

PROTEUS Protein G Midi Kit 簡易取扱説明書

キット内容(PC-GK04)

- ・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) 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 0.65mL) 4
- ・50mL 遠心チューブ 8 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 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°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 μm と 1.2 μm (25mm 直径) 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
- ・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=3 分間)

10mL の Binding Buffer G 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 μm シリンジフィルターに通し、その後 0.2 μm シリンジフィルターを通して細胞の残渣などを完全に除去します。

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=30 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、10mL のフィルター処理済みサンプルと 10mL 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 20mL 取り、スピнкаラムにローディングします。スピнкаラムを $150 \times g$ 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 G 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。この操作をもう一回行います。

6. 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、 $500 \times g$ で 3 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。この操作をもう一回行います。

※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 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存する場合は、 $0.05\sim 0.2\%$ (w/v)のアジ化ナトリウムを加えて下さい。長期保存には、 $10\sim 50\%$ 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。

8. プロテイン G 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 分間遠心してミニプラグを洗浄します。続いて、スピнкаラムに 10mL の Binding Buffer G 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 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 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存して下さい。