

## Product Information

## EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel

製品番号 F2426

保存温度 -20 °C

## TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

## 製品概要

EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel は、免疫沈降実験で使用するための赤色の高可視性 ANTI-FLAG M2 アガロースアフィニティーゲルです。アフィニティーレジンは、4% アガロースビーズと共有結合した ANTI-FLAG M2 モノクローナル抗体が含まれています。

EZview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel は、標準的な無色の ANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody Agarose Affinity Gel (製品番号 A2220)と同様の方法で細胞ライセートやその他の生物学的なサンプルから FLAG 融合タンパク質に結合する機能があります。ANTI-FLAG Affinity Gel と結合した FLAG 融合タンパク質は、遠心分離によって回収されます。赤色のアフィニティーゲルにより、ゲルの可視性が向上し、複数回の洗浄、アフィニティーレジンスビーズの回収、結合した FLAG 融合タンパク質の回収などの操作が簡単です。可視性の向上により、サンプル処理の手間が減り実験の再現性が高くなるため、調べたいタンパク質をより正確に定量できます。

EZview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel は、リン酸緩衝食塩水 (PBS) に懸濁した約 50% のスラリーで、50% のグリセロールと抗菌性保存剤として 0.0015% (15ppm) の Kathon® CG/IPCII が含まれています。

結合特異性: 融合タンパク質の N 末端、Met-N 末端、または C 末端部位の FLAG オクタペプチド (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C)

細菌性アルカリホスファターゼの FLAG 融合タンパク質に対する結合能は、充填レジン 1 mL あたり 0.6 mg 以上です。

## ご用意していただく装置と試薬

- ライセート調製に使用する細胞
- 溶解バッファー (50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TRITON® X-100), CellLytic™ M (C2978) または CellLytic™ B (B7435, B7310 または C8740)
- トリス緩衝食塩水 (TBS): 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4
- ボルテックスミキサー
- プロテアーゼインヒビターカクテル (P8340 または P2714)
- ピペットチップ (200 µL) (P5161)
- ピペットチップ、広口 (200 µL) (P1678)
- ピペットチップ (1000 µL) (P1665)
- ピペット (200 µL) (Z368113)
- ピペット (1000 µL) (Z368121)
- マイクロ遠心チューブ (T9661)
- 2x Laemmli サンプルバッファー (S3401)
- 3x FLAG ペプチド (F4799) または塩酸グリシン (G2879)

## ご使用前の注意と免責事項

EZview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬用、家庭用、その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート (MSDS) をご覧ください。

## 保存/安定性

安定性を確保するため、EZview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel は 50% のグリセロール中で -20 °C で保存してください。未開封の製品は、指示通り保存した場合 1 年間安定です。グリセロールを含まない状態で冷凍庫に入れないでください。

## 手順

注: 使用前にこの使用説明書をすべてお読みください。特に、巻末の対応試薬一覧をご確認ください。

免疫沈降実験には多くの手法があり、実施手順もさまざまです。具体的な方法は、個別の実験ごとに研究者によって選択されます。その他の情報や手順は参考文献 1 をご覧ください。

以下の一般的手順はあくまでもひとつの例または出発点で、すべての状況に適するとは限りません。以下の手順は、1個のサンプルを使用した場合を想定し、多くの哺乳類組織培養細胞株に適しています。免疫沈降反応を複数回行う場合は、処理するサンプル数に応じて必要な試薬量を計算します。免疫沈降反応を簡単に実施するため、1回の反応あたり40 µLのゲル懸濁液(充填ゲル量約20 µL)を使用します。より少量のレジンを(充填ゲル量約10 µL、1 µg以上のFLAG融合タンパク質と結合)を使用することも可能です。

