

NW DexG-25シリーズのデキストランゲルクロマトグラフィー媒体

製品紹介

NW DexG-25シリーズのデキストランゲルは、生体分子の分離と精製に使用されるクロマトグラフィー媒体です。このゲルはデキストランを原料としており、架橋剤によって生成されたデキストラン微粒子で、親水性、多孔性の特性を持っています。主にウイルス、タンパク質、多糖、核酸などの生物サンプルのバッファー交換、脱塩、小分子物質の除去に使用されるほか、ペプチド、オリゴヌクレオチドの分離精製や、抗生物質、化学合成薬、天然物の分離精製にも使用されます。また、化学工業におけるナノ材料の精製や、環境保護分野の汚水処理にも利用されています。

NW DexG-25の分離・精製の原理は分子ふるい（分子篩）原理、もしくはゲル濾過原理に基づいており、これは最も簡単で穏やかなクロマトグラフィー技術です。この分子篩原理は主に次の2つの分野で使用されます。

1. 成分分離:

分子の大きさの違いによって、試料を大分子群と小分子群に分け、分離を行います。例えば、タンパク質分子と塩分子、大型ウイルス粒子と小分子汚染物質を分離することができます。主にウイルス分離、脱塩、バッファー交換に使用されます。

2. 高分解能分離:

生体分子の大きさの違いに基づいて分離を行います。高分解能分離では、サンプルを一つまたは複数の成分に分離できます。例えば、凝集体から単量体を分離したり、単量体分子から凝集体を除去したり、分子量や分子量分布の解析を行います。注意点として、天然のタンパク質には空間構造があるため、場合によってはタンパク質の分子量と天然構造のサイズが一致しないことがあります。つまり、一部の大きな分子の天然構造を持つタンパク質は、凝集体に比べて分子量が小さな線形分子よりも小さい挙動を示すことがあります。

非ゲルろ過分離（吸着）では、芳香族の小分子（プリン、ピリジンなど）が低イオン濃度下でイオン吸着を起こす場合があります。

もう一方の用途としては、特定の条件下で緩衝液条件を調整することにより、非ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて変性タンパク質の再フォールディングを行うことができます。

NW Dex G-25の最も一般的な用途は、脱塩や緩衝液交換です。

NW Dex G-25は、ゲルの粒子サイズに応じて以下の4種類に分類されます。

- NW Dex G-25C（粗粒子）
- NW Dex G-25M（中粒子）
- NW Dex G-25F（細粒子）
- NW Dex G-25 SF（超細粒子）

NW Dex G-25シリーズのデキストランクロマトグラフィー媒体の技術仕様

製品名	NW Dex G-25 C	NW Dex G-25 M	NW Dex G-25 F	NW Dex G-25 SF
分離原理	分子篩			
基質	デキストラン微粒子			
平均粒径(水溶膨潤)	320 μm	140 μm	80 μm	50 μm
分離範囲(線性分子)	$1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4 \text{D}$			
分離範囲(球状分子)	$1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3 \text{D}$			
最大流速	1400 cm/h	640 cm/h	360 cm/h	80 cm/h
耐圧	0.5 MPa			
pH安定性	2~13			
化学安定性	水溶性溶液、1M NaOH、6M 塩酸グアニジン、30% イソプロパノール、70% エタノール			
使用温度	4~40° C			
保管条件	20% エタノール、4~30° C			

使用前の準備作業

1. 推奨されるクロマトグラフィーカラムのタイプ:

適用分野に基づいてカラムを選択します。

- 1) 成分分離: 一般的にはカラムの高さ30cm程度のものを選択
- 2) 高分解能分離: 一般的にはカラムの高さ60cm以上のものを選択
- 3) 非ゲルろ過分離 (吸着分離): 実験室の小規模な試験に基づいて決定します。プロセスのスケールアップ設計では、一般的にカラムの高さは一定で、カラムの直径を大きくします。

