

Cellufine™

ミニカラム

ミニカラムに充填されたセルファイン SPA-HC はプロテインA固定化担体の迅速なスクリーニング評価に簡単に使用できます。

セルファイン SPA-HC は細胞培養によって発酵されたモノクローナル抗体を吸着させるアルカリ耐性プロテインAクロマトグラフィー充填剤である。セルファイン SPA-HC は真球状の高度に架橋されたセルロース粒子にアルカリ耐性の高い組換えプロテイン A リガンドを固定化している。セルファイン SPA-HC を充填したミニカラムの特長を表1に示す。

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ます。

表1 セルファイン SPA-HC 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	6.7 mmID x 3.0 cmL (1.0 ml) 14.6 mmID x 3.0 cmL (5.0 ml)
粒径	平均 70 μm
ベース担体	高度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 (長期)	20%(V/V)エタノール、温度 2-8℃

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. 低 pH の溶出バッファーで吸着されている抗体を溶出する。

推奨バッファー

吸着バッファー: 10~50 mM の低イオン強度のバッファーに 150 mM NaCl を加える。イオン種はリン酸、酢酸、トリスなどが使用できる。使用方法によっては他のイオン種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: 60 mM 酢酸 pH 3.0 を推奨する。精製対象の抗体が酸性条件に不安定な場合、pH 3.5 に上昇させることができる。他のバッファーとしては、0.1 M グリシン pH3.0 や、0.1M クエン酸 pH3.5 も使用できる。

サンプル準備

細胞培養サンプルを pH 7.5 になるように調製する。また必要であれば、イオン強度を 12 mS/cm になるように NaCl を添加する。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。

精製手順

1. ポンプやチューブ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. カラムにサンプルをロードする。
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る。

セルファイン SPA-HC 後の精製ステップ

セルファイン SPA-HC による精製の後、高純度に精製するためのポリッシングステップで以下の不純物を除去する必要がある。a) 宿主細胞タンパク質（HCP）、b) プロテイン A 溶出リガンド、c) 宿主由来 dsDNA、d) mAb 凝集体 (> 300 kDa 分子量) などである。またモノクローナル抗体のダイマー（2量体）の除去も必要となる。セルファインは、これらの汚染物質を除去するためのラインナップを各種取りそろえている。詳細については、Web サイト <http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/> を参照のこと。

- **Cellufine MAX IB** は、1級アミンと疎水基リガンドを固定化した新しいミックスモードクロマトグラフィー充填剤である。HCP やプロテイン A 溶出リガンドおよび、モノクローナル抗体の凝集体をフロースルーモードで効率的に除去することができる。
 - 中性バッファーで操作可能
 - 0.2 M NaCl までの広い塩濃度で使用可能
- **Cellufine MAX GS** は、モノクローナル抗体の2量体や凝集体の除去に優れた性能を発揮する陽イオン交換クロマトグラフィー充填剤である。結合&溶出モードで使用する。
 - Tris 塩基で pH 4.5、電気伝導度を 5 mS / cm 未満にして使用する。
- **Cellufine MAX Q-h** は宿主由来タンパク質 (HCP)、プロテイン溶出物、宿主 dsDNA などをフロースルーモードで除去することができる。
 - Tris 塩基で pH 8.5、電気伝導度を 12 mS / cm 未満にして使用する。

再生方法と脱パイロジェン

セルファイン SPA-HC は抗体の溶出後に、0.1 M 酢酸または 0.1M NaOH によるカラムの定置洗浄をする。0.1M NaOH で 15～30 分間接触させる。定置洗浄後は 10 CV の吸着バッファーで平衡化する。保存する場合は 5 CV の 20%エタノール水溶液に置換する。

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。

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。保存温度は 2～8℃の冷蔵保存にすること。

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。

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.inc-corp.co.jp/fine/en/cellufine/>

製品名	容量	カタログ No.
セルファイン SPA-HC	5 x 1 mL ミニカラム	21900-51
	1 x 5 mL ミニカラム	21900-15

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/>