

NWSuper100&150ゲル濾過クロマトグラフィー媒体

製品紹介

NWSuper100&150は、生体分子の分離・精製に使用されるアガロースゲルクロマトグラフィー媒体です。アガロースを原料とし、高度に架橋されたデキストランから作られた微粒子で、親水性と多孔性を持ち、タンパク質、多糖、核酸などの生体サンプルの高分解能分離と精製によく使用されます。特に、タンパク質の分離に最適なゲル濾過クロマトグラフィー媒体です。

NWSuper100&150ゲル濾過クロマトグラフィー媒体の特徴：

- 均一なゲル粒子で、高い分解能を提供し、通常のカラム効率は12000以上。
- 高速で分離を達成可能。
- 高い化学的・物理的安定性で高収率を実現。
- 簡単にスケールアップして生産可能。

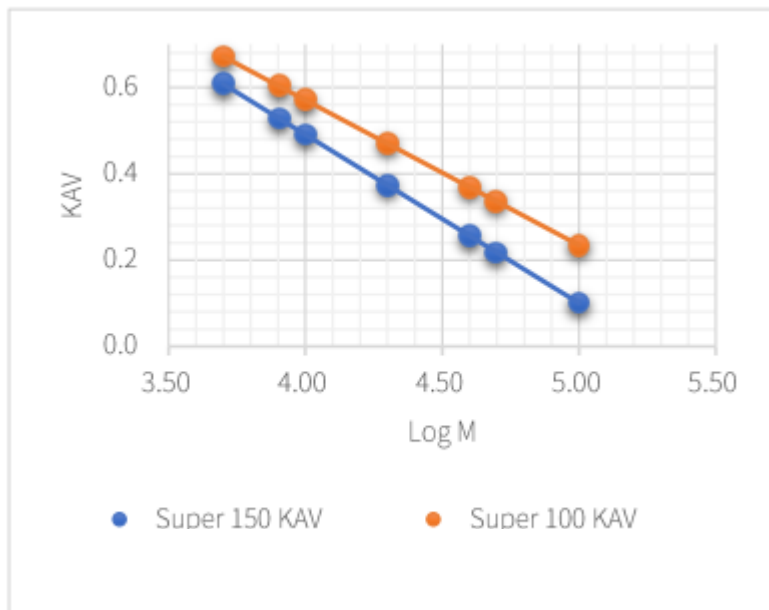


図1. NWSuper100&150標準デキストラン分子量選択曲線。

NWSuper100&150の分離・精製の原理は分子篩原理（モレキュラーシーブまたはゲルろ過原理）であり、分子篩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（ゲルろ過原理）は主に高分解能の分離精製に使用されます。

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。高分解能分離は、サンプルを1つまたは複数の成分に分離することが可能で、例えば、凝集体からモノマーを分離したり、モノマー分子から凝集体を除去したり、分子量や分子量分布の分析に使用されます。注意：天然のタンパク質には立体構造があるため、場合によっては、タンパク質の分子量の大きさと天然構造の大きさが一致しないことがあります。すなわち、いくつかの高分子天然構造のタンパク質は、分子量がわずかに小さい線形分子よりも、ゲルろ過分離の挙動が小さくなる場合があります。

NWSuper100は主に5k-100kDaのタンパク質の分離を目的として設計されており、NWSuper150は主に5k-250kDaのタンパク質の分離を目的としています。

NWSuper100&150のゲルろ過クロマトグラフィー媒体の技術仕様は、表1に示されています。

表 1. NWSuper100&150のゲルろ過クロマトグラフィー媒体の技術仕様

製品型式	NWSuper100	NWSuper150
分離原理	分子篩	分子篩
基材	高架橋アガロースとデキストラン微粒子	
平均粒径（水膨潤時）	24-44μm	
分離範囲（球状分子）	5～100kDa	5～250kDa
最大流速	90cm/h	
流速範囲	30-60cm/h	
耐圧	0.3MPa（最大耐圧0.5MPa）	
pH安定性	3-12（使用時）、1-14（CIP時）	
化学安定性	一般的な水系溶液、1MNaOH、6M塩酸、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	

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：
用途に応じてカラムを選択します。高分解能分離では、通常カラムの高さが60cm以上のカラムが推奨されます。
スケールアップ設計では、通常カラムの高さは変わらず、カラムの直径を大きくします。

