

Code No. 014-23081 ( 2 mL, beads net volume 1 mL)  
010-23083 (10 mL, beads net volume 5 mL)

## Anti HA Antibody Beads

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

### 【Formulation】

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

### 【Beads matrix】

4% Agarose

### 【Antibody quantity】

8.5 mg/mL beads

### 【Antibody clone No.】

4B2

### 【Antibody subclass】

IgG<sub>1</sub>

### 【Binding capacity】

Min. 1.5 mg HA 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, 0.5 w/v% Sodium Deoxycholate, 0.1 w/v% Sodium Dodecyl Sulfate, 1.0 w/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.

### 【Procedure】

The immunoprecipitation of HA tagged recombinant proteins (Mammalian cells).

#### 1. The preparation of cell lysates

##### A. Adherent cells

- 1) Culture the cell lines. ( $1 \times 10^6$ - $10^7$ )

— 1/8 —

- 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°C.
- 5) Remove the supernatant.
- 6) Suspend cell pellet in 1 mL 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°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°C.
- 3) Remove the supernatant.
- 4) Suspend cell pellet in 1 mL 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°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°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°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  $\mu$ L (beads net approx. 20  $\mu$ 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°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°C and remove the supernatant.
- 8) Repeat step 6)-7). (Prewashed beads)
- 9) Additional step<sup>\*1</sup>.
- 10) Add 200-1,000  $\mu$ L of cell lysate<sup>\*2</sup> into tube of Prewashed beads.

— 2/8 —

- 11) Mix by rotator for 2-8 hours at 4°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 – 1.0mL 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 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 HA tagged recombinant proteins

Please see the following methods of A – C.

#### A. The competitive peptide elution at neutral pH condition by using HA peptide

- 1) Prepare the HA peptide stock solution (final conc.  $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ )<sup>※3</sup>. Dissolve 5 mg of HA peptide in 1 mL of  $1 \times \text{TBS}$  (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L Sodium Chloride).
- 2) Prepare the HA peptide working solution (final conc.  $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Add  $3 \mu\text{L}$  of the HA peptide stock solution into  $97 \mu\text{L}$  of  $1 \times \text{TBS}$ .
- 3) Add  $100 \mu\text{L}$  of the HA peptide working solution into a tube of **Antigen binding beads**.
- 4) Mix by rotator for 30 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  $100 \mu\text{L}$  of 0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.5) into tube of **Antigen binding beads**.
- 2) Mix by rotator for 5 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  $10 \mu\text{L}$  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  $100 \mu\text{L}$  of  $4 \times \text{SDS sample buffer}$ <sup>※4</sup> (0.25 mol/L Tris-

- HCl (pH 6.8), 8 w/v% SDS, 40 w/v% Glycerol, 0.02 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 HA antibody is easily dissociated from agarose beads.

#### [Storage]

Keep at –20°C.

#### [Package]

2 mL (beads net volume 1 mL) (014-23081)

10 mL (beads net volume 5 mL) (010-23083)

## 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://fwk.fujifilm.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. 014-23081 ( 2mL, beads net volume 1mL)  
010-23083 (10mL, beads net volume 5mL)

## Anti HA Antibody Beads

本品は、HA 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、HA ペプチド (YPYDVDPYA) 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, 0.02vol% ProClin 300

### 【使用担体】

4% アガロース

### 【抗体結合量】

8.5mg/mL

### 【結合抗体クローン No.】

4B2

### 【結合抗体サブクラス】

IgG<sub>1</sub>

### 【抗原結合容量】

ビーズ 1mL の当たり約 1.5mg の HA タグ融合タンパク質が結合。

### 【Setting Volume】

1.8 ~ 2.1mL slurry/mL resin

### 【その他必要な試薬】

遠心分離機器、遠心チューブ、1.5mL 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

- 50mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 15mmol/L Sodium Chloride, 1mmol/L EDTA, 1% Triton X-100.
- RIPA Buffer (コード No. 182-02451)  
50mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150mmol/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)  
20mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 200mmol/L Sodium Chloride, 2.5mmol/L Magnesium Chloride, 0.05w/v% NP-40 substitute.

