

実験基礎情報

抗体精製

プロテインA, プロテインG, プロテインL-アガロースを用いた抗体精製

このプロトコールは、哺乳動物の血清、腹水および細胞培養上清から、抗体を迅速に精製する方法です。出発試料が血清又は腹水の場合、最終的な調製物には特異的抗体の他、内在性の宿主動物のIgGが含まれます。一般的には、内在性IgGの存在は測定に影響しません。

注記：弊社のプロテインA抗体精製キットPure-1A(p.597)をぜひご利用下さい。

精製プロトコール (1mLカラム用)

注記

プロテインA、プロテインGは哺乳動物のFc部分に対する結合領域を保持しています。IgG結合能は種によって異なります。一般的に、プロテインGはプロテインAよりIgGに対して高い親和性を示し、多種のIgGと反応します。また、プロテインAは特にヒトやマウスIgGではサブクラスにより特異性が異なります。従ってプロテインAは特定のアイソタイプのIgGの精製に適しているといえます。プロテインLは多種のκ鎖に高い特異性があり、モノクローナルおよびポリクローナルIgG、IgA、IgM、Fab、F(ab')₂、κL鎖を含むリコンビナントscFvフラグメントに適用されます。ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウマの免疫グロブリンのほとんどがプロテインLに結合しない鎖であるため、ウシIgGを含む細胞培養上清からマウスモノクローナル抗体を精製するのに適しています。プロテインLは、プロテインAのFcおよびFab結合領域と、プロテインLのκL鎖結合領域を組み合わせた組替えタンパクであり、より広範なIgGへの結合能をもつリガンドを調製するのに適しています。

このプロトコールでは、プロテインAに対する親和性が弱いサブクラス (マウスIgG1など) の結合を高めるために、高モル濃度、高pHのローディングバッファーを使用します。中性pHで結合するプロテインG、Lの場合は、PBSをローディングバッファーとして用います。結合したイムノグロブリンの溶出は、pH3のクエン酸緩衝液を用いたワンステップで行い、レジンに結合した全てのサブクラスを除去します。種々の動物由来のIgGに対するプロテインA及びGの結合能は、Table1に示した親和性から判断して下さい。+から++表記のIgGサブクラスは、レジン1mLあたり1~5mg、+++から++++表記のサブクラスは、レジン1mLあたり10~25mgを結合します。プロテインLは全てのイムノグロブリンクラスの結合が可能であり、+++と表記した動物種についてレジン1mLあたり3~10mgのイムノグロブリンを結合します。精製する試料の動物種およびイムノグロブリンのクラスに対して最低++であるレジンのご使用をお奨めします。

試薬と機器

- 血清、腹水又は細胞培養上清
- プロテインAローディングバッファー：1Mリン酸カリウム、pH9.0
- プロテインG、Lローディングバッファー：0.01Mリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS)、pH7.4 (シグマ P4417)
- 溶出バッファー：0.1Mクエン酸、pH3.0
- 1.5Mトリス溶液：溶出液の中和用
- 3~5mLシリンジ (カラム筒用)、ガラスウール
- 活栓、Luer-Lock
- リングスタンド、クランプ
- 試験管、ラック
- 分光光度計、キュベット
- pHメーター
- ピペット、バルブ
- ピーカー、攪拌棒、攪拌台 (バッファー調製用)
- 滅菌フィルターユニット
- アジ化ナトリウム (保存剤) (シグマ S2002)

Table 1: プロテインA/G/Lの動物種別親和性

動物種	イムノグロブリン	プロテインA結合性	プロテインG結合性	プロテインL結合性
Human	IgG (normal)	++++	++++	++++
	IgG1	++++	++++	++++
	gG2	++++	++++	++++
	IgG3	—	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgM	—	—	++++
	IgA	—	—	++++

プロトコール

- バッファーを調製します。バッファーは4℃で1~2週間保存できます。滅菌フィルターでろ過するとバッファーの寿命を延長できますが、必須ではありません。
- カラムを準備します。シリンジからプランジャーを外して捨てます。シリンジ底部にガラスウールを1/2~1cmの厚さで緩衝になるように入れます。栓を取り付けて1~2mLのバッファーでリンスします。シリンジ底部にガラスウールが固定されているか確認して下さい。
- 2mLのバッファーで、ボトルを反転、回転してレジンを懸濁します。温度の振盪は避けて下さい。また懸濁液はvortexにかけないで下さい。
- 懸濁液をシリンジに移します。過剰のバッファーを排出してから、5mLのローディングバッファーでカラムを洗浄します。レジンを乾燥しないように行ってください。
- 可能であれば、ロードする血清、腹水または上清中のイムノグロブリン量を概算します。イムノグロブリン量が不明な場合、Table2に示した様々な動物種由来の血清、マウス腹水および細胞培養上清中のおおよそのイムノグロブリンレベルから、出発試料中のイムノグロブリン量を見積もってください。出発試料中の動物種イムノグロブリンに対するレジンの結合能と、出発試料中のイムノグロブリン量に基づいて、ロードする容量を計算します。

