

## 温度溶出型プロテインA

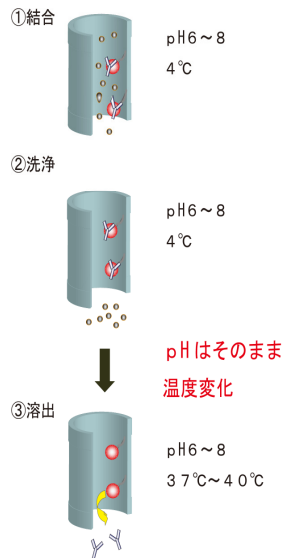
# Byzen A

## 使用説明書

ノマディックバイオサイエンス株式会社  
〒701-1221 岡山県岡山市北区芳賀 5303 番  
岡山リサーチパークインキュベーションセンター  
TEL: 086-286-9507 FAX : 086-286-9508  
Email : info@nomadicbio.com  
URL: www.nomadicbio.com

### 1. 製品の概要

**Byzen A** の特徴は、温度変化によって抗体の結合と解離を制御できることにあります。野生型プロテインAでは、強酸による溶出を行うため、潜在的に抗体が凝集体を形成する恐れが指摘されています。**Byzen A** は、任意のpHの緩衝液が使用できるため、酸による抗体の活性低下リスクを回避できます。



#### ○中性条件下で溶出可能

酸性条件下で精製を行う必要がなく、凝集体や活性低下などのリスクが防止できます。

#### ○温度変化で結合と溶出を制御

4°Cで結合、37°C~40°Cで溶出できます。

#### ○任意の緩衝液で溶出可能

中性であれば緩衝液を自由に選択でき、抗体溶出後の緩衝液交換が不要になります。

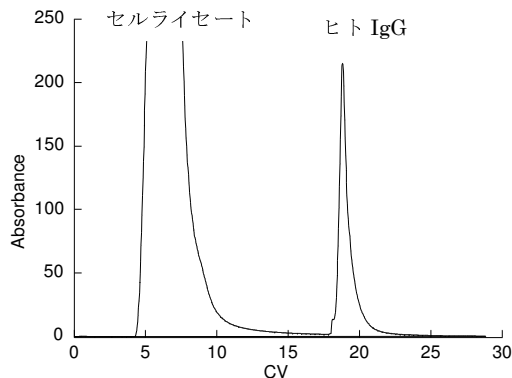
#### ○優れた抗体吸着特異性

野生型プロテインAと同様の特異性を持ち、優れた不純物淘汰能力を持っています。

#### ○ヒト抗体回収率は95%以上

## 2.1 密閉型カラムを使用した精製例

クロマト装置又はポンプに接続して送液を行う場合は、カラム圧力が 0.3 MPa を超えないようにご注意ください。



- ・カラム体積: 1.0 ml
- ・カラム高: 2.5 cm
- ・緩衝液 A (結合および溶出用): 20 mM Phosphate, 150 mM NaCl, pH 8.0
- ・流速: 1.0 ml/min
- ・結合温度: 4 °C
- ・溶出温度: 40 °C
- ・サンプル: ヒト IgG (1 mg) + セルライセート (1 ml)

### 【精製】

- ① カラムを 5 CV の H<sub>2</sub>O で置換し、カラムの手前に 5 ml のループをつける。
- ② カラムとループを 4 °C に設定した恒温水槽に完全に沈水させ、カラムを緩衝液 A で平衡化する。

- ③ 約 5 分間待機した後、緩衝液 A の送液を開始して、サンプルをインジェクトする。
- ④ 不純物が除去された後(この例では、約 15 CV (カラム体積)、送液を停止してカラムとループを 40 °C の恒温水槽に完全に沈水させる。
- ⑤ 約 5 分間待機した後、緩衝液 A の送液を開始して IgG を回収する。
- ⑥ 必要に応じて、約 5 CV の緩衝液 B (100 mM 酢酸、pH 3.5) を送液し、未溶出の IgG がいないことを確認する。
- ⑦ 同じサンプルの場合は、4°C に設定した恒温水槽にカラムを再び沈水させ、5 CV の緩衝液 A で平衡化し、次の精製を行う。異なるサンプルの場合は、以下の【再生】手順を行う。

