

HA Ultrogel[®]

ヒドロキシアパタイト・
クロマトグラフィー樹脂



お客様のメリット

- さまざまなプロセスで効果的な精製メカニズム
- 高い多孔性
- 容易な洗浄
- 大規模なバイオプロセスで使用可能

製品情報

HA Ultrogel樹脂は、研究開発規模から製造に至るまで、生体分子を分離するためのヒドロキシアパタイト・アガロース複合樹脂です。

ヒドロキシアパタイト・クロマトグラフィーは、「疑似親和性」クロマトグラフィーまたは「混合モード」イオン交換であるとみなされています。さまざまなプロセスにおける効果的な精製メカニズムであることが実証されており、従来型のイオン交換または疎水性相互作用手法をさらに補完する生体分子選択性を提供します。HA Ultrogelは、容易に拡張可能で、研究規模をはじめマルチリットル・カラム・アプリケーションで使用されています。

樹脂の概念

HA Ultrogelヒドロキシアパタイト樹脂は、架橋アガロース・ビーズと、アガロース・メッシュに取り込まれたヒドロキシアパタイトの微結晶で構成されています。粒径サイズは、60～180 μmの範囲です。HA Ultrogelのアガロース部分は、強アルカリ性の条件下でエピクルヒドリンによって化学的に安定化されます。これによって、多糖鎖間にグリセロール・ブリッジが形成され、樹脂に優れた剛性と、pHやイオン強度の変化および高温に対する安定性をもたらします。HA Ultrogelは、再生と浄化のために、0.1M NaOHを用いて定期的に処理することができます。

HA Ultrogelの多孔性はアガロース・ゲルに匹敵し、球状タンパク質の排除限界は5,000,000ダルトンです。このマクロな多孔性によって、分離中の分子ふるい効果が回避されます(図1参照)。

樹脂は、20%エタノール含有の1 M NaClで出荷され、広範なパッケージ・サイズで入手可能です。ご要望に応じて、特定の製造要件を満たすための特殊なパッケージもご利用可能です。

表1. HA Ultrogelの主な特性。

粒径	60～180 μm
ヒドロキシアパタイト含有量	40 %
アガロース (重量/体積)	4 %
排除限界	> 5,000,000 dt
稼働および洗浄pH	pH 5～13
シトクロムc*の容量	> 7 mg/mL
BSA**の容量	< 7 mg/mL

* 1 mMリン酸バッファーで50/50に希釈された5 mg/mLのシトクロムcを用いて測定された (pH 6.8, 30 cm/h)。

** 1 mMリン酸バッファーで50/50に希釈された1 mg/mLのBSAを用いて測定された (pH 6.8, 12.5 cm/h)。

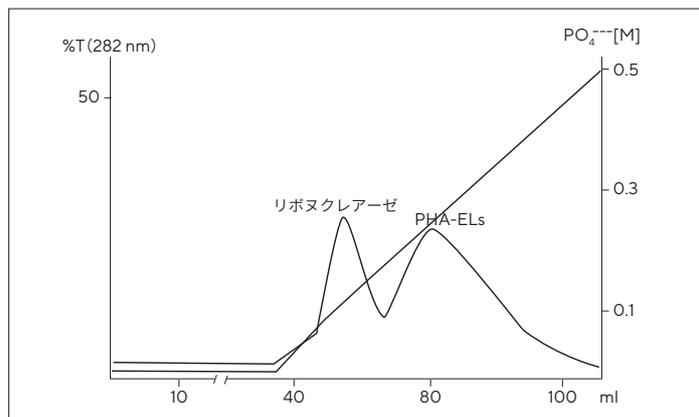


図1. リボヌクレアーゼとPHA-ELの混合物の分離。

カラム: 1.6 x 6.5 cm、サンプル: 5 mMリン酸カリウム (pH 6.8) 1 mL中、リボヌクレアーゼ (MW 14,700) とインゲン豆由来PHA-EL (赤血球凝集性とリンパ刺激性の植物性ヘムアグルチニン) (MW 128,000) のタンパク質混合物 1 mg、溶離勾配: pH 6.8の5 mM～500 mMのリン酸カリウム、流速: 14.4 cm/h。

