

Product Information

ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel

製品番号 A2220

保存温度 -20 °C

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

製品概要

ANTI-FLAG® M2 affinity gel は、精製マウス IgG₁モノクローナル抗体をアガロースにヒドラジン結合させています。FLAG 融合タンパク質の精製または免疫沈降に使用できます。

本製品の FLAG ペプチドへの結合はカルシウム非依存性です。

結合特異性:

N 末端、Met-N 末端、C 末端、内部の FLAG ペプチド (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C) 融合タンパク質

試薬

抗 FLAG M2 アフィニティーゲルは、0.02% (w/v) アジ化ナトリウム含有の 10 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.4)(PBS/A) の 50% グリセロール溶液中に懸濁されています。

お客様に用意していただく試薬および機器

- FLAG 融合タンパク質を発現する細胞
- 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, C8740)
- 適切な遠心分離機
- 適切なカラムまたは遠心チューブ
- 塩化ナトリウム、製品番号 S3014
- トリス塩基(Trizma® base)、製品番号 T6066
- プロテアーゼインヒビターカクテル (哺乳類細胞・組織抽出液用)、製品番号 P8340

ご使用前の注意と免責事項

弊社の製品は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、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

抗 FLAG M2 アフィニティーゲルは、安定性を最大にするために -20 °C、50% グリセロール溶液中で保存する必要があります。未開封の製品は、表示通りに保存した場合 1 年間安定です。使用後は製品保護のため、0.02% アジ化ナトリウム含有の PBS または PBS バッファーの 50% グリセロール溶液で洗浄、保存する必要があります。グリセロールを添加せずに凍結しないでください。

手順

注: 使用前に使用説明書の全体 (特に試薬適合性表) をお読みになることをお勧めします。

Part I. ライセートの調製

最適な手順は使用者によって経験的に決定される必要があります。E. coli 粗抽出液からの FLAG 融合タンパク質の代表的な精製方法を示します。細菌の細胞溶解には、CellLytic B Lysis Reagent (製品番号 B7435、B7310、C8740) または CellLytic B Plus Kit (製品番号 CB0050、CB0500) を使用することをお勧めします。哺乳動物細胞には CellLytic M が使用できます。

- A. CellLytic Lysis Reagent を用いた E. coli 溶解の推奨手順
 1. FLAG 融合タンパク質の産生を誘導する条件下で細胞 (約 1 L 以下) を増殖させます。
 2. 5,000 × g, 2–8 °C で 30 分間遠心して、細胞を回収します。
 3. 細胞ペーストから培地をデカントして捨てます。
 4. 細胞ペーストをドライアイス/エタノール浴を用いるか、または、-20 °C のフリーザー内で凍結します。ゆっくり凍結するうちに細胞溶解が進みます。
 5. 凍結した細胞ペースト 1 gあたり 10 mL の CellLytic B (製品番号 B7435) または凍結した細胞ペースト 1 gあたり CellLytic B, 2x concentrate (製品番号 B7310) 5 mL で凍結細胞ペーストを溶解します。

6. 細胞を CellLytic B 試薬にピペットで再懸濁します。完全にタンパク質が抽出されるように、15 分間振盪機で激しく混和します。
7. $21,000 \times g$ で 15 分間遠心して菌体破片を除きます。
8. 遠心後、上清をデカントして新しい容器に移し、細胞ペレットを捨てます。溶液は不溶性粒子がなく透明になります。

B. 哺乳類細胞用の推奨手順

70–90% コンフルエントな 100 mm 培養皿 (10^6 – 10^7 細胞) に対して、溶解バッファー (50 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TRITON X-100) を 1 mL 使用します。

FLAG 融合タンパク質の発現レベルが比較的低い場合は、溶解バッファーの量を減らして細胞を溶解してください。特に後の利用のためライセートを保存する場合は、溶解バッファーにプロテアーゼインヒビターカクテル (製品番号 P8340)(1 mL の溶解バッファーあたり 10 μ L) を添加することをお勧めします。

