

Ubiquitin Monobody IP Beads & Buffer Kit

For research use only

Cat. No. CSR-MB-001-SAB

Updated on August. 27th, 2025

www.cosmobiousa.com

Note: This product requires the separately sold Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin (Cat. No. MB-001-B) for use.

【 I 】 Introduction

This product is a dedicated support kit designed to simplify and enhance the efficiency of immunoprecipitation (IP) using Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin (Cat. No. MB-001-B). It includes streptavidin magnetic beads, along with a set of buffers optimized for each step of the workflow, including lysate preparation, monobody immobilization, capture of ubiquitinated proteins, washing, and elution.

The Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin binds to ubiquitinated proteins regardless of ubiquitin chain length or linkage type, making it well suited for a range of downstream applications, including Western blot and proteomic analyses. Furthermore, because the amino acid sequence of ubiquitin is highly conserved across species, immunoprecipitation using Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin is applicable to a wide range of organisms.

A notable feature of this kit is its use of FG beads®—streptavidin magnetic beads coated with poly(glycidyl methacrylate). As a result, nonspecific adsorption, which is often problematic with conventional beads, is minimized, enabling the high-purity, low-background recovery of ubiquitinated proteins.

【 II 】 Kit Components

Storage temperature: 4 °C
Number of assays: 20 (based on the usage described in the protocol)
Handling precautions: When handling this product, wear appropriate personal protective equipment such as safety glasses and gloves, and avoid direct contact with skin or eyes.

Contents	Vol	Qty	Remarks
Streptavidin Magnetic Beads	50 µL	1 vial	FG beads® (Tamagawa Seiki Co., Ltd., Cat. No. TAS8848N1170)
Monobody Immobilization Buffer (1x)	1.5 mL	1 vial	
Lysis/Wash Buffer (2x, pH 7.5)	30 mL	1 vial	This buffer contains 1 mM EDTA, 2% IGEPAL® CA-630, and 20% glycerol.
SDS Elution Buffer (4x, pH 6.8)	0.5 mL	1 vial	This buffer has a general composition suitable for SDS-PAGE with Tris-Glycine gels.
LDS Elution Buffer (4x, pH 8.5)	0.5 mL	1 vial	This buffer has a general composition suitable for SDS-PAGE with Bis-Tris gels.

【 III 】 Additional Materials Required

- Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin (e.g., Cosmo Bio Co., Ltd. MB-001-B)
- Cell or tissue samples
- Magnetic Stand
- Rotary mixer (end-over-end type)
- Vortex mixer
- Ultrasonic disruptor (e.g., Bioruptor, Cosmo Bio Co., Ltd., UCD-250HSA or equivalent)
- Microcentrifuge (for $\geq 12,000 \times g$ and spin-down steps) and 1.5 mL microcentrifuge tubes
- PBS (phosphate-buffered saline)
- Protease inhibitor cocktail
- Reducing agents (e.g., 2-mercaptoethanol, DTT)

【 IV 】 Buffer Preparation

1. Monobody Immobilization Buffer

The supplied Monobody Immobilization Buffer (1x) is ready to use as is.

2. Lysis Buffer

Immediately before use, prepare a 1x Lysis Buffer by adding purified water and an appropriate protease inhibitor cocktail to the supplied Lysis/Wash Buffer (2x).

Select a protease inhibitor cocktail appropriate for your sample type.

In addition to general protease inhibitors, the following additives may also be effective:

- MG-132 (proteasome inhibitor; final concentration: 10 μ M)
- PR-619 (deubiquitinating enzyme [DUB] inhibitor; final concentration: 10 μ M)
- Iodoacetamide (DUB inhibitor; final concentration: 10 mM)

Note: These inhibitors are not included in this kit.

3. Wash Buffer

Prepare a 1x Wash Buffer by diluting the supplied Lysis/Wash Buffer (2x) with purified water.

4. Elution Buffer

Select an appropriate elution buffer according to the intended downstream application.

If performing SDS-PAGE, prepare the elution buffer as follows:

- **When using Tris-Glycine gels:**

Immediately before use, prepare a 1x elution buffer by adding purified water and a reducing agent (e.g., 0.1 M DTT final concentration) to the supplied **SDS Elution Buffer (4x, pH 6.8)**.

- **When using Bis-Tris gels:**

Immediately before use, prepare a 1x elution buffer by adding purified water and a reducing agent (e.g., 0.1 M DTT final concentration) to the supplied **LDS Elution Buffer (4x, pH 8.5)**.

Note: Anti-Pan Ubiquitin Monobody exhibits high affinity for ubiquitin ($K_d = 0.88$ nM), and the Monobody-immobilized beads (see below) bind polyubiquitin chains in a multivalent manner. As a result, acidic buffers such as Glycine-HCl or TFA may not be effective for eluting ubiquitinated proteins. If acidic conditions are to be used, please verify their suitability in advance.

