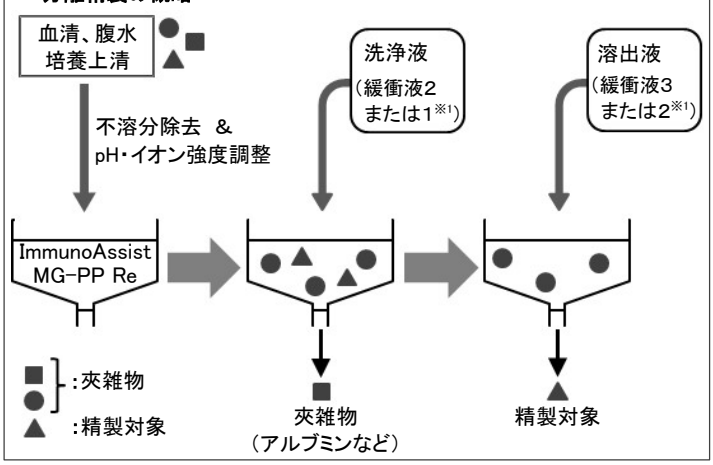
取 扱 説 明 書

ImmunoAssist MG-PP Re
イムノアシスト MG-PP Re

1. はじめに

ImmunoAssist MG-PP Re は、ピロリン酸マグネシウムを主成分とするセラミックスタイプのクロマトグラフィー用担体です。血清や腹水、培養上清などから簡単な操作で純度良くIgM や IgG を精製できます。IgM や IgG は静電的相互作用により保持されるため、基本的に動物種に関わりなく使用できます。

● 分離精製の概略



※1 精製対象によって洗浄液と溶出液に使用する緩衝液が異なります。
緩衝液の詳細については、「3. 緩衝液の調製」を参照して下さい。

精製対象	夾雑物	洗浄液	溶出液
IgM	アルブミン・IgG など	緩衝液2	緩衝液3
IgG	アルブミンなど	緩衝液1	緩衝液2

2. 製品形態

製 品 名	ImmunoAssist MG-PP Re
形 状	球状粒子（セラミックスタイプの担体）
保 管 温 度	室温
製 品 番 号	20352-33
容 量	25 g

3. 緩衝液※2, 3の調製

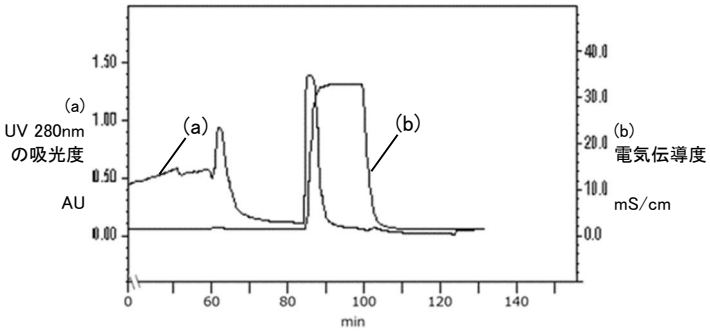
緩衝液	対象	調製方法
緩衝液1 : 10 mM リン酸緩衝液、pH6.8	IgG	10 mM NaH_2PO_4 水溶液と、10 mM K_2HPO_4 水溶液を混合し、pH を 6.8 に調整します。
緩衝液2 : 300 mM NaCl, 10 mM リン酸緩衝液、pH6.8	IgM IgG	300 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 水溶液と、300 mM NaCl, 10 mM K_2HPO_4 水溶液を混合し、pH を 6.8 に調整します。
緩衝液3 : 300 mM リン酸緩衝液、pH6.8	IgM IgG	300 mM NaH_2PO_4 水溶液と300 mM K_2HPO_4 水溶液を混合し、pH を 6.8 に調整します。

緩衝液はメンブレンフィルター（孔径：0.45 μm）でろ過してから使用して下さい。

※2 マウス・ラットのIgM、あるいはマウス・ラット・ウサギのIgGを精製する場合の標準的な条件（塩濃度、pH）を示してあります。他の動物種由来の IgM・IgG を精製する場合、またマウス・ラット・ウサギ由来であっても、抗体の性質に応じて塩濃度や pH を変えることによってより良い精製が行える場合があります。
詳しくは「7. トラブルシューティング」をご覧下さい。

