



アフィニティークロマトグラフィー

アフィニティークロマトグラフィー用カラムの特長	P.68 - P.69
抗体特異的アフィニティークロマトグラフィー用カラム	
TSKgel FcR-ⅢA-NPR	
TSKgel FcR-ⅢA-5PW	P.68
TSKgel Protein A-5PW	
群特異的アフィニティークロマトグラフィー用カラム	
TSKgel Heparin-5PW	
TSKgel Chelate-5PW	
TSKgel BioAssist Chelate	P.68
TSKgel Boronate-5PW	
活性化型アフィニティークロマトグラフィー用カラム	
TSKgel Tresyl-5PW	P.68
価格表	P.72

アフィニティークロマトグラフィー (Affinity Chromatography; AFC) は、生体内での生物特異的相互作用 (例: 酵素/基質、抗体/抗原、ホルモン/レセプターたんぱく質など) を利用した分離モードです。生物特異的に相互作用する一方の物質 (リガンドと呼ばれる) を固定相に導入・固定化することで、他方の物質を吸着分離することが可能になります。このような生物特異的相互作用を利用することで、選択性が非常に高い分離、分析を行うことが可能です。

AFC用カラムは、大きく分けて2種類のタイプが用意されています。既にリガンドが固定相に導入され、すぐに分離、分析が可能であり、その応用範囲も広いタイプ (群特異的アフィニティーと呼ばれる) と、固定相に活性化型の官能基が導入されており、使用者が、自分でリガンドを固定化して使用するタイプ (活性化型) が用意されています。

アフィニティゲルの基材はポリマーゲルで、多孔性充填剤と非多孔性充填剤があります。多孔性充填剤は細孔径が100 nmで10、13、20 μm の粒子径の製品があります。一方、非多孔性充填剤は粒子径が5 μm の製品があります。

特長

抗体特異的アフィニティークロマトグラフィー用カラム

1. TSKgel FcR-III A-NPR

- ・抗体Fc領域のN-結合型糖鎖構造を認識し、ADCC活性に基づいて抗体を分離することが可能です。
- ・世界初の高性能分析用アフィニティークロマトグラフィー用カラムです。
- ・遺伝子組換えヒトFc γ R IIIaをリガンドとして用いています。天然型に比べ安定性が向上しています。
- ・抗体分子を直接分離することが可能です。
- ・精製の必要がありません。
- ・短時間での分離が可能です (30分)。

(技術資料) S/R No.118

*本製品の研究開発の一部は国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の支援によって行われました。 課題番号: 2017年度: JP17ae0101003

2. TSKgel FcR-III A-5PW

- ・セミ分取用カラムです。
 - ・TSKgel FcR-III A-NPRと同一のリガンドを用いているため同等の分離選択性を示します。
 - ・約5 mgの抗体試料を負荷することが可能です。
 - ・1回の分取クロマトグラフィーで構造解析、活性測定に必要な量を分取することが可能です。
- (技術資料) S/R No.123

3. TSKgel Protein A-5PW

- ・リガンドは遺伝子組換えProtein Aです。
- ・粒子径は20 μm 、細孔径は100 nmです。
- ・抗体 (IgG) のFc領域に結合します。
- ・培養液中の抗体量の迅速定量が可能です。

(技術資料) S/R No.117

群特異的アフィニティークロマトグラフィー用カラム

1. TSKgel Heparin-5PW

- ・リガンドは、ヘパリン (多糖: 血液凝固阻止因子) です。
- ・粒子径は10 μm 、細孔径は100 nmです。
- ・血液凝固因子 (Factor V III、トロンビン III など) の吸着分離が可能です。
- ・制限酵素、リパーゼ、リボたんぱく質、コラゲナーゼなどを吸着します。
- ・アンチトロンビンの吸着量は、約2-3 g/Lです。

(技術資料) S/R No.61

2. TSKgel Chelate-5PW、TSKgel BioAssist Chelate

- ・リガンドは、イミノジ酢酸です。
- ・粒子径は10、13 μm 、細孔径は100 nmです。
- ・前処理で金属イオン (Cu²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺ など) を配位させてから使用します。
- ・アミノ酸のなかで、His、Met、Thrなどを含む幅広いたんぱく質、His-Tagたんぱく質ペプチドを吸着します。
- ・抗体、血清たんぱく質、レクチン、膜たんぱく質などの分離が可能です。
- ・分取カラムが揃っています。

