

UniGel ET Removal 親和性クロマトグラフィー媒体

製品紹介

UniGel ET Removal は、機械強度が高く、化学的安定性が優れており、均一な粒径を持つ単分散ポリメタクリル酸微粒子を基質とする親和性クロマトグラフィー媒体です。この媒体は、基質上にポリリシン(ε-リシン)を結合し、サンプルに混入したエンドトキシンを選択的に結合して除去することができます。また、表面の親水性を改善し、非特異的吸着を低減します。さらに、独自の技術により表面を機能化し、高流速、低反圧、高結合容量といった優れたクロマトグラフィー性能を実現します。

表 1. UniGel ET Removal 親和性クロマトグラフィー媒体の技術仕様

項目	仕様
製品型番	UniGel ET Removal
分離原理	特殊親和捕捉
基質	単分散ポリメタクリル酸樹脂
粒径	約65 μm
最大耐圧	0.8 MPa
pH 安定性	2~12
化学安定性	一般的な緩衝液、20 mM リン酸ナトリウム、1% SDS、6 M 塩酸胍、70% エタノール、6 M 尿素などの有機溶剤に耐性；長期接触で強酸強アルカリを避ける
使用温度	2-40℃

操作案内

スラリー濃度測定

UniMab ProtG 親和性クロマトグラフィー媒体は、20%エタノール溶液に保存され、スラリー濃度 (Cs) は約65% (w/v) です。スラリー濃度とはクロマトグラフィー媒体の恒定沈降体積が媒体全体積に対するの割合を指します。Csを正確に測定する為に、クロマトグラフィー媒体をよく掻き混ぜてなら、10 mL のスラリーを試験管に移し一晩静置し、沈降後の体積 Vr を読み取ります。スラリー濃度 Cs の計算式は次の通りです。

$$Cs (\%) = 100 \times (V_r/10) = 10 V_r \text{---式 1}$$

最適なカラム充填結果を得るために、0.5 M NaCl 溶液でスラリー濃度を50-70%に調整することを推奨します。

媒体の前処理

1, カラム体積 (Vc) の計算:

$$V_c = h \times \pi r^2 \text{---式 2}$$

h: カラム長さ; r: カラム半径

2, 必要なスラリー量 (Vs) の計算:

通常、クロマトグラフィー媒体は圧縮されると体積が減少します。最適な充填密度を得るため、スラリー量を多めに用意することを推奨します。通常、圧縮比 (CF) は 1.05 です。

$$V_s = 100 \times (V_c \times CF) / Cs \text{---式 3}$$

3, 充填用スラリーの用意:

元の保存容器からクロマトグラフィー媒体を取り出し、必要なスラリー量を適切な容器に移し、静置して沈殿させた後、上澄みを除去します。次に、5倍体積の 0.5 M NaCl で媒体を洗浄し、保存液を除去します。最後に、充填用スラリーの濃度を50-70%に調整します。

クロマトグラフィーカラムの充填

UniGel ET Removalクロマトグラフィー媒体は20%エタノール中で保存されており、1.5kgのスラリーが1リットルの媒体体積

に相当します。カラムの充填には、0.5M NaClまたは純水を流動相として使用することを推奨します。推奨充填係数は1.05です。

1) 必要なクロマトグラフィー媒体のスラリー量の計算:

必要なスラリー量 (kg)
= 目標カラム体積 (L) x 1.5 kg/L x 1.05
例として、40 cm I.D×20 cmの25Lカラムを充填する場合、必要なスラリー量は以下の通りです: 25L × 1.5 kg/L × 1.05 = 39.375 kg。媒体体積を正確に計量するためには、計量前にスラリーの濃度が均一であることが必要です。(ゆっくりと手動で混ぜるか、または50 rpm未満の機械で攪拌することで均一にしてからスラリーを静置させる時間は10分以内に計量します。)

2) 充填用スラリーの準備

充填前に、必要量の0.5 M NaCl (または純水) を充填液として用意します。以下の充填液は0.5 M NaCl (純水) を指します。

実験室規模の小カラム (内径≦50 mm) の場合:
計算した必要量の20%エタノール溶液を漏斗に移し、ろ過後に媒体体積の3倍の量の充填液を加え、ゆっくりとスラリーを攪拌します。その後、再度ろ過を行います。以上の手順を2回繰り返して、エタノールが完全に除去されるまで行います。最終的に、スラリーの濃度を50~60%に調整して、目標体積の1.67~2倍の量の充填液を用意します。

大カラム (内径>50 mm) の場合:
計算した必要量の20%エタノール溶液をカラムに静置させ、2時間以上かけて沈降させた後、上澄みを除去します (上澄みには一部微細な濁りが含まれることがあります)。新たに同じ体積の充填液を加え、再度2時間静置します。上澄みを再び除去し、最終的に、スラリーの濃度を50~60%に調整して、目標体積の1.67~2倍の量の充填液を準備します。

注意: 充填液の準備中には、摩擦や衝突を避けるために細心の注意を払うことが重要です。攪拌時には、磁気攪拌や機械攪拌装置を使用することは避けてください。充填が再度必要となる場合は、上記の手順に従ってスラリーと充填液を用意します。

3) 充填流動充填:

