

MJS002V2 Protein G-Magnetic Beads

PRODUCT DESCRIPTION

Protein G-Magnetic Beads are well-designed magnetic microparticles for bioseparation such as immunoprecipitation and antibody purification. Their surfaces are covered with a JSR Life Sciences proprietary hydrophilic polymer and chemically conjugated Protein G, which specifically binds to the F_C moiety of Immunoglobulin. These chemistries enable you to perform a high yield and low non-specific binding bioseparation in a simple way.

FEATURES

- Uniform particle size
- Superparamagnetic
- Rapid magnetic responsiveness
- High IgG capacity
- Low non-specific binding

EXAMPLE APPLICATIONS

Immunoprecipitation(Protein, Chromatin), Antibody purification

SPECIFICATIONS

Package volume	10 mL
Solid content in slurry	1% (6 x 10 ⁸ beads/mL approx.)
Dispersion media	TBS* + 0.05% Tween20 + 0.09 % Sodium Azide
Bead diameter	3 μm (micrometer)
Bead magnetite content	20% approx.
IgG capacity	7 μg/mg bead approx. (In case of Mouse IgG)
Shelf life	Labeled on the bottle
*TBS: Tris buffered saline,	25 mM Tris-HCl (pH 7.2)/0.15 M NaCl

STORAGE

Protein G-Magnetic Beads are stable for 24 months when stored at 2-8 °C. Do not freeze the vial. Vortex the vial or pipette gently up and down to obtain a homogeneous dispersion before use

DISPOSAL

Reagent contains sodium azide at a low concentration as a preservative. Sodium azide is toxic if ingested and may react with heavy metals to form explosive metal azides. Azide compounds should be diluted with running water before discarding to avoid deposits in plumbing where explosive condition may develop.

RECOMMENDED PROTOCOLS

Protocol I & II for antibody binding onto **Protein G-Magnetic Beads**. (Preparation for Immunoprecipitation)

Protocol-1 (w/o IgG Cross-linking) may have an advantage in terms of maintaining antibody activity.

In case you need to avoid co-elution of your antibody, please try Protocol-2 (Cross-linking). The optimal condition may depend on the nature of your antibody.

[Protocol I] IgG Binding without Cross-linking

Reagent and equipment requirement

Binding Buffer	: Citrate-Phosphate buffer (pH5.0) with 0.1% Tween 20
Washing & Storage Buffer	: TBS-T (25 mM Tris-HCl, pH7.2, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20)
Equipment	: Magnetic separator. Vortex tube mixer. Tube rotator.

1. Suspend the **Protein G-Magnetic Beads** well using Vortex mixer and put 1 mL of the suspension (i.e., 10 mg beads) into a microtube.
2. Place the tube on a magnetic separator for 1 minute (or longer if needed) and remove the supernatant carefully.
3. Add 1 mL of Binding Buffer and suspend the beads by vortexing. Then, remove the supernatant as in step 2.
4. Add 100 μL of Binding Buffer and 100 μg of IgG solution (100 μL, if antibody was diluted to 1 mg/mL) and suspend the beads by vortexing.
5. Keep rotating the tube using a tube rotator for 30 minutes at room temperature.
6. Remove the supernatant as in step 2.
7. Add 1 mL of Washing Buffer and suspend them by vortexing.
8. Repeat steps 6 & 7 again. Then, remove the supernatant as in step 2.
9. Suspend the beads with Washing & Storage Buffer or a desired buffer suitable for downstream applications and store at 2-8°C until needed.

[Protocol II] IgG Binding with Cross-linking

Reagent and equipment requirement

Binding Buffer	: Citrate-Phosphate buffer (pH 5.0) with 0.1 % Tween 20
Cross-link Buffer	: 0.2 M Triethanolamine (pH 8.2, Adjusted with HCl(aq.))
Cross-link Reagent	: 20 mM DMP; prepared just before the cross-linking reaction (DMP: Dimethyl pimelimidate-2HCl, Thermo Fisher Scientific Inc.)
Stop Solution	: TBS (25 mM Tris + 0.15 M NaCl, pH 7.2)
Washing & Storage Buffer	: TBS-T (25 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20)
Equipment	: Magnetic separator. Vortex tube mixer. Tube rotator.

