

NW Rose Plus HPイオン交換親和クロマトグラフィー媒体

製品紹介

NW Rose Plus HPは新世代のアガロースベースのイオン交換クロマトグラフィー媒体であり、全く新しいアガロース微粒子を使用しています。この微粒子は、孔径と粒径を最適化し、イオン配基と結合して作られたもので、高流速、高剛性、高分解能を特徴としています。クロマトグラフィーにおいて、粒子サイズは生体分子の分離分解能に影響を与えます。粒子が小さいほど、分解能は向上しますが、同時に粒子が小さいと高い逆圧が生じるという課題もあります。NW Rose Plus HPシリーズのクロマトグラフィー媒体は、50 μmの粒径を持つ高流速・高剛性のアガロース微粒子を採用しており、分解能を向上させると同時に、小粒径が大規模生産に与える影響を低減しています。

NW Rose Plus HPシリーズのイオン交換クロマトグラフィー媒体は、以下の特徴を備えています。

- 1) 高動的結合容量
- 2) 優れた流速特性
- 3) 安定した化学的および物理的特性
- 4) 簡単な定置洗浄と消毒
- 5) 研究室レベルから工業規模まで対応可能

NW Rose Plus HP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2つの製品があります。

- NW Rose Plus SP HP: 陽イオン交換クロマトグラフィー媒体
- NW Rose Plus Q HP: 陰イオン交換クロマトグラフィー媒体

表1. NW Rose Plusシリーズ イオン交換クロマトグラフィー媒体技術仕様

項目	NW Rose Plus Q HP	NW Rose Plus SP HP
製品型式	NW Rose Plus Q HP	NW Rose Plus SP HP
分離原理	強陰イオン交換	強陽イオン交換
基材	高流速・高剛性アガロース微粒子	
粒径	50μm	
リガンド	第四級アンモニウム基	磺酸基
イオン容量	0.14-0.18μmol/mL (Cl ⁻)	0.12-0.17 μmol/mL (H ⁺)
最大耐圧	0.5MPa	
CIPインプレース洗浄	0.5M NaOH	
最大流速	600cm/h (0.1MPa、XK16/40カラム、高さ20 cm、25℃)	
pH安定性	2-12 (作業時)、2-14 (CIP時)	2-12 (作業時)、2-14 (CIP時)
化学的安定性	一般的水溶液、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 一般的水溶液、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℃	
保存条件	20% エタノール、4-30℃	

使用前の準備作業

1, 推奨するクロマトグラフィーカラムの種類:

用途に応じてクロマトグラフィーカラムを選択:

一般的に生体高分子は高さは10-20cmのカラムを使用します。

2, NW Rose Plus HPクロマトグラフィー媒体の処理:

クロマトグラフィーカラムの体積に基づいて必要なNW Rose Plus HPの量を計算します。

カラム体積 = カラムの底面積 x 充填層の高さ

クロマトグラフィー媒体の量 (mLまたはL) = (カラム体積 x クロマトグラフィー媒体の圧縮係数)

NW Rose Plus HPの圧縮係数は1.15です。

スラリーの使用量 (mLまたはL) = クロマトグラフィー媒体の量 / スラリーの濃度

注意:

1) 使用する緩衝液または水は脱気処理が必要です (注射用水の場合は脱気処理は不要です)。

2) 一般的に、包装状態のスラリー濃度は75%前後です。スラリー濃度が不確かである場合、クロマトグラフィー媒体のスラリーをメスシリンダーに注ぎ、一晚静置し (一般12~20時間) 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ます。

3) 包装状態のNW Rose Plus HPは20%エタノール中に保存されています。砂芯フィルターを使用し、負圧ろ過でカラムの充填緩衝液に置き換えます (カラムの充填緩衝液は一般的に水または20%エタノール、もしくは平衡緩衝液を使用します)。この手順を3回繰り返します。攪拌時に過度の力を加えないでください。

4) 高圧蒸気滅菌が必要な場合は、121℃、20分間の高圧蒸気滅菌を行ってください。

5) ゲルが膨潤する際には磁気攪拌子を使用しないでください。磁気攪拌子を使用すると、クロマトグラフィー媒体の粒子が破損する可能性があります。

6) スラリー濃度は50%~75%になるように調整してください。よく攪拌してから使用してください。

カラム充填

クロマトグラフィーカラムの使用手順については、カラムメーカーごとに異なるため、使用手冊を参照してください。

1) カラムの充填緩衝液には、一般的に脱イオン水または0.15M NaClを平衡緩衝液として使用します。

2) カラムの水平を調整します。

3) カラムの底部フィルターを排気し、カラム底部に1cmの充填緩衝液を保持します。

4) カラム充填器を設置します。通常、充填の高さがカラムの2/3を超える場合、充填器を追加で装着する必要があります。

5) よく攪拌したゲルの懸濁液を一度にゆっくりとカラムに注ぎます。この際、気泡が入らないように注意し、注入後に再度ゲル攪拌棒で均一に混ぜます。

6) カラムヘッドを接続し、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することに注意します (工業用規模のカラムには必要)。カラムヘッドのフィルターの排気を行います。

7) カラムヘッドをカラムに挿入し、カラムヘッドの底部フィルターが液面に接触するようにします。液面とカラムヘッドのフィルターの間の気泡を取り除きます。

8) システムまたは蠕動ポンプを接続し、流速を調整します。圧力を制御し、3barを超えないように注意します。

9) 流速に伴い、クロマトグラフィー媒体の界面が徐々に下降します。クロマトグラフィー媒体の界面が安定するのを待ちます (30分以内に界面がさらに下降しなくなります)。安定したら、界面の位置をマークします。