(1) 上記のスラリーを完全に攪拌し、カラムに移します。
(2) 充填液を流動相として使用し、充填を開始します (充填の開始時には、液体の流出により一部泡立ちが見られることがあります。充填を進

めるにつれて、1~2回分のカラム体積後に安定します)。

注意: 充填開始時の流速は高すぎないようにしてください。

(3) カラムベッドが安定した後、目標とする最高流速に流速を増加させます (使用流速の2倍で洗浄することを推奨します) または、目標最大圧力に圧力を増加させます (推奨最大圧力は1.0 MPa)。

(4) 圧力を一定に保ち、20分間保持します。ピストンをカラムベッド面から2~3 mm下の位置まで調整して固定します。

軸向圧縮充填 (内径>300 mm) :

(1) カラムを洗浄し、空気を排出します。
(2) スラリータンクをカラムに接続し、カラム内の余分な溶液を除去します。ピストンをカラムの底まで5cmほど降ろします。
(3) 供給バルブを開き、ピストンを上昇させながら充填を開始します。充填速度は200~300cm/hです。スラリー濃度に基づいて充填量を決定し、ピストンの移動距離を換算します。注入が終わったら、供給バルブを閉じ、ピストンを下げてカラムを圧縮します。圧縮速度は60~100cm/hで、充填材が完全に沈降し、カラムベッドの高さが安定したら、ピストンの移動を停止し、カラムベッドの高さを読み取ります。この時点で、1.05の圧縮比を基に最終的なピストンの位置を計算します。

注意: 充填時に気泡が入らないように、通常は計算された媒体量に対して120%以上の量で充填を行ってください。

カラム効率評価

充填したクロマトグラフィーカラムをまず2 CVの0.5M NaCl溶液で平衡化し、その後、2.0M NaCl溶液を使用し、100cm/hの流速でカラム効率を評価します。また、脱イオン水でクロマトグラフィーカラムを平衡し、アセトン溶液を用いてテストを行うことも可能です。具体的な試験データについては表3を参照してください。

表2. UniGel Removal クロマトグラフィーカラム

項目	の効率試験条件	内容
サンプル	5% (v/v) アセトン水溶液または2 M NaCl	
ロード量	カラム容量の1~5%	
移動相	脱イオン水または0.5 M NaCl	
線速度	50~200 cm/h	
測定	5% アセトンロード: UV 280 nm; 2 M NaCl ロード: 電気伝導度計	
合格基準	As: 0.8~1.5; Plates (N/m): >2500	

使用方法

- 1, 洗浄および平衡化:3-5CVの0.2-0.5MエンドトキシンフリーのNaOH水溶液を使用して、カラムを洗浄し、流速制御で媒体がNaOH溶液と接触する時間を0.5-2時間にします。
3-5CVのエンドトキシンフリーの水でカラムを洗浄します。
- 2, 平衡化:3-5 CVのエンドトキシンフリーの平衡化溶液でカラムを平衡化し、洗浄します。
- 3, サンプルロード:4-25° Cの範囲で、10から50cm/hの流速でサンプルをカラムに通過させます。
- 4, 収集:流出液を収集し、流出物中のエンドトキシン含量を測定します。これが目標サンプル溶液です。
- 5, 再生:カラムの再生には、ステップ1から3の方法を使用します。
- 6, 保存:
使用終了後、まず純水でカラム中の緩衝塩を置換し、その後20%エタノールで保存します。

製品応用

実験条件装置: SCG 液体クロマトグラフィーカラム: 16 × 40 mm
流速: 1.0 ml/min
サンプル: rHSA 原液 87.9 mg/ml
サンプル量: 10ml サンプル/ml
平衡化緩衝液: 20mM PBS, 0.1M NaCl, pH7.0
洗脱緩衝液: 20mM PBS, 1.0M NaCl, pH7.0 CIP: 0.5M NaOH

実験結果

	UniGel ET Removal	競合製品 ET Clean L
サンプル液エンドトキシン含量 (EU/ml)	187	187
流出液エンドトキシン含量 (EU/ml)	16	96
エンドトキシン除去率 (%)	91.40%	48.60%
タンパク質回収率 (%)	99.60%	97.40%

長期保存

媒体を20%エタノールで密閉して保存し、推奨保存温度は2～8℃です。エタノールの蒸発と微生物の繁殖を防ぐため、3か月ごとに20%エタノールを交換することをお勧めします。

注意: 使用過程中、使用するサンプルおよび流動相は必ず0.45 μmのフィルターでろ過してください。

UniGel ET Removal親和性クロマトグラフィー媒体製品仕様書

製名	包装	品番
UniGel ET Removal	30 mL	17009-065100-2030
	50 mL	17009-065100-2050
	100 mL	17009-065100-2100
	300 mL	17009-065100-2300
	500 mL	17009-065100-2500
	1 L	17009-065100-1001
	5 L	17009-065100-1005
	10 L	17009-065100-1010
	50 L	17009-065100-1050
	100 L	17009-065100-1100

注記：7.7 mm × 22 mm、16 mm × 25 mm、7.7 mm × 100 mm のクロマトグラフィー用カラムも提供可能です。その他の規格やカスタム製品については、お問い合わせください。