

抗体を精製したい

I はじめに

腹水、培養組織上清または血清から得た抗体は、硫酸塩析法、ゲルろ過法、イオンクロマト法あるいは protein A/G クロマト法等により精製される。protein A/G クロマト法は、IgG の protein A または protein G に対する親和性を利用した精製法である。短時間、かつ高い精製効率で粗製 IgG を精製できることから汎用されており、また簡易精製キットとしても市販されている。IgG の protein A または protein G に対する親和性は動物種により異なるため、精製する IgG によりその選択が必要である。

IgG Purification Kit - A および IgG Purification Kit - G は、シリカゲルにそれぞれ protein A および protein G を固定化した担体を用いる。操作は全てスピニングにより行なわれるため、30分以内に目的の IgG を精製することができる。スピニング後、サンプル溶液はほとんど残存しないため、IgG を失うことなく単離することができる。表 P-5-1 に動物種毎の IgG の protein A および protein G への結合性を示す。

本稿では IgG Purification Kit - A および IgG Purification Kit - G の操作法を解説する。

表 1 IgG の protein A および protein G への結合性

動物種	protein A	protein G
ヒト	◎	◎
マウス	◎	◎
ラット	△	○
ウサギ	◎	◎
ヤギ	△	◎
ヒツジ	△	◎
ニワトリ	×	×
ブタ	◎	○
ウマ	△	◎
ウシ	△	◎
ハムスター	△	△

◎：非常に強い、○：強い、△：弱い、×：非常に弱い

II IgG Purification Kit - A および IgG Purification Kit - G を使用した IgG の精製

1. キット内容

(1) IgG Purification Kit - A(Code: AP01)

- Protein A Cartridge tube
- Washing Buffer
- Elution Buffer
- Catching Buffer
- 1.5 ml Microtube

(2) IgG Purification Kit - G(Code: AP02)

- Protein G Cartridge tube
- Washing Buffer
- Elution Buffer
- Catching Buffer
- 1.5 ml Microtube

2. 適用量

血清 50 μl または 200 μg IgG 溶液

3. キット以外に必要なもの

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

4. 操作



IgG を含むサンプル溶液 50 μl に Washing Buffer 50 μl を加え混合する。

操作 1) の溶液を Protein A Cartridge tube または Protein G Cartridge tube のカップに加える (キャップを閉めないこと)。

カップを指で回転させ、溶液とゲルをよく混合させる^{a)}。その後、室温に2分間静置し、IgG を Protein A または G へ吸着させる。

キャップを閉め、30 秒間遠心する。ろ液を再びカップに移し、操作 3) を繰り返す。キャップを閉め、30 秒間遠心する。ろ液はマイクロチューブに移し保存しておく^{b)}。

Washing Buffer 200 μl 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、溶液とゲルをよく混合させる^{a)}。

キャップを閉め、30 秒間遠心する。ろ液を捨てる。再び操作 5) を繰り返す。キャップを閉め、30 秒間遠心する。ろ液は捨てる。

キット添付の 1.5 ml Microtube へ Catching Buffer を 60 μl 加えた後、Protein A または G Cartridge tube のカップを取り付ける^{c)}。

Elution Buffer 70 μl をカップに加える。キャップは閉めずにカップを指で回転させ、溶液とゲルをよく混合させる^{a)}。

キャップを閉め、30 秒間遠心する。再び操作 8) を繰り返す。キャップを閉め、30 秒間遠心する。ろ液はそのまましておく (このろ液中に IgG が含まれている)。

カップを取り除き、キャップを閉める。ボルテックスミキサーで混合し、0 ~ 5°C で保存する^{d)}。

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

Protein A および G pack のキャップにゲルが付着している場合は、チューブの底を軽くたたか、遠心によりゲルをカップ内に落とすこと。

- a) チューブを傾け、カップを指で 10 ~ 20 回回転させる。
- b) IgG の回収量が低い場合は、ろ液をカップに移し、操作 3 で降に従い回収する。
- c) Protein A または G Cartridge tube は、再度精製操作を行う際に使用するので、リザーバーは保管しておくこと。
- d) -20°C 保存する場合は、同量のグリセロールを添加する。

血清 50 µl を使用した場合の、IgG Purification Kit - A および IgG Purification Kit - G による動物種毎の IgG の回収量を表 2 に示す。

図 1 には、IgG Purification Kit - A および IgG Purification Kit - G で精製した rabbit IgG の SDS-PAGE の例を示す。

