

IgG Purification Kit - A IgG Purification Kit - G

Technical Manual

はじめに

IgG Purification Kit - A/Gは各種動物のイムノグロブリン G(IgG) を単離、精製するためのキットです。キットにはプロテイン A/G 固定化ゲル、および各種緩衝液が含まれており、わずか 30 分で IgG を高純度、高回収率で精製することができます。プロテイン A/G 固定化の担体としてはシリカゲルを採用しています。遠心後のゲル上の残液はごく少く、プロテイン A/G への抗体結合後のゲル洗浄操作によって、プロテイン A/G 未結合物質を完全に除去することができます。また、プロテイン A/G へ結合した IgG は溶出時の酸性条件下に長時間さらさずことなく溶出操作を短時間で行うことで、IgG の活性低下を最小限に抑えられます。本キットは 1 回の精製につき 50 μ L の腹水や血清、200 μ g の IgG 精製が可能です。

キット内容

- Protein A/G Cartridge tube	1 tube	
- Washing Buffer	13 mL	x 1
- Elution Buffer	1.8 mL	x 1
- Catching Buffer	1 mL	x 1
- 1.5 mL Microtube	5 tubes	x 2

保存条件

0 ~ 5 °C で保存してください。

必要なもの (キット以外)

- 200 μ L マイクロピペッター
- マイクロチューブ
- 遠心機 (マイクロチューブ用)
- ボルテックスミキサー

使用上のご注意

- Protein A/G Cartridge tube に入ったシリカゲルが、キャップやカップの内壁に付着している場合があります。キャップを開ける前に Cartridge tube を軽く叩き、シリカゲルをカップの底に落としてからご使用ください。
- 本キットには抗体を溶出、保存するためのマイクロチューブを 10 本添付していますので、抗体溶出時はキット添付の 1.5 mL Microtube をご使用ください。

プロトコール



1 IgG を含む試料溶液 50 μ L と Washing Buffer 50 μ L をマイクロチューブ^{a)}へ加え、ピペティングにて混合する。



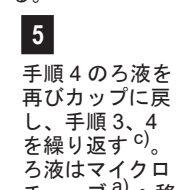
2 手順 1 で調製した試料溶液を Protein A/G Cartridge tube のカップに加える (**キャップを閉めないこと**)。



3 カップを指で回転させ、ゲルとよく混合する^{b)}。その後、室温で 2 分間静置し、IgG をプロテイン A/G へ吸着させる。



4 キャップを閉め、8,000 \times g で 30 秒間遠心する。



5 手順 4 のろ液を再びカップに戻し、手順 3、4 を繰り返す^{c)}。ろ液はマイクロチューブ^{a)}へ移し、0 ~ 5 °C で保存する^{d)}。



6 Washing Buffer 200 μ L をカップに加える (**キャップを閉めないこと**)。カップを指で回転させ、ゲルとよく混合する^{b)}。



7 キャップを閉め、8,000 \times g で 30 秒間遠心し、ろ液を捨てる。



8 手順 6、7 をもう一度繰り返す。



9 キット添付の 1.5 mL Microtube へ Catching Buffer を 60 μ L 加えた後、Protein A/G Cartridge tube のカップを取り付ける^{e)}。



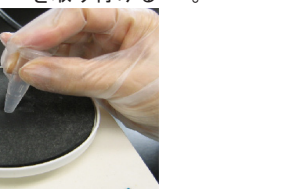
10 Elution Buffer 70 μ L をカップに加える (**キャップを閉めないこと**)。カップを指で回転させ、ゲルとよく混合する^{b)}。



