

# **UNO™ Q&S**

## **Continuous Bed**

### **イオン交換カラム**

### **取扱説明書**

ご使用前に

この取扱説明書を十分お読みください。

なお、この取扱説明書は製品の近くに保存し、なくさないようご注意ください。

### **Catalog Numbers**

**720-0001**

**720-0003**

**720-0005**

**720-0021**

**720-0023**

**720-0025**

**BIO-RAD**

## 目 次

1.	はじめに .....	1
2.	支持体構造 .....	1
3.	支持体の安定性 .....	1
4.	製品仕様 .....	1
5.	クロマトグラフィーシステムへの接続 .....	2
6.	準備 .....	2
7.	バッファの選択 .....	3
8.	サンプル調整 .....	4
9.	サンプルのロード .....	4
10.	溶出条件 .....	4
11.	溶出に用いる塩の選択 .....	4
12.	グラジェントの容量と塩濃度 .....	5
13.	界面活性剤の使用 .....	5
14.	クロマトグラフィーのプレラン .....	6
15.	カラムのクリーニング .....	6
16.	フリットの交換 .....	7
17.	カラムの修理 .....	7
18.	保存条件 .....	7
19.	参考文献 .....	7
20.	製品ガイド .....	8

## 1. はじめに

プレパックイオン交換カラムUNOは、クロマトグラフィーを行う研究者の「タンパク質、ペプチド、ポリヌクレオチドなどの生体成分の分離を、高分離能でなおかつ迅速に行える再現性のあるカラムで」という要望を満たすために開発されました。カラムサイズは3種類あり（ベッドボリュームが1.3, 6, 12ml）、サンプル量に合わせたサイズを選ぶことにより、オーバーローディングによる分離能低下させずに最適な分離・精製実験を経済的かつ計画通りにスケールアップすることが可能です。

## 2. 支持体構造

UNOカラムは、強塩基性基(-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)または強酸性基(-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)を持つ“Continuous Bed”支持体でできています。この新しい支持体構造により、高流速そして低バックプレッシャーで生体成分の優れた分離が得られるようになりました。また、この親水性の支持体は生体成分との非特異的結合が非常に少ないため、生物活性の高い回収が可能となります。

## 3. 支持体の安定性

pH耐性、試薬・溶媒耐性をTable 1に示します。

Table 1. カラムの化学耐性

pH耐性	2~12			
試薬・溶媒耐性	~100% エタノール	~8M 尿素	グアニジン-HCl	アセトン
	~100% メタノール	界面活性剤	~100% 酢酸	ヘキサン
	~100% イソプロパノール	~1M HCl	~100% ギ酸	~70% DMSO
	~100% アセトニトリル	~2M NaOH	~1% TFA	

## 4. 製品仕様

UNO Q・Sカラムの仕様をTable 2, 3に示します。

Table 2. UNO Q カラム

	Q-1	Q-6	Q-12
カラムベッドボリューム (ml)	1.3	6	12
推奨する許容タンパク量 (mg)	20	90	180
推奨する流速 (ml/min)	0.5 - 5.0	0.5 - 8.0	0.5 - 10.0
カラムサイズ (mm)	7 x 35	12 x 53	15 x 68
最大圧力 (psi/MPa/Bar)	700 / 4.5 / 48	700 / 4.5 / 48	700 / 4.5 / 48

Table 3. UNO S カラム

	S-1	S-6	S-12
カラムベッドボリューム (ml)	1.3	6	12
推奨する許容タンパク量 (mg)	20	90	180
推奨する流速 (ml/min)	0.5 - 5.0	0.5 - 8.0	0.5 - 10.0
カラムサイズ (mm)	7 x 35	12 x 53	15 x 68
最大圧力 (psi/MPa/Bar)	700 / 4.5 / 48	700 / 4.5 / 48	700 / 4.5 / 48

