

NW Rose 4FF/NW Rose 6FFゲル濾過クロマトグラフィー媒体

製品紹介

NW Rose FFシリーズアガロースゲルは、生物分子の分離および精製に使用されるクロマトグラフィー媒体です。アガロースを原料とし、乳化、架橋、サイズ分別を経て製造されたアガロース微粒子で、親水性と多孔性を持ち、ウイルス、タンパク質、多糖、核酸などの高分子生物サンプルの分離・精製または検出に広く使用されます。この媒体は高い物理的および化学的安定性を持ち、流速が速く、大規模な分離・精製に適しています。

NW Rose FFシリーズの分離・精製原理は、分子ふるい（またはゲル濾過）原理に基づいています。分子ふるい法は、最もシンプルで温和なクロマトグラフィー技術であり、主に以下の分野で使用されます。生体高分子の分離・精製、例としてウイルスなどの分子から不純物を除去するプロセスや、バッファの交換が挙げられます。

- NW Rose 6FFアガロースゲル媒体の特性は次の通りです。
- 高い化学的および物理的安定性、pH2～12の範囲で使用可能
 - 流速が速い
 - 大規模生産に適している
 - 清浄が容易

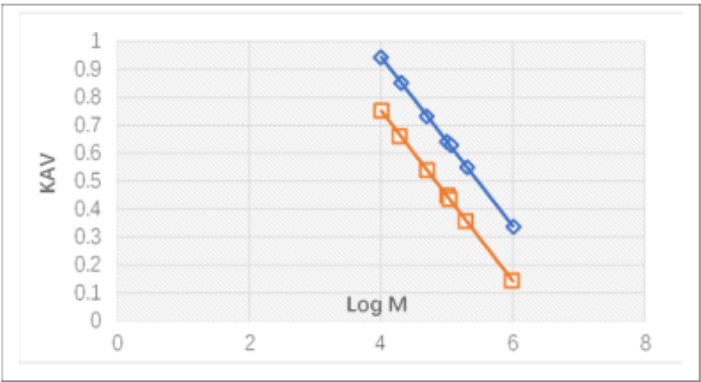


図1. NW Rose 4/6FFの選択性曲線（青はNW Rose 4FF、茶はNW Rose 6FF）

表1. NW Rose 4FF、NW Rose 6FFの技術仕様

項目	NW Rose 4 FF	NW Rose 6 FF
アガロース濃度	4%	6%
除外限界	線形分子≒6000 kDa	線形分子≒2000 kDa
	球状分子≒30,000 kDa	球状分子≒4000 kDa
粒子サイズ範囲	45-165 μm	45-165 μm
平均粒子サイズ	90 μm	90 μm
使用流速	90cm/h(カラム:50/100,高さ:80cm)	110cm/h(カラム:50/100,高さ:80cm)
最大使用流速	150cm/h(カラム:50/100,高さ:80cm)	200cm/h(カラム:50/100,高さ:80cm)
最大耐圧	0.3 MPa (3 bar)	0.3 MPa (3 bar)
pH安定性	pH 2-12（作業範囲）、 pH 2-14（CIP、短期間）	pH 2-12（作業範囲）、 pH 2-14（CIP、短期間）
化学的安定性	2M NaOH、8M尿素、6M塩酸グアニジン、70%エタノール、 30%イソプロパノール、1% SDS	
滅菌	0.5M NaOH で2時間、または 121℃で20分間水溶液	
保存条件	20%エタノール、室温	
外観	白色の球状粒子、放置すると層が分かれる	
注意事項	凍結により媒質の内部構造が破壊される可能性があります	

*粒子サイズは正規分布を示し、この範囲内の粒子が全体の90%以上を占めます。

** 溶液により粒子サイズが異なる場合があります。このデータは、水溶液中での粒子サイズを示しています。

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種類:

生体高分子の分離・精製: 一般的にはカラムの高さが60~100cmのものを選択します。操作の利便性を考慮し、カラムの高さが60cmを超えるプロセスでは、2~3本のカラムを直列に接続することを推奨します。

バッファー交換: 一般的にはカラムの高さが30~60cmのものを選択します。

2. NW Rose 4FF/NW Rose 6FFアガロースゲルの取り扱い:

2.1 カラムの体積に応じたNW Rose 4FF/NW Rose 6FFの量(体積)の計算:

