

NW Rose FFイオン交換親和クロマトグラフィー媒体

製品紹介

イオン交換クロマトグラフィー（Ion Exchange Chromatography, IEC）は、現代バイオテクノロジーにおいて最も広く使用されている精製方法の一つであり、1960年代から生体分子の分離分野に応用されてきました。現在、この技術は最も広く用いられている方法の一つとして、タンパク質、ペプチド、核酸、その他の電荷を帯びた生体分子の分離・精製に利用されており、高負荷量で高い分解能を提供することができます。

この方法では、わずかな電荷差しかない分子、たとえば、1つの電荷を持つアミノ酸が異なる2つのタンパク質の分離も可能です。そのため、イオン交換クロマトグラフィーは、生体分子の精製のキャプチャー、中度純化、細かい精製段階に広く使用されており、少量のサンプルの精製分析にも、キログラム単位のサンプルの精製にも適用されます。

イオン交換媒体は、以下の3つの部分で構成されています：

- 1. 架橋されたメッシュ状の基質：この基質は多孔性で親水性が高く、化学的安定性に優れています。
- 2. 基質に固定された機能基：これは帯電基であり、イオン交換クロマトグラフィー媒体の特性を決定します。
- 3. 機能基と逆の電荷を持つイオン（平衡イオンとも呼ばれる）：このイオンは、機能基と可逆的に結合し、交換が可能です。

NW Rose FFシリーズのイオン交換クロマトグラフィー媒体は、高流速アガロース微粒子に異なる機能基を結合させたイオン交換媒体です。

NW Rose FFシリーズのイオン交換クロマトグラフィー媒体の特徴は以下の通りです。

- ・高動的結合容量および優れた流速特性
- ・化学的および物理的安定性が高く、スケールアップに適し、再現性が良好
- ・簡便なインプレース洗浄と滅菌が可能で、実験室用および工業用クロマトグラフィーカラムへの充填が容易

NW Rose FFシリーズのイオン交換クロマトグラフィー媒体には、以下の種類があります。

- ・強陰イオン交換クロマトグラフィー媒体：NW Rose Q FF
- ・弱陰イオン交換クロマトグラフィー媒体：NW Rose DEAE FF
- ・強陽イオン交換クロマトグラフィー媒体：NW Rose SP FF
- ・弱陽イオン交換クロマトグラフィー媒体：NW Rose CM FF

表1. NW Rose FFシリーズ 技術仕様

項目	NW Rose Q FF	NW Rose DEAE FF	NW Rose SP FF	NW Rose CM FF
分離原理	強陰イオン交換	弱陰イオン交換	強陽イオン交換	弱陽イオン交換
基質	高流速アガロース微粒子			
粒径	45-165 μm			
配基	第四級アンモニウム基	二級アミノ基	スルホン酸基	カルボキシ基
イオン容量	180-250 μmol/mL (Cl ⁻)	110-160 μmol/mL (Cl ⁻)	180-250 μmol/mL (H ⁺)	90-130 μmol/mL (H ⁺)
最大耐圧	0.3 MPa			
CIPインプレース洗浄	0.5 M NaOH			
推奨流速	200-600 cm/h			
最大流速	600 cm/h (0.1 MPa, XK26/30, カラム高15 cm, 25℃)			
pH安定性	2-12 (作業時), 2-14 (CIP)			
化学安定性	一般的な水系溶液、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			
保存条件	20% エタノール, 4-30° C			

クロマトグラフィー媒体の使用前処理

1. 推奨されるクロマトグラフィーカラムの種類:

使用分野に応じてクロマトグラフィーカラムを選択します。大分子生体物質の分離・精製には、一般的にカラムの高さを10~20cmに設定したカラムが推奨されます。

2. NW Rose FFシリーズイオン交換媒体の準備:

カラムの体積に基づいて必要なNW Rose FFの量を計算します。

カラム体積 = カラムの底面積 × カラムの高さ

媒体の使用量 (mLまたはL) = カラム体積 × 1.15

媒体のスラリー量 (mLまたはL) = 媒体の使用量 ÷ スラリー濃度

注意:

1) 使用するバッファー液または水は脱気処理が必要です (注射用水の場合、脱気処理は不要です)。

2) 原則として、スラリーの濃度は約75%です。スラリー濃度が不明な場合、スラリーをメスシリンダーに注ぎ、12~20時間静置してから自然沈降体積を計算します。

3) NW Rose FFは20%エタノール中で保存されています。砂芯フィルター (G2またはG3モデル) を使用し、負圧ろ過でカラムのバッファー液を交換します (バッファー液には0.15~0.5M NaClを含むバッファー、純水、または平衡バッファーを使用します)。このプロセスを3回繰り返します。攪拌は力をかけすぎないように注意してください。