## 5. クロマトグラフィーシステムへの接続

UNOカラムにはフィッティングキット（2本の0.02 inch ID (1/16 inch OD) テフツェルチューブと2個の1/4 x 28フランジレスフィッティング）が付属しています。フィッティングをチューブの片方の端に装着し、カラムの上下に接続します。お使いのクロマトグラフィーシステムへの接続は、テフツェルチューブの先端に適当なフィッティングを付けて行って下さい。FPLC®、HPLCへの接続は、それぞれFPLC®フィッティングセット、HPLCフィッティングセットを用いて行えますので別途ご注文下さい。また、ご自分でアダプターを用意される場合は、1/16inchODチューブ用のフェラルドナットをご使用ください。

**注意：**ステンレスを接液部に持つ送液システムでハロゲン化塩などを含む腐食性溶出液を使用する条件下では、UNOカラムのご使用はお避けください。またこのような条件下での使用は、保証致しかねます。

カラムの寿命を伸ばし、生物活性の高い生体成分の精製を行うためにも、インナー/バイオコンパチブルな材質（セラミック、PEEK、チタン）の送液システムをお使いください。

## 6. 準備

カラムは0.1M NaClと20%エタノールを含む保存液で満たされています。対イオンはQカラムがCl<sup>-</sup>、SカラムがNa<sup>+</sup>です。初回の使用や長期保存の後の使用時には、以下の手順（ステップ1—5）にしたがってカラムの調整を行って下さい。また、常にHPLCグレードの試薬、フィルターを通し脱気したバッファーを使用して下さい。この操作の間は以下の流速を超えないようにしてください。

S-1 or Q-1	1 ml/min
S-6 or Q-6	2 ml/min
S-1 2 or Q-1 2	3 ml/min

1. 5 ベッド容量の脱イオン水で洗浄します。  
脱イオン水での洗浄中にバックプレッシャーの上昇が起こることがありますが、700 psiを超えないように気をつけてください。
2. 5 ベッド容量の低イオン強度スタートバッファーで洗浄します。  
例えば、Qカラムなら20mM Tris-HClバッファー、Sカラムなら20mM Sodium Phosphateバッファーを使用します。
3. 5 ベッド容量の高イオン強度溶出バッファーで洗浄します。  
例えば、スタートバッファーに1.0M NaClを含むバッファーを使用します。
4. 5 ベッド容量の低イオン強度スタートバッファーで洗浄します。  
例えば、Qカラムなら20mM Tris-HClバッファー、Sカラムなら20mM Sodium Phosphateバッファーを使用します。
5. 使用する流速でカラムの平衡化を行います。

## 7. バッファーの選択

Table 4と5は、一般的に陰イオン交換クロマトグラフィー・陽イオン交換クロマトグラフィーに用いられるバッファーのリストです。陰イオン・陽イオン交換クロマトグラフィーのどちらを行うかは、主に目的のタンパク質の等電点(pI)そしてpHと活性・安定性の関係により決められます。イオン交換の種類が決まれば、タンパク質活性とpHの関係から用いるバッファーの種類とpHを決定します。一般的にpHは、選択したバッファーのpKa値から±0.5pH範囲で使用します。これにより、最大の緩衝能を保ち、可能な限り低濃度のバッファーを用いることができます。大抵の場合は、20mMのバッファーを使用します。

Table4と5に示すように、pKa値はバッファーの温度によって変化しますので、バッファーのpHも同様に変化します。バッファーのpH調整は、実験温度で行うようにしてください。

Table 4. 陰イオン交換クロマトグラフィーのバッファー

pHレンジ	バッファー	分子量	pKa@25°C	対イオン	ΔpKa/°C
5.0 - 6.0	Piperazine	86.1	5.7	Cl <sup>-</sup> /HCOO <sup>-</sup>	-0.015
5.5 - 6.0	L-Histidine	155.2	6.15	Cl <sup>-</sup>	
5.8 - 7.2	Bis-Tris	209.2	6.5	Cl <sup>-</sup>	-0.017
6.4 - 7.3	Bis-Tris Propane	282.3	6.8, 9.0	Cl <sup>-</sup>	
7.3 - 8.3	Triethanolamine	149.2	7.8	Cl <sup>-</sup> /CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	-0.020
7.6 - 8.6	Tris	121.1	8.1	Cl <sup>-</sup>	-0.031
8.4 - 8.8	Diethanolamine	105.1	8.9	Cl <sup>-</sup>	-0.025
9.0 - 9.9	Ethanolamine	61.1	9.5	Cl <sup>-</sup>	-0.029
9.8 - 10.3	1,3-diamino-propane	74.1	10.5	Cl <sup>-</sup>	-0.026