【 V 】 Sample Preparation

Using the lysis buffer included in this kit, lysates can be prepared from cells or tissues of various species. For adherent mammalian cells, please refer to the procedure described below. For other biological samples, consult relevant literature to determine an appropriate preparation method.

As a general guideline, 50 μ L of cleared lysate at a concentration of 1 mg/mL is used per assay.

※ For samples that contain interfering substances—such as green plant tissues—perform cleanup (e.g., gel filtration) as needed before measuring protein concentration.

Preparation of Clear Lysate from Adherent Mammalian Cells (e.g., HCT116)

- ① Prepare cells cultured to a sub-confluent state in a 10 cm dish.
Note: A total protein yield of approximately 1–2.5 mg is typically obtained from one 10 cm dish.
- ② Remove the culture medium and wash the cells twice with 10 mL of PBS.
- ③ Add 1 mL of PBS, gently detach the cells using a cell scraper, and transfer the suspension to a 1.5 mL tube.
- ④ Centrifuge at $200 \times g$ for 3 min at 4 °C.
Resuspend the pellet in 0.5 mL of PBS, centrifuge again under the same conditions, and discard the supernatant.
- ⑤ Add 200 μ L of lysis buffer and resuspend thoroughly. Fragment the genomic DNA by sonication (e.g., 350–380 W, 10 s ON / 30 s OFF, 20 cycles).
- ⑥ Incubate the lysate on ice for 30 min, then centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 10 min at 4 °C.
Collect the supernatant as the clear lysate.
- ⑦ Measure the protein concentration and dilute with lysis buffer if necessary.
Note: Prepared clear lysates can typically be stored at –70 °C or below for several months. However, we recommend confirming storage stability in advance depending on the sample type and intended application.

【 VI 】 Preparation of Monobody-Immobilized Beads

Caution: When working with small liquid volumes, bead loss and pipetting errors are more likely to occur. To ensure consistent results, **always prepare Monobody-immobilized beads in batches for 10 assays.**

Reagent volumes per 10 assays:

- Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin (sold separately): 30 μ L (equivalent to 15 μ g)
- Streptavidin Magnetic Beads (included): 25 μ L (equivalent to 0.5 mg)

Note: At this loading, the monobody is nearly saturated on the beads.

- ① Vortex the streptavidin magnetic beads at medium speed for at least 30 seconds to ensure complete resuspension.
- ② Transfer 25 μ L of the bead suspension to a 1.5 mL tube.
- ③ Place the tube on a magnetic stand and let the beads fully separate. Then, carefully remove the supernatant, avoiding disturbance of the beads.
Note: FG beads are very small (0.2 μ m diameter) and highly dispersible, so separation may take several minutes.
- ④ Add 200 μ L of Monobody Immobilization Buffer to resuspend the beads, then perform a brief spin down and magnetic separation to remove the supernatant.
- ⑤ Add 70 μ L of Monobody Immobilization Buffer to resuspend the beads.
- ⑥ Add 30 μ L of Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin, and mix thoroughly by pipetting.
- ⑦ Incubate at 4°C for 1 hour at a moderate rotation speed using an end-over-end rotator.
Note: During incubation, occasionally check to ensure the beads are being adequately mixed, and adjust the rotation speed as needed. Temporary microaggregation may be observed after incubation, but it will naturally resolve during the immunoprecipitation reaction.
- ⑧ After incubation, perform a brief spin down and magnetic separation, then discard the supernatant (flow-through). If the supernatant is needed for downstream analysis or other purposes, transfer it to a separate tube for storage.
- ⑨ Add 500 μ L of Wash Buffer to resuspend the beads, then perform a brief spin down and magnetic separation to remove the supernatant.
Repeat this wash step a total of three times.
- ⑩ Finally, resuspend the beads in 200 μ L of Wash Buffer.
- ⑪ Store at 4 °C until use.
Note: The prepared monobody-immobilized beads are stable at 4 °C for at least one month, but we recommend using them as soon as possible.

【 VII 】 Immunoprecipitation Protocol

As initial conditions, we recommend using 50 μ L of clear lysate at 1 mg/mL per assay, followed by overnight incubation at 4 °C. These conditions are based on experiments using HCT116 cells and may be adjusted as needed depending on the sample type and experimental goals.

Please refer to section [III] Buffer Preparation and select an appropriate elution buffer according to your downstream application.

