

## PROTEUS Protein G Mini Kit 簡易取扱説明書

### サンプルキット内容(PC-MGK16)

- ・プレパックレジンプラグ(プロテイン G 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 G) 250mL×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°C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ご注意ください。

### 他の使用器具

- ・フィルターユニット:0.2  $\mu\text{m}$  (25mm 直径) 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  $\mu\text{m}$  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ている図をご参照下さい。

#### 2. スピнкаラムの平衡化(合計遠心時間=2 分間)

0.65mL の Binding Buffer G 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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 G 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 G 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 G 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。

#### 6. 新しいマイクロチューブに 65 $\mu\text{L}$ 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。チューブを回して溶出液と Neutralization Buffer C を完全に混合します。この 6 の操作をもう一回繰り返します。

※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. 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。

#### 8. プロテイン G 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 G を加え、同様の遠心操作を 2 回繰り返します。

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 G 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 2~8°C で保存して下さい。