Table 5. 陽イオン交換クロマトグラフィーのバッファー

pHレンジ	バッファー	分子量	pKa@25°C	対イオン	ΔpKa/°C
3.6 - 4.3	Lactic acid	90.1	3.8	Na <sup>+</sup>	-0.015
4.2 - 5.2	Citric acid	192.1	3.1	Na <sup>+</sup>	
5.5 - 6.7	MES	195.2	6.1	Na <sup>+</sup>	-0.011
6.1 - 7.5	PIPES	302.4	6.8	Na <sup>+</sup>	-0.009
6.5 - 7.9	MOPS	209.3	7.2	Na <sup>+</sup>	-0.006
6.7 - 7.6	Phosphate	120(Monobasic) 140(Dibasic)	7.2	Na <sup>+</sup>	-0.003
6.8 - 8.2	TES	229.2	7.4	Na <sup>+</sup>	-0.020
6.8 - 8.2	HEPES	238.3	7.5	Na <sup>+</sup>	-0.014
7.4 - 8.8	Tricine	179.2	8.1	Na <sup>+</sup>	-0.021

バッファーの作成に用いる試薬は、常に高純度のものを使用してください。UV吸収のある不純物が混入している場合、ベースラインが乱れたり、タンパク質のピーク同定に影響を及ぼすことがあります。

## 8. サンプル調整

サンプルのpHとイオン強度を正確に調整することは、再現性のあるクロマトグラフィーにとって非常に重要なことです。最良の結果を得るためにはサンプルのバッファーをスタートバッファーに交換するか、スタートバッファーの濃度まで希釈してください。バッファー交換はサンプル容量に応じて、バイオスピンカラム6、バイオスピンカラム30、エコノパック10DG脱塩カラム、バイオゲルP-6DG、エコノパックP6カートリッジにより行うことができます。

サンプルは遠心、もしくはポアサイズ $0.2\mu\text{m}$ ~ $0.45\mu\text{m}$ のフィルターでろ過を行い、常に粒子状のものを除くようにしてください。濁っていたり、脂質を含むサンプルの使用はカラム寿命を短くします。

## 9. サンプルのロード

UNOカラムにロードできるサンプル量についてはTable 2と3に示してありますが、実際のサンプル組成により若干この値は変わってきます。また、サンプルのカラムへのオーバーロードは、分離能の低下、カラム寿命の減少の原因となりますので行わないで下さい。大量のサンプルロードを行いたいときは、サイズの大きいカラムに変更するか、一度にロードする量を減らし、クロマトグラフィーを数回にわけて行って下さい。UNOカラムは高流速でも再現性のある分離能を示しますので、数回のクロマトグラフィーを行っても短時間で終了します。

理想的には、サンプルはカラムトップ部分に濃縮ゾーンを形成して結合しますが、大量のサンプルをロードした場合には、ブロードな結合ゾーンを形成します。このブロードなゾーンでは弱い極性を持つ物質はより強い極性を持つ物質で置換されますので、結果としてピークはグラジェントの早い溶出位置にシフトすることもあります。

## 10. 溶出条件

一般的にイオン交換クロマトグラフィーでは連続またはステップグラジェント溶出による塩濃度の上昇により分離を行います。溶出バッファーの塩濃度の変更に加えてさらにpHの変更を行うことにより、高い分離能を得ることが期待されます。一般的に、最初は目的とするタンパク質がグラジェントの早い段階で溶出するpHとイオン強度を選択するのが良いとされています。特に、不安定なタンパク質の分離の場合、遅い溶出ポイントでは溶液が高塩濃度化するという点からも、早い段階での溶出の有効性を示しています。

