

UniGel®シリーズイオン交換クロマトグラフィー媒体

製品紹介

イオン交換クロマトグラフィー（Ion Exchange Chromatography）は、生体分子の表面電荷（種類、数、分布）の違いに基づいて異なる生体分子を分離する方法です。Nanomicro社は、単分散均一粒径および多分散粒径の高分子微粒子を基材としたイオン交換クロマトグラフィー媒体を提供しています。これらの媒体は、表面の改質後にイオン交換基を結合し、異なるニーズに応じて多様な製品を提供できます。これにより、捕集、中度純化、精細純化および分析精製などの用途に対応できます。優れた生体分子相容性と化学的安定性を備え、顧客に生体サンプルの実験室での精製から工業化までの全体的な解決策を提供します。

表 1. イオン交換官能基の分類および用途

タイプ	化学構造、略号	主な特長	pKa 値
弱陽イオン交換	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$ (CM)	酸性がやや弱く、 $\text{pH}>4$ の充填液に適用	4~6
強陽イオン交換	$-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$ (SP)	酸性が強く、 $\text{pH}=2-12$ に適用	<2
弱陰イオン交換	$-\text{CH}_2\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$ (DEAE)	塩基性がやや弱く、 $\text{pH}<9$ の充填液に適用	>9
強陰イオン交換	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (Q)	塩基性が非常に強く、 $\text{pH}=2-12$ に適用	>12

UniGel®イオン交換クロマトグラフィー媒体の特長:

- 超高動態結合容量で、一般的に1mlの媒体が105mgの溶菌酵素（陽イオン交換）および90mgのBSA（陰イオン交換）を結合できます。
- 粒径30/50/65/80 μm など、さまざまな粒径のイオン交換媒体を提供し、中程度の純度から高純度までのニーズに応えます。
- 充填材の圧縮係数と膨張係数が低く（球状糖やアガロースゲルよりも低い）、カラムベッドの安定性が高い。
- 高硬度の基材を使用しており、より高い流速と更に高い圧力に耐え、精製効率を向上させます。
- 優れた耐アルカリ性があり、使用寿命を延ばし、生産効率を向上させ、コストを削減できます。

表 2. UniGel® 基本属性データ

名称	UniGel®-30CM	UniGel®-30SP	UniGel®-30DEAE	UniGel®-30Q
分離原理	弱陽イオン交換	強陽イオン交換	弱陰イオン交換	強陰イオン交換
基質	ポリメタクリル酸メチル（PMMA）			
粒径	$\sim 30 \mu\text{m}$			
配基	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	$-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$	$-\text{CH}_2\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
配基密度	$\sim 0.28 \text{ meq/mL}$	$\sim 0.11 \text{ meq/mL}$	$\sim 0.09 \text{ meq/mL}$	$\sim 0.09 \text{ meq/mL}$
動態結合量	$\sim 105 \text{ mg/mL}$ (Lys)	$\sim 115 \text{ mg/mL}$ (Lys)	$\sim 80 \text{ mg/mL}$ (BSA)	$\sim 80 \text{ mg/mL}$ (BSA)
最大耐圧	1.0 MPa			
CIP定置洗浄	1 M NaOH	1 M NaOH	0.5 M NaOH	0.5 M NaOH
推奨流速	50-300 cm/h			
pH 安定性	2~12			
化学安定性	すべての一般的な緩衝液、1M酢酸、1M塩酸、1M NaOH、70% エタノール、30% イソプロパノール、1% SDS、6M塩酸グアニジン、8M尿素などの有機溶媒に安定。強酸化剤との接触は避けること。			
使用温度	4-30 °C			
保存条件	20% エタノール、4-25 °C			

高化学安定性

一般的な使用環境の要件に基づいて設計されており、UniGel®シリーズの高結合容量イオン交換媒体は、0.5 M NaOH溶液中で15日間にわたり、異なる時間点でタンパク質の動態結合量を測定し、その変動安定性を確認した結果、UniGel®シリーズの高結合容量イオン交換媒体は優れた耐アルカリ性と化学的安定性を持っていることが示されました。

