

# SPLITT フロー・フラクショネーションシステムによる タンパク質の連続精製

## 一般情報

ID0059

アプリケーション：バイオテクノロジー、医薬、タンパク質、ウシ $\gamma$ -グロブリン、  
タンパク質精製

テクノロジー：スプリットフロー・フラクシネーション

機器構成：GF2000

キーワード：精製、タンパク質、拡散、透析法、SPLITT、非対称フローFFF

## はじめに

タンパク質精製はバイオテクノロジーにおいて重要な工程の一つです。カラムクロマトグラフィー、限外濾過、および超遠心分離が一般的に使用されている精製技術です。

このアプリケーションでは拡散に基づく新しい精製技術によって、ウシ $\gamma$ -グロブリンを効率的に精製します。このアプローチの基礎理論は、1990年代初頭にGiddings氏によって確立されました。[1,2]。

システム(図1)は精製用SPLITTチャネルとタンパク質とバッファーを供給するための2つのペリスタポンプで構成されています。精製用SPLITTチャネルは2つの入口と2つの出口で構成されています。入口と出口のストリームは入口側と出口側の流れの安定性を確保するために、2つのスプリッターによってチャネル内を分割しています。SPLITTチャネルの側面図を図2に示します。破線はSPLITTチャネル内に流体力学的に形成される入口と出口の分割面(ISPおよびOSP)の位置を表します。ISPとOSPの間の領域は濃縮されたタンパク質を不純物から分離する拡散障壁(仮想膜)として機能します。

サンプルはサンプル注入口からチャネルに送り込まれます。バッファーは別の入口から注入されます。バッファーの体積流量はサンプルの体積流量よりも高く、サンプルをチャネルの上壁(壁A)に向かって押します。サンプルが出口に向かって移動すると、拡散係数の高い不純物の大部分が拡散障壁を通過し、下部の出口(不純物出口)から排出されます。拡散係数が低いタンパク質成分は、ほとんどが上部領域(壁AとISPの間)に留まるため、出口Aから溶出します。この透析法のような分離プロセスは非常に速く(数十秒)、また連続的にタンパク質を精製することが可能です。



図1 上：精製用SPLITTチャネルと2つのペリスタポンプで構成された連続SPLITT分離システム  
下：精製用SPLITTチャネルの拡大図

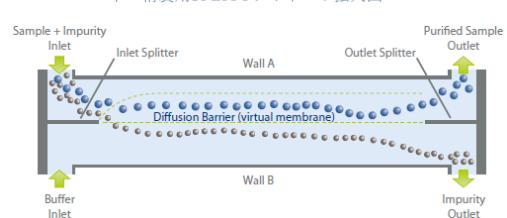


図2：精製用SPLITTチャネルの側面図

## 測定

ウシ  $\gamma$ -グロブリンと870 Daの標準ポリスチレンスルホン酸塩（低分子量不純物の代替として使用）の1:1 (w/w) 混合物を0.9% (w/w) NaClバッファーに混和してサンプルを作成しました。同じNaClバッファーを精製プロセスのバッファーとして使用しました。10 mLのサンプルを1 mL/minの流速でチャネルに送りました。精製したフラクションをチャネルにさらに2回通して、最適なタンパク質溶液の純度に到達させました。出口AおよびBから回収したサンプルは、UV検出器を接続した非対称フローFFF(AF4)によって分析しました。

## 結果と考察

左の図3は元のサンプルと最終精製物のAF4-UV分析の結果を示しています。最終的な精製物では、 $\gamma$ -グロブリンと不純物全体のピーク面積が元のサンプルと比較して5.2倍に増加しました。相対的な $\gamma$ -グロブリン領域の増加により、最終的な精製物の純度は97%に達しました。（図3右）。

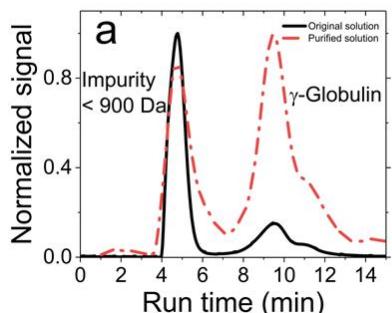


図3：元のサンプルと最終精製物のAF4-UV分析

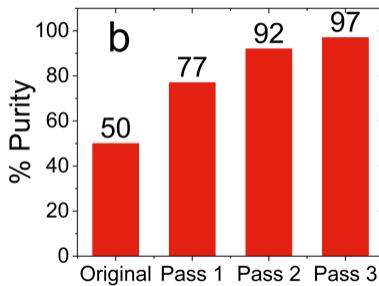


図4：連続精製サイクルにおける $\gamma$ -グロブリンの純度変化

## まとめ

拡散ベースの精製システムは、他のタンパク質精製法に代わる高速で費用対効果の高い精製法です。1つのシステムで1日あたり最大1.4リットルのタンパク質（タンパク質43 g）を精製可能です。精製チャネルは簡単に洗浄でき、何度も再利用できます。精製サイクルを増やすことで純度のレベルを大幅に上げることができます。1サイクルあたりの希釈率は300%と推定されます。

## 参考文献

- [1] Williams et.al, Ind., Eng., Chem., Res., 1992, 31, 2172-2181
- [2] Levin et.al, Anal., Chem., 1993, 65, 2254-2261