FUJIFILM

Wako

Code No. 115-01121 (1 mL)
111-01123 (5 mL)
119-01124 (5 mL×5)

For Genetic Research

KANEKA KanCap™ G Prepacked Column

KANEKA KanCap™ G Prepacked Column is a pre-packed column with KANEKA KanCap™ G. KANEKA KanCap™ G is a newly developed cellulose-based Protein G affinity chromatography resin designed for capture and purification of antibody fragment formats containing the CH1 region such as Fab and $F(ab')_2$. It consists of a highly cross linked cellulose matrix and a newly developed Protein G ligand designed to exhibits an increased affinity to the CH1 region of human antibodies. It is useful for purification of not only antibody fragment formats but also full length formats, especially which poorly bind to Protein A resins. KANEKA KanCap™ G Prepacked Column is designed for small scale purification.

Features

1. High binding capacity for antibody molecules containing CH1 or Fc region
2. Pre-packed Column
3. Ready to Use

【About Column】

- Components of Prepacked Column (column tube, lock nut, filter adapters) are made of bio-compatible polymers, mainly high-density polyethylene. Filter plates are made of porous polypropylene/polyethylene material.
- KANEKA KanCap™ G Prepacked Column can be reused but are not designed to be repacked.
- KANEKA KanCap™ G Prepacked Column may be connected directly to most liquid chromatography systems or workstations. Standard 10-32 male/M6 female adapters should be used to connect to FPLC systems.
- KANEKA KanCap™ G Prepacked Column can also be operated with syringes or peristaltic pumps.

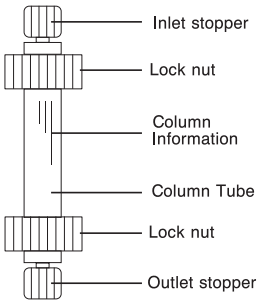

Fig. 1 Description of the KANEKA KanCap™ G Prepacked Column (Code No. 115-01121, 1 mL shown)

【Safety Precautions】

- Keep away from fire. This product is shipped as pre-packed in 20% ethanol.
- Follow your local regulations for disposal.
- Wear eye protection, protective gloves and lab coat.
- Make sure to tighten the connector to prevent leakage.
- During operation, make sure not to exceed pressure limit of the column and pump system.
- Do not disassemble the product.

【Product Description】

Table 1 : Characteristics of KANEKA KanCap™ G Prepacked Column

Column Type	1 mL (Code No. 115-01121)	5 mL (Code No. 111-01123, 119-01124)
Inner Diameter × Length (mm × mm)	8.0 × 20	8.0 × 100
Column Cross Section (cm^2)	0.5	0.5
Column Volume (mL)	1.0	5.0
Recommended Flow rate[1] (mL/min (cm/h))	0.17 to 0.33 (20 to 40)	0.83 to 1.67 (100 to 200)
Max. Flow rate (mL/min (cm/h))	0.84 (100)	4.19 (500)
Outer Dimensions[2] (mm × mm)	10 × 84	10 × 164
Connectors	Standard HPLC (10-32 for 1/16 inch capillaries)	
Maximum Operating Pressure	30 bar	30 bar
Chemical Stability[3]	Columns are tolerant to aqueous buffers and salt solutions, 1 mol/L alkaline solutions, 1 mol/L non-oxidizing mineral acids, 8 mol/L urea, 6 mol/L guanidine hydrochloride, non-halogenated organic solvents and detergents. They are not compatible with strong oxidants and halogenated solvents.	
Storage Condition[4]	20% ethanol at 2-10℃	

1) Recommended residence time is 3-6 min. (3-6 min. is recommended for sample loading step.)
2) Including stoppers.
3) The chemical stability is for the column hardware parts only. For the chemical stability of KANEKA KanCap™ G, please refer to "Table 2 : Physical and chemical properties of KANEKA KanCap™ G".
4) Prevent from freezing.

