

FUJIFILM

Wako

Code No. 137-18751 (2 mL)

For immunochemistry
**MagCapture™ HP Anti PA tag Antibody
Magnetic Beads**

MagCapture™ HP Anti PA tag Antibody Magnetic Beads are composed of the Anti PA tag, rat monoclonal antibody attached to magnetic beads, which specifically recognize the PA tag which is consisted of 12 amino acids (GVAMPGAEDDVV), and can be used for purification and immunoprecipitation of PA-tagged recombinant proteins.

PA-tagged recombinant proteins can be eluted by competitive elution with PA tag Peptide under neutral pH condition after immunoprecipitation. In addition, used MagCapture™ HP Anti PA tag Antibody Magnetic Beads can also be recycled easily under mild condition at pH 6.0 by PA tag Washing Solution (Code No. 169-27261) after elution of PA-tagged recombinant proteins.

This product is intended for laboratory research use only.

[Formulation]

1 × TBS aqueous solution with 50% glycerol, 0.05w/v% sodium azide, pH 7.4

[Immobilized antibody]

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

[Subclass of Immobilized antibody]

IgG2a

[Binding capacity of antigen]

16 µg protein / 1 mL beads slurry

Note : the binding capacity is for reference. It varies depending on protein of interest.

[Usage]

10 mL of cell culture medium / 50-100 µL beads slurry

200-1,000 µL of cell lysate / 20 µL beads slurry

Note : the above usage of beads slurry is for reference. Please optimize the appropriate usage in accordance with goal, protein of interest, and cell lines etc.

[Additional required materials]

Magnetic stand, Centrifuge, Rotator, Vortex mixer, Tube mixer, Centrifuge tube, Microcentrifuge tube (1.5 mL), Cell lysis buffer (see below), Wash buffer such as PBS (-), TBS etc., 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 PA-tagged recombinant proteins and the recycling method for used MagCapture™ HP Anti PA tag Antibody Magnetic Beads

1. Sample preparation : cell lysate and cell culture medium

1-A In the case of adherent cells

- 1) Incubate the PA-tagged-protein-expressing cell lines under appropriate conditions.^{※1}
- 2) Remove the medium from culture dishes and wash cultured cells twice with PBS(-).
- 3) Detach the cells from culture dishes with a cell scraper or trypsin-EDTA solution and transfer the cell suspension into a new 1.5 mL microcentrifuge 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 3) at 200 × g for 5 minutes at 4 °C.
- 5) Remove the supernatant.
- 6) Add PBS(-) and suspend the cell pellet, then centrifuge the cell suspension at 200 × g for 5 minutes at 4 °C.
- 7) Remove the supernatant.
- 8) Repeat 6)-7) steps once again.
- 9) Add 1mL of cell lysis buffer to the cell pellet and suspend by pipetting or vortex mixer.
- 10) Incubate on ice for 10 minutes.
- 11) Centrifuge 10) at 20,000 × g for 10-20 minutes at 4 °C.^{※2}
- 12) Transfer the supernatant to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.
... **Cell lysate**

1-B In the case of suspension cells

- 1) Incubate the PA-tagged-protein-expressing cell lines under appropriate condition.^{※1}
- 2) Centrifuge the culture medium at 200 × g for 5 minutes at 4 °C.
- 3) Remove the supernatant.
- 4) Add 1 mL of PBS(-) and suspend the cell pellet, then transfer all to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 5) Centrifuge 4) at 200 × g for 5 minutes at 4 °C.
- 6) Remove the supernatant.
- 7) Add 1 mL of PBS(-) and suspend the cell pellet again, then centrifuge the cell suspension at 200 × g for 5 minutes at 4 °C.
- 8) Remove the supernatant.

- 9) Add 1 mL of cell lysis buffer to the cell pellet and suspend by pipetting or vortex mixer.
- 10) Incubate on ice for 10 minutes.
- 11) Centrifuge 10) at $20,000 \times g$ for 10-20 minutes at 4 °C.^{※2}
- 12) Transfer the supernatant to a new 1.5 mL microcentrifuge tube. ... **Cell lysate**

1-C In the case of cell culture medium

- 1) Incubate the PA-tagged-protein-expressing cell lines under appropriate condition.^{※1}
- 2) Collect the cell culture medium to a centrifuge tube, then centrifuge at $2,000 \times g$ for 10 minutes at 4 °C to remove cell.^{※3}
- 3) Transfer the supernatant to a new centrifuge tube.^{※4} ... **Cell culture medium**

- ※1 Please examine appropriate culture conditions depending on cell lines.
- ※2 When a white-floating layer appears in supernatant after centrifugation, please filter it with a centrifugal filter (pore size: 0.45 μ m).
- ※3 Cells etc. are removable by using the filtration filter (pore size: 0.22 μ m etc.).
- ※4 It is possible that adding a 1 mol/L Tris-HCl into collected cell culture medium to adjust its pH to 7.5.

