

Cellufine™ MAX DexS

セルファイン MAX DexS は、デキストラン硫酸ポリマーを表面に固定化した新しいクロマトグラフィー充填剤です。この非動物性由来の疑似親和性リガンドは、ヘパリン固定化担体の代替品として、血液タンパク質やウイルスの精製に使用できます。

セルファインでは2つの異なる DexS クロマトグラフィー充填剤を提供しています。粒子表面は、それぞれ異なる長さのデキストラン硫酸ポリマーで修飾されています。 a) DexS-HbP : ヘパリン結合タンパク質の精製用に開発された充填剤です。 b) DexS-VirS : 特にヘパリンに対して親和性を有するウイルスおよびウイルス様粒子を精製する充填剤です。どちらの充填剤も、タンパク質またはウイルスの吸着性能を向上させるために開発されました。セルロース粒子を高度に架橋したベース担体は、高流速での使用に最適化されています。また定置洗浄では最大 0.5 M NaOH まで耐性があります。充填剤の特性を以下の表 1 にまとめます。

表 1 セルファイン MAX DexSの特徴

特徴		
製品名	セルファイン MAX DexS-HbP	セルファイン MAX DexS-VirS
リガンド	デキストラン硫酸	
ベース担体	架橋セルロース粒子	
粒径	40 - 130 μm (ca. 90 μm)	
硫黄含量 ($\mu\text{mol/mL}$)	≥ 36	≥ 74
リゾチーム吸着量 (mg/ml)	≥ 50	≥ 56
pH 安定性	3 - 12	
操作圧力	< 0.3 MPa	
保存液	50% (v/v) スラリー, 0.1M リン酸 - 20% (v/v) エタノール	

カラム充填方法

1. 目標のベッド高さになるように、必要な体積を計算します。
2. 純水、0.1 M NaCl 溶液または適切なバッファーで、40~60% (v / v) のスラリーを準備します。充填剤を室温で1時間平衡化させます。
3. 軽く攪拌するか、真空にして脱気します。
4. カラム出口を閉じた状態で、注意深くスラリーをカラムに注ぎます。カラム充填体積によっては、リザーバーが必要になる場合があります。
5. 上部フィルターを開いて空気を抜きながら、可動栓をスラリー表面まで挿入して固定化します。
6. カラム出口を開いて、操作流速より10~20%早い速度で溶出バッファーの送液を開始します。
7. ベッドが安定したら、カラム出口を閉じます。次いで上部フィルターを開放した状態で、可動栓をベッドの表面まで下げます。サンプルをロードする前に、10 CV (カラム体積) の吸着バッファーで平衡化します。

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します。
2. サンプルを pH 4~9 のバッファーでロードします。
3. 吸着していない不純物を除去するために、吸着バッファーを用いて数 CV で洗浄します。
4. 溶出バッファーで吸着した標的分子を溶出します。

セルファイン MAX DexS の一般的な操作手順の概要を以下の表 2 に示します。pH、緩衝液、塩、流速などの各条件は、目的に応じて最適化できます。

表 2 セルファイン MAX DexS の一般的な使用手順

工程	CV	各工程の解説
1	3 - 10	カラム内のバッファーの pH と導電率が必要なサンプルロードバッファーと同じであることを確認する。
2	任意	カラムへのサンプルロード a) フロースルーまたは b) クロマトグラフィーの結合および溶出モード。
3	5	10 mM リン酸ナトリウム, 0.15 M NaCl, pH 7.5
4	3 - 7	10 mM リン酸ナトリウムバッファー, 1.0 M NaCl, pH 7.5
5	3 - 10	10 mM リン酸ナトリウムバッファー, 0.15 M NaCl, pH 7.5
6	3 - 10	0.1 - 0.5 M NaOH

推奨バッファー

吸着/サンプルロードバッファー: 10 mM リン酸ナトリウムバッファー, 0.1 M NaCl, pH 7.5 を使用します。用途によっては、他のバッファーイオンを使用することもできます。一般に、吸着強度は pH とイオン強度に反比例します。イオン強度をわずかに上げると、緩く結合した非特異的吸着物質の除去に役立ちます。非イオン性界面活性剤 (Tween®20、Triton®X など) を添加して溶解性を向上させることもできます。

