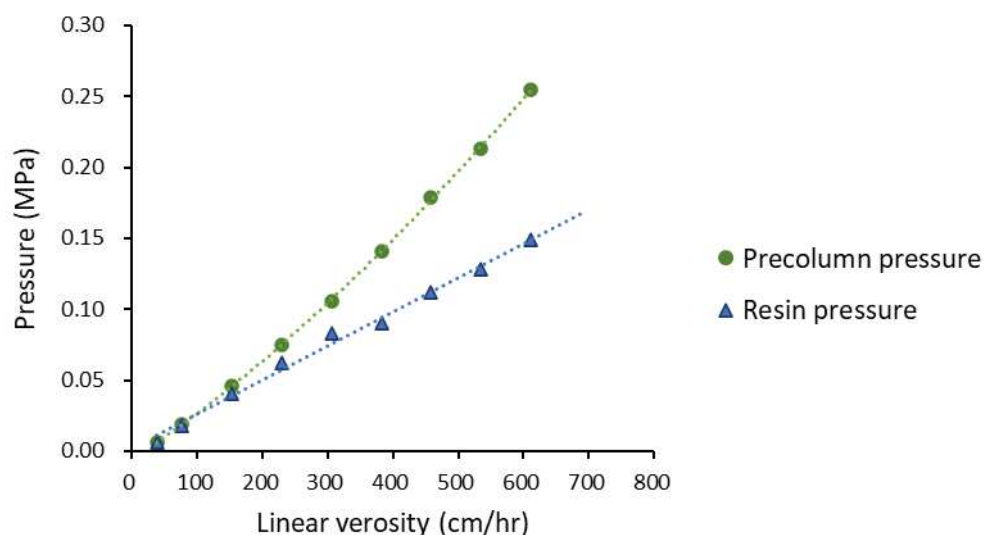
セルファイン MAX Q シリーズには、溶出性の優れたセルファイン MAX Q-r、高吸着性能が高いセルファイン MAX Q-h がラインナップされています。**セルファイン MAX Q-hv** は、吸着性能を維持しつつ、多糖やウイルス粒子のようなサイズの大きい標的物質の溶出性を改善することを志向したリガンド設計をしています。このため、従来の MAX Q-r、MAX Q-h とは異なる分離挙動が期待できます。

表 1 セルファイン MAX Q-hv の特徴

製品名	セルファイン MAX Q-r	セルファイン MAX Q-h	セルファイン MAX Q-hv
イオン交換基	強陰イオン / $-N^+(CH_3)_3$		
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	0.10~0.20 meq /ml	0.13~0.22 meq /ml	0.04~0.07 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	110 mg BSA/ml	180 mg BSA/ml	120 mg BSA/ml
使用可能 pH	2-12	2-12	2-12
pH 安定性 (40°C, 1 週間)	2-12	2-12	2-12
化学安定性	一般的に使用されるバッファーで安定		
定置洗浄	1 M NaOH		0.5 M NaOH
保存液	20 % エタノール水溶液		

流速特性

セルフアイン MAX Q-hv 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：1.10

温度：24±1 °C

移動相：純水

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) × 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 × 1.08-1.12
2. 純水またはバッファーでスラリーを洗浄します。
3. 純水、0.1M NaCl 水溶液または充填バッファーで 40～60 % (v/v) スラリーを調製します。
4. 室温で緩やかに攪拌します。必要であれば脱気しながら攪拌します (室温、1 時間)。
5. 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。
6. 上部フィルター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。
7. 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。
8. 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。

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

一般的に陰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 0.1 M NaCl 以下）のバッファーで吸着させます。また pH 条件は 6～9 の範囲内で操作します。吸着量は吸着バッファーの pH と電気伝導度に強く影響します。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します。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します。

1. 吸着バッファーでカラムを平衡化します。
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。

一般的な使用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 セルファイン MAX Q-hv の一般的な使用手順

工程	CV	各工程の解説
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。
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。
洗浄	5	吸着バッファーを使用する。
溶出	3 - 7	溶出バッファーを使用する。
定置洗浄	3 - 10	0.5 M NaOH

推奨バッファー

吸着バッファー: 10～50 mM リン酸 Na (pH 6～8) または Tris-HCl (pH 6～9)

サンプルロード: 吸着バッファーで置換したサンプルを用意する

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

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。サンプル濃度は 1 - 20 mg/ml になるように調製します。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 の吸着バッファで洗浄して未吸着物質を除去します。

