

アフィ・ゲルHz イムノアフィニティーキット

取扱説明書

Cat. No. 153-6060

ご使用の前に

この説明書を十分お読み下さい。

なお、この取扱説明書は製品の近くに保存し、なくさないようご注意ください。

COMMITTED TO EXCELLENCE IN SEPARATION

BIO-RAD

目 次

1章 はじめに	
1.1 イムノアフィニティーカップリングと固定化抗体	2
1.2 ヒドラジドカップリング反応	3
1.3 キット内容	3
2章 モノクローナル抗体	5
3章 抗体精製法	6
4章 固定化操作法	
4.1 バッファー交換	7
4.2 IgGの酸化	8
4.3 脱塩法	9
4.4 アフィゲルHzへの酸化IgGのカップリング	9
5章 IgG固定化アフィゲルHzの応用	
5.1 イムノアフィニティーカラムの取扱い法	12
5.2 サンプルのアプライ	12
5.3 溶出法	13
6章 製品説明	
6.1 アフィゲルHzヒドラジドゲル特性	15
6.2 製品ガイド	15

1章 はじめに

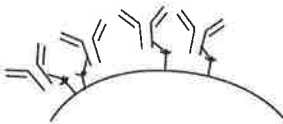
アフィゲルHzイムノアフィニティーキットはアフィニティー精製に用いるアガロース担体にユニークな方法でIgGをカップリングさせるキットです。このキットは1級アミンを介して抗体を結合する活性担体に比べ、均一な方向性をもった抗体のカップリングが行えるように工夫されています。

アフィゲルHzヒドラジドゲルは酸化糖質のアルデヒド基と反応し、安定したヒドラゾン共有結合を形成するアガロース担体です。

IgGはFc領域 (Heavy chain) に約3%の糖質を含む糖タンパク質です。過ヨウ素酸処理によりこれらの糖の近接した水酸基は酸化されてアルデヒド基となり、アフィゲルHzへのカップリング反応基となります。

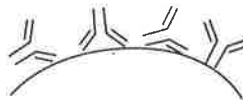
このカップリング方法によると方向性のよい抗体結合が可能となり、抗原結合部位付近がカップリングするような1級アミンカップリングで生じる抗体活性の減少を防ぐ利点があります。

1.1 イムノアフィニティーカップリングと固定化抗体



方向性を持つIgGのカップリングにより、より高い抗原結合量をもつ抗体活性を得ることができます。

vs



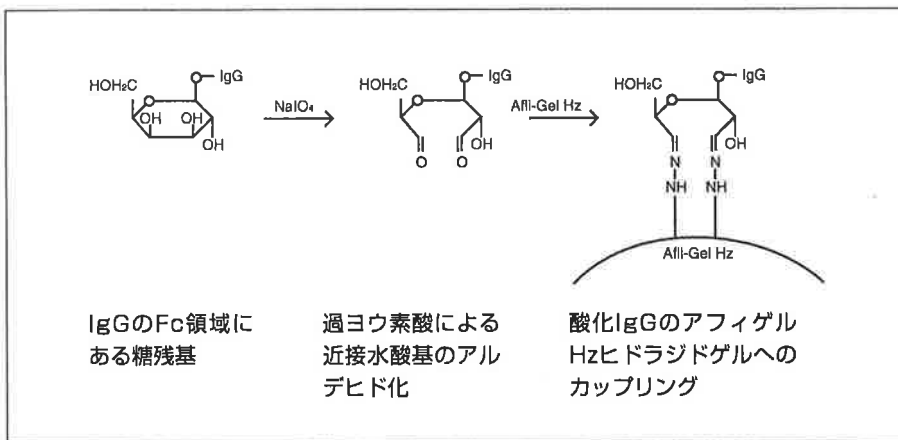
方向性のないランダムなカップリングは抗体の結合部位あるいはその付近で接するため抗原結合効率は低くなります。IgGは1級アミンを介してアガロース担体に直接カップリングされています。

