

Super Edge Empty Mini Column

エンプティミニカラムの汎用性と充填後のカラムの性能評価-2

JNC のエンプティミニカラムは様々なメーカーのクロマトグラフィー担体を充填することができます。カラムの性能評価-1 では充填したカラムの品質を理論段数と対称性ファクター評価した結果を示しました。性能評価-2では *Super Edge* エンプティミニカラムを用いた吸着容量の信頼性に関するデータを紹介します。

1 互換性、市販パッキドカラムと *Super Edge* エンプティミニカラムに充填したカラムの吸着容量の比較

大手のクロマトグラフィー樹脂のメーカーからパッキドカラムが販売されています。これらの市販のパッキドカラムに充填されている樹脂をボトルで購入して *Super Edge* エンプティミニカラムに充填しそれぞれの吸着容量を比較した。この比較データが同等性を示せば *Super Edge* エンプティミニカラムは市販のパッキドカラムと互換性があると言えます、また各社の樹脂の吸着性能を正しく測定可能である事を示している。

充填方法

充填は、スターターキットに同封の充填ツールを使用してマニュアルに従って行いました。マニュアルは、*Super Edge* のWebサイトから入手することができます。

https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/grade/super_edge/

材料

下記に示した市販のパッキドカラムおよびボトル入りの樹脂を使用しました。

<<Table1 AEX>>

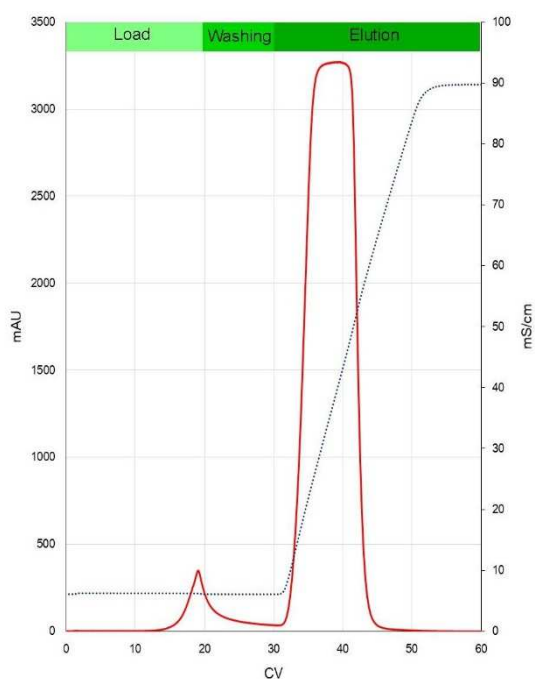
Manufacturer	Product abbreviation	Bead size μm	Base material
T	DEAE(1)	65	Polymer
	Q(2)	65	Polymer
	Q(3)	75	Polymer
	QAE(4)	100	Polymer
G	DEAE(5)	90	Agarose
	Q(6)	90	Agarose
B	Q(7)	50	Polymer

<<Table2 CEX>>

Manufacturer	Product abbreviation	Bead size μm	Base material
T	CM(8)	75	Polymer
	S(9)	75	Polymer
	SP(10)	75	Polymer
	SP(11)	75	Polymer
G	S(12)	90	Agarose

クロマトグラフィー

Table3と2の条件でクロマトグラフィーを行う事で動的吸着容量(DBC)を測定した。下記に典型的なクロマトグラムを示した。添加するタンパク質濃度の 10%が検出されるまでロードし、その後洗浄、次いで溶出する事で、吸着量、回収量を求めました。



<< Table 3 Chromatography condition >>

Step	CV(column volume) ml
1. Equilibration	5
2. Sample application	Up to 10% break through
3. Column wash	10
4. Elution1 (0→100%)	20
5. Elution 2(100%)	10
6. Column wash	10
7. CIP	10 0.1M NaOH
8. Equilibration	20

※流速はカラム滞在時間を1分とした

1ml カラムの場合は 1ml/min

5ml カラムの場合は 5ml/min

<< Table 4 Protein and buffer condition >>

Mode	Protein	Buffer A	Buffer-B
AEX	BSA 5mg/ml	50mM Tris-HCl, pH8.5	Buffer-A + 1M NaCl
CEX	Lysozyme 5mg/ml	10mM Na-sodium phosphate, pH7.0	Buffer-A + 1M NaCl

結果

Table 5 *Super Edge* mini column と市販パッキドカラムの 10%DBC(mg/ml)と回収率の比較

	10% DBC			Recovery (%)	
	JNC	Commercial		JNC	Commercial
AEX	BSA				
DEAE(1)	25.2	21.4		105	111
Q(2)	112.7	74.5		98	98
Q(3)	124.8	134.5		100	98
QAE(4)	26.9	19.5		103	118
DEAE(5)	166.2	159.6		101	101
Q(6)	120.2	111.9		97	95
CEX	Lysozyme				
CM(8)	151.9	132.8		101	101
S(9)	155.0	142.9		100	100
SP(10)	78.4	65.6		110	109
※JNC : <i>Super Edge</i> mini column,					
※Commercial: Packed column purchased from a resin manufacturer.					