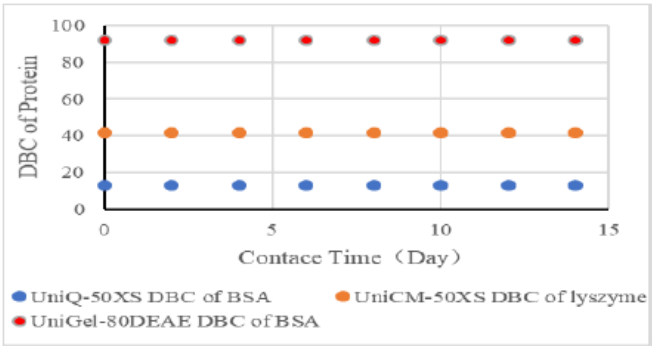


図 2. UniGel®イオン交換クロマトグラフィー媒体の化学的安定性試験結果

高流速下の高動態結合量を実現

独自の表面機能化技術と延長アーム結合設計を採用しているため、UniGel®シリーズイオン交換媒体は、高動態結合量の優位性を持っています。以下の実験では、BSA (2 mg/mL) in 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) をサンプルとし、流速180 cm/hで測定しました。黒色の実線はUniGel®-80 DEAEの動態結合量を示し、赤色の点線は従来のイオン交換媒体の動態結合量を示しています。結果として、UniGel®-80 DEAEの結合容量は従来の媒体と比較して顕著に高いことが示されました。UniGel®シリーズは従来のイオン交換媒体と比較して、同等の条件下でUniGel®-80 DEAEの結合容量が高いことを示しています。

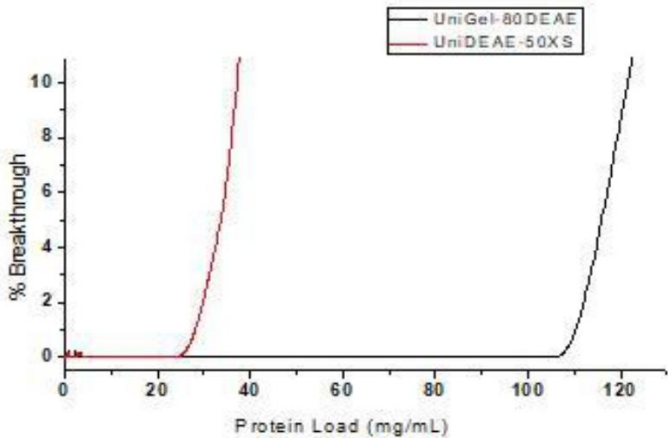


図 3. UniGel®イオン交換クロマトグラフィー媒体の動態結合量測定。

クロマトグラフィーカラムの充填

UniGel®シリーズ製品は20%エタノール中に保存されており、1.5kgのスラリーは1リットルの媒体体積に相当します。充填用のスラリーを充填液として0.1M NaClまたは純水を推奨し、推奨圧縮係数は1.05~1.1です。UniGel®シリーズ製品は高い機械強度を持つ「硬ゲル」であり、低圧カラムや中高压カラムにも適しています。適切なカラムフィルタープレートサイズは10~23µmです。

充填手順は以下の通りです。

1) クロマトグラフィー媒体スラリーの必要質量の計算

必要なスラリー質量 (kg) = 目標カラム体積 (L) × 1.5 kg/L × 1.05

例: 内径40cm、長さ20cmの25Lのカラムを充填するには、スラリー質量は25L × 1.5 kg/L × 1.05 = 約39.375kgとなります。正確にスラリーの容積を計量するには、計量前にスラリー濃度を均一にする必要があります。(プラスチックスプーンや50rpm以下の機械で緩やかに攪拌し、攪拌後は静置時間を10分以内にしてください)。