2. Prewashing of Antibody Magnetic Beads

- 1) Suspend MagCapture™ HP Anti PA tag Antibody Magnetic Beads sufficiently by vortex mixer until it reaches a uniform consistency.
- 2) Transfer 50-100 μ L of MagCapture™ HP Anti PA tag Antibody Magnetic Beads into a 1.5 mL centrifuge tube.^{※5}
- 3) Add 1 mL of cell lysis buffer and suspend by vortex mixer.
- 4) Spin-down 3), then places it on the magnetic stand for 30 seconds to 1 minute.
- 5) Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 6) Repeat 3)-5) of prewashing steps twice. ... **Prewashed beads**

- ※5 Please examine appropriate amount of beads slurry depending on the purpose.

3. Immunoprecipitation

3-A In the case of cell lysate

- 1) Add 200-1,000 μ L of **Cell lysate** into **Prewashed beads**.^{※6}
- 2) Incubate with rotator for 2 hours~at 4 °C.
- 3) Spin-down 2) and places it on the magnetic stand until magnetic beads and supernatant separate sufficiently, then remove the supernatant.
- 4) Add 1.0 mL of cold cell lysis buffer and suspend by vortex mixer.
- 5) Spin-down 4), then places it on the magnetic stand for 30 seconds to 1 minute.
- 6) Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 7) Repeat 4)-6) of washing steps twice. ... **Antigen binding beads**

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

3-B In the case of cell culture medium

- 1) Add 1mL of **Cell culture medium** into **Prewashed beads**.^{※7}
- 2) Incubate with rotator for 2 hours~at 4 °C.
- 3) Spin-down 2) and places it on the magnetic stand until magnetic beads and supernatant separate sufficiently, then remove the supernatant.
- 4) Add 1.0 mL of cold cell lysis buffer and suspend by vortex mixer.
- 5) Spin-down 4), places it on the magnetic stand for 30 seconds to 1 minute.
- 6) Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 7) Repeat 4)-6) of washing steps twice. ... **Antigen binding beads**

- ※7 Please examine appropriate amount of beads slurry depending on the purpose.

4. Elution of PA-tagged recombinant Proteins

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

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

- 1) Prepare a stock solution of PA tag Peptide (final concentration: 5 mg/mL) by dissolving 5 mg of PA tag Peptide (Code No. 167-25501) in 1mL of 1 $\times$ TBS (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L Sodium Chloride).^{※8}
- 2) Prepare a diluted solution of PA tag Peptide (final concentration : 100-200 μ g/mL) by diluting the stock solution from step 1).
- 3) Add 30-100 μ L of the diluted solution of PA tag Peptide into **Antigen binding beads**.^{※9}
- 4) Incubate with rotator or tube mixer for 30 minutes at 4 °C.^{※10}
- 5) Spin-down 4) and places it on the magnetic stand until magnetic beads and supernatant separate, then transfer the supernatant into a new 1.5 mL microcentrifuge tube. ... **Eluted sample**
- 6) Store the **Eluted sample** on ice. In the case of long storage, store at -20 °C.^{※11}

Point : Repeating 3)-5) of elution steps with PA tag peptide can increase the yield of eluted protein. Please examine the appropriate number of times for elution with PA tag peptide.

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

- 1) Add 30-100 μ L of 0.1 mol/L Glycine-HCl, pH 3.0 into **Antigen binding beads**.^{※9}
- 2) Incubate with rotator or tube mixer for 5-10 minutes at room temperature.^{※12}
- 3) Spin-down 2) and places it on the magnetic stand until magnetic beads and supernatant separate, then transfer the supernatant into a new 1.5 mL microcentrifuge tube. ... **Eluted sample**
- 4) Neutralize **Eluted sample** immediately with neutralization buffer. (Example : 1 mol/L Tris-HCl, pH 9.0) ... **Neutralized sample**
- 5) Store the **Neutralized sample** on ice. In the case of long storage, store at -20 °C.

4-C Elution by SDS sample buffer (denaturing condition)

Note : when 2 × SDS sample buffer includes reducing agent such as 2-mercaptoethanol or DTT, heavy chain (50 kDa) and light chain (25kDa) may dissociate from anti PA tag antibody and are eluted into a recovered sample.