- ① Vortex the monobody-immobilized beads at medium speed for at least 30 seconds to ensure complete resuspension.
- ② Transfer 20 μ L (0.05 mg) of the bead suspension to a 1.5 mL microcentrifuge tube.
- ③ Place the tube on a magnetic stand to collect the beads, and carefully remove the supernatant.
- ④ Add 50–100 μ L of clear lysate and gently resuspend the beads by pipetting.
- ⑤ Incubate overnight at 4 °C with gentle rotation using an end-over-end rotator.
- ⑥ After incubation, perform a brief spin down and magnetic separation, then discard the supernatant (flow-through). If needed, transfer the supernatant to a separate tube for retention.
- ⑦ Add 200 μ L of Wash Buffer, vortex to resuspend, then perform a spin down and magnetic separation to remove the supernatant.
Repeat this wash step a total of three times. On the third wash, to prevent nonspecific proteins adsorbed on the inner wall from being carried over into the eluate, transfer the suspension to a new tube before magnetic separation.
- ⑧-A **If using Tris-Glycine gels:** Add 20–50 μ L of **SDS Elution Buffer**, gently resuspend the beads by pipetting, and heat at 95 °C for 5 minutes.
- ⑧-B **If using Bis-Tris gels:** Add 20–50 μ L of **LDS Elution Buffer**, gently resuspend the beads by pipetting, and heat at 70 °C for 10 minutes.
Note: The Anti-Pan Ubiquitin Monobody exhibits high affinity for ubiquitin ($K_d = 0.88$ nM), and the monobody-immobilized beads bind polyubiquitin chains multivalently.
Heat treatment is therefore essential for complete elution.
- ⑨ After spin-down, perform magnetic separation and transfer the supernatant (eluate) to a new tube. If necessary, centrifugation (e.g., $\geq 12,000 \times g$ for 1 min) can be used as an alternative to magnetic separation.
- ⑩ Use the eluted sample immediately or store at –20 °C for short-term storage. For long-term storage, –70 °C or lower is recommended.

【 VII 】 Example Application: Immunoprecipitation–Western Blotting (IP–WB)

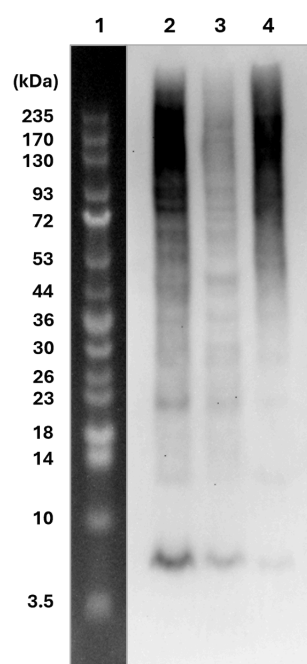


Figure 1. Immunoprecipitation Using Mammalian Cells

Lysate was prepared from untreated human HCT116 cells according to the protocol described in this datasheet. Immunoprecipitation was performed using monobody-immobilized beads with 50 μ L of lysate. Ubiquitinated proteins bound to the beads were eluted with 50 μ L of 1 \times LDS Elution Buffer. To evaluate the recovery efficiency of ubiquitinated proteins, the eluted fraction was diluted to match the volume of the lysate and flow-through fractions, and each sample was subjected to SDS-PAGE using a 4–12% Bis-Tris gel. The separated proteins were transferred onto a PVDF membrane and blocked with 3% skim milk. Ubiquitinated proteins were detected using a mouse monoclonal anti-ubiquitin primary antibody (P4D1, 1:1000 dilution) and an HRP-conjugated goat polyclonal anti-mouse IgG secondary antibody (1:2000 dilution), followed by ECL-based chemiluminescence detection.

Lane 1: Molecular weight marker

Lane 2: Lysate

Lane 3: Flow-through

Lane 4: Eluate

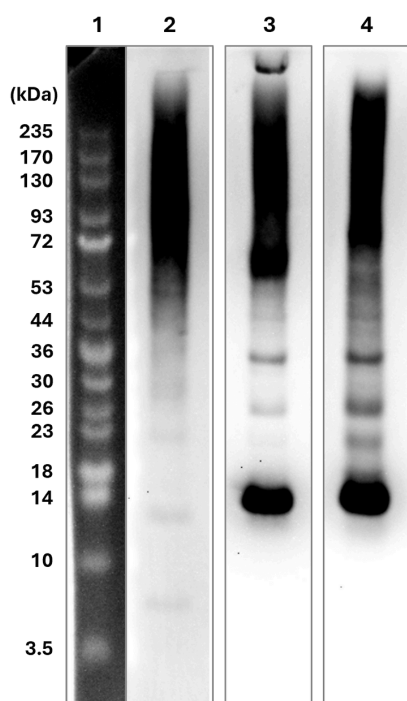


Figure 2. Comparison of Signal Patterns by Detection Method

Using eluted fractions obtained from the same immunoprecipitation assay as described in Figure 1, three PVDF blots were prepared, each employing a different combination of blocking reagent, primary antibody, and secondary reagent (see lane descriptions below). Ubiquitinated proteins were detected on each blot using the ECL method. Notably, in lanes 3 and 4, in addition to the ubiquitinated proteins, the Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin dissociated from the streptavidin beads was also detected (arrowhead), highlighting differences in signal patterns depending on the detection system.