安定性

HA Ultrogel樹脂使用での推奨される流速は、カラムの形状と分離段階 (捕捉、溶出、または洗浄のどのステップか) によって異なります。現在、プロセス規模では、標準的な30～200 cm/hの流速がマルチリットル・カラム・サイズに適用されています。

ヒドロキシアパタイト結晶は、pH 4未満で錯化剤を含む溶液を除き、本質的に大半の化学薬品に対する耐性を備えています。ヒドロキシアパタイトは酸性溶液によって溶解されますが、EDTA、クエン酸塩、その他の錯化剤は樹脂の吸着容量を減少させます。錯化剤は、母材に不可逆的に結合した特定の化合物を脱離する必要がある場合など、極端なケースで使用されることがあります。

HA Ultrogel樹脂は、変性剤に対する耐性を備えています。8 M尿素、6 M Guanidinium塩酸塩、1% SDS、および3 M KSCNなどのカトピック剤によって処理できます。

HA Ultrogel樹脂のアガロース部分は、強アルカリ媒体内でエピクルヒドリンと架橋することで化学的に安定化されます。HA Ultrogel樹脂はアルカリ性条件下で安定し、再生とパイロジェン除去のために、0.1 M水酸化ナトリウムで定期的に処理することができます。

HA Ultrogel樹脂は、ヒドロキシアパタイト結晶の性質上、pH 4未満の溶液では取り扱わないでください。

HA Ultrogel樹脂は高温 (最高121°C) で安定しています。クロマトグラフ特性を変化させることなく、オートクレーブ処理による殺菌ができます。ただし、沈殿することのあるリン酸塩の存在を回避するために、pH 7の緩衝化された状態で操作する必要があります。

HA Ultrogel樹脂は、決して凍結しないでください。

アプリケーション

ヒドロキシアパタイト吸着クロマトグラフィーは、生産準備段階から量産規模まで、タンパク質、ペプチド、核酸の分離を含め、さまざまなアプリケーションで使用できます (図2、3、4参照)。

タンパク質の場合、最もよく知られたヒドロキシアパタイトのアプリケーションは、塩基性タンパク質 (シトクロムc、リゾチームなど) とリン酸化タンパク質の分離です。HA Ultrogel樹脂は、ヒト血清タンパク質とレクチンなどの植物性タンパク質、糖タンパク質、グリコシダーゼ、ホスホリパーゼ、スルホヒドロラーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、およびキナーゼ類の分離に使用できます。

リン酸塩含有の樹脂として、HA Ultrogelはリン酸依存性タンパク質および酵素とDNA依存性酵素の分離に使用できます。

HA Ultrogel樹脂は、リン酸バッファーで分離することで、ワンステップ・クロマトグラフ精製におけるIgG精製向けの効率的なツールとなります。このアプローチは、酸性溶液での従来の溶出に比べ非常に穏やか（中性pH、生理的条件）で、抗体の生物活性を保護します。

HA Ultrogelは、以下の分離に使用されています。

- 合成ポリペプチド（ポリ-L-グルタミン酸、ポリ-L-アスパラギン酸などの酸性ポリペプチド）。
- ポリ-L-リジン、ポリ-L-オルニチンなどの塩基性ポリペプチド。
- ポリ-L-プロリンなどの中性ポリペプチド。

転移RNAおよびDNAの低分子量グリオキシル酸類縁体を含むさまざまなタイプの核酸を対象に、再現性、安定性、信頼性を備えた分離を行うために使用できます（図2、3参照）。

