

## Immunoprecipitation (1)

### Summary

FGビーズ®はケミカルバイオロジーなどの様々な用途で使用されますが、免疫沈降においても優れた性能を発揮します。

FGビーズ®に抗体を固定化する方法としては、NHSビーズなどの、活性化された官能基を利用して抗体とビーズを直接固定化する方法や、プロテインAやプロテインGなどのタンパク質機能を利用する方法などがあります。NHSビーズは抗体を直接共有結合で固定化するため、抗体の溶出が少なく、また、プロテインAやプロテインGに起因する非特異的吸着がないため、バックグラウンドを最小限に抑えられます。プロテインAビーズやプロテインGビーズでは、少ない実験操作で簡便に行えるというメリットがあります。

そこで、今回は多くの動物種とそのサブクラスに強い親和性があるプロテインGビーズを用いて、‘回収量が多い’というFGビーズの特徴を示します。

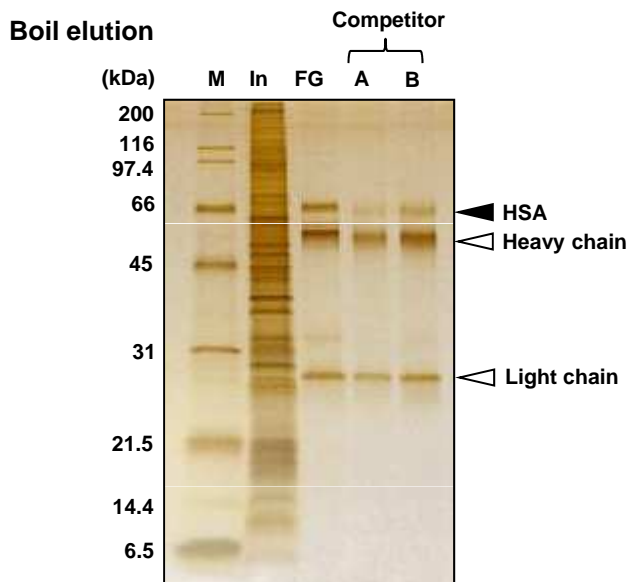
### Result

#### 1. 同じビーズ量での実験

FGビーズ®は0.1mg当たり10ug以上の抗体結合能があり、0.1mgのビーズ量で免疫沈降で一般に使用される抗体量を十分に固定化することができます。

そこで、FGビーズ®を含めた3社のビーズで、0.1mgのビーズと5ugの抗HSA抗体を用いて、抗原回収量比較を行いました。

その結果、FGビーズ®で最も多い回収量を得ることができました。



Condition

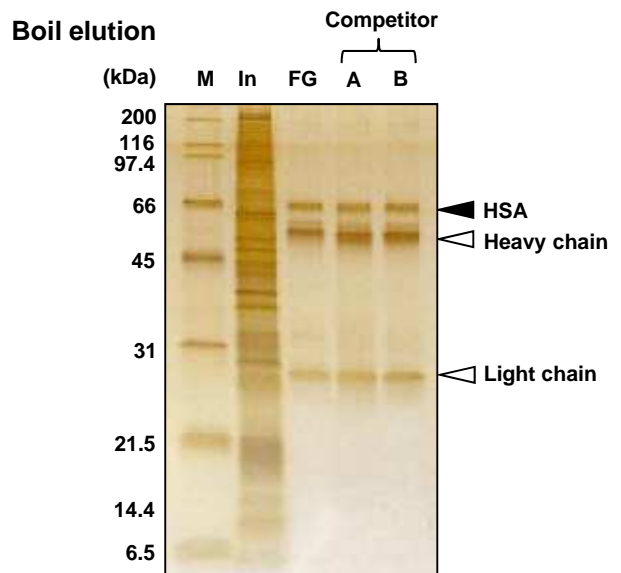
	Beads	Antibody
FG beads®	0.1mg	5ug
A	0.1mg	5ug
B	0.1mg	5ug

#### 2. 同じ抗原回収量を得るための実験

次に、5ugの抗HSA抗体を用いて同じ抗原量を回収するために、ビーズ量を振って免疫沈降を行いました。

その結果、下記条件において抗原の回収量は同じとなりました。

このことにより、5ugの抗体を用いて免疫沈降を行って同じ抗原回収量を得る場合は、FGビーズ®はA社の1/15、B社の1/2.5のビーズ使用量で良いことが確認されました。



