

## PROTEUS Protein A Midi Kit 簡易取扱説明書

### キット内容(PC-AK04)

- ・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) 4 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 20mL) 4 個
- ・50mL 遠心チューブ 8 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 4 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  $\mu\text{m}$  と 1.2  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  Steriflip GP unit(カタログ番号 SCGP 005 25)
- ・マイクロピペット
- ・50mL コニカル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=3 分間)

10mL の Binding Buffer A を、1 の操作で組み立てたスピнкаラムに入れ、500×g で 3 分間遠心します。

#### 3. サンプルの前処理

12-15mL のサンプルを、1.2  $\mu\text{m}$  シリンジフィルターで通し、次に 0.2  $\mu\text{m}$  シリンジフィルターに通して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  $\mu$ 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=30 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、10mL のフィルター処理済みサンプルと 10mL 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 20mL 取り、スピнкаラムにローディングします。スピнкаラムを 100  $\times$  g で 30 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 10mL の Binding Buffer A を入れ、500  $\times$  g で 3 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。この操作をもう 1 回行います。

~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. 新しい遠心チューブに 0.5mL 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 10mL の Elution Buffer B1 を入れ、500  $\times$  g で 3 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. 新しい遠心チューブに 1.3mL 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 10mL の Elution Buffer B2 を入れ、500 g で 3 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。

限外濾過カラムの使用方法は別紙をご覧ください。

### 9. プロテイン A ミディプラグの再生

スピнкаラムに10mLの Elution Buffer B2を加え、 $500 \times g$ で3分間遠心してミディプラグを洗浄します。

続いて、スピнкаラムに10mLの Binding Buffer Aを加え、同様の遠心操作を行います。

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2~8°Cで保存して下さい。