

(90 × 210mm Size)

FUJIFILM

Wako

Code No. 017-25151 (2.5 mL)
013-25153 (2.5 mL × 5 vials)
011-25154 (200 μL)

For immunochemistry

Anti DYKDDDDK tag Antibody magnetic beads

Anti DYKDDDDK (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) tag Antibody magnetic beads is the slurry of anti DYKDDDDK monoclonal antibody-immobilized magnetic beads. This product can be used for the purification and immunoprecipitation of DYKDDDDK-tagged recombinant proteins. DYKDDDDK-tagged recombinant proteins can be eluted by competitive elution with DYKDDDDK tag Peptide under neutral pH condition after immunoprecipitation.

This product is intended for laboratory research use only.

[Formulation]

10 mg/mL Anti DYKDDDDK tag Antibody magnetic beads, 1 × TBS (pH 7.4), 50w/v% glycerol, 0.05w/v% sodium azide.

[Immobilized antibody]

Anti DYKDDDDK mouse monoclonal antibody (1E6)

[Subclass of Immobilized antibody]

IgG2b

[Assay]

50 μL/immunoprecipitation

[Storage]

- 20 °C

[Additional required materials]

Magnetic stand, Centrifuge, Rotator, Vortex mixer, Tube mixer, Centrifuge tube, 1.5 mL microcentrifuge tube, Cell lysis buffer (see below), PBS (-), TBS, Protease inhibitors, Phosphatase inhibitors.

Recommended cell lysis buffer

- RIPA Buffer (Code No. 182-02451)
50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L Sodium chloride, 0.5w/v% Sodium Deoxycholate, 0.1w/v% Sodium Dodecyl Sulfate, 1.0w/v% NP-40 substitute
- Cell Lysis Buffer M (Code No. 038-21141)
20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 200 mmol/L Sodium Chloride, 2.5 mmol/L Magnesium Chloride, 0.05w/v% NP-40 substitute

When inhibitors are added to a cell lysis buffer, please use it in accordance with manufacturer's instruction.

[Protocol]

The immunoprecipitation method for DYKDDDDK-tagged recombinant proteins (from mammalian cells)

1. The preparation of cell lysates

A. Adherent cells

- 1) Culture the cell lines expressing DYKDDDDK-tagged recombinant proteins ($1 \times 10^6 \sim 10^7$).

- 1/8 -

- 2) Remove the culture medium and wash the cells twice with PBS (-).
- 3) Dissociate the cells using a cell scraper or trypsin-EDTA solution from dishes, and transfer the cell suspension into a new centrifuge tube. In the case of using trypsin-EDTA solution, add the medium including serum to the cell suspension immediately for suppressing damage by trypsin.
- 4) Centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 5) Remove the supernatant.
- 6) After adding PBS (-) and resuspending the cell pellet with PBS (-), centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C. Repeat step 5) to 6).
- 7) Remove the supernatant.
- 8) Add 1 mL of cell lysis buffer to the cell pellet and suspend cells by pipetting or vortex mixer.
- 9) Incubate on ice for 10 minutes.
- 10) Centrifuge the cell lysate at $20,000 \times g$ for 10~20 minutes at 4 °C.
- 11) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube. (Cell lysate)*1

*1 Please keep on ice until you use it for the research.

B. Suspension cells

- 1) Culture the cell lines expressing DYKDDDDK tagged recombinant proteins ($1 \times 10^6 \sim 10^7$).
- 2) Centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 3) Remove the supernatant.
- 4) After adding PBS (-) and resuspending the cell pellet with PBS (-), centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C. Repeat step 3) to 4).
- 5) Remove the supernatant.
- 6) After suspending the cell pellet with 1mL of PBS (-), transfer the cell suspension into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 7) Centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C and remove the supernatant.
- 8) Add 1 mL of cell lysis buffer to the cell pellet and suspend cells by pipetting or vortex mixer
- 9) Incubate on ice for 10 minutes.
- 10) Centrifuge the cell suspension at $20,000 \times g$ for 10~20 minutes at 4 °C.
- 11) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube. (Cell lysate)*1

*1 Please keep on ice until you use it for the research.

