

## Product Information

## PROTEIN A-IMMOBILIZED

表 1

製品番号	製品名	結合能 (mg/mL) <sup>d</sup>
P-1052	プロテイン A-アクリルビーズ (250 $\mu$ m) <sup>c</sup>	約 10
P-8036	プロテイン A-アクリルビーズ (150 $\mu$ m) <sup>c</sup>	約 5
P-0932	プロテイン A-アガロース CL-4B <sup>b</sup>	30-40
P-7786	プロテイン A-アガロース <sup>b</sup>	約 10
P-2545	プロテイン A-アガロース CL-4B <sup>a</sup>	20-30
PA-1	P-2545 充填済みカラム	20-25
P-1406	プロテイン A-アガロース 架橋 <sup>a</sup>	20-30
P-9269	プロテイン A-アガロース <sup>a</sup>	20-30
P-1925	プロテイン A-アガロース 6MB <sup>a</sup>	約 6
P-0558	プロテイン A-アガロース 6MB <sup>b</sup>	10-20
P-6649	プロテイン A-セファロース 6MB <sup>a</sup>	約 6
P-3391	プロテイン A セファロース CL-4B <sup>a</sup>	約 20
P-9424	プロテイン A-セファロース 4B Fast Flow <sup>a</sup>	約 35
P-5906	プロテイン A(細胞外)-アガロース <sup>a</sup>	20-30
P-2670	プロテイン A(細胞外)-アガロース 懸濁液 <sup>a</sup>	20-30
5-4838	HiTrap プロテイン A カラム、1 mL <sup>e</sup>	
5-4839	HiTrap プロテイン A カラム、5 mL <sup>e</sup>	
Z29,006-8	SigmaChrom 充填済み HPLC カラム、 プロテイン A	約 10

<sup>a</sup> 臭化シアン、活性化<sup>b</sup> p-ニトロフェニルクロロホルマート、活性化<sup>c</sup> オキシラン、活性化<sup>d</sup> 結合能はヒト IgG を用いて測定 (I-4506)<sup>e</sup> データシート別添コピーのご請求はテクニカルサポートまでお電話ください。

## 固定化プロテイン A

### 膨潤:

凍結乾燥製品は室温で 30 分以上、バッファーA で膨潤させます。機械的なスターラーなどで攪拌しないでください。通常、1 g の粉末は膨潤して 3~4 mL の水和ゲルになります。適切に保管し取り扱われたレジン、5 回以上再利用できます。

### 保存方法:

凍結乾燥粉末は 2~8 °C で保存してください。懸濁液および水和したレジンに保存剤として 0.1% アジ化ナトリウム、0.01% チメロサル、または 1% トルエンを加えたバッファーA 中で 2~8 °C で保存してください。凍らせないでください。

<u>バッファーA:</u>	0.02 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (製品番号 S-0751)	2.4 g
	0.15 M NaCl (製品番号 S-9625)	8.8 g
	H <sub>2</sub> O を加えて 1 L にします。pH 8.0 に調整してください。	
<u>バッファーB:</u>	0.2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (製品番号 S-0876)	25.7 mL
	0.1 M クエン酸 (製品番号 C-7129)	24.3 mL
	脱イオン化 H <sub>2</sub> O	50.0 mL
	pH は動物種/サブクラスによって異なります。表 2 を参照してください。	

### 使用法-概論:

イムノグロブリンに対するプロテイン A の結合については、参考文献(1) を参照してください(広範囲収録表を含む)。論文には血清中のイムノグロブリンレベルも記載されています。免疫沈降試験での抗体-セファロースの使用法は参考文献(8)に記載されています。「抗体-セファロース」を「プロテイン A-セファロース」と読み替えることもできます。免疫沈降法の詳細は、シグマの抗体カタログのアプリケーションガイドに記載しています (ページ番号はカタログの発行年によって異なります)。

### 使用法-カラム方式:

バッファーA を用いて 1:1 のレジン懸濁液を調製します。カラムに注入してください。カラムを静置してください。静置後、20 カラム体積 (CV) のバッファーA で洗浄し、サンプルを加えてください。10 CV のバッファーA で洗浄し、3 CV のバッファーB で溶出してください。溶出液を 0.1 M NaOH で中和します。溶出液の IgG を定量します。20 ~30 CV のバッファーA でカラムを再平衡します。保存剤を加えたバッファーA は 2~8 °C で保存してください。溶液量がレジン量より多い場合は、カラム法を推奨いたします。