2) スラリーの準備

充填前に、0.1M NaCl (または純水) を充填液として使用します。以下では、充填液は0.1M NaCl (または純水) のことを指します。

実験室規模の小型カラム (内径<50 mm)

計算した20%エタノールのスラリーをろうとに移し、濾過した後、カラム容量の3倍の充填液を加えます。プラスチック製のスプーンでゆっくり攪拌した後、再度ろ過します。この手順を2回繰り返して、スラリー中の20%エタノールが完全に充填液に置換された後、充填液を追加して、最終的にカラム体積の1.67~2倍にします (スラリー濃度50%~60%)。

大カラム (内径≥50 mm) :

計算した20%エタノールのスラリーを均質化タンクに移し、2時間以上静置して沈降させます。その後、上澄み液を除去し (上澄み液には若干の濁りがある場合があります)、上澄み液と同体積の充填液を追加します。ゆっくり攪拌した後、再度2時間以上静置沈降させ、上澄み液を除去します。この手順を2~3回繰り返して、スラリー中の20%エタノールが完全に充填液に置換された後、充填液を追加して、最終的にカラム体積の1.67~2倍にします (スラリー濃度50%~60%)。

注意: スラリー準備時に、媒体が圧縮や摩擦を受けないよう注意してください。磁気攪拌や圧力式の蠕動ポンプは使用しないでください。機械攪拌の場合、攪拌ブレードが容器の壁に近づきすぎないようにしてください。また、クロマトグラフィー媒体を再充填する場合は、前述のろ過、沈降の手順でスラリーを準備してください。

3) カラム充填

流動充填:

3-1) 上述のスラリーを均一に分散させ、カラムに移します。

3-2) 充填液を移動相として使用し、カラム充填を開始します (カラム充填開始時、流出液に多少の濁りが見られることがあります、1~2カラム体積が流れた後、澄んできます)。

注意: カラム充填を開始する流速が高すぎないようにしてください。

3-3) カラムベッドの高さが安定したら、流速を目標の最高流速 (使用流速の2倍を推奨) または目標の最高圧力 (1.0 MPaを超えないことを推奨) にまで引き上げます。圧力が一定になった後、さらに20分間安定させます。

3-4) ピストンをゲル面の下2~3 mmに調整します。

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 3. UniGel®シリーズ充填イオン交換クロマトグラフィーカラムのカラム効率測定方法。

項目	内容
サンプル	2M NaCl
サンプル量	カラム体積の1～5%
洗脱液	0.5M NaCl
線速度	100cm/h
検出	2M NaCl 上サンプル: 電気伝導率計
合格基準	As: 0.8-1.5; Plates (N/m): >3000

使用方法

1. 平衡: 5CV以上の平衡緩衝液でカラムを平衡させ、流出液の導電率とpHが変わらなくなるまで（平衡液と一致する）、緩衝液としてBuffer A、たとえば20mM PBS, pH7.0を使用します。具体的な緩衝液は、ターゲットタンパク質の安定性や等電点に応じて、イオン交換媒体の種類を選択し最適化してください。
2. サンプルロード: 固体サンプルは平衡液で溶解してください。低濃度サンプル溶液は濃縮し、高濃度サンプル溶液は平衡液で希釈してください。サンプルの流路閉塞を避けるため、サンプルは遠心または膜フィルター処理を行ってください。サンプルロード量は、媒体の結合容量とサンプル中のターゲットタンパク質の含有量に基づいて計算されます。サンプルロード前に、結合容量緩衝液が可能な限り平衡液と一致していることを確認してください。
3. 洗脱: サンプルロードが完了した後、平衡緩衝液でベースラインが安定するまで洗浄を続けます。必要に応じて、塩濃度や流動相のpHを変更して、クロマトグラフィー媒体に吸着されたサンプルを段階的に洗脱します。
4. 再生洗浄（CIP）: 定期的なCIP洗浄は、媒体ベッド内のタンパク質沈殿物や汚染物の蓄積を防止し、クロマトグラフィー媒体の結合容量、分離効果、流動特性などの性能を維持するのに役立ちます。汚染物の種類に応じて、各プロセスに特定のCIP洗浄方法を設計する必要があります。CIP洗浄の頻度は、初期原料液の性質やプロセス条件によります。以下のCIP洗浄方法を推奨します:
- 順次、5CVの1-2M NaCl、5CVの0.5-1M NaOH、3CVの水、次いで5CVの1M酢酸で洗浄します。