1. Follow the same procedure found in Protocol I steps 1~6.
2. Add 1 mL of Cross-link Buffer and suspend the beads by vortexing. Then, place the tube on a magnetic separator for 1 minute (or longer if needed) and remove the supernatant carefully. Repeat this step twice.
3. Add 1 mL of Cross-link Reagent and suspend the beads by vortexing.
4. Keep rotating the tube using a tube rotator for 30 minutes at room temperature.
5. Place the tube on magnetic separator for 1 minute and remove the supernatant carefully.
6. Add 1 mL of Stop Solution and suspend the beads by vortexing.
7. Keep rotating the tube using a tube rotator for 30 minutes at room temperature.

8. Remove the supernatant as in step 5.
9. Add 1 mL of Washing Buffer and suspend them by vortexing.
10. Repeat steps 8 & 9 again. Then remove the supernatant as in step 5.
11. Suspend the beads with Washing & Storage Buffer or a desired buffer suitable for downstream applications and store at 2-8 °C until needed.

Protocol III for Immunoprecipitation (IP)

Antibody conjugated beads prepared from Protocol I and Protocol II above are applicable to the following immunoprecipitation protocol.

[Protocol III] Immunoprecipitation of Target Protein

Reagent and equipment requirement

Specimen	: Cell lysate, Serum (10-5,000 µg-protein/mL)
IP Washing Buffer	: 20 mM HEPES(pH 7.9) + 10 v/v% glycerol + 0.5 M KCl + 0.1 % NP-40 + 0.1 mM EDTA
Eluent	: 0.5% Sodium dodecyl sulfate or a desired acid solution suitable for downstream applications
Equipment	: Magnetic separator. Vortex tube mixer. Microtube shaker.

1. Suspend the antibody conjugated **Protein G-Magnetic Beads** well using Vortex mixer and put the 1mg beads (100 µL, if the beads were stored at 10 mg/mL) into a microtube.
2. Place the tube on magnetic separator for 1 minute and remove the supernatant carefully.
3. Add your specimen (20~1000 µL) and suspend the beads by vortexing.
4. Incubate the beads for 30 minutes at room temperature with gentle mixing.
5. Remove the supernatant as in step 2.
6. Add 1 mL of IP Washing Buffer and suspend the beads by vortexing.
7. Repeat steps 5 & 6 for a total of 3 times.
8. Transfer the suspension to a clean tube.
9. Remove the supernatant as in step 2.
10. Add 20 µL of Eluent and suspend the beads by vortexing.
11. Incubate the beads for 10 minutes at room temperature with gentle mixing.
12. Place the tube on a magnetic separator for 1 minute and transfer the eluate to a clean tube.

[Protocol IV] antibody purification

Antibodies like Human IgG, Mouse IgG, Rabbit IgG and so on, which specifically bind to Protein G, can be extracted from your specimen by the following protocol.

Reagent and equipment requirement

Specimen	: Serum
Washing Buffer-1	: Citrate buffer (pH 5.0) + 0.01% Tween 20
Eluent	: Citric acid (pH 2.0)
Washing Buffer-2	: 0.5 M Phosphate buffer (pH 8.0)
Equipment	: Magnetic separator. Vortex tube mixer. Microtube shaker.

1. Suspend the **Protein G-Magnetic Beads** well using a Vortex mixer and put 100 µL of the suspension (i.e., 1 mg beads) into a microtube.
2. Place the tube on magnetic separator for 1 minute and remove the supernatant carefully.
3. Add 1 mL of Washing Buffer-1 and suspend the beads by vortexing.
4. Remove the supernatant as in step 2.
5. Repeat steps 3 & 4 again.
6. Add 200 µL of Specimen and suspend the beads by vortexing.
7. Keep shaking the tube using a Microtube shaker for 20 minutes at room temperature.
8. Remove the supernatant as in step 2.
9. Add 1 mL of Washing Buffer-1 and suspend them by vortexing.
10. Repeat steps 8 & 9 again. Then remove the supernatant as in step 2.
11. Add 100 µL of Eluent and suspend the beads by vortexing.
12. Keep shaking the tube using a Microtube shaker for 20 minutes at room temperature.
13. Place the tube on a magnetic separator for 1 minute and transfer the eluted protein to a clean tube.

