

Uni®イオン交換クロマトグラフィー媒体

製品紹介

イオン交換は、分子表面の電荷（種類、数、分布）の違いに基づいて異なる物質を分離する方法であり、生体高分子の分離・精製に最も一般的に使用される手法です。弊社が提供するイオン交換クロマトグラフィー媒体は、ポリマー（ポリアクリレートまたはポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体）を基材としており、この基材は表面親水改性を経てイオン交換基を結合しています。これにより、生物活性高分子に対する優れた生体適合性と物理化学的安定性を兼ね備え、精製効率を大幅に向上させます。弊社のUni®およびUni®MSPシリーズのイオン交換製品は、小分子タンパク質、ペプチド、核酸、抗生物質などの分子量が小さい生体分子の精製に適しています。

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	主な特長	pKa値
弱陽イオン交換	-CH ₂ COO ⁻ (CM)	酸性がやや弱く、pH>4の移動相に適用	4~6
強陽イオン交換	-(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻ (SP)	酸性が強く、pH=2-12に適用	<1
弱陰イオン交換	-CH ₂ NH ⁺ (CH ₃) ₂ (DEAE)	塩基性がやや弱く、pH<9の移動相に適用	<9
強陰イオン交換	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	塩基性が非常に強く、pH=2-12に適用	>12

- 注:
1. 移動相のpHは、pI（等電点）とpKaの間に設定する必要があります。
 2. 移動相のpHは、分離対象サンプルの等電点と少なくとも1.0pH以上の差を持つ必要があります。
 3. pH3.0の場合は強陽イオン交換媒体を選択し、pH10.0の場合は強陰イオン交換媒体を選択するのが適しています。

表2. イオン交換クロマトグラフィー媒体の基本特性一覧表

製品シリーズ	Uni®シリーズ	Uni®MSPシリーズ
分離原理	イオン交換	複合モード
基質	単分散ポリスチレン酸酯	単分散ポリスチレン酸酯
動態結合容量	15-60 (mg/mL)	65-70 (mg/mL)
孔径	300, 500Å	300Å
微球サイズ	30, 50 μm	30, 50 μm
純化段階	捕獲、中程度の純化	捕獲、中程度の純化
主な特徴	親水膜表面改性、低非特異的吸着、小孔径で高い分離率を持ち、小分子に対する高い結合容量を持つ。	多機能イオン交換介質で、疎水性およびイオン交換作用を兼ね備え、選択性と分離率が高く、高塩濃度条件で使用可能。
典型的な応用	小分子タンパク質、ペプチド、核酸、抗生物質など分子量が小さい生体分子の精製に適している。	高塩濃度に耐性があり、Uni®シリーズとは異なる選択性を持つ。

表3. Uni®およびUni™MSPシリーズ製品の技術仕様一覧表

製品名	イオン交換タイプ	粒径(μm)	孔径(Å)	最大耐圧(MPa)	推奨流速範囲(cm/h)	pH*1安定範囲	動態吸附量(mg/mLgel)*2	全交換量(meq/mLgel)
Uni®シリーズ小分子純化向け選択								
UniCM®-30S	弱陽イオン交換	36	500	1	50-300	2~12	~60	~0.23
UniSP®-30S	強陽イオン交換	36	500	1	50-300	2~12	~60	~0.23
UniDEAE®-30S	弱陰イオン交換	36	500	1	50-300	2~12	~55	~0.23
UniQ®-30S	強陰イオン交換	36	500	1	50-300	2~12	~35	~0.23
UniCM®-50XS	弱陽イオン交換	55	300	0.8	100-500	2~12	~60	~0.23
UniSP®-50XS	強陽イオン交換	55	300	0.8	100-500	2~12	~55	~0.23
UniDEAE®-50XS	弱陰イオン交換	55	300	0.8	100-500	2~12	~55	~0.23
UniQ®-50XS	強陰イオン交換	55	300	0.8	100-500	2~12	~15	~0.20