特に規定のない限り、操作は氷上または2-8 °Cで行います。

#### FLAG 融合タンパク質の免疫沈降

1. 完全かつ均一に懸濁するまで、EZview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel ビーズを慎重に混合します。直ちに50%のスラリー40 µLを氷上で清浄な1.5 mLマイクロ遠心チューブに移します。ビーズを分注するため、広口ピペットチップを使用するか、通常のピペットチップの先端を約1 mm切り取って口を広げ、ビーズ懸濁液が詰まらないようにします。
2. ビーズの洗浄/平衡化:  
TBS (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH7.4) 500 µLをチューブに加え、ボルテックスを行い、8,200 x gで30秒間、マイクロ遠心機で遠心します(Eppendorf® 5415C マイクロ遠心機で10,000 rpm)。上清をピペットで慎重に除去し(または上清を慎重に吸引)、ビーズペレットが入っているチューブを氷上に置きます。
3. 上記と同様に洗浄を繰り返します。上清を除去した後、洗浄したビーズペレットを氷上に置きます。  
注: 複数の免疫沈降サンプルを使用する場合、全サンプルで必要な量のレジンを同時に洗浄することも可能です。各回の洗浄は、充填ゲル総量の少なくとも20倍の量のTBSを用いて行います。その後、洗浄したレジンを必要なサンプルの数に応じて分注します。
4. ライセートを、8,200 x gで10分間、2-8 °Cで遠心して変性タンパク質や細胞残屑を取り除きます。200-1000 µLの細胞ライセート上清を洗浄したレジンに添加します。必要に応じて、溶解バッファーを加えて最終量を1 mLにします。使用する細胞ライセート量は、トランスフェクションした細胞内のFLAG融合タンパク質の発現量によって決まります。

5. すべてのサンプルとコントロールを2-8 °Cで1~2時間ゆっくりと攪拌するか、振とうします(回転振とう器推奨)。結合を最大にするため、結合ステップの時間を延長してオーバーナイトで行うこともできます。
6. 8,200 x gのマイクロ遠心機で30分間遠心します。氷上に置きます。上清を慎重に吸引するか、ピペットで除去します。必要に応じて、分析用の上清を確保します。ビーズペレットが入っているチューブを氷上に置きます。
7. TBS 500 µLを加えてビーズペレットを洗浄します。ボルテックスを短時間行い、2-8 °Cで5分間ゆっくりと完全に混合してインキュベートします。8,200 x gのマイクロ遠心機で30秒間遠心します。上清を慎重に吸引(またはピペットで除去)し、ビーズペレットが入っているチューブを氷上に置きます。
8. ステップ7と同様に、さらに2回洗浄を繰り返します。最後の洗浄上清を除去した後、結合した抗原を溶出し、必要に応じて分析します(以下の「結果の分析」の項を参照)。

#### 結果の分析

##### FLAG 融合タンパク質の溶出

3種類の溶出方法が提案されます。

- A. 3X FLAG ペプチドとの競合による未変性状態でのタンパク質溶出この方法を用いた場合、非常に高い溶出効率が得られます。
- B. pH 3.5の0.1 M 塩酸グリシンによる酸性条件での溶出。この方法は迅速で、効率的な溶出方法です。溶出したタンパク質を洗浄バッファーで直ちに中和することで、活性が維持されます。
- C. ゲル電気泳動とイムノプロットングのためのサンプルバッファーによる溶出

タンパク質の特徴と分析後の用途に応じて方法を選択します。

##### A. 3X FLAG ペプチドによる溶出:

1. 3X FLAG ペプチド(製品番号 F4799)を0.5 M Tris HCl, pH 7.5, 1 M NaClに25 µg/µLの濃度で溶解し、3X FLAG ペプチド高濃度溶液を調製します。3X FLAG ペプチド高濃度溶液を水で1/5に希釈し、5 µg/µLの3X FLAG ペプチドストック溶液を調製します。この5 µg/µL 3X FLAG ペプチドストック溶液3 µLをTBS 100 µLに加え、3X FLAG 溶出液にします(最終濃度150 ng/µL)。
2. 3X FLAG 溶出液100 µL(150 ng/µL)を各サンプルとコントロール用のレジンに加えます。
3. サンプルとコントロールを2-8 °Cで30分間ゆっくりと振とうしてインキュベートします。