## 11. 溶出に用いる塩の選択

最も一般的に溶出に用いられる塩としては塩化ナトリウムと塩化カリウムがあげられ、もちろんこれらの塩はUNOカラムでもご使用いただけます。他のイオンも使用できますが、溶出強度、カオトロピック作用により違った選択性を示すかもしれません。

イオン種による溶出強度の違いを次に示します。

### Cations for UNO S Columns

Barium > Calcium > Magnesium > Potassium > Sodium > Lithium

### Anions for UNO Q Columns

Citrate > Sulfate > Iodide > Chloride > Formate > Acetate

クロマトグラフィーにおけるイオン選択についてのさらに詳しい説明は、文献1を参照してください。

## 12. グラジェントの容量と塩濃度

UNO S、UNO Qカラムで生体成分の分離を行うにあたっては、まず最初に10ベッド容量以上の単純なグラジェント設定で流すことをお勧めいたします。

プロトコール：Table 2, 3に示されたレンジ内の流速を使ってください。サンプルのアプライ後、4ベッド容量のスタートバッファーAで未結合タンパク質を洗い流します。溶出は10ベッド容量で0.5M NaCl(50% B)までのグラジェントで行います。続いて4ベッド容量で塩濃度を1.0M NaCl(100% B)まであげた後、さらに同濃度で4ベッド容量流します。その後5ベッド容量のスタートバッファーAでカラムを再平衡化します。Fig.1は、グラジェントの一例を表しています（文中の容量とは異なります）。一度最初の分離を行い、目的のタンパク質の溶出ポイントが決まったら、グラジェント組成と容量を最も分離能が高くなるよう調整してください。大抵の場合、グラジェントの容量はカラム容量1ml当たり10ml~20mlで十分です。

グラジェントの傾きは分離能に影響します。急なグラジェントで溶出した場合は、ピーク容量は比較的少なくなりますが、各ピーク間の距離が短くなります。逆に緩やかなグラジェントで溶出した場合は、非常に良い分離能を発揮しますが、ピーク容量が大きくなります。