Lane 1: Molecular weight marker

Lane 2: 3% skim milk / anti-ubiquitin mouse monoclonal antibody (P4D1, 1:1000 dilution) / HRP conjugated goat anti-mouse IgG polyclonal antibody (1:2000 dilution)

Lane 3: 3% BSA / Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin (1:5000 dilution) / HRP-conjugated anti-6xHis mouse monoclonal antibody (1:2000 dilution)

Lane 4: 3% BSA / Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin (1:5000 dilution) / HRP-conjugated streptavidin (1:5000 dilution)

【 VII 】 Example Application: IP-WB (continued)

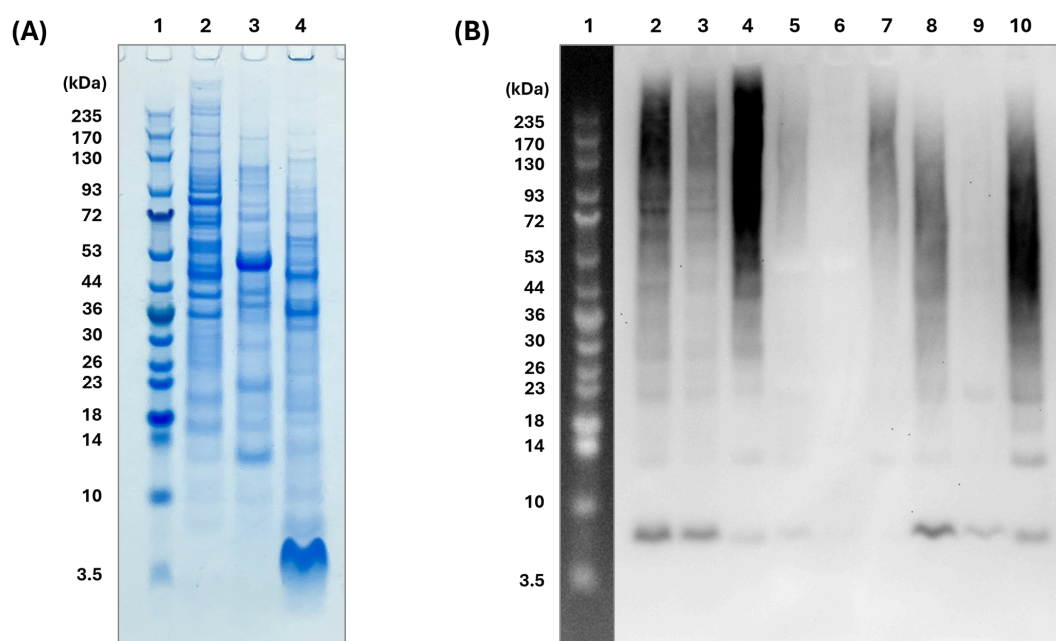


Figure 3. Broad Applicability Across Species

(A) Lysates were prepared using the lysis buffer included in this kit from human HCT116 cells (**Lane 2**), *Arabidopsis* leaves (**Lane 3**), and *Rhizopus* hyphae (**Lane 4**). For *Arabidopsis* and *Rhizopus*, lysates were pretreated by gel filtration prior to protein quantification. Each lysate was adjusted to 1 mg/mL, and 5 µg of protein was separated by SDS-PAGE followed by CBB staining. This allowed visual confirmation that the protein concentrations were approximately equivalent across the samples.

Lane 1: Molecular weight marker

(B) Immunoprecipitation, SDS-PAGE, and western blotting were performed following the same protocol as in Figure 1, except that no dilution was applied to the eluted fractions.

Lane 1: Molecular weight marker

Lanes 2-4: Lysate, flow-through, and eluate from human HCT116 cells

Lanes 5-7: Lysate, flow-through, and eluate from *Arabidopsis* leaves

Lanes 8-10: Lysate, flow-through, and eluate from *Rhizopus* hyphae

一般研究用キット

Ubiquitin Monobody IP Beads & Buffer Kit

ユビキチン免疫沈降用ビーズ & バッファークット

Cat. No. MB-001-SAB

2025年 8月 27日作成

www.cosmobio.co.jp

※ 本製品の使用には、別売のAnti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin（製品番号 MB-001-B）が必要です。

【I】 特長

本製品は、Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin（製品番号 MB-001-B）を用いて、簡便かつ高効率に免疫沈降（IP）を行うための専用サポートキットです。ストレプトアビジン磁気ビーズに加え、ライセート調製、モノボディの固相化、ユビキチン化タンパク質の捕捉、洗浄および溶出の各工程に最適化されたバッファーク群が同梱されています。

Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotinは、ユビキチン鎖の長さや結合様式に依存せずユビキチン化タンパク質に結合する特性を持つため、これを用いた免疫沈降は、ウェスタンブロット解析だけでなく、プロテオーム解析などの下流アプリケーションにも適しています。さらに、ユビキチンは生物種間でアミノ酸配列の保存性が極めて高いため、Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotinを用いた免疫沈降は、幅広い生物種に適用可能です。

また、本キットの特筆すべき特長は、ストレプトアビジン磁気ビーズとして、ポリ（グリシジルメタクリレート）でコーティングされたFGビーズ®を採用している点です。これにより、従来のビーズでしばしば問題となる非特異的吸着が極めて少なく、ユビキチン化タンパク質を高純度かつ低バックグラウンドで回収できます。

【II】 キット構成品

保存温度：4℃

想定使用回数：プロトコルに記載された使用量に基づき、20 アッセイ分

取り扱い上の注意：取り扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。

内 容	容量	数量	備考
ストレプトアビジン磁気ビーズ (Streptavidin Magnetic Beads)	50 µL	1 本	FG beads®（玉川精機株式会社 製品番号：TAS8848N1170）を使用しています。
モノボディ固定化バッファーク（1x） (Monobody Immobilization Buffer)	1.5 mL	1 本	
溶解/洗浄 バッファーク（2x, pH 7.5） (Lysis / Wash Buffer)	30 mL	1 本	このバッファークには、1 mM EDTA、2 % IGEPAL® CA-630、および 20 % グリセロールが含まれます。
SDS溶出バッファーク（4x, pH 6.8） (SDS Elution Buffer)	0.5 mL	1 本	Tris-Glycine ゲル用の一般的組成の SDS-PAGE サンプルバッファークです。
LDS溶出バッファーク（4x, pH 8.5） (LDS Elution Buffer)	0.5 mL	1 本	Bis-Trisゲル用の一般的組成の SDS-PAGE サンプルバッファークです。



【Ⅲ】ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin（コスモ・バイオ株式会社 MB-001-B）
- 細胞または組織サンプル
- 磁気スタンド
- ロータリーミキサー（エンドオーバーエンド式）
- ボルテックスミキサー
- 超音波破碎機（例：コスモ・バイオ株式会社 UCD-250HSA / Bioruptor）または同等品
- マイクロ遠心機（ $\geq 12,000 \times g$ 対応、およびスピンドウン工程用）および 1.5 mL マイクロチューブ
- PBS（リン酸緩衝生理食塩水）
- プロテアーゼ阻害剤カクテル
- 還元剤（例：2-メルカプトエタノール / DTT 等）

【Ⅳ】バッファの調製

1. モノボディ固定化バッファ

付属のモノボディ固定化バッファ（1x）をそのまま使用可能。

2. 溶解バッファ

使用直前に、付属の溶解／洗浄バッファ（2x）に精製水およびプロテアーゼ阻害剤カクテルを加え、全体が 1 x 濃度になるように調製します。

サンプルの種類に適したプロテアーゼ阻害剤カクテルを選択してください。

一般的なプロテアーゼ阻害剤に加え、以下の添加剤を使用することで効果が得られる場合があります：

- MG-132（プロテアソーム阻害剤、最終濃度 10 μ M）
- PR-619（脱ユビキチン化酵素 [DUB] 阻害剤、最終濃度 10 μ M）
- Iodoacetamide（DUB 阻害剤、最終濃度 10 mM）。

※ これらの阻害剤は本キットには含まれていません。

3. 洗浄バッファ

付属の溶解／洗浄バッファ（2x）を精製水で希釈し、1x 濃度に調製します。

4. 溶出バッファ

目的とする下流解析に応じて、適切な溶出バッファを選択します。

SDS-PAGEを行う場合は、下記の指示に従って溶出バッファを調製します。

• Tris-Glycineゲルを使用する場合：

使用直前に、付属の**SDS溶出バッファ（4x, pH 6.8）**に、精製水および還元剤（例：最終濃度 0.1 M DTT）を加え、全体が 1x 濃度になるように調製します。

• Bis-Trisゲルを使用する場合：

使用直前に、付属の**LDS溶出バッファ（4x, pH 8.5）**に、精製水および還元剤（例：最終濃度 0.1 M DTT）を加え、全体が 1x 濃度になるように調製します。

Anti-Pan Ubiquitin Monobody はユビキチンに高親和性 ($K_d = 0.88 \text{ nM}$) を示し、モノボディ固定化ビーズ（後述）はポリユビキチン鎖に多価的に結合します。そのため、Glycine-HCl や TFA などの酸性バッファでは、ユビキチン化タンパク質の溶出が困難な場合があります。酸性条件を使用する場合は、あらかじめ適合性をご確認ください。



