



1. 概要

ミニカラム セルファイン ET クリーンは生理レベルの pH、0.05~1.0 mol/l の塩濃度、温度 0~25°C の条件でグラム陰性菌由来の発酵物からエンドトキシンを除去することができる。ミニカラム セルファイン ET クリーン L および ET クリーン S はあらかじめカラムに充填されているため簡単にエンドトキシン除去ができる。ET クリーンは物理的強度の高いセルロース粒子にポリεリジンを固定化している。このポリεリジンがミックスモード相互作用に基づくユニークな選択性を与えている。すなわちリジン残基のカチオンリガンドとポリマーの疎水領域によってミックスモードとしての相互作用をセルロース粒子に与えている。セルファイン ET クリーンは 0.2 M NaOH や 2 M NaCl などの定置洗浄液に安定である。ポリεリジンは 25~35 個のリジンポリマーで、*Streptomyces albulus* によって発酵される。ポリεリジンおよびセルロース粒子は JNC によって製造されている。

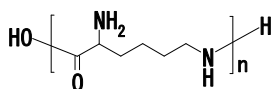


図 1 ポリεリジンの構造

2. 特徴

セルファイン ET クリーンは 2 つのグレードがある。ET クリーン L は大きな細孔を有し、エンドトキシンの除去能力は 10 pg/ml と高い。一方で低塩濃度の条件では酸性タンパク質への低い吸着活性を持つ。

ET クリーン S はタンパク質の入らない狭い細孔を有するため、タンパク質回収率が 99% と優れている。一方でエンドトキシンの除去能力は 10~80 pg/ml と ET クリーン L と比較してサンプルに依存する傾向がある。

製品名	細孔サイズ (排除限界分子量)
セルファイン ET クリーン S	2,000
セルファイン ET クリーン L	≥2 × 10 ⁶

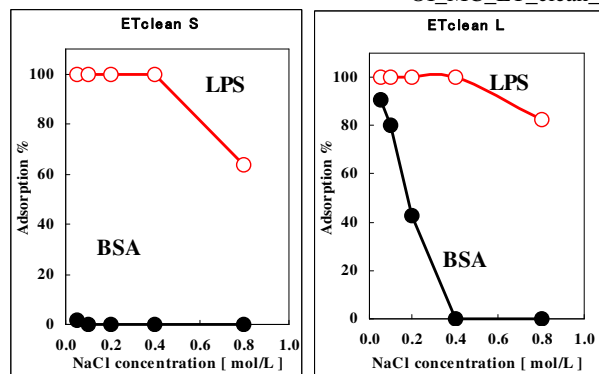


図 2 ウシ血清アルブミン (BSA) からのエンドトキシン (LPS) の選択的な吸着性能

エンドトキシンの吸着試験は 0.2 g の湿潤ゲルに 2 ml のサンプル溶液 (BSA: 500 μg/ml, E. coli 0111: B4 LPS: 100 ng/ml, pH 7.0, イオン強度: 0.05 - 0.8 mol/l) を加えてバッチワイズで吸着させた。

表 1 タンパク質からのエンドトキシンの除去

proteins	before treatment	ETclean S		ETclean L		
		LPS	Protein	LPS	Protein	
						pg/mL
Ovalbumin	4.6	28,000	81	99	<10	95
BSA	4.9	32,000	45	99	<10	97
Myoglobin	6.8	4,500	18	99	<10	98
γ-globulin	7.4	5,600	20	99	<10	97
Cytochrome C	10.6	1,500	15	99	<10	98

エンドトキシンの吸着試験は 0.3ml の湿潤ゲルに 2 ml のサンプル溶液 (タンパク質濃度 1 mg/ml に天然のエンドトキシンを添加) を加えてバッチワイズで吸着させた。

カラム

セルファインミニカラムはポリプロピレン製のチューブに超高分子量ポリエチレン製のフィルターを組み合わせ構成されている。ミニカラムは一般的な 10 - 32UNF 規格のフィンガータイトコネクターにより、1/16 インチチューブでクロマトグラフィーシステムと接続できる。