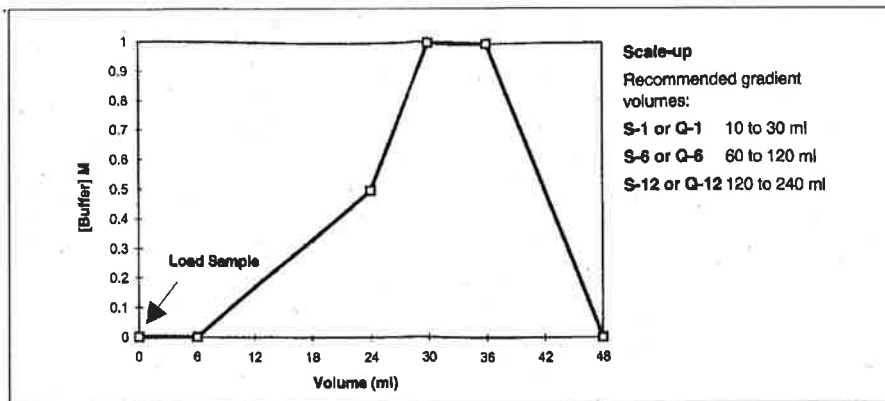


Fig.1. UNO Q・Sカラムのグラジェント溶出

## 13. 界面活性剤の使用

UNO Qカラムには陽イオン性または非イオン性界面活性剤を、UNO Sカラムには陰イオン性または非イオン性界面活性剤を使えます。Triton X-100を使用される場合は、還元型のもを使いますとUV吸収による影響を抑えることができます。サンプルのアプライの前に界面活性剤の入ったバッファーでカラムを平衡化しておくことはもちろんですが、その際のpHの変動には特に注意してください。pHは様々なクラスの界面活性剤の溶解度に影響を与えます。臨界ミセル濃度(CMC)以下の界面活性剤入りバッファーを使用した場合は、塩グラジェントでの溶出時に問題が発生するかもしれません。塩濃度が上昇するとCMCが下降しミセルが形成され、このミセル自体が光を散乱させ、UVのベースラインが突然上昇するようになります。よって、グラジェントによる溶出を行う際の界面活性剤は、CMC以上に調製するようにしてください。もしその後のクロマトグラフィーステップ（例えば疎水性相互作用を利用したもの）や他の生化学的操作に界面活性剤が影響するような場合は、界面活性剤を除く方法の選択が必要です。

生物学、生化学における種々の界面活性剤の特性、使用やサンプルからの除去など

## 14. クロマトグラフィーのプレラン

サンプルをロードする前にカラムがクリーンであるかチェックするためにブランクグラジェントをかけてください。更に、界面活性剤や他の成分がグラジェント溶出中にUV吸収のあるシャープなピークとして溶出されるのかどうか、クロマトグラムの解析で紛らわしくならないかをチェックをしてください。

## 15. カラムのクリーニング

サンプルとバッファーを調製（特にフィルタをろ過）することによりカラムの性能と寿命が維持されます。通常、1.0M NaClかKClを使用すれば、カラムに結合している大抵の物質は洗浄できます。しかしながら、もしバックプレッシャーの増加や分離能の著しい低下など、カラム性能の大きな低下が見られた場合は、さらに次に示す方法（ステップ1-8）でカラムクリーニングを行ってください。

この操作中、常にバッファーを逆方向に流すことで、カラムの上部に強く結合してしまったような物質を取り除ける可能性があります。

この操作の間は以下の流速を超えないようにしてください。

S-1 or Q-1	1 ml / min
S-6 or Q-6	2 ml / min
S-12 or Q-12	3 ml / min

- 2 ベッド容量の脱イオン水で洗浄します。この洗浄中にバックプレッシャー値が上昇するかもしれませんが、700psiを超えないように注意して行ってください。
- 2 ベッド容量の2.0M NaClまたはKClで洗浄します。
- 1 ベッド容量の2.0M NaOHで洗浄した後、3 ベッド容量の0.1M NaClで洗浄します。
- 1 ベッド容量の50%酢酸で洗浄した後、3 ベッド容量の0.1M NaClで洗浄します。
- 1 ベッド容量の脱イオン水で洗浄します。
- もし脂質の混入が問題となっている場合は、1 ベッド容量のメタノールで洗浄後、3 ベッド容量の0.1M NaClで洗浄します。
- 2 ベッド容量の2.0M NaClまたはKClもしくは使用する対イオンを含む塩溶液で洗浄します。
- 上部フリットを交換し、3 ベッド容量のスタートバッファーで洗浄します。

