

(90 × 210mm Size)

FUJIFILM

Wako

Code No. 012-25841 (2 mL, Net volume 1 mL)
018-25843 (10 mL, Net volume 5 mL)
016-25844 (50 mL, Net volume 25 mL)

For immunochemistry

Anti PA tag Antibody Beads 抗PA タグ抗体ビーズ

PA tag is consisted of 21 amino acids (GVAMPGAEDDVV) and has been used as the tag for detection and/or purification of PA tag fusion recombinant proteins.

Anti PA tag Antibody Beads is the slurry of agarose beads immobilized Anti PA tag rat monoclonal antibody. This product is used for the purification of PA tag fusion proteins by immunoprecipitation method and able to purify PA tag fusion proteins with neutral pH condition by the competitive elution of PA tag Peptide. In addition, This product is easily regenerated by using PA tag Washing Solution (Code No. 169-27261) on neutral pH condition.

[Formulation]

1 × PBS aqueous solution with 0.05w/v% sodium azide, pH 7.2.

[Immobilized antibody]

Anti PA tag, Rat Monoclonal Antibody (NZ-1)

[Immobilized antibody subclass]

IgG_{2a}

[Antibody bonding amount]

Indicated on the label.

[Antigen binding capacity]

0.015-1.0 mg protein/1 mL beads

The binding capacity depends on the target protein and the experiment.

[Usage]

10mL conditioned culture medium/50-100 μL beads

200-1,000 μL cell lysate/20 μL beads

Please examine appropriate usage according to the target protein and cell lines etc.

[Additional required reagents and materials]

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.

In the case of adding a protease inhibitor etc. to a cell lysis buffer, please prepare it according to its instruction manual.

[Protocol]

The immunoprecipitation of PA tag fusion proteins and the regeneration of Anti PA tag Antibody Beads

1. The preparation of samples

1-A In the case of adherent cells

- 1) Culture the cell lines expressing PA tag fusion proteins ($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells).^{※1}
- 2) Remove the medium from culture dishes and wash cultured cells twice with PBS(-).
- 3) Detach the cells from dishes using a cell scraper or trypsin-EDTA solution and transfer the cell suspension into a new 1.5 mL centrifugation tube. In the case of trypsin-EDTA solution, add the medium including serum to the cell suspension immediately to avoid the damage due to trypsin treatment.
- 4) Centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 5) Remove the supernatant.
- 6) After adding 1 mL of PBS(-) and suspending the cell pellet by pipetting, centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 7) Remove the supernatant.
- 8) Repeat 6)-7) steps.
- 9) Add 1 mL of cell lysis solution to the cell pellet and suspend by pipetting or vortex mixer.
- 10) Incubate on ice for 10 minutes.
- 11) Centrifuge the cell lysate at $20,000 \times g$ for 10 ~ 20 minutes at 4 °C.^{※2}
- 12) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL microcentrifuge tube. ... **Cell lysate**

1-B In the case of suspension cells

- 1) Culture the cell lines expressing PA tag fusion proteins ($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells).^{※1}
- 2) Centrifuge the culture solution at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 3) Remove the supernatant.
- 4) After adding 1 mL of PBS(-) and suspending the cell pellet by pipetting, transfer the cell suspension into a new 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 5) Centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 6) Remove the supernatant.
- 7) After adding 1 mL of PBS(-) and suspending the cell pellet, centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 8) Remove the supernatant.
- 9) Add 1 mL of cell lysis solution to the cell pellet and suspend by pipetting or vortex mixer.
- 10) Incubate on ice for 10 minutes.
- 11) Centrifuge the cell lysate at $20,000 \times g$ for 10 ~ 20 minutes at 4 °C.^{※2}
- 12) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL microcentrifuge tube. ... **Cell lysate**

1-C In the case of conditioned culture medium

- 1) Culture the cell lines expressing PA tag fusion proteins ($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells).^{※1}
- 2) Recover the cell culture medium into a new centrifuge tube and centrifuge at $2,000 \times g$ for 10 minutes at 4 °C for cell and cell debris removal.^{※3}

- 3) Transfer the supernatant into a new centrifuge tube and adjust its pH to 7.5 with 1 mol/L Tris. . . . **Conditioned culture medium**

※1 Please examine some appropriate culture conditions according to cell lines.

※2 If a white floating layer appeared in supernatant after centrifugation, please filtrate it using a filter (pore size : 0.45 μm).

※3 Cells etc. are removable by using a filter (pore size : 0.22 μm etc.).