4) 高圧滅菌が必要な場合は、121℃で20分間の高圧滅菌が推奨されます。

5) ゲルの膨潤中に磁気攪拌子の使用は避けてください。磁気攪拌子は媒体粒子を破損させる可能性があります。

準備したクロマトグラフィー媒体を50%~75%のスラリーにし、均一に攪拌しておきます。

注意: カラム充填中に、ゲルの温度が高すぎるとカラムが損傷する可能性があるため、適切な温度管理が必要です。

カラムの充填

クロマトグラフィーカラムの充填に関しては、各メーカーのカラム使用マニュアルを参考にしてください (メーカーによってカラムの使い方が異なるため、操作を誤るとカラムやクロマトグラフィー媒体が損傷する可能性があります)。充填に使用するバッファー液は、一般的に水または平衡バッファー液が使用されます。

1. カラムの位置調整: カラムを垂直に調整します。

2. カラムのエア抜き: カラム底膜のエア抜きを行い、カラム底部に1cmほどの充填バッファー液を残しておきます。

3. 充填器の装着: 充填器を装着します。カラム充填の高さがカラムの2/3を超える場合には、充填器の使用が推奨されます。

4. スラリーの充填: 均一に攪拌されたゲルスラリーを一度にゆっくりとカラム内に注ぎます。この際、気泡が入らないよう注意してください。注入後、ゲル攪拌棒でスラリーを均一に混ぜます。

5. カラムヘッドの接続: カラムヘッドを接続し、ヘッドとシステム、または蠕動ポンプの間に圧力計を取り付けます (産業規模のカラムでは必要)。カラムヘッド膜のエア抜きを行います。

6. カラムヘッドの挿入: カラムヘッドをカラムに挿入し、ヘッドの底膜が液面に接触するようにします。その後、液面とカラムヘッド膜の間の気泡を除去します。

7. システムまたは蠕動ポンプへの接続: カラムをシステムまたは蠕動ポンプに接続し、流速を調整します。圧力は3バールを超えないように制御します。

8. クロマトグラフィー媒体のレベル調整: 流速に応じて、クロマトグラフィー媒体の界面が徐々に下がります。約30分以内に界面が安定するのを待ち、その位置をマーキングします。

9. ポンプ停止と充填器の取り外し: ポンプを停止し、充填器を取り外します (必要に応じて)。カラムヘッドをクロマトグラフィー媒体の界面まで (マーキング位置より0.5cm下まで) 下げます。

10. 最終圧縮: ポンプを再び動かし、停止前の流速で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したら、充填作業が完了です。

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

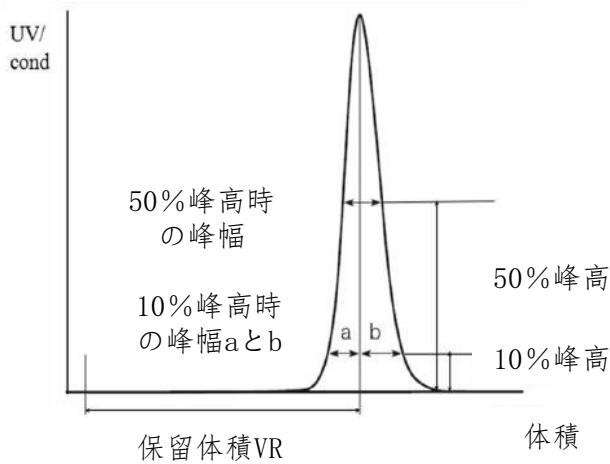


図2. カラム効果評価データの意味

結果評価

上記の公式によって計算されたHETPの値が、膨潤後の媒体の平均粒径の3倍未満であり、かつ非対称因子が0.8～1.8の範囲内であれば、合格と判定されます。理想的でないカラム

クロマトグラフィー媒体の洗浄と再生

クロマトグラフィー媒体の使用回数が増えると、カラム内に汚染物質が蓄積されます。定期的なインプレース洗浄により、汚染物質の蓄積を防ぎ、安定した作業状態を維持することができます。媒体の汚染度合いに応じて、インプレース洗浄の頻度を決定します（汚染がひどい場合は、使用後に毎回インプレース洗浄を行うことを推奨し、結果の再現性を確保します）。異なる種類の不純物や汚染物質に対して、以下の洗浄条件が推奨されます。

1. 最初に2カラム体積の2M NaClを使用して、強く結合しているタンパク質を洗浄するか、pH3の1M NaAcを用いてpHを変更し、強く結合しているタンパク質を除去します。
2. 強疎水性タンパク質や沈殿したタンパク質の除去には、最初に2～3カラム体積の1M NaOHで洗浄し、その後すぐに5～10カラム体積の純水で洗浄します。
3. リポタンパク質や脂質の除去には、最初に5～10カラム体積の70%エタノールまたは30%イソプロパノールで洗浄し、その後5～10カラム体積の純水で洗浄します。

注意: 70%エタノールや30%イソプロパノールは、使用前に脱気処理を行う必要があります。インプレース洗浄中の流速は30～60 cm/hが推奨されます。詰まりがひどい場合は、逆流洗浄を使用することができます。