4. レジンを  $8,200 \times g$  で 30 秒間遠心します。上清を新しいチューブに移します。レジンまで移してしまわないよう注意してください。

すぐに使用するとき、上清を  $2-8^{\circ}\text{C}$  で保存します。長期保存するとき  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存します。

#### B. pH 3.5 の 0.1 M 塩酸グリシンによる溶出:

注: この手順は室温で行ってください。レジンをこのバッファー中で 20 分以上放置しないでください。

1. pH 3.5 の 0.1 M 塩酸グリシン緩衝液 100  $\mu\text{L}$  を各サンプルとコントロール用のレジンに加えます。
2. 各サンプルおよびコントロールを室温で 5 分間ゆっくりと振とうしてインキュベートします。
3. レジンを  $8,200 \times g$  で 5 秒間遠心します。直ちに上清を 0.5 M Tris HCl, pH 7.4, 1.5 M NaCl 10  $\mu\text{L}$  を含む新しいチューブに移し、サンプルを中和します。レジンを移さないよう注意してください。

すぐに使用するとき、上清を  $2-8^{\circ}\text{C}$  で保存します。長期保存するとき  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存します。

#### C. SDS-PAGE サンプルバッファーでの溶出:

注: 抗体の変性と溶出を最小限に抑えるため、還元剤 (2-メルカプトエタノールや DTT など) がサンプルバッファーに含まれないようにしてください。還元剤の添加は、固定化された M2 抗体 (25 kDa, 50 kDa バンド) の重鎖と軽鎖の解離を引き起こします。還元条件がどうしても必要な場合には、還元剤を加えても構いません。その場合、1x サンプルバッファー (62.5 mM Tris HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% (v/v) グリセロール, 0.002% プロモフェノールブルー) 中の 2-メルカプトエタノールまたは DTT の最終濃度は、それぞれ 5% または 50 mM とします。

サンプルバッファー中の SDS は M2 抗体を変性させるため、SDS-PAGE サンプルバッファーでの処理後は EZview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel ビーズを再使用できません。

1. 2x Laemmli サンプルバッファー (製品番号 S3401)(125 mM Tris HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20%

(v/v) グリセロール, 0.004% プロモフェノールブルー) 20  $\mu\text{L}$  を各サンプルとコントロールに加えます。

2. サンプルとコントロールを 5 分間煮沸します。
3. ボルテックスを短時間行い、サンプルとコントロールを  $8,200 \times g$  で 30 秒間遠心します。上清を新しいチューブに移すか、直接 SDS-PAGE にロードし、ANTI-FLAG 抗体または融合タンパク質に対する特定の抗体を用いて、染色、オートラジオグラフィーまたはイムノブロットングによるその後の分析を行います。

#### 酵素アッセイ

キナーゼアッセイなどの酵素アッセイは、アッセイ混合液と基質を直接サンプルチューブに加えて実施します。まず、ビーズペレットを分析前にあらかじめアッセイバッファー中で洗浄し、アッセイバッファー内で平衡化します。

#### トラブルシューティング

次頁のトラブルシューティングガイド表をご覧ください。

アフィニティーレジンビーズの可視性の向上により、洗浄操作中に偶然ビーズが除去されたときも容易に確認できます。この場合、洗浄した上清をチューブに戻し、遠心操作を繰り返してレジンを再び回収します。

コントロール: ポジティブコントロールは、TBS 1 mL と 50 ng/ $\mu\text{L}$  の FLAG-BAP<sup>®</sup> 融合タンパク質 (約 200 ng) 4  $\mu\text{L}$  を同様に洗浄したレジンのチューブに加えます。FLAG-BAP 融合タンパク質の沈殿量は、検出方法によって異なります。活性アッセイやイムノブロット分析では、タンパク質量は 200 ng で十分です。クマシーブルーまたは銀染色による SDS-PAGE 分析では、FLAG-BAP 融合タンパク質 1  $\mu\text{g}$  を使用します。