Condition

	Beads	Antibody
FG beads®	0.1mg	5ug
A	1.5mg	5ug
B	0.25mg	5ug

※各社推奨プロトコールに準じて実施しました。

## Materials and method

### Materials

1. Anti-HSA (Human Serum Albumin) (from Hytest)
2. HSA (from nacalai tesque)
3. HeLa cell extracts (cytosolic fraction) – 3mg/ml
4. Protein G beads
5. PBS(-) (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
6. Wash Buffer A (10mM HEPES-NaOH(pH7.9), 50mM KCl, 0.2mM EDTA, 10%(v/v) glycerol)
7. Wash Buffer B (20mM HEPES-NaOH(pH7.9), 150mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 0.1% NP-40, 0.2mM PMSF)
8. Elution Buffer (0.1M glycine-HCl pH2.5)
9. Neutralization Buffer (1M Tris-HCl pH9.0)
10. SDS sample buffer (62.5mM Tris-HCl (pH6.8), 0.005% BPB, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercapto ethanol)

### FG beads® information

Product name	Protein G beads
Product number	TAS8848N1173
Storage temperature	2-8°C
Storage buffer	10mM HEPES(pH7.9), 50mM KCl, 1mM EDTA, 10%glycerol
Size of beads	190nm ± 20nm
IgG binding capacity	>100ug mouse IgG /mg of beads

### Method 1 (Binding Antibody)

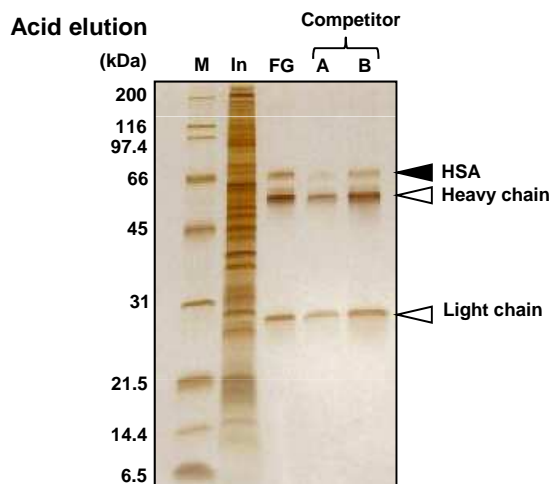
1. **Wash**  
Transfer each amount of beads to a tube.  
Wash beads with 200ul PBS(-) 2 times at 4°C.
2. **Bind Antibody**  
Add antibody (5ug) diluted in 200ul PBS(-) to beads.
3. **Reaction**  
Mix for 30min at room temperature.
4. **Wash**  
Wash antibody binding beads with Wash buffer A 2 times at 4°C.

### Method 2 (Immunoprecipitation)

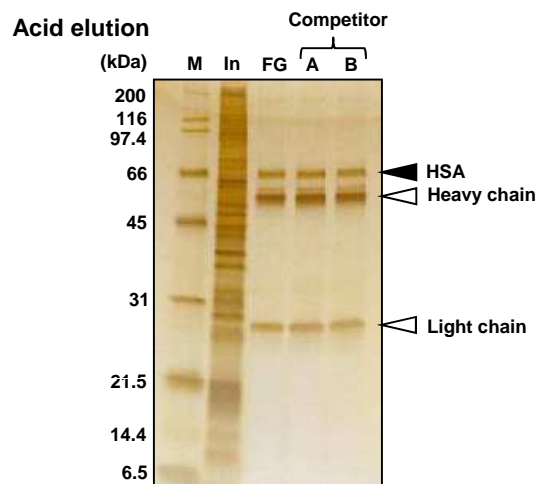
1. **Add sample solution**  
Add 200ul HeLa cell extracts containing HSA to the antibody binding beads.
2. **Reaction**  
Resuspend beads and incubate with rotation for 120min at 4°C.
3. **Wash**  
Separate magnetically and remove supernatant.  
Wash beads with Wash buffer B 3 times at 4°C.  
Transfer 100ul resuspended solution to new tube to perform 2 elution pattern.  
Separate magnetically and remove supernatant.
4. **Elution**
  - Acid elution**  
Add 28ul Elution buffer and resuspend beads.  
Stand for 5min at 4°C, separate magnetically.  
Transfer the supernatant to new clean tube and add 2ul Neutralization buffer, and 10ul 4 × SDS sample buffer.
  - Boil elution**  
Add 40ul 1 × SDS sample buffer and resuspend beads.  
Boil for 5min and remove the beads.
5. **Analyze the samples by SDS-PAGE and silver staining**

## Result (2)

### 1. Experiment with the same amount of beads



### 2. Experiment to obtain the same recovery amount of antigens



Acid elution samples show similar band pattern to Boil elution samples.