

Uniシリーズ金属キレート親和性クロマトグラフィー媒体

製品紹介

組換えタンパク質の濃縮と精製には、一般的に既知のサイズのタグを使用し、組換え発現の後、タグと充填材の特異的な相互作用を利用して分離・精製を行います。固定金属イオンまたは金属キレート親和性クロマトグラフィー（MAC）は、タンパク質の特定のアミノ酸（ヒスチジン、システインなど）と、媒体に固定された遷移元素イオン（ Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} など）とのキレート結合を利用して、不溶性タンパク質の分離を実現します。タンパク質と金属イオンの結合能力に影響を与える要因は、主にタンパク質表面の結合可能なアミノ酸（種類、数、および分布）、金属イオンの種類と密度、クロマトグラフィー条件（pH、塩の種類と濃度、添加剤など）です。固定金属イオン親和性媒体は、高い吸着容量、選択性、分離能、再生が容易、コストが低いといった利点があり、生物製薬やバイオ製品の downstream におけるタンパク質、核酸、およびポリペプチドタグの精製に広く使用されています。特にヒスチジンタグ（His-Tag）タンパク質の分離精製に使われています。

固定金属イオン親和性クロマトグラフィー媒体は、多孔性ポリアクリレート基材としており、優れた安定性、生体適合性、および溶媒適合性を備えています。これにより、バイオ医薬品や製品の生物活性を維持し、収率を向上させるだけでなく、クロマトグラフィー条件の選択範囲を広げることが可能です。

UniIDA-80L、UniNTA-80L、UniTED-80Lは、さまざまな遷移金属イオン（ Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} など）をキレートするための媒体であり、使用者は必要に応じて異なる金属イオンをキレートすることができます。また、UniIDA-80Ni、UniNTA-80Ni、UniTED-80Niは、あらかじめ Ni^{2+} をキレートした媒体であり、使用者は金属イオンをキレートする必要なく、直接使用できます。

製品の利点:

- a) 単分散微粒子充填材を採用しており、ロット間の安定性が向上します。
- b) 高い機械強度と低い逆圧により、生産効率が向上し、さまざまなニーズに対応します。
- c) 化学的安定性が高く、適用範囲が広い。低濃度の還元剤や他の添加剤が使用可能です。
- d) プロジェクトの要件に応じて、特定の金属イオンをキレートし、より高い分離精製要求を満たすことができます。
- e) より多様な充填材の仕様があり、顧客に専門的なカスタマイズ製品も提供します。

表 1. UniIDA-80L、UniNTA-80L、UniTED-80L クロマトグラフィー媒体の特性表

項目	UniIDA-80L	UniNTA-80L	UniTED-80L
基材	ポリメタクリル酸メチル (PMMA)		
粒径	80 μm		
配基	IDA	NTA	TED
最大耐圧	0.5 MPa		
CIP（定置洗浄）	0.5 M NaOH		

項目	内容
推奨流速	150-750
pH安定性	2～12
化学的安定性	安定な水溶液、0.1M HCl、0.1M NaOH、2% SDS、30% イソプロパノール、6M 塩酸グアニジン、8M 尿素、70% エタノール (Ni除去条件下)
使用温度	4-30 ℃
保存条件	20% エタノール、4-25 ℃

表 2. UniIDA-80Ni、UniNTA-80Ni、UniTED-80Ni クロマトグラフィー媒体の特性

項目	UniIDA-80Ni	UniNTA-80Ni	UniTED-80Ni
基材	ポリメタクリル酸メチル (PMMA)		
粒径	80 μm		
配基	Ni ²⁺		
最大耐圧	0.5 MPa		
CIP（定置洗浄）	0.5 M NaOH (Ni ²⁺ 除去必須)		
推奨流速	150-750		
pH安定性	2～12		
化学的安定性	安定な水溶液、0.1M HCl、0.1M NaOH、2% SDS、30% イソプロパノール、6M 塩酸グアニジン、8M 尿素、70% エタノール (Ni除去条件下)		
使用温度	4-30 ℃		
保存条件	20% エタノール、4-25 ℃		

クロマトグラフィカラムの充填

Uniシリーズ製品は20%エタノール中に保存されており、1.5 kgのスラリーは1 Lの媒体体積に対応します。カラム充填には、移動相として0.1～0.5 MのNaClまたは純水を推奨し、圧縮係数は1.1を推奨します。Uniシリーズ製品は高い機械強度を持つ「ハードゲル」であり、低圧カラムにも中高圧カラムにも適しています。適切なカラムのフィルタープレートサイズは10～23 μmです。カラム充填の手順は以下の通りです。

1，必要なクロマトグラフィー媒体スラ、リーの質量を計算

必要なスラリーの質量 (kg) = 目標カラム体積 (L) × 1.5 kg/L × 1.1。例えば、内径40 cm、高さ20 cmの25 Lカラムの充填に必要なスラリーの質量は、25 L × 1.5 kg/L × 1.1 = 41.25 kgとなります。クロマトグラフィー媒体の体積を正確に計量する為に、計量前にはスラリーの濃度が均一であることが必要がです（プラスチック製の攪拌棒を使ってゆっくりと混合するか、50 rpm以下の機械攪拌を使用してスラリーを攪拌し、攪拌後は静置時間を10分以内にします）。