→ IgG Fc領域の糖質

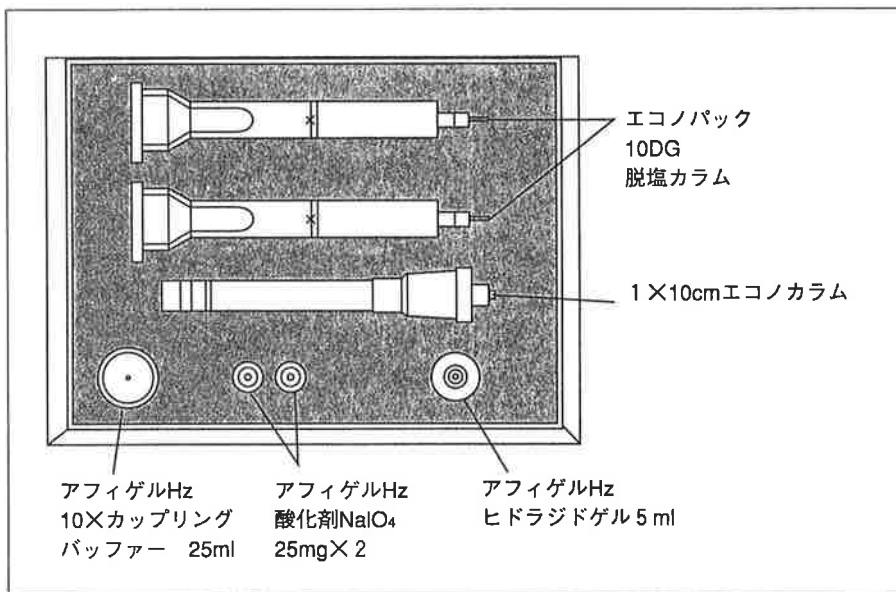
Y ゲルスパーサーアームとヒドラジド反応基

Y IgG

1.2 ヒドラジドカップリング反応



1.3 キット内容



●キット以外に必要なもの

1.5mlテストチューブ（スクリューキャップ付）—ポリプロピレンまたは
ポリスチレン製

転倒式ミキサー

ピペット

pHメーター

UV-Vis分光光度計

2章 モノクローナル抗体

モノクローナル抗体のそのユニークな特異性により、最適なアフィゲルHzゲルへのカップリングが起きないことがあります。抗体精製実験での大切な抗体サンプルのロスを最小限に抑えるために、一度サンプルのカップリング効率を決定する実験を行うことを強く推奨します。その結果がアフィゲルHzゲルに適したものであれば、残りの抗体のアフィゲルHzゲルへのカップリング操作を行って下さい。もしそうでなかったらアフィゲル10ゲルを抗体の固定化に使用して下さい。

3章 抗体精製法

IgGのゲルへのカップリングを行う前に、抗体は最低限部分精製されていなければなりません。IgGの精製度が高いほど、酸化されアフィニティー支持体に固定されるIgGの割合が高くなります。またIgGの精製度を高くすることにより、カップリング容量、抗原精製能力を最大限に引き出すことができます。ここに抗体精製法のいくつかを示します。

このキットを使用される際には、抗体溶液を総タンパク質濃度1~5mg/ml、容量5ml以下に調整します。エコノパック10DGによる脱塩、バッファー交換を迅速に行うには5ml以下の容量が適当です。抗体精製方法に関係なく、抗体を酸化・カップリングする以前にアフィゲルHzカップリングバッファーでバッファー交換する必要があります。バッファー交換については4.1章を参照して下さい。

血清や腹水からのIgG精製はMacro-Prep High Sによるイオン交換クロマトグラフィーとMacro-Prep t-butylによる疎水クロマトグラフィーの組み合わせで行うことができます。DEAEアフィゲルブルーはトランスフェリン以外の大抵の血清成分除去に使用できます。