1. 付着細胞または浮遊細胞を適切に洗浄します。
付着細胞 – 分析する細胞から培地を除きます。PBS (10 mM リン酸, 2.7 mM 塩化カリウム, 137 mM 塩化ナトリウム, pH 7.4, 25 °C) バッファーで 2 回、細胞が剥がれないように注意して洗浄します。PBS を捨てます。溶解バッファー (10^6 – 10^7 cells/ml) を添加します。
浮遊細胞 – 適切なコニカル遠心チューブに細胞を回収します。420 $\times g$ で 5 分間遠心します。上清をデカントして捨てます。細胞ペレットを PBS に再懸濁することにより細胞を 2 回洗浄し、420 $\times g$ で 5 分間遠心します。上清をデカントして捨てます。細胞ペレットを溶解バッファーに再懸濁します (10^6 – 10^7 cells/ml)。
2. シェーカーで 15–30 分間細胞を振盪します。
3. 付着細胞の場合のみ、細胞を剥がして回収します。浮遊細胞の場合: ステップ 4 に進みます。
4. 12,000 $\times g$ で 10 分間ライセートを遠心します。
5. 上清を冷却したチューブに移します。すぐに使用する場合は氷上に置きます。すぐに使用しない場合は、-70 °C で保存します。

Part II. レジンの準備

本製品は 50% グリセロールバッファー中で保存されています。使用直前にグリセロールを取り除き、レジンをバッファーで平衡化する必要があります。平衡化は室温または 2 ~ 8 °C で行います。精製に必要な量のレジンだけ取り出してください。レジンをよく再懸濁してください。標準的な方法を用いてレジンを清浄なクロマトグラフィーカラムに流し入れることができます。抗菌剤 (例えば、0.02% アジ化ナトリウム) をバッファーに添加していない場合は、長時間 (24 時間以上) レジンを TBS バッファー中に放置しないでください。

1. 空のクロマトグラフィーカラムを安定な支持台に設置します。
2. 空のカラムを TBS (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) または別の適切なバッファーで 2 回すすぎます。バッファーをカラムから排水し、カラムに残った TBS は抗 FLAG M2 アフィニティーゲルを充填しやすいように、そのままにしておきます。
3. ゆっくりと転倒混和してレジンを完全に懸濁させます。本製品のボトル中のゲルビーズが均一に懸濁していることを確認してください。適切な使用量を取り出します。
4. 懸濁液を直ちにカラムに移します。
5. ゲルベッドをそのまま排水させ、レジンを取るのに用いたピペットを TBS ですすぎます。50% グリセロールバッファーはゆっくり流れるので、平衡化中に流速が速くなります。
6. すすぎ液をカラム上部に加え、再び排水せます。通常条件下では、過剰に溶液を排水してもゲルベッドがひび割れることはありませんが、ゲルベッドは乾燥させないようにしてください。
7. カラム量の 3 倍の 0.1 M 塩酸グリシン、pH 3.5 を連続してロードすることによりゲルを洗浄します。バッファーを加える際にゲルベッドを乱さないようにしてください。次の溶液を加える前に、前の溶液を完全に排水せます。カラム内に塩酸グリシンを 20 分以上留まらせないようにしてください。
8. レジンをカラム量の 5 倍の TBS で洗浄し、使用できるようにレジンを平衡化します。ゲルベッドを乾燥させないようにしてください。カラム上部に少量のバッファーを残すようにしてください。

Part III. 結合手順

FLAG 融合タンパク質の精製用に、レジンはカラムでもバッチでも使用できます。ロードするライセート量が約 100 mL までの場合に限り、1–3 mL のレジンを用いたカラムで上手く対処できます。それ以上の量のライセートの場合、大容量の抽出液からの目的タンパク質の迅速な精製にはバッチ方式をお勧めします。少量のサンプル (1–2 mL の

