

MBL

A JSR Life Sciences
Company

Printed June 25, 2019

Version 3.0

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

His tagged Protein PURIFICATION GEL

(MoAb. clone 2D8)

CODE No. 3311 / 3312

*PURIFICATION to Maintains Protein Activity
from eukaryote cell lysate and culture supernatant*

Product Description

The ability to isolate and study a purified protein lies at the heart of modern biochemistry. Researchers in many fields require highly purified, active proteins for studies involving signaling pathways, enzymology, receptor binding, DNA binding, post-transcriptional modifications, and much more. Thus, choosing a method of purification is an important aspect in maintaining protein structure and function.

The hexa Histidine-tag (6xHis tag) is one of the most common tags used to facilitate the purification of recombinant proteins. Metal chelate affinity chromatography is widely used for purification of His tagged proteins. Unfortunately, some serum components are absorbed by the metal chelate affinity columns, making these columns impractical for the purification of proteins secreted into the culture supernatant. Indeed many proteins have intrinsic histidine residues or other untagged host proteins that can bind to the metal chelate affinity columns and elute with His tagged protein. These untagged contaminants may be removed using an additional purification or laborious optimizing the imidazole concentration.

MBL's His-tagged Protein PURIFICATION GEL is designed for the isolation of His tagged protein from cell culture supernatants containing serum and cell lysate under neutral pH condition. Severe conditions such as acidic or alkaline elution denature protein structure. However, a neutral pH elution can preserve protein activity and native conformation. Therefore, MBL has developed the Anti-His tag Gel to purify His-tagged proteins quickly and efficiently at neutral pH to maintain the activity and conformation of purified proteins. The elution of His tagged proteins from the Gel is achieved by the addition of the 6xHis tag peptide. As the 6xHis tag peptide competes with His tagged proteins on the Gel, the purified proteins do not lose the protein activity.

Components

	Quantity	
	CODE No. 3311	CODE No. 3312
<u>Anti-His tag Gel</u>	<u>1 mL × 1 vial</u>	<u>1 mL × 5 vials</u>
50% slurry: 1 mL Gel in 2 mL total volume in PBS with 0.1% ProClin 150 as preservative.		
<u>Elution Peptide</u>	<u>2 mg × 5 vials</u>	<u>2 mg × 25 vials</u>

Lyophilized form: 6xHis tag peptide; reconstitute the Elution Peptide with 1 mL of distilled water. 2 mg in 1 mL PBS after reconstitution.

Product Capacity

The purification capacity of Anti-His tag Gel varies depending upon the His tagged protein. For example, 1 mL of Anti-His tag Gel bound 1.0 mg of a His tagged protein (32 kDa) and eluted 0.6 mg of purified protein in our hands.

Storage

Store for up to 1 year from date of receipt at 4°C. Do not freeze.

Material Preparation

Prepare the following reagents before affinity purification.

Equilibration buffer : PBS

Elution buffer : 1 mg/mL 6xHis tag peptide in Equilibration buffer.

Fully reconstitute the Elution Peptide with 1 mL of distilled water, and mix it with 1 mL of Equilibration buffer in another tube. Store the reconstituted Elution Peptide in aliquots at -20°C.

Regeneration buffer : 0.17 M Glycine-HCl, pH 2.3

Column storage buffer : PBS/Preservative (e.g. 0.1% ProClin 150 and 0.09% NaN₃)

Lysis buffer : Suitable Lysis buffer varies with cell type (see **Additional Information**).