またアフィゲルプロテインAアガロース (MAPS IIキット：LPLC用担体) やアフィプレッププロテインA (HPLC用担体) を用いても血清や腹水からのIgG精製を行えます。ブドウ球菌由来のプロテインAはIgGのFc領域と結合します。プロテインAを用いた精製を行うことにより、精製度の高いIgGを得ることができます。

$\mu\text{g/ml}$ 程度の低濃度の抗体を含むハイブリドーマ培養上清は抗体の濃縮と精製が必要です。精製・濃縮は硫酸沈殿、イオン交換クロマトグラフィーにより行えます。さらにヒドロキシアパタイト、アフィゲルプロテインAを使用するとさらに高濃度、高精製度の抗体溶液を得ることができます。

イムノグロブリンの中には高濃度の硫酸、低pHに不安定なものがありますので、アフィゲルHzにカップリングする以前に抗体活性の不可逆的低下が起こることがあります。このような条件に抗体をさらす時間を最小にして、イムノアフィニティー担体作成以前の活性低下を防ぐように注意して下さい。

4章 固定化操作法

4.1 バッファー交換

抗体をアフィゲルHzにカップリングする前にバッファー交換する必要があります。アフィゲルHzカップリングバッファーは抗体の酸化・固定化を効率よく行えるよう調整されています。キットにエコノパック10DG脱塩カラムが含まれていますので、このバッファー交換は容易に行えます。

抗体の固定化は、抗体のバッファー交換、酸化、脱塩、カップリングによって行われます。抗体が酸化作用を受けることによりFc領域の糖質にアルデヒド基が形成され、ゲル上のヒドラジド反応基に結合します。

糖の存在は全糖タンパク質量に対して数%にすぎませんので、このカップリング反応は通常の活性化アフィニティー担体に比べてとてもゆっくり行われます。この反応によって安定したヒドラジン結合を形成しますので、通常アフィニティークロマトグラフィーで使用される多くの溶出バッファーに対し化学的に耐性を示します。

4.1A アフィゲルHz・10×カップリングバッファーの調整

1. アフィゲルHz・10×カップリングバッファーをイオン交換蒸留水で1：9に希釈し、よく混和します。
2. pH5.5を確認し、必要があれば1N-CH₃COOHまたは1N-NaOHで調整します。長期保存する場合は、0.02%のNaN₃を添加します。

4.1B エコノパック10DG脱塩カラムによるバッファー交換

このカラムによるバッファー交換は精製抗体の希釈を最小限で行うことができます。カラムは再生可能で適切な洗浄によって再使用できます。

1. エコノパック10DG脱塩カラムのフタをはずし過剰の保存用バッファーを捨てます。
2. カップリングバッファー20mlを加え（30mlの線まで満たし）、カラムのボトムチップを切り離し、カラム流出を開始します。
3. バッファーがトップフリットの位置にくると溶出は止まります。流出したバッファーは捨てます。

4. カラムに精製したIgG 3 mlを加えます。サンプル量が3 ml以下の場合は、カップリングバッファーを後から補います。流出した最初の3mlを捨てます。
5. サンプル量に対し、1.2倍量のカップリングバッファーを加え、0.5mlのフラクションを集めます。各フラクションのUV吸収 (280nm) をモニターし、IgGを含むフラクションを調べます。
6. カラムはIgGの酸化後に行う脱塩にも利用しますので、少なくとも20mlのカップリングバッファーで洗浄します。
7. カラムの流出口にエンドキャップ (黄) を取り付け、バッファー漏れを防ぎます。カラムを保存する場合は0.02%NaN₃を添加したカップリングバッファーを加えフタをします。

4.2 IgGの酸化

精製IgGの酸化には過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO₄) を使用しています。

注意：過ヨウ素酸ナトリウムは強酸化剤ですので、触れたり吸入しないで下さい。水素化物、金属粉末のような還元剤と激しく反応します。手袋、保護メガネを着用し、取扱説明書に準じて使用して下さい。

