

PROTEUS Protein A Mini Kit 簡易取扱説明書

キット内容(PC-MAK16)

- ・プレパックレジンプラグ(プロテイン A 結合アガロースビーズカラム) 16 個
- ・プレパックレジン用バレル(アングルローター使用で容量 0.65mL) 16 個
- ・2.2mL マイクロチューブ 32 個
- ・1x Binding Buffer(Buffer A) 250mL×1 本
- ・1x Elution Buffer(Buffer B1) 125mL×1 本
- ・1x Elution Buffer(Buffer B2) 125mL×1 本
- ・Neutralization Buffer(Buffer C) 30mL×1 本
- ・10kDa MWCO 限外濾過カラム 16 個
- ・プラグ挿入用器具 1 本
- ・取り扱い説明ハンドブック

保存

プレパックレジンプラグは、2~8℃で保存して下さい。他は室温保存で問題ありません。(バッファー各種は、0.1%アジ化ナトリウムを含んでおります。)

プレパックレジンプラグを凍結させたり、室温保存しないようにご注意ください。

他の使用器具

- ・フィルターユニット:0.2 μm のシリンジフィルター(サンプルの前処理に使用します。)
例) Millipore 社 0.2 μm Steriflip GP unit(カタログ番号 SCGP 005 25)
- ・マイクロピペット
- ・2.2mL マイクロチューブに適合した遠心機

使用方法

1. レジンプラグの挿入

プレパックレジンプラグを、挿入用器具でバレルに押し込みます。英文の簡易取扱説明書に記載された図をご参照下さい。

2. スピнкаラムの平衡化(合計遠心時間=2 分間)

0.65mL の Binding Buffer A を、1 の操作で組み立てたスピнкаラムに入れ、1,800 × g で 1 分間遠心します。

この平衡化の操作を、もう一回繰り返します。

3. サンプルの前処理

1mL のサンプルを、0.2 μm シリンジフィルターに通し、細胞の残渣などを除去します。

ご注意※

腹水、血清、細胞培養上清では、保存や凍結・融解の繰り返しによるタンパク質の沈殿が起こります。あらゆるクロマトグラフィーにおいて、サンプルをカラムにローディングする直前に 0.2 μm シリンジフィルターに通す操作が重要です。

4. サンプルローディング(合計遠心時間=6 分間)

サンプルを Binding Buffer A で 1:1 の割合で希釈します。(v/v; 例として、0.5mL のフィルター処理済みサンプルと 0.5mL の Binding Buffer A を混合する)

チューブの蓋を閉めて 3~4 回転倒混和します。希釈したサンプルを 0.65mL 取り、スピнкаラムにローディングします。スピнкаラムを 640 $\times g$ で 6 分間遠心します。

ご注意※

スピнкаラム内にサンプルが残っている場合は、遠心時間または遠心力を増やして下さい。

5. カラムの洗浄(合計遠心時間=6 分間)

スピнкаラムに 0.65mL の Binding Buffer A を入れ、1,800 $\times g$ で 2 分間遠心し、プラグに結合しなかった不要物を洗い流して除去します。この操作をあと 2 回繰り返します。

～ここから先の溶出操作は、抗体の種類によって次のように進めて下さい。～

・マウス IgG1、ラット IgG1、ラット IgG2a、ラット IgG2b、ウシ IgG1…[手順 6→7](#)

・上記以外の IgG、マウス IgG2a、マウス IgG2b、マウス IgG3、ラット IgG2c、ヒト IgG1-IgG4、ウサギ IgG、モルモット IgG1、モルモット IgG2、ウシ IgG2 など、他の IgG…[手順 7](#)

6. 新しいマイクロチューブに 25 μL の Neutralization Buffer C を入れておき、そこにスピнкаラムを移します。スピнкаラムに 0.5mL の Elution Buffer B1 を入れ、1,800 $\times g$ で 2 分間遠心して IgG を溶出します。チューブを穏やかに振って溶出液と Neutralization Buffer C を完全に混合します。

この 6 の操作をもう一度繰り返します。

※ご注意

精製抗体を濃縮して回収したい場合、2 回分の溶出画分を合わせないでください。

7. 新しいマイクロチューブに 65 μL の Neutralization Buffer C を入れておき、そこにスピнкаラムを重ねます。スピнкаラムに 0.5mL の Elution Buffer B2 を入れ、1,800 $\times g$ で 2 分間遠心して IgG を溶出します。チューブを穏やかに振って溶出液と Neutralization Buffer C を完全に混合します。

この 7 の操作をもう一度繰り返します。

※ご注意

精製抗体を濃縮して回収したい場合、2 回分の溶出画分を合わせないでください。

8. 精製抗体の脱塩と濃縮

必要に応じて、10kDa MWCO 限外濾過カラムで抗体の脱塩と濃縮を行います。抗体を 2~8°C で保存する場合は、0.05~0.2%(w/v) のアジ化ナトリウムを加えて下さい。長期保存には、10~50% のグリセロールを加え、少量ずつに分注して -20°C で凍結保存することをお勧めします。

9. プロテイン A ミニプラグの再生

スピнкаラムに 0.65mL の Elution Buffer B2 を加え、 $1,800 \times g$ で 2 分間遠心してミニプラグを洗浄します(洗浄は 2 回行います)。続いて、スピнкаラムに 0.65mL の Binding Buffer A を加え、同様の遠心操作を 2 回行います。

すぐに次の精製を行う場合は、再び手順 1 から操作を進めて下さい。

また、再生したプラグは保存することもできます。エンドキャップを外したままで、Binding Buffer A か、0.1%アジ化ナトリウム溶液(超純水で調製)に浸し、次の使用まで $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存して下さい。