10) ポンプを停止し、充填器を取り外します (もし使用している場合)。カラムヘッドをクロマトグラフィー媒体の界面まで下げます (マークした位置からさらに0.5 cm下げます)。

11) ポンプを停止する前の流速で、さらに20~30分間、ゲルを圧縮します。クロマトグラフィー媒体の界面が安定した場合、充填が完了です。

カラム評価

1. 柱効測定

可以采用アセトン或者NaCl作为指示剂，按照下表配制指示剂溶液和流动相。

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。

• $HETP = L / N$
• $N = 5.54 \times (VR / Wh)^2$

ここで：

- 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。

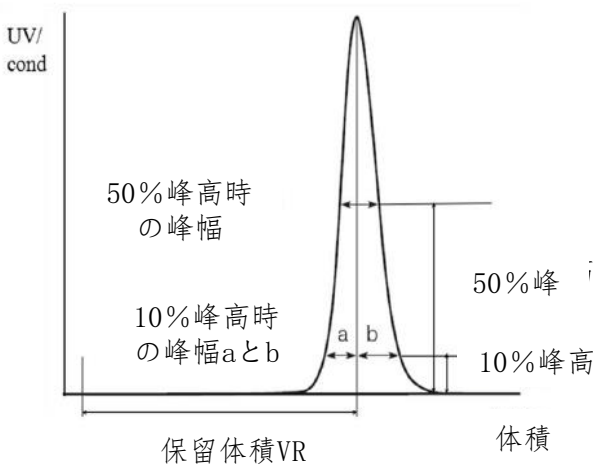


図2. カラム効果評価データの意味

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

効率（柱効）に関しては、原因を分析し、再度カラムを充填する必要があります。異なる用途に応じて、求められるカラム効率は異なります。

a) 精製や分離に高分解能が必要な場合、カラム効率の要件が高くなり、HETPは媒体の平均粒径の2～4倍である必要があります。

b) 成分の分離時には、カラム効率の要件はそれほど高くありません。

クロマトグラフィー方法

NW Rose Plus HPイオン交換クロマトグラフィー媒体は、主にキャプチャー後の中程度の精製と精密精製に使用されます。

1. イオン交換クロマトグラフィー媒体は、生体分子の電荷差異に基づいて分離されます。使用前に、ターゲットサンプルの等電点や電荷状態を十分に理解しておく必要があります。

2. 目的分子の安定性などの特性に応じて緩衝液を選択し、pHを設定します。一般に、カチオン交換では等電点より1 pH低い値、アニオン交換では等電点より1 pH高い値が推奨されます。

3. 実験室用のカラムで、10～20 cmのカラム高さを使用して予備実験を行います。

4. 予備実験の結果を分析し、実験条件を最適化します。

NW Rose Plus Q HP分離精製：

実験条件

- クロマトグラフィー媒体：NW Rose Plus Q HP
- クロマトグラフィーカラム：7.7×100mm, CV4.65ml
- バッファーA：25mM Tris-HCl, pH8.5
- バッファーB：25mM Tris-HCl + 1.0M NaCl, pH8.5
- サンプル：8mg/ml BSA（牛血清アルブミン），5mg/ml α-アミラーゼをバッファーAに溶解

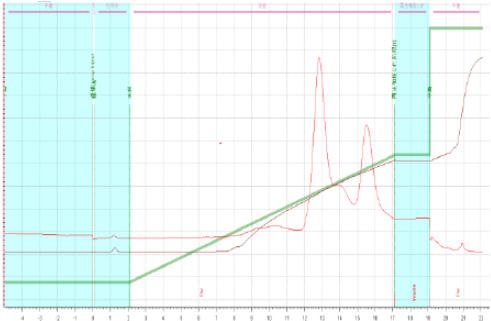


図 1. NW Rose Plus Q HP 分離純化図

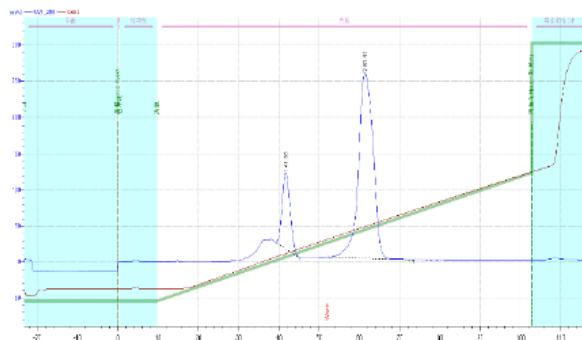


図 1. NW Rose Plus SP HP 分離純化図

NW Rose Plus Q HPおよびNW Rose Plus SP HPは、抗体の研究開発および製造においても非常に高い結合容量を持っています。

標準タンパク質	NW Rose Plus Q HP (mg/mL)	NW Rose Plus SP HP (mg/mL)
IgG	77.5	68.3
BSA	56.2	—
リゾチーム	65.2	—

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、pH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. リボ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 Plus HP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 Plus HP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 Plus HP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 Plus HP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 HPイオン交換クロマトグラフィー媒体製品仕様書

製品型式	容量	製品番号
NW Rose Plus Q HP	25 mL	60023-547000-2025
	100 mL	60023-547000-2100
	500 mL	60023-547000-2500
	1 L	60023-547000-1001
	5 L	60023-547000-1005
	10 L	60023-547000-1010
NW Rose Plus SP HP	25 mL	60023-546800-2025
	100 mL	60023-546800-2100
	500 mL	60023-546800-2500
	1 L	60023-546800-1001
	5 L	60023-546800-1005
	10 L	60023-546800-1010

注：7.7 mm x 22 mm、16 mm x 25 mm、7.7 mm x 100 mmのカラムプリパックも提供可能です。その他の仕様やカスタマイズについてはお問い合わせください。