In some cases, Protein G beads can be regenerated and reused by the following steps;

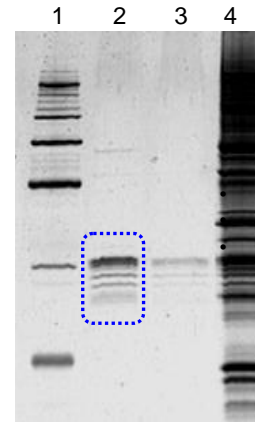
14. Wash the beads using 1 mL of Washing Buffer-1 and remove the supernatant.
15. Wash the beads using 1 mL of Washing Buffer-2 and remove the supernatant.
16. Suspend the beads with 1 mL of Washing Buffer-1 and return to the step 3.

EXPERIMENTAL EXAMPLE

[Example I] Immunoprecipitation

Immunoprecipitation of 20S proteasome complex from Jurkat cell lysate
Anti-20S proteasome alfa6 monoclonal antibody (Biomol International, L.P, Clone MCP20) was coupled onto **Protein G-Magnetic Beads** through **Protocol II**.

Immunoprecipitation was performed through **Protocol III**.



Lane 1 Molecular weight marker
Lane 2 IP product using **Protein G-Magnetic Beads**
Lane 3 IP product using competitor-A's magnetic beads
Lane 4 IP product using competitor-B's magnetic beads

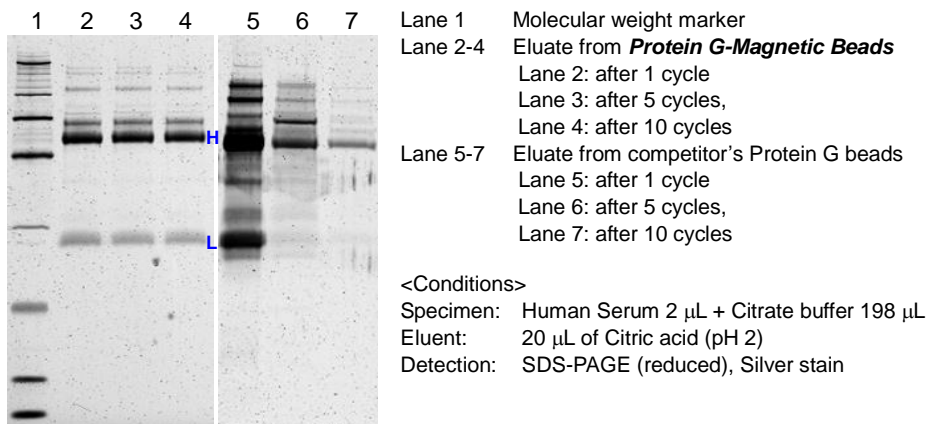
<Conditions>

Specimen: Jurkat cell lysate 100µL (30µg protein)
Elution: 20 µL of 0.5% Sodium dodecyl sulfate
Detection: SDS-PAGE (reduced), Silver stain

By using **Protein G-Magnetic Beads**, subunits (alfa1- alfa7, beta1- beta7) of 20S proteasome complex were isolated with high purity from the cell lysate (lane 2, *inside dotted frame*). In comparison, competitor's Protein G magnetic beads resulted in low yield (lane 3) or low purity (lane 4) under the same experimental condition.

[Example II] Antibody purification

Human IgG was extracted from human serum by using **Protein G-Magnetic Beads** through **Protocol IV**:



By using **Protein G-Magnetic Beads**, human antibody was isolated with high purity from the human serum (Lane 2). Recycled beads also showed almost the same performance (Lane 3, 4).

IMPORTANT NOTICE

This product is for research use only and not intended for therapeutic or *in vivo* diagnostic use.
The specificity of this product may change without notice.
JSR Life Sciences Corporation does not guarantee that this product will be continuously available.
JSR Life Sciences Corporation makes no warranties as to this product including, but not limited to, implied warranties of merchantability or fitness for a particular purpose.