非特異的バックグラウンドをモニターするためのネガティブコントロールは、FLAG 融合タンパク質を発現しない細胞ライセートからの同程度のライセート量を使用します。また、FLAG 融合タンパク質に対する特異性を示すため、FLAG ペプチドを免疫沈降の競合剤として使用することも可能です。

### トラブルシューティングガイド

問題	原因	対策
シグナルが観察されない。	FLAG 融合タンパク質がサンプルに含まれていない。	<ul style="list-style-type: none"> <li>イムノブロットまたはドットブロット分析によって、調べたいタンパク質が FLAG タグを含むことを確認してください。</li> <li>新しいライセートを調製します。凍結したライセートの使用は避けてください。</li> <li>ライセートに適切なプロテアーゼ阻害剤を使用するか、濃度を上げて FLAG 融合タンパク質の分解を防止します。</li> </ul>
	洗浄条件が厳しすぎる。	<ul style="list-style-type: none"> <li>洗浄回数を減らしてください。</li> <li>高濃度の NaCl を反応液に添加しないでください。</li> <li>より少量の界面活性剤を含む溶液または界面活性剤を含まない溶液を使用してください。</li> </ul>
	インキュベーション時間が不適。	<ul style="list-style-type: none"> <li>アフィニティーレジンによるインキュベーション時間を延ばしてください(数時間から一晩)。</li> </ul>
	干渉物質がサンプルに含まれている。	<ul style="list-style-type: none"> <li>高濃度のジチオスレイトール (DTT)、2-メルカプトエタノール、その他の還元剤を含むライセートは抗体機能を破壊する可能性があるため、避ける必要があります。</li> <li>過剰な界面活性剤濃度は、抗体-抗原相互作用を妨げる可能性があります。希釈によってバッファー中の界面活性剤濃度を下げることが可能です。</li> </ul>
	検出システムが不適切。	<p>ウエスタンブロット検出を使用した場合：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>適切なコントロールを用いて一次抗体と二次抗体を確認し、結合と反応性を確認します。</li> <li>Ponceau S で膜を染色して適切に転写されたことを確認します。</li> <li>新しい検出基質を用いるか、異なる検出システムを試します。</li> </ul>
バックグラウンドが高すぎる。	タンパク質が ANTI-FLAG モノクローナル抗体、レジンビーズ、マイクロ遠心管に非特異的に結合している。	<ul style="list-style-type: none"> <li>マウス IgG-アガロース (A0919) や EZview Red Protein A Affinity Gel (P6486) でライセートをあらかじめプレクリアーし、非特異的な結合タンパク質を除去します。</li> <li>最終洗浄用にビーズを懸濁させた後、遠心前に全サンプルを清浄なマイクロチューブに移します。</li> </ul>
	洗浄が不十分。	<ul style="list-style-type: none"> <li>洗浄回数を増やします。</li> <li>洗浄時間を延ばし、1 回の洗浄につき 15 分以上インキュベートします。</li> <li>洗浄液中の塩濃度や界面活性剤濃度を上げます。</li> <li>アフィニティーレジン複合体の初回遠心中にライセートから変性タンパク質が非特異的にトラッピングされることを避けるため、低速で遠心します。</li> </ul>