1. クロマトグラフィーカラムの体積 = カラムの底面積 × カラムの高さ
2. クロマトグラフィー媒体の使用量 (mLまたはL) = (カラム体積 × 1.15)
3. クロマトグラフィー媒体の懸濁液量 (mLまたはL) = 媒体の使用量 ÷ 媒体の懸濁液濃度

注意点:

1. 使用するバッファーまたは水は脱気処理が必要です(注射用水を使用する場合は脱気の必要はありません)。
2. 通常、製品の懸濁液濃度は約75%です。懸濁液濃度が不明な場合は、懸濁液をメスシリンダーに注ぎ、12~24時間静置して、自然沈降したクロマトグラフィー媒体の体積を計算して懸濁液濃度を確認してください。
3. NW Rose 4FF/NW Rose 6FFは20%エタノール中で保存されています。砂芯フィルターを使用し、負圧ろ過によってカラム充填バッファー(通常は0.15~0.5M NaClを含むバッファーまたは超純水)に置換します。置換作業は3回行い、攪拌時には過度な力を加えないように注意してください。
4. 高圧蒸気滅菌が必要な場合は、121℃で20分間の高圧蒸気滅菌を行います(水溶液中での滅菌)。
5. ゲルの攪拌時に磁気攪拌子は使用しないでください。磁気攪拌子を使用すると、ゲル粒子が破壊される可能性があります。

2.2 準備したクロマトグラフィー媒体を50~75%の懸濁液に調整し、充填体積とカラムの空体積に応じて懸濁液濃度を準備します。懸濁液濃度が75%以上になると、気泡が発生しやすくなるため、注意が必要です。均一に攪拌して準備してください。

注意: 滅菌後にゲルの温度が高すぎると、カラム充填中にカラムが破損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. クロマトグラフィーカラムの使用マニュアルを参照してください(異なるメーカーのカラムは使用方法が異なるため、操作を誤るとカラムやクロマトグラフィー媒体に損害を与える可能性があります)。
2. カラムの充填には一般的に水または平衡バッファーを使用します。
3. クロマトグラフィーカラムの水平を調整します。
4. カラム底膜の空気を抜き、カラムの底部に0.5~1cmの充填バッファーを残します。
5. 充填装置を取り付けます。カラムの充填高さがカラム全体の2/3を超える場合には、充填装置の取り付けが必要です。
6. 均一に攪拌したゲル懸濁液を一度にゆっくりとカラム内に注ぎ入れます。気泡が入らないように注意し、注ぎ終わったら攪拌棒で再度均一に混ぜます。
7. カラムヘッドを接続します。この際、カラムヘッドとシステムまたは蠕動ポンプの間に圧力計を設置します(特に工業規模のカラムでは必要です)。その後、カラムヘッドの膜内の空気を排気します。
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ます。液面とカラムヘッドの膜の間にある気泡を除去します。
9. システムまたは蠕動ポンプに接続し、流速を調整します。圧力を制御し、1バーを超えないようにします。
10. 流れに従い、カラム内のゲルの界面が徐々に下がります。界面が安定したら(30分以内に

- 界面が動かなくなる）、界面の位置に印を付けます。
11. ポンプを停止し、充填装置を取り外します（必要に応じて）。カラムヘッドをゲルの界面まで下げ、印を付けた位置からさらに0.5cm下げます。
12. ポンプを再び同じ流速で作動させ、ゲルを20～30分間圧縮します。ゲルの界面が安定している場合、カラムの充填は完了です

カラム評価

1. カラム効率測定
- カラム効率を測定する際には、アセトンまたはNaClを指示剤として使用することができます。下記の表に基づいて指示剤溶液と移動相を調製します。

表2. カラム効率評価の条件

サンプル	1.0% (v/v) アセトン水溶液	2M NaCl溶液
サンプル量	カラム体積の1.0%	カラム体積の1～5%
移動相	水	0.4M NaCl溶液
線形流速	30 cm/h	30 cm/h
検出	UV 280nm	電導検出器

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。
- $HETP = L / N$

• $N = 5.54 \times (VR / Wh)^2$
- VR=保留体積（ Retained Volume）、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