2. Immunoprecipitation

- 1) Resuspend anti DYKDDDDK tag antibody magnetic beads by using vortex mixer.
- 2) Transfer 50 μL of beads slurry into a new 1.5 mL micro centrifuge tube.
- 3) Add 1mL of cell lysis buffer into 1.5 mL microcentrifuge tube including beads slurry.
- 4) Place this tube on magnetic stand for 30 seconds to 1 minute.
- 5) After confirming the separation of beads and supernatant, discard the supernatant carefully not to aspirate any beads. (Prewashed beads)

- 2/8 -

- 6) Add appropriate volume of cell lysate (200~1000 μ L) into 1.5 mL microcentrifuge tube including prewashed beads and resuspend the beads by vortex mixer.
- 7) Incubate with rotation for 4 hours at 4 °C.
- 8) Place this tube on magnetic separation stand after incubation.
- 9) After confirming the separation of beads and supernatant, discard the supernatant carefully not to aspirate any beads.
- 10) Add 1 mL of cell lysis buffer into 1.5 mL microcentrifuge tube including magnetic beads and resuspend by vortex mixer.
- 11) Place this tube on magnetic separation stand for 30 seconds to 1 minute.
- 12) After confirming the separation of beads and supernatant, discard the supernatant carefully not to aspirate any beads.
- 13) Repeat 10)-12) steps twice. (Antigen binding beads)

3. The elution of DYKDDDDK-tagged recombinant proteins

Please select an appropriate elution method in accordance with goal and property of protein.

A. The elution by using DYKDDDDK peptide (non-denaturing condition)

- 1) Prepare the DYKDDDDK peptide (Code No. 044-30951) stock solution (5 mg/mL final concentration). Dissolve 5 mg of DYKDDDDK peptide in 1 mL of 1 \times TBS (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L Sodium Chloride).
- 2) Prepare the diluted solution. Dilute DYKDDDDK peptide stock solution in 1 \times TBS at a concentration of 150-500 μ g/mL.
- 3) Add 50 μ L of above diluted solution of DYKDDDDK peptide into 1.5 mL microcentrifuge tube including antigen binding beads.
- 4) Incubate above sample at room temperature or 4 °C with shaking by using tube mixer etc.
- 5) After incubation, spin down the 1.5 mL microcentrifuge tube and place it on magnetic stand for 30 seconds to 1 minute.
- 6) After confirming the separation of beads and supernatant, transfer the supernatants to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 7) Store the collected solution on ice until further experiments. In the case of long storage, store at -20 °C.

B. The elution by using 0.1 mol/L Glycine-HCl, pH 3.0 (acidic condition)

- 1) Add 50 μ L of 0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.0) into microcentrifuge tube including antigen binding beads.
- 2) Incubate the samples at room temperature for 10 minutes with shaking by using tube mixer etc.
- 3) After incubation, spin down the 1.5 mL microcentrifuge tube and place it on magnetic separation stand for 30 seconds to 1 minute.
- 4) After confirming the separation of beads and supernatant, transfer the supernatant to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 5) Neutralize with neutralization buffer. (Example : 0.5 μ L of 1M CAPS, pH 11)
- 6) Store the solution on ice until further experiments. In the case of long storage, store at -20 °C.

C. The elution by using SDS sample buffer (denaturing condition)

When 2 \times SDS sample buffer includes reducing agent such as 2-mercaptoethanol or DTT, heavy chain (50 kDa) and light chain (25 kDa) may dissociate from anti DYKDDDDK tag antibody and are eluted into a recovered sample.

- 1) Add 50 μ L of 2 \times SDS sample buffer (0.125 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 4w/v% SDS, 20w/v% Glycerol, 10 w/v% 2-mercaptoethanol or 100 mM DTT, 0.01w/v% Bromophenol Blue) into microcentrifuge tube including antigen binding bead and resuspend the samples by using vortex mixer.
- 2) Incubate the samples at 95 °C for 5 minutes.
- 3) Place it at room temperature for 5 minutes.
- 4) After incubation, spin down the 1.5 mL microcentrifuge tube and place it on magnetic separation stand for 30 seconds to 1 minute.
- 5) After confirming the separation of beads and supernatant, transfer the supernatants to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 6) Store the collected solution on ice until further experiments. In the case of long storage, store at -20 °C.

D. The elution by using 4w/v%SDS solution (denaturing condition)

This elution method inhibits co-elution of immunoglobulin heavy chain (50kDa) and light chain (25kDa) into eluate.

- 1) Prepare 4w/v%SDS solution and add 50 μ L 4w/v% SDS solution into microcentrifuge tube including antigen binding beads.
- 2) Incubate the samples at room temperature for 10 minutes with shaking by using tube mixer etc.
- 3) After incubation, spin down the 1.5 mL microcentrifuge tube and place it on magnetic separation stand for 30 seconds to 1 minute.
- 4) After confirming the separation of beads and supernatant, transfer the supernatants to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 5) Store the collected solution on ice until further experiments. In the case of long storage, store at -20 °C.