2. NW Dex G-25 デキストランクロマトグラフィー媒体の取り扱い

2.1 カラムの体積に基づいて必要なNW Dex G-25乾燥粉の量を計算します。

カラムの体積 = カラムの底面積 × カラムの高さ

乾燥粉の量 (g) = カラム体積 × 1.15 ÷ 4.5

1.15はカラム媒体の圧縮比、4.5は媒体の膨潤係数です。計量したゲル媒体を容器に入れ、乾燥粉の5倍の重量の80~100℃の0.1M NaClを加えてよく混ぜます。80~100℃で保持し、ゲルを1時間膨潤させます。室温での膨潤の場合は、少なくとも4時間以上、または一晩膨潤させます。または、混ぜた後にオートクレーブで121℃、20分間の滅菌処理を行うことも可能です。

注意事項:

- a) 電気炉や磁気炉で80~100℃を維持する際は、底部の局部温度が高くなりすぎないように、ゆっくりと攪拌してください。高温によりゲルが損傷するのを防ぎます。また、ゲルの膨潤中に磁気攪拌子を使用しないでください。磁気攪拌子は媒体の粒子を破損させる可能性があります。
- b) 常温で膨潤させた後は、負圧下で脱気するのが望ましいです。膨潤が完了した後 (高温膨潤の場合は室温に冷却してから)、上層の清液の一部を取り除き、沈殿したゲルの体積が全体の50%~75%になるように調整し、均一に攪拌して準備します。
- c) ゲルの温度が高すぎると、カラム充填時にクロマトグラフィーカラムが損傷する可能性があります。

クロマトグラフィーカラムの充填

1. 各メーカーのクロマトグラフィーカラム使用マニュアルを参照してください (異なるメーカーによってカラムの使用方法が異なり、誤った操作はカラムやクロマトグラフィー媒体を損傷する可能性があります)。
2. 充填用の緩衝液として、一般的に脱イオン水または平衡緩衝液を使用します。
3. クロマトグラフィーカラムの水平を調整します。
4. カラムの底膜の空気を抜き、カラムの底部に1cm程度の緩衝液を保持します。
5. 充填器を設置します。一般的にカラムの充填高さが全体の2/3以上になる場合、充填器の設置が必要です。
6. 均一に混ぜたゲル懸濁液を一度にゆっくりとカラムに注ぎ入れ、気泡が入らないように注意します。注入後、攪拌棒で再度均一にかき混ぜます。
7. クロマトグラフィーカラムのカラムヘッドを接続し、カラムヘッドとシステムや蠕動ポンプの間に圧力計を取り付けます (工業規模のクロマトグラフィーカラムに必要です)。カラムヘッドの膜の空気を抜きます。
8. カラムヘッドをカラムに挿入し、カラムヘッドの底膜が液面に接触するようにし、液面とカラムヘッド膜の間にある気泡を取り除きます。
9. システムまたは蠕動ポンプを接続し、流速を調整します。圧力は3バールを超えないように制御してください。流体の流れに伴い、クロマトグラフィー媒体の界面が徐々に下がります。クロマトグラフィー媒体の界面が安定したら (30分以内に界面がこれ以上下がらない場合)、界面の位置をマーキングします。
10. ポンプを停止し、充填器を取り外します (必要に応じて)。
11. カラムヘッドをクロマトグラフィー媒体の界面 (マーキング位置より0.5cm下) まで下げます。
12. ポンプを停止前の流速で再度稼働し、20~30分間クロマトグラフィー媒体を圧縮します。クロマトグラフィー媒体の界面が安定すれば、充填作業が完了です。

推奨カラム充填流速

(実際の流速はクロマトグラフィシステムおよびカラムに基づいて決定)

製品名	G-25C	G-25M	G-25F	G-25SF
推奨流速 (cm/h)	450	300	150	100

カラム効率評価

1. カラム効率の測定

アセトンまたはNaClを指示薬として使用することができます。以下の表に従って指示薬溶液および移動相を調製します。

サンプル	1.0% (v/v) アセトン水溶液	2M NaCl (水に溶解)
サンプル体積	カラム体積の1.0%	カラム体積の1.0%
移動相	水	0.4M NaCl水溶液
流速	30cm/h	30cm/h
検出器	UV 280 nm	電導率