(技術資料) S/R No.61、70、74

3. TSKgel Boronate-5PW

- ・リガンドは、m-アミノフェニルボロン酸です。
- ・粒子径は10 μm 、細孔径は100 nmです。
- ・1,2-シスジオール化合物を吸着します。
- ・糖類、糖たんぱく質の分離が可能です。

(技術資料) S/R No.61

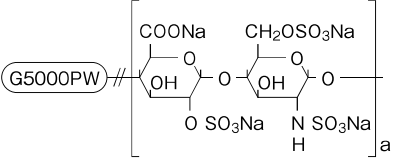
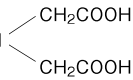
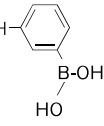
*高速分取用アフィニティークロマトグラフィー用充填剤 (粒子径: 20 μm 、30 μm) については、当社営業までお問い合わせください。

活性化型アフィニティークロマトグラフィー用カラム

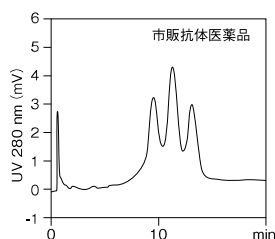
1. TSKgel Tresyl-5PW

- ・活性基はトレシル基です。アミノ基、チオール基を持つリガンドを固定化できます。
 - ・粒子径は 10 μm、細孔径は 100 nm です。
 - ・たんぱく質の温和な条件での固定化が可能です。
 - ・カラムタイプの商品は、リガンド溶液を循環して固定化を行います。
 - ・初期検討用のバルク充填剤も用意されています。
 - ・ダイズトリプシンインヒビターの固定化量は、約 60 mg/g です。
- (技術資料) S/R No.67

カラムの基本物性

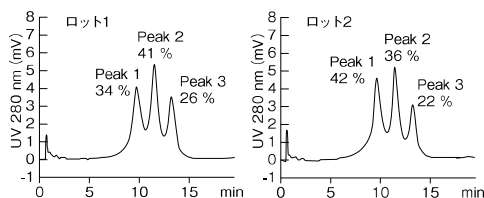
品名	基材	粒子径 (μm)	リガンド	細孔径 nm (推定)	吸着量など特性 (参考値)
TSKgel FcR-III A-NPR	ポリマー	5	非多孔性充填剤—ヒト遺伝子組換えFcγ受容体IIIa	非多孔性	抗体Fc領域の N-結合型糖鎖の違いを識別・分離
TSKgel FcR-III A-5PW	ポリマー	10	G5000PW—ヒト遺伝子組換えFcγ受容体IIIa	100	抗体Fc領域の N-結合型糖鎖の違いを識別・分離
TSKgel Protein A-5PW	ポリマー	20	G5000PW—遺伝子組換えProtein A	100	IgGのFc領域に結合
TSKgel Heparin-5PW	ポリマー	10	G5000PW— 	100	アンチトロンビンⅢ 約 3 g/L
TSKgel Chelate-5PW TSKgel BioAssist Chelate	ポリマー	10、13	G5000PW—N 	100	His-Tagたんぱく質など
TSKgel Boronate-5PW	ポリマー	10	G5000PW—NH 	100	糖、糖たんぱく質 シス-ジオール化合物
TSKgel Tresyl-5PW	ポリマー	10	G5000PW—CH ₂ OSO ₂ CH ₂ CF ₃	100	ダイズトリプシンインヒビター 約 60 mg/g

市販抗体医薬品の分離



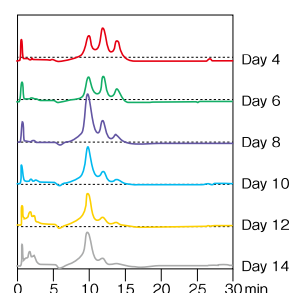
カラム：TSKgel FcR-III A-NPR
(4.6 mm I.D. × 7.5 cm)
溶離液：A; 50 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 6.5)
B; 50 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 4.5)
グラジエント：B 0-100 % (2-20 min, リニア)
流速：1.0 mL/min 検出：UV (280 nm)
温度：25°C
試料：市販抗体医薬品

ロットの異なる抗体医薬品の分離比較 (品質管理への応用例)