2，カラム充填とスラリーの準備

開始前に、0.1～0.5 M NaCl（または純水）の量を十分用意し、これをカラム充填液として使用します。以下では、カラム充填液は0.1～0.5 M NaCl（または純水）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%エタノール媒体の懸濁液をろうとに移し、ろ過した後、媒体の3倍の体積のカラム充填液を加え、プラスチック製のスプーンでゆっくりと攪拌します。その後、再度ろ過します。この手順を2回繰り返して、クロマトグラフィー媒体の懸濁液中の20%エタノールを完全にカラム充填液に置換し、最後にカラム充填液を追加して、目的のカラム体積の1.67～2倍の容量にします（充填濃度を50%～60%にします）。

大型カラム（内径>50 mm）：

計算した20%エタノール媒体の懸濁液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、上澄み液を除去します（上澄み液には若干の濁りが含まれている場合があります）。除去した上澄み液と同じ体積のカラム充填液を加えます。スラリーをゆっくりと攪拌し、再び2時間以上沈降させ、その後、上澄み液を除去します。

上述手順を2〜3回繰り返して、媒体懸濁液を完全にカラム充填液に置換し、最後にカラム充填液を追加して、目的のカラム体積の1.67〜2倍にします（スラリー濃度は50%〜60%にします）。注意：カラム充填用のスラリーを準備する際、媒体が圧縮や摩擦を受けないように注意してください。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、ブレードが容器の壁に近づきすぎないようにして下さい。また、クロマトグラフィー媒体を再充填する必要がある場合も、上記のろ過または沈降の手順に従ってカラム充填用のスラリーを用意する必要があります。

3. カラム充填

流動充填：

- 3-1) 上記の媒体懸濁液を十分にスラリー化し、カラムチューブに移します。
- 3-2) カラム充填液を移動相として使用し、カラム充填を開始します（カラム充填の開始時には、流出液に多少の濁りが見られることがあります。1〜2カラム体積が流れると徐々に澄んできます）。注意：カラム充填の開始時の流速は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、流速を目標最高流速まで引き上げます（使用流速の2倍の流速を推奨します）または圧力を目標最高圧力まで引き上げます（推奨圧力は1.0 MPaを超えない）。圧力が一定になったら、さらに20分間安定させます。
- 3-4) ピストンをゲル面の2〜3ミリメートル下の位置に調整します。

軸方向圧縮充填（内径>300 mm）：

- 3-1) カラムを洗浄し、空気を抜きます。
 - 3-2) スラリータンクとカラムを接続し、カラム内の余分な溶液を排出します。ピストンを下ろし、下部のフィルタープレートから5cmの位置まで下げます。
 - 3-3) 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。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するまで圧縮を続けます。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、1.1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：スラリーの充填時に気泡が入らないようにするため、一般的に充填材の量は120%以上で計算します。

カラム効率の評価

クロマトグラフィーカラムを充填した後、2 CV 0.5M NaClを使用して、60cm/hの流速で平衡を取り、カラム効率のテストを行います。具体的なテストデータは以下の表3. をご参照ください。

表 3. Uniシリーズ充填クロマトグラフィーカラムの柱効率テスト方法

項目	1.0% (v/v) アセトン水溶液	2 M NaCl（水に溶解）
サンプル	1.0%体積	1.0%体積
サンプル体積	1.0%体積	1.0%体積
移動相	水	0.5 M NaCl水溶液
流速	50〜200 cm/h	50〜200 cm/h
検出器	UV 280 nm	電導率計

使用方法

分離・精製の過程での緩衝液選択は、以下の原則に従います。

- a) 生体分子が安定する緩衝液のpH（通常pH7〜8）と塩濃度（通常0.15〜1 M NaCl）を使用します。不安定な緩衝液を使用すると、分離・精製の過程でサンプルが凝集・沈殿し、カラムのフィルタープレートやクロマトグラフィー媒体が詰まり、カラム圧力やサンプルの収率に影響を与えることがあります。
- b) 非特異的な吸着を減少させるため（収率を向上させるため）、通常は緩衝液に0.5 Mの塩（例えばNaCl）を加えます。
- c) 精製純度を向上させるために、サンプルに20 mMのイミダゾールを加えることができます。非標識タンパク質（Hisタグがない場合）では、サンプル緩衝液にイミダゾール添加を推奨しません。

- a) 通常イミダゾールの競合方式を利用してタンパク質を洗脱します。
- b) pHを下げることも洗脱の方法の一つですが、低pHでの洗脱ではキレートされた金属イオンも一緒に洗脱される可能性があります。
- c) サンプルは通常、G-25カラムを使用して緩衝液を平衡緩衝液に置換するか、平衡緩衝液で溶解します。