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
 Telephone : + 81-6-6203-3741
 Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
 Richmond, VA 23237
 U.S.A.
 Telephone : +1-804-271-7677
 Facsimile : +1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
 D-41468 Neuss
 Germany
 Telephone : + 49-2131-3111-0
 Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 017-25151 (2.5 mL)
013-25153 (2.5 mL × 5 vials)
011-25154 (200 μL)

免疫化学用

Anti DYKDDDDK tag Antibody magnetic beads 抗DYKDDDDKタグ抗体磁気ビーズ

本品は、DYKDDDDK (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) ペプチドを認識するモノクローナル抗体を固定化した磁気ビーズ懸濁液です。免疫沈降法によるDYKDDDDK融合タンパク質の精製に最適で、溶出にDYKDDDDKペプチドを用いることで目的融合タンパク質を未変性状態で精製することが可能です。

〔組成〕

10 mg/mL Anti DYKDDDDK tag Antibody magnetic beads, 1 × TBS (pH 7.4), 50w/v% glycerol, 0.05w/v% sodium azide

〔固定化抗体〕

抗DYKDDDDKマウスモノクローナル抗体 (1E6)

〔固定化抗体サブクラス〕

IgG_{2b}

〔使用回数〕

50 μL / 免疫沈降反応

〔保存条件〕

- 20℃

〔その他必要な試薬〕

磁気ラック、遠心分離機器、ローテーター、ボルテックスミキサー、チューブミキサー、遠心チューブ、1.5 mL容マイクロ遠心チューブ、細胞溶解バッファー (下記参照)、細胞洗浄バッファー (PBS, TBSなど)、プロテアーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤

推奨される細胞溶解バッファー

●RIPA Buffer (Code No. 182-02451)

50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L Sodium chloride, 0.5w/v% Sodium Deoxycholate, 0.1w/v% Sodium Dodecyl Sulfate, 1.0w/v% NP-40 substitute

●Cell Lysis Buffer M (Code No. 038-21141)

20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 200 mmol/L Sodium Chloride, 2.5 mmol/L Magnesium Chloride, 0.05w/v% NP-40 substitute

プロテアーゼ阻害剤等を細胞溶解バッファーに添加する場合は、使用する阻害剤の添付文書に従い調製してください。

〔プロトコール〕

DYKDDDDK融合タンパク質の免疫沈降 (哺乳動物細胞)

1. 細胞溶解液の調製

A. 接着細胞の場合

- 1) 目的のDYKDDDDK融合タンパク質発現細胞株を1 × 10⁶~10⁷になるまで培養する。

- 2) 培養液を除いた後、PBS (-) で2回洗浄する。
- 3) トリプシン-EDTA溶液または、細胞スクレーパーを用いて細胞をディッシュから剥がし、遠心チューブに細胞を回収する。トリプシン-EDTA溶液を用いる場合には、細胞を剥がした後、血清入り培地などを加え、細胞へのダメージをできるだけ抑えるようにする。
- 4) 細胞懸濁液を4℃、200 × gで5分間遠心分離し、上清を除く。
- 5) PBS (-) を添加し、細胞ペレットを再懸濁後、4℃、200 × gで5分間遠心分離し、上清を除く。この操作を2回行う。
- 6) 細胞ペレットに細胞溶解バッファーを1 mL添加し、ピペティングまたはボルテックスミキサーで細胞を懸濁する。
- 7) 氷上で10分間静置する。
- 8) 4℃、20,000 × gで10~20分間遠心分離する。
- 9) 上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに回収する。
(細胞溶解液) *1

*1 細胞溶解液は使用するまで氷上に保管してください。

B. 浮遊細胞の場合

- 1) 目的のDYKDDDDK融合タンパク質発現細胞株を1 × 10⁶~10⁷になるまで培養する。
- 2) 細胞懸濁液を4℃、200 × gで5分間遠心分離し、培地を除く。
- 3) PBS (-) を添加し、細胞ペレットを再懸濁後、4℃、200 × gで5分間遠心分離し、上清を除く。この操作を2回行う。
- 4) 細胞ペレットにPBS (-) を1 mL加え懸濁後、1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。
- 5) 4℃、200 × gで5分間遠心分離し、上清を除く。
- 6) 細胞ペレットに細胞溶解バッファー1 mLを添加し、ピペティングまたはボルテックスミキサーで細胞を懸濁する。
- 7) 氷上で10分間静置する。
- 8) 4℃、20,000 × gで10~20分間遠心分離する。
- 9) 上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに回収する。
(細胞溶解液) *1

*1 細胞溶解液は使用するまで氷上に保管してください。

2. 免疫沈降反応

- 1) 本品をボルテックスミキサーで十分に懸濁し、バイアル中のビーズを均一にする。
- 2) 本品50 μLのビーズ懸濁液を、新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。
- 3) ビーズ懸濁液が入った1.5 mL容マイクロ遠心チューブに細胞溶解バッファー1 mLを加え、磁気ラックにチューブをセットし、30秒から1分間静置する。