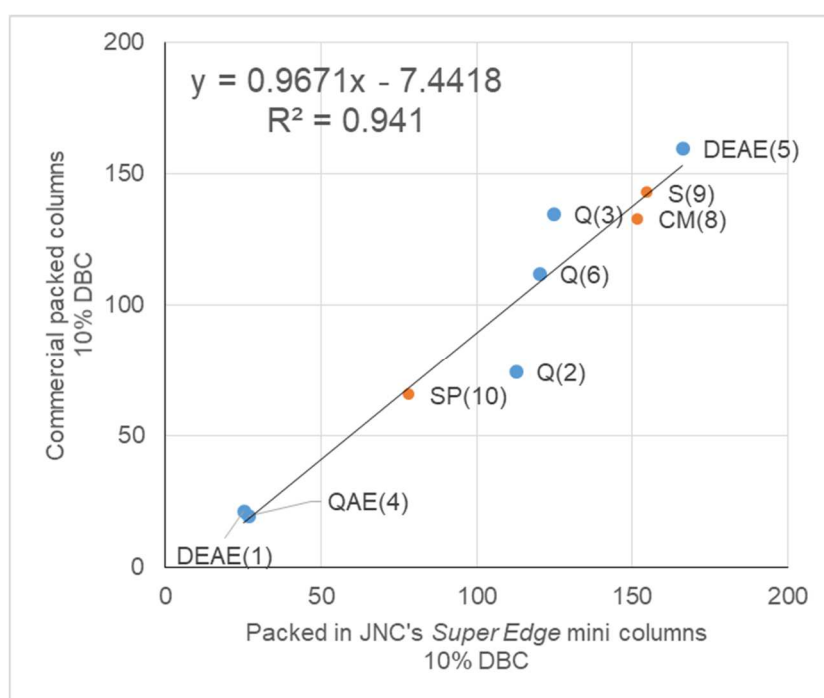


Fig1. *Super Edge* mini column と市販カラムの 10%DBC(mg/ml)の回帰分析

Table5 と Fig1 に比較データを示した。一部(Q(2),Q(3))は DBC の差が大きくなったが、回帰分析の結果は切片が約1、相関係数も1に近い値であり、互換性があることが示されました。

2 Super Edge エンブティミニカラムの1mlと5mlのスケラビリティ

JNC の Super Edge エンブティミニカラムは 1ml と 5ml の二種類があり、これらのスケールで吸着容量が同等に測定できるかを調べました。

<< Table 6 Column dimension >>

Column volume ml	I.D. mm	Length mm
1	6.7	30
5	14.6	

材料

Table1 と Table2 に加え下記のイオン交換体を加えた。

<< Table 6 Resin added to comparative experiment >>

Manufacturer	Product abbreviation	Bead size μm	Base material
JNC Cellufine®	A-500	90	Cellulose
	MAX DEAE	90	Cellulose
	MAX Q-h	90	Cellulose
	MAX Q-r	90	Cellulose
	MAX S-h	90	Cellulose
	MAX S-r	90	Cellulose
T	S(13)	100	Polymer
G	S(14)	90	Agarose

クロマトグラフィー

前述した方法と同様に行いました。

結果

<< Table7 Comparison of DBC with 1ml and 5ml *Super Edge* mini column>>

		10%DBC(mg/ml)	
		1ml Column	5ml Column
Cellufine	A-500	18	18
	MAX DEAE	154	166
	MAX Q-h	174	202
	MAX Q-r	131	137
	MAX S-h	165	192
	MAX S-r	126	122
T	DEAE(1)	25	23
	Q(2)	113	129
	Q(3)	125	119
	QAE(4)	27	27
	CM(8)	152	140
	S(9)	155	142
	SP(10)	78	78
G	S(13)	30	29
	DEAE(5)	120	119
	Q(6)	166	164
B	S(14)	151	139
	Q(7)	36	33