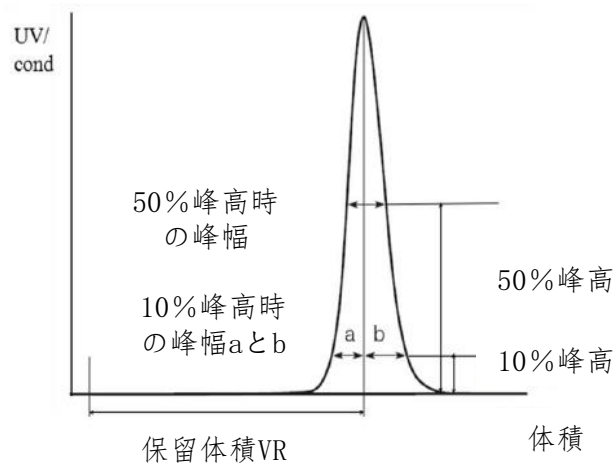


図2. カラム効果評価データの意味

結果の評価：

上記の式を使用して計算されたHETP（高さ相当理論段数）の値が、充填材の平均粒径の3倍未満であり、かつ非対称因子が0.8～1.8の範囲内に収まっていれば、カラムの充填は合格と判断されます。不十分なカラム性能については、原因を分析し、再度カラムを充填する必要があります。異なる用途に応じたカラム性能: 高分解能を必要とする精製分離では、カラム効率（HETP）の要件がより厳しく、平均粒径の2～4倍のHETPが求められます。

クロマトグラフィー方法

NW Rose 4FF/NW Rose 6FFの分離原理

NW Rose 4FF/NW Rose 6FFの純化および分離は、ゲルろ過（分子篩）原理に基づいています。ゲルろ過では、生体分子が充填されたクロマトグラフィーカラムを通過する際、分子のサイズ（通常は分子量に基づいて）によって分離されます。生体分子はクロマトグラフィー媒体と結合することなく、媒体の孔径を通過しながら分離されるため、緩衝液の成分は分離結果（分解能）に直接影響を与えることはありません。

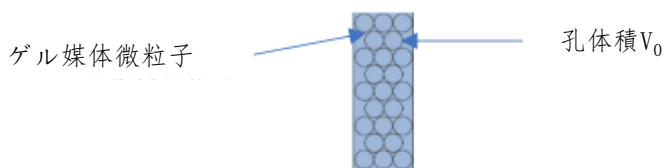


図3. クロマトグラフィーの概略図

カラムベッド体積 V_c はカラムの物理的体積であり、 V_c =カラムの底面積 x カラムの高さ

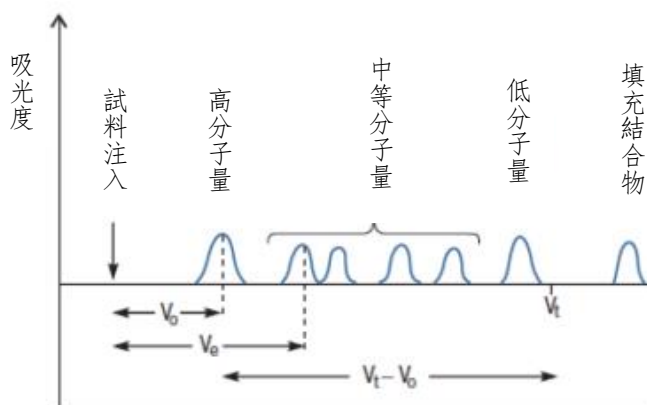


図4. ゲルろ過による分離の概略図

NW Rose 4FF/NW Rose 6FFアガロース親水性微粒子は、惰性材料であり、生体分子と反応しません。ゲルろ過（サイズ排除クロマトグラフィー）は、温和な分離・精製技術であり、温度、塩濃度、pH値などが分離効果に影響しません。クロマトグラフィー過程では、サンプルは緩衝液に溶解され、同じ（または異なる）緩衝液を移動相として使用します。

カラム推奨:

NW Rose 4FF/NW Rose 6FFは、ゲルろ過（サイズ排除クロマトグラフィー）の媒体であり、使用するクロマトグラフィーカラムは、分離・精製の規模に応じて選択されます。

実験室規模

実験室規模での精製の場合、処理するサンプル量に応じて決定します。ゲルろ過（サイズ排除クロマトグラフィー）のカラムにサンプルをロードする量は、一般的にカラムベッド体積の1~5%です。サンプルの量が少ない（1%程度）ほど分離効果が良く、サンプル量が多い（5%以上）ほど分離効果は低下します。カラムの選択には、一般的に60~100cmのカラムベッドの高さを推奨します。

生産規模

生産規模に使用するクロマトグラフィーカラムも、サンプル量に基づいて選択されます。カラムの高さは、実験室スケールと同じに設定されます。カラムの直径が300mm未満の場合、通常は1本のカラムで分離します。直径が300mmを超える場合、2本以上のカラムを直列に接続して使用します。