- 4) ビーズと上清が分離されているのを確認後、上清を除去する。(洗浄済みビーズ)
- 5) 細胞溶解液適量(200~1000 μL)を洗浄済みビーズが入っている1.5 mL容マイクロ遠心チューブに添加する。
- 6) ローテーターを用い転倒混和させながら、4℃、4時間インキュベートする。
- 7) 磁気ラックに1.5 mL容マイクロ遠心チューブをセットして磁気ビーズと溶液を分離し、上清を除く。
- 8) 1.5 mL容マイクロ遠心チューブに細胞溶解バッファー1 mLを加えて、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 9) 磁気ラックに1.5 mL容マイクロ遠心チューブをセットして30秒から1分間静置し、ビーズと上清が分離されているのを確認後、上清を除く。
- 10) 上記8)-9)の洗浄操作をさらに2回繰り返す。(抗原結合ビーズ)

3. DYKDDDDK融合タンパク質の溶出

目的タンパク質の性質や、免疫沈降後の実験内容に応じて、下記の適した溶出方法を採用してください。

A. DYKDDDDKペプチドによる溶出(未変性条件下での溶出)

- 1) 終濃度5 mg/mL DYKDDDDKペプチドストック溶液を調製する。
DYKDDDDKペプチド(Code No. 044-30951)5 mgを1×TBS(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L Sodium Chloride)1 mLに溶解する。
- 2) 5 mg/mL DYKDDDDKペプチドストック溶液を用いて、150-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度のDYKDDDDKペプチド希釈溶液を調製する。
- 3) 上記で調製したDYKDDDDKペプチド希釈溶液50 μL を抗原結合ビーズが入っている1.5 mL容マイクロ遠心チューブに添加する。
- 4) チューブミキサー等を用いて攪拌しながら、室温または冷蔵で30分間インキュベートする。
- 5) 1.5 mL容マイクロ遠心チューブを卓上遠心機等でスピンドウンし、磁気ラックにセットして30秒から1分間静置し、ビーズと上清が分離されているのを確認後、上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。
- 6) 回収した溶液は使用するまで氷上で保管する。ただし、長期保存する場合は冷凍(-20℃以下)で保存する。

B. 0.1 mol/L Glycine-HCl, pH 3.0による溶出(酸性条件下での溶出)

- 1) 0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.0) 50 μL を抗原結合ビーズが入っているマイクロ遠心チューブに添加する。
- 2) チューブミキサー等を用いて攪拌させながら10分間室温でインキュベーションする。
- 3) 1.5 mL容マイクロ遠心チューブを卓上遠心機等でスピンドウンし、磁気ラックにセットして30秒から1分間静置し、ビーズと上清が分離されているのを確認後、上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。

- 4) 中和バッファーを添加し、中和する(例、1M CAPS、pH 11、0.5 μL)。
- 5) 回収した溶液は使用するまで氷上で保管する。ただし、長期保存する場合は冷凍(-20℃以下)で保存する。

C. SDSサンプルバッファーによる溶出(変性条件下での溶出)

2×SDSサンプルバッファーに還元剤(2-メルカプトエタノールやDTT)が添加されている場合は、ビーズに結合している抗DYKDDDDKタグ抗体のH鎖(50 kDa)とL鎖(25 kDa)が溶出します。

- 1) 2×SDSサンプルバッファー(0.125 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 4w/v% SDS, 20w/v% Glycerol, 10w/v% 2-mercaptoethanol or 100 mM DTT, 0.01w/v% Bromophenol Blue) 50 μL を抗原結合ビーズが入っている1.5 mL容マイクロ遠心チューブに添加し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 2) 95℃、5分間インキュベートする。
- 3) 室温で5分間静置する。
- 4) 1.5 mL容マイクロ遠心チューブを卓上遠心機等でスピンドウンし、磁気ラックにセットして30秒から1分間静置し、ビーズと上清が分離しているのを確認後、上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。
- 5) 回収した溶液は実験に使用するまで氷上に保管する。ただし、長期保存する場合は冷凍(-20℃以下)で保存する。

D. 4w/v%SDS溶液による溶出(変性条件下での溶出)

本溶出法は、抗体由来のH鎖とL鎖の溶出液への混入を抑えることができます。

- 1) 4w/v%SDS溶液を調製し、50 μL を抗原結合ビーズが入っているマイクロ遠心チューブに添加する。
- 2) チューブミキサー等を用いて攪拌させながら10分間室温でインキュベーションする。
- 3) 1.5 mL容マイクロ遠心チューブを卓上遠心機等でスピンドウンし、磁気ラックにセットして30秒から1分間静置し、ビーズと上清が分離しているのを確認後、上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。
- 4) 回収した溶液は実験に使用するまで氷上に保管する。ただし、長期保存する場合は冷凍(-20℃以下)で保存する。

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社
大阪府中央区道修町三丁目1番2号
Tel : 06-6203-3741

1712KA1