操作流速

セルファイン MAX Q-hv 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ます。このため高流速でも安定的に使用できます。内径 2.2 cm x 高さ 20 cm のカラムにおいて、0.3 MPa 以下の操作圧力で流速 1,000 cm/h を通液することができます。内径 30 cm 以上 x 高さ 20 cm のカラムにおいて、0.3 MPa 以下の操作圧力で流速 500 cm/h 以上を通液することができます。

化学安定性

室温で pH 2~12 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 0.2 M NaOH が使用できます。

定置洗浄 (CIP)

0.5 M NaOH で 15 分間の暴露における安定性から、少なくとも 100 回後の繰り返し暴露後も、性能劣化は確認されませんでした。

脱パイロジェン

5 CV の 0.2 M 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で洗浄します。

エンドトキシンの除去には 0.2 M NaOH-20% EtOH が効果的です。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、2000mL 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 μm 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、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. セルファイン MAX ブチル HS による疎水的相互作用クロマトグラフィー
操作方法はセルファイン MAX ブチル HS の取扱説明書を参照のこと。
5. セルファイン MAX Q-hv による陰イオン交換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 A	5 CV
サンプルロード	サンプル溶液	-
洗浄	緩衝液 A	15 CV
溶出	緩衝液 B	10 CV
洗浄	緩衝液 A	10 CV
定置洗浄	0.5M NaOH 溶液	10 CV
平衡化	超純水	20 CV

カラム : 6.7 mmID×30 mmH (1.06 mL)

流速 : 0.424 mL/min (RT 2.5 min, 72 cm/hr)

緩衝液 A : 50 mM リン酸ナトリウム, pH 6.0

緩衝液 B : 50 mM リン酸ナトリウム, 1.0 M 塩化ナトリウム, pH 6.0

6. 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。

	10% DBC mg/mL-resin	Ps Recovery%	Ps Purity%	Pr μ g/mL	NA μ g/mL	Pr/Ps %	NA/Ps %
ロード液	-	-	75.6	5.1	161.7	1	31
精製後	6.4	97.8	98.7	Not detected	4.3	0	1

保存方法

2 週間以内の短期間であれば、pH2 - 12 の条件にお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ーで、2~25°C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.
セルフアイン MAX Q-hv	5 x 1 mL ミニカラム	22100-51
	1 x 5 mL ミニカラム	22100-15
	100 mL	22100
	500 mL	22101
	5 L	22102
	10 L	22103

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

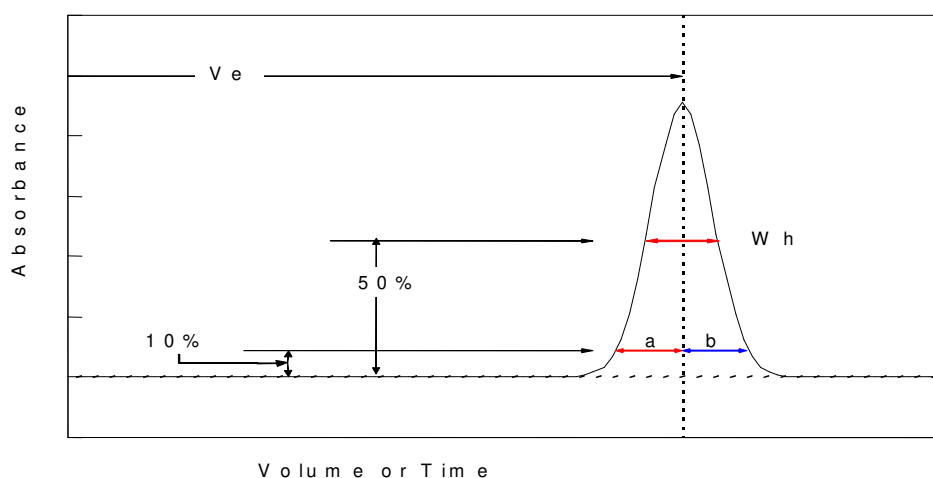
e メール: cellufine@jnc-corp.co.jp

<http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>

付録 1: セルフア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 (移動相: 水)
	1 M NaCl (移動相: 0.1 - 0.4M NaCl 溶液)
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、理論段数は 3,000N/m を超えていれば良好とされており、また非対称性 (As) は 0.7 ~ 1.5 の範囲にあれば良い状態だとされています。