ライセート)を精製する場合、FLAG 融合タンパク質を免疫沈降できます。

1. カラムクロマトグラフィー

カラムとバッファーを再平衡化して、室温で精製を行います。プロテアーゼによる問題がある場合は、カラムクロマトグラフィーを 2~8 °C で行うか、溶出液にプロテアーゼインヒビターカクテルを添加してください。菌体破片や粒子状物質はカラムを詰まらせるので、精製前に除去する必要があります。染色体 DNA や RNA を含む粘性の高いサンプルもカラムを詰まらせるので、粘度を下げるために Benzonase®(製品番号 E1014)などのエンドヌクレアーゼで処理する必要があります。ゲルの機能を確認するために、FLAG•BAP ポジティブコントロールタンパク質を用いることができます。

注: 抗 FLAG M2 アフィニティーゲルは多くの界面活性剤に耐性です。一般に抗体やタンパク質に有害な、または有害な可能性のある試薬は使用しないでください。詳細は試薬適合性表を参照してください。

A. FLAG 融合タンパク質のカラムへの結合

1. FLAG 融合タンパク質が抗 FLAG M2 アフィニティーカラムに適切に結合するには、0.15 M 塩化ナトリウムと中性の pH が必要です。
2. 自然落下によりサンプルをカラムにロードします。サンプル量が多い時は、数回に分けてロードするか、カラムリザーバーを取り付けます。タンパク質の種類や流速によって、全ての抗原が結合しない場合があります。カラムにサンプルを複数回通すことにより、結合効率が向上します。
3. カラム量の 10–20 倍の TBS でカラムを洗浄します。この操作により、M2 抗体に結合していないタンパク質は全て除去されます。カラムから完全に排水せます。

B. 溶出には、次の 2 つの手順のうち 1 つを選んでください。

1. グリシンを用いた酸溶出による FLAG 融合タンパク質の溶出—カラムに結合した FLAG 融合タンパク質を 15–25 µL の 1 M Tris (pH 8.0) を入れた各バイアル内に、それぞれ 1 mL の 0.1 M 塩酸グリシン (pH 3.5) で 6 回溶出します。カラム内に塩酸グリシンを 20 分以上留まらせないようにしてください。

溶出後すぐにカラムを中性の pH に再平衡化してください。

または、

2. FLAG ペプチドを用いた競合による FLAG 融合タンパク質の溶出 — カラム量の 5 倍の 100

µg/mL FLAG ペプチド溶液(製品番号 F3290)
(TBS に溶解)で競合的に溶出させます。

C. カラムのリサイクル

カラムは使用後直ちにカラム量の 3 倍の 0.1 M 塩酸グリシン (pH 3.5) で洗浄し、再生させることをお勧めします。溶出液の pH が中性になるまで、直ちにカラムを TBS により再平衡化する必要があります。

D. カラムの保存

カラム量の 10 倍の 0.02% アジ化ナトリウム含有の 50% グリセロール TBS または PBS バッファーでカラムを洗浄後、5 mL の 0.02% アジ化ナトリウム含有のグリセロールバッファーを加え、排水せずに 2–8 °C または–20 °C で保存します。E. coli のペリプラズムをカラムにアプライする場合は、結合能が損なわれることなく 20 回まで再利用できます。E. coli 粗抽出液をカラムにアプライする場合は、結合能の低下が認められるまで 3 回再利用できます。再利用の回数は、サンプル条件、プロテアーゼなどにより変化します。

2. 抗 FLAG M2 アフィニティーゲルを用いた FLAG 融合タンパク質のバッチ方式による精製

FLAG 融合タンパク質を希釈した溶液から精製する迅速で効率的な方法です。量の多いサンプルを少量のレジンに通すという時間のかかるカラムクロマトグラフィーの操作を省けます。