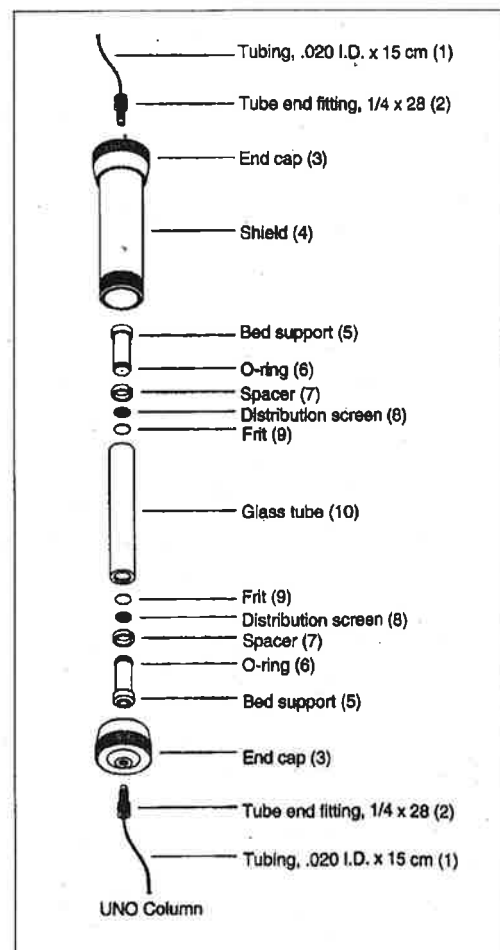


Fig.2. UNOカラムの構成部品



## 16. フリットの交換

バックプレッシャーの増加が見られた時や、何回かカラムを使用し、性能の低下が見られたときには、上部フリットとスクリーンを交換することをおすすめします。UNOカラムには、フリットリムーバルツールとポリエチレンフリット、ディストリビューションスクリーンが付属しています。スクリーンにはサンプルをカラム表面全体へ均一に拡げる働きとフリットの前フィルターとしての働きがあります。したがってフリットを交換する際には、同時にスクリーンも交換して下さい。

## 17. カラムの修理

樹脂ベッド上部の詰まり・汚れが前述のクリーニング処理をしても解消しない時は、ベッドの数ミリをベッドリムーバルツールで除去します。このツールを使うとベッドの4mmが除去されます。ベッド部分の除去に関する詳しい説明はツールに付属されているインストラクションシートを参照してください。ベッドの不要な部分を除去したら、新しいフリットとディストリビューションスクリーンを挿入して下さい。ベッドサポート上部、下部の黒色のスペーサーは、ベッドサポートをガラスチューブに再挿入する前に取り除いてください。この操作によりベッドが正常な性能を示す状態になります。このカラム修理操作は一度だけ行えます。この操作を行ってもカラムのバックプレッシャーがまだ高いようでしたら、UNO交換カラムの購入をお奨めします。

## 18. 保存条件

長期保存の前には、前述のカラムのクリーニングを行い、微生物の繁殖を防ぐために3ベッド容量の20%エタノールで洗浄してください。カラムは室温で安全な場所に保管して下さい。絶対にカラムを凍らせないようにしてください。

## 19. 参考文献

1. Kopaciewicz, W., Rounds, M. A., Fausnaugh, J. and Regnier, F.E., Retention Model for High-performance Ion-Exchange Chromatography. *J. Chromatography*, **266**, 3-21 (1983).
2. A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry. J. Newgebauer (Calbiochem Biochemicals).

## 20. 製品ガイド

カタログ番号	品名	内容
<b>UNOカラム</b>		
720-0001	UNO Q-1カラム	1ml Qカラム・フィッティング(B)
720-0003	UNO Q-6カラム	6ml Qカラム・フィッティング(B)
720-0005	UNO Q-1 2カラム	12ml Qカラム・フィッティング(B)
720-0021	UNO S-1カラム	1ml Sカラム・フィッティング(B)
720-0023	UNO S-6カラム	6ml Sカラム・フィッティング(B)
720-0025	UNO S-1 2カラム	12ml Sカラム・フィッティング(B)
<b>交換カラム (カラムのガラスチューブ部分のみの交換用)</b>		
720-0011	UNO Q-1交換カラム	1ml Q交換カラム・パーツ(C)
720-0013	UNO Q-6交換カラム	6ml Q交換カラム・パーツ(C)
720-0015	UNO Q-1 2交換カラム	12ml Q交換カラム・パーツ(C)
720-0031	UNO S-1交換カラム	1ml S交換カラム・パーツ(C)
720-0033	UNO S-6交換カラム	6ml S交換カラム・パーツ(C)
720-0035	UNO S-1 2交換カラム	12ml S交換カラム・パーツ(C)
<b>UNOカラム+同種交換カラム</b>		
720-0001S	UNO Q-1カラムセット	1ml Qカラム&交換カラム・フィッティング&パーツ(D)
720-0003S	UNO Q-6カラムセット	6ml Qカラム&交換カラム・フィッティング&パーツ(D)
720-0005S	UNO Q-1 2カラムセット	12ml Qカラム&交換カラム・フィッティング&パーツ(D)
720-0021S	UNO S-1カラムセット	1ml Sカラム&交換カラム・フィッティング&パーツ(D)
720-0023S	UNO S-6カラムセット	6ml Sカラム&交換カラム・フィッティング&パーツ(D)
720-0025S	UNO S-1 2カラムセット	12ml Sカラム&交換カラム・フィッティング&パーツ(D)
<b>カートリッジカラム</b>		
720-0009	UNO Qミニカートリッジカラム	0.2ml Qカートリッジカラム・フィッティング(A)
720-0029	UNO Sミニカートリッジカラム	0.2ml Sカートリッジカラム・フィッティング(A)
<b>システムフィッティング</b>		
750-0567	M6 Fitting kit(FPLC <sup>®</sup> 接続用)	Nut(2), Ferrule(4)
750-0568	10-32 Fitting kit(HPLC接続用)	Nut(2), Ferrule(4)
751-0099	Fitting kit for Bio-Scale & UNO	Super Flangeless Nut(1/4x28 threads)(2), Ferrules(6) & Flangeless M6 Nut(2) & Ferrules(4), Cap(2) & Fingertight II fitting(10-32 threads)

