

# 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.78 – P.79

---

**New** 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 Protein A-5PW P.80 – P.81

---

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.80 – P.81

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.80 – P.81

---

価格表 P.82

---

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。

アフィニティーゲルの基材はポリマーゲル、粒子径は10、13、20  $\mu\text{m}$ 、細孔径は100 nmです。

## 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

#### New 1. TSKgel Protein A-5PW

- ・リガンドは遺伝子組換えProtein Aです。
  - ・粒子径は20  $\mu\text{m}$ 、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  $\mu\text{m}$ 、細孔径は100 nmです。
  - ・血液凝固因子 (Factor VIII、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、リポたんぱく質、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  $\mu\text{m}$ 、細孔径は100 nmです。
  - ・前処理で金属イオン ( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 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  $\mu\text{m}$ 、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

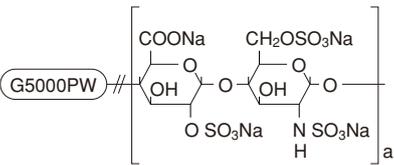
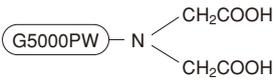
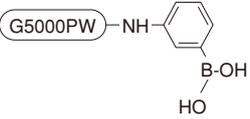
\* 高速分取用アフィニティークロマトグラフィー用充填剤 (粒子径:20  $\mu\text{m}$ 、30  $\mu\text{m}$ ) については、当社営業までお問い合わせください。

活性化型アフィニティークロマトグラフィー用カラム

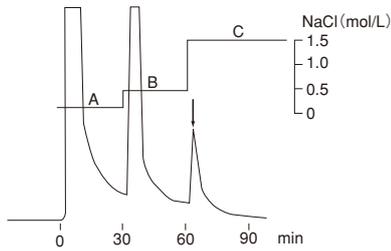
1. TSKgel Tresyl-5PW

- ・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

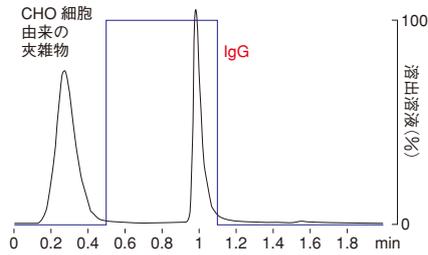
品名	基材	粒子径 (μm)	官能基構造	細孔径 nm (推定)	吸着量など特性 (参考値)
TSKgel Protein A-5PW	ポリマー	20	G5000PW—遺伝子組換えProtein A	100	IgGのFc領域に結合
TSKgel Heparin-5PW	ポリマー	10	G5000PW— 	100	アンチトロンビンⅢ 約3 g/L
TSKgel Chelate-5PW TSKgel BioAssist Chelate	ポリマー	10、13	G5000PW— 	100	His-Tagたんぱく質など
TSKgel Boronate-5PW	ポリマー	10	G5000PW—NH— 	100	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 <sub>2</sub> OSO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	100	ダイズトリプシン インヒビター 約60 mg/g

ヒト血漿アンチトロンビンⅢの分離



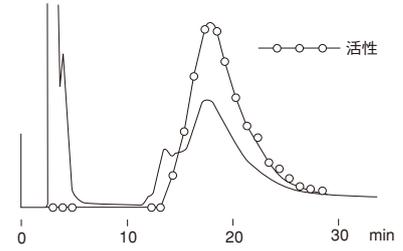
カラム; TSKgel Heparin-5PW (7.5 mm I.D.×7.5 cm)  
 溶離液; A: 20 mmol/L トリス塩酸緩衝液 + 0.15 mol/L NaCl (pH 7.5)  
 B: 20 mmol/L トリス塩酸緩衝液 + 0.5 mol/L NaCl (pH 7.5)  
 C: 20 mmol/L トリス塩酸緩衝液 + 1.5 mol/L NaCl (pH 7.5)  
 流速; 1.0 mL/min 検出; UV (280 nm)

CHO 細胞培養液中の IgG の分離



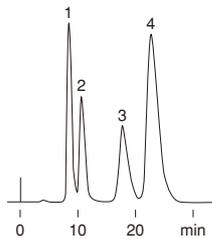
カラム; TSKgel Protein A-5PW (4.6 mm I.D.×3.5 cm, PEEK)  
 吸着溶液; 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)  
 溶出溶液; 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 2.5)  
 試料; ポリクローナル IgG (0.5 g/L) を含む CHO 細胞培養液, 20 μL (10 μg)  
 流速; 2.0 mL/min  
 検出; UV (280 nm)  
 ステップグラジエント; 0 → 0.5 min; 吸着溶液  
 0.5 → 1.1 min; 溶出溶液  
 1.1 → 2.0 min; 吸着溶液  
 \*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



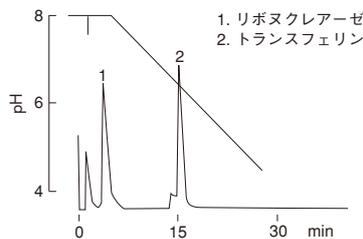
カラム; TSKgel Boronate-5PW (7.5 mm I.D.×7.5 cm)  
 溶離液; A: 20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH 8.5) + 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>  
 B: 20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH 8.5) + 100 mmol/L ソルビトール  
 A→B (60 min、リニアグラジエント)  
 流速; 1.0 mL/min  
 検出; UV (280 nm)  
 活性回収率; 94 %