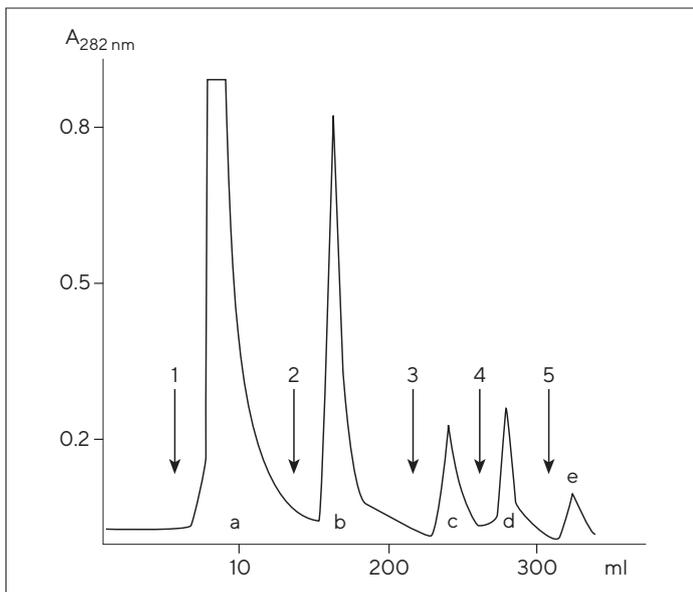


図2. そばの酵素粗抽出成分からのグリコヒドロラーゼの分離。

カラム：2 x 6 cm、サンプル：1 mMリン酸バッファー（pH 6.8）1 mL中、凍結乾燥抽出成分40 mg、リン酸バッファーの不連続な溶離勾配、流速：7.1 cm/h、温度：4°C。ピークa：グリコヒドロラーゼ活性のないタンパク質、ピークb：β-グルコシダーゼ。R. Rourbouze & F. Percheronの厚意によりBiochemistry Lab., Faculty of Pharmacy, Parisから転載。

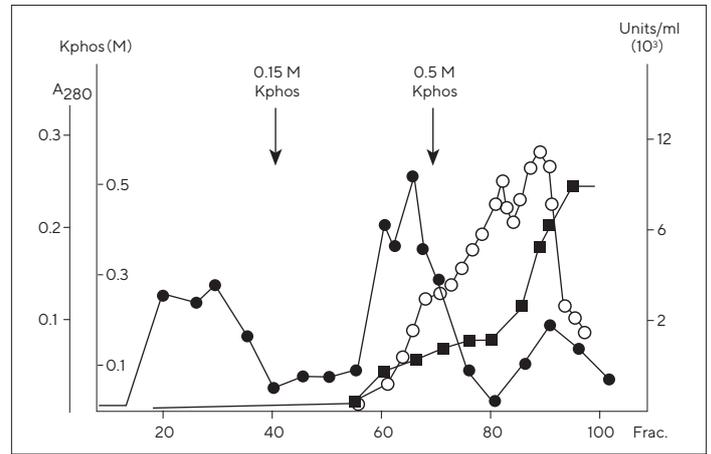


図3. ヒト胎盤からの損傷特異的なDNA結合タンパク質の精製。

サンプルは、硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過によって、ヒト胎盤から予備精製されました。

カラム：2.5 x 6 cm、初期バッファー：5%グリセロールと13 mM 2-メルカプト-エタノール含有10 mMリン酸カリウム（pH 8）、1回目の溶出（矢印）：0.15 Mリン酸カリウム・バッファー、2回目（矢印）：0.5 Mリン酸カリウム・バッファー、画分体積：1.8 mL。●-● A280 nm ■-■ DNA結合活性。○-○ 伝導度。R.S. Feldberg他の厚意によりJ. Biol. Chem. 257 (1982) 6394-401から転載。