2. NW Super 100&150アガロースクロマトグラフィー媒体の準備：

- 2.1 クロマトグラフィーカラムの体積に基づいたNW Super 100&150の匀漿量の計算：
カラムの体積 = カラムの底面積 × カラムの高さ
クロマトグラフィー媒体の量（mLまたはL）= カラム体積 × 媒体の圧縮係数
圧縮係数 = 1.15（通常1.15～1.2の範囲内）

- 2.2 沈降したゲルを均等に混ぜた後、メスシリンダーに入れ、24時間自然沈降させ、スラリー濃度を測定します（新しい媒体のスラリー濃度は70～75%）。
カラムスラリーの量 = カラム媒体量 / スラリー濃度％
カラム媒体のスラリー濃度（沈降したゲル体積とスラリー体積の比率）は、通常50～70%でカラム充填します。スラリー濃度が高すぎると攪拌時に泡が発生しやすく、充填に不利です。逆に、スラリー濃度が低すぎると、カラムに一度に入れられないため、カラム性能に悪影響を与える可能性があります。

- 注意：
- a) クロマトグラフィー媒体は室温で保存するのが望ましいです。ただし、冬季の低温時には、クロマトグラフィー媒体が凍結しないように注意してください。
 - b) カラムを充填する際には、クロマトグラフィー媒体の温度は、充填緩衝液一、クロマトグラフィーカラム、およびクロマトグラフィーシステムの温度と一致させるのが望ましいです。温度変化によって気泡が発生するのを防ぐためです。
 - c) ゲルの攪拌時には、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、媒体粒子が破損する可能性があります。
 - d) 良好なカラム効率を得るためには、クロマトグラフィー媒体を脱気処理するのが望ましいです。通常は負圧で脱気するか、高圧蒸気滅菌法を使用して脱気・滅菌します。
 - e) 20%エタノールで保存する際は、気泡に注意してください。

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、各メーカーの使用手引きを参照してください。（異なるメーカーのクロマトグラフィーカラムでは使用方法が異なり、不適切な

- 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。)
1. カラム充填緩衝液一には、一般的に脱イオン水または0.15M NaCl、平衡緩衝液一を使用します。
 2. クロマトグラフィーカラムを垂直に調整します。
 3. クロマトグラフィーカラムの底部フィルターの空気を抜き、カラム底部には1cmの高さの充填緩衝液一を残します。
 4. 充填器を取り付けます。通常、充填の高さがカラムの2/3を超える場合、充填器を取り付ける必要があります。
 5. 均一に攪拌したゲル懸濁液を、ゆっくりとクロマトグラフィーカラム内に一度に注ぎ入れます。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攪拌します。
 6. カラムヘッドを接続します。カラムヘッドとシステム、または蠕動ポンプの間には必ず圧力計を取り付けてください（カラム充填中の圧力監視が非常に重要です。工業規模のクロマトグラフィーカラムでは圧力計の設置が必要です）。カラムヘッドの膜の空気を抜きます。
 7. カラムヘッドをクロマトグラフィーカラムに挿入し、カラムの底部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。
 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。圧力を制御します（この圧力は、クロマトグラフィーカラムにかかる圧力です）。流速に伴って、クロマトグラフィー媒体の界面が徐々に下がります。
 9. クロマトグラフィー媒体の界面が安定したら（30分以内に界面が下がらなくなった場合）、その位置をマーキングします。
 10. ポンプを停止し、必要であれば充填器を取り外します。カラムヘッドをクロマトグラフィー媒体の界面（マーキングした位置の0.5 cm下）まで下げます。
 11. ポンプ停止前の流速で、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、カラムの充填は完了です。

推奨カラム充填流速
 （実際の流速はクロマトグラフィーシステムおよびカラムによって決定されます。）
 第一段階： 推奨流速30cm/h
 第二段階： 恒圧3～3.5bar

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

カラム評価

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× (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