※3 溶出液の pH は精製対象が安定に存在する pH に調整する必要があります。

参考：ImmunoAssist MG-PP Re γ-グロブリン保持量評価時の LC 分析チャート



4. 滅菌方法

オートクレーブ滅菌および乾熱滅菌共に可能です。

5. カラムのアルカリ洗浄

試料中の脂質分等がカラム内に蓄積し、ImmunoAssist MG-PP Re の処理能力が低下したなどの場合には、下記の通り、アルカリ洗浄をすることができます。

1） 10 mM NaOH による洗浄　　ベッド容積の 4 倍程度
2） 緩衝液3による洗浄　　ベッド容積の 4 倍程度
3） 洗浄液※4による初期化　　ベッド容積の 6 倍程度

※4 精製対象によって洗浄液が異なります。ご注意下さい。

6. カラムの保存

保存溶媒には洗浄液をご使用下さい。
防腐剤を添加した洗浄液※5で置換し、冷蔵庫に保存します。

※5 精製対象によって保存溶媒（洗浄液）が異なります。ご注意下さい。

7. トラブルシューティング

1） IgM の分離精製

現象	考えられる原因	対策
(a) 緩衝液2を送液時に IgM が溶出される	緩衝液2の pH が高い	緩衝液2の pH を低くする（pH6.5 程度）
	緩衝液2の NaCl 濃度が高い	緩衝液2の NaCl 濃度を低くする（200-250 mM 程度）
	試料負荷量が負荷能力以上である	試料負荷量を少なくする
(b) 緩衝液3で溶出される画分に、IgG や血清アルブミンが混入する	緩衝液2の pH が低い	緩衝液2の pH を高くする（pH7.0 程度）
	緩衝液2の NaCl 濃度が低い	緩衝液2の NaCl 濃度を高くする（400-500 mM 程度）
(c) 緩衝液3を通液しても IgM が溶出されない	緩衝液3の濃度が低い	緩衝液3の濃度を高める（500 mM 程度）
(d) 流速が遅い（カラム背圧が高い）	ImmunoAssist MG-PP Re が微粉化している可能性がある	「9. (A) - ②カラムの作製」を参照の上、新しい ImmunoAssist MG-PP Re 粉末で再充填する

2） IgG の分離精製

現象	考えられる原因	対策
(a) 緩衝液1を送液時に IgG が溶出される	緩衝液1の pH が高い	緩衝液1の pH を低くする（pH6.5 程度）
	緩衝液1の濃度が高い	緩衝液1の濃度を低くする（5 mM 程度）
	試料負荷量が負荷能力以上である	試料負荷量を少なくする
(b) 緩衝液2で溶出される画分に、血清アルブミンが混入する	緩衝液1の pH が低い	緩衝液1の pH を高くする（pH7.0 程度）
	緩衝液1の濃度が低い	緩衝液1の濃度を高くする（20 mM 程度）
(c) 緩衝液2を通液しても IgG が溶出されない	緩衝液2の NaCl 濃度が低い	緩衝液2の NaCl 濃度を高める（500 mM 程度）
(d) 流速が遅い（カラム背圧が高い）	ImmunoAssist MG-PP Re が微粉化している可能性がある	「9. (B) - ②カラムの作製」を参照の上、新しい ImmunoAssist MG-PP Re 粉末で再充填する

8. 参考文献

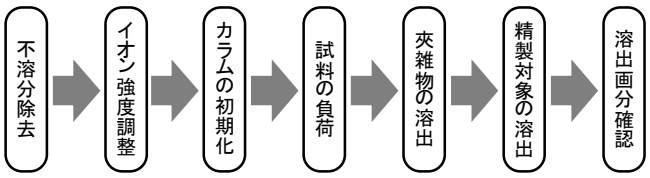
1） S. Inoue and N. Ohtaki, *J. Chromatogr.*, **645** (1993) 57.
2） 大瀧伸之・井上千也、分析化学, **44** (1995) 875
3） 窪田哲朗、臨床免疫、29[Suppl.17] (1997) 231
4） 窪田哲朗、臨床免疫、29[Suppl.17] (1997) 240
5） 大瀧伸之・井上千也、*CHEMICAL TIMES*, **165** (1997) 21
6） 窪田哲朗、*CHEMICAL TIMES*, **210** (2008) 16