11 キャップを閉め、8,000 \times g で 30 秒間遠心する。ろ液はそのままにしておく (このろ液中に IgG が含まれます)。

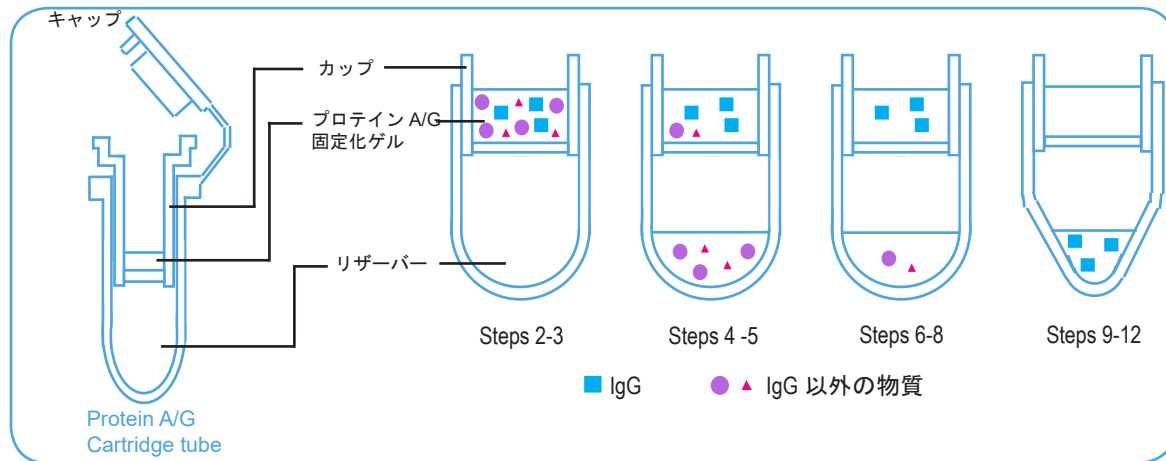


12 手順 10、11 をもう一度繰り返す。



13 カップを取り除く^{f)}。キャップを閉め、ボルテックスにより IgG 溶液を混合した後、0 ~ 5 °C で保存する^{g)}。

- a) このマイクロチューブはキットには含まれておりません。お手持ちのマイクロチューブをご使用ください。
- b) Protein A/G Cartridge tube を傾け、指で 10 ~ 20 回カップを回転させてください。
- c) IgG を最大限回収するためには手順 5 が必要です。この工程により IgG 回収が 25 ~ 30% 増加します。
- d) IgG 回収が低い場合は手順 5 のろ液を使用し、手順 2 以降のプロトコールに従って操作することで、IgG の回収を上げることができます。
- e) Protein A/G Cartridge tube は、再度精製操作を行う際に再使用しますので、リザーバーは捨てないでください。
- f) カップ中のゲルは再使用することができます。ゲルを保存する場合は手順 9 で保管しておいたりリザーバーへカップを戻し、手順 6、7 に従って Washing Buffer でゲルを洗浄してください。洗浄後は Washing Buffer 200 μ L を加え、Protein A/G Cartridge tube ごと 0 ~ 5 °C で保存してください。また、再使用する前には Protein A/G Cartridge tube を遠心し、Washing Buffer を除いてください。
- g) 長期保存する場合には、等のグリセロールを添加した後、-20 °C で保存してください。



精製 IgG の SDS-PAGE 及び血清 50 μ L からの IgG 回収

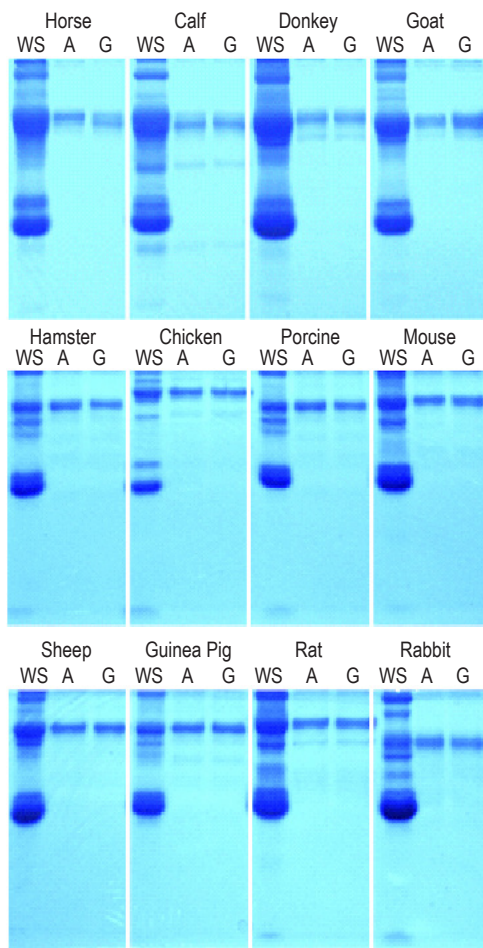


Table. 血清 50 μ L からの IgG 回収 (IgG 回収は 280 nm の吸光度から算出)

	IgG Purification Kit - A (μ g)	IgG Purification Kit - G (μ g)
Horse	150 - 250	200 - 300
Calf	200 - 300	250 - 350
Donkey	200 - 300	150 - 250
Goat	50 - 100	150 - 250
Hamster	150 - 250	100 - 150
Chicken	25 - 50	10 - 20
Porcine	200 - 300	150 - 250
Mouse	150 - 250	150 - 250
Sheep	50 - 100	150 - 250
Guinea Pig	150 - 200	100 - 200
Rat	50 - 100	100 - 200
Rabbit	200 - 300	150 - 250
Human	150 - 250	200 - 300
Cat	150 - 250	100 - 200
Dog	200 - 300	100 - 200

Figure. IgG Purification Kit - A/G を用いて精製した IgG の SDS-PAGE
 WS: whole serum
 A : IgG Purification Kit - A を用いて精製
 G : IgG Purification Kit - G を用いて精製
 6% Acrylamide gel/ Tris-glycine buffer

Q & A

- ◆ このキットにより精製した IgG の純度はどのくらいですか？
 精製により得られた IgG の SDS-PAGE を Figure に示しています。1 回の精製で高純度の精製 IgG を得ることができます。
- ◆ 血清 50 μ L からの IgG 回収はどのくらいですか？
 動物種の血清 50 μ L からの IgG 回収を Table に示しています。動物種や抗体サブクラスにも依存しますが、血清 50 μ L から約 50 ~ 350 μ g の IgG を回収することができます。
- ◆ プロテイン A/G 固定化ゲルは繰り返し使用が可能ですか？
 はい、可能です。10 回の精製を繰り返し行った場合でも、プロテイン A/G 固定化ゲルの IgG 吸着能は変化しません。
- ◆ 異なる試料溶液の精製に同じゲルを使用してもよいですか？
 いいえ、使用しないでください。不純物の混入を防ぐには、1 本のシリカゲルは同一サンプルの精製にのみご使用ください。
- ◆ 血清などのサンプルをカップに加えた後、カップを指で回転させる前にキャップを閉めてしまいました。どうすればよいですか？
 Protein A/G Cartridge tube を 8,000 \times g で 30 秒間遠心してください。その後、ろ液をカップに戻し、プロトコールにしたがって精製操作を進めてください。

<開発元>
 Dojindo Molecular Technologies, Inc.
 211 Perry Parkway, Suite 5, Gaithersburg, Maryland, 20877
 Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687, URL: www.dojindo.com

<委託製造元>
 株式会社 同仁化学研究所
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202
 Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 URL:www.dojindo.co.jp/
 ドージン・イースト (東京) Tel:03-3578-9651 Fax:03-3578-9650