

**FUJIFILM**

**Wako**

Code No. 016-24381 ( 2 mL, beads net volume 1 mL)  
012-24383 (10 mL, beads net volume 5 mL)

## Anti V5 tag Antibody Beads

Anti V5 tag Antibody Beads is the slurry of anti V5 tag peptide (GKPIPNNPLGLDST) monoclonal antibody immobilization beads. This product is used for the immunoprecipitation of V5 tagged recombinant proteins by using some elution solutions.

### **[Formulation]**

1×PBS (pH 7.4), 50% glycerol, 0.02 w/v% sodium azide.

### **[Beads matrix]**

4% Agarose

### **[Antibody quantity]**

7 mg/mL beads

### **[Antibody clone No.]**

10B5

### **[Antibody subclass]**

IgG<sub>1</sub>

### **[Binding capacity]**

Min. 0.5 mg V5 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 V5 tagged recombinant proteins (Mammalian cells).

#### **1. The preparation of cell lysates**

##### **A. Adherent cells**

- 1) Culture the cell lines. (1×10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>)

— 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×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×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. (1×10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>)
- 2) Centrifuge cell suspension at 200×g for 5 minutes at 4°C.
- 3) Remove the supernatant.
- 4) Suspend cell pellet in 1 mL of PBS(-). Transfer all of the suspension into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 5) Centrifuge cell suspension at 200×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×g for 5 minutes at 4°C.
- 9) Remove the supernatant.
- 10) Add 1 mL of RIPA Buffer and suspend cells by pipetting.
- 11) Incubate for 5-10 minutes on ice.
- 12) Centrifuge the cell lysate at 20,000×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 μL (beads net approx. 20 μL) of this product into a new micro centrifugation tube.
- 3) Centrifuge the beads slurry at 5,000-8,000×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×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 μL of cell lysate \*<sup>2</sup> into tube of Prewashed beads.
- 11) Mix by rotator for 2-8 hours at 4°C.

— 2/8 —

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

13) Repeat step 6)-7) ×3. ([Antigen binding beads])

※1 : To remove the unattached antibody, add 0.5-1.0 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×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×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 V5 tagged recombinant proteins

Please see the following methods of A or B.

#### A. The elution by using 0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 3.5) (room temperature)

- 1) Add 100 μL 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×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 μL 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.

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

- 1) Add 100 μL of 4×SDS sample buffer<sup>※3</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×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.

※3 : In the case of addition of reducing reagents such as 2-mercaptoethanol or DTT, anti V5 antibody is easily dissociated from agarose beads.

#### [Storage]

Keep at -20°C.

#### [Package]

2 mL (beads net volume 1 mL)  
10 mL (beads net volume 5 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://fwk.fujifilm.co.jp>

**FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation**   **FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH**  
1600 Bellwood Road   Fuggerstrasse 12  
Richmond, VA 23237   D-41468 Neuss  
U.S.A.   Germany  
Telephone : +1-804-271-7677   Telephone : +49-2131-311-0  
Facsimile : +1-804-271-7791   Facsimile : +49-2131-311100  
<http://www.wakousa.com>   <http://www.wako-chemicals.de>

コードNo. 016-24381 ( 2mL, beads net volume 1mL)  
012-24383 (10mL, beads net volume 5mL)

## Anti V5 tag Antibody Beads

本品は、V5 タグペプチド (GKPIPPLLGLDST) を含む融合タンパク質の免疫沈降に使用するアフィニティービーズです。

### 【組成】

1×PBS (pH 7.4), 50% glycerol, 0.02w/v% sodium azide.

### 【使用担体】

4% アガロース

### 【抗体結合量】

7mg/mL

### 【結合抗体クローン No.】

10B5

### 【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 0.5mg の V5 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】

#### V5 タグ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。

— 5/8 —

- 4) 細胞懸濁液を 4°C、200×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°C、200×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°C、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 1mL を添加し、ピベ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°C、20,000×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°C、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(−) 1mL で懸濁後、1.5mL マイクロ遠心チューブに移す。
- 4) 4°C、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(−) 1mL で再懸濁する。
- 6) 4°C、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 1mL を添加し、ピベ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°C、20,000×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 μL (beads net volume 約 20 μL) 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ベットチップの先端 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°C、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 ~ 1mL を添加しボルテックスミキサーで再懸濁する。
- 7) 4°C、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<sup>\*1</sup>。
- 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<sup>\*2</sup>。
- 11) 4°C でロ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°C、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〕

— 6/8 —

※ 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、細胞溶解バッファーを添加して 1mL までメスアップしていただいても構いません。

### 3. V5 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 または B から適当な溶出方法を採用して下さい。

#### A. 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) 100μL 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) 中性バッファー (0.5mol/L Tris-HCl pH 7.4, 1.5mol/L Sodium Chloride) 10μL を添加する。
- 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。

#### B. 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<sup>※3</sup> (0.25mol/L Tris-HCl pH 6.8, 8w/v% SDS, 40w/v% Glycerol, 0.02w/v% Bromophenol Blue) 100μL 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。

※ 3 : 還元剤 (2-メルカプトエタノールや DTT) を添加すると、抗 V5 タグ抗体の H 鎮 (50kDa) と L 鎮 (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)  
10mL (beads net volume 5mL)

製造発売元

富士フィルム 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