注記：これらは、最初に指標として参照していただくための、概算の数値です。実際の試料溶液中のイムノグロブリン濃度やレジンへの結合は変化しますので、レジンに対する出発試料の最適な比率は実験的に決定して下さい。

- 血清または腹水を3倍量のローディングバッファーで希釈します。上清の場合は1倍量のローディングバッファーで希釈します。
- 希釈したサンプルをカラムにアプライします。試験管またはピーカーに未結合画分を集め、再アプライ用に回収しておきます。レジン1mLに対し5mLのバッファーで未結合のタンパク質を洗浄します。
- カラムに溶出バッファーをアプライします。カラムの1/2容量の画分を回収します。レジン1mLあたり10mLの溶出バッファーを使用します。
- レジン1mLあたり5mLのバッファーでカラムを再平衡化します。排出液のpHをチェックして、カラムがローディングバッファーのpHで平衡化されているか確認して下さい。
- 溶出フラクションのタンパク量を280nmで測定します。
- タンパク質陽性のフラクションをプールして、1.5Mトリス塩基溶液でpH6~8に中和します。
- 必要な場合、未結合のフラクションを再アプライし、最初のアプライで結合しなかったイムノグロブリンを回収します。
- 4℃で適切なバッファー (PBS、pH7など) を用いて透析します。透析バッファー容量はタンパク質溶液の最低20倍です。少なくとも2~4時間ごとに、最低2回透析バッファーを交換し、透析バッファーで完全に平衡化して下さい。
- ここで作業を終了する場合は、0.05~0.1%のアジ化ナトリウム含有PBSでカラムを洗浄します。栓またはパラフィルムでカラムに封をし、4℃で保存します。

注記：pH6.5からpH3.0まで0.1Mクエン酸緩衝液で直線的なpH勾配を形成すると、プロテインAからマウスIgGとヒトIgGアイソタイプを分離できます。勾配溶液の総量はカラム容量の最低10倍必要です。この溶出方法は、数種のピークが生成して各々を中和して試験しなければならぬことや、ワンステップの溶出に比べて溶出物が希釈されているのが欠点です。

Table 1: プロテインA/G/Lの動物種別親和性

動物種	イムノグロブリン	プロテインA結合性	プロテインG結合性	プロテインL結合性
	IgE	—	—	++++
	IgD	—	—	++++
	Fab	++	++	++++
	κ light chains	—	—	++++
	L light chains	—	—	—
	ScFv	++	—	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	++++
	IgG3	++	+++	++++
Rat	IgG1	—	+	++++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++++
	IgG2c	+	++	++++
Bovine	IgG	++	++++	—
Cat	IgG	++++	—	N/A
Chicken	IgG	—	+	++
Dog	IgG	++++	++++	+
Goat	IgG	+/-	++	—
Guinea Pig	IgG	++++	++	++
Hamster	IgG	+	++	++++
Horse	IgG	++	++++	+/-
Pig	IgG	+++	+++	++++
Rabbit	IgG	++++	+++	+
Sheep	IgG	+/-	++	—

プロテインLは特定のサブクラスのVLドメインにのみ結合するため、表中のアフィニティは全てのIgGサブクラスに対する値ではなく、κ L鎖を持つ抗体に対する値を示しています。

Table 2: 正常血清、腹水、細胞培養上清に含まれる各イムノグロブリン濃度

動物種	IgG	IgM (mg/mL)	IgA (mg/mL)	% κ/λ (mg/mL)
Human	Total: 7.5 - 22	0.2 - 2.8	0.5 - 3.4	67/33
	IgG1: 5 - 9.5			
	IgG2: 2.2 - 4.8			
	IgG3: 0.4 - 1.0			
	IgG4: 0.1 - 0.6			
Mouse	Total: 2 - 5	0.8 - 6.5	1.0 - 3.2	99/1
	IgG1: 1.2 - 5			
	IgG2a: 1.3 - 2.9			
	IgG2b: 2.2 - 6.6			
	IgG3: no data			
Rat	Total: 5 - 7	0.6 - 1.0	0.1 - 0.2	99/1
	IgG1: 5.85			
	IgG2a: 6.7 - 8.0			
	IgG2b: ca. 0.9			
	IgG2c: 2.6			

動物種	IgG	IgM (mg/mL)	IgA (mg/mL)	% κ/λ (mg/mL)
Rabbit	12 - 14.5	0.3 - 0.6	0.4 - 0.8	90/10
Goat	Total: 18 - 24	0.8 - 2.0	0.1 - 0.9	1/99
	IgG1: 10.9			
	IgG2: 9.1			
Sheep	18 - 24	0.8 - 1.8	0.1 - 1.0	1/99
Pig	Total: 17 - 24	1.0 - 3.4	1.3 - 2.6	50/50
	IgG1: no data			
	IgG2: 8 - 17			
Bovine	Total: 9 - 24	1.9 - 3.9	0.5 - 1.2	1/99
	IgG1: 7 - 13			
	IgG2: 6 - 15			
Horse	IgG: 11.5 - 21	1.0 - 3.0	1.0 - 4.0	1/99
	IgGt: 1 - 12			
Monoclonal Sources				
腹水	0.5 - 5.0			N/A
培養上清	0.01 - 0.05			N/A