2. カラム効率の計算

UVまたは電導率の曲線に基づいて、理論塔板高さ (HETP)、理論塔板数 (N)、および非対称因子 (As) を計算します。公式は以下の通りです。

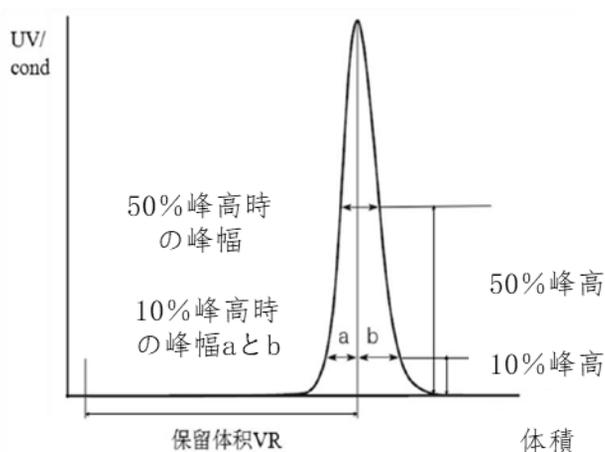
$$\bullet \text{HETP} = L/N$$

$$\bullet N = 5.54 \times (VR/Wh)^2$$

VR=保留体積 (RetainedVolume)、Wh=半峰幅、L=カラムの高さ、N=理論塔板数
VRとWhの単位は一致させる必要があります。

$$As = b/a$$

a=10%ピーク高における第1半峰幅、b=10%ピーク高における第2半峰幅



3. 結果の評価:

上記の公式で計算されたHETPの値が、膨潤後の媒体の平均粒子サイズの3倍以下であり、かつ非対称因子が0.8~1.3の範囲内であれば、合格と判定されます。不適切なカラム効率の場合は、原因を分析してカラムを再充填する必要があります。

異なる用途に応じて、必要なカラム効率は異なります。

高分解能分離の場合、カラム効率の要求は高く、HETPは媒体の平均粒径の2~4倍です。

クロマトグラフィー方法

NW Dex G-25 デキストランの分離原理

NW Dex G-25 デキストランは、分子篩（ゲルろ過）の原理を使用して分離および精製を行います。これは、生体分子がクロマトグラフィーカラム（充填済みのクロマトグラフィー媒体）を通過する際に、分子の大きさ（通常は分子量の大きさに基づく）に従って分離される方法です。

生体分子はクロマトグラフィー媒体と結合せず、媒体の孔径を通過することで分離が行われます。そのため、緩衝液の成分は分離効率（分解能）に直接影響を与えることはありません。

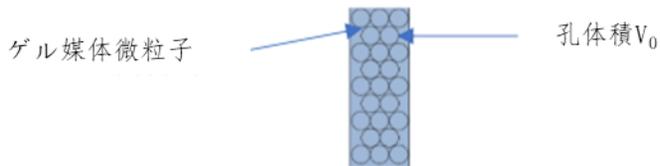


図3. クロマトグラフィーの概略図

カラムベッド体積 V_c はクロマトグラフィーカラムの物理的体積であり、カラムの底面積とカラムの高さを掛けたものです。

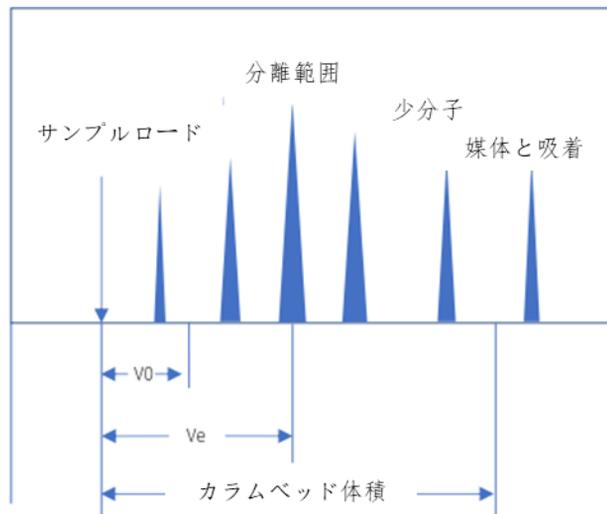


図4. ゲルろ過による分離の概略図

NW Dex G-25 デキストランアガロースは親水性微粒子であり、惰性材料で、通常は生体分子と反応しません。ゲルろ過は温和な分離・精製技術であり、温度、塩濃度、pH値などは分離効果に影響を与えません。クロマトグラフィーの過程で、サンプルは元の緩衝液から流動相へ徐々に移行します。サンプルの溶解緩衝液と流動相緩衝液は、できるだけ同じ成分を使用することが推奨されます。異なる成分を使用する場合は、サンプルの溶解度に注意する必要があります。