Homemade Lysis buffer

20-50 mM Tris-HCl, pH 7.5 or HEPES-KOH, pH 7.5

50-250 mM NaCl

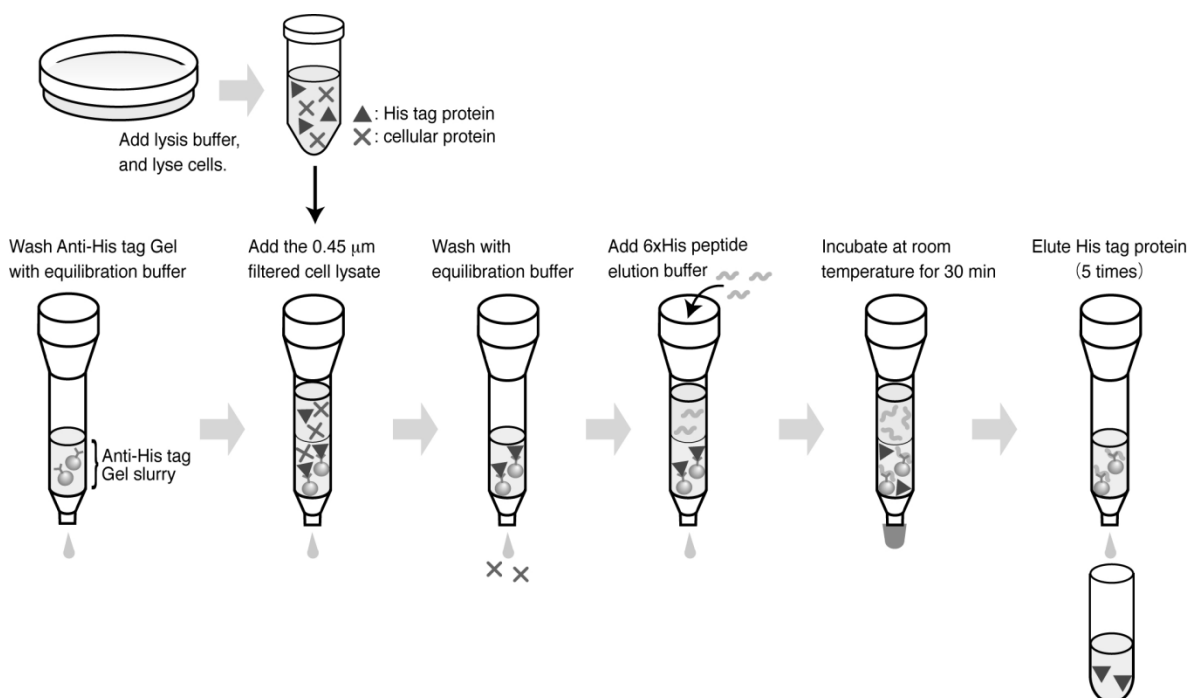
5 mM EDTA

1% NP-40 or Triton X-100

if necessary add Protease Inhibitor Cocktail

(e.g. SIGMA code P8340, PIERCE code 78415).

Procedure Summary



Protocols

- Notes:
1. The Gel is optimized under the native conditions only, and it is not recommended under denaturing conditions and also for purification of aggregated, unstable, and insoluble protein (e.g. inclusion bodies). Proteins solubilized with such as 6 M Guanidine-HCl or 8 M Urea cannot be purified using this Kit (see **Additional Information**).
 2. Cellular debris and particulate matter must be removed prior to purification. The protein extract should be centrifuged (10,000-20,000 × g for 15 minutes) and filtered with a 0.45 µm filter to remove any remaining cells and particulates.
 3. Highly viscous samples containing chromosomal DNA or RNA should be sonicated or treated with nuclease to reduce viscosity.

A. Column preparation

1. Place the empty chromatography column (e.g., PIERCE, code 29920) on rack or stand.
2. Rinse the column with Equilibration buffer.
3. Resuspend Anti-His tag Gel by tapping and inverting the vial several times immediately before dispensing. Don't vortex.
4. Transfer the desired volume to the column. Allow the column to drain. Do not allow the column to dry out.
5. Wash the column with 10 bed volumes of Equilibration buffer.

B. Column binding

1. Apply the lysate on the top of the column under gravity flow.
Note: The binding efficiency to Anti-His tag Gel depends on the conditions such as a kind of the His tagged protein, sample flow rate, and temperature. If the coupling efficiency has been low, put a sample through the column several times, or incubate the lysate with the Gel in batch.
2. Collect the flow-through into clean collection tubes.
3. Wash the column with Equilibration buffer until the OD280 is <0.01.

C. Elution of the His tagged protein

1. Prepare 5 bed volumes of Elution buffer.
2. Remove the bottom cap, and pour off the excess liquid.
3. To exchange the buffer in the column, add 1 bed volume of Elution buffer, and drain the 1 bed volume of the buffer.
4. Cap the bottom, and add 1 bed volumes of Elution buffer so that the Gel does not dry.

5. Allow the column to stand at room temperature for 30 minutes. (As the 6xHis tag peptide competes with His tagged protein on the Gel by this incubation, His tagged protein is eluted from the Gel.)
6. Remove the bottom cap, and collect the eluate into clean collection tubes (Fraction 1).
7. Cap the bottom, add 1 bed volumes of Elution buffer, and allow the column to stand at room temperature for 5 minutes.
8. Remove the bottom cap, and collect the eluate into clean collection tubes (Fraction 2).
9. Repeat the elution and collection step (7 and 8) 3 times more. (Fraction 1-5 contains His tagged Protein.)

D. Regeneration and storage

1. Wash the column with 10 bed volumes of Regeneration buffer.
2. Immediately wash the column with 10 bed volumes of Column storage buffer.
3. Store at