

NM90Agarose複合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、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手法であり、生体高分子の分離と精製に最もよく使用される方法です。NM90Agarose複合イオン交換シリーズは、高架橋アガロース微粒子を採用しており、微粒子にはさまざまな機能性イオン基が結合されており、従来のイオン交換クロマトグラフィー媒体とは異なる選択性を持っています。

表1. NM90Agarose複合クロマトグラフィー媒体技術仕様

品名	NM90Agarose HCM	NM90Agarose HAM
分離原理	複合弱陽イオン交換	複合強陰イオン交換
基質	アガロース	
粒径	90 μ m	
配位基	フェニル/カルボキシ基	フェニル/第四級アンモニウム塩
動的結合容量	~50 mg/mL (リジン)	~30 mg/mL (BSA)
最大耐圧	0.3MPa	
CIP定置洗浄	1M NaOH	
推奨流速	150-250cm/h	
pH安定性	2~12	
化学的安定性	一般的緩衝液、1M酢酸、1M水酸化ナトリウム、1M塩酸、70%エタノール、30%イソプロパノール、30%アセトニトリル、1% SDS、6M塩酸グアニジン、8M尿素など。強酸化剤の接触を避けること。	
使用温度	4~30 $^{\circ}$ C	

クロマトグラフィーカラムの充填手順

NM90Agarose製品は、20%エタノールに保存されています。1.5kgのスラリーは、1Lの媒体体積に相当します。カラム充填に使用するスラリーの推奨移動相は、0.1M NaClまたは純水であり、推奨充填係数は1.15~1.2です。NM90Agarose製品は高機械強度を持つ「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。適切なカラムフィルタープレートのサイズは10~23 μ mで、充填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する

必要なスラリーの質量 (kg) = 目標カラム体積 (L) \times 1.5 kg/L \times 1.15。

例えば、内径40cm \times 高さ20cmのカラム (25L) に充填する場合、必要なスラリーの質量は次のように計算されます。25L \times 1.5 kg/L \times 1.15 = 43.125 kg。

クロマトグラフィー媒体の体積を正確に計量するために、スラリーの濃度が均一であることが必要で、プラスチック製のスプーンでゆっくりと混ぜるか、50rpm以下の機械攪拌を使用します。スラリーの攪拌後、静置時間は10分以内にしてください。

2) カラム充填用スラリーの準備

充填を開始する前に、0.1M NaClまたは純水を十分に用意して充填液として使用します。以下では、充填液を「0.1M NaCl (または純水)」と指します。

実験室規模の小型カラム（内径 $\leq 50\text{mm}$ ）

計算された20%エタノールのスラリーをろ過漏斗に移し、ろ過後、スラリーの3倍の体積の充填液を加えて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、再びろ過します。この手順を2回繰り返して、スラリー中の20%エタノールを充填液に完全に置換し、最後に充填液を追加して、目標カラム体積の1.67~2倍の容量にします（スラリー濃度は50~60%にします）。

大規模カラム（内径 $> 50\text{mm}$ ）：

1. 計算された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、上澄み液を除去します（上澄み液には多少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時間以上静置して沈降させた後、再度上澄み液を除去します。

2. この手順を2~3回繰り返して、スラリー中のエタノールを完全に充填液に置換し、最後に充填液を追加して、目標カラム体積の1.67~2倍の容量にします（スラリー濃度は50~60%にします）。注意：カラム充填用スラリーの準備中は、できる限りクロマトグラフィー媒体に過度な圧力や摩擦をか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せず、機械攪拌時には攪拌翼が容器の壁に過度に近づかないようにする必要があります。また、クロマトグラフィー媒体を再充填する場合も、同様のろ過または沈降手順に従ってスラリーを準備してください。

3) カラム充填手順：

流動充填：

3-1) カラム充填用のスラリーを十分に均質化し、カラムチューブに移します。

3-2) 充填液を流動相として使用し、充填を開始します。充填開始時には、流出液が若干濁って見える場合がありますが、1~2カラム体積の充填後には次第に透明になります。