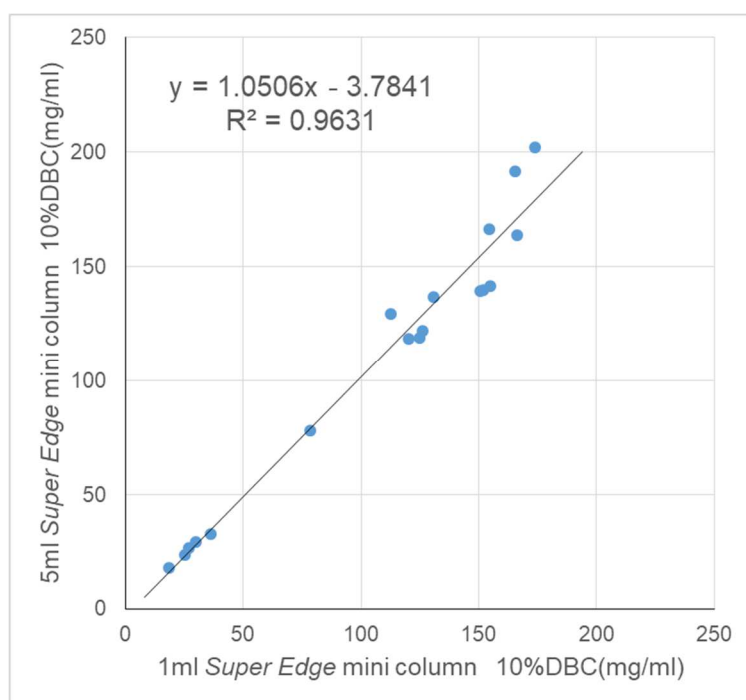


Fig2 Regression analysis of DBC on 1ml and 5ml *Super Edge* mini columns

Table7 と Fig2 に示したように、*Super Edge* エンプティミニカラムは 1ml と 5ml で測定される吸着容量は同等でした。

3 CIPサイクルと安定性

Super Edge ミニカラムで作成した充填カラムの使用回数と性能の関係について検討しました。カラムにたんぱく質を負荷→回収→CIP→平衡化を繰り返し行い、理論段数、対称性ファクター、吸着量、回収率の変化を調べました。

クロマトグラフィー

Table4 の CEX の条件で、Table3の1番～8番のサイクルを繰り返し、1サイクル毎に理論段数と対称性ファクターAsを調べました。

カラム

1ml, 5ml それぞれに Cellufine® MAX S-h を充填しました。

測定

1ml, 5ml それぞれ3本のカラムについてサイクル毎に1回測定し、3本の値から平均を求めました。

結果

<< Table 8. 1ML COLUMN / CIP cycle and column performance >>

Cycle	N/m		As		10%DBC(mg/ml)		Recovery	
	Average	S.D.	Average	S.D.	Average	S.D.	Average	S.D.
0	5,738	421	0.93	0.07				
1	5,488	246	0.87	0.01	172.6	4.0	98	0.5
2	5,366	86	0.86	0.06	176.2	4.0	96	0.8
3	5,593	210	0.85	0.05	165.6	3.5	103	1.6
4	5,340	180	0.86	0.02	171.3	2.1	100	0.2
5	5,542	226	0.86	0.02	168.3	3.7	102	0.5
6	5,607	169	0.86	0.01	172.0	4.1	98	0.7
7	5,523	100	0.90	0.01	171.4	4.0	99	0.4
8	5,636	130	0.87	0.02	166.5	4.8	105	0.4
9	5,490	30	0.88	0.03	167.4	3.2	102	0.7
10	5,639	118	0.91	0.05	174.7	3.6	96	0.4

<< Table 9. 5ML COLUMN / CIP cycle and column performance >>

Cycle	N/m		As		10%DBC(mg/ml)		Recovery	
	Average	S.D.	Average	S.D.	Average	S.D.	Average	S.D.
0	6,849	176	1.22	0.01				
1	6,741	279	1.23	0.04	174.3	1.6	99	1.3
2	6,956	327	1.21	0.02	172.5	2.2	103	2.2
3	7,049	352	1.25	0.02	173.0	1.6	102	3.1
4	6,634	547	1.29	0.04	171.4	1.7	103	1.3
5	7,223	294	1.23	0.02	171.8	1.8	102	1.8
6	7,252	230	1.24	0.02	175.5	1.7	101	1.8
7	7,200	217	1.24	0.03	173.5	1.7	100	0.6
8	7,264	305	1.25	0.04	173.3	1.7	101	1.2
9	7,281	238	1.24	0.01	168.5	1.6	104	0.2
10	7,297	198	1.25	0.03	176.4	1.7	100	1.4