2. Prewashing of Antibody Beads

- 1) Suspend Anti PA tag Antibody Beads adequately by vortex mixer.
- 2) Transfer 40-200 μL (net beads volume 20-100 μL) of Anti PA tag Antibody Beads into a new 1.5 mL microcentrifuge tube.※4
- 3) Centrifuge at 5,000-8,000 $\times g$ for 30 seconds at 4 $^{\circ}\text{C}$.
- 4) Incubate for 1-2 minutes on ice.
- 5) Remove the supernatant carefully not to aspirate beads.
- 6) Add 0.5-1.0 mL of chilled TBS or chilled PBS(-) and suspend by vortex mixer.※5
- 7) Centrifuge at 5,000-8,000 $\times g$ for 30 seconds at 4 $^{\circ}\text{C}$ and remove the supernatant carefully not to aspirate beads.
- 8) Repeat 6)-7) step. . . . **Prewashed beads**

※4 Please examine an appropriate beads quantity and centrifugation tube for your purpose.

※5 Please choice an appropriate washing buffer for your purpose.

3. Immunoprecipitation

3-A In the case of cell lysate

- 1) Add 200-1,000 μL of **Cell lysate** into **Prewashed beads**. ※6
- 2) Incubate with rotation for more than 2 hours at 4 $^{\circ}\text{C}$.
- 3) Centrifuge at 5,000-8,000 $\times g$ for 30 seconds at 4 $^{\circ}\text{C}$.
- 4) Remove the supernatant carefully not to aspirate beads.
- 5) Add 0.5-1.0 mL of chilled TBS or chilled PBS(-) and suspend by vortex mixer.
- 6) Centrifuge at 5,000-8,000 $\times g$ for 30 seconds at 4 $^{\circ}\text{C}$ and remove the supernatant carefully not to aspirate beads.
- 7) Repeat 5)-6) step. . . . **Antigen binding beads**

※6 Fill up to 1 mL by cell lysis buffer as needed.

3-B In the case of conditioned culture medium

- 1) Add 10 mL of **Conditioned culture medium** into **Prewashed beads**. ※7
- 2) Incubate with rotation for more than 2 hours at 4 $^{\circ}\text{C}$.
- 3) Centrifuge at 5,000-8,000 $\times g$ for 1 minute at 4 $^{\circ}\text{C}$.
- 4) Remove the supernatant carefully not to aspirate beads.
- 5) Transfer the beads into a new 1.5 mL microcentrifuge tube using 1.0 mL of chilled TBS or chilled PBS(-). ※8
- 6) Centrifuge at 5,000-8,000 $\times g$ for 30 seconds at 4 $^{\circ}\text{C}$ and remove the supernatant carefully not to aspirate beads.
- 7) Add 0.5-1.0 mL of chilled TBS or chilled PBS(-) and suspend by vortex mixer.
- 8) Centrifuge at 5,000-8,000 $\times g$ for 30 seconds at 4 $^{\circ}\text{C}$ and remove the supernatant carefully not to aspirate beads.
- 9) Repeat 7)-8) step 1-3 times. . . . **Antigen binding beads**

※7 The use of 50-100 μL beads per 10 mL conditioned culture medium is recommended.

※8 The yield of PA tag fusion proteins may increase by reuse of a conditioned culture medium removed at step 4).

4. The elution of PA tag fusion proteins

Please choice an appropriate elution method depending on protein character and downstream experiment.

4-A The elution by PA tag Peptide (non-denaturing condition)

- 1) Prepare the PA tag Peptide stock solution (final concentration 5mg/mL). Dissolve 5 mg of PA tag Peptide (Code No. 167-25501) in 1 mL of TBS (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L Sodium Chloride). ※9
- 2) Prepare the PA tag Peptide working solution (final concentration 100-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) by using the PA tag Peptide stock solution.
- 3) Add above PA tag Peptide working solution of 1-5 times the amount of **Antigen binding beads** into the 1.5 mL micro centrifugation tube containing **Antigen binding beads**.
- 4) Incubate with rotation for 30 minutes at 4 $^{\circ}\text{C}$. ※10
- 5) Centrifuge at 5,000-8,000 $\times g$ for 30 seconds at 4 $^{\circ}\text{C}$ and transfer the supernatant into a new 1.5 mL microcentrifuge tube carefully not to aspirate beads.
- 6) Store the collected supernatant on ice. ※11

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

- 1) Add 0.1 mol/L Glycine-HCl, pH 3.0 of 1-5 times the amount of **Antigen binding beads** into the 1.5 mL microcentrifuge tube containing **Antigen binding beads**.
- 2) Incubate with rotation for 5 minutes at room temperature.
- 3) Centrifuge at 5,000-8,000 $\times g$ for 30 seconds at room temperature and transfer the supernatant into a new 1.5 mL microcentrifuge tube carefully not to aspirate beads.
- 4) Neutralize by neutralization buffer. (Example : 1 mol/L Tris-HCl, pH 9.0)
- 5) Store the neutralized supernatants on ice.