NW Rose 4FF/NW Rose 6FF推奨緩衝液

分離・精製の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: 生体分子が安定する緩衝液のpHや塩濃度不安定な緩衝液を使用すると、分離・精製中にサンプルが凝集・沈殿し、カラム圧力やサンプルの回収率に悪影響を与える可能性があります。非特異的吸着

を減らすための塩の添加一般的に、緩衝液には0.15Mの塩（例：NaCl）を加えます。これにより、非特異的な吸着が減少し、収率が向上します。有機試薬の使用有機試薬を追加することができますが、高濃度の有機試薬はクロマトグラフィー媒体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する必要があります。粘度の影響有機試薬（例：グリセロール）を使用する場合、粘度が高くなると分離・精製に影響を与えるため、注意が必要です。サンプルの緩衝液も同様に分離・精製の効果に影響します。

NW Rose 4FF/NW Rose 6FF 一般的な手順

A. 平衡:

クロマトグラフィーカラムを平衡緩衝液で1~2カラムベッド体積(CV)分平衡させ、UV、電導率、pH曲線が安定したらサンプルのロードを開始します。

B. サンプルのロード:

通常、カラムベッド体積の1~5%のサンプル量をロードします。

C. 洗脱:

平衡緩衝液で1~1.5CV洗脱します。洗脱後、試験の要件に従ってサンプルを連続してロードできます。試験が終了した場合、保存液（脱気した20%エタノール）を1~1.5CVで保存します。洗浄が必要な場合は、CIP手順に従ってください。

クロマトグラフィーカラムおよびクロマトグラフィー媒体の保存

•長期保存:

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

•短期保存:

短期間保存する場合は、20%エタノールまたは0.01M NaOHを使用して、カラム内で保存し、室温で保管します。

クロマトグラフィーの応用

緩衝液の交換:

NW Rose 4FF/NW Rose 6FFアガロースゲルクロマトグラフィー媒体は、水相緩衝液が選択され、害のある試薬の除去や緩衝液の交換に使用されます。

•分子量の違いによる分離:

異なる分子量の生体分子を分離するには、分子量の差が1倍以上必要です。分子量の差が小さいと、分離効果が不十分になる可能性があります。

•大分子ウイルス（例：ワクチン製品）の分離:

A. サンプルのロード量は、カラムベッド体積の5~20%で、塩濃度の要件に基づいて決定します。ロード量が少ない場合、分離度が良好であれば、ロード量を増やすことができます。

B. 流速は通常30~60cm/hで、適切な圧力（1バール以下）を維持します。

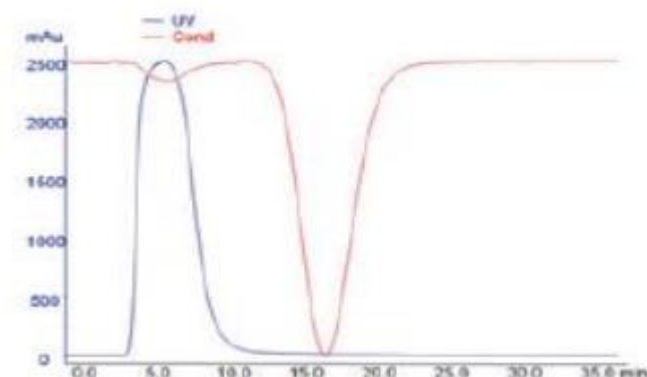


図5. 狂犬病ワクチンウイルスの精製クロマトグラフィー図

クロマトグラフィー媒体の洗浄と再生

NW Rose 4FF/NW Rose 6FFシリーズの媒体は、一定期間使用すると、カラム性能が低下し、分離効果が悪化することがあります。その場合、以下の手順で洗浄および再生を行うことができます。

- a) 蒸留水で2カラムボリュームを洗浄
- b) 1M NaClで1～2カラムボリュームを洗浄
- c) 蒸留水で1～2カラムボリュームを洗浄して切り替え
- d) 0.2～0.5M NaOHで1～2カラムボリュームを洗浄
- e) 蒸留水で4カラムボリュームを洗浄