- 1) Add 50 μ L of 2 × 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 **Antigen binding beads** and mix by vortex mixer.
- 2) Boil for 5 minutes at 95 °C.
- 3) Spin-down 2) and places it on the magnetic stand until magnetic beads and supernatant separate, then transfer the supernatant into a new 1.5 mL microcentrifuge tube. . . . **Eluted sample**
- 4) Store the **Eluted sample** on ice. In the case of long storage, store at -20 °C.

- ※8 Please store the used stock solution of PA tag Peptide at -20 °C, and use it as soon as possible.

※9 Please examine appropriate amount depending on the purpose.

※10 In order to increase the efficiency of competitive elution, please be sure to incubate with rotator or tube mixer for 5 minutes~.

※11 Please remove the peptide in the solution by dialysis or gel filtration as needed.

※12 There is a possibility that proteins of interest are denatured if reaction time is too long.

5. Recycling of the used Anti PA tag Antibody Magnetic Beads

The used Anti PA tag Antibody Magnetic Beads can be recycled with PA tag Washing Solution (Code No. 169-27261). Here, the recycling protocol for 50 μ L of beads slurry is described.

Note : denatured magnetic beads cannot be recycled.

- 1) 500 μ L of PA tag Washing Solution into the used Anti PA tag Antibody Magnetic Beads.
- 2) Incubate with rotator for 10 minutes at room temperature.
- 3) Spin-down 2) and places it on the magnetic stand until magnetic beads and supernatant separate, then remove the supernatant.
- 4) Repeat 1)-3) steps three times.
- 5) Add 500 μ L of TBS and suspend sufficiently by vortex mixer.
- 6) Spin-down 5) and places it on the magnetic stand until magnetic beads and supernatant separate, then remove the supernatant.
- 7) Repeat 5)-6) steps three times.
- 8) Add 2 times the amount of TBS or PBS(-).
- 9) Add 50 μ L of storage buffer (1 × TBS aqueous solution with 50% glycerol, 0.05w/v% sodium azide, pH 7.4).
- 10) Store 2-10 °C.

[Storage]

2-10 °C

[References]

1. Fujii, Y. *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, **95**, 240-7 (2014)
2. 藤井勇樹ら, 蛋白質科学会アーカイブ, **7**, e075 (2014)
3. Kaneko, M. K. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **432**, 40-45 (2013)
4. Fujii, Y. *et al.*, *J. Cell Sci.*, **129**, 1512-1522 (2016)

[Related products]

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://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>

Code No. 137-18751 (2 mL)

免疫化学用

MagCapture™ HP 抗PAタグ抗体磁気ビーズ

本品は、PAタグ(GVAMPGAEDDVV)を認識する抗PAタグラットモノクローナル抗体が固相化された磁気ビーズで、PAタグ融合組換えタンパク質の精製や免疫沈降に使用できます。免疫沈降後、溶出にPAタグペプチドを用いることで目的のPAタグ融合組換えタンパク質を中性付近のpH条件下で精製することが可能です。また、抗原溶出後、PAタグ洗浄溶液(コードNo. 169-27261)を用いて磁気ビーズをマイルドな条件下(pH 6.0)で再生することも可能です。

試験研究用以外には使用しないで下さい。

〔組成〕

1×TBS (pH 7.4), 50% glycerol, 0.05w/v% sodium azide

〔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〕

IgG2a

〔抗原結合容量〕

16 µg protein/1 mL beads slurry

(注：上記結合容量は目安です。目的のタンパク質によって結合量は変化します。)

〔使用量〕

1 mL培養上清/50～100 µL beads slurry

200～1,000 µL細胞溶解液/50 µL beads slurry

(注：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〕

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〕

PAタグ融合組換えタンパク質の免疫沈降法および使用済み抗PAタグ抗体ビーズの再生方法

1. サンプルの調製(細胞溶解液および培養上清サンプルの調製)

1-A 接着細胞の場合

- 1) 目的のPAタグ融合組換えタンパク質発現細胞株を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etting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タグ融合組換えタンパク質発現細胞株を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etting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タグ融合組換えタンパク質発現細胞株を適切な条件下で培養する※1。
- 2) 培養液を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す※4。…

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。

※4 回収した培養上清に1 mol/L Tris-HCl等を添加し、pH 7.5に調整することも可能です。

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し、バイアル中のビーズを均一にする。
- 2) 本品50～100 μ Lを1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す※5。
- 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、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 4) 軽くスピンドウンしたチューブを磁気ラックにセットし、30秒から1分間静置する。
- 5) 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。
- 6) 細胞溶解バッファー1 mLを加え、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 7) 軽くスピンドウンしたチューブを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、上清を除く。
- 8) 上記6)-7)の洗浄操作をさらに1回繰り返す。… **洗浄済みビーズ**