### フィッティング(A)

1/16x1/4-28 Flangeless Fitting(2),  
1/16 Flangeless Ferrule(2),  
1/16 Tefzel Tube 15cm(2)

### パーツ(C)

Distribution Screen (2), Frit(2), O-ring(2),  
Frit Remover(1)

### フィッティング(B)

1/16x1/4-28 Flangeless Fitting(2),  
1/16 Flangeless Ferrule(2),  
1/16 Tefzel Tube 15cm(2),  
Distribution Screen (2), Frit(2),  
O-ring(2), Frit Remover(1)

### フィッティング&パーツ(D)

フィッティング(B)+パーツ(C)

カタログ番号	品名	内容
バッファー交換カラム		
732-6002	バイオスピンカラム6	25本
732-6213	バイオスピンカラム6	1000本
732-6006	バイオスピンカラム30	25本
732-6216	バイオスピンカラム30	1000本
732-2011	エコノパック10DG脱塩カラム	10本
732-2010	エコノパック10DG脱塩カラム	30本
150-0738	バイオゲルP-6DG	100g
150-0739	バイオゲルP-6DG	1kg
732-0011	エコノパックP-6カートリッジ	5ml x 1本
732-0015	エコノパックP-6カートリッジ	5ml x 5本
イオン交換クロマトプロテインスタンダード		
125-0561	陰イオンクロマトプロテインスタンダード	6バイアル
125-0562	陽イオンクロマトプロテインスタンダード	6バイアル
交換フリットキット		
751-0091	Replacement Part Kit for Bio-Scale2 & UNO1	Frit(5), Distribution Screen(5), O-ring(2), Frit Remover(1)
751-0095	Replacement Part Kit for Bio-Scale10 & UNO6	Frit(5), Distribution Screen(5), O-ring(2), Frit Remover(1)
751-0097	Replacement Part Kit for Bio-Scale20 & UNO12	Frit(5), Distribution Screen(5), O-ring(2), Frit Remover(1)

注) FPLCはアマシャムファルマシアバイオテック社の登録商標です。

○ 製品の学術的なお問い合わせは

Tel : 03-6404-0331    Mail : life\_ps\_jp@bio-rad.com

**バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社**

本社            〒140-0002 東京都品川区東品川 2-2-24  
Tel : 03-6361-7000    Fax : 03-5463-8480  
大阪            〒532-0025 大阪市淀川区新北野 1-14-11  
Tel : 06-6308-6568    Fax : 06-6308-3064  
福岡            〒812-0013 福岡市博多区博多駅東 2-5-28  
Tel : 092-475-4856    Fax : 092-475-4858

M10497 1302B