

Code No. 010-26501 (200 μ L, beads net volume 100 μ L)
 016-26503 (2 mL, beads net volume 1 mL)
 014-26504 (10 mL, beads net volume 5 mL)

Anti c-Myc Antibody Beads (10D11)

Anti c-Myc Antibody Beads is the slurry of anti c-Myc monoclonal antibody immobilization beads. This product is used for the purification of c-Myc tagged recombinant proteins by the competitive elution using c-Myc peptide (EQKLISEEDL).

[Formulation]

1 \times PBS (pH 7.4), 50% glycerol, 0.02 vol% ProClin 300

[Beads matrix]

4% Agarose

[Antibody quantity]

7.5 mg/mL beads

[Antibody clone No.]

10D11

[Antibody subclass]

IgG₁

[Binding capacity]

Min. 0.9 mg c-Myc tagged recombinant protein/mL beads

[Setting Volume]

1.8 ~ 2.1 mL slurry/mL beads

[Additional materials required]

centrifuge, centrifugation tube, 1.5 mL micro centrifugation tube, washing buffer (PBS(-), TBS etc.), cell scraper, protease inhibitor, phosphatase inhibitor, cell lysis buffer (following).

Example of cell lysis buffer

- 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 15 mmol/L Sodium Chloride, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100.
- 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.

[Procedure]

The immunoprecipitation of c-Myc tagged recombinant proteins (Mammalian cells).

1. The preparation of cell lysates

A. Adherent cells

- 1) Culture the cell lines. ($1 \times 10^6 - 10^7$)
- 2) Remove the culture medium and wash the cells twice with PBS(-).

- 3) Collect the cells using a cell scraper or Trypsin-EDTA solution from dishes to a new centrifugation tube. In the case of using Trypsin-EDTA solution, add medium including serum after cell collection.
- 4) Centrifuge cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 $^{\circ}$ C.
- 5) Remove the supernatant.
- 6) Suspend cell pellet in 1mL of PBS (-). Transfer all of the suspension into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 7) Repeat step 4) to 5).
- 8) Suspend cell pellet in 1 mL of PBS (-).
- 9) Repeat step 4) to 5).
- 10) Add 1 mL of cell lysis buffer and suspend cells by pipetting.
- 11) Incubate for 5 - 10 minutes on ice.
- 12) Centrifuge the cell lysate at $20,000 \times g$ for 5 - 20 minutes at 4 $^{\circ}$ C.
- 13) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.

B. Suspension cells

- 1) Culture the cell lines. ($1 \times 10^6 - 10^7$)
- 2) Centrifuge cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 $^{\circ}$ C.
- 3) Remove the supernatant.
- 4) Suspend cell pellet in 1mL of PBS (-). Transfer all of suspension into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 5) Centrifuge cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 $^{\circ}$ C.
- 6) Remove the supernatant.
- 7) Suspend cell pellet by 1 mL of PBS (-).
- 8) Centrifuge cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 $^{\circ}$ C.
- 9) Remove the supernatant.
- 10) Add 1 mL of cell lysis buffer and suspend cells by pipetting.
- 11) Incubate for 5 - 10 minutes on ice.
- 12) Centrifuge the cell lysate at $20,000 \times g$ for 5 - 20 minutes at 4 $^{\circ}$ C.
- 13) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.

2. Antigen-antibody reaction

- 1) Mix product bottle by vortex mixer.
- 2) Transfer 40 μ L (beads net approx. 20 μ L) of this product into a new micro centrifugation tube.
- 3) Centrifuge the beads slurry at $5,000 - 8,000 \times g$ for 30 seconds at 4 $^{\circ}$ C.
- 4) Incubate for 1 - 2 minutes on ice.
- 5) Remove the supernatant.
- 6) Add 0.5 ~ 1 mL of PBS (-) or TBS and mix by vortex mixer.
- 7) Centrifuge the beads slurry at $5,000 - 8,000 \times g$ for 30 seconds at 4 $^{\circ}$ C and remove the supernatant.
- 8) Repeat step 6) - 7). (**Prewashed beads**)
- 9) Additional step^{*1}.
- 10) Add 200 - 1000 μ L of cell lysate^{*2} into tube of **Prewashed beads**.
- 11) Mix by rotator for 2 - 8 hours at 4 $^{\circ}$ C.