保存方法

使用後のクロマトグラフィー媒体やプリパックカラムは、再生が完全に行われた後、20%エタノールまたは10 mM NaOH中で密封保存し、保存温度は4～25℃を推奨します。未使用のクロマトグラフィー媒体やプリパックカラムについては、エタノールの揮発や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推奨します。

トラブルシューティング

UniGel®シリーズイオン交換製品を使用する際に問題が発生した場合は、以下の表を参考にして解決するか、ご連絡ください。

トラブル内容	原因分析	推奨対策
カラム圧力の上昇	流速が高すぎる	流速を下げる
	ポンプと収集器の間のバルブが開いていない	出口を開く
	装置のインラインフィルターが詰まっている	不純物を除去して洗浄する、または交換する。使用前にサンプルと緩衝液を0.45 μmまたは0.2 μmで濾過する。
	ラム前の詰まり	20BVの充填液を使用してカラムを逆流洗浄する
	サンプルがカラム上で沈殿した	定置洗浄を行い、サンプル溶液の濃度を調整する
	サンプルが膨張する、または一部の物質が強く吸着して充填材に残留している	定置洗浄を実施する（再生条件を参照）
	カラムベッドが圧縮された	カラムを再充填する
	カラムの使用時間が長い	カラムまたはカラム充填材を交換する
サンプルの吸着が不十分	サンプル溶液中のイオン強度が高すぎる	サンプル溶液中のイオン強度を低下させる（希釈や脱塩などの手段を使用）
	サンプルのpHが不適切	pHを調整し、結合強度を増加させる
サンプルが洗脱過程で洗脱されない	洗脱液のイオン強度が低すぎる	洗脱液の濃度を増加させる
	洗脱液の洗浄能力が低すぎる	洗浄能力の高い洗脱液に交換する
	洗脱液のpHが不適切	洗脱液のpHを調整する
	カラムに疎水性が強い残留不純物がある場合	定置洗浄を実施する（再生条件を参照）
分離率の低下	洗脱条件が不適切（例：勾配度が急すぎる、流速が高すぎる）	洗脱条件を変更し、より緩やかな勾配洗脱や等度洗脱を採用し、流速を下げる
	カラムが正しく充填されていない	カラムを再充填する
	カラムの上端や下端に大きな混合空間がある	充填材の上表面を増やすか、カラム後部の体積を減らす
	カラムの過負荷	カラムを洗浄し、再び平衡を取り、上サンプル量を減らす
	粒径が大きい	同じタイプでより小さい粒径の充填材に交換する
	選択性の差がある	他のタイプの充填材に交換する
	サンプルのロード回数が増えるとサンプルの吸着能力が低下する	定置洗浄操作を実行する（再生条件を参照）
使用中にカラムベッドに割れ目が発生する	溶液が十分に脱気されていない	0.5MNaClで均一に混合し、充填を平衡させる
	溶液中に気泡がある	圧力を下げて気泡を除去する
	外部空気がシステムに入り込んでいる	より多くの緩衝液を追加し、システム内の気体を完全に除去する
ベースラインの漂移	カラムが十分に平衡されていない	平衡時間を増加させる
	洗脱液A、Bが同一紫外波長で吸収係数が異なる	異なる波長を使用するか、空白基準を設定する
	洗脱液が不純である	高純度のクロマトグラフィーグレード試薬を使用する
不明なノイズピークが現れる	前のサンプルが完全に洗脱されていない	カラムを再生する
	洗脱液が不純である	高純度のクロマトグラフィーグレード試薬を使用する
	微量の疎水性不純物がカラムに結合し平衡やサンプルの適用過程で濃縮され洗脱時にピークとして現れる	カラムを洗浄する
平衡時間が長すぎる	CIP後すぐに再平衡	まず2CVのBuffer B（1M NaClを含む）を使用し、その後Buffer Aで平衡を行います。

