



1. 概要

ミニカラム セルファイン ET クリーンは中性 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 albus* 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。

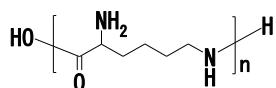


図 1 ポリ ε リジンの構造

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 以下と高く、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。（表 1、図 2）

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 S	$\geq 2 \times 10^6$

OI_MC_ET_clean_V11_J
表 1 タンパク質溶液からのエンドトキシンの除去

proteins	before treatment pl	LPS pg/mL	ETclean S		ETclean L	
			LPS pg/mL	Protein Recv.%	LPS pg/mL	Protein Recv.%
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

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、LPS：各タンパク質試薬に混入していたもの）を加えてバッチ法で吸着させた。リムルス ES-II テスト（スタンダード LPS：*E. coli* UKT-B, 1 endotoxin unit (EU) = 250 pg LPS で換算可能）使用。

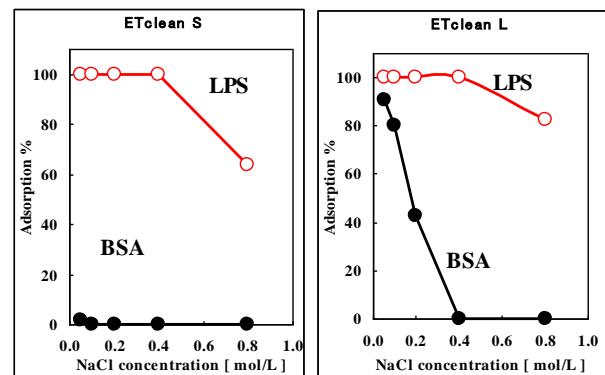


図 2 ウシ血清アルブミン (BSA) からのエンドトキシン (LPS) の選択性的な吸着性能

0.2 g の湿潤ゲルに 2 ml のサンプル溶液 (BSA: 500 μ g/ml, LPS: *E. coli* O111: B4 LPS: 100 ng/ml, pH 7.0, NaCl: 0.05 - 0.8 mol/l) を加えてバッチ法で吸着させた。

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て構成されている。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 μ m
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 %エタノール溶液等で充填剤を洗浄することで再生させる。この状態で 1 時間静置してエンドトキシンを不活化させる。(再生バッファー参照)
- (3) 再生液を 5~10 ml のパイロジエンフリーのバッファーか、パイロジエンフリー水で洗浄する。
- (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 0.1~0.4 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。吸着バッファーに 1~2M の NaCl を加え、グラジエント溶出により 0.5 M 程度まで塩濃度を増加させて溶出する。

再生バッファー:

- 0.2M NaOH, 95%(v/v) エタノール : 1 時間静置で再生可能
- 0.2M NaOH, 20%(v/v) エタノール : 3~5 時間静置で再生可能
- 0.2M NaOH : 16 時間または終夜静置で再生可能

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。

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液して平衡化する。
- (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。

セルファイン™ は JNC 株式会社の登録商標です。

(5) 吸着バッファーを 5~10 CV 通液して洗浄する。

(6) 溶出バッファーを 5~10 CV 通液してタンパク質を溶出す。

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と締めること。

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	5 x 1 ml	20051
セルファイン ET クリーン L, 1 ml		
ミニカラム	5 x 1 ml	20151
セルファイン ET クリーン S, 1 ml		
ミニカラム	1 x 5 ml	20015
セルファイン ET クリーン L, 5 ml		
ミニカラム	1 x 5 ml	20115
セルファイン ET クリーン S, 5 ml		
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	5 x 5 ml	19711-55
セルファイン GH-25		

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/