溶出バッファー: 一般的に 1~2 M NaCl または KCl を含む吸着/サンプルロードバッファーを使用します。正確な濃度は、予備実験でグラジエント溶出によって決めます。ステップワイズによる溶出は、分取アプリケーションで採用されています。

サンプル準備とサンプルロード

吸着/サンプルロードバッファーに 1~20 mg / ml の濃度でサンプルを準備します。遠心分離または精密ろ過によって不溶性物質を除去します。必要に応じて、透析、ダイアフィルトレーション、または脱塩クロマトグラフィーを使用してサンプルバッファーを置換します。

操作流速

セルファイン MAX DexS の流速は 100~300 cm / h の範囲での操作を推奨します。カラムの最大圧力 (0.3 MPa) 未満の適切な流速で操作する必要があります。

化学的・物理的安定性

pH 3-12, 2-30°C で操作する場合、pH 3-12 で安定です。

再生と脱パイロジェン

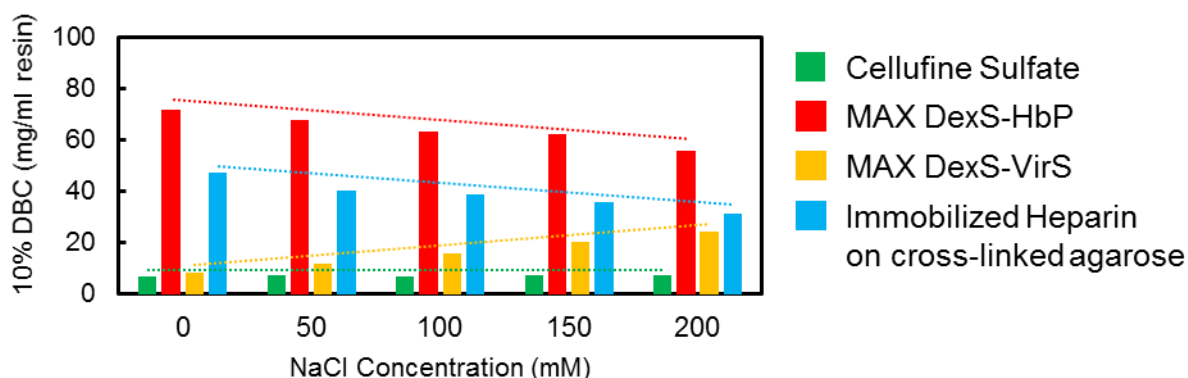
セルファイン MAX DexS は通常、高イオン強度 (1~3 M) NaCl で再生できます。洗浄が十分でない場合は、0.05~0.15 M NaOH を 3~10 CV で洗浄した後、pH が 9 未満になるまで 1~3 M NaCl で洗浄します。

応用事例

硫酸デキストランは、天然多糖類に硫酸基を付加した多糖類で、非動物性原料です。硫酸デキストランは、ヘパリンと同様の生物活性を有することが報告されており、in vivo 実験における HIV-1 複製の選択的な阻害や、ヘパリン補因子 II との結合活性が報告されています。硫酸デキストランは、イオン交換クロマトグラフィーにおける陽イオン交換リガンドとしてもよく知られています。これらの特性により、充填剤の吸着/溶出性能は pH と導電率 (イオン強度) の影響を受けます。操作条件は注意深く最適化する必要があります。セルファイン MAX DexS クロマトグラフィー充填剤によるラクトフェリン吸着特性の例を以下の図 1 に示します。詳細については、web サイトのテクニカルデータシートを参照してください。

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

図1 ラクトフェリンの動的吸着量測定



内径 5 mm x 高さ 2.5 cm のカラムに充填剤を充填し、10 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.5 + 0、50、100、150 mM NaCl で平衡化しました。ラクトフェリン (2 mg / ml) を上記のバッファーに溶解してサンプル溶液を調製した後、0.125 ml / min の流速で 4 分の滞留時間でカラムにロードしました。各バッファー条件でのタンパク質ブレイクスルー曲線から、10%DBC (mg / ml レジン量) が推定されました。サンプルロードの合間に、カラムを上記の緩衝液 + 1.0M NaCl で溶出した。