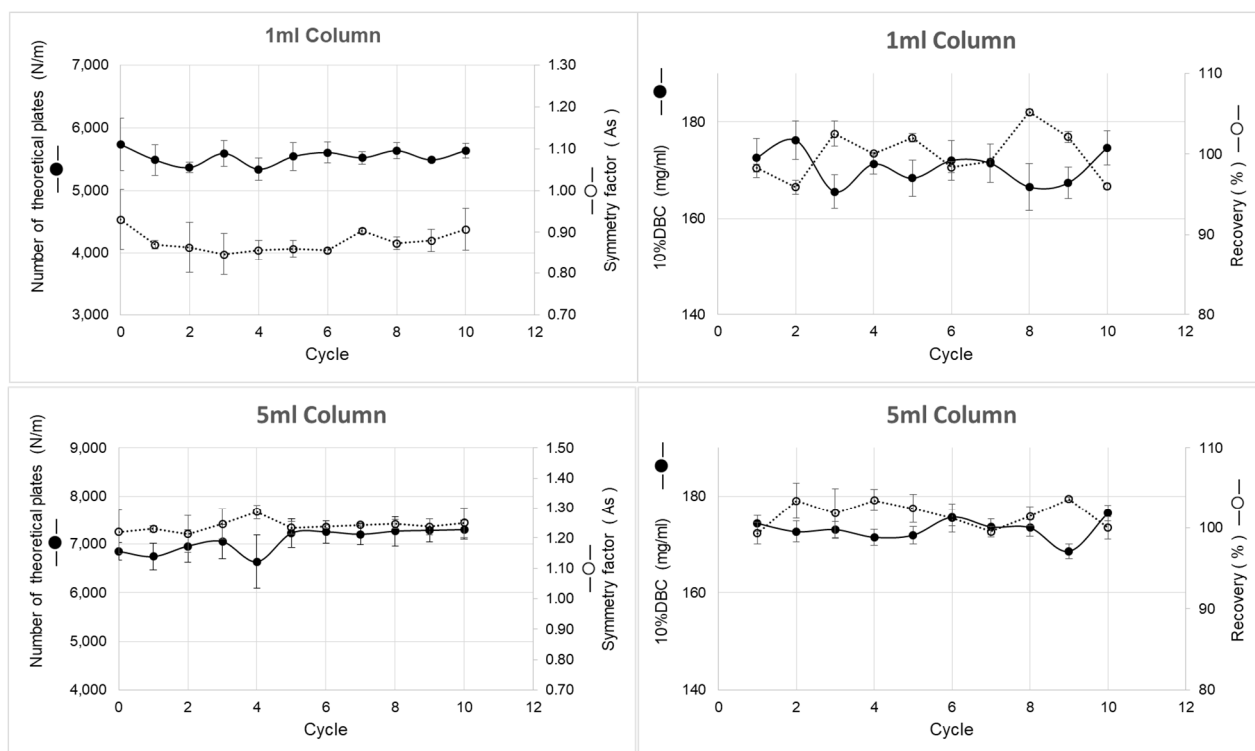


Fig3 CIP cycle and column performance

Table8と9は 1ml,5ml それぞれ3本のカラムについてサイクル毎に測定した結果の平均値とその標準偏差を示しました。Fig3は Table8 と9をグラフ化したものです。

CIP サイクル毎の理論段数と対称性ファクター、DBC と回収率に変化はなく、10サイクルまで劣化は見られませんでした。Fig3 の理論段数と対称性ファクターの傾向を見る限り、10サイクル以降も急激な劣化もなさそうです。ただし DBC は充填する樹脂の耐久性によって影響を受けるために注意が必要です。実際にお使いになる樹脂の取り扱い説明書を参照し、CIP 条件を設定して使用してください。

まとめ

- 市販のパックドカラムと *Super Edge* ミニカラムのDBCと回収率は同等で、市販の樹脂をボトル購入して *Super Edge* ミニカラムへ充填して性能評価する事が可能です。
- *Super Edge* ミニカラムの1mlと5mlのDBCと回収率は同等であるため、スケールアップが容易に行える事が確認できました。
- *Super Edge* ミニカラムの充填カラムは10回の繰り返しCIPサイクルで性能劣化がみられず、数回のクロマトグラフィー実験が可能です。