1. タンパク質抽出液の pH を 7–8 に合わせます。大量のタンパク質のレジンへの非特異的な結合を抑えるために塩濃度 (塩化ナトリウムまたは塩化カリウム) を少なくとも 0.15 M にするのも有用です。
2. FLAG 融合タンパク質の抽出液は不溶性物質を除去すると透明になります。大量の不溶性物質を除くのには、遠心分離 (約 10,000~20,000 × g で 15 分間)が必要です。ステップ 6 のレジン回収時にカラムやフィルターを詰まらせる可能性のある残存する細胞や粒子を除去するため、タンパク質抽出液は 0.45 または 0.22 µm フィルターで濾過することも必要です。
3. 使用前に抗 FLAG M2 アフィニティーゲルを平衡化する必要があります。調製の項にあるレジンの準備を参照してください。
4. レジンを TBS に再懸濁して、タンパク質抽出液を添加します。
5. FLAG 融合タンパク質が結合するように穏やかに混和しながらタンパク質抽出液を抗 FLAG M2 アフィニティーゲルと約 1 時間インキュベートします。混和はオーバーヘッドミキサーか振とう機で行つ

てください。磁気スターラーシステムは、レジンピーズが破損するので使用しないでください。このステップは、2-8 °C または室温で行えます。インキュベーション時間は 30 分から数時間まで可能です。インキュベーション時間が 3 時間以上の場合は、細菌の増殖および/またはタンパク質分解を抑えるためにプロテアーゼインヒビターと抗菌剤を添加する必要があります。

6. 結合ステップの終了後、直ちに容器からレジンを回収します。レジンは遠心分離($1,000 \times g$ で 5 分間)、または、空のカラムやブフナー漏斗を用いたフィルター濾過により回収できます。
7. 非特異的に結合したタンパク質を全て除くために TBS でレジンを洗浄します。このステップは、タンパク質の溶出が終わるまでカラムに新鮮なバッファーを通すカラム方式でも行えます。レジンから溶出するタンパク質は、溶出液の 280 nm の吸光度を測定することによりモニタリングできます。カラムから出てきた洗浄液の吸光度の、洗浄液のブランクに対する差が 0.05 以下になるまでレジンの洗浄を続けます。
8. FLAG 融合タンパク質は低い pH または FLAG ペプチドとの競合によりレジンから溶出されます。カラムクロマトグラフィーの溶出ステップ B に従ってください。
9. カラムクロマトグラフィーの C と D に記載されているように、レジンはリサイクルおよび保存ができます。

3. FLAG 融合タンパク質の免疫沈降

この方法は FLAG 融合タンパク質の量が少ない場合の精製にお勧めします。

注: 異なる濃度の界面活性剤からなる溶解バッファーが必要な抗原やタンパク質・タンパク質複合体に関しては、使用前にレジンをあらかじめテストすることをお勧めします。抗 FLAG M2 アフィニティーゲルは、5.0% TWEEN® 20、5.0% TRITON X-100、0.1% IGEPAL® CA-630、0.1% CHAPS、0.2% ジギトニンなど多くの界面活性剤に対して耐性があります。1.0 M NaCl または 1.0 M 尿素とも使用できます。他の化学薬品については試薬適合性表を参照してください。

別途指示のない限り、全てのステップを 2-8 °C で行ってください。あらかじめ冷やしておいた溶解バッファー、洗浄バッファーと器具を使用します。ライセートと溶出バッファーはあらかじめ冷やさないでください。全ての遠心分離は 2-8 °C で、あらかじめ冷やしておいたローターで行います。

A. FLAG 融合タンパク質の免疫沈降

以下に示す手順は、1 回の免疫沈降反応の例です。複数回の免疫沈降反応については、処理するサンプルの数に応じて必要な試薬量を計算してください。免疫沈降反応の操作をしやすくするために、反応あたり 40 μL のゲル懸濁液を使用することをお勧めします(充填ゲル量は約 20 μL)。より少ない量のレジン(約 10 μL の充填ゲルあたり、1 μg 以上の FLAG 融合タンパク質を結合)を使用することも可能です。