Table 2 : Physical and chemical properties of KANEKA KanCap™ G

Base Matrix	Highly cross-linked cellulose
Average Particle Size[1']	65-85 μm
Ligand	Recombinant Protein G
Coupling Chemistry	Epoxy
Dynamic Binding Capacity[2']	≥ 25 mg human Fab/mL packed resin
Chemical Stability	Stable in commonly used solvents in affinity chromatography
Working pH Range	2-9
CIP (Cleaning In Place) condition	6-8 mol/L urea or 6 mol/L guanidine hydrochloride
Operational Flow Rate	1 mL column : Up to 100 cm/h 5 mL column : Up to 500 cm/h
Residence Time	≥ 2 min, (3-6 min. is recommended for sample loading step)
Storage Condition[3']	Slurry in 20% ethanol at 2-10℃

1') Average particle size is represented by the medium particle size of the cumulative volume distribution.
2') Dynamic binding capacity at 5% breakthrough is determined by frontal analysis at 4 min. of residence time.
3') Prevent from freezing.

【Operation】

1. Connecting Column

1) Loosen the Outlet stopper (Do not over loosen).
2) Remove the Inlet stopper. Connect the column to the inlet line by Drop-to-Drop ※1 to avoid introducing air into the column.
   ※1…Drop-to-Drop means that the column and the inlet line are connected so that the liquid and liquid are in contact with each other.
3) Immediately remove the Outlet stopper and connect the column to the outlet line.

2. Chromatographic Conditions

An example of chromatographic condition is described below. The optimal condition for each sample should be determined based on the characteristics of the feed stock used. For example, flow rate, buffer composition, buffer concentration, buffer volume, buffer pH and buffer conductivity of each step may have an effect on the purification results.

Flow rate Ⅰ) :	3-6 min. residence time corresponding to 20-40 cm/h (1 mL column) and 100-200 cm/h (5 mL column), respectively
Equilibration :	PBS, pH 7.4 (5 column volumes (CV))
Load Ⅰ) :	Fab solution pH neutralized
Wash Ⅱ) :	PBS, pH 7.4 (5 CV)
Elution Ⅲ) :	Acidic buffer usually in the range of pH 2.5-3.5
Strip Ⅳ) :	0.1 mol/L phosphoric acid, pH 2.0 (3 CV)
Neutralization Ⅴ) :	PBS, pH 7.4 (3 CV)
CIP Ⅵ) :	8 mol/L urea (contact time 15 min.)
Re-equilibration :	PBS, pH 7.4 (5 CV)
Storage Ⅶ) :	20% ethanol (5 CV)

Ⅰ) Recommended residence time for loading step is 3-6 min. and 3 ～ min. for other steps. Longer loading residence time takes longer loading time but gives higher binding capacity.

Ⅱ) Some intermediate wash steps can be conducted before product elution, if necessary.

Ⅲ) Citrate buffer or acetate buffer is generally used as elution buffer. Elution pH can be determined by performing a preliminary elution experiment with linear pH gradient as described below :

Buffer A : 50 mmol/L Citrate buffer pH 6
Buffer B : 50 mmol/L Citrate buffer pH 2

1. Equilibrate the column with PBS (5 CV).
2. Inject the sample on the column.
3. Wash the column with PBS (5 CV).
4. Wash the column with Buffer A (5 CV).
5. Elute the column using linear pH gradient from Buffer A to Buffer B (10 to 20 CV).
6. Read the pH of the elution peak top. Use the value as guidance for elution pH to be used.
7. Perform the Strip (3 CV), neutralization (3 CV) and CIP (contact time : 15 min.).
8. After column re-equilibration (3 CV), store the column in storage buffer (5 CV).

Buffer composition, concentration, pH and conductivity should be optimized in order to obtain the appropriate yield, purity and elution volume. Use the highest pH value determined to elute the antibody. Lower elution pH may lead to higher aggregate formation. Elution fractions are neutralized by adding the small amount of neutralizing buffer (e.g. 1 mol/L Tris buffer pH 9).

Ⅳ) Perform "Strip" with low pH solution to elute the impurities tightly bounded on resin after elution step. 1 mol/L acetic acid, pH 2.0 (3 CV) can also be used.

Ⅴ) Direct contact of acidic or alkaline solution on the column should be avoided.