推奨されるクロマトグラフィーカラム

NW Dex G-25はゲルろ過（分子篩）クロマトグラフィー媒体であり、使用するカラムは純化・分離の規模に応じて決定されます。

実験室規模実験室規模の純化では、処理するサンプル量に応じてカラムを選択します。ゲルろ過（分子篩）クロマトグラフィー媒体のサンプルロード量は、以下の条件に基づきます。

- 成分分離：通常、カラムベッド体積の10-30%。サンプルロード量が低い（10%程度）ほど分離効果が良好ですが、30%以上になると分離効果が低下します。
- 高分解能分離：サンプルロード量は通常、カラムベッド体積の1-5%で、具体的なロード量は実験に基づいて決定します。
- 生産規模生産規模でのカラムも、サンプル量に応じて選択します。
- カラムの高さは、実験室で使用したものと同一高さで設定されます。

NW Dex G-25で推奨される緩衝液分離・純化過程で使用する緩衝液は、以下の原則に基づいて選択されます：

- 生体分子に安定なpHや塩濃度の緩衝液を使用します。不安定な緩衝液を使用すると、サンプルが凝集したり沈殿したりして、カラム圧力やサンプル収率に影響を与える可能性があります。
- 非特異的吸着を減らし、収率を向上させるために、一般的には0.15Mの塩（例：NaCl）を緩衝液に添加します。
- 有機試薬を追加することも可能ですが、高濃度の有機試薬を使用するとクロマトグラフィー媒体の微粒子が収縮する可能性があるため、追加前に媒体の耐性を確認してください。
- 有機試薬（例：グリセロール）を使用する場合、粘度に注意します。粘度の高い緩衝液は分離・純化の効果に影響を与えることがあります。
- サンプルに使用される緩衝液も、分離・純化の効果に影響を与える可能性があります。

Nw Dex G-25媒体の一般的な手順

- 平衡：緩衝液でクロマトグラフィーカラムを1~2カラムベッド体積（CV）分平衡させます。UV、導電率、およびpH曲線が安定したらサンプルをロードします。
- サンプルロード：通常、カラムベッド体積の1~59%分のサンプルをロードします。
- 洗脱：平衡用の緩衝液を使用して洗脱を行い、通常1~1.5 CV分を洗脱します。洗脱後、試験の要求に従って連続してサンプルをロードすることができます。試験が終了した場合、脱気済みの20%エタノールを1~1.5 CV分使用して保存します。洗浄が必要な場合はCIP方法に従います。