### 対応試薬一覧

試薬	作用	コメント
カオトロピック剤 (尿素、塩酸グアニジンなど)	固定化された M2 抗体を変性させます。	レジン上の M2 抗体を変性させ、FLAG 融合タンパク質との結合能を破壊するため、これらの種類の成分を含む試薬は <b>使用しないでください</b> 。低濃度の尿素 (1 M 以下) は使用できます。
還元剤 (DTT、DTE、2-メルカプトエタノールなど)	M2 抗体鎖を結合するジスルフィド架橋を還元します。	レジン上の M2 抗体のジスルフィド結合を還元し、FLAG 融合タンパク質との結合能を破壊するため、これらの種類の成分を含む試薬は <b>使用しないでください</b> 。
デオキシコール酸	FLAG 融合タンパク質との M2 結合を妨げます。	M2 抗体の FLAG 融合タンパク質との結合を阻害するため、この界面活性剤を含む試薬は <b>使用しないでください</b> 。
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	固定化された M2 抗体を変性させます。	レジン上の M2 抗体を変性させ、FLAG 融合タンパク質との結合能を破壊するため、溶解および洗浄バッファーにこの界面活性剤を含む試薬は <b>使用しないでください</b> 。免疫沈降後、アフィニティーレジンからのタンパク質の除去のためサンプルバッファーに含まれていますが、レジンには再使用できません。
TWEEN <sup>®</sup> 20	レジンとの非特異的タンパク質結合を減少させます。	5%以下の濃度で使用できます。この濃度を超えないようにしてください。
TRITON <sup>®</sup> X-100	レジンとの非特異的タンパク質結合を減少させます。	5%以下の濃度で使用できます。この濃度を超えないようにしてください。
イゲパール CA-630 (NP-40)	レジンとの非特異的タンパク質結合を減少させます。	0.1%以下の濃度で使用できます。この濃度を超えないようにしてください。
CHAPS	レジンとの非特異的タンパク質結合を減少させます。	0.1%以下の濃度で使用できます。この濃度を超えないようにしてください。
ジギトニン	レジンとの非特異的タンパク質結合を減少させます。	0.2%以下の濃度で使用できます。この濃度を超えないようにしてください。
塩化ナトリウム	イオン相互作用を減少させることで、レジンとの非特異的タンパク質結合を減少させます。	1.0 M 以下の濃度で使用できます。この濃度を超えないようにしてください。
0.1 M 塩酸グリシン、pH 3~5	レジンから FLAG 融合タンパク質を溶出します。	アフィニティーレジンに塩酸グリシン中で 20 分以上放置しないでください。インキュベーション時間が長いと、M2 抗体の変性が始まります。

### 関連製品

- 哺乳類 FLAG 発現キット (製品番号 FLMA、FLMAS、FLMC)
- 哺乳類発現ベクター (製品番号 E7273、E7398、E8770、E1775、E3762、E2275、E2400)
- 哺乳類シークエンスプライマー (製品番号 P5350、P5475)
- ANTI-FLAG M1 モノクローナル抗体 (製品番号 F3040)
- ANTI-FLAG M1 Affinity Gel (製品番号 A4596)
- ANTI-FLAG M2 モノクローナル抗体 (製品番号 F3165)
- ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (製品番号 A2220)
- ANTI-FLAG M5 モノクローナル抗体 (製品番号 F4042)
- FLAG 免疫沈降キット (製品番号 FLAGIPT1)
- タンパク質測定用ビスシコニン酸 (BCA) キット (製品番号 BCA1)
- QuantiPro™ BCA アッセイキット (製品番号 QPBCA)
- FLAG-BAP コントロール融合タンパク質 (製品番号 P7582、P7457、P5975)
- プロテアーゼインヒビターカクテル (一般的には細菌、哺乳類、菌 & 酵母、植物、培養組織、ヒスチジンタグ)(製品番号 P2714、P8465、P8340、P8215、P9599、P1860、P8849)
- ホスファターゼインヒビターカクテル (製品番号 P2850、P5726)
- FLAG ペプチド (製品番号 F3290)
- 3X FLAG ペプチド (製品番号 F4799)
- ANTI-FLAG M2-ペルオキシダーゼ (HRP) 結合体 (製品番号 A8592)
- ANTI-FLAG M2-アルカリホスファターゼ 結合体 (製品番号 A9469)
- ジチオスレイトール (DTT) (製品番号 D9779)
- 2-メルカプトエタノール (製品番号 M7154)
- 塩酸グリシン (製品番号 G2879)
- EZview Red Protein A Affinity Gel (製品番号 P6486)