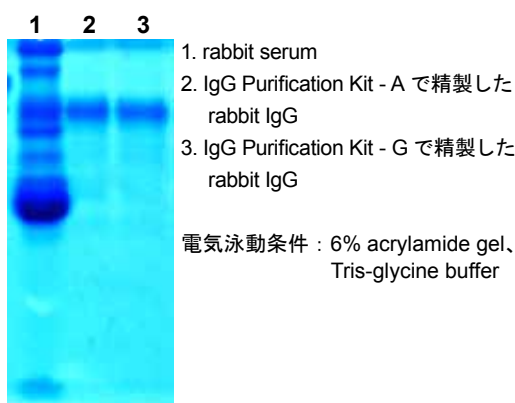


図 1 IgG Purification Kit - A および IgG Purification Kit - G で精製した rabbit IgG の SDS-PAGE

表 2 IgG Purification Kit - A および IgG Purification Kit - G による IgG の回収量

	protein A (µg)	protein G (µg)
ウシ	200 ~ 300	250 ~ 350
ウマ	150 ~ 250	200 ~ 300
マウス	150 ~ 250	150 ~ 250
ラット	50 ~ 100	100 ~ 200
ヤギ	50 ~ 100	150 ~ 250
ヒト	150 ~ 250	200 ~ 300
ウサギ	200 ~ 300	150 ~ 250
ヒツジ	50 ~ 100	150 ~ 250

* 血清 50 µl 使用

III 市販のゼラチン含有抗体の精製

市販されている抗体には、安定化剤としてゼラチンを含むものがある。ゼラチンを含む抗体に小社 Labeling Kits を用いて酵素や蛍光物質を標識する際、ゼラチンは抗体と各 Reactive 体との反応を妨害する。また、ゼラチン自体がゲル化しやすいという特徴を持つため、Labeling Kit シリーズで用いるフィルターチューブの目詰まりを引き起こす。そのため、ゼラチン含有の抗体を用いて標識操作を行う前には、ゼラチンを除去して抗体を単離することが必要となる。

ここでは、IgG Purification Kit - G を活用したゼラチン除去例を二種類紹介する。

(1) Collagenase(コラゲナーゼ) によるゼラチン分解

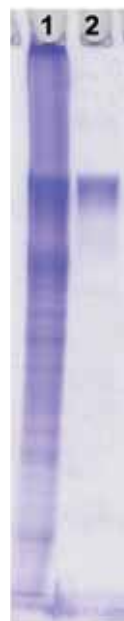


図 2 ゼラチン除去精製前後の SDS-PAGE

- 1: ゼラチン含有 IgG 溶液
- 2: 精製後の IgG 溶液

0.2 % ゼラチンを含む 0.2 mg/ml IgG 溶液 1 ml に、酵素処理用バッファー (100 mmol/l HEPES, pH7.4, 0.36 mmol/l CaCl₂ 含有) 420 µl と酵素処理用バッファーで調製した 3.5 CDU/ml Collagenase (Sigma, # C7926) 希釈溶液 80 µl を加えて混合した。37°C, 3 時間 インキュベートした後、IgG Purification Kit - G(Code: AP02) を用いて IgG を単離した。

注) IgG Purification Kit-G では、抗体を Protein G 固定化担体に保持させる際の抗体溶液量を一回当たり 200 µl としている。しかし、上記の操作でコラゲナーゼ処理した抗体溶液量は、1.5 ml となるため、IgG を担体に保持させる操作を 8 回 (200 µl × 7 回, 100 µl × 1 回) に分けて行った。

※上記の方法で得られる抗体の回収率：45 ~ 50 %

(2) 300K 限外濾過チューブを用いたゼラチン除去



図 3 ゼラチン除去精製前後の SDS-PAGE

- 1: IgG
- 2: ゼラチン含有 IgG 溶液
- 3: 300K 限外濾過のみの IgG 溶液
- 4: 300K 限外濾過 + IgG Purification Kit - G で精製後の IgG 溶液

0.1% ゼラチンを含む 0.2 mg/ml IgG 溶液 1 ml を 300K フィルトレーションチューブ 2 本に分けて限外濾過を行った (1 本につき 200 µl × 2 回, 100 µl × 1 回; 13,500 x g centrifuge)。

その後、回収溶液 500 µl を IgG Purification Kit - G(Code: AP02) を用いて IgG を単離した。

注) 回収溶液 500 µl に対し、IgG Purification Kit - G の Washing Buffer 50 µl を添加し、精製を行った。ゲルへの吸着操作を繰り返し行った。

※上記の方法で得られる抗体の回収率：35 ~ 45 %