

Product Information

アガロース固定化プロテインG

シグマ製品番号:

P-7700 プロテイン G、架橋 4% アガロースビーズ
 P-4691 プロテイン G、架橋 4% アガロースビーズ、fast flow
 P-3296 プロテイン G、Sephacrose® 4B fast flow
 5-4840 HiTrap® プロテイン G カラム、Sephacrose HP、1 mL
 5-4841 HiTrap プロテイン G カラム、Sephacrose HP、5 mL
 5-4842 MAbTrap® G-II キット、Sephacrose HP、1 mL

Sephacrose、HiTrap および MAbTrap は、Pharmacia Inc.の登録商標です。

物理的特性

外観: P-7700 はラクトースで安定化させた凍結乾燥粉末です。P-4691 は 0.5 M NaCl を含む 20% エタノール懸濁液です。P-3296 は 20% エタノールの懸濁液です。HiTrap 製品は、カラムのトップとボトムに多孔性のフリットと、必要なフィッティングを付けた、ポリプロピレンハウジングに収めた ready-to-use (調製済み) 使い捨てカラムです。レジンは 20% エタノールに入っています。MAbTrap キットには、必要なフィッティングを付けた 1 mL HiTrap プロテイン G カラム 1 本、結合バッファー 50 mL (10 倍濃度)、15 mL 溶出バッファー (10 倍濃度)、中和バッファー 25 mL が含まれています。

平均粒子径: 架橋 4% アガロースビーズ、架橋 4% アガロースビーズ fast flow、Sephacrose 4B fast flow では 45~165 μ m、Sephacrose HP では約 34 μ m です⁶。

プロテイン G の分子量: 約 20,000 d⁴

プロテイン G の等電点(pI) : 4.1⁶ または 4.19⁴

プロテイン G 1 分子あたりの IgG 結合部位数: 2^{4,6}

製品番号	活性化 ^a	スペーサー原子数	リガンド ^b mg/mL	結合力 ^c
P7700	臭化シアン	1		>20
P4691	臭化シアン	1	約 4	最小 20
P3296	臭化シアン	1	約 2	>20
5-4840	N-ヒドロキシスクシンイミド	9	2	約 25
5-4841	N-ヒドロキシスクシンイミド	9	2	約 25
5-4842	N-ヒドロキシスクシンイミド	9	2	約 25

a - リガンドは、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化法⁶ または臭化シアンによってアガロースに共有結合しています。

b - 充填レジン 1 mL あたりのプロテイン G 固定化量 mg

c - 充填レジン 1 mL あたりのヒト IgG 結合量 mg

アガロース固定化プロテイン G

調製法:

プロテイン G は細胞壁タンパク質の 1 種 (もとは G 型連鎖球菌に由来) で、免疫グロブリン (IgG) の Fc 部位に高親和性に結合します。天然のプロテイン G は Fc 受容体のほかにも、膜貫通領域、アルブミンの特異的結合部位、免疫グロブリン Fab 領域の特異的結合部位をもっています^{1,2,3}。P-7700 および P-4691 は遺伝子組換えプロテイン G から調製します。これは Fc 結合部位のみをもつ短縮タンパク質で、アルブミン結合部位は持っていません⁴。他のレジン Pharamacia, Inc. が作成した遺伝子組換えプロテイン G から調製されています。これは 2 カ所の高親和性 Fc 結合部位をもつますが、低親和性の Fab 領域にも結合します⁶。プロテイン G はアミノ末端および ϵ -リジンアミノ基を介してアガロースビーズに結合します。

安定性/未開封での保存方法:

凍結乾燥レジン P-7700 は、-20 °C で冷凍保存できます。水和したレジンおよび ready-to-use のカラムは冷蔵庫内で保存してください。水和したレジン中で細菌が繁殖しないように、20% エタノール、0.02% アジ化ナトリウム、または 0.02% チメロサルとといった静菌薬を保存バッファー中に入れてください。レジンオートクレーブできません。1 度水和したレジンで凍らせると、ビーズにひびが入ったり結合能が低下するため、水和してからレジンで凍らせないでください。

アガロースに固定化されたプロテイン G は、一般に使用される水溶性バッファーに対して安定です。レジンの作動 pH 範囲は 3~9 (長期) または 2~10 (短期) です。次に挙げる溶液中でも安定しています。70% エタノール、1 M 酢酸、5 M NaCl、1% SDS、3 M イソチオシアネート、6 M グアニジン HCl (37 °C で 7 日間)、0.1 M グリシン NaOH、pH 11 (室温で 2 時間)、1 M HCl (室温で 2 時間)、8 M 尿素 (室温で 2 時間)⁶。

用途

レジンの調製: P-7700 は、レジンに過剰量の水 (レジン 1 g あたり約 25 mL) を加えて 30 分間水和します。乾燥ビーズ 1 g は充填レジン 4~5 mL になります。使用前に、ラクトース安定化剤、エタノール、または過剰量の NaCl を P-7700、P-4691 および P-3296 から除いてください。レジン免疫沈降に用いる場合には、レジン 1 g あたり 50 mL の脱イオン水を用いて、ブフナー漏斗で弱く吸引してレジン完全に洗浄します。レジン乾燥させないでください。サンプルに加える前に、過剰量のワーキングバッファーで洗浄済みレジン再懸濁します。レジンカラムを使用する場合は、過剰量の水または保存用溶液を捨て、開始バッファーまたは 20 mM リン酸ナトリウムバッファー、pH 7.0 中にレジン再懸濁します。カラムに入れます。カラムベッドをカラムの 5 倍量の開始バッファーで平衡化させます。これによってレジンに残っていた静菌剤や安定剤を効率的に除去することになります。