4-C The elution by SDS sample buffer (denaturing condition)

In the case of using 2 \times SDS sample buffer including reducing reagents such as 2-mercaptoethanol or DTT, heavy chain (50kDa) and light chain (25kDa) of Anti PA tag Rat Monoclonal Antibody is denatured.

- 1) Add 40-200 μL of 2 \times SDS sample buffer (0.125 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 4w/v% SDS, 20w/v % Glycerol, 10% 2-mercaptoethanol or 100 mmol/L DTT, 0.01% Bromophenol Blue) into a 1.5 mL microcentrifuge tube containing **Antigen binding beads** and suspend by vortex mixer.
- 2) Boil for 5 minutes at 95 $^{\circ}\text{C}$.
- 3) Centrifuge at 5,000-8,000 $\times g$ for 30 seconds at room temperature and transfer the supernatant into a new 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 4) Store the collected supernatants on ice.

- ※9 Please store the used PA tag Peptide stock solution at -20°C , and use it as promptly as possible.
- ※10 In order to increase the elution efficiency of PA tag fusion proteins, please incubate with rotation for more than 5 minutes.
- ※11 Please remove the peptide from the solution by dialysis or gel filtration as needed.

5. The regeneration of the used Anti PA tag Antibody Beads by PA tag Washing Solution (Code No. 169-27261).

- 1) Add 10 times the volume of PA tag Washing Solution (Code No. 169-27261) into the used Anti PA tag Antibody Beads.
- 2) Incubate with rotation for 10 minutes at room temperature.
- 3) Centrifuge at $5,000-8,000 \times g$ for 30 seconds at room temperature and remove the supernatant carefully not to aspirate beads.
- 4) Repeat 1)-3) steps 3 times.
- 5) Add 10 times the volume of TBS or PBS(-) and suspend by vortex mixer.
- 6) Centrifuge at $5,000-8,000 \times g$ for 30 seconds at room temperature and remove the supernatant carefully not to aspirate beads.
- 7) Repeat 5)-6) step 3 times.
- 8) Add 2 times the volume of TBS or PBS(-).
- 9) Store $2-10^{\circ}\text{C}$.

[Storage]
 $2-10^{\circ}\text{C}$

[Reference]
 Fujii, Y. *et al.*, "PA tag : A versatile protein tagging system using a super high affinity antibody against a dodecapeptide derived from human podoplanin.", *Protein Exp. Purif.*, **95**, 240-247 (2014).

[Related products for Anti PA tag Antibody Beads]

Code No.	Product Name	Package
169-27261	PA tag Washing Solution	50 mL
167-25501	PA tag Peptide	5 mg
163-25503		25 mg
182-02451	RIPA Buffer	100 mL
188-02453		250 mL
038-21141	Cell Lysis Buffer M	100 mL
034-21143		250 mL

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. 012-25841 (2 mL, Net volume 1 mL)
018-25843 (10 mL, Net volume 5 mL)
016-25844 (50 mL, Net volume 25 mL)

免疫化学用
Anti PA tag Antibody Beads
抗PA タグ抗体ビーズ

PAタグは、PAタグ融合組換えタンパク質の検出や精製に使用される12アミノ酸（GVAMPGAEDDVV）で構成されたタグです。

本品は、抗PAタグラットモノクローナル抗体が固定化されたアガロースビーズの懸濁液です。免疫沈降法によるPAタグ融合タンパク質の精製に最適で、溶出にPAタグペプチドを用いることで目的のPAタグ融合タンパク質を中性付近のpH条件下で精製可能です。また、PAタグ洗浄溶液（Code No. 169-27261）をもちいて、使用済み抗PAタグ抗体ビーズを容易に再生可能です。

〔組成〕

0.05w/v%アジ化ナトリウムを含む1×PBS、pH 7.2

〔固定化抗体〕

抗PAタグ、ラットモノクローナル抗体（NZ-1）

〔固定化抗体サブクラス〕

IgG_{2a}

〔抗体結合量〕

ラベルに記載。

〔抗原結合容量〕

0.015-1.0 mg protein/1 mL beads

目的のタンパク質によって結合量は変化します。

〔使用量〕

10 mL培養上清/50-100 μ L beads

200-1,000 μ L細胞溶解液/20 μ L beads

上記ビーズ使用量は目安です。目的のタンパク質、細胞種など実験系に応じて最適な使用量をあらかじめご検討ください。

〔その他必要な試薬および器具〕

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

細胞溶解バッファー（推奨）

●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, 0.05 w/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〕