Ⅵ) 6 mol/L guanidine hydrochloride can also be used. See〔Cleaning-In-Place (CIP)〕below.

Ⅶ) See〔Storage〕below.

【Cleaning-In-Place (CIP)】

During the purification process, some contaminants which negatively affect the overall performance of the affinity chromatography resin might accumulate on the column. These might lead to a back pressure increase or to binding capacity reduction. In order to remove such contaminants and wash out the column, CIP should be performed periodically. 6-8 mol/L urea or 6 mol/L guanidine hydrochloride is used as CIP solution. If column performance is decreased, CIP with 100 mmol/L Glycine-NaOH pH 11 (contact time is 15 min.) can be used. For lipid removal a 70% ethanol is also recommended. Different CIP protocols may have to be combined depending on the contaminants to be removed.

【Sanitization】

In order to reduce microbial contamination, KANEKA KanCap™ G Prepacked Column is sanitized with a 70% ethanol. The frequency and the sanitization conditions are designed for efficient reduction of microbial contamination and for a minimum loss of binding capacity.

【Storage】

To maintain a good column performance and prevent microbial growth, unused KANEKA KanCap™ G Prepacked Column should be stored at 2-10℃ in a 20% ethanol. DO NOT FREEZE. 2% benzyl alcohol can also be used as storage buffer at 4℃ .

After usage, remove KANEKA KanCap™ G Prepacked Column from the system and seal the column by tightening both Inlet stopper and Outlet stopper. Avoid introducing air into the column.

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
http://www.wako-chem.co.jp

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation
1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
http://www.wakousa.com

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH
Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-311-0
Facsimile : + 49-2131-311100
http://www.wako-chemicals.de

コード No. 115-01121（1mL）
111-01123（5mL）
119-01124（5mL×5）

遺伝子研究用

KANEKA KanCap™ G プレパックカラム

本品は、KANEKA KanCap™ G が充填されたプレパックカラムです。KANEKA KanCap™ G は、高架橋セルロースビーズと CH1 領域に対する親和性を高めた新規プロテイン G リガンドから構成されたプロテイン G アフィニティークロマトグラフィーレジンです。Fab や $F(ab')_2$ などのフラグメントフォーマットを含む抗体分子の捕捉および精製に最適です。抗体フラグメントフォーマットだけでなく、特にプロテイン A レジンにほとんど結合しない全長フォーマット抗体の精製にも有用です。KANEKA KanCap™ G プレパックカラムは、小スケール精製用に設計されています。

特　長：

1. CH1 領域や Fc 領域を含む抗体分子に対する高い結合容量
2. プレパックタイプ
3. Ready to use

【カラムについて】

・カラム、ロックナット、フィルターアダプターのプレパックカラム部品は、高密度ポリエチレンを主とした生体適合性ポリマーで作られています。また、フィルタープレートは、多孔性のポリプロピレン / ポリエチレン素材から作られています。
・本品は再利用できますので、再度レジンを詰め直さないで下さい。
・本品は、ほとんどの液体クロマトグラフィーシステムやワークステーションに直接接続できます。FPLC システムに接続する際は、Standard 10-32 male/M6 female adapter をご使用下さい。
・本品は、シリンジや蠕動ポンプに接続しても使えます。

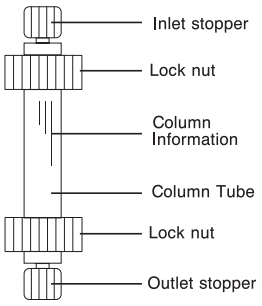

図 1　KANEKA KanCap™ G プレパックカラムの概要
（コード No. 115-01121, 1mL）

【使用上の注意点】

・20% エタノール溶液を含むので、火から遠ざけて下さい。
・所属施設のガイドラインに従って適切に廃棄して下さい。
・眼鏡、手袋、白衣を着用して下さい。
・漏出を防ぐため、コネクタが堅く締まっていることを確認して下さい。
・操作中は、カラムやポンプの圧力制限を超えないようにして下さい。
・本品を分解しないで下さい。