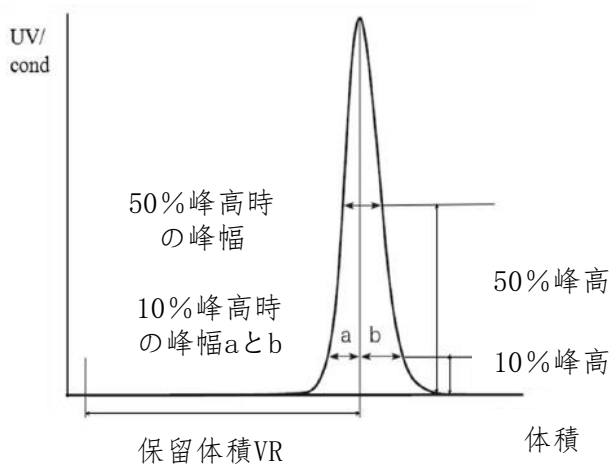
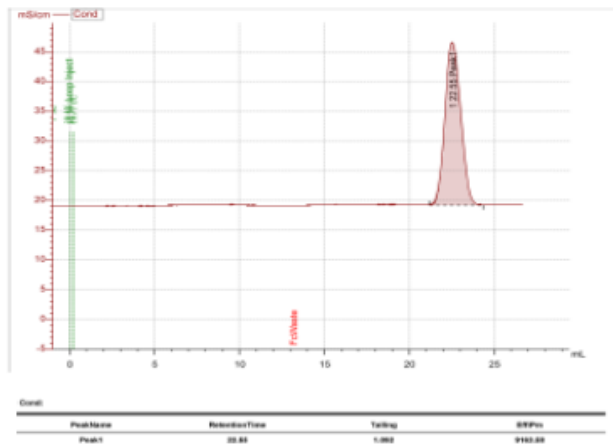


図2. カラム効果評価データの意味



Super100 媒体充填 10/30 クロマトグラフィーカラムのカラム効率

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。

NWSuper 100&150のHETP値は一般的に約8000です。

クロマトグラフィー方法

1. NW Super 100&150の分離原理

NWSuper 100&150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。

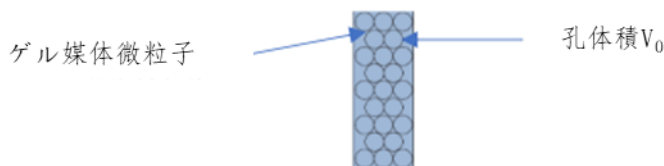


図3. クロマトグラフィーの概略図

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。

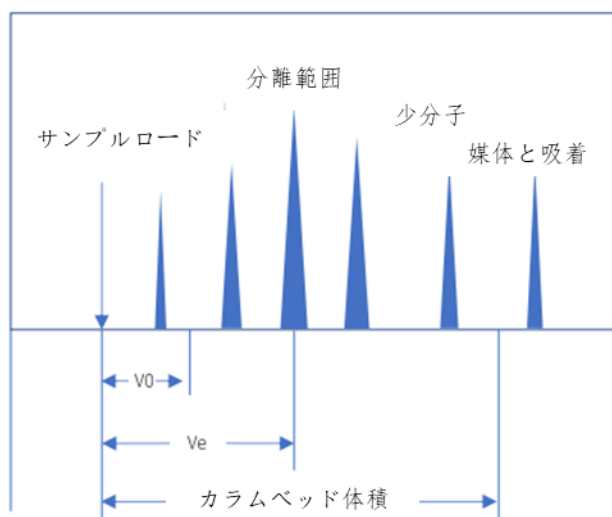


図4. ゲルろ過による分離の概略図

NW Super 100&150はアガロース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。

2. 推奨されるクロマトグラフィーカラム

NW Super 100&150はゲルろ過（分子篩）クロマトグラフィー媒体であり、使用するクロマトグラフィーカラムは分離・精製の規模に基づいて決定されます。

- 実験室規模実験室規模での精製では、処理する試料の量に基づいて決定します。ゲルろ過（分子篩）クロマトグラフィー媒体のサンプル量は、アプリケーションに応じて選択します。高分解能の分離：サンプル量は通常、カラムベッド体積の1～59%の範囲内で、具体的なサンプル量は実験によって決定します。
- 生産規模生産規模のクロマトグラフィーカラムも、試料の量に基づいて選択します。カラムの高さは、実験室での小規模試験のカラムの高さと同じに設定します。

3. NW Super 100&150 推奨される緩衝液

分離・精製プロセス中の緩衝液の選択は、以下の原則に従います。

- 生体分子に安定なpHと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、分離・精製中にサンプルが凝集・沈殿し、クロマトグラフィーカラムのフィルターやクロマトグラフィー媒体が詰まり、カラムの圧力やサンプルの回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、回収率を向上させるために、一般的には緩衝液に0.15Mの塩（例：NaCl）を加えます。
- 有機試薬の添加が可能ですが、高濃度の有機試薬を使用する場合、クロマトグラフィー媒体の微粒子が収縮することがあります。そのため、有機試薬を添加する前にクロマトグラフィー媒体の化学的耐性に注意してください。
- 有機試薬（例：グリセロール）を使用する際は、粘度に注意してください。高粘度の緩衝液は分離・精製の効果に影響を与える可能性があります。サンプルの緩衝液の成分も分離・精製の効果に影響を与える可能性があります。

