

JNC 株式会社

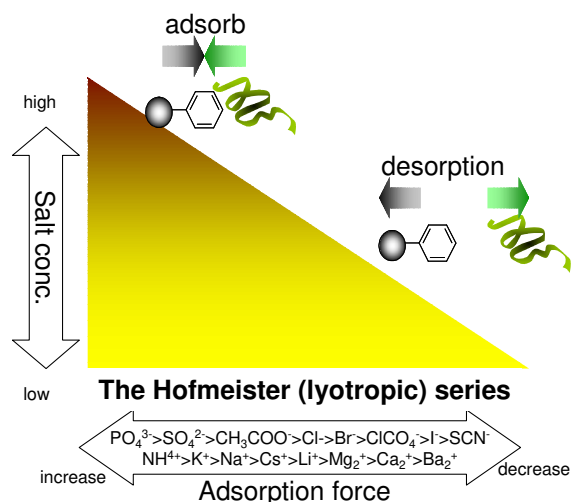
取扱説明書

ミニカラム セルファイン フェニル EX



1. 概要

セルファイン フェニル EX をミニカラムに充填しているため、簡単に使用することができる。セルファインフェニル EX は抗体の凝集体、タンパク質、酵素、多糖などの高分子を濃縮・精製するように設計されている。担体は真球で物理的強度の高いセルロースにフェニル基を付加している。セルファイン フェニル EX は架橋されたセルロース粒子にリガンドを付加した充填剤である。



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 1 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	フェニル基
吸着量 (BSA)	13 mg/ml
粒径	ca. 90 μm
ベース担体	架橋セルロース粒子
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	3 - 12
保存方法	20%エタノールに置換後、冷暗所で保存。

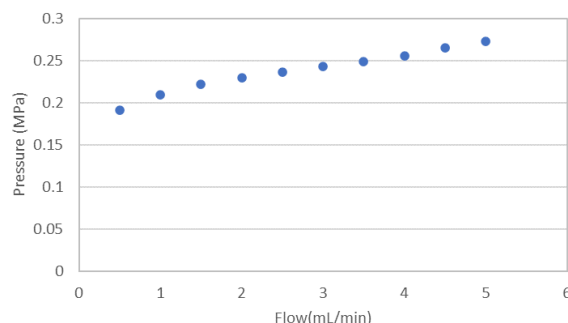
2. 操作ガイドライン

一般的な使用方法

- (1) 吸着バッファーでカラムを平衡化する。
- (2) 吸着バッファーに溶解されたサンプルをロード。

- (3) 未吸着の不純物を除去するため、吸着バッファーで複数回洗浄する。
- (4) 溶出バッファーで吸着された目的物質を溶出する。

ミニカラム セルファイン フェニル EX の流速特性を AKTA システム (Cytiva 製) で測定した。



システム: Akta avant 25

Flow Restrictor FR-902: in line

移動相: 純水

温度: 20-25°C

カラム接続配管: ID 5mm x 20 cm, 2 本 (カラム上下)

推奨バッファー

吸着バッファー:

1) 汎用疎水担体として使用する場合

タンパク質が沈殿しない濃度の硫酸アンモニウムを含むバッファーを推奨する。イオン種はリン酸、酢酸、トリスなどを使用できる。一般的にタンパク質の吸着の強さは塩濃度の強さに比例して高くなる。不純物の結合を弱める目的で、バッファーの塩濃度を少し低くすることもできる。ノニオン性の界面活性剤 (Tween®20, Triton® X など) も不純物の溶出性を高めることができる。

2) フロースルーモードで抗体凝集体の精製に使用する場合

リン酸、酢酸、トリスなど使用できる。負荷する抗体溶液に合わせ pH、電気伝導度を調整する。セルファイン フェニル EX は 5-15 mS/cm 程度の電気伝導度で抗体凝集体を吸着することができる。

溶出バッファー:

1) 汎用疎水担体として使用する場合

吸着バッファーに添加された硫酸アンモニウムの濃度を下げることによって溶出することができる。最適な塩濃度はグラジエント溶出による予備検討で確定させる。分取クロマトグラフィーにおいてはステップワイズで溶出させることが一般的である。溶出が不十分の場合、カオトロピック試薬やエチレングリコールを加えることができる。

2) 抗体凝集体の精製に使用する場合

カラムに吸着した抗体凝集体や夾雑物など不純物の溶出は電気伝導度 5 mS/cm 以下の緩衝液またはの純水を用いる。定置洗浄として 0.5M NaOH, 30%イソプロパノールを 10 CV 通液

する。0.5M NaOH と 30%イソプロパノールは混合したものを使用してもよい。

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。

3. 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。（グラジエント溶出またはステップワイズ溶出）
- (7) 0.5 M NaOH に 30 %イソプロパノールを加えた洗浄液で定置洗浄する。洗浄後は吸着バッファーで再平衡化すること。

抗体をフロースルー精製する場合、(4)および(5)のカラム通過液を回収する。

4. 再生方法と脱バイロジェン

定置洗浄として 0.5M NaOH, 30%イソプロパノールを 10 CV 通過する。0.5M NaOH と 30%イソプロパノールは混合したものを使用してもよい。洗浄後は吸着バッファーで洗浄して次の操作に備える。

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

International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2006) 38(4) pp 521-532

"Primary structure and properties of Mn-superoxide dismutase from scallop adductor muscle" Ikebuchi,

Makoto; Takeuchi, *et. al.*

PDA Journal of GMP and Validation in Japan (2000) 2(1) pp 28-33

Purification of Recombinant Human Serum Albumin. Akinori SUMI, *et. al.*

Lipids. (2000) 35(12) pp 1359-70.

Purification, characterization, and molecular cloning of group I phospholipases A2 from the gills of the red sea bream, *Pagrus major*. Iijima N, *et. al.*

J Biochem (Tokyo). (1998) 123(2) pp 219-25.

Purification and some characteristics of phosphatase of a psychrophile. Tsuruta H, *et. al.*

Protein Expr Purif. (1995) 6(5) pp 679-84.

Overexpression and purification of the trimetric aspartate transcarbamoylase from *Bacillus subtilis*. Baker DP, *et. al.*

Biosci. Biotechnol., Biochem. (1993) 57(2) pp 177-80

Purification and characterization of *Actium lappa* L. (edible burdock) polyphenol oxidase

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。

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

9. 注文情報

製品名	容量	カタログ No.
ミニカラム		
セルファイン フェニル EX, 1 ml	5 x 1 ml	22000-51
ミニカラム		
セルファイン フェニル EX, 5 ml	5 x 5 ml	22000-55

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/>