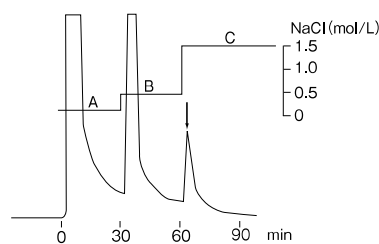
カラム：TSKgel FcR-III A-NPR
(4.6 mm I.D. × 7.5 cm)
溶離液：A; 50 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 6.5)
B; 50 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 4.5)
グラジエント：B 0-100 % (2-20 min, リニア)
流速：1.0 mL/min 検出：UV (280 nm)
温度：25°C
試料：市販抗体医薬品 (2ロット)

CHO細胞で培養した抗体の分析例 (工程管理への応用例)



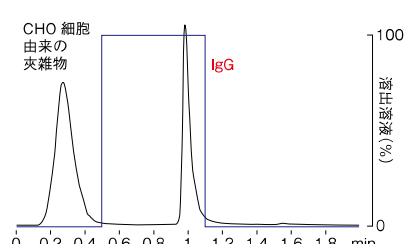
カラム：TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. × 7.5 cm)
溶離液：A; 50 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 6.5)
B; 50 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 4.5)
グラジエント：B 0-100 % (2-20 min, リニア)
流速：1.0 mL/min 検出：UV (280 nm)
温度：25°C 試料：モノクローナル抗体、5 μg
*培養開始後一定期間経過後のCHO細胞培養液を採取、フィルターろ過、ProteinAゲルで簡易精製し測定

ヒト血漿アンチトロンビンⅢの分離



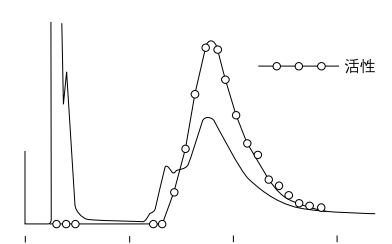
カラム：TSKgel Heparin-5PW (7.5 mm I.D. × 7.5 cm)
溶離液：A; 20 mmol/L トリス塩酸緩衝液
+ 0.15 mol/L NaCl (pH 7.5)
B; 20 mmol/L トリス塩酸緩衝液
+ 0.5 mol/L NaCl (pH 7.5)
C; 20 mmol/L トリス塩酸緩衝液
+ 1.5 mol/L NaCl (pH 7.5)
流速：1.0 mL/min
検出：UV (280 nm)

CHO細胞培養液中のIgGの分離



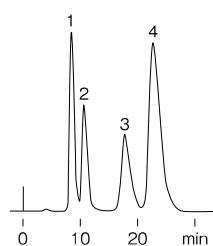
カラム：TSKgel Protein A-5PW
(4.6 mm I.D. × 3.5 cm, PEEK)
吸着溶液：20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)
溶出溶液：20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 2.5)
試料：ポリクローナルIgG (0.5 g/L) を含む
CHO細胞培養液、20 μL (10 μg)
流速：2.0 mL/min
検出：UV (280 nm)
ステップグラジエント：0 → 0.5 min; 吸着溶液
0.5 → 1.1 min; 溶出溶液
1.1 → 2.0 min; 吸着溶液
*スタティックミキサー (10 μL) 使用 (ポンプとインジェクションバルブ間)

トリプシンの分離



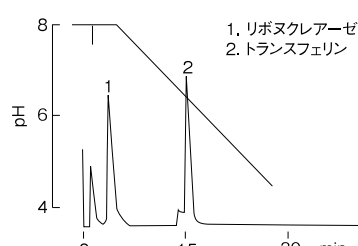
カラム：TSKgel Boronate-5PW (7.5 mm I.D. × 7.5 cm)
溶離液：A; 20 mmol/L HEPES緩衝液 (pH 8.5)
+ 50 mmol/L MgCl₂
B; 20 mmol/L HEPES緩衝液 (pH 8.5)
+ 100 mmol/L ソルビトール
A → B (60 min, リニアグラジエント)
流速：1.0 mL/min
検出：UV (280 nm)
活性回収率：94 %

ヌクレオシドの分離



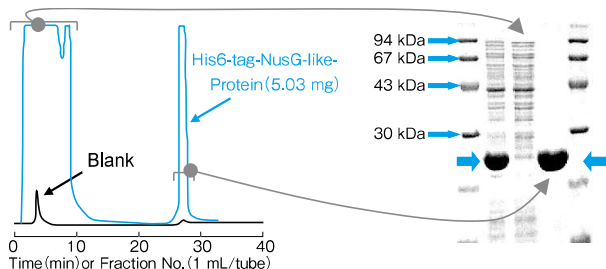
カラム：TSKgel Boronate-5PW (7.5 mm I.D. × 7.5 cm)
溶離液：0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 8.0)
流速：1.0 mL/min
検出：UV (260 nm)
試料：1. シチジン 2. ウリジン
3. グアノシン 4. アデノシン