【製品概要】

Table 1 : KANEKA KanCap™ G プレパックカラムの特徴

カラムタイプ	1mL（Code No. 115-01121）	5mL（Code No. 111-01123, 119-01124）
内径×長さ（mm×mm）	8.0×20	8.0×100
カラム断面（cm^2）	0.5	0.5
カラム容量（mL）	1.0	5.0
推奨流速 [1]（mL/min（cm/h））	0.17 ～ 0.33（20 ～ 40）	0.83 ～ 1.67（100 ～ 200）
最大流速（mL/min（cm/h））	0.84（100）	4.19（500）
外寸法 [2]（mm×mm）	10×84	10×164
コネクター	Standard HPLC（10-32 for 1/16 inch capillaries）	
最大圧力	30 bar	30 bar
化学安定性 [3]	下記の溶液に対してカラム部品は安定です。 --- 水性緩衝液、塩溶液、1mol/L アルカリ溶液、1mol/L 非酸化性鉱酸、8mol/L 尿素、6mol/L 塩酸グアニジン、非ハロゲン化有機溶媒、界面活性剤 --- 強酸化剤やハロゲン化溶媒には不安定です。	
保存条件 [4]	20% エタノール懸濁液、2 ～ 10℃	

1）推奨滞留時間は、3 ～ 6 分です。（サンプルローディングステップでは、3 ～ 6 分をお奨めします。）
2）両端の stopper を含みます。
3）カラム部品の化学安定性情報です。KANEKA KanCap™ G の化学安定性については、“Table 2 : KANEKA KanCap™ G の物理的及び化学的性質” をご参照下さい。
4）凍結不可。

Table 2 : KANEKA KanCap™ G の物理的及び化学的性質

マトリックス	高架橋セルロース
平均粒子径 [1']	65 ～ 85 μm
リガンド	プロテイン G、組換え体
結　合	化学結合（エポキシ）
動的結合容量 [2']	≧25mg ヒト Fab/mL 担体
化学安定性	アフィニティークロマトグラフィー汎用溶媒で安定
pH 範囲	2 ～ 9
定置洗浄条件（CIP）	6 ～ 8mol/L 尿素、6 mol/L 塩酸グアニジン
流　速	1mL カラム：最大 100cm/h 5mL カラム：最大 500cm/h
滞留時間	≧2 分（推奨：3 ～ 6 分）
保存条件 [3']	20%エタノール懸濁液、2 ～ 10℃

1'）平均粒子径は、累積体積分布の中間粒径です。
2'）5% 動的結合容量は前端分析（滞留時間 4 分）で測定しています。
3'）凍結不可。

【操作概要】

1. カラムの接続

1）Outlet stopper を緩める。（緩めすぎないで下さい。）
2）Inlet stopper を外して、カラムに空気が入るのを避けるために、Drop to Drop [※1] で注入ラインにカラムを接続する。
※ 1…接続部に液をためて、液と液を触れ合わせるように接続する。
3）接続後直ぐに Outlet stopper を外して送出ラインに接続する。

2. クロマトグラフ条件

クロマトグラフ条件の参考例を下記に示します。最適な条件は試料の性質に依存しますのでご検討下さい。各工程の流速および緩衝液の組成、濃度、容量、pH および導電率は、精製結果に影響を与える可能性があります。

流　速[Ⅰ]	20 ～ 40cm/h（1mL カラム）および 100 ～ 200cm/h（5 mL カラム）にそれぞれ対応する 3 ～ 6 分間の滞留時間
平衡化	PBS, pH 7.4（5 column volumes（CV））
サンプル[Ⅰ]	pH を中和した Fab 溶液（推奨滞留時間：3 ～ 6 分）
洗　浄[Ⅱ]	PBS, pH 7.4（5CV）
溶　出[Ⅲ]	pH 2.5 ～ 3.5 の酸性緩衝液
ストリップ[Ⅳ]	0.1mol/L りん酸 , pH 2.0（3CV）
中　和[Ⅴ]	PBS, pH 7.4（3CV）
CIP[Ⅵ]	8mol/L 尿素（接触時間 15 分）
再平衡化	PBS, pH 7.4（5CV）
保　存[Ⅶ]	20% エタノール（5CV）