クロマトグラフィー媒体の滅菌

NW Rose 4FF/NW Rose 6FFは、水溶液中で121℃の高圧蒸気滅菌を30分行うか、0.5M NaOHで30分間処理することで滅菌できます。

注意：高圧蒸気滅菌を行う際は、溶液のpHを中性に保つ必要があります。

クロマトグラフィー媒体の長期保存

NW Rose 4FF/NW Rose 6FFは、20%エタノール（または0.01M NaOH）に保存し、冷暗所に密閉して保管します。保存液は3ヶ月ごとに新鮮な20%エタノール（または0.01M NaOH）に交換し、4～8℃で保管することを推奨します。

注意：保存温度は0℃以下にならないようにします。

廃棄およびリサイクル

NW Rose 4FF/NW Rose 6FFシリーズの媒体は自然環境で分解されにくいため、環境保護の観点から焼却処理による廃棄が推奨されます。

附録 変換式

- 1. 線形流速 (cm/h) = 体積流速 (ml/min) ÷ カラム底面積 (cm²) × 60
- 2. 体積流速 (ml/min) = 線形流速 (cm/h) × カラム底面積 (cm²) ÷ 60

化学的安定性

化学試薬	日本語	安定性
Acetonitrile 30%	アセトニトリル 30%	OK
Ethanol 70%	エタノール 70%	OK
Guanidine Hydrochloride 6M	グアニジン塩酸 6M	OK
Isopropanol 30%	イソプロパノール 30%	OK
NaOH 2M	水酸化ナトリウム 2M	OK
SDS 1%	SDS 1%	OK
8M Urea	尿素 8M	OK

****Q&A****

もしNW Rose 4FF/NW Rose 6FFゲル濾過クロマトグラフィー媒体を使用している際に問題が発生した場合、以下の表を参考にして解決するか、私たちにお問い合わせください。

****問題1: 層析を攪拌して均漿（均質化）した後、細かい白い泡が浮かぶのはなぜですか？****

この現象は、長期間使用した場合や、攪拌時に磁気攪拌器を使用したり、移送時に蠕動ポンプを使用したことによる微粒子の破損が原因です。また、長期間使用していない場合、媒体が硬く沈殿し、攪拌が激しすぎたことが原因かもしれません。もしくは、フィルタリングでのバッファー交換中に脱水が長く続き、再度液体を加えたときに、微粒子の内部孔が完全に液体を吸収しきれない場合もあります。ゆっくり攪拌し、20～30分間静置すれば解決します。

****問題2: 微粒子が破損している場合（破片がある）、使用を続けることができますか？****

破片が1～3%以下の少量であれば、顕微鏡で観察して確認します。脱塩などの用途であれば、そのまま使用を続けることが可能です。ただし、破片の量が不確かな場合は、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。

****問題3: なぜ私のサンプルは常に1CV後に現れるのですか？****

通常、サンプルが媒体に吸着しており、ゲル濾過の原理に従っていない場合にこの現象が起こります。この現象が発生した場合、まず試験の目的が達成されたかを確認します。達成されていればその条件で分離を続けても問題ありませんが、達成されていない場合は、エリートバッファーの塩濃度を上げることを検討してください。一般的にはバッファー濃度は20～50mMです。

****問題4: サンプルを繰り返しロードできますか？ 何回まで繰り返しロードできますか？****

分離の目的が達成されたか、また、媒体が汚染されていないかを確認してください。サンプルが澄んでいて、粒子や沈殿がなく、分離後のサンプルも澄んでいる場合、このようなサンプルは10～15回繰り返しロードすることが可能です。サンプルが乳濁液の場合、分離の過程でカラム圧が上昇する可能性があります。この場合、カラム圧が1バールを超えないように注意してください。カラム圧が1バールを超えると、カラムベッドが圧縮される恐れがあります。

****問題5: サンプルが希釈されて濃度が非常に低くなっています。****

ゲル濾過技術はそもそも希釈を伴う技術であり、これはこの技術の欠点の一つです。サンプル濃度を上げたり、ロードするサンプル体積を増やすことで、部分的に解決できます。サンプルを濃縮する際には、サンプルの粘度に注意してください。

NW Rose 4FF/NW Rose 6FF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
NW Rose 4 FF	200 mL	60012-014900-2200
	1 L	60012-014900-1001
	10 L	60012-014900-1010
NW Rose 6 FF	200 mL	60012-015900-2200
	1 L	60012-015900-1001
	10 L	60012-015900-1010

注：7.7 mm × 22 mm、16 mm × 25 mm、7.7 mm × 100 mm のカラムプリパックもご提供可能です。その他のサイズやカスタマイズのご要望がある場合は、お問い合わせください。