4. NW Super 100&150 の一般的な手順

- 平衡：クロマトグラフィーカラムを平衡させるために、平衡緩衝液を1～2カラムボリューム

- ーム (CV) 流します。UV、導電率、およびpHの曲線が安定したらサンプルをロードできます。
- サンプルロード：通常、カラムベッド体積の1～5%のサンプルをロードします。
 - 洗脱：平衡緩衝液を使用して洗脱を行い、通常1～1.5 CVです。
 - 洗脱後、試験の要求に応じ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、脱気した20%エタノールを1～1.5 CV使用して保存します。
- 洗浄が必要な場合は、CIP方法に従ってください。

5. 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

長期保存の場合：クロマトグラフィー媒体をカラムから取り出し、20%エタノール (0.01M NaOH) で室温保存し、密封してください。短期保存の場合：カラム内に20%エタノール (0.01M NaOH) を使用して室温で保存できます。

クロマトグラフィーの応用

高分解能分離：

- NW Super™ 75シリーズのアガロースゲルクロマトグラフィー媒体は、一般的に3K-70KDのタンパク質の分離に使用されます。
- 一般的に60cm以上の長いカラムを使用します。
- サンプルのロード量はカラムベッド体積の1～5%です。
- 流速は分解能に大きな影響を与えるため、通常は低速を採用します。
- 150mMのNaClを加えることで、非特異的な吸着を減少させることができます。

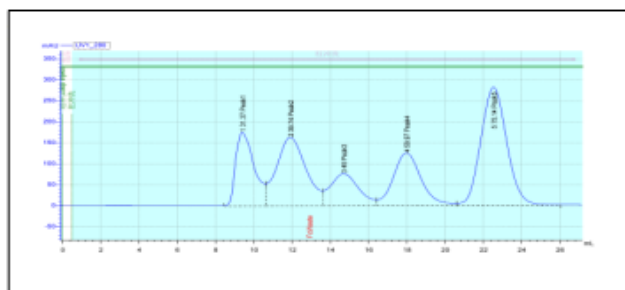


図5. NW Super 150 (16/70カラム、120ml) のクロマトグラフィー図

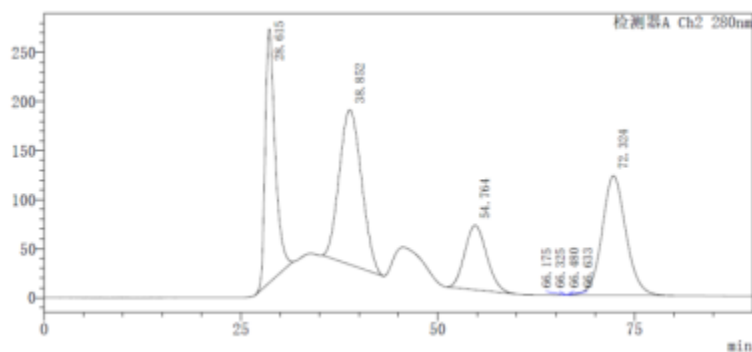


図6. NW Super 100 (10/30カラム、24ml) のクロマトグラフィー図

クロマトグラフィー条件：

- カラム：XK (GE) 16/70 空カラム
- クロマトグラフィー媒体：NW Super 100/NW Super 150
- 緩衝液：50mM PB + 0.15M NaCl, pH7.0
- サンプル：ブルーデキストラン2000 (3mg/ml), BSA (8.0mg/ml), β-ラクトグロブリン (3mg/ml), シトクロムc (1.0mg/ml), ビタミンB12 (0.3mg/ml)
- サンプル量：100 μL
- 流速：1mL/min

サンプル分子量:

- ピーク1: ブルーデキストラン2000, 分子量 2000KDa
- ピーク2: BSA, 分子量 66 KDa
- ピーク3: ラクトグロブリン, 分子量 18KDa
- ピーク4: シトクロムC, 分子量 13.7KDa
- ピーク5: ビタミンB12, 分子量 1.4KDa