UniGel®シリーズイオン交換クロマトグラフィー媒体仕様書

品名	包装	品番	品名	包装	品番
UniGel®-30Q	30mL	04084-030100-2030	UniGel®-30CM	30mL	04081-030100-2030
	50mL	04084-030100-2050		50mL	04081-030100-2050
	100mL	04084-030100-2100		100mL	04081-030100-2100
	300mL	04084-030100-2300		300mL	04081-030100-2300
	500mL	04084-030100-2500		500mL	04081-030100-2500
	1L	04084-030100-1001		1L	04081-030100-1001
	5L	04084-030100-1005		5L	04081-030100-1005
	10L	04084-030100-1010		10L	04081-030100-1010
	50L	04084-030100-1050		50L	04081-030100-1050
	100L	04084-030100-1100		100L	04081-030100-1100
UniGel®-80Q	30mL	04084-080100-2030	UniGel®-80CM	30mL	04081-080100-2030
	50mL	04084-080100-2050		50mL	04081-080100-2050
	100mL	04084-080100-2100		100mL	04081-080100-2100
	300mL	04084-080100-2300		300mL	04081-080100-2300
	500mL	04084-080100-2500		500mL	04081-080100-2500
	1L	04084-080100-1001		1L	04081-080100-1001
	5L	04084-080100-1005		5L	04081-080100-1005
	10L	04084-080100-1010		10L	04081-080100-1010
	50L	04084-080100-1050		50L	04081-080100-1050
	100L	04084-080100-1100		100L	04081-080100-1100
UniGel®-30SP	30mL	04082-030100-2030	UniGel®-30DEAE	30mL	04083-030100-2030
	50mL	04082-030100-2050		50mL	04083-030100-2050
	100mL	04082-030100-2100		100mL	04083-030100-2100
	300mL	04082-030100-2300		300mL	04083-030100-2300
	500mL	04082-030100-2500		500mL	04083-030100-2500
	1L	04082-030100-1001		1L	04083-030100-1001
	5L	04082-030100-1005		5L	04083-030100-1005
	10L	04082-030100-1010		10L	04083-030100-1010
	50L	04082-030100-1050		50L	04083-030100-1050
	100L	04082-030100-1100		100L	04083-030100-1100
UniGel®-80SP	30mL	04082-080100-2030	UniGel®-80DEAE	30mL	04083-080100-2030
	50mL	04082-080100-2050		50mL	04083-080100-2050
	100mL	04082-080100-2100		100mL	04083-080100-2100
	300mL	04082-080100-2300		300mL	04083-080100-2300
	500mL	04082-080100-2500		500mL	04083-080100-2500
	1L	04082-080100-1001		1L	04083-080100-1001
	5L	04082-080100-1005		5L	04083-080100-1005
	10L	04082-080100-1010		10L	04083-080100-1010
	50L	04082-080100-1050		50L	04083-080100-1050
	100L	04082-080100-1100		100L	04083-080100-1100

注: 7.7mm×22mm、16mm×25mm、7.7mm×100mmの標準カラムサイズも提供可能です。その他の規格やご要望については、当社までお問い合わせください。

日本販売三島国際貿易株式会社

〒411-0044 静岡県三島市徳倉三丁目18-5

TEL (055) 988-3590 E-mail: jaina@jaina-msm.com