12) Centrifuge the beads slurry at $5,000 - 8,000 \times g$ for 30 seconds at 4°C and remove the supernatant.

13) Repeat step 6) - 7) $\times 3$. (**Antigen binding beads**)

※ 1 : To remove the unattached antibody, add $0.5 - 1.0\text{ mL}$ of 0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.5) into tube of **Prewashed beads** before antigen binding reaction. Centrifuge the beads slurry at $5,000 - 8,000 \times g$ for 30 seconds at 4°C and remove the supernatant. In this case, avoid exposing this product to 0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.5) for a long time (max. 20 minutes). After washing with 0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.5), add $0.5 - 1\text{ mL}$ of PBS (-) or TBS and mix by vortex mixer. Centrifuge the beads slurry at $5,000 - 8,000 \times g$ for 30 seconds at 4°C and remove the supernatant (Procedure A). Repeat Procedure A twice.

※ 2 : Fill up to 1 mL by cell lysis buffer as needed procedure.

3. The elution of c-Myc tagged recombinant proteins Please see the following methods of A - C.

A. The competitive peptide elution at neutral pH condition by using c-Myc peptide

- 1) Prepare the c-Myc peptide stock solution (final conc. $5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$)^{※3}. Dissolve 5 mg of c-Myc peptide in 1 mL of $1 \times$ TBS (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L Sodium Chloride).
- 2) Prepare the c-Myc peptide working solution (final conc. $150\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$). Add $3\text{ }\mu\text{L}$ of the c-Myc peptide stock solution into $97\text{ }\mu\text{L}$ of $1 \times$ TBS.
- 3) Add $100\text{ }\mu\text{L}$ of the c-Myc peptide working solution into a tube of **Antigen binding beads**.
- 4) Mix by rotator for 30-60 minutes at 4°C .
- 5) Centrifuge the beads slurry at $5,000 - 8,000 \times g$ for 30 seconds at 4°C and transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 6) Store the recovered supernatant at 4°C . For long term storage, store at -20°C .

※ 3 : Aliquot and store at -20°C . Avoid repeated freeze and thaw cycle.

B. The elution at acidic condition by using 0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.5) (room temperature)

- 1) Add $100\text{ }\mu\text{L}$ of 0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.5) into tube of **Antigen binding beads**.
- 2) Mix by rotator for 5-10 minutes at room temperature.
- 3) Centrifuge the beads slurry at $5,000 - 8,000 \times g$ for 30 seconds at 4°C and transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 4) To adjust pH to neutral, add $10\text{ }\mu\text{L}$ of neutralization buffer (0.5 mol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 mol/L Sodium Chloride).
- 5) Store the recovered supernatant at 4°C . For long term storage, store at -20°C .

C. The elution by using SDS sample buffer (room temperature)

- 1) Add $100\text{ }\mu\text{L}$ of $4 \times$ SDS sample buffer^{※4} (0.25 mol/L Tris-HCl (pH 6.8), $8\text{ w/v}\%$ SDS, $40\text{ w/v}\%$ Glycerol, $0.02\text{ w/v}\%$ Bromophenol Blue) into tube of **Antigen binding beads**.

2) Boil in water or heat block for 3 minutes.

3) Centrifuge the beads slurry at $5,000 - 8,000 \times g$ for 30 seconds at 4°C and transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.

4) Store the recovered supernatant at 4°C . For long term storage, store at -20°C .