※5 目的に応じて適切なビーズ量をご検討ください。

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 μ L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) 1.5 mL容マイクロ遠心チューブを軽くスピンドウンし、磁気ラックにセットして磁気ビーズと溶液を分離し、上清を除く。
- 4) 氷冷した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。
- 5) 軽くスピンドウンしたチューブを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、上清を除く。
- 6) 上記4)-5)の洗浄操作をさらに2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1mL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) **培養上清** 1 mL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※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) 1.5 mL容マイクロ遠心チューブを軽くスピンドウンし、磁気ラックにセットして磁気ビーズと溶液を分離し、上清を除く。
- 4) 氷冷した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。
- 5) 軽くスピンドウンしたチューブを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、上清を除く。
- 6) 上記4)-5)の洗浄操作をさらに2回繰り返す。… **抗原結合ビーズ**

※7 目的に応じて適切なビーズ量をご検討ください。

4. PAタグ融合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、適した溶出方法を選択してください。

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1×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タグペプチド溶液を調製する※8。
- 2) 5.0 mg/mL PAタグペプチド溶液を用いて、100～200 μ g/mL濃度のPAタグペプチド希釈溶液を調製する※8。
- 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タグペプチド希釈溶液を30～100 μ L添加する※9。
- 4) チューブミキサーやローテーター等を用いて、30分間4℃で攪拌させながら反応させる※10。
- 5) 軽くスピンドウンしたチューブを磁気ラックにセットして磁気ビーズと溶液を分離し、上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す(溶出サンプル)。
- 6) 溶出サンプル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※11。

ポイント：3)-5)のペプチド溶出工程を複数回繰り返すことで溶出タンパク質の回収量を増加できる場合があります。適宜溶出回数を検討してください。

4-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) **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30～100 μ L添加する※9。
- 2) チューブミキサーやローテーター等を用いて、5-10分間室温で攪拌させながら反応させる※12。
- 3) 軽くスピンドウンしたチューブを磁気ラックにセットして磁気ビーズと溶液を分離し、上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す(溶出サンプル)。
- 4) 中和バッファー(例：1 mol/L Tris-HCl, pH 9.0)を直ちに添加して中和する。
- 5) 中和した溶出サンプル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。

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)が剥離され、溶出サンプル中に混入されることに注意してください。

- 1) 50 μ Lの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)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※9。
- 2) 95℃、5分間ボイルする。
- 3) 軽くスピンドウンしたチューブを磁気ラックにセットして磁気ビーズと溶液を分離し、上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す(溶出サンプル)。
- 4) 溶出サンプルは使用するまで氷上に保存する。ただし、長期保存する場合は冷凍(-20℃以下)で保存する。

- ※8 調製した 5.0 mg/mL PA タグペプチド溶液やPA タグペプチド希釈溶液は-20℃で保存し、凍結融解をできるだけ避け、速やかに使用してください。
- ※9 目的に応じて適切な添加量をご検討ください。
- ※10 PA タグペプチドでの競合溶出効率を高める為、必ず 5 分以上攪拌しながら反応させてください。
- ※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。
- ※12 反応時間が長すぎると目的タンパク質が変性する場合があります。

5. 抗PAタグ抗体磁気ビーズの再生

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。ここでは、50 μ L の抗PAタグ抗体磁気ビーズを再生するプロトコルを示します。変性条件で溶出を行ったビーズの再利用はできません。

- 1) 使用済み抗PAタグ抗体磁気ビーズに 500 μ L 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) 軽くスピンドダウンしたチューブを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、上清を除く。
- 4) 1)-3) を 3 回繰り返す。
- 5) TBS を 500 μ L 添加した後、ボルテックスミキサーで十分懸濁する。
- 6) 軽くスピンドダウンしたチューブを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、上清を除く。
- 7) 5)-6) を 3 回繰り返す。
- 8) 50 μ L の保存用バッファー (50% glycerol, 0.05 w/v% sodium azide を含む 1 $\times$ TBS, pH 7.4) を添加する。
- 9) 2~10℃で保存する。

〔保存条件〕

2~10℃

〔参考文献〕

1. Fujii, Y. *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, **95**, 240-7 (2014)
2. 藤井勇樹ら, 蛋白質科学会アーカイブ, **7**, e075 (2014)
3. Kaneko, M. K. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **432**, 40-45 (2013)
4. Fujii, Y. *et al.*, *J. Cell Sci.*, **129**, 1512-1522 (2016)

〔抗PAタグ抗体磁気ビーズ関連製品〕

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

2305KA2