【V】サンプルの準備

本キットの溶解バッファーを用いることで、さまざまな生物種の細胞や組織からライセートを調製できます。接着性哺乳類細胞については下記の手順を、その他の生物試料については文献等を参考にして適切な方法をご検討ください。

1 アッセイには、1 mg / mL のクリアライセートを 50 μ L 使用するのが目安です。

※ 緑色植物組織など、干渉物質を多く含む試料を使用する場合は、タンパク質濃度の測定前に、必要に応じてゲルろ過などによるクリーンアップを行ってください。

接着性哺乳類細胞（例：HCT116）からのクリアライセート調製手順

- ① 10 cm ディッシュにサブコンフルエントまで培養した細胞を用意します。
※ 通常、1 枚のディッシュから 1~2.5 mg の総タンパク質が得られます。
- ② 培地を除去し、10 mL の PBS で 2 回洗浄します。
- ③ PBS を 1 mL 加え、セルスクレーパーで細胞をやさしく剥がし、1.5 mL チューブに回収します。
- ④ 4°C、200 \times g で 3 分間遠心し、得られたペレットを 0.5 mL の PBS に再懸濁します。
同条件で再度遠心し、上清を除去します。
- ⑤ 溶解バッファーを 200 μ L 加えて完全に再懸濁した後、超音波処理によりゲノム DNA を断片化します。
(例：350 – 380 W、10 秒 ON / 30 秒 OFF、20 サイクル)
- ⑥ 氷上で 30 分間インキュベートした後、4°C、12,000 \times g 以上で 10 分間遠心し、
上清（クリアライセート）を回収します。
- ⑦ タンパク質濃度を測定し、必要に応じて溶解バッファーで希釈します。
※ 調製したクリアライセートは、-70°C 以下で数か月間保存可能です。
なお、下流の解析やサンプルの特性に応じて、保存中の安定性を事前に確認することを推奨します。

【VI】モノボディ固定化ビーズの調製

注意：操作時の液量が少ないと、ビーズのロスや分注誤差が生じやすくなります。

安定した結果を得るため、モノボディ固定化ビーズの調製は必ず 10 アッセイ分単位で行ってください。

使用量（10 アッセイ分あたり）：

- ・ Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin（別売）：30 μ L（15 μ g 相当）
- ・ ストレプトアビジン磁気ビーズ（付属）：25 μ L（0.5 mg 相当）

※ この使用量では、モノボディはビーズに対してほぼ飽和状態になります。

- ① ストレプトアビジン磁気ビーズを中速で 30 秒以上ボルテックスして十分に懸濁します。
- ② 25 μ L のビーズ懸濁液を 1.5 mL チューブに移します。
- ③ チューブを磁気スタンドに置いて、ビーズが完全に分離するまで静置します。
その後、ビーズを吸い上げないように注意して、上清を丁寧に除去します。
※ FG ビーズは非常に小さく（直径 0.2 μ m）分散性が高いため、磁気分離には数分間かかることがあります。
- ④ モノボディ固定化バッファを 200 μ L 加えてビーズを再懸濁し、スピンドウンと磁気分離を行って上清を除去します。
- ⑤ モノボディ固定化バッファを 70 μ L 加えて再懸濁します。
- ⑥ Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin を 30 μ L 加え、ピペティングで十分に混合します。
- ⑦ 4℃で 1 時間、エンドオーバーエンド式ロータリーミキサーを用い、中速回転でインキュベートします。
※ インキュベーション中は、ビーズが十分に攪拌されていることを確認しながら、必要に応じて回転速度を調整してください。インキュベーション後に一時的な微小凝集が見られることがありますが、免疫沈降反応中に自然に解消されます。
- ⑧ インキュベーション後、スピンドウンと磁気分離を行い、上清（フロースルー）を除去します。
上清を分析などに使用する場合は、別のチューブに回収して保存してください。
- ⑨ 洗浄バッファを 500 μ L 加えて再懸濁し、スピンドウンと磁気分離を行って上清を除去します。
この洗浄工程を合計 3 回繰り返します。
- ⑩ 最終的に洗浄バッファ 200 μ L に再懸濁します。
- ⑪ 使用まで 4℃で保存します。
※ 調製したモノボディ固定化ビーズは 4℃で少なくとも 1 か月間安定ですが、できるだけ早めの使用を推奨します。

【Ⅶ】免疫沈降プロトコル

初期条件として、1 アッセイあたり1 mg / mL のクリアライセートを 50 μ L 用い、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートすることを推奨します。これらの条件は HCT116 細胞を用いた実験結果に基づいて設定されていますが、サンプルの種類や実験目的に応じて適宜調整してください。

溶出バッファーについては、【Ⅳ】**バッファーの調製**の記載を参照のうえ、目的に適したものを選択してください。以下は、下流で SDS-PAGE を行う場合のプロトコルです。