This product has used Protein G-Magnetic Beads manufactured by JSR Corporation. Magnosphere™ is a trademark of JSR Corporation.



MJS002V2 Protein G-Magnetic Beads

Protein G-Magnetic Beads はバイオセパレーション開発用の高機能磁性粒子です。粒子表面は独自開発の親水性ポリマーでコーティングされており、さらに、免疫グロブリンの Fc 部位との結合性を有する Protein G が化学結合にて固定化されています。タンパク質の非特異吸着が極限にまで抑制された粒子表面と Protein G の特性により、抗体を用いた標的タンパク質の免疫沈降や、夾雑物中に含まれる抗体の精製など、様々なバイオセパレーション用途へ適用することが可能です。

<特徴>

- 均一粒子径
- 超常磁性
- 高速な磁気応答性
- 高い抗体結合量
- 低非特異吸着

<用途例>

免疫沈降(タンパク質、クロマチン)、抗体精製

<製品仕様>

粒子径	3 μm
内容量	10 mL
固形分濃度	1% (10 mg/mL)
分散媒	TBS + 0.09% Na ₃ N + 0.05% Tween 20 ・TBS: Tris buffered saline; 25mM Tris-HCl pH7.2/0.15M NaCl
磁性体含量	約 20 重量%
マウス IgG 結合量	約 7 μg/mg beads
使用期限	製品ラベルに表示

<保存方法>

冷蔵保存 (2-8°C)。凍らせないでください。使用前によく分散してお使い下さい。

<廃棄>

アジ化ナトリウム (Na₃N) は、金属と反応して爆発性の高い金属アジドを生成することがあります。廃棄の際は大量の水とともに洗い流してください。

<推奨プロトコル>

粒子担体への抗体結合 (免疫沈降の準備)

下記プロトコル I は架橋剤を用いない一般的な処方です。抗体の活性は損なわれませんが、免疫沈降に適用した場合、目的物質と共に抗体が溶出液に溶出されます。抗体の溶出を防ぎたい場合には架橋剤を用いるプロトコル II をお試しください。

【プロトコル I】架橋剤を用いない抗体の結合法

必要な試薬・器具

Binding Buffer : クエン酸-リン酸 Buffer (pH5.0)/0.1% Tween 20

Washing & Storage Buffer : TBS-T (TBS/0.05% Tween 20)

装置 : 磁気スタンド、Vortex ミキサー、チューブローテーター

1. **Protein G-Magnetic Beads** を Vortex ミキサーでよく分散後、1 mL の粒子分散液をマイクロチューブに取る(粒子 10 mg 相当)。
2. マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
3. 1 mL の Binding Buffer をマイクロチューブに加え、Vortex ミキサーで分散させた後、マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
4. 操作 3. のマイクロチューブへ 100 μL の Binding Buffer と 100 μg の IgG を含む溶液(抗体濃度が 1 mg/mL の場合; 100 μL) とを加え、Vortex ミキサーで分散する。
5. 30 分間、室温下でマイクロチューブをチューブローテーターで攪拌する。
6. マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
7. 1 mL の Washing Buffer を加え、Vortex ミキサーを用いて粒子を洗浄する。
8. 操作 6., 7. の工程をもう一度繰り返した後、マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
9. Storage Buffer または以降の実験に適した Buffer をマイクロチューブに加え、Vortex ミキサーで粒子を分散する。分散液は 2~8°C で保存する。

【プロトコル II】: 架橋剤を用いた抗体の結合法

必要な試薬・器具

Binding Buffer : クエン酸-リン酸 Buffer (pH5.0)/0.1% Tween20

Cross-link Buffer : 0.2 M トリエタノールアミン (塩酸にて pH8.2 に調整)

Cross-link Reagent : 20 mM DMP (Dimethyl pimelimidate-2HCl/Cross-link Buffer)
*架橋反応の直前に調製のこと。

Stop Solution : TBS

Washing & Storage Buffer : TBS-T (TBS/0.05% Tween 20)