注: 2 つのコントロール反応を同時にを行うことをお勧めします。1 つ目のコントロールは、FLAG-BAP 融合タンパク質(ポジティブコントロール)との免疫沈降反応で、もう 1 つはタンパク質を含まないブランクの試薬(ネガティブコントロール)との反応です。

1. レジンを均一に懸濁するため、ANTI-FLAG M2 アフィニティーゲルをバイアルに完全に懸濁します。懸濁液と充填ゲル量の比率は 2:1 にします。40 μL のゲル懸濁液を直ちに別のチューブに移します。レジンを移す際には、レジンが移せるように先を広げた清浄なプラスティック製チップを使用してください。
2. レジンを $5,000-8,200 \times g$ で 30 秒間遠心します。レジンがチューブの中で沈むように、サンプルを扱うまで 1-2 分間待ちます。先の細いチップまたは Hamilton® シリンジを用いて、レジンを吸わないように注意しながら上清を除去します。先の細いチップは、ピンセットを用いてプラスティック製ピペットチップの開口部を部分的に閉じるまで挟むことで作れます。
3. 沈殿させたゲルを 0.5 mL の TBS で 2 回洗浄します。レジンは捨てないように注意しながら、洗浄バッファーのほとんどを除去します。複数の免疫沈降サンプルの場合、サンプル全てに必要なレジンを一緒に洗浄します。洗浄後、試験を行うサンプル数に合わせてレジンを分割します。各洗浄は沈殿ゲル総量の 20 倍量の TBS で行う必要があります。
4. オプショナルステップ一レジン懸濁液から微量の非結合の抗 FLAG 抗体を除去するためには、結合ステップを続けて行う前に 0.5 mL の 0.1 M 塩酸グリシン(pH 3.5)で洗浄します。レジンを塩酸グリシン中で 20 分以上そのままにしないでください。レジンから全ての上清が除去されるように注意しながら直ちに上清を捨て、続けて 0.5 mL の TBS で 3 回洗浄します。
5. 細胞ライセート 200-1000 μL を洗浄したレジンに加えます。必要であれば、溶解バッファー(50 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TRITON X-100)を加えて最終量を 1 mL にします。用いるライセート量は、トランスフェクトした細胞における FLAG 融合タンパク質の発現レベルにより決まります。ポジティブコントロールについては、洗浄したレジンに 1 mL の TBS と 4 μL の 50 ng/μL FLAG-

- BAPTM 融合タンパク質 (約 200 ng) を添加します。ネガティブコントロールについては、タンパク質を含まない溶解バッファーを 1 mL のみ添加します。
- 免疫沈降される FLAG-BAP 融合タンパク質の量は検出法により決まります。活性アッセイやイムノプロット分析では、タンパク量は 200 ng で十分です。
- Coomassie[®] ブルーまたは銀染色による SDS-PAGE 分析には、FLAG-BAP 融合タンパク質を 1 µg 使用してください。
6. すべてのサンプルとコントロールを 2 時間ゆっくりと攪拌または振とう (回転振とう器を推奨) します。結合効率を高めるため、結合ステップの時間を延ばしてオーバーナイトで行うこともできます。
 7. レジンを 5,000–8,200 × g で 30 秒間遠心します。先端の細いピペットチップで上清を除去します。
 8. レジンを 0.5 mL の TBS で 3 回洗浄します。Hamilton シリンジまたは相当する器具を用いて、上清が全て除去されることを確認してください。

B. FLAG 融合タンパク質の溶出

タンパクの特徴またはその後の使用に応じて、3 種類の溶出方法を推奨します。

1. 3X FLAG ペプチドを用いた競合による未変性条件下でのタンパク質の溶出この方法を用いると溶出効率が高くなります。
2. 0.1 M 塩酸グリシン (pH 3.5) を用いた酸性条件での溶出は、迅速かつ効率的な溶出方法です。溶出したタンパクを洗浄バッファーで平衡化することで、活性が維持されます。
3. ゲル電気泳動とイムノプロットのためのサンプルバッファーによる溶出