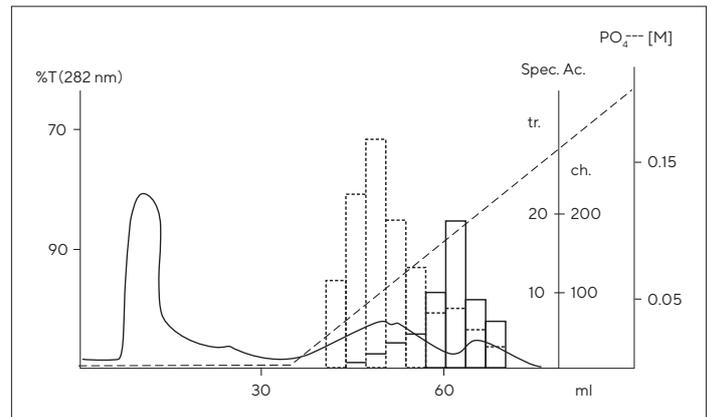


図4. 豚の膵酵素抽出成分からのトリプシンおよびキモトリプシンの分離。

カラム：1.6 x 5 cm、サンプル：5 mMリン酸バッファー（pH 6.8）1 mL中、タンパク質30 mg、勾配：5 ~ 200 mMリン酸ナトリウム（pH 6.8）、流速：10 cm/h、温度：10°C、破線のヒストグラム：トリプシン活性、実線のヒストグラム：キモトリプシン活性、Spec. Ac.：比活性（U/mg）、tr：トリプシン、ch：キモトリプシン。トリプシン活性は、主に50 mMリン酸ナトリウムによって溶出されたピークに確認され、キモトリプシンは100 mMリン酸ナトリウムによって溶出されました。最終収率は約50%でした。

参考文献

1. Séné, C.他、ChimicaOggi 8 (1990) 30。
2. Galand, G.、Biochim. Biophys. Acta 789 (1984) 10。
3. Huitorel, P.他、Eur. J. Biochem. 144 (1984) 233。
4. Fournier, N.他、Biochem. Biophys. Res. Commun. 111 (1983) 326。
5. Ek, K.他、J. Biochem. Biophys. Meth. 8 (1983)。
6. Rousson, R.他、Biochimie 65 (1983) 115。
7. Nari, J.他、Plant Sci. Lett. 28 (1983) 307。
8. Gegenheimer, P.他、J. Biol. Chem. 258 (1983) 8365。
9. Ait, N.他、J. Gen. Microbiol. 128 (1982) 569。
10. Nelson, W.J.およびTraub, P.、J. Biol. Chem. 257 (1982) 5544。
11. Verger, R.他、Biochemistry 21 (1982) 6883。
12. Feldberg, R.S.他、J. Biol. Chem. 257 (1982) 6394。
13. Leblanc, J.P.他、J. Biol. Chem. 257 (1982) 3477。
14. Sim, R.B.およびDiscipio, R.G.、J. Biochem. 205 (1982) 285。
15. Ryan, D.E.他、Arch. Biochem. Biophys. 216 (1982) 272。
16. Degranges, C.他、Biochim. Biophys. Acta 654 (1981) 211。
17. Rowe, T.C.他、J. Biol. Chem. 256 (1981) 10354。
18. Akiki, C.他、J. Chrom. 188 (1980) 435。
19. Monsigny, M.他、Eur. J. Biochem. 98 (1979) 39。
20. Monsigny, M.他、Biochimie 60 (1978) 1315。

発注情報

製品	サイズ	発注コード
HA Ultrogel	25 mL	24775-082
HA Ultrogel	100 mL	24775-025
HA Ultrogel	500 mL	24775-017
HA Ultrogel	1 L	24775-041
HA Ultrogel	10 L	24775-058
HA Ultrogel	20 L	24775-066

お問い合わせ先

詳細については、www.sartorius.comをご覧ください。

ザルトリウス・ステディム・ジャパン株式会社

営業部

Phone : 03 6478 5201 | Fax : 03 6478 5495

www.sartorius.com

〒140-0001 東京都品川区北品川1-8-11 Daiwa品川Northビル4階

※製品仕様は予告なく変更される場合があります。