アフィゲルH₂酸化剤は、溶解後必要に応じてIgGに添加して使用します。添加量はサンプル量に応じ、比率計算から求めます。過ヨウ素酸ナトリウムは光に不安定ですので酸化反応は遮光します。過ヨウ素酸ナトリウム溶液の保存は4℃、褐色ビンで1週間です。

以下の操作で示されている過ヨウ素酸ナトリウム濃度はIgGの糖酸化に特異的で活性を変化させることはありません。

1. 過ヨウ素酸ナトリウムのバイアル (25mg/バイアル) にイオン交換蒸留水1.2mlを加え、溶解します。
2. カップリングバッファーで希釈した精製IgGサンプルをスクリーキャップ付ポリプロピレンまたはポリスチレン製チューブに移します。このチューブ以外のものを使用すると漏れる場合があります。
3. 過ヨウ素酸ナトリウムのストック液を1：10になるようにIgGサンプルに加えます。(例えばIgG4.0mlに対し400 μ l) また、ウサギIgGの場合は過ヨウ素酸ナトリウムのストック液を9：10になるようにIgGサンプルに加えます。(例えばIgG4.0mlに対し1.2ml)

4. キャップをしてチューブをアルミホイルで包みます。
5. 室温で1時間転倒混和します。
6. 1時間反応後直ちに脱塩操作に移ります。

4.3 脱塩法

1時間の酸化反応後、直ちにIgG溶液から過ヨウ素酸ナトリウムを除去する必要があります。残存する過ヨウ素酸ナトリウムはカップリング反応に悪影響を及ぼします。この脱塩方法は4.1のバッファー交換と同様に行うことができます。

1. バッファー交換に使用したエコノパック10DGをカップリングバッファーで洗浄、平衡化します。
2. 4章(4.1バッファー交換)を参考に行います。1回のサンプル量は3mlとし、サンプルが3ml以上の場合はエコノパック10DGを20mlのカップリングバッファーで再平衡し繰り返して行って下さい。
3. IgG濃度決定のため少量を別画分に取ります。この画分はカップリング効率の測定に用いますので、酸化IgGの容量を測定しておきます。

4.4 アフィゲルHzへの酸化IgGのカップリング

4.4A アフィゲルHzヒドラジドゲルの洗浄

アフィゲルHzヒドラジドゲルはイソプロパノールに保存されています。

注意：イソプロパノールは有毒、可燃性です。

熱、火気から充分離れて取り扱って下さい。

また、ガスは眼、鼻、のどに刺激性がありますので換気装置のある場所で、手袋、保護メガネを使用して下さい。

カップリング操作を行う前にイソプロパノールを除くためにカップリングバッファーで洗浄する必要があります。

1. ピペットを使ってスラリー状ゲルを15mlの透明チューブに移し、静置します。
2. イソプロパノールの上清を除去した後、10mlのカップリングバッファーを加え、混和後静置します。これを再度繰り返します。

3. 上清を取り除き、5mlのカップリングバッファーを加えます。
4. スラリー状ゲルをカップリング反応チューブに移します。5ml以下のゲルをカップリングに使用する際は、1倍量のバッファーによる洗浄で充分です。未使用のゲルはイソプロパノール中で4℃保存が可能です。

4.4B IgGカップリング

IgG量を1mlのゲルあたり1~5mgで全IgGサンプル量を5ml以下にするとエコノパック10DGでのバッファー交換・脱塩が容易に行えます。IgGのカップリング効率は、pH5.5で最大となります。再度、カップリングバッファー、IgGサンプル、ゲルのpHを確認してください。

1. 反応チューブ内のゲルに、酸化、脱塩したIgGを加えます。厳重にフタをし室温にて10-24時間転倒混和します。
2. カップリング反応後、キットに含まれるエコノカラム (1.0×10cm) にゲルを移し、カラム溶出液を回収し容量を測定しておきます。
3. アフィゲルHzイムノアフィニティーカラムを1倍量0.5M NaClを含むバッファー (例: PBS 0.5M NaCl, pH7.0) で洗浄します。洗浄液は採取し効率を求める場合に使用します。
4. 使用したバッファーに0.02%NaN₃を添加したものでカラムを洗浄します。PBS 0.5M NaCl以外の洗浄バッファーを使用する場合は、10倍量のバッファーで平衡化します。黄色のエンドキャップをカラムの下部に確実に取り付けます。ゲルベッド上にバッファーを満たした状態で上部キャップを取り付け、次に使用するまで4℃で保存します。