Ⅰ）サンプルを添加する際の推奨滞留時間は、3 ～ 6 分です。他のステップは、3 分以上からご検討下さい。滞留時間が長ければ長いほど時間はかかりますが、結合容量が増大します。

Ⅱ）必要に応じて溶出前の洗浄工程をご検討下さい。

Ⅲ）クエン酸緩衝液または酢酸緩衝液が、一般に溶出緩衝液として使用されます。溶出 pH は、以下に記載するような線形 pH 勾配を用いた予備溶出実験にて決定できます。

緩衝液 A：50mmol/L クエン酸緩衝液 pH 6
緩衝液 B：50mmol/L クエン酸緩衝液 pH 2

1. カラムを PBS（5CV）で平衡化する。
2. サンプルをカラムに注入する。
3. カラムを PBS（5CV）で洗浄する。
4. カラムを緩衝液 A（5CV）で洗浄する。
5. 緩衝液 A から緩衝液 B まで直線的な pH 勾配条件でカラムからサンプルを溶出する。（10 ～ 20CV）
6. 溶出ピークが最大になる pH を判断する。使用する溶出 pH のガイダンスとしてこの値を使用して下さい。
7. ストリップ（3CV）、中和（3CV）および CIP（接触時間：15 分間）を実施する。
8. カラムの再平衡化（3CV）後、カラムに保存バッファー（5CV）を流して保存して下さい。

適切な収量、純度および溶出量を得るためには、緩衝液の組成、濃度、pH および導電率を最適化する必要があります。抗体を溶出するために測定した pH 値で一番高い pH を使用して下さい。溶出 pH が低いと凝集体を形成しやすくなります。少量の中和緩衝液（例えば 1mol/L Tris 緩衝液 pH 9）を添加することによって溶出画分を中和して下さい。

Ⅳ）溶出工程の後、樹脂に強く結合した不純物を溶出するために、低い pH 溶液でストリップを実施して下さい。1mol/L 酢酸 , pH 2.0（3CV）も使用できます。

Ⅴ）酸溶液やアルカリ溶液を直接カラムに流さないで下さい。

Ⅵ）6mol/L 塩酸グアニジンも使用できます。〔Cleaning-In-Place（CIP）〕をご参照下さい。

Ⅶ）〔保存〕をご参照下さい。

〔Cleaning-In-Place（CIP）〕

精製プロセス中に、アフィニティークロマトグラフィー樹脂の全体的な性能に悪影響を与える汚染物質がカラム上に蓄積し、背圧の上昇または結合容量の低下を引き起こす可能性があります。このような汚染物質を除去し、カラムを洗浄するために、6 ～ 8mol/L の尿素溶液または 6mol/L の塩酸グアニジン溶液を用いて CIP を定期的に行って下さい。カラム性能が低下した場合、100mmol/L のグリシン -NaOH 溶液 pH 11 を用いた CIP を実施して下さい。その際の接触時間は、15 分です。脂質除去を行いたい場合、70% エタノールも推奨されます。除去すべき汚染物質に応じて、異なる CIP プロトコルを適宜組み合わせて行って下さい。

〔殺菌法〕

微生物汚染を低減するため、KANEKA KanCap™ G プレパックカラムを必要に応じて 70% エタノールで殺菌して下さい。

〔保　存〕

良好なカラム性能を維持し、微生物増殖を防ぐため、未使用の KANEKA KanCap™ G プレパックカラムは、20% エタノール中、2 ～ 10℃で保存して下さい。本品は、凍結不可です。2% ベンジルアルコールも 4℃における保存用緩衝液として使用できます。

システムから取り外した KANEKA KanCap™ G プレパックカラムの両端を Inlet stopper と Outlet stopper で堅く締めて保管して下さい。その際、空気が入らないようご注意下さい。

製造発売元
富士フイルム和光純薬株式会社
大阪市中央区道修町三丁目1番2号
Tel：06-6203-3741

2002KA2