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。

3-3) カラムベッドの高さが安定したら、流速を目標最高流速に引き上げます（推奨最高流速は使用流速の2倍）または圧力を目標最高圧力に引き上げます（推奨圧力は1.0MPa以下）。圧力が一定になった後、さらに20分間安定させます。

3-4) カラム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て終了です。

軸方向に圧縮する充填手順（カラム内径 $> 300\text{mm}$ の場合）

3-1) カラムを清掃し、排気を行います。

3-2) 均質化タンクとカラムを接続し、カラム内の余分な液体を排除した後、ピストンを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) 給液バルブを開いてピストンを上昇させ、充填液を吸引します。吸引速度は200~300cm/h。スラリーの濃度に応じて吸引する量を決定し、ピストンの移動距離を計算します。給液バルブを閉じた後、ピストンを下降させてカラムを圧縮し、圧縮速度は60~100cm/hに調整します。充填材が完全に沈降し、カラムベッドの高さが増加しなくなったらピストンの移動を停止し、カラムベッドの高さを測定します。1.05の圧縮比に基づいて、最終的なピストンの位置を計算します。

注意：スラリーの吸引時に気泡が入るのを防ぐため、通常は120%以上の量の充填材を計算して準備します。

表3. NM90Agaroseイオン交換クロマトグラフィー媒体のカラム効率テスト方法

項目	テスト条件
サンプル	2M NaCl
サンプル量	1~5% カラム体積
洗脱液	0.5M NaCl
線形流速	100 cm/h
検出	2M NaCl サンプル：電導検出器
合格基準	As（ピーク対称性）：0.8-1.5、プレート数（N/m）： > 3000

使用方法

1. 平衡

5カラムボリューム以上の平衡緩衝液でカラムを平衡させ、流出液の電導率とpHが変わらず平衡液と一致するまで待ちます。緩衝液はBuffer A (例:20 mMリン酸緩衝液 (PB), pH7.0) を使用しますが、具体的な緩衝系は、対象タンパク質の安定性、等電点、使用するイオン交換媒体の種類に応じてスクリーニングし、最適化する必要があります。

2. サンプルロード

固体サンプルは平衡液で溶解して準備します。低濃度のサンプルは前もって濃縮し、高濃度のサンプルは平衡液で希釈します。カラムの詰まりを防ぐため、サンプルは遠心分離または膜ろ過で処理します。サンプルのロード量は、媒体のキャパシティーとサンプル中の目標タンパク質の含有量に基づいて計算します。サンプルロード前に、キャパシティー緩衝液が平衡液とできる限り一致していることを確認します。

3. 洗脱

サンプルロードが完了した後、平衡緩衝液を使用してベースラインが安定するまでカラムを洗浄します。必要に応じて、塩濃度や移動相のpHを変更することで、カラム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 (定置洗浄) は、カラム内のタンパク質沈殿や汚染物質の蓄積を防ぎ、カラムのキャパシティー、分離性能、流動特性を維持するのに役立ちます。存在する汚染物質の種類に応じて、それぞれのプロセスに特定のCIP方法を設計します。CIPの頻度は、開始原料の性質とプロセス条件に依存します。推奨されるCIP方法は以下の通りです。

1-2M NaClを5カラムボリューム、0.5-1M NaOHを5カラムボリューム、3カラムボリュームの水、1M酢酸を5カラムボリュームの順で洗浄します。

保存方法

使用後のクロマトグラフィー媒体やプレパックカラムは、完全に再生した後、20%エタノール中で密封して保存します。保存温度は4~25°Cを推奨します。未使用のクロマトグラフィー媒体やプレパックカラムについては、エタノールの蒸発と微生物の繁殖を防ぐため、3ヶ月ごとに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