1. 3X FLAG ペプチドを用いた溶出

- a. 3X FLAG 溶出溶液を調製します。1 M NaCl 含有の 0.5 M Tris HCl (pH 7.5) に 3X FLAG ペプチド (製品番号 F4799) を濃度 25 µg/µL で溶解します。5 倍量の水で希釈して、5 µg/µL の 3X FLAG ペプチドのストック溶液を調製します。溶出用には、100 µL の TBS に 5 µg/µL の 3X FLAG ペプチドのストック溶液 3 µL を加えます (最終濃度 150 ng/µL)。
- b. 100 µL の 3X FLAG 溶出液を各サンプルとコントロールレジンに添加します。
- c. 穏やかに振盪しながら 2–8 °C で 30 分間サンプルとコントロールをインキュベートします。
- d. レジンを 5,000–8,200 × g で 30 秒間遠心します。ハミルトンシリンジまたは同等の機器を用いて、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。

- e. 直ちに使用する場合には、上清を 2–8 °C で保存します。長期保存の場合は–20 °C で保存します。

2. 0.1 M 塩酸グリシン (pH 3.5) を用いた溶出

この手順は室温で行ってください。レジンを塩酸グリシン中で 20 分以上そのままにしないでください。

- a. 100 µL の 0.1 M グリシン HCl (pH 3.5) バッファーを各サンプルとコントロールレジンに添加します。
- b. サンプルと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。
- c. レジンを 5,000–8,200 × g で 30 秒間遠心します。Hamilton シリンジまたは相当する器具を用いて、10 µL の 0.5 M Tris HCl (pH 7.4)、1.5 M NaCl を入れた別のチューブに上清を移します。レジンまで移してしまわないよう注意してください。
- d. 直ちに使用する場合には、上清を 2–8 °C で保存します。長期保存の場合は–20 °C で保存します。

3. SDS-PAGE サンプルバッファーを用いた溶出

この手順は室温で行ってください。サンプルバッファーは使用前に室温にする必要があります。抗体の変性や溶出を最小限にするために、サンプルバッファーには還元剤 (2-メルカプトエタノールまたは DTT) を加えないでください。還元剤の添加により、固定化された M2 抗体の重鎖と軽鎖が解離します (25 および 50 kDa のバンド)。還元条件がどうしても必要な場合には、還元剤を加えることもできます。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% ブ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 の最終濃度がそれぞれ 5% または 50 mM になるようにします。

注: サンプルバッファー中の SDS は M2 抗体を変性させるので、SDS-PAGE サンプルバッファー処理後の抗 FLAG M2 アフィニティーゲルは再利用できません。

- a. 20 µL の 2X サンプルバッファー (125 mM Tris HCl (pH 6.8)、4% SDS、20% (v/v) グリセロール、0.004% ブロモフェノールブルー) を各サンプルとコントロールに添加します。
- b. サンプルとコントロールを 3 分間煮沸します。
- c. サンプルとコントロールを 5,000–8,200 × g で 30 秒間遠心して、不溶性のアガロースをペレット化します。ハミルトンシリンジまたは先端の細いパスツールピペットで上清を新しいチューブに移します。サンプルとコントロールは、SDS-PAGE へのローディング、また抗 FLAG 抗体または融合タンパク質に特異的な抗体を用いたイムノブロッティングができる状態です。

