



产品使用说明书

# Rhinogen<sup>®</sup> Immobilized IdeS Cut-Pure Kit, Microspin

货号：QIP-102



## 目 录

目 录 .....	1
产品信息 .....	2
试剂包装 .....	2
保藏条件 .....	2
产品综述 .....	3
背景 .....	3
概述 .....	3
应用 .....	3
特性 .....	3
操作方法 .....	4
实验准备 .....	4
推荐使用方法 .....	4
操作说明 .....	6
相关产品 .....	7
联系我们 .....	8
参考文献 .....	8

## 产品信息

**试剂包** Rhinogen® Immobilized IdeS Cut-Pure Kit, Microspin 包装规格如下:

装	目录号	组成	
		Immobilized IdeS, Microspin	Protein A 纯化柱
	QIP-102-A	1 支	1 支
	QIP-102-B	5 支	5 支
	QIP-102-C	10 支	10 支

一套 Immobilized IdeS, Microspin 及 Protein A 纯化柱可组合用于 0.5mg IgG 的酶切及纯化。产品储存于 20%乙醇中，不添加防腐剂。

**保藏条件** 采用冰袋运输，Immobilized IdeS, Microspin及Protein A 纯化柱产品均储存于20%乙醇中，收到产品后请立即将其置于2-8℃保存。**避免冻存!**

## 产品综述

**背景** IdeS protease 是仅在铰链区下方的一个特定位点裂解 IgG 以产生 F(ab')<sub>2</sub> 和 Fc 片段的免疫球蛋白降解酶。由于 IdeS protease 在一个特定位点消化 IgG，因此延长孵育时间也没有过度消化的风险。

**概述** Rhinogen<sup>®</sup> Immobilized IdeS Cut-Pure Kit, Microspin 包含用于抗体消化的 Immobilized IdeS, Microspin 和用于 F(ab')<sub>2</sub> 片段以及 Fc 片段分离的 Protein A 纯化柱。  
Rhinogen<sup>®</sup> Immobilized IdeS, Microspin 使用经过改造后的 IdeS 蛋白酶，因此具有更广的底物特异性，可有效切割人 IgG1~4（切割位点如下表1）、猴、羊、兔的 IgG，还可特异性切割小鼠 IgG2a、IgG3。此外，Immobilized IdeS, Microspin 可在生理条件下切割 IgG，从而保持酶切产物的免疫原性。

表 1. 人 IgG 切割位点

人 IgG 种类	切割位点
人 IgG1	HTCPPCPAPELLG↓GPSVF
人 IgG2	VECPPCPAPP_VA↓GPSVF
人 IgG3	PPCPRCPAPELLG↓GPSVF
人 IgG4	PHAHHAQAPEFLG↓GPSVF

Protein A 纯化柱采用了重组表达的 Protein A，与天然 Protein A 相比，增强了与 Fc 结合的专一性，同时提高了蛋白稳定性。Protein A 纯化柱能够特异性地结合多种免疫球蛋白的 Fc 区段。

**应用** 重组抗体药物的结构表征分析，Fab 片段的制备。

**特性** Rhinogen<sup>®</sup> Immobilized IdeS Cut-Pure Kit, Microspin 具有如下特性：

- ✓ **比活性高：**有效切割抗体下铰链，获得 F(ab')<sub>2</sub> 和 Fc 片段；酶切效率≥90%；
- ✓ **底物特异性广：**能有效切割人 IgG1~4、猴、羊、兔 IgG、小鼠 IgG2a、IgG3；
- ✓ **回收率高：**经消化后，纯化分离可收获 F(ab')<sub>2</sub>，回收率>80%以上；
- ✓ **稳定性高：**每批产品都经过严格的质量控制，以实现产品批间稳定性。

## 操作方法

### 实验准备

试剂盒中包含两种类型的离心柱，一种用于 IgG 消化的 Immobilized IdeS, Microspin，另一种用于 F(ab')<sub>2</sub> 纯化及 Fc 片段分离的 Protein A 纯化柱。两种类型的离心柱构造相同，如下图：