※ 4 : In the case of addition of reducing reagents such as 2-mercaptoethanol or DTT, anti c-Myc antibody [heavy chain (50kDa) and light chain (25kDa)] is easily dissociated from agarose beads.

[Storage]

Keep at -20°C .

[Package]

$200\text{ }\mu\text{L}$ (beads net volume $100\text{ }\mu\text{L}$) (010-26501)

2 mL (beads net volume 1 mL) (016-26503)

10 mL (beads net volume 5 mL) (014-26504)

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

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

コード No. 010-26501 (200 μ L, beads net volume 100 μ L)
016-26503 (2 mL, beads net volume 1 mL)
014-26504 (10 mL, beads net volume 5 mL)

Anti c-Myc Antibody Beads (10D11)

本品は、c-Mycタグ融合タンパク質の精製に使用するアフィニティービーズです。免疫沈降に最適で、c-Mycペプチド(EQ-KLISEEDL)を用いたペプチド溶出にも使用できます。

〔組成〕

1 × PBS (pH 7.4), 50% glycerol, 0.02 vol% ProClin 300

〔使用担体〕

4% アガロース

〔抗体結含量〕

7.5 mg/mL

〔結合抗体クローンNo.〕

10D11

〔結合抗体サブクラス〕

IgG₁

〔抗原結含量〕

ビーズ 1 mL 当たり約 0.9 mg の c-Myc タグ融合タンパク質が結合。

〔Setting Volume〕

1.8~2.1 mL slurry/mL resin

〔その他必要な試薬〕

遠心分離機、遠心チューブ、1.5 mL 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)、スクレーパー、プロテアーゼ阻害剤、ホスターゼ阻害剤。

推奨される細胞溶解バッファー

- 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 15 mmol/L Sodium Chloride, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100.
- RIPA Buffer (コード 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 (コード 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.

〔プロトコール〕

c-Myc 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

- 1) 目的の細胞株を培養する ($1 \times 10^6 \sim 10^7$)。
- 2) 培養液を除いた後、氷冷した PBS (-) で 2 回洗浄を行う。

- 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) 氷冷した PBS (-) 1 mL を添加し、細胞ペレットを懸濁後、1.5 mL マイクロ遠心チューブに移す。
- 6) 4℃、200 × g で 5 分間遠心分離し、上清を除く。
- 7) 氷冷した PBS (-) 1 mL を添加し、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。
- 8) 細胞溶解バッファー 1 mL を添加し、ピペッティングで細胞を懸濁する。
- 9) 氷上で 5~10 分間静置する。
- 10) 4℃、20,000 × g で 5~20 分間遠心分離する。
- 11) 上清を新しい 1.5 mL マイクロ遠心チューブに回収する。
(細胞溶解溶液)

B. 浮遊細胞

- 1) 目的の細胞株を培養する ($1 \times 10^6 \sim 10^7$)。
- 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) 細胞ペレットを氷冷した PBS (-) 1 mL で懸濁後、1.5 mL 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) 細胞ペレットを氷冷した PBS (-) 1 mL で再懸濁する。
- 6) 4℃、200 × g で 5 分間遠心分離し、上清を除く。
- 7) 細胞溶解バッファー 1 mL を添加し、ピペッティングで細胞を懸濁する。
- 8) 氷上で 5~10 分間静置する。
- 9) 4℃、20,000 × g で 5~20 分間遠心分離する。
- 10) 上清を新しい 1.5 mL マイクロ遠心チューブに回収する。
(細胞溶解溶液)

2. 抗原抗体反応

- 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 40 μ L (beads net volume 約 20 μ L) のビーズ懸濁液を、新しい 1.5 mL マイクロ遠心チューブに移す。サンプリングの際には、滅菌したハサミなどでピペットチップの先端 2~3 mm を切断すると、吸引口が広がり、ビーズをサンプリングしやすくなります。
- 3) 4℃、5,000~8,000 × g で 30 秒間遠心分離する。
- 4) 氷上で 1~2 分間静置する。これにより、ビーズを試験管底に沈殿させる。
- 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 PBS (-) または TBS 0.5~1 mL を添加しボルテックスミキサーで再懸濁する。
- 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) Step 6)~7)。 (洗浄済みビーズ)
- 9) 追加工程*1。