試薬適合性表

試薬	作用	コメント
変性剤(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 融合タンパク質を結合する能力を損ねますので、これらのタイプの成分を含む試薬は 使用しないでください 。低濃度(1M 以下)の尿素が使用できます。
還元剤(DTT、DTE、2-メルカプトエタノールなど)	M2 抗体の鎖を結ぶジスルフィド結合を還元します。	レジン上の M2 抗体のジスルフィド結合を還元して、FLAG 融合タンパク質を結合する能力を壊すので、これらのタイプの成分を含む試薬は 使用しないでください 。
ツイーン 20、5% 以下	レジンへの非特異的なタンパク質結合を低下させます。	推奨される 5%までなら使用できますが、それ以上の濃度では 使用しないでください 。
TRITON X-100 5% 以下	レジンへの非特異的なタンパク質結合を低下させます。	推奨される 5%までなら使用できますが、それ以上の濃度では 使用しないでください 。
IGEPAL CA-630、0.1%以下	レジンへの非特異的なタンパク質結合を低下させます。	推奨される 0.1%までなら使用できますが、それ以上の濃度では 使用しないでください 。
CHAPS、0.1%以下	レジンへの非特異的なタンパク質結合を低下させます。	推奨される 0.1%までなら使用できますが、それ以上の濃度では 使用しないでください 。
ジギトニン、0.2%以下	レジンへの非特異的なタンパク質結合を低下させます。	推奨濃度から 0.2%までなら使用できますが、それを超えるものは ご使用にならないでください 。
塩化ナトリウム、1.0M 以下	イオンの相互作用を低下させることによって、レジンへの非特異的なタンパク質結合を低下させます。	推奨される 1.0M までなら使用できますが、それ以上の濃度では 使用しないでください 。
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 融合タンパク質を結合する能力を損ねますので、ローディングおよび洗浄バッファーにこの界面活性剤を含む試薬は 使用しないでください 。免疫沈降時のタンパク質の除去用としてサンプルバッファー中に含まれていますが、レジンは再利用できません。
0.1M グリシン HCl(pH 3.5)	レジンから FLAG 融合タンパク質を溶出します。	カラム内に塩酸グリシンを 20 分以上留まらせないようにしてください。インキュベーション時間が長くなると、M2 抗体の変性が始まります。
デオキシコレート	FLAG 融合タンパク質への M2 の結合を阻害します。	M2 抗体の FLAG 融合タンパク質への結合を阻害するので、この界面活性剤を含む試薬は 使用しないでください 。

トラブルシューティングガイド

問題	考えられる原因	対策
シグナルが検出されない	サンプル中に FLAG 融合タンパク質が存在しない	<ul style="list-style-type: none"> イムノプロット分析またはドットプロット分析により、目的のタンパク質に FLAG タグが含まれていることを確認してください。 新鮮なライセートを調製してください。凍結したライセートを使用しないようにしてください。 ライセートに適切なプロテアーゼインヒビターを用いるか、濃度を上げて FLAG 融合タンパク質の分解を抑えてください。
	洗浄条件が厳しすぎる	<ul style="list-style-type: none"> 洗浄回数を減らしてください。 バッファーへの高濃度の NaCl の添加を避けてください。 界面活性剤の濃度が低い、または含まない溶液を使用してください。
	インキュベーション時間が不適切である	<ul style="list-style-type: none"> 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 (数時間からオーバーナイト)。
	サンプル中に阻害物質が存在する	<ul style="list-style-type: none"> 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またはその他の還元剤を含むライセートは抗体の機能を壊す可能性があるので、避ける必要があります。 高すぎる界面活性剤濃度は、抗体-抗原相互作用を阻害する可能性があります。バッファー中の界面活性剤の濃度を希釈によって下げることができます。
バックグラウンドが高すぎる	検出システムが不適切である	<p>ウェスタンブロッティングによる検出の場合:</p> <ul style="list-style-type: none"> 一次抗体および二次抗体の結合および反応性を確かめるために、適切なコントロールを用いてチェックしてください。 ポンソーアガロースで膜を染色することにより、タンパク質の転写が適切かを確認してください。 新鮮な検出基質を使用するか、異なる検出システムを試してください。
	タンパク質が抗 FLAG モノクローナル抗体、レジンビーズまたはマイクロ遠心チューブに非特異的に結合している	<ul style="list-style-type: none"> 非特異的に結合するタンパク質を除くために Mouse IgG-Agarose (A0919) を用いてライセートをプレクリアーハーしてください。 最後の洗浄のためにビーズを懸濁した後、遠心分離前にサンプルを全て別のマイクロ遠心チューブに移してください。
	洗浄が不十分である	<ul style="list-style-type: none"> 洗浄回数を増やしてください。 洗浄時間を長くし、洗浄ごとに少なくとも 15 分間はインキュベートしてください。 洗浄溶液中の塩濃度と界面活性剤いずれか、もしくは両方の濃度を高くしてください。 アフィニティーレジン複合体の最初の遠心分離時にライセート由来の変性したタンパク質の非特異的な結合を避けるために低速度で遠心してください。