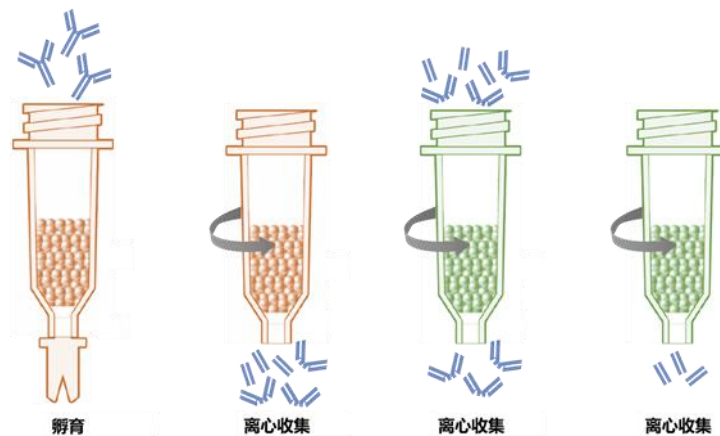


图 1. Rhinogen® Immobilized IdeS Cut-Pure Kit, Microspin 试剂盒操作简介

需自备物料及试剂如下：

离心管：1.5~2ml 离心管；

消化缓冲液：10mM PB, 10mM NaCl, pH6.5；

结合缓冲液：20mM PB, 500mM NaCl, pH7.0；

洗脱缓冲液：50mM 醋酸, pH3.0；

中和缓冲液：1M Tris, pH9.0；

样品制备：使用消化缓冲液将至多 0.5mg 的 IgG 样品稀释到 100~300 $\mu$ l。

### 推荐使用

#### 方法

#### 1. 消化

##### 1.1 平衡

##### Immobilized IdeS,

##### Microspin

- 1) 折断 Immobilized IdeS, Microspin 堵头，将离心柱放入离心管中，拧松顶盖。200 $\times$ g 离心 1 分钟去除储存液；

注：堵头请勿丢弃，后续需多次使用。

- 2) 加入 300 $\mu$ l 消化缓冲液平衡离心柱，200 $\times$ g 离心 1 分钟，重复 2 次；离心结束后堵上堵头。

##### 1.2 消化

- 1) 将待消化 IgG 样品 (0.5mg 的 IgG 样品稀释到 100~300 $\mu$ l) 加到离心柱中，盖好顶盖，上下/左右颠倒混合，确保柱内有流动，使底物与固定化酶充分结合；
- 2) 室温 ( $\geq 26^{\circ}\text{C}$ ) 颠倒孵育至少 30 分钟。

注：对于酶切效率低的底物，建议适度提高酶切温度 (温度越接近  $37^{\circ}\text{C}$ ，酶活越高) 或延长酶切时间。

##### 1.3 收集酶切产物

- 1) 取下堵头，将离心柱放入离心管中，轻轻打开顶盖，1000 $\times$ g 离心 1 分钟收集抗体酶切片段；

- 
- 2) 为获得最大回收率，加入 100 $\mu$ l 消化缓冲液，盖好顶盖，颠倒混匀。1000 $\times$ g 离心 1 分钟，再次收集酶切片段。

**注：酶切产物第一次离心收集，回收率可>85%以上；增大回收率的步骤会导致样品浓度稀释，若需要较高浓度酶切产物，则不建议多次洗涤收集。**

---

## 2. 纯化

### F(ab')<sub>2</sub>

#### 2.1 平衡

#### Protein A 纯化柱

- 1) 折断 Protein A 纯化柱堵头，将纯化柱放入离心管中，拧松顶盖。200 $\times$ g 离心 1 分钟去除储存液；

**注：堵头请勿丢弃，后续需多次使用。**

- 2) 加入 300 $\mu$ l 的结合缓冲液平衡纯化柱，200 $\times$ g 离心 1 分钟，重复 2 次；离心结束后堵上堵头。
- 

#### 2.2 结合 Fc

- 1) 将上页步骤 1.3 收集到的抗体片段加到纯化柱中并盖好顶盖。上下/左右颠倒混合多次，确保柱内有流动；

- 2) 室温下颠倒孵育 30 分钟。
- 

#### 2.3 收集

#### F(ab')<sub>2</sub>

- 1) 取下堵头，将纯化柱放入离心管中，拧松顶盖。200 $\times$ g 离心 1 分钟收集 F(ab')<sub>2</sub> 片段；

- 2) 为获得最大回收率，加入 100 $\mu$ l 消化缓冲液，颠倒几次混匀后，200 $\times$ g 离心 1 分钟；

- 3) 合并收集的 F(ab')<sub>2</sub> 片段；

**注：F(ab')<sub>2</sub> 片段第一次离心收集，回收率>90%以上；增大回收率的步骤会导致样品浓度稀释，若需要较高浓度酶切产物，则不建议多次洗涤收集。**

---

## 3. 洗脱 Fc

### 片段

#### 3.1 洗涤

- 1) 加入 300 $\mu$ l 结合缓冲液洗涤纯化柱，200 $\times$ g 离心 1 分钟，重复 2 次；洗涤结束堵上堵头。
- 

#### 3.2 洗脱

- 1) 加入 100 $\mu$ l 洗脱缓冲液至纯化柱中，盖上顶盖。颠倒使得样品充分混匀。
- 

#### 3.3 收集 Fc

- 1) 准备收集样品的离心管，加入 10 $\mu$ l 中和缓冲液；

- 2) 将 3.2 步骤中的纯化柱转移至加入中和缓冲液的离心管中，200 $\times$ g 离心 1 分钟收集 Fc 片段。

- 3) 为获得最大回收率，可重复 3.2-3.3 步骤 1 次，1000 $\times$ g 离心 1 分钟收集 Fc 片段。

**注：1) 对于部分 Fc-融合蛋白或抗体样品，纯化柱可能对 F(ab')<sub>2</sub> 片段具有非特异性吸附，如对 Fc 样品的纯度有更高需求时，建议采用 pH 梯度洗脱的方法以除去非特异性吸附的 F(ab')<sub>2</sub>；**