ヌクレオシドの分離



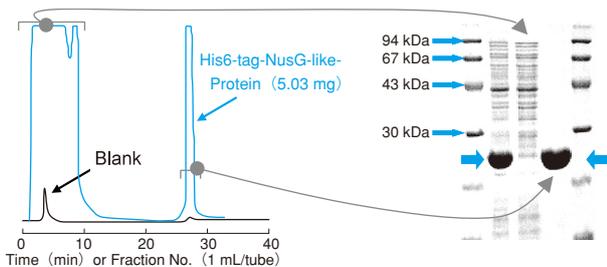
カラム; TSKgel Boronate-5PW (7.5 mm I.D.×7.5 cm)  
 溶離液; 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 8.0)  
 流速; 1.0 mL/min  
 検出; UV (260 nm)  
 試料; 1. シチジン 2. ウリジン  
 3. グアノシン 4. アデニン

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)、Ni<sup>2+</sup> 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 リン酸塩緩衝液 (pH 7.5-8.0)
- ② 0.5 mol/L リン酸塩緩衝液 (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°C, 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 トリス塩酸塩緩衝液 (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 リン酸塩緩衝液 (pH 7.5)

#### 反応

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

#### ブロッキング

0.1 mol/L トリス塩酸塩緩衝液 (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

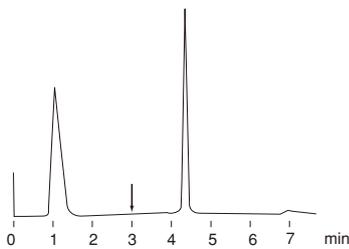
室温overnight振とう

#### ブロッキング

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

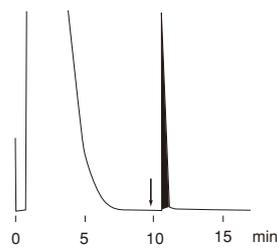
- TSKgel Tresyl-5PWを用いたリガンドの固定化については、まず充填剤 (パラゲル) を用いて少量での予備実験を行い、それから充填カラムでの固定化をお勧めします。  
なお、TOYOPEARL AF-Tresyl-650M にも、この固定化方法が適用できます。具体的な実施例については、当社技術資料 (セパレーションレポートNo.67) をご参照ください。

### 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 リン酸塩緩衝液 (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 リン酸塩緩衝液 (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	官能基	出荷溶媒	納期	価格(円)
0023483	TSKgel Protein A-5PW	20 μm	4.6 mm I.D. × 3.5 cm	組換えプロテインA	*		140,000

\* 20 %エタノール水溶液

● 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	官能基	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		101,000
0014443	TSKgel Heparin-5PW Glass	10 μm	5.0 mm I.D. × 5 cm	ヘパリン	水	**	101,000
0014444	TSKgel Heparin-5PW Glass	10 μm	8.0 mm I.D. × 7.5 cm	ヘパリン	水	**	150,000
0008645	TSKgel Chelate-5PW	10 μm	7.5 mm I.D. × 7.5 cm	イミノジ酢酸	*		101,000
0008646	TSKgel Chelate-5PW	13 μm	21.5 mm I.D. × 15 cm	イミノジ酢酸	*	**	350,000
0014440	TSKgel Chelate-5PW Glass	10 μm	5.0 mm I.D. × 5 cm	イミノジ酢酸	*	**	101,000
0014441	TSKgel Chelate-5PW Glass	10 μm	8.0 mm I.D. × 7.5 cm	イミノジ酢酸	*	**	150,000
0020022	TSKgel BioAssist Chelate	10 μm	7.8 mm I.D. × 5 cm	イミノジ酢酸	*	**	100,000
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		101,000
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	**	101,000

\* 10 mmol/L 酢酸塩緩衝液 (pH 4.5)

カラムは要冷蔵 (4~10℃) (TSKgel Protein A-5PWは2~8℃) (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及び充填剤 (納期: 受注後1ヶ月)

品番	品名	粒子径	カラムサイズ	官能基	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	41,000
0014456	TSKgel Tresyl-5PW	10 μm	7.5 mm I.D. × 7.5 cm	トレシル基	アセトン	101,000
0016208	TSKgel Tresyl-5PW	10 μm	2 g入り	トレシル基	乾燥ゲル	30,000

カラム及びゲルは要冷蔵 (4~10℃)

ガードゲルキット

品番	品名	備考	価格(円)
0008647	TSKgel guardgel Chelate-5PW	*	31,000
0013125	TSKgel guardgel Boronate-5PW	*	31,000
0014451	TSKgel guardgel Boronate-5PW Glass	**	41,000

\* 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)

FPLC用コネクタ及びPEEKラインフィルタ

品番	品名	備考	価格(円)
0018217	トヨパールパック用アダプタ (M6 - 1/4-28)	2個入*	4,200
0020028	T-Fユニオン (M6 - 10-32)	FPLC® コネクタ**	2,100
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

\* フレアフィットタイプ。TSKgel ガラスカラムを直接FPLCシステムに接続するためのコネクタです。

\*\* オンネタイプのカラムやラインフィルタを直接FPLCシステムに接続するためのコネクタです。

FPLCは、GEヘルスケア・ジャパン株式会社の登録商標です。