- 10) **細胞溶解溶液** 200～1,000 μL を **洗浄済みビーズ** が入っているマイクロ遠心チューブに添加する^{※2}。
- 11) 4℃でローテーターにより転倒混和し、2時間以上抗原抗体反応を行う。結合効率を増加させるために、抗原抗体反応を8時間以上(オーバーナイト)行ってもよい。
- 12) 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除去する。
- 13) Step 6)～7) を3回繰り返す。(**抗原結合ビーズ**)

※1：非結合抗体の除去を行う場合には次の操作を行ってください。

抗原結合反応前に0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.5) 溶液0.5～1.0 mLを **洗浄済みビーズ** が入っているマイクロ遠心チューブに添加し、4℃、5,000～8,000×gで30秒間遠心分離し、上清を除去する。この際、Glycine-HCl溶液を入れたまま20分以上放置しない。洗浄後、速やかに氷冷したPBS(-)またはTBS 0.5～1 mLを添加しボルテックスミキサーで再懸濁する。4℃、5,000～8,000×gで30秒間遠心分離し、上清を除去する(操作A)。操作Aを2回繰り返す。

※2：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. c-Myc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A～Cから適当な溶出方法を採用してください。

A. c-Mycペプチドによる未変性条件下(中性)での競合溶出

- 1) c-Mycペプチド(コードNo. 132-16361) 5 mg を1×TBS (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L Sodium Chloride) 1 mL に溶解し、終濃度5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ c-Mycペプチドストック溶液^{※3}を準備する。
- 2) 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ c-Mycペプチドストック溶液3 μL を1×TBS 97 μL に溶解し、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ c-Mycペプチド溶液100 μL を調製する。
- 3) c-Mycペプチド溶液100 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
- 4) 4℃でローテーターにより30～60分間転倒混和する。
- 5) 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回収し新しい1.5 mL マイクロ遠心チューブに移す。
- 6) 回収した上清は4℃で保存する。長期保存の場合は-20℃で保存する。

※3：このストック溶液は-20℃で保存できます。調製後に必要量を分注し、実験毎に溶解して使用して、凍結融解はできるだけ避けてください。

B. 0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.5)による酸性条件下での溶出(室温操作)

- 1) 0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.5) 100 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) 室温で5～10分間転倒混和する。
- 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回収し、新しい1.5 mL マイクロ遠心チューブに移す。

- 4) 中性バッファー(0.5 mol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 mol/L Sodium Chloride) 10 μL を添加します。
- 5) 回収した上清は4℃で保存する。長期保存の場合は-20℃で保存する。

C. SDSサンプルバッファーでの溶出(室温操作)

- 1) 4×SDSサンプルバッファー^{※4}(0.25 mol/L Tris-HCl (pH 6.8), 8 w/v% SDS, 40 w/v% Glycerol, 0.02 w/v% Bromophenol Blue) 100 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) 3分間ボイルする。
- 3) 室温、5,000～8,000×gで30秒間遠心分離し、不溶性ゲルをペレット化する。
- 4) 上清を新しい1.5 mL マイクロ遠心チューブに移す。
- 5) 回収した上清は4℃で保存する。長期保存の場合は-20℃で保存する。

※4：還元剤(2-メルカプトエタノールやDTT)を添加すると、抗c-Mycタグ抗体のH鎖(50kDa)とL鎖(25kDa)がビーズ担体から剥離しやすくなります。

〔保存条件〕

-20℃

〔容量〕

200 μL (beads net volume 100 μL) (010-26501)

2 mL (beads net volume 1 mL) (016-26503)

10 mL (beads net volume 5 mL) (014-26504)

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

1811KA2