注：緩衝液中にキレート剤（EDTA、EGTA）や還元剤（β-メルカプトエタノール、DTT、DTE）を含めてはいけません。

●操作手順：

- 1) 平衡：5CV以上の平衡緩衝液でカラムを平衡化します。UV、電導率、pH曲線が安定したらサンプルをロードできます。
- 2) サンプルロード：一般的にタンパク質の結合容量に基づいてサンプルをロードします。クロマトグラフィー媒体の結合容量を超えないようにしてください。
- 3) 洗浄：吸着されなかったサンプルを平衡緩衝液で洗浄します。
- 4) 洗脱：洗脱緩衝液で洗脱します。通常1〜1.5CV。

●最も一般的な緩衝液

Buffer A: 20 mM PB + 0.5 M NaCl、pH 7.4

Buffer B: 20 mM PB + 0.5 M NaCl + 0.5 Mイミダゾール、pH 7.4

●金属イオンの除去手順：

20 mM PB + 0.5 M NaCl + 0.1 M EDTA、pH 7.4 5CV

20 mM PB + 0.5 M NaCl、pH 7.4 5CV

超純水（または脱イオン水）で5CV

20%エタノールで保存

●金属イオンの再生：

超純水（または脱イオン水）5CV

0.1 M NiSO₄ 1〜2CV

超純水（または脱イオン水）5CV

20%エタノールで保存

洗浄と再生

クロマトグラフィー媒体を使用してしばらく経ち、カラム効率が低下したり分離性能が変わった場合、以下の手順で洗浄と再生を行うことができます。

注意：NaOHを使用して洗浄する前に、必ず金属イオンを除去してください。

- 1. 超純水（または脱イオン水）で2 CVを洗浄します。
- 2. 20 mM PB + 0.5 M NaCl + 0.1 M EDTA、pH 7.4で5 CVを洗浄します。
- 3. 20 mM PB + 0.5 M NaCl、pH 7.4で5 CVを洗浄します。
- 4. 超純水（または脱イオン水）で5 CVを洗浄します。
- 5. 1M NaCl で1〜2 CVを洗浄します。
- 6. 0.2〜1M NaOH で1〜2 CVを洗浄します。
- 7. 超純水（または脱イオン水）で5 CVを洗浄します。
- 8. 0.1M NiSO₄ で1〜2 CVを洗浄します。

クロマトグラフィー媒体の長期保存

使用後のUniシリーズクロマトグラフィー媒体は、密閉して20%エタノール中に保存します。エタノールの揮発および微生物の繁殖を防ぐために、3ヶ月ごとに新しい20%エタノールに交換することを推奨します。4〜25℃の環境で保存することがより効果的です。

Uniシリーズ充填クロマトグラフィー媒体仕様書

製品型番	包装容量	品番
UniIDA-80Ni	30 mL	04087-080100-2030
	50 mL	04087-080100-2050
	100 mL	04087-080100-2100
	300 mL	04087-080100-2300
	500 mL	04087-080100-2500
	1 L	04087-080100-1001
	5 L	04087-080100-1005
	10 L	04087-080100-1010
	50 L	04087-080100-1050
	100 L	04087-080100-1100
UniNTA-80Ni	30 mL	04088-080100-2030
	50 mL	04088-080100-2050
	100 mL	04088-080100-2100
	300 mL	04088-080100-2300
	500 mL	04088-080100-2500
	1 L	04088-080100-1001
	5 L	04088-080100-1005
	10 L	04088-080100-1010
	50 L	04088-080100-1050
UniTED-80Ni	30 mL	04089-080100-2030
	50 mL	04089-080100-2050
	100 mL	04089-080100-2100
	300 mL	04089-080100-2300
	500 mL	04089-080100-2500
	1 L	04089-080100-1001
	5 L	04089-080100-1005
	10 L	04089-080100-1010
	50 L	04089-080100-1050
	100 L	04089-080100-1100

製品型番	包装容量	品番
UniIDA-80L	30 mL	04085-080100-2030
	50 mL	04085-080100-2050
	100 mL	04085-080100-2100
	300 mL	04085-080100-2300
	500 mL	04085-080100-2500
	1 L	04085-080100-1001
	5 L	04085-080100-1005
	10 L	04085-080100-1010
	50 L	04085-080100-1050
	100 L	04085-080100-1100
UniNTA-80L	30 mL	04086-080100-2030
	50 mL	04086-080100-2050
	100 mL	04086-080100-2100
	300 mL	04086-080100-2300
	500 mL	04086-080100-2500
	1 L	04086-080100-1001
	5 L	04086-080100-1005
	10 L	04086-080100-1010
	50 L	04086-080100-1050
	100 L	04086-080100-1100
UniTED-80L	30 mL	04090-080100-2030
	50 mL	04090-080100-2050
	100 mL	04090-080100-2100
	300 mL	04090-080100-2300
	500 mL	04090-080100-2500
	1 L	04090-080100-1001
	5 L	04090-080100-1005
	10 L	04090-080100-1010
	50 L	04090-080100-1050
	100 L	04090-080100-1100

注：7.7 mm × 22 mm、16 mm × 25 mm、7.7 mm × 100 mmのカラムを提供できます。その他の規格やカスタマイズのニーズについては、お問い合わせください。