Uni®MSPシリーズ疎水イオン交換作用を持ち、耐塩性が高く、Uni®シリーズとは異なる選択性

UniMSP-30XS	強陽イオン交換	33	300	1	50-300	2~12	~70	~0.25
UniMSP-50XS	強陽イオン交換	50	300	0.8	100-500	2~12	~65	~0.20

注:

*1. pH安定範囲は、使用するpI区間に基づく

*2. 動態吸着量は酵素リゾチームを使用した場合に測定され、牛血清アルブミン(BSA)を使用した場合に明示される

操作手順:

カラム充填

スラリーの濃度は、クロマトグラフィー媒体が沈降した後の体積とスラリー全体の体積の比率を指します。最適なイオン交換クロマトグラフィー媒体のカラム充填効果を得るために、スラリー濃度を50~70%にすることを推奨します。具体的なカラム充填方法は以下の通りです。

1) まず、充填するカラムの体積Vcを計算します。

$$Vc = h \times \pi r^2 *$$

Vc: カラム体積、h: カラムの高さ、r: カラムの半径。

2) イオン交換クロマトグラフィー媒体を元の容器内で静かに攪拌し、媒体が液体に完全に分散してスラリーを作ります。必要な原液の体積を計量します。

*一般的に、イオン交換クロマトグラフィー媒体は圧力がかかると圧縮され、体積が縮小します。緻密なカラムベッドを得るために、充填材の体積をカラム体積の約1.1倍にすることを推奨します。

3) 20%のエタノールを添加し、スラリーの濃度を50%~70%に調整します。

4) スラリーを全部カラムに注ぎ、圧縮係数1.05~1.1でカラム充填を行います。まず低流速で定流量の充填を行い、その後高流速で定圧充填を行うことを推奨します。

カラム効率評価

カラムが充填された後、流速50~200cm/hで移動相を用いて平衡させ、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表4を参照してください。

表4. イオン交換クロマトグラフィーカラムのカラム効率テスト

サンプル	5%(v/v)ピリジン水溶液/2MNaCl
サンプル量	0.5-2%カラム体積
移動相	脱イオン水/0.5MNaCl
線形流速	50~200cm/h
検出	5%ピリジン: UV@280nm
	2MNaCl: 導電率計

洗浄

充填されたカラムは、少なくとも5BVの脱イオン水で洗浄する必要があります。

平衡

カラムは、少なくとも5BVの平衡緩衝液で平衡させ、流出液の導電率とpHが一定になるまで

(平衡液と一致するまで)行います。平衡緩衝液の例としてはBufferA(例: 20mMPBS, pH=7.0)などがあります。具体的な緩衝液の選択と最適化は、目的タンパク質の安定性や等電点、イオン交換媒体の種類に基づいて行います。

サンプルロード

固体サンプルは、平衡液で溶解して調製します。低濃度のサンプル溶液は予め濃縮し、高濃度のサンプル溶液は平衡液で希釈します。カラムの詰まりを防ぐために、サンプルは遠心分離または膜フィルター処理を行います。サンプル量は、媒体の結合容量とサンプル中の目的タンパク質の含有量に基づいて計算し、サンプルロード前に結合容量の緩衝液が平衡液と一致するようにします。

洗脱

サンプルロード後、平衡緩衝液で洗浄を続け、ベースラインが安定するまで行います。必要に応じて、塩濃度を下げるか、移動相のpHを変更することで、クロマトグラフィー媒体に吸着したサンプルを順次洗脱します。

再生

各クロマトグラフィー操作後に、0.5-2MNaClでカラムを洗浄し、クロマトグラフィー媒体に強く結合しているタンパク質を除去します。

定置洗浄

カラムの性能を維持するために、再生過程でタンパク質や他の不純物が効果的に除去されなかった場合、定置洗浄手順を実行できます。定置洗浄では、逆流洗浄も採用できます。具体的な手順は以下の通りです。

(1) イオン結合が強すぎるタンパク質に対しては、2MNaClで3BV以上の洗浄を行い、その後3BV以上の脱イオン水で洗浄します。

(2) 沈殿タンパク質や疎水性結合タンパク質、リポタンパク質に対しては、0.2~0.5MNaOHで洗浄します(クロマトグラフィー媒体との接触時間は1~2時間)。その後、5BV以上の平衡液と3BV以上の脱イオン水で洗浄します。