### 参考文献

1. Harlow, E., and Lane, D. Antibodies, A Laboratory Manual, pp. 423-470, 513-517 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1988).
2. Brizzard, B.L., *et al.*, BioTechniques, **16**, 730-735 (1994).
3. Knappik, A., and Pluckthun, A., BioTechniques, **17**, 754-761 (1994).
4. Chiang, C.M., and Roeder, R.G., Pept. Res., **6**, 62-64 (1993).
5. Ausubel F.M., *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons Inc., NY (1998), pp. 10.15.1-10.16.29

本製品とその使用は、米国特許第 6,887,377、7,163,633、及び 7,438,806 号で保護されています。

FLAG、ANTI-FLAG 及び Trizma は Sigma-Aldrich® Biotechnology LP 及び Sigma-Aldrich Co.の登録商標です。

Ezview、CellLytic、QuantiPro 及び FLAG-BAP は Sigma-Aldrich Biotechnology LP 及び Sigma-Aldrich Co.の商標です。

Kathon は Rohm and Haas Company の登録商標です。Eppendorf は Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH の登録商標です。

TRITON は Union Carbide Corporation の登録商標です。TWEEN は ICI Group の登録商標です。

IGEPAL は Rhodia Operations の登録商標です。

Coomassie は Imperial Industries PLC.の登録商標です。

TD,DWF,KMR,CMH,KTA,MAM 04/10-1

これらの製品の使用は、製品に付属するライセンスに記載された使用条件に従うものとします。要望があればそのコピーを提供します。FLAG® と ANTI-FLAG® は、Sigma-Aldrich Biotechnology LP の登録商標です。pFLAG™, p3XFLAG™, pFLAG-1™, pFLAG-2™, pFLAGSHIFT™, pFLAG-CTS™, pFLAG-ATS™, pFLAG-MAC™, pFLAG-CMV™, YEpFLAG™及びFLAG-BAP™ の製品表示は、Sigma-Aldrich Biotechnology LP の商標です。

### 使用許諾

**A. ベクターライセンス:** 同封のベクターを使用して、研究目的で細胞を形質転換してアミノ酸配列 DYKDDDDK を含有するタンパク質を生成できますが、こうした研究目的には、未許可の抗体をこのアミノ酸配列の一部に結合させたり、こうしたタンパク質をこのアミノ酸配列の一部に対する親和性を持つ抗体の調製に使用する場合は含まれません。

**B. 抗体ライセンス:** 以下の場合に限り、実際に使用される国で効力を有する前述の特許のいずれかの範囲に従って、同封の抗体を使用して、研究目的でタンパク質を宿主細胞で発現させ、抗体を使用して精製するタンパク質生成法を実施できます。(1) Sigma-Aldrich Co. から使用許諾を受けた DNA 発現ベクターでそのような方法を行う場合、(2) 未認可の抗体をこの方法を使用して生成された融合タンパク質の DYKDDDDK エピトープと結合させない (もしくは他者に結合させない) 場合。

この使用許諾には、他の特許に定められたいかなる権利も含まれません。ベクターや抗体を、前述以外の方法や目的で使用することはできません。前述の場合、「未許可の抗体」とは、Sigma-Aldrich Co. が B 項に従って明示的に使用許諾を与えていない抗体を指します。Sigma-Aldrich Co. は、本契約で明示的に使用許諾を与えていない前述の特許におけるすべての権利を明示的に保有します。

この使用許諾の条件に同意した場合、ベクターや抗体の入った容器を開封することができ、容器を開封することによって、これらの条件に同意したものとみなします。

この使用許諾条件に同意しない場合、未開封の容器を Sigma-Aldrich Co. に返送してください。製品料金を全額返金します。

追加のライセンス情報や前述の特許のコピーを入手するには、Sigma-Aldrich Co. のライセンス部門、tel 314-771-5765 にご連絡ください。

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc. を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc. は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。掲載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。