PAタグ融合タンパク質の免疫沈降と使用済み抗PAタグ抗体ビーズの再生

1. サンプルの調製

1-A 接着細胞の場合

- 1) 目的のPAタグ融合タンパク質発現細胞株を $1 \times 10^6 \sim 10^7$ になるように適切な条件下で培養する*1。
- 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1 mL添加し、細胞ペレットを懸濁後、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*2。
- 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-B 浮遊細胞の場合

- 1) 目的のPAタグ融合タンパク質発現細胞株を $1 \times 10^6 \sim 10^7$ になるように適切な条件下で培養する*1。
- 2) 培養液を4℃、200×gで5分間遠心分離し、上清を除く。
- 3) 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。
- 4) 4℃、200×gで5分間遠心分離し、上清を除く。
- 5) 細胞ペレットにPBS(-)を1 mL加え再懸濁後、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*2。
- 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-C 培養上清の場合

- 1) 目的のPAタグ融合タンパク質発現細胞株を $1 \times 10^6 \sim 10^7$ になるように適切な条件下で培養する*1。
- 2) 培養液を新しい遠心チューブに回収して4℃、2,000×gで10分間遠心分離し、細胞を除く*3。

- 3) 上清を新しい遠心チューブに移し、回収した培養上清のpHを1 mol/L TrisでpH 7.5になるように調整する。…

培養上清

- ※1 培地や培養細胞数などは目的の細胞株に応じて適切な条件をご検討ください。
※2 遠心分離後、上清に白濁浮遊層が現れることがあります。その際には、遠心フィルター (pore size : 0.45 μmなど) を用いてろ過処理することで浮遊物をほぼ除去することができます。
※3 フィルターろ過 (pore size : 0.22 μmなど) を用いてろ過処理することで細胞などを除去することができます。

2. 抗体ビーズの使用前洗浄

- 1) 本品をボルテックスミキサーで十分に懸濁する。
- 2) 本品40～200 μL (net beads volume 20～100 μL) を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す^{※4}。
- 3) 4℃、5,000～8,000 × gで30秒間遠心分離する。
- 4) 氷上で1～2分間静置し、ビーズを底に沈殿させる。
- 5) ビーズを吸い込まないように上清を除去する。
- 6) 氷冷したTBSまたはPBS(-)を0.5～1.0 mL添加し、ボルテックスミキサーで懸濁する^{※5}。
- 7) 4℃、5,000～8,000 × gで30秒間遠心分離し、ビーズを吸い込まないように上清を注意深く除去する。
- 8) 6)-7)を繰り返す。… **洗浄済みビーズ**

- ※4 目的に応じて適切なビーズ量および適切な容器をご検討ください。
※5 目的に応じて適切な洗浄バッファーをご検討ください。

3. 免疫沈降反応

3-A 細胞溶解液の場合

- 1) **細胞溶解液** 200～1,000 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}。
- 2) ローテーター等により転倒混和しながら4℃で2時間以上反応させる。
- 3) 4℃、5,000～8,000 × gで30秒間遠心分離する。
- 4) ビーズを吸い込まないように上清を除去する。
- 5) 氷冷したTBSまたはPBS(-)を0.5～1.0 mL添加し、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 6) 4℃、5,000～8,000 × gで30秒間遠心分離し、ビーズを吸い込まないように上清を注意深く除去する。
- 7) 5)-6)を1～3回繰り返す。… **抗原結合ビーズ**

- ※6 必要に応じて細胞溶解バッファーを添加して1 mLまでメスアップしていただいても構いません。

3-B 培養上清の場合

- 1) **洗浄済みビーズ** が入っている遠心チューブに **培養上清** 10 mLを添加する^{※7}。
- 2) ローテーター等により転倒混和しながら4℃で2時間以上反応させる。
- 3) 4℃、5,000～8,000 × gで1分間遠心分離する。
- 4) ビーズを吸い込まないように上清を除去する。
- 5) 氷冷したTBSまたはPBS(-)を1.0 mL添加して、新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブにビーズを移す^{※8}。
- 6) 4℃、5,000～8,000 × gで30秒間遠心分離し、ビーズを吸い込まないように上清を注意深く除去する。

