

取扱説明書

強陽イオン交換クロマトグラフィー充填剤 セルファイン™ MAX S-r, セルファイン™ MAX S-h

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。強陽イオン交換クロマトグラフィー充填剤セルファイン MAX S 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。サブクラスの Cellufine MAX “r” シリーズは溶出性能 (recovery) と堅牢性 (robust) を重視した設計、Cellufine MAX “h” シリーズは高吸着量 (Highest adsorption capacity) を重視した設計で開発されました。

セルファイン MAX S の特長

製品名	セルファイン MAX S-r	セルファイン MAX S-h
イオン交換基	強陽イオン / $-SO_3^-$	
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	
イオン交換容量	0.09 ~ 0.21 meq /ml	0.10 ~ 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	> 130 mg IgG /ml	> 180 mg IgG /ml
使用可能 pH	2 - 13	3 - 14
pH 安定性 (40°C, 1 週間)	2 - 14	3 - 14
化学安定性	一般的に使用されるバッファーで安定、1 M NaOH に安定	
保存液	20 % エタノール水溶液	

カラム充填方法

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 (cm^2) 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 1.2
2. 純水でゲルを洗浄する (バッファーでも良い)。

3. 純水、0.1M NaCl 水溶液または充填バッファーで 40 - 60 % (v/v) スラリーを調製する。
4. 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）
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、充填バッファーまたは 20%エタノールで湿らせておく
 - (c) 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。
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. カラム上部フェイルターを装着する（気泡を入れないように注意する）。
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) の吸着バッファー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（バッファーでも良い）
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、充填バッファーまたは 20%エタノールで湿らせておく。
- (c) 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。
- 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. 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) の吸着バッファー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）のバッファーで吸着させる。また pH 条件は下表のように 4.0~9.0 の範囲内で吸着する。モデルタンパク質の吸着量と pH、NaCl 濃度の関係性を下表に示す。このように目的のタンパク質を用いて、最適条件をスクリーニングする必要がある。これらの条件ではタンパク質が正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。

セルファインMAX S-r 10%DBC polyclonal IgG (mg/mL)		pH			セルファインMAX S-h 10%DBC polyclonal IgG (mg/mL)		pH		
		4.3	5.0	5.5			4.3	5.0	5.5
NaCl mM (10mM 酢酸バッファー)	10	133	192	158	NaCl mM (10mM 酢酸バッファー)	10	207	228	238
	50	159	107	3		50	188	199	2
	100	121	1	-		100	150	1	-
セルファインMAX S-r 10%DBC polyclonal IgG (mg/mL)		pH			セルファインMAX S-h 10%DBC polyclonal IgG (mg/mL)		pH		
		7.8	8.5	9.5			7.8	8.5	9.5
NaCl mM (50mM Tris-HCl)	10	124	143	160	NaCl mM (50mM Tris-HCl)	10	156	167	198
	50	93	119	134		50	104	134	156
	100	59	69	-		100	63	74	-

表 動的吸着量と pH、NaCl 濃度の関係

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 酢酸 Na (pH 4 - 6) または 0.01-0.05 M リン酸 Na または Tris-HCl (pH 6 - 9)

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)

MAX S-r の場合、pH 2-14 の条件で 40°C、1 週間で安定

MAX S-h の場合、pH 3-14 の条件で 40°C、1 週間で安定

0.1M NaOH の条件で、20°C以下であれば、3 ヶ月間安定 (MAX S-r、MAX S-h)

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 S-r および MAX S-h 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 を通液することができる。

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 以上を通液することができる。

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。

MAX S-r の場合、pH2 - 14 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。MAX S-h の場合、pH3 - 14 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。

アルカリ条件での保存期間は以下の通り。

0.1M NaOH の場合；

MAX S-h は 2-4 カ月、20°C以下で保存可能

MAX S-r は 2-6 カ月、20°C以下で保存可能

0.5M NaOH の場合；

MAX S-h は 1 カ月以内、20°C以下で保存可能

MAX S-r は 2 カ月以内、20°C以下で保存可能

長期保存する場合、20%エタノールを含む中性バッファで、2 - 8℃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.-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					
	MC* 1mL x 5	MC 5mL x 5	100 mL	500 mL	5 L	10 L
セルファイン MAX S-r	20300-51	20300-55	20300	20301	20302	20303
セルファイン MAXS-h	20400-51	20400-55	20400	20401	20402	20403

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

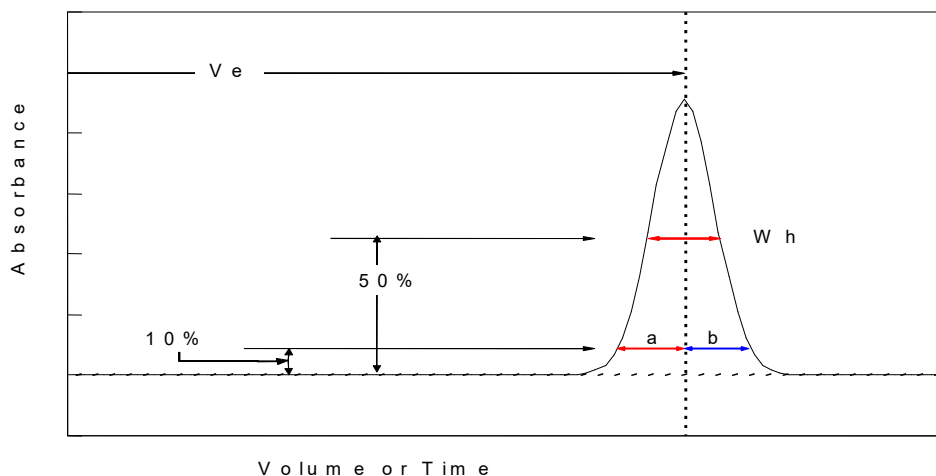
eメール: cellufine@jnc-corp.co.jp

<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 (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

$$HETP = L/N$$

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

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す。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おります。