クロマトグラフィーカラムとクロマトグラフィー媒体の保存

長期保存：

使用しない場合、クロマトグラフィー媒体をカラムから取り外し、20%エタノールで密封して室温で保存します。

短期保存：

クロマトグラフィーカラム内で20%エタノール（または0.01 M NaOH）を使用して室温で保存します。

クロマトグラフィーの応用

異なる用途における応用：

成分分離：サンプルロード量は通常カラムベッド体積の10~30%です。試験に基づいて塩濃度に応じたサンプルロード量を確認します。

流速の影響：成分分離においては、流速の影響は小さく、適切な圧力条件下で比較的高い流速を使用することが可能です。

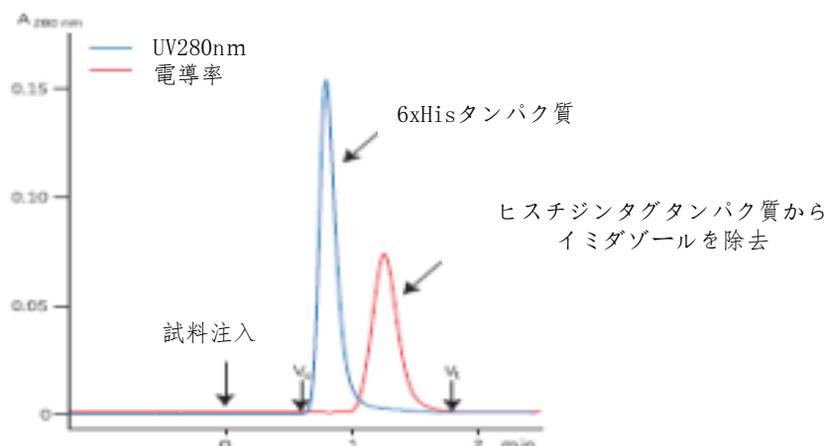


図5. 緩衝液の置換または有害物質の除去

高分解能分離

- a) NW Dex G-25シリーズのデキストランゲルクロマトグラフィー媒体は、通常1K～5KDのペプチドの分離に使用されます。
- b) 一般的に、カラム長は60cm以上のものを使用します。
- c) サンプルの注入量は1～5%です。
- d) 流速は分解能に大きな影響を与えるため、通常は低い流速を使用します。
- e) 150mM NaClを添加すると、非特異的吸着の減少に有利です。

クロマトグラフィー媒体の洗浄と再生 (CIP)

NW Dex G-25シリーズの媒体は、使用期間が長くなるとカラム効率が低下し、分離性能が悪化する可能性があります。その場合は、以下の手順で洗浄と再生を行います。

- 1) 蒸留水でカラム体積の2倍の量を洗浄
- 2) 1M NaClでカラム体積の1倍を洗浄
- 3) 0.2M NaOHでカラム体積の1倍を洗浄
- 4) 蒸留水でカラム体積の4倍の量を洗浄

クロマトグラフィー媒体の滅菌

NW Dex G-25は、pH中性条件下で121℃の高圧蒸気滅菌を30分間行うか、0.5M NaOHを用いて30分間処理することで滅菌が可能です。

クロマトグラフィー媒体の長期保存

乾燥粉末のNW Dex G-25は、湿気を防ぐために涼しく乾燥した場所で密閉保存してください。膨潤後のNW Dex G-25は20%エタノール中に保存します。エタノールの揮発や微生物の繁殖を防ぐために、3か月ごとに新鮮な20%エタノールに交換することを推奨します。4～8℃の環境で保存すると、より良い効果が得られます。

包装

NW DexG-25デキストランシリーズクロマトグラフィー媒体には、2種類の包装があります。固体粉末の包装で、輸送中は常温で輸送されます。最高温度は40℃未満です。

廃棄とリサイクル

NW Dex G-25シリーズの媒体は自然環境では分解しにくいいため、環境保護のために焼却処理を推奨します。

Nw Dex G-25試薬の安定性と耐性

試薬	耐性	試薬	耐性
2-クロロエタノール 309%	OK	蟻酸 104%	OK
2-メルカプトエタノール 0.1M	OK	グリシン-HCl 0.1M pH 1.0	OK
酢酸 50%	平衡および洗浄に使用可能	グアニジン塩酸塩 6M	OK
アセトン 609%	OK (媒体が収縮します)	ヒドラジン 809%	OK
アルカリ溶液	OK	塩酸 0.1M	OK
アンモニア水	OK	メタノール 75%	OK
塩溶液	OK	酸化剤	使用を避けてください
CHAPS 30mM	OK	ピペリジン 1M	OK
クロロホルム/メタノール 3:1	OK	プロピオン酸 1M	OK
デキストラナーゼ	使用を避けてください	ビリジン 1M	OK
ジメチルスルホキシド	OK	ホウ化ナトリウム 4mg/ml	OK
ジオキサン 509%	OK	デオキシコール酸ナトリウム 16mg/l	OK
ジチオスレイトール 1mM	OK	ドデシル硫酸ナトリウム 39%	OK
エタノール 95%	OK	尿素 8M	OK
フォルミン酸バッファー 0.1M	OK		

よくある質問と回答

質問1: カラム充填時にクロマトグラフィーカラムのガラスが破損した場合は？

この現象は、新しいクロマトグラフィー媒体を使用する際に一般的に発生します。主な原因は、クロマトグラフィー媒体が完全に膨潤していないことです。使用時には、特にG-50/75/100媒体の膨潤倍率に注意する必要があります。完全に膨潤していない状態でカラムを充填すると、媒体がバッファー中でさらに膨潤し、カラムが破裂することがあります。