クロマトグラフィー媒体の滅菌

NW Rose FFシリーズのイオン交換クロマトグラフィー媒体は、1M NaOHで0.5～1時間以上処理することで滅菌およびエンドトキシンの除去が可能です。

クロマトグラフィー媒体の長期保存

NW Rose FFシリーズのイオン交換クロマトグラフィー媒体は、密閉状態で20%エタノール中に保存されます。エタノールの蒸発および微生物の繁殖を防ぐため、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。

廃棄とリサイクル

NW Rose FFシリーズのイオン交換クロマトグラフィー媒体は自然界で分解されにくいため、環境保護のために焼却処分を推奨します。

Q&A（質問と回答）

NW Rose FFシリーズのイオン交換クロマトグラフィー製品を使用する際に問題が発生した場合、下記の表を参考にして解決するか、当社までご連絡ください。

問題1 クロマトグラフィー媒体を攪拌して均質化した後、細かい白い泡が浮かぶことがありますか？

この現象は、長時間使用した後、あるいは攪拌時に磁気攪拌器や蠕動ポンプを使用した場合に、媒体の微粒子が破損することが原因です。また、長時間使用しないと媒体が過度に沈降し、攪拌を開始した際に強く攪拌されると、このような現象が発生します。

問題2 タンパク質のイオン交換後の純度が低いのはなぜですか？

イオン交換の分離能にはいくつかの要因が影響します。

- クロマトグラフィー媒体のカラム性能（カラム効率）が高いほど、分解能が向上します。詳細はカラム性能測定を参照してください。
- クロマトグラフィー媒体の粒径が小さいほど分解能が高く、粒径が大きいと分解能が低くなります。
- 洗脱方法では、線形洗脱が分解能を高めます。
- 試料中のターゲットと不純物の電荷差を確認し、最適なpH条件を見つけ、適切なクロマトグラフィー媒体を選択します。

問題3 精製後のタンパク質の回収率が低いのはなぜですか？

試料の回収濃度（または活性）を確認し、タンパク質がクロマトグラフィー媒体に吸着しているか、部分的にしか吸着していないかを確認してください。（試料の過負荷も回収率低下の原因です）再生液で試料をテストし、タンパク質が強く吸着していないかを確認します。（緩衝液や媒体の種類を変更できます）CIP洗浄中に試料が存在するか確認し、沈殿している場合はクロマトグラフィーカラム条件を変更します。

問題4 試料が吸着しない場合の対策は？

試料が吸着しない原因としては、以下の可能性があります。

- 試料が過負荷になっているか、流出液中の濃度や活性を確認してください。
- 試料の環境が荷電していないか、または試料の電荷がクロマトグラフィー媒体の電荷と同じ場合があります。

問題5 試料を繰り返しロードできますか？ また、何回まで繰り返しロードできますか？

精製の目的が達成されているか、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てください。一般的に、試料が透明で、粒子や沈殿がなく、分離後の試料も透明であれば、このような試料は10～15回まで繰り返しロードできます。

問題6 イオン交換精製後、どうやって脱塩しますか？

凝縮ろ過技術（例えば：NW DEX G-25C）を使用して脱塩することができます。または、洗脱時にpH洗脱法を使用することも可能です。

問題7 クロマトグラフィー媒体の変色や凝集が起こるのはなぜですか？

この現象は、クロマトグラフィー媒体を長期間使用した場合に、試料による汚染が原因で発生します。試料中の色素、脂質、核酸などの物質によって汚染されることがあります。異なるCIP方法を試して解決してください。一般的な試料に対しては、NW Roseシリーズのクロマトグラフィー媒体は300～600回の使用が可能です。複雑な試料の場合は100～200回の使用が可能です。

問題8 クロマトグラフィー媒体の寿命はどうやって判断しますか？

実験室での使用では、クロマトグラフィー媒体のカラム圧力、流速、色の変化などの簡単な指標で寿命を判断します。工業生産では、厳密に工法検証の方法に従ってクロマトグラフィー媒体の寿命を判断する必要があります。

NW Rose Plus FF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
NW Rose Q FF	25 mL	60022-051000-2025
	100 mL	60022-051000-2100
	500 mL	60022-051000-2500
	1 L	60022-051000-1001
	5 L	60022-051000-1005
	10 L	60022-051000-1010
NW Rose SP FF	25 mL	60022-072900-2025
	100 mL	60022-072900-2100
	500 mL	60022-072900-2500
	1 L	60022-072900-1001
	5 L	60022-072900-1005
	10 L	60022-072900-1010
NW Rose DEAE FF	25 mL	60022-070900-2025
	100 mL	60022-070900-2100
	500 mL	60022-070900-2500
	1 L	60022-070900-1001
	5 L	60022-070900-1005
	10 L	60022-070900-1010
NW Rose CM FF	25 mL	60022-071900-2025
	100 mL	60022-071900-2100
	500 mL	60022-071900-2500
	1 L	60022-071900-1001
	5 L	60022-071900-1005
	10 L	60022-071900-1010

注：7.7mm x 22mm、16mm x 25mm、7.7mm x 100mm のクロマトグラフィーカラムプレパックが提供可能です。その他の規格やカスタムニーズについてはお問い合わせください。