装置 : 磁気スタンド、Vortex ミキサー、チューブローテーター

1. プロトコル I 記載の操作 1.~6.と同じ操作を行う。
2. 1 mL の Cross-link Buffer を加えて粒子を洗浄する。この操作を 2 回行う。上清除去の際は、マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットしてから行う。
3. 1 mL の Cross-link Reagent を加え Vortex ミキサーで分散する。
4. 30 分間、室温下でマイクロチューブをチューブローターで攪拌する。
5. マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
6. 1 mL の Stop Solution を加え、Vortex ミキサーで分散する。
7. 30 分間、室温下でマイクロチューブをチューブローターで攪拌する。
8. マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
9. 1 mL の Washing Buffer を加え、Vortex ミキサーを用いて粒子を洗浄する。
10. 操作 8., 9.の工程をもう一度繰り返した後、マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
11. Storage Buffer または以降の実験に適した Buffer をマイクロチューブに加え、Vortex ミキサーで粒子を分散する。分散液は 2~8°C で保存する。

免疫沈降法

上記プロトコル I、II で作製した抗体結合粒子は、以下の免疫沈降プロトコルへ適用可能です。

【プロトコル III】 標的タンパク質の免疫沈降

必要な試薬・器具

試料	: 細胞破碎液、血清 (10-5,000 µg-protein/ mL)
IP Washing Buffer	: 20 mM HEPES (pH 7.9) / 10 v/v% glycerol + 0.5 M KCl / 0.1% NP-40 / 0.1 mM EDTA
溶出液	: 0.5% SDS または以降の実験に適した Buffer
装置	: 磁気スタンド、Vortex ミキサー、マイクロチューブシェーカー

1. 抗体を結合させた **Protein G-Magnetic Beads** を Vortex ミキサーでよく分散後、1 mg 分をマイクロチューブに取る (10 mg/mL 分散液の場合; 100 µL)。
2. マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
3. マイクロチューブへ試料 (20~1,000 µL) を加え、Vortex ミキサーで分散する。
4. 30 分間、室温下でマイクロチューブを穏やかに攪拌する。
5. マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
6. 1 mL の IP Washing Buffer を加え、Vortex ミキサーで粒子を洗浄する。
7. 操作 6., 7.の工程をさらに 2 回行う。
8. 粒子分散液を新しいマイクロチューブに移し変える。
9. マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
10. 20 µL の溶出液を加え Vortex ミキサーで粒子を分散する。
11. 10 分間、室温下でマイクロチューブを穏やかに攪拌する。
12. マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、分離した上清 (溶出液) を新しいマイクロチューブに回収する。

抗体の精製

Protein G-Magnetic Beads を用いれば、ヒト IgG、マウス IgG、ウサギ IgG のような Protein G と特異的に結合する性質を有する抗体を精製することができます。

【プロトコル IV】 抗体の精製

必要な試薬・器具

試料: 血清

Washing Buffer①	: クエン酸 Buffer (pH 5.0)/0.01% Tween 20
溶出液	: クエン酸 (pH2.0)
Washing Buffer②	: 0.5 M リン酸 Buffer (pH8.0)
装置	: 磁気スタンド、Vortex ミキサー、マイクロチューブシェーカー

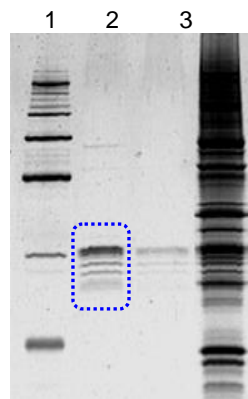
1. **Protein G-Magnetic Beads** を Vortex ミキサーでよく分散後、100 µL の粒子分散液をマイクロチューブに取る (粒子 1 mg 相当)。
2. マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
3. Washing Buffer① を 1 mL チューブに加え、Vortex ミキサーで分散する。
4. マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
5. 操作 3., 4.の工程をもう一度繰り返す。
6. マイクロチューブへ 200 µL の試料を加え、Vortex ミキサーで分散する。
7. 20 分間、室温下でマイクロチューブを穏やかに攪拌する。
8. マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、上清を除去する。
9. 1 mL の Washing Buffer① を加え、Vortex ミキサーで粒子を洗浄する。
10. 操作 8., 9.の工程をもう一度繰り返す。
11. 100 µL の溶出液を加え、Vortex ミキサーで粒子を分散する。
12. 20 分間、室温下でマイクロチューブを穏やかに攪拌する。
13. マイクロチューブを磁気スタンドに約 1 分間セットし、分離した上清 (溶出液) を新しいマイクロチューブに回収する。