※ 製品名の『Re』は復刻製品であることを意味しています。
『ImmunoAssist MG-PP Re』は以前弊社で販売していた『ImmunoAssist MG-PP』と同じ方法で製造した製品です。

関東化学株式会社　試薬事業本部　〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号　(03)6214-1090　https://www.kanto.co.jp

9. プロトコール例

- 本書では、ImmunoAssist MG-PP Re を充填したカラムを液体クロマトグラフィー（構成：送液ポンプ、UV 検出器ほか）に接続して用いる場合について記載しますが、オープンカラムでも同様の手順で IgM または IgG を精製することができます。
- 本書では例として、ImmunoAssist MG-PP Re（粒径：約 100 μm） 2.0 g を内径 15 mm のクロマトグラフィー管に充填して使用する際の手順および注意事項などについて説明します。カラムはベッド高さを低くした方がカラム圧力が低く取扱い易いので、なるべく径の大きなクロマトグラフィー管の使用をお勧めします。
- ImmunoAssist MG-PP Re を充填したカラムを液体クロマトグラフィーに接続して UV280 nmにおける吸光度をモニターし、IgM または IgG の画分をフラクションコレクター等で分取します。



操作手順フローチャート

A) IgM の分離精製

①試料の前処理

- 血清や腹水などは遠心分離やメンブレンフィルター（孔径：0.45 μm）によるろ過などにより、不溶分を除去して下さい。
- 血清や腹水、培養上清などのイオン強度を調整するために、次のいずれかの方法で処理して下さい。
  例：イオン強度 0.3 に調整　　※ 試料に応じて最適化が必要です。
  (a) 試料に相当量の NaCl を加える（血清や腹水、培養上清のイオン強度を約 0.15 と考えます）。
  (b) 試料を緩衝液 2 で 5 倍程度に希釈する（イオン強度を高めます）。
  (c) 試料を緩衝液 2 に対して透析する。

②カラムの作製

1) ImmunoAssist MG-PP Re 乾燥粉末 2.0 g を緩衝液2 約 50 mL に懸濁します。
   参考：懸濁後、すぐに 2) 以下の操作に移ることができます。
   （膨潤収縮などはありませんので特別な前処理は必要ありません）
2) 1) のスラリーを静かに振り混ぜて、乾燥粉末を緩衝液に馴染ませると共に気泡を除去します。
   注意：ガラス棒やマグネチックスターラーなどによる攪拌は避けて下さい。
   ImmunoAssist MG-PP Re 粒子が微粉化する可能性があります。
3) クロマトグラフィー管（内径 15 mm）にスラリーを静かに注ぎ込みます（参考：ベッド高さ約 3 cm）。
   参考：静水圧で充填します。特別に加圧する必要はありません。
4) 液体クロマトグラフィーに取り付けます。
5) 通液テスト
   ポンプ流量を 1.0 mL/min に設定し、緩衝液2を通液した時のカラム背圧を確認します。よく充填されたカラムにはほとんど背圧がかかりません（0–0.1 MPa）。
   （上記大きさのカラムの、静水圧下での流量は 1.0–2.0 mL/min 程度です。）
   参考：表示される背圧は、数 MPa の値を示すことがありますが、これは主に配管部分や検出部のセルなどにおける負荷です。カラム自体にはほとんど圧力はかかりません。

③ステップワイズ法による IgM の分離精製

1) カラムの初期化：カラムを液体クロマトグラフィーに接続し、ベースライン（吸光度値）が低く安定するまで、緩衝液2を通液します。
   （流速：1.0 mL/min ・・・30 mL 程度）
2) 試料の負荷：前処理した試料をカラムに負荷します※6。
3) 夾雑タンパク質の溶出：UV280 nm における吸収が小さくなり、ほぼベースラインに戻るまで緩衝液2を送液します。　（流速：1.0 mL/min ・・・30 mL 程度）
4) IgM の溶出：緩衝液3に切り替えて※7 溶出する IgM を回収します※8,9。
   （流速：1.0 mL/min ・・・15 mL 程度）
5) カラムの初期化：緩衝液2を 30 mL 程度通液します。