HiTrap カラムの調製には、3 カラム容量 (カラムの 3 倍量) の脱イオン水または 20 mM リン酸ナトリウムバッファー、pH 7.0 を用いてエタノールを除去し、さらに、カラム 2 倍量の開始バッファーで平衡化します。

アガロース固定化プロテイン G

用途: (続き)

レジンベッドのチャネリングを起こすため、カラムを乾燥させないでください。

サンプル調製: プロテイン G は、中性～塩基性の pH で IgG に結合します。サンプルのマトリックスは血清、腹水、低イオン強度の中性バッファー (20 mM リン酸ナトリウムバッファー, pH 7.0 など) でも可能です。サンプルの pH は、開始バッファーの pH と同じにしてください。アフィニティークロマトグラフィーの場合、濁っているか粒子状物質を含むサンプルは、濾過または遠心によってクリアにしてください。

アフィニティークロマトグラフィーによる IgG 精製: カラムにサンプルをロードします。液層がレジンベッドのトップに達したとき、1～2 カラム容量の開始バッファーまたは 20 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0 で洗浄します。最初のカラム溶出液に多量の IgG が含まれ、カラム容積を超えなかった場合は、溶出液を低流量で再度カラムに流し、IgG をさらに除去することができます。さらに 3～4 カラム容量の開始バッファーまたは 20 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.0 でカラムを洗浄します。1～3 カラム容量の 100 mM グリシン HCl, pH 2.7 で IgG を溶出します。IgG を含む画分を 1 M トリス HCl, pH 9.0 または 0.1 N NaOH で中性 pH にします。中性バッファーでレジン再进行平衡化します。

流量を遅くすることで、結合量および IgG 回収率が最大になります。4% アガロースビーズ fast flow および Sepharose 4B fast flow のカラムは 0.8 mL/分で流すことができます。4% 架橋アガロースビーズで調製したカラムは、約 0.2 mL/分で流してください。HiTrap カラムの最高流量は 4 mL/分です⁶。

免疫沈降法による IgG の精製: 洗浄した適量のレジンにサンプルを加えます。シーソー式または水平式振とう器でサンプルとレジンとを 1 時間混和します。弱く吸引しながらブフナー漏斗でレジンを集め、レジンの 10 倍量のワーキングバッファーまたは 20 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.0 でレジンとを洗浄します。レジンの 2～3 倍量の酸性バッファー (100 mM グリシン HCl バッファー pH 2.7 など) で再懸濁します。シーソー式または水平式の振とう器で 15 分混和し、IgG を溶出します。吸引または遠心によって溶出液を集めます。1 M トリス HCl, pH 9 または 0.1 N NaOH で溶出液の pH を中性にします。レジンとを再使用する場合は、中和バッファーで平衡化します。

レジンの洗浄: 使用するたびに必ずしもレジンとを洗浄する必要はありません。しかし、血清や腹水などをレジンに使った場合は、70% エタノールで消毒することができます。レジンの結合能が低下した場合は、非特異的に結合したタンパク質を除去することで、これを回復できることがあります。このようなタンパク質は一般的に、1～5 M NaCl 液、0.5 M NaCl を含む 100 mM トリスバッファーまたはホウ酸バッファー, pH 8.5、もしくは 0.5 M NaCl を含む 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH 4.0 で溶出されます。これによっても結合能が回復しない場合は、次の溶液を使用することもできます。0.1 N HCl、100m グリシン NaOH バッファー, pH 11、6 M 尿素、8 M グアニジン HCl、または 1% SDS⁶。4～5 カラム容量の中性バッファーでレジンとを再平衡化します。レジンとを保存しようとする場合は、最終バッファーの洗浄に静菌薬を加えます。尿素、グアニジン HCl および界面活性剤はプロテイン G を変性させるため、再平衡化では完全に再度中和されない可能性があることに、ご注意ください。

アガロース固定化プロテイン G

参考文献:

1. Akerstrom, B., and Bjorck, L., *J. Biol. Chem.* 261, 10240-10247, 1986.
2. Akerstrom, B., et al., *J. Immunol.* 135, 2589-2592, (1985).
3. Bjorck, L., and Kronvall, G., *J. Immunol.* 133, 969-974, (1984).
4. Goward, C.R., et al., *Biochem. J.* 267, 171-177, (1990).
5. Guss, B., et al., *EMBO J.* 5, 1567-1575, (1986).
6. Pharmacia テクニカル資料

プロテイン G とプロテイン A による IgG 結合の比較

動物種	プロテイン G	プロテイン A
モノクローナル: ³		
ヒト IgG ₁	高	高
ヒト IgG ₂	高	高
ヒト IgG ₃	高	--
ヒト IgG ₄	高	高
マウス IgG ₁	高	低
マウス IgG _{2a}	高	高
マウス IgG _{2b}	高	高
マウス IgG ₃	高	低
ラット IgG ₁	低	低
ラット IgG _{2a}	高	--
ラット IgG _{2b}	低	--
ラット IgG _{2c}	低	低
ポリクローナル IgG: ^{5,6}		
ウシ	高	低
ニワトリ	--	--
イヌ	低	高
ヤギ	高	低
モルモット	低	高
ウマ	高	--
ヒト	高	高
マウス	低	低
ブタ	高	高
ウサギ	高	高
ラット	高	--
ヒツジ	高	--