続けて以下の操作を行えば、Protein G 粒子を再利用できる場合がある。

14. 粒子を 1 mL の Washing Buffer① で洗浄し、上清を除去する。
15. 粒子を 1 mL の Washing Buffer② で洗浄し、上清を除去する。
16. 1 mL の Washing Buffer① を加え、粒子を分散する。操作 3.に戻る。

<使用例>

【使用例 1】Jurkat cell lysate からの 20S プロテアソームの免疫沈降



プロトコル II に従って **Protein G-Magnetic Beads** に抗 20S プロテアソーム $\alpha 6$ モノクローナル抗体 (Enzo Life Sciences International, Inc., クローン: MCP20) を固定化した。続いて、プロトコル III に従って免疫沈降を行った。

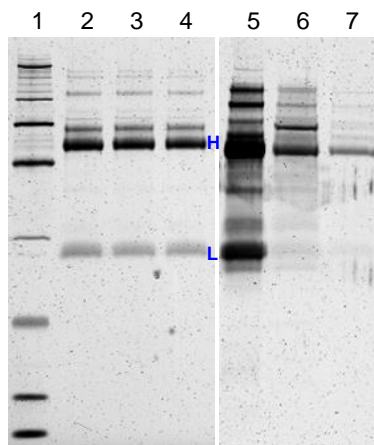
レーン 1 分子量マーカー
レーン 2 **Protein G-Magnetic Beads** からの免疫沈降物
レーン 3 A 社製 Protein G 磁性粒子からの免疫沈降物
レーン 4 B 社製 Protein G 磁性粒子からの免疫沈降物

<評価条件>

試料: Jurkat cell lysate 100 μ L (30 μ g protein)
溶出: 0.5% SDS 20 μ L
検出: SDS-PAGE (還元), 銀染色

Protein G-Magnetic Beads を用いて、細胞破碎液中の 20S プロテアソーム複合体 ($\alpha 1 \sim \alpha 7$, $\beta 1 \sim \beta 7$) が高純度で回収できた (レーン 2 の点線内)。一方、他社製 Protein G 磁性粒子を使用した場合は、標的の回収量が少ないか (レーン 3)、あるいは純度が低かった (レーン 4)。

【使用例 2】抗体の精製



プロトコル IV に従って、ヒト血清からのヒト IgG の精製を行なった。

レーン 1 分子量マーカー
レーン 2~4 **Protein G-Magnetic Beads** 溶出物
レーン 2: 1 サイクル目
レーン 3: 5 サイクル目 (粒子再利用)
レーン 4: 10 サイクル目 (粒子再利用)
レーン 5~7 他社製 Protein G 磁性粒子からの溶出物
レーン 5: 1 サイクル目
レーン 6: 5 サイクル目 (粒子再利用)
レーン 7: 10 サイクル目 (粒子再利用)

<評価条件>

試料: ヒト血清 2 μ L + クエン酸 Buffer 198 μ L
溶出: 20 μ L クエン酸 (pH 2)
検出: SDS-PAGE (還元), 銀染色

Protein G-Magnetic Beads を用いて、ヒト血清から高純度の IgG が回収できた (レーン 2)。粒子を再生処理し、再利用した場合でもほぼ同等の結果が得られた (レーン 3, 4)。

<注意>

- 本製品は研究用試薬ですので、研究用以外の目的にはご使用にならないください。
- 製品の仕様等は予告なく変更されることがあります。
- 製品の使用に当たっては、用途に対する法規制、および用途への適合性、安全性等を試験・確認ください。

本製品には JSR ライフサイエンス (株) 製の Protein G-Magnetic Beads が用いられています。Magnosphere™ は JSR ライフサイエンス (株) の登録商標です。

JSR Life Sciences
MATERIALS INNOVATION