- ① モノボディ固定化ビーズを中速で 30 秒以上ボルテックスし、十分に懸濁します。
 - ② 20 μ L (0.05 mg) のビーズ懸濁液を 1.5 mL マイクロチューブに移します。
 - ③ チューブを磁気スタンドに置いてビーズを分離し、上清を丁寧に除去します。
 - ④ クリアライセートを 50~100 μ L を加え、ピペッティングでビーズを再懸濁します。
 - ⑤ 4 $^{\circ}$ C で一晩、エンドオーバーエンド式ロータリーミキサーを用いて、低速回転でインキュベートします。
 - ⑥ インキュベーション後、スピンドウンと磁気分離を行って上清（フロースルー）を除去します。必要に応じて、上清は別のチューブに回収してください。
 - ⑦ 洗浄バッファーを 200 μ L 加えてボルテックスで懸濁し、スピンドウンと磁気分離を行って上清を除去します。この洗浄工程は合計 3 回行い、3 回目は内壁に吸着した非特異的タンパク質が溶出液に持ち込まれないよう、懸濁液を新しいチューブに移してから磁気分離を行います。
 - ⑧-A **Tris-Glycine ゲルを使用する場合：**
SDS 溶出バッファーを 20~50 μ L 加えてピペッティングでビーズを再懸濁し、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱します。
 - ⑧-B **Bis-Tris ゲルを使用する場合：**
LDS 溶出バッファーを 20~50 μ L 加えてピペッティングでビーズを再懸濁し、70 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱します。
- ※ Anti-Pan Ubiquitin Monobody はユビキチンに対して高い親和性（ $K_d = 0.88$ nM）を示し、モノボディ固定化ビーズはポリユビキチン鎖に多価的に結合します。
完全な溶出のために、必ず加熱処理を行ってください。

- ⑨ スピンドウン後に磁気分離を行い、上清（溶出サンプル）を新しいチューブに回収します。必要に応じて、磁気分離の代替として遠心分離（例：12,000 \times g 以上で 1 分間）を行うこともできます。
- ⑩ 溶出サンプルは、すぐに使用するか、-20 $^{\circ}$ C で短期保存してください。長期保存が必要な場合は、-70 $^{\circ}$ C 以下で保存することを推奨します。

【Ⅷ】 使用例：免疫沈降－ウェスタンブロッティング（IP-WB）

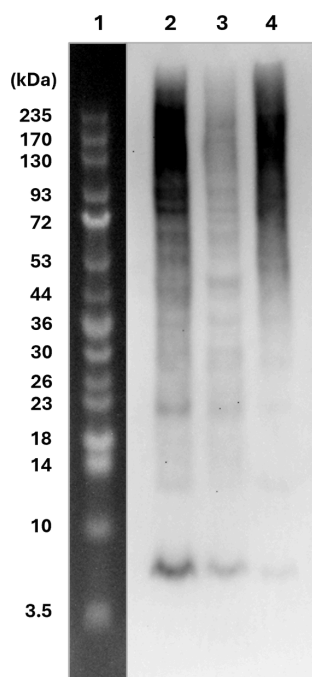


図1. 哺乳類細胞を用いた免疫沈降

本データシートに記載の手順に従い、未処理のヒト HCT116 細胞からライセートを調製し、50 μ L のライセートに対してモノボディ固定化ビーズを用いて免疫沈降を行った。結合したユビキチン化タンパク質は、50 μ L の 1x LDS 溶出バッファーで溶出した。ユビキチン化タンパク質の回収効率を評価するため、溶出画分をライセートおよび素通り画分と同等の体積となるよう希釈し、各画分を 4 – 12 % Bis-Tris ゲルによる SDS-PAGE に供した。分離したタンパク質は PVDF 膜に転写後、3 % スkimミルクでブロッキングを行い、一次抗体として抗ユビキチンマウスモノクローナル抗体（P4D1、1:1000 希釈）、二次抗体として HRP 標識抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体（1:2000 希釈）を使用し、ECL 法によってユビキチン化タンパク質のシグナルを検出した。