### 【プロトコール】

HA 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 ( $1 \times 10^6 \sim 10^7$ ) を培養する。
- 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℃、 $200 \times g$  で 5 分間遠心分離し、上清を除く。
- 5) 氷冷した PBS(-) 1mL を添加し、細胞ペレットを懸濁後、1.5mL マイクロ遠心チューブに移す。
- 6) 4℃、 $200 \times g$  で 5 分間遠心分離し、上清を除く。
- 7) 氷冷した PBS(-) 1mL を添加し、細胞ペレットを懸濁後、4℃、 $200 \times g$  で 5 分間遠心分離し、上清を除く。
- 8) 細胞溶解バッファー 1mL を添加し、ピペettingで細胞を懸濁する。
- 9) 氷上で 5 ~ 10 分間静置する。
- 10) 4℃、 $20,000 \times g$  で 5 ~ 20 分間遠心分離する。
- 11) 上清を新しい 1.5mL 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 ( $1 \times 10^6 \sim 10^7$ ) を培養する。
- 2) 細胞懸濁液を 4℃、 $200 \times g$  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(-) 1mL で懸濁後、1.5mL マイクロ遠心チューブに移す。
- 4) 4℃、 $200 \times g$  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(-) 1mL で再懸濁する。
- 6) 4℃、 $200 \times g$  で 5 分間遠心分離し、上清を除く。
- 7) 細胞溶解バッファー 1mL を添加し、ピペettingで細胞を懸濁する。
- 8) 氷上で 5 ~ 10 分間静置する。
- 9) 4℃、 $20,000 \times g$  で 5 ~ 20 分間遠心分離する。
- 10) 上清を新しい 1.5mL 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  $\mu$ L (beads net volume 約 20  $\mu$ L) のビーズ懸濁液を、新しい 1.5mL 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 ~ 3mm 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℃、 $5,000 \sim 8,000 \times g$  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 ~ 1mL を添加しボルテックスミキサーで再懸濁する。
- 7) 4℃、 $5,000 \sim 8,000 \times g$  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<sup>\*1</sup>。
- 10) (細胞溶解溶液) 200 ~ 1,000  $\mu$ L 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<sup>\*2</sup>。
- 11) 4℃でロータ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℃、 $5,000 \sim 8,000 \times g$  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下さい。

抗原結合反応前に 0.1mol/L Glycine-HCl (pH 3.5) 溶液 0.5～1.0mL を添加し、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 0.5～1mL 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、細胞溶解バッファを添加して 1mL までメスアップしていただいても構いません。

### 3. HA 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下さい。

#### A. HA ペプチドによる未変性条件下 (中性) での競合溶出

- 1) HA ペプチド (コード No. 088-09161) 5mg を 1×TBS (10mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150mmol/L Sodium Chloride) 1mL に溶解し、終濃度 5 μg/μL HA ペプチドストック溶液<sup>※3</sup>を準備する。
- 2) 5 μg/μL HA ペプチドストック溶液 3 μL を 1×TBS 97 μL に溶解し、150 μg/mL HA ペプチド溶液 100 μL を調製する。
- 3) HA 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 1.5mL 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下さい。

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

- 1) 0.1mol/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 1.5mL マイクロ遠心チューブに移す。
- 4) 中性バッファ (0.5mol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1.5mol/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 サンプルバッファでの溶出 (室温操作)

- 1) 4×SDS サンプルバッファ<sup>※4</sup> (0.25mol/L Tris-HCl (pH 6.8), 8w/v% SDS, 40w/v% Glycerol, 0.02w/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 1.5mL 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 HA 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】

2mL (beads net volume 1mL) (014-23081)

10mL (beads net volume 5mL) (010-23083)

製造発売元

**富士フイルム 和光純薬株式会社**

大阪市中央区道修町三丁目 1 番 2 号

Tel : 06-6203-3741