### 【再生】

- ① カラムを常温に戻し、5 CV の H<sub>2</sub>O でカラムを洗浄する。
- ② 約 5 CV 以上の 6 M グアニジン又は 8 M 尿素でカラムを洗浄する(注:この操作は、グアニジン等の析出を防ぐため必ず室温に戻したうえで行う。また、これらの溶液は粘性が高いため、カラム圧力が上昇することがあるので注意が必要)。
- ③ 10 CV 以上の H<sub>2</sub>O でカラムを洗浄した後、4°C に設定した恒温水槽に沈水させ、5 CV の緩衝液 A で平衡化して、次の精製を行う。

## 2.2 ジャケット付オープンカラムを使用した精製例

オープンカラムを使用する場合は、ジャケット付のカラムを用いて循環水で温度調節を行うことを推奨します。また、温度変化の所要時間は使用環境によって異なるため、H<sub>2</sub>O を入れたカラムで事前に測定しておくことを推奨します。

重力落下による流速が遅い場合は、カラム出口にアスピレータ、チューブポンプ、シリンジ等を接続して吸引してください。



- ④ カラムの温度が 4 °Cであることを確認し、レジンの表面を乱さないように、4 °Cに冷却したサンプルをピペット等でカラムにロードし、重力落下させる（抗体濃度が低い場合、流速は 0.2 ml / min 程度を推奨）。
- ⑤ レジンの表面を乱さないように、4 °Cに冷却した緩衝液Aをピペット等でカラムにロードし、重力落下させる。不純物が除去されるまで、このステップを繰り返す。
- ⑥ ⑦～⑧の作業は、40 °Cに設定した恒温器にカラムを設置して行う。
- ⑦ カラムの温度が 40 °Cであることを確認し、レジンの表面を乱さないように、40 °Cの緩衝液Aをピペット等でカラムにロードし、数分待機した後、重力落下させてIgGを回収する。
- ⑧ 必要に応じて、約 5 CVの緩衝液B (100 mM 酢酸、pH 3.5) をロードして、未溶出の IgGがないことを確認する。
- ⑨ 同じサンプルの場合は、カラムの温度を再び 4° Cに設定し、緩衝液Aで平衡化して次の精製を行う。異なるサンプルの場合は、以下の【再生】手順を行う。

#### 【再生】

- ① カラムを常温に戻し、5 CV の H<sub>2</sub>O でカラムを洗浄する。
- ② 約 5 CV 以上の 6 M グアニジン又は 8 M 尿素でカラムを洗浄する（注：この操作は、グアニジン等の析出を防ぐため必ず室温に戻したうえで行う。重力落下の速度が遅くなる場合には、カラム出口からシリンジ等で吸引する。）。
- ③ 10 CV 以上の H<sub>2</sub>O でカラムを洗浄した後、カラムの温度を再び 4°C に設定し、5 CV の緩衝液Aで平衡化して、次の精製を行う。

## 2.4 保存

- ① カラムを 5 CV の H<sub>2</sub>O で置換する。
- ② 密閉型カラムの場合は、5 CV の 20 %エタノールでカラムを置換し、そのまま 4 °Cで保存する。
- ③ オープンカラムの場合は、5 CV の 20 %エタノールでカラムを置換し、レジンをカラムから取り出したうえで、20 %エタノール中、4 °Cで保存する。

## 3. 仕様

樹脂	架橋アガロース
平均粒径	34 μm
耐圧	0.3 Mpa、3bar
流速(推奨)	1.0 ml/min まで
pH(推奨)	pH 6～pH 8
結合温度(推奨)	4 °C
溶出温度(推奨)	37 °C～40 °C
静的最大結合量	20 mg/ml (ヒト IgG)
保存条件	20 %エタノール、4 °C
洗浄・再生条件	6 M グアニジン又は 8 M 尿素
(NaOH の使用は避けてください)	(必ず室温に戻してから行ってください)

### 精製に適した抗体

ヒト IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>4</sub>  
 マウス IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub> (IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>3</sub>とは弱結合)  
 ウサギ IgG 等

## 4.カタログ番号

1225N05	5 ml
1225N25	25 ml