たんぱく質の分離



カラム：TSKgel Chelate-5PW Glass (5 mm I.D. × 5 cm)
溶離液：A; 20 mmol/L HEPES-MES酢酸緩衝液 (pH 8.0) + 0.5 mol/L NaCl
B; 20 mmol/L HEPES-MES酢酸緩衝液 (pH 4.5) + 0.5 mol/L NaCl
A → B (30 min, リニアグラジエント)
流速：0.8 mL/min
検出：UV (280 nm)

His-tag 結合たんぱく質の精製



カラム：TSKgel BioAssist Chelate (7.8 mm I.D. × 5 cm, PEEK)、Ni²⁺添加
 溶離液：A; 20 mmol/L イミダゾールを含む 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)
 B; 500 mmol/L イミダゾールを含む 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)
 グラジエント：0 → 20 min B 0%, 20 → 50 min B 100 %
 流速：1.0 mL/min
 検出：UV (280 nm)
 注入量：2.5 mL
 試料：His6-tag 結合 NusG 様たんぱく質を含む大腸菌粗抽出液

福井大学医学部 藤井豊先生、木元久先生のご厚意によります。

TSKgel Tresyl-5PW (充填剤) へのリガンドの固定化方法

たんぱく質の固定化

カップリング溶液の選択

- ① 1.0 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.5-8.0)
- ② 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.5-8.0) *1)
- ③ 1.0 mol/L 炭酸塩緩衝液 (pH 8-9) + 0.5 mol/L NaCl *2)

*1) リガンドが①の溶液に溶けない場合
 *2) リガンドが②の溶液に溶けない場合

反応

室温 4-6時間 (4℃, overnight) 振とう
 ● リガンドの多点結合が起こるため、反応時間をあまり長くしない様ご注意ください。

ブロッキング

0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 中、室温 1時間振とう

抗体の固定化

カップリング溶液の選択

- ① 1.0 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.5)

反応

- ① 抗体添加量が 10 g/Lゲルの場合 25℃、6-7時間振とう
- ② 抗体添加量が 2.5 g/Lゲルの場合 25℃、2-3時間振とう
あるいは 4℃、15-20時間振とう

ブロッキング

0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 中、室温 1時間振とう

低分子リガンドの固定化

カップリング溶液の選択

- ① リガンドのpKa値よりも高いpHの緩衝液
- ② 0.1 mol/L 炭酸塩緩衝液 (pH 8-9) + 0.5 mol/L NaCl

反応

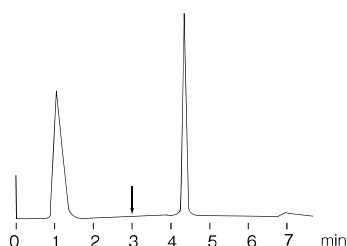
室温 overnight 振とう

ブロッキング

0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 中、室温 1時間振とう

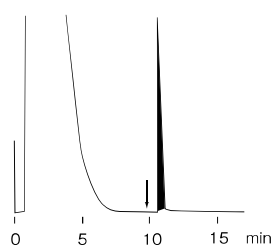
- TSKgel Tresyl-5PWを用いたリガンドの固定化については、まず充填剤 (パラゲル) を用いて少量での予備実験を行い、それから充填カラムでの固定化をお薦めします。
 なお、TOYOPEARL AF-Tresyl-650M にも、この固定化方法が適用できます。具体的な実施例については、当社技術資料 (セパレーションレポート No.67) をご参照ください。

ヒト血清中のアルブミンの分離



カラム：抗ヒトアルブミン抗体固定化Tresyl-5PW (10 mm I.D. × 2 cm)
 溶離液：A; 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)
 B; 0.1 mol/L クエン酸-HCl (pH 1.6)
 A → B ステップグラジエント (矢印: 3分にて切替え)
 流速：1.0 mL/min
 検出：UV (280 nm)

ヒト血清中のプラスミノゲンの精製



カラム：リジン固定化Tresyl-5PW (5.0 mm I.D. × 5 cm)
 溶離液：A; 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0)
 B; A + 0.1 mol/L ε-アミノカプロン酸
 A → B ステップグラジエント (矢印: 10分にて切替え)
 流速：0.8 mL/min
 検出：UV (280 nm)