表 2 ミニカラムの特長

カラム体積	1 ml または 5 ml
カラム形状 (i. d. x L)	6.7 mm x 30 mm (1 ml) 14.6 mm x 30 mm (5 ml)
リガンド	poly(ε-lysine)
粒径	ca. 40 - 130 μm
ベース担体	真球セルロース粒子
最大圧力	0.4 MPa (4 bar)
推奨流速	0.1 - 1.0 ml/min (1 ml) 0.1 - 5.0 ml/min (5 ml)
pH 安定性	2 - 14
化学安定性	0.2 M NaOH/20 - 95% エタノール
保存方法	20%エタノールに置換後、冷暗所で保存。

3. 操作ガイドライン

一般的な使用方法

- (1) 保存液を除去するために5~10mlの純水でカラムを洗浄
- (2) 5~10 ml の 0.2 mol/l NaOH, 95 %エタノール溶液で充填剤を洗浄することで再生させる。この状態で3時間静置してエンドトキシンを不活化させる。
- (3) 再生液を5~10 ml のピロジェンフリーのバッファーか、蒸留水で洗浄する。
- (4) 吸着バッファーでカラムを平衡化する。
- (5) 吸着バッファーに溶解されたサンプルをロード。
- (6) フロースルー分画を回収する。必要であれば高イオン強度のバッファーを加えて溶出させる。
- (7) ステップ1~3によって充填剤を再生する。

推奨バッファー

吸着バッファー: 0.01 M~0.05 M リン酸 Na または Tris-HCl に 0.1~0.2 M NaCl を加えたバッファーを推奨する。応用次第ではその他のイオン種のバッファーも使用できると思われる。一般的にタンパク質の吸着の強さは pH とイオン強度によって変化する。不純物の結合を弱める目的で、バッファーのイオン強度を少し高くすることもできる。

溶出バッファー: ET クリーンに目的サンプルが吸着した場合、サンプルを溶出させるためにイオン強度の高いバッファーを使用する。

再生バッファー: 0.2M NaOH, 95%(v/v) エタノール。0.2M NaOH, 20%(v/v) エタノールを使用する場合、終夜での静置を要する。

サンプルの準備

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。不溶物は遠心分離が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。

4. 精製方法

- (1) ポンプまたはシリンジでカラムを吸着バッファーで置換する。入口のプラグ(カラム上部)を外し、ポンプまたはシリンジとカラムを接続する。このとき空気がカラムに入らないように注意する。
- (2) カラム出口のプラグを外す。
- (3) カラム内の保存液を吸着バッファーに置換するため、10カラム体積(CV)分の吸着バッファーを通過して平衡化する。
- (4) カラムにポンプやシリンジを用いてサンプルをロードする。
- (5) 吸着バッファーを5~10 CV 通過して洗浄する。
- (6) 溶出バッファーを5~10 CV 通過してタンパク質を溶出する。

5. スケールアップ

2~3つのミニカラムを連結することができる。

6. 保存方法

カラムを5~10 CVの20%(v/v)エタノール水溶液で置換する。冷蔵で保存すること。

注意: ミニカラムの乾燥を防ぐために、エンドプラグはきつく締めること。

7. 参考文献

The Cellufine ET clean was developed jointly by Kumamoto University and JNC Corporation.

- 1) M. Sakata, M. Todokoro, C. Hirayama, American Biotechnol. Lab., 20 (2002) 36.
- 2) M. Todokoro, M. Sakata, S. Matama, M. Kunitake, J. Ohkuma, C. Hirayama, J. Liq. Chrom. & Rel. Technol., 25 (2002) 601.
- 3) Ivars Bemberis, Masayo Sakata, Chuichi Hirayama et al. BioPharm International, January 2005 pp 50-51 (www.biopharminternational.com)

8. 追加情報

さらに情報を得たい場合、セルファインホームページを参照すること。

9. 注文情報

製品名	Quantity	Product number
ミニカラム セルファイン ET クリーン L, 1 ml	5 x 1 ml	20051
ミニカラム セルファイン ET クリーン S, 1 ml	5 x 1 ml	20151
ミニカラム セルファイン ET クリーン L, 5 ml	1 x 5 ml	20015
ミニカラム セルファイン ET クリーン S, 5 ml	1 x 5 ml	20115
セルファイン ET クリーン S	10 ml	681984324
セルファイン GH-25	100 ml	670000327
ミニカラム セルファイン GH-25	5 x 5 ml	19711-55

10. お問い合わせ

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-mail : cellufine@jnc-corp.co.jp

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