4.4C IgGカップリング効率の計算

アフィゲルHzへのIgGカップリング効率は間接的に求められます。カップリング前後のIgG量の差をもって効率が計算でき、高純度に精製されたIgGであれば正確な計算が可能です。他の糖タンパクを含む場合、カップリングしたIgG量を正確に算出するのは困難になります。

精製度の高いIgGサンプルの場合、石英セルを用いて280nmでの吸光度を測定します。吸光度は0.1～1.0の間の値になるように希釈します。次に示す計算式によりIgG量を求められます。

$$\text{IgG量} = \frac{280\text{nmでの吸光度}}{1.4} \times \text{希釈率} \times \text{サンプル量}$$

精製度の低いIgGサンプルの場合は、全タンパク量をプロテインアッセイキットIを用いて測定してください。

カップリング効率は次に示す計算式で求められます。

$$\begin{aligned} \text{カップリングしなかったタンパク量 (IgG量)} = \\ \text{アフィゲルHzカラム溶出液中のタンパク量 (IgG量)} \\ + \text{洗浄液中のタンパク量 (IgG量)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{カップリングしたタンパク量 (IgG量)} = \\ \text{カップリング前のタンパク量 (IgG量)} \\ - \text{カップリングしなかったタンパク量 (IgG量)} \end{aligned}$$

$$\text{カップリング効率(\%)} = \frac{\text{カップリングしたタンパク量 (IgG量)}}{\text{カップリング前のタンパク量 (IgG量)}} \times 100$$

5章 IgG固定化アフィゲルHzの応用

ここではサンプリング法と溶出法について示します。この条件はアフィニティー精製での溶出に共通して使用できます。溶出法はいくつか考えられますので、5章（5.3 溶出法）および6章から適当な方法を選択します。

5.1 イムノアフィニティーカラムの取扱い法

サンプルをアプライする前にカラムを至適化する必要があります。

1. 4°C保存のカラムを室温にもどします。
アフィニティーカラムに抗原溶出に選択したバッファーを2~4ベッド容量加えます。
2. 少なくとも5ベッド容量のサンプルアプライ用バッファー（例：PBS pH7.0）でカラムを再生します。この操作によりイムノアフィニティーカラムはサンプルをアプライできる状態になります。

5.2 サンプルのアプライ

1. IgG固定化カラムにサンプルをアプライします。
サンプルに微粒子が含まれている場合は、フィルターろ過して取り除きます。また、他の成分が多く含まれている場合は、サンプルをサンプルアプライバッファーで希釈します。この操作により、固定化IgGとの特異結合が増加し、またカラム寿命も延びます。
2. 0.5M NaClを含むサンプルアプライ用バッファー2ベッド容量でカラムを洗浄し、未結合のタンパク質を除きます。
3. 再度1~2ベッド容量のサンプルアプライ用バッファーだけでカラムを洗浄します。カラムは抗原を溶出できる状態です。

5.3 溶出法

溶出は抗体-抗原結合の切断により行いますが、抗体-抗原結合の強度によってその結合を切断する溶出条件は変わってきます。以下にいくつか溶出条件を示しますが、最適な条件は実験的に決定します。アフィニティー精製の溶出方法を検討する際は、ゲルマトリクスや生成物にダメージを与えない条件を選択します。非常にきびしい条件ではゲルにカップリングしている抗体が変性したり、カラム性能に悪影響を及ぼします。比較のおだやかな条件から開始し、少しずつ条件を至適化していきます。一般的に溶出は速やかに行います。（溶出法についてプレティン1099が用意されています。）