レーン 1：分子量マーカー

レーン 2：ライセート

レーン 3：素通り画分

レーン 4：溶出画分

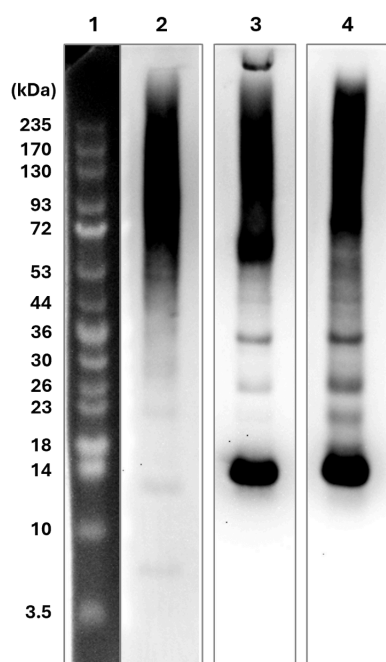


図2. 検出方法によるシグナルパターンの比較

図1と同様の免疫沈降アッセイから得た溶出画分を用いて、3 枚の PVDF プロットを作製し、それぞれ異なるブロッキング剤・一次抗体・二次抗体（二次試薬）（以下レーン情報を参照）を組み合わせ使用した。各プロットに対して ECL 法を用いてユビキチン化タンパク質の検出を行った。レーン 3 およびレーン 4 では、ユビキチン化タンパク質に加えて、ストレプトアビジンビーズから解離した Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin が同時に検出されており（矢頭）、検出系によりシグナルパターンが異なることが確認された。

レーン 1：分子量マーカー

レーン 2：3 % スkimミルク / 抗ユビキチンマウスモノクローナル抗体（P4D1、1:1000 希釈） / HRP 標識抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体（1:2000 希釈）

レーン 3：3 % BSA / Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin（1:5000 希釈） / HRP 標識抗 6 x His マウスモノクローナル抗体（1:2000 希釈）

レーン 4：3 % BSA / Anti-Pan Ubiquitin Monobody, Biotin（1:5000 希釈） / HRP 標識ストレプトアビジン（1:5000 希釈）

【Ⅷ】 使用例：免疫沈降－ウェスタンブロッティング（IP-WB） つづき

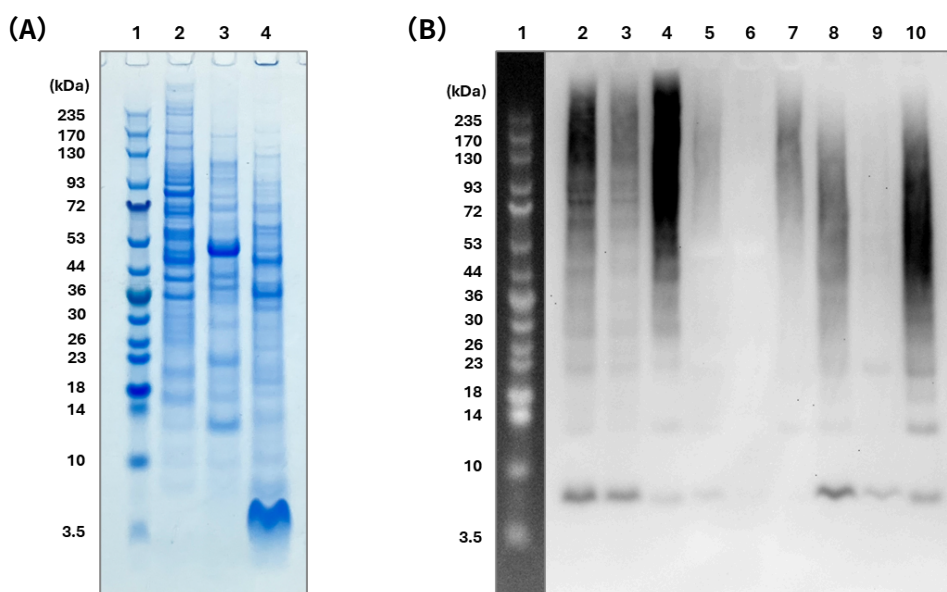


図3. 広範な生物種への適用

(A) 本キットに含まれる溶解バッファーを使用して、ヒト HCT116 細胞（レーン 2）、*Arabidopsis* 葉（レーン 3）、および *Rhizopus* 菌糸（レーン 4）からライセートを調製した。*Arabidopsis* および *Rhizopus* については、タンパク質定量の前にゲルろ過による前処理を行った。各ライセートは 1 mg / mL に調整し、5 μ g を SDS-PAGE に供して分離後、CBB 染色を行った。これにより、各サンプル間でおおよそ同程度のタンパク質濃度であることが視覚的に確認できた。

レーン1：分子量マーカー

(B) 免疫沈降、SDS-PAGE、およびウェスタンブロッティングは図 1 と同様のプロトコルに従って実施した（ただし、溶出画分の希釈は省略）。

レーン1：分子量マーカー

レーン2-4：ヒト HCT116 のライセート、素通り画分、溶出画分

レーン5-7：*Arabidopsis* 葉のライセート、素通り画分、溶出画分

レーン8-10：*Rhizopus* 菌糸のライセート、素通り画分、溶出画分

本商品をご利用になられた文献、発表データを募っております。

本商品をご利用いただき投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。

ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付方法

郵送 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
コスモ・バイオ株式会社 製品情報部 宛

Email tech@cosmobio.co.jp ※PDFファイルにてお送りください。



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部（お問い合わせ）

TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619

TEL : (03) 5632-9620