▼
価格表(アフィニティークロマトグラフィー用カラム)

● 抗体特異的アフィニティークロマトグラフィー用カラム

分析カラム							
品番	品名	粒子径	カラムサイズ	リガンド	出荷溶媒	納期	価格(円)
0023513	TSKgel FcR-III A-NPR	5 μm	4.6 mm I.D. × 7.5 cm	ヒト組換えFcγ受容体IIIa	*		480,000
0023532	TSKgel FcR-III A-5PW	10 μm	7.8 mm I.D. × 7.5 cm	ヒト組換えFcγ受容体IIIa	*		480,000
0023483	TSKgel Protein A-5PW	20 μm	4.6 mm I.D. × 3.5 cm	遺伝子組換えプロテインA	**		154,000

* 0.025 % ProClin® 300 + 0.65 mmol/L クエン酸 + 9.35 mmol/L クエン酸三ナトリウム (pH 6.5)

** 20 % エタノール水溶液

カラムは要冷蔵 (2 ~ 8 °C)

ProClinはRohm and Haas Company の登録商標です。

● 群特異的アフィニティークロマトグラフィー用カラム

分析カラム							
品番	品名	粒子径	カラムサイズ	リガンド	出荷溶媒	納期	価格(円)
0013064	TSKgel Heparin-5PW	10 μm	7.5 mm I.D. × 7.5 cm	ヘパリン	水		111,000
0014443	TSKgel Heparin-5PW Glass	10 μm	5.0 mm I.D. × 5 cm	ヘパリン	水	**	111,000
0014444	TSKgel Heparin-5PW Glass	10 μm	8.0 mm I.D. × 7.5 cm	ヘパリン	水	**	165,000
0008645	TSKgel Chelate-5PW	10 μm	7.5 mm I.D. × 7.5 cm	イミノジ酢酸	*		111,000
0008646	TSKgel Chelate-5PW	13 μm	21.5 mm I.D. × 15 cm	イミノジ酢酸	*	**	385,000
0014440	TSKgel Chelate-5PW Glass	10 μm	5.0 mm I.D. × 5 cm	イミノジ酢酸	*	**	111,000
0014441	TSKgel Chelate-5PW Glass	10 μm	8.0 mm I.D. × 7.5 cm	イミノジ酢酸	*	**	165,000
0020022	TSKgel BioAssist Chelate	10 μm	7.8 mm I.D. × 5 cm	イミノジ酢酸	*	**	110,000
0013066	TSKgel Boronate-5PW	10 μm	7.5 mm I.D. × 7.5 cm	m-アミノフェニルボロン酸	水		111,000
0014449	TSKgel Boronate-5PW Glass	10 μm	5.0 mm I.D. × 5 cm	m-アミノフェニルボロン酸	水	**	111,000

* 10 mmol/L 酢酸塩緩衝液 (pH 4.5)

カラムは要冷蔵 (4 ~ 10 °C) (TSKgel Chelate-5PW及びTSKgel Chelate-5PW Glassを除く)

納期: ** は受注後1 ヶ月

● 活性化型アフィニティークロマトグラフィー用カラム及び充填剤

活性化型アフィニティ分離用カラム (納期: 受注後1 ヶ月)

品番	品名	粒子径	カラムサイズ	リガンド	出荷溶媒	価格(円)
0014455	TSKgel Tresyl-5PW	10 μm	6.0 mm I.D. × 4 cm	トレシル基	アセトン	45,000
0014456	TSKgel Tresyl-5PW	10 μm	7.5 mm I.D. × 7.5 cm	トレシル基	アセトン	111,000

カラムは要冷蔵 (4 ~ 10 °C)

ガードゲルキット

品番	品名	備考	価格(円)
0008647	TSKgel guardgel Chelate-5PW	*	34,000
0013125	TSKgel guardgel Boronate-5PW	*	34,000
0014451	TSKgel guardgel Boronate-5PW Glass	**	45,000

* 充填剤5 mL、TSKgel guardgel用ホルダ (6 mm I.D. × 1 cm)、予備フィルタ10枚、ジョイント

** 充填剤5 mL、TSKgel guardgel用ガラスホルダ (8 mm I.D. × 1 cm)

PEEKラインフィルタ

品番	品名	備考	価格(円)
0018014	ラインフィルタキット (PEEK)	—	31,500
0018021	ラインフィルタエレメント (PEEK)	3個入り	6,300