クロマトグラフィー媒体の洗浄と再生 (CIP)

NW Super 100&150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 Super 100 & 150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

NW Super 100&150は、乾燥した涼しい場所で密閉し、20%エタノール中で保存します。エタノールの蒸発や微生物の増殖を防ぐために、3か月ごとに新しい20%エタノールに交換することが推奨されます。

廃棄とリサイクル

NW Super 100&150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。

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
3. 1 Mpa=10 bar=14.5 psi

****Q&A****

もしNW Super 100&150ゲルろ過クロマトグラフィー製品の使用中に問題が発生した場合、以下の表を参考にして解決してください。必要があれば、弊社にご連絡ください。

質問 1: クロマトグラフィーの攪拌後に微小な白い泡が浮いてくるのはなぜですか？

回答: この現象は、長期間使用した後や、攪拌中に磁気攪拌器や蠕動ポンプを使用した場合に発生することがあります。これにより、媒体微粒子が破壊されることがあります。また、長期間放置していた媒体を激しく攪拌した場合や、クロマトグラフィー媒体が脱水されすぎた場合に起こります。軽く攪拌し、20～30分放置すれば解消されます。

質問 2: カラム充填時に脱気は必要ですか？

回答: ゲルろ過クロマトグラフィーは、高いカラム効率で最高の分離を達成します。気泡は分離効率に悪影響を与えるため、カラム充填前に脱気を行うことをお勧めします。以下の操作を避けるべきです：

- a) 速い攪拌
- b) 脱水時間が長すぎる
- c) 有機溶媒と水を混合する際の気泡発生
- d) 配管から直接放出された純水の使用
- e) 最適な脱気方法：高圧滅菌、真空脱気

質問 3: 微粒子が破損している場合、使用を続けることはできますか？

回答: 破損が非常に少量（1～3%未満）であれば、顕微鏡で観察し、脱塩などの用途で使用を続けることができます。ただし、破片の量が不明な場合は、新しい媒体に交換することをお勧めします。

質問 4: なぜサンプルが1CV後に現れるのですか？

回答: サンプルがクロマトグラフィー媒体に吸着され、分離がゲルろ過の原理に従っていないことがあります。この場合、まず目的の分離が達成されているかを確認してください。達成されている場合はそのまま使用できますが、達成されていない場合は、洗脱緩衝液の塩濃度を上げてください。一般的に、緩衝液の塩濃度は20～50mMです。

質問 5: 繰り返しサンプルを適用できますか？何回まで可能ですか？

回答: 分離が目的を達成しているか、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。澄んだサンプルであれば、10～15回繰り返し適用することができます。ただし、乳濁液サンプルの場合はカラム圧が上昇する可能性があるため、圧力に注意し、1バールを超えた場合はカラムベッドが圧縮される可能性があります。

質問 6: サンプルが希釈され、濃度が低いのはなぜですか？

回答: ゲルろ過技術自体がサンプルを希釈する技術であり、これは技術の欠点です。サンプルの濃度を上げたり、適用するサンプルの量を増やすことで部分的に解決できます。サンプルの濃縮時には、粘度に注意してください。

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

回答: 媒体の変色や固まりは、サンプルに含まれる色素、脂質、核酸などの物質による汚染が原因です。さまざまなCIP方法を試して解決できます。NW Superシリーズのクロマトグラフィー媒体は、適切に維持すれば通常300～600回使用できますが、サンプルが複雑な場合は100～200回使用できます。

質問 8: 媒体の寿命はどのように判断しますか？

回答:

- 実験室では、カラム圧、流速、色などから寿命を簡単に判断できます。
- 工業生産では、プロセス検証に基づいた方法で寿命を厳密に判断する必要があります。

NW Super 100&150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 Super 100	150 mL	60013-030000-2150
	500 mL	60013-030000-2500
	1 L	60013-030000-1001
	5 L	60013-030000-1005
	10 L	60013-030000-1010
Nw Super 150	150 mL	60013-030100-2150
	500 mL	60013-030100-2500
	1 L	60013-030100-1001
	5 L	60013-030100-1005
	10 L	60013-030100-1010

注記: 7.7 mm × 22 mm、16 mm × 25 mm、7.7 mm × 100 mmのクロマトグラフィー用プレパックカラムを提供可能です。その他の仕様やカスタム要件については、お問い合わせください。