

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量はごく少量であり、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す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 µlの腹水や血清、200 µg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 x1
- Elution Buffer 1.8 ml x1
- Catching Buffer 1 ml x1
- 1.5 ml Microtube 5 tubes x2

保存条件

0~5 °Cで保存してください。ご購入後未開封の状態です。

必要なもの (キット以外)

- 200 µl 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 µlとWashing Buffer 50 µl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。



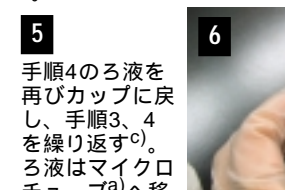
2 手順1で調製した試料溶液をProtein A/G Cartridge tubeのカップに加える(キャップを閉めないこと)。



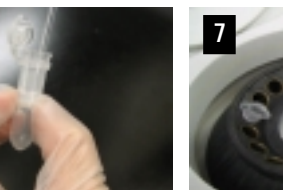
3 カップを指で回転させ、ゲルとよく混合する^{b)}。その後、室温で2分間静置し、IgGをProtein A/Gへ吸着させる。



4 キャップを開け、8,000 x 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 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、ゲルとよく混合する^{b)}。



7 キャップを閉め、8,000 x 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 µl加えた後、Protein A/G Cartridge tubeのカップを取り付ける^{e)}。



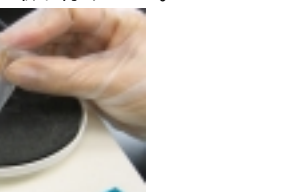
10 Elution Buffer 70 µlをカップに加える(キャップを閉めないこと)。カップを指で回転させ、ゲルとよく混合する^{b)}。



11 キャップを開け、8,000 x gで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)。

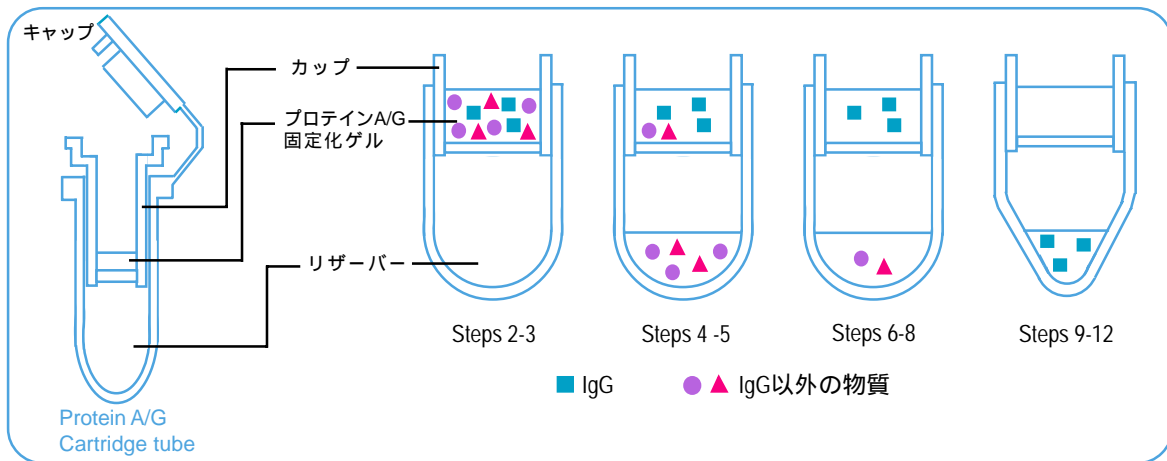


12 手順10、11をもう一度繰り返す。



13 カップを取り除く^{f)}。キャップを開け、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回収量が25~30%増加します。
- d) IgG回収量が低い場合は手順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の回収量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 µl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、等量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 µlからの
IgG回収量

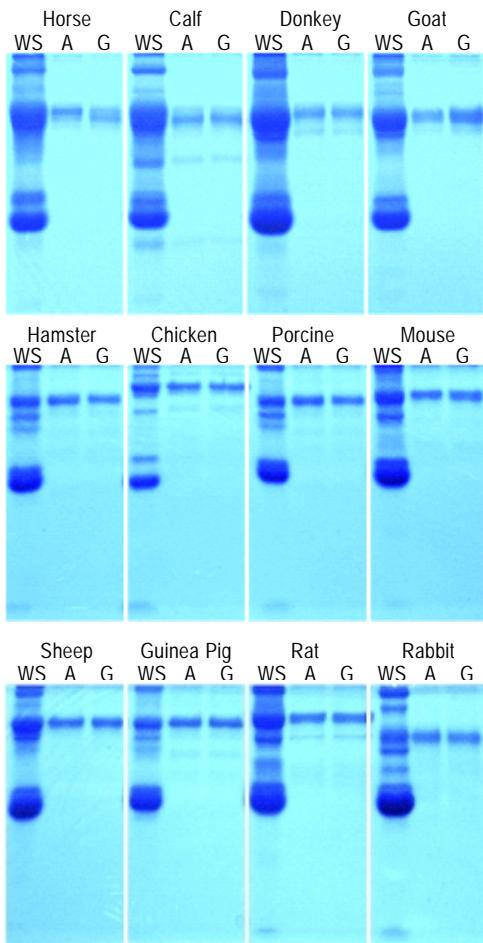


Table. 血清50 µlからのIgG回収量
(IgG回収量は280 nmの吸光度から算出)

	IgG Purification Kit - A (µg)	IgG Purification Kit - G (µg)
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 µlからのIgG回収量はどのくらいですか？
動物種別の血清50 µlからのIgG回収量を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 µlから約50 ~ 350 µg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 × 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