(3) 強い疎水性結合を持つタンパク質、リポタンパク質、および脂質に対しては、5BV以上の50%エタノールまたは30%イソプロパノールで洗浄します(クロマトグラフィー媒体との接触時間は0.5~1時間)。その後、5BV以上の脱イオン水で洗浄します。また、非イオン性界面活性剤を含むアルカリ性または酸性溶液を使用して洗浄することも可能です。例えば、0.1~0.5%のTritonX-100と0.1M酢酸を含む溶液で1~2時間洗浄し、その後5BV以上の50%エタノールで洗浄して界面活性剤を除去し、最後に5BV以上の純水で洗浄します(高濃度の有機溶剤を使用する場合、気泡の発生を避けるため、有機溶剤の濃度を徐々に上げるようにしてください)。

保管

未使用のクロマトグラフィー媒体は、4~25℃の20%エタノール溶液中で密封して保管します。使用済みのクロマトグラフィー媒体は、再生および洗浄した後、20%エタノール中で密封保管します。

トラブルシューティング

Uni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の移動相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 カラムの使用時間が長い	カラムを再充填する 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	サンプル中の不純物が充填材に結合し、正常 な結合を妨げている	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

Uni®イオン交換クロマトグラフィー媒体仕様書

製品名	包装規格	在庫コード	製品名	包装規格	在庫コード	
UniCM®-30S	30mL	04021-030050-2030	UniQ®-50XS	500mL	04024-050030-2500	
	100mL	04021-030050-2100		1L	04024-050030-1001	
	500mL	04021-030050-2500		5L	04024-050030-1005	
	1L	04021-030050-1001		10L	04024-050030-1010	
	5L	04021-030050-1005		50L	04024-050030-1050	
	10L	04021-030050-1010		100L	04024-050030-1100	
	50L	04021-030050-1050		UniCM®-50XS	30mL	04021-050030-2030
	100L	04021-030050-1100			100mL	04021-050030-2100
UniSP®-30S	30mL	04022-030050-2030	500mL		04021-050030-2500	
	100mL	04022-030050-2100	1L		04021-050030-1001	
	500mL	04022-030050-2500	5L		04021-050030-1005	
	1L	04022-030050-1001	10L		04021-050030-1010	
	5L	04022-030050-1005	50L		04021-050030-1050	
	10L	04022-030050-1010	100L		04021-050030-1100	
	50L	04022-030050-1050	UniSP®-50XS	30mL	04022-050030-2030	
	100L	04022-030050-1100		100mL	04022-050030-2100	
UniDEAE®-30S	30mL	04023-030050-2030		1L	04022-050030-1001	
	100mL	04023-030050-2100		10L	04022-050030-1010	
	500mL	04023-030050-2500		100L	04022-050030-1100	
	1L	04023-030050-1001		UniDEAE®-50XS	30mL	04023-050030-2030
	5L	04023-030050-1005			100mL	04023-050030-2100
	10L	04023-030050-1010			1L	04023-050030-1001
	50L	04023-030050-1050	10L		04023-050030-1010	
	100L	04023-030050-1100	100L		04023-050030-1100	
UniQ®-30S	30mL	04024-030050-2030	UniMSP-30XS		30mL	04012-030030-2030
	100mL	04024-030050-2100			100mL	04012-030030-2100
	500mL	04024-030050-2500			1L	04012-030030-1001
	1L	04024-030050-1001		10L	04012-030030-1010	
	5L	04024-030050-1005		100L	04012-030030-1100	
	10L	04024-030050-1010		UniMSP-50XS	30mL	04012-050030-2030
	50L	04024-030050-1050			100mL	04012-050030-2100
	100L	04024-030050-1100			1L	04012-050030-1001
UniQ®-50XS	30mL	04024-050030-2030	10L		04012-050030-1010	
	100mL	04024-050030-2100	100L		04012-050030-1100	

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