- 7) 氷冷したTBSまたはPBS(-)を0.5～1.0 mL添加し、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 8) 4℃、5,000～8,000 × gで30秒間遠心分離し、ビーズを吸い込まないように上清を注意深く除去する。
- 9) 7)-8)を1～3回繰り返す。… **抗原結合ビーズ**

- ※7 10 mLの培養上清当たり50～100 μL beadsの使用を推奨しています。
※8 工程4)で除去した上清を免疫沈降直後のビーズに再度添加することによって、PAタグ融合タンパク質の収量が上がる場合があります。

4. PAタグ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。

4-A PAタグペプチドによる溶出 (未変性条件下での溶出)

- 1) PAタグペプチド (Code No. 167-25501) 5 mgをTBS (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L Sodium Chloride) 1 mLに溶解して、終濃度5.0 mg/mL PAタグペプチドストック溶液を調製する^{※9}。
- 2) 5.0 mg/mL PAタグペプチドストック溶液を用いて、100～200 μg/mL濃度のPAタグペプチド溶液を調製する。
- 3) **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上記で調製したPAタグペプチド溶液を **抗原結合ビーズ** の1～5倍量添加する。
- 4) ローテーター等により30分間4℃で転倒混和する^{※10}。
- 5) 4℃、5,000～8,000 × gで30秒間遠心分離した後、ビーズを吸い込まないように上清を回収し、新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。
- 6) 回収した上清は使用するまで氷上で保管する^{※11}。

4-B 0.1 mol/L Glycine-HCl, pH3.0による溶出 (酸性条件下での溶出)

- 1) **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0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.0) を **抗原結合ビーズ** の1～5倍量添加する。
- 2) ローテーター等により5分間室温で転倒混和する。
- 3) 室温、5,000～8,000 × gで30秒間遠心分離した後、ビーズを吸い込まないように上清を回収し、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 (例：1 mol/L Tris-HCl, pH 9.0) を添加して中和する。
- 5) 中和した上清は使用するまで氷上で保管する。

4-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-mercaptoethanol やDTT) が添加されている場合、ビーズに結合している抗PAタグ抗体のH鎖 (50 kDa) とL鎖 (25 kDa) が剥離します。
- 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, 10% 2-Mercaptoethanol or 100 mmol/L DTT, 0.01% Bromophenol Blue) 40-200 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℃以上、5分間ボイルする。
- 3) 室温、5,000～8,000×gで30秒間遠心分離し、上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。
- 4) 回収した上清は使用するまで氷上に保存する。

- ※9 使用しない5.0 mg/mL PAタグペプチドストック溶液は-20℃で保存し、できるだけ速やかに使用してください。
- ※10 PAタグペプチドでの競合溶出効率を高める為、必ず5分以上転倒混和してください。
- ※11 溶液中のペプチドは、透析やゲルろ過などで目的に応じて除いてください。

5. 抗PAタグ抗体ビーズの再生

PAタグ洗浄溶液 (Code No. 169-27261) を使用してビーズを再生します。適宜、最適容量の遠心管などに移して再生作業を行ってください。

- 1) 使用済み抗PAタグ抗体ビーズに10倍量のPAタグ洗浄溶液を添加する。
- 2) ローテーター等により10分間、室温で転倒混和する。
- 3) 室温、5,000～8,000×gで30秒間遠心分離し、ビーズを吸い込まないように上清を除去する。
- 4) 1)-3)を3回繰り返す。
- 5) TBSまたはPBS(-)をビーズの10倍量添加した後、ボルテックスミキサーで十分懸濁する。
- 6) 室温、5,000～8,000×gで30秒間遠心分離し、ビーズを吸い込まないように上清を除去する。
- 7) 5)-6)を3回繰り返す。
- 8) TBSまたはPBS(-)をビーズの2倍量添加する。
- 9) 2～10℃で保存する。

〔保存条件〕

2～10℃

〔参考文献〕

Fujii, Y. *et al.*, "PA tag : A versatile protein tagging system using a super high affinity antibody against a dodecapeptide derived from human podoplanin.", *Protein Exp. Purif.*, **95**, 240-247 (2014).

〔抗PAタグ抗体ビーズ関連製品〕

コード No.	品 名	容 量
169-27261	PA タグ洗浄溶液	50 mL
167-25501	PA タグペプチド	5 mg
163-25503		25 mg
182-02451	RIPA バッファー	100 mL
188-02453		250 mL
038-21141	細胞溶解バッファー M	100 mL
034-21143		250 mL

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

1801KA1