質問2: クロマトグラフィーの攪拌後、細かい白い泡が浮いてくるのはなぜですか？

この現象は、使用してしばらく経った場合や、攪拌時に磁気攪拌子を使用した場合、または蠕動ポンプで媒体を移動させた場合に起こることがあります。これにより、クロマトグラフィー媒体のミクロスフェアが破損します。また、長期間使用しなかった場合、媒体が固く沈降し、攪拌が過剰になってしまうことがあります。クロマトグラフィー媒体のバッファー交換時に脱水が長時間行われた場合も、媒体の内部孔が脱水され、液体が十分に浸透しないことがあります。この場合、ゆっくりと攪拌し、20～30分間静置すると解決します。

質問3: クロマトグラフィー媒体のミクロスフェアが破損（破片が出現）した場合、使用を続けられますか？

破片が1～3%以下であれば、顕微鏡で確認して使用可能です。脱塩などの用途では引き続き使用できますが、破片の量が不明な場合は、新しいクロマトグラフィー媒体に交換することをお勧めします。

質問4: なぜ私のサンプルは常に1カラム体積（CV）後に出現するのですか？

通常、サンプルがクロマトグラフィー媒体に吸着しており、サンプルの挙動がゲル濾過の原理に従っていないことが原因です。この現象が発生した場合、まず目的が達成されたかを確認します。期待通りであれば、その条件で分離を続けます。期待に達しない場合は、洗浄バッファーの塩濃度を高めます。一般的な純化では、バッファーの濃度は20～50mMが適しています。

質問5: サンプルを繰り返し注入することはできますか？何回まで可能ですか？

純化の目的が達成され、クロマトグラフィー媒体が汚染されていないかを確認します。サンプルが澄んでおり、粒子や沈殿がない場合、分離後のサンプルも澄んでいることを確認し、そのようなサンプルは10～15回繰り返し注入できます。サンプルがエマルジョンの場合、純化中にカラム圧が上昇する可能性があるため、カラム圧を注意深く監視し、1barを超えた場合はカラムベッドが圧縮される恐れがあります。

質問6: 脱塩後、サンプルが希釈されるのはなぜですか？

ゲル濾過技術自体がサンプルを希釈する技術であり、これはこの技術の欠点です。サンプルの濃度や注入体積を増やすことで部分的に解決できます。

質問7: クロマトグラフィー媒体が変色し、固まってしまった場合はどうすればよいですか？

この現象は、クロマトグラフィー媒体が長期間使用された際に発生することがあります。媒体がサンプルにより汚染され、例えばサンプル中の色素、脂質、核酸などの物質が原因です。さまざまなCIP（クリーニング・イン・プレース）方法を試して解決します。通常のサンプルであれば、NW Dexシリーズのクロマトグラフィー媒体は300～600回使用可能ですが、複雑なサンプルの場合は100～200回の使用が限界です。

質問8: クロマトグラフィー媒体の寿命はどのように判断すればよいですか？

実験室では、カラム圧、流速、色の変化などを基にクロマトグラフィー媒体の寿命を簡単に判断します。工業生産では、プロセス検証の方法に従ってクロマトグラフィー媒体の寿命を厳密に確認します。

NW Dex G-25ゲル濾過クロマトグラフィー媒体製品仕様書

品名	包装	品番
NWW DexG-25C	100 mL	60011-003401-2100
	500 mL	60011-003401-2500
	1L	60011-003401-1001
	10L	60011-003401-1010
NW Dex G-25 M	100 mL	60011-003301-2100
	500 mL	60011-003301-2500
	1L	60011-003301-1001
	10L	60011-003301-1010
NW DexG-25F	100 mL	60011-003201-2100
	500 mL	60011-003201-2500
	1L	60011-003201-1001
	10L	60011-003201-1010
NW DexG-25SF	100 mL	60011-003101-2100
	500 mL	60011-003101-2500
	1L	60011-003101-1001
	10L	60011-003101-1010

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を提供できます。その他の仕様やカスタムのご要望については、お問い合わせください。