※6 試料の負荷量は、ImmunoAssist MG-PP Re 乾燥粉末 1 g あたり血清 5 mL からお試し下さい。試料の性状などによって試料の最大負荷量は異なります。
※7 IgM の大部分は、カラムからの流出液が緩衝液3に切り替わってから 5–10 mL に溶出されます。
※8 IgM 溶出画分に回収した IgM が高濃度に存在することによって凝集することがあります。あらかじめ受け器に適当な緩衝液等を入れておくと凝集を抑えることができます。また、回収した IgM は必要に応じて、緩衝液交換や pH 調整等の後処理をして保存して下さい。
※9 回収した IgM 溶出画分は SDS-PAGE などでご確認下さい。

B) IgG の分離精製

①試料の前処理

- 血清や腹水などは遠心分離やメンブレンフィルター（孔径：0.45 μm）によるろ過などにより、不溶分を除去して下さい。
- 血清や腹水、培養上清などのイオン強度を調整するために、次のいずれかの方法で処理して下さい。
  例：イオン強度 0.01～0.02 に調整　　※ 試料に応じて最適化が必要です。
  (a) 試料を緩衝液1に対して透析する。
  (b) 試料を緩衝液1で 5 倍程度に希釈する（イオン強度を低くします）。

②カラムの作製

1) ImmunoAssist MG-PP Re 乾燥粉末 2.0 g を、緩衝液1 約 50 mL に懸濁します。
   参考：懸濁後、すぐに 2) 以下の操作に移ることができます。
   （膨潤収縮などはありませんので特別な前処理は必要ありません）
2) 1) のスラリーを静かに振り混ぜて乾燥粉末を緩衝液に馴染ませると共に気泡を除去します。
   注意：ガラス棒やマグネチックスターラーなどによる攪拌は避けて下さい。
   ImmunoAssist MG-PP Re 粒子が微粉化する可能性があります。
3) クロマトグラフィー管（内径 15 mm）に、スラリーを静かに注ぎ込みます（参考：ベッド高さ約 3 cm）。
   参考：静水圧で充填します。特別に加圧する必要はありません。
4) 液体クロマトグラフィーに取り付けます。
5) 通液テスト
   ポンプ流量を 1.0 mL/min に設定し、緩衝液1を通液した時のカラム背圧を確認します。よく充填されたカラムにはほとんど背圧がかかりません（0–1 MPa）。
   （上記大きさのカラムの、静水圧下での流量は 1.0–2.0 mL/min 程度です。）
   参考：表示される背圧は、数 MPa の値を示すことがありますが、これは主に配管部分や検出部のセルなどにおける負荷です。カラム自体にはほとんど圧力はかかりません。

③ステップワイズ法による IgG の分離精製

1) カラムの初期化：カラムを液体クロマトグラフィーに接続し、ベースライン（吸光度値）が低く安定するまで、緩衝液1を通液します。
   （流速：1.0 mL/min ・・・30 mL 程度）
2) 試料の負荷：前処理した試料をカラムに負荷します※10。
3) 夾雑タンパク質の溶出：UV280 nm における吸収が小さくなり、ほぼベースラインに戻るまで緩衝液1を送液します。　（流速：1.0 mL/min ・・・30 mL 程度）
4) IgG の溶出：緩衝液2に切り替えて※11、IgG を溶出して回収します※12。
   （流速：1.0 mL/min ・・・15 mL 程度）
5) カラムの洗浄：緩衝液3を 15 mL 程度通液します（主に IgM が溶出されます）。
6) カラムの初期化：緩衝液1を 30 mL 程度通液します。

※10 試料の負荷量は、ImmunoAssist MG-PP Re 乾燥粉末 1 g あたり血清 1 mL からお試し下さい。試料の性状などによって、試料の最大負荷量は異なります。
※11 IgG の大部分は、カラムからの流出液が緩衝液2に切り替わってから 5–10 mL に溶出されます。
※12 回収した IgG 溶出画分は、SDS-PAGE などでご確認下さい。