**2) 增大回收率的步骤会导致样品浓度稀释，若需要较高浓度洗脱产物，则不建议多次洗涤收集。**

---

---

**操作说明**

- ✓ Rhinogen<sup>®</sup> Immobilized IdeS Cut-Pure Kit, Microspin 能有效地用于酶切及纯化人类、人源化、嵌合、羊、兔和猴的 IgG，并对小鼠 IgG2a 和 IgG3 也具有中等活性，同时也适用于许多 Fc-融合蛋白以及抗体药物缀合物（antibody drug conjugates, ADCs）的酶切及纯化。不适用于小鼠 IgG1/IgG2b、大鼠、猪、牛或山羊 IgG。此外，它不能切割非 IgG 同种型，包括 IgA、IgM、IgD 和 IgE；
  - ✓ 对于小鼠 IgG2a 和小鼠 IgG3 的切割，建议适度提高孵育温度（酶切温度越接近 37℃，则酶活越高）及孵育时间（2 小时至过夜）；
  - ✓ 理想的 IgG 浓度应在 0.5~20mg/ml 的范围内；
  - ✓ 通过 SDS-PAGE 很容易确定目标蛋白的切割；
  - ✓ 最适的酶切反应缓冲液 pH 为 6.0~8.0，在低于 pH5.0 体系中，Immobilized IdeS 会不可逆的失活，在高于 pH8.0 体系中需要适当延长/优化反应条件；
  - ✓ 本产品仅供研究使用，不适用于人或动物的诊断及治疗用途。
-

## 相关产品

产品名称	货号
IdeS protease	QIP-001
Chymotrypsin (Sequencing Grade)	QIP-002
Trypsin (Sequencing Grade)	QIP-003
Endoproteinase Lys-C	QIP-004
Glu-C (Sequencing Grade)	QIP-005
Carboxypeptidase B	QIP-006
IgdE protease	QIP-007
O-Glycoprotease	QIP-008
FabCOUPER protease	QIP-009
GlyCOUPER protease	QIP-010
Quick™ Trypsin (Sequencing Grade)	QIP-012
O-GlyCOUPER protease	QIP-013
Immobilized IdeS, Microspin	QIP-101



## 联系我们

---

如果您需要帮助，我们的客户支持专家可以通过电话和 email 为您提供帮助：

- 电 话: [0512-87663137](tel:0512-87663137)
  - 技术支持: [techserv@rhinobio.com](mailto:techserv@rhinobio.com)
- 

## 参考文献

---

- [1] Mary H. Ryana, Diane Petrone, Jennifer F. Nemetha, Evan Barnathan, Lars Björck, Robert E. Jordan. Proteolysis of purified IgGs by human and bacterial enzymes in vitro and the detection of specific proteolytic fragments of endogenous IgG in rheumatoid synovial fluid[J]. *Molecular Immunology*, October 2007.
- [2] Vincents, von Pawel-Rammingen, Björck & Abrahamson. Enzymatic Characterization of the Streptococcal Endopeptidase, IdeS, Reveals That It Is a Cysteine Protease with Strict Specificity for IgG Cleavage Due to Exosite Binding[J]. *Biochemistry* (2004), 43: 15540-15549.
- [3] Wenig, Chatwell, von Pawel-Rammingen, Björck, Huber & Sonderrmann. Structure of the streptococcal endopeptidase Ides, a cysteine proteinase with strict specificity for IgG[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 101, No.50. (Dec. 14, 2004): 17371-17376.
- [4] von Pawel-Rammingen, Johansson & Björck; IdeS. a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G[J]. *The EMBO Journal* vol. 21 No 7: 1607-1615 (2002).
- [5] Björck, Åkesson, Bohus, Trojnar, Abrahamson, Olafsson, Grubb. Bacterial growth blocked by a synthetic peptide based on the structure of a human proteinase inhibitor[J]. *Nature* vol. 337 January (1989).
-

# RHINO BIO



上海瑞诺生物科技有限公司  
苏州瑞特佰生物科技有限公司  
网 址: [www.rhinobio.com](http://www.rhinobio.com)  
电 话: 0512-87663137  
邮 箱: [techserv@rhinobio.com](mailto:techserv@rhinobio.com)



公众号



联系客服