### 使用法-バッチ方式:

焼結ガラス漏斗またはブフナー漏斗 (ワットマン 54 番ろ紙) で、レジン量 (RV) の 10 倍のバッファーA を用い、レジンを弱いバキュームによって洗浄します。1 つの容器にレジンとサンプルを入れる。懸濁液を振とう機で 1 時間弱く混和する (溶液量がレジン量より多い場合は、混和時間を長くする)。

焼結漏斗またはブフナー漏斗でレジンを収集します。10 RV のバッファーA で洗浄します。レジンをビーカーに移してください。2 RV のバッファーB を加え、振とう機で 15 分間弱く混和してください。洗浄したサイドアーム付きフラスコを用いて、先のように漏斗でレジンを収集し、溶出した抗体を集めます。溶出液の pH を 0.1 M NaOH で中性にします。20 RV のバッファーA でレジンを洗浄し、保存剤を加えて 2~8 °C で保存します。

## 固定化プロテイン A

### 洗浄手順:

非特異的に結合したタンパク質が立体障害となって、結合能が低下することがあります。0.5-2.0 M NaCl を含む 10～20 倍量の 100 mM トリスバッファーまたはホウ酸バッファー(pH 8.5)で洗浄し、さらに 0.5-2.0 M NaCl を含む 10～20 倍量の 100 mM 酢酸バッファー(pH 4.0)で洗浄することで、レジン洗浄することができます。20 倍量のバッファーA でレジン再平衡化します。保存剤を加えて 2～8 °C で保存してください。

表 2

動物種	サブクラス	結合能	溶出 pH
ヒト	IgG	高	4
	IgG1	高	3.9-4.6
	IgG2	高	4.3-5
	IgG3	----	
	IgG4	高	3.9-5
マウス	IgG1	低 <sup>f</sup>	6-7
	IgG2a	高	4.5-5
	IgG2b	高	4.5
	IgG3	高	3.5-4
ウサギ	IgG	高	3
ラット	IgG1	低 <sup>f</sup>	7
	IgG2a	----	
	IgG2b	----	
	IgG2c	中-高	3-4
モルモット	IgG	高	4
ウシ	IgG	低	
ヤギ	IgG	---- <sup>f</sup>	

f 代替バッファー(1 M グリシン, 2 M NaCl, pH 9 または 1 M ホウ酸, 2 M NaCl, pH 9)の使用によって結合能が増大する可能性があります。マウス IgG1 では高 pH(9)を用い、塩化ナトリウム濃度を 2-3 M とします。pH 3, 0.15 M NaCl まで変化させる勾配溶出を行います。

## 固定化プロテイン A

注:

IgG の Fc 領域にあるチロシン残基は、プロテイン A との相互作用に関係します。溶出にはグリシルチロシンを用いることもできます (2% NaCl に溶解した 0.1 M グリシルチロシン溶液、室温で pH 7.0)<sup>9,10</sup>。

### 参考文献:

1. Lindmark, R., *J. Immunol. Meth.*, 62, 1 (1983).
2. Langone, J. J., *J. Immunol. Meth.*, 51, 3 (1982).
3. Ey, P. L., et. al., *Immunochem.*, 15, 429 (1978).
4. Surolia, A., et. al., *Trends Bioch. Sci.*, 7, 74 (1981).
5. Ishikawa, E. and Kato, K., *Scand. J. Immunol. Suppl.*, 7, 43 (1978).
6. Werner, E. and Machleidt, Q., *Eur. J. Biochem.*, 90, 99 (1978).
7. Tucker, D. F., et. al., *J. Immunol.*, 121, 1644 (1978).
8. Coligan, J. E., et. al., *Current Protocols in Immunology*, 1, sections 8.3.1-8.3.11, John Wiley & Sons, New York (1983).
9. *Affinity Chromatography Principles and Methods* by Pharmacia, Pharmacia LKB Biotechnology, pp. 51-52 (1993).
10. Bywater, R., *Chromatography of Synthetic and Biological Polymers*, Epton, R., ed., Ellis Horwood, Chichester, U. K., pp. 337-340 (1978).