セルファイン MAX DexS-HbP およびヘパリン固定化担体は、加えた塩濃度に依存してラクトフェリンの吸着量が減少しました。これはクロマトグラフィーの陽イオン交換モードで見られる典型的な現象です。対照的に、セルファイン MAX DexS-VirS は、高塩濃度ではラクトフェリン吸着量が増加しました。セルファイン MAX DexS-VirS は他の充填剤とは異なる吸着特性があることを示唆しています。セルファインサルフェイトは細孔が狭く、ラクトフェリンが細孔内部に入りません。このためセルファインサルフェイトはラクトフェリンの吸着量は最も低い結果となりました。

保存方法

未開封の容器は 2~8° C で保管してください。凍結しないでください。2 週間以下の短期保存の場合、バルクおよびカラムの状態、2~8° C の中性バッファー+1 M NaCl の保存液で保存できます。長期保存も同一条件下で行うことができます。ただし、20% (v / v) エタノールまたは 2% (v / v) ベンジルアルコールなどの保存剤をバッファーに添加する必要があります。

使用期限

製造日から 5 年。

製品名	パックサイズ	カタログ No.
セルファイン MAX DexS-HbP	5 x 1 mL ミニカラム	21 700-51
	1 x 5 mL ミニカラム	21 700-15
	10 mL	21 700
	50 mL	21 701
	500 mL	21 702
	5 L	21 703
	10 L	21 704
セルファイン MAX DexS-VirS	5 x 1 mL ミニカラム	21 800-51
	1 x 5 mL ミニカラム	21 800-15
	10 mL	21 800
	50 mL	21 801
	500 mL	21 802
	5 L	21 803
	10 L	21 804

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

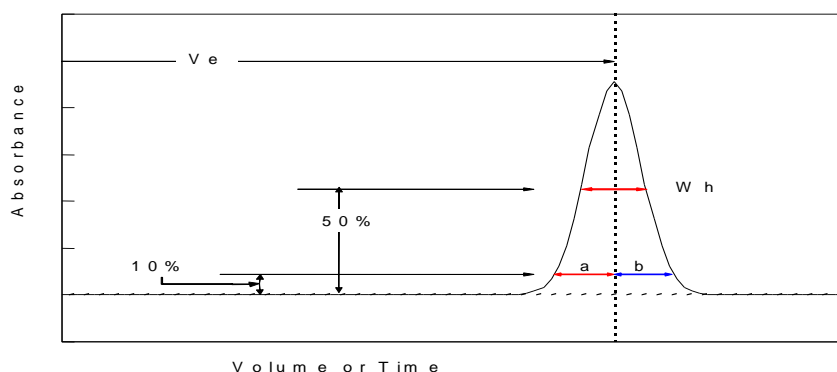
eメール: cellufine@jnc-corp.co.jp

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

付録 1: セルファイン充填後のカラム評価方法

カラムの充填状態は理論段プレート数 (N)、理論段数相当高さ (HETP)、非対称性 (As) などの指標を使用して評価します。これらの評価指標は、測定条件の影響を受けます。たとえばカラムの直径/高さの違い、配管、溶媒サンプル量、流速、温度などの変化などによって変化します。したがって、毎回同じ測定条件を使用してカラム充填後の評価を行って同等性を確認する必要があります。評価時の流速は 30cm/h を推奨しますが、速度を速くする事は可能です。ただし速い程理論段プレート数 (N) は低くなる傾向があります。カラムを評価するためには毎回同じ条件 (流速、カラムサイズ、移動相、サンプル) で測定する必要があります。

パラメータ	条件
サンプルロード量	カラム体積の 1 -2.5%の液量
サンプル組成	1-2 % (v/v) アセトン (移動相 : 水および吸着バッファー) 1 M NaCl (移動相 : 0.1-0.4M NaCl 溶液)
流速 (cm/h)	30 cm/h
検出器	吸光度 OD 280nm (アセトンの場合) 電気伝導度 (NaCl の場合)



L	カラム高さ [cm or m]
V_e	溶出時間 (または溶出体積)
W_h	ピーク高さの半値時のピーク幅
a, b	ピーク高さの 10%高さにおける (a) 中心より前半部のピーク幅 (b) 中心より後半部のピーク幅
注意	単位は合せて計算すること。

計算式		
$HETP = L/N$	$N = 5.54 \times (V_e/W_h)^2$	$As = b/a$

一般的に、理論段数は 3,000N/m を超えていれば良好とされております。また A_s は 0.7~1.5 の範囲にあれば良い状態だとされております。