NM90Agarose複合イオン交換クロマトグラフィー製品を使用中に問題が発生した場合は、以下の表を参照して対処するか、お問い合わせください。

現象	原因分析	提案対策
カラム圧力が高い	流速が高すぎる	流速を下げる
	ポンプとコレクター間のバルブが開いていない	バルブを開ける
	装置のオンラインフィルターが詰まっている	不純物を除去して清浄、フィルターを交換。使用前にサンプルとバッファを0.45 μmまたは0.2 μmでろ過する
	サンプルがカラム内で沈殿している	在位清浄を実行する（再生条件を参照）
	サンプルや強い吸着性の物質が充填材に残留している	在位清浄を実行する（再生条件を参照）
	カラムベッドが圧縮されている	カラムを再充填する
	カラムの使用期間が長い	カラムまたは充填材を交換する
サンプルが十分に吸着されない	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下げるために、希釈や脱塩などの手段を使用します。
	サンプルのpHが適切でない	pHを調整し、吸着強度を増やす
サンプルが洗脱されない	洗脱液の洗脱能力が低すぎる	より強力な洗脱液を使用する
	洗脱液のpHが適切でない	洗脱液のpHを調整する
	カラムに疎水性が強い不純物が残っている	在位清浄を実行する（再生条件を参照）
分離能が低下する	不適切な洗脱条件（例：グラジエントが急すぎる、流速が高すぎる）	洗脱条件を変更し、緩やかなグラジエントまたは等度洗脱を使用し、流速を下げる
	カラムが適切に充填されていない	カラムを再充填する
	カラムの上部または下部に多くの混合スペースがある	充填材の表面を追加するか、カラムの後部体積を減少させる
	カラムが過負荷状態になっている	カラムを清浄して再平衡し、サンプル負荷を減らす
注入回数が多い場合、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吸着し、正常な吸着を妨げている	定置洗浄を実行する（再生条件を参照）
使用中、カラムベッドにひび割れが発生する	膨潤が不十分	0.5 M NaClで均一に混合し、十分に平衡させる
	溶液に気泡が入っている	減圧ろ過で脱気する
	外部から空気がシステムに入り込んでいる	さらにバッファを加えて空気を取り除く
	充填品質が悪い	カラムを再充填する
ベースラインが漂う	カラムが十分に平衡されていない	平衡時間を増やす
	洗脱液AとBの紫外線吸収係数が異なる	別の波長を使用するか、サンプルのない空白グラジエントを実行する
不明なピークが出現する	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
	洗脱液が不純物を含んでいる	空白グラジエントを実行するか、高純度の試薬を使用する
	痕跡量のイオン性不純物がカラムに吸着し、平衡とサンプル注入中に濃縮され、洗脱時にピークが現れる	カラムを清浄する
平衡時間が長すぎる	CIP後にすぐ平衡を行った	2CVのBuffer B（1M NaCl含有）を使用し、続いてBuffer Aで平衡する

NM90Agarose複合イオン交換クロマトグラフィー媒体製品仕様書

品名	包装	品番
NM90Agarose HCM	30 mL	04091-090001-2030
	50 mL	04091-090001-2050
	100 mL	04091-090001-2100
	300 mL	04091-090001-2300
	500 mL	04091-090001-2500
	1 L	04091-090001-1001
	5 L	04091-090001-1005
	10 L	04091-090001-1010
	50 L	04091-090001-1050
	100 L	04091-090001-1100
NM90Agarose HAM	30 mL	04092-090001-2030
	50 mL	04092-090001-2050
	100 mL	04092-090001-2100
	300 mL	04092-090001-2300
	500 mL	04092-090001-2500
	1 L	04092-090001-1001
	5 L	04092-090001-1005
	10 L	04092-090001-1010
	50 L	04092-090001-1050
	100 L	04092-090001-1100

注：7.7 mm x 22 mm、16 mm x 25 mm、7.7 mm x 100 mmのクロマトグラフィー事前充填カラムも提供可能です。その他のサイズやカスタマイズのご要望については、お問い合わせください。