参考文献

- Brizzard, B.L., et al., *BioTechniques*, **16**, 730 (1994).
- Knappik, A., and Pluckthun, A., *BioTechniques*, **17**, 754 (1994).
- Chiang, C.M., and Roeder, R.G., *Pept. Res.*, **6**, 62 (1993).
- Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel F.M., et al. (John Wiley and Sons Inc., NY, 1998), pp. 10.15.1-10.16.29
- Antibodies, A Laboratory Manual*, Harlow, E. and Lane, D. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1988), pp. 514-517, 541-542, 547-549

TRITON は Union Carbide Corp. の商標です。
 TWEEN は Uniqema (ICI Americas, Inc. の部門) の登録商標です。
 IGEPAL は Rhone-Poulenc AG Co. の登録商標です。
 Hamilton は Hamilton Co. の登録商標です。
 Coomassie は Imperial Chemical Industries, Ltd. の登録商標です。
 ベンゾナーゼは Merck KGaA の登録商標です。

RM,DJ,CMH,KAT 12/05-1

上記の製品および、またはその用途は、以下の特許によって保護されています: US 5,011,912, US 4,703,004, US 4,782,137, US 4,851,341, EP 150126, EP 335899, JP 1983150, JP 2665359, CA 1307752。上記の製品の使用権は各製品に添付されている使用許諾書（ご要望があればお届けします）の条項に準拠します。FLAG® および 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™, FLAG-BAP™ の各製品の名称は Sigma-Aldrich Biotechnology LP の商標です。

使用許諾

同封の DNA 発現ベクターや抗体は、Sigma-Aldrich Co. が保有する以下のいずれかまたは複数の特許で保護されている、特定のタンパク分子を生成する手法で使用するためのものです（米国特許第 5,011,912, 4,703,004, 4,782,137, 4,851,341 号; EP 特許第 150,126 号（オーストリア、ベルギー、スイス、フランス、英国、イタリア、オランダ、スウェーデン）; EP 特許第 335,899 号（ベルギー、スイス、ドイツ、フランス、英国、イタリア、ルクセンブルグ、スウェーデン）; ドイツ特許第 P3584260.1 号; カナダ特許第 1,307,752 号; 日本特許第 1,983,150, 2,665,359 号）。代金には、これらの特許に基づいた限定ライセンスが含まれており、これらの製品の使用は下記の用途に限られています。

A. ベクターライセンス: 同封のベクターを用いて、研究目的で細胞を形質転換しアミノ酸配列 DYKDDDDK を含有するタンパクを生成できます。ただし、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除くものとします。

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に準拠して、研究目的において同封の抗体を使用し、タンパクを宿主細胞で発現させて抗体で精製するタンパク生成法を実施することができます。(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のうえ、ベクターや抗体の入った容器を開封してください。容器を開封された場合、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されない場合、未開封の容器を Sigma-Aldrich Co. に返送してください。料金を全額返金いたします。

追加のライセンス情報や前述の特許のコピー入手するには、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。収載の品目、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。