1. アフィニティーカラムに2ベッド容量の溶出バッファー（下記バッファーリスト参照）を加えます。
2. フラクションを採取するか、UVモニターで溶出液の状況を観察します。低いpHあるいは沈殿を生じる場合は溶出された抗原溶液を中和します。
3. 溶出バッファーがゲルの上部表面に達したら、直ちに0.02%NaN₃を含むサンプルアプライ用バッファーで再生し、4℃にて保存します。
4. 精製効率を求めます。

酸溶出に用いるバッファー

0.2M Glycine-HCl, pH2.5

0.1M Acetic Acid

0.15M Sodium Citrate, pH3.0

0.5M Formic Acid

カオトロピック溶出に用いるバッファー

4M NaSCN

6M Urea

5M Guanidine-HC

溶出手順について

前述の溶出バッファーは一般的に抗体変性を起こさないものと言われています。(注1)
この溶出バッファーは抗原にも悪影響を及ぼさないものを使用しなければなりません。
次の順番でいくつかの方法を試して下さい。

1. 酸 (pH2~3.5) 溶出が一般的です。しかし低いpHはある種のタンパク質は不活性化したり、IgGの溶解度を減少させます。
2. カオトロピック塩 (3.5M NaSCN, 3-6M GuHCl) の使用は効果的です。たいていの場合、カオトロピック溶出は中性付近のpHで行います。低pHでのNaSCN塩の使用はお避け下さい。

(注1) 酸の中和やカオトロピック塩を含む溶液の希釈を速やかに行うことにより、きびしい条件にさらす時間を最小限にすることができます。

6章 製品説明

6.1 アフィゲルHzヒドラジドゲル特性

使用温度範囲 (°C)	2-30
溶出pH範囲	2-10
粒子径 (μm)	75-300

6.2 製品ガイド

カタログ番号	品名	
153-6060	アフィゲルHzイムノアフィニティーキット	
	キット内容：アフィゲルHz ヒドラジドゲル	5ml
	アフィゲルHz 10Xカップリングバッファー	25ml
	アフィゲルHz 酸化剤 (NaIO ₄)	25mg×2
	エコノパック10DG脱塩カラム	2本
	エコノカラム (1×10cm)	1本
153-6047	アフィゲルHz	25ml
153-6054	アフィゲルHz カップリングバッファー	500ml
153-6055	アフィゲルHz オキシダイザー	250mg
732-2010	エコノパック10DG脱塩カラム	30個
関連商品		
156-0030	Macro-Prep High S	100ml
732-0066	エコノパック High S カートリッジ	5ml
156-0090	Macro-Prep t-Butyl HIC	100ml
153-6046	アフィゲル10	25ml×4
153-6099	アフィゲル10	25ml
153-7307	DEAEアフィゲルブルー	100ml
153-6159	アフィゲルプロテインA MAPSIIキット	
153-6153	アフィゲルプロテインA	5ml
153-6154	アフィゲルプロテインA	50ml
732-2022	エコノパックプロテインAカラム	2ml×5
732-2020	エコノパックプロテインAキット	

カタログ番号	品名	
156-0006	アフィブレッププロテインA	5ml
156-0005	アフィブレッププロテインA	25ml
157-0040	CHT セラミックハイドロキシアパタイト Type I (40 μm)	100g
157-4000	CHT セラミックハイドロキシアパタイト Type II (40 μm)	100g

バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

本社 〒140-0002 東京都品川区東品川 2-2-24
天王洲セントラルタワー20F

Tel : 03-6361-7000 Fax : 03-5463-8480

大阪 〒532-0025 大阪市淀川区新北野 1-14-11

Tel : 06-6308-6588 Fax : 06-6308-3064

福岡 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東 2-5-28

Tel : 092-475-4856 Fax : 092-474-5580

製品の学術的なお問い合わせは

Tel : 03-6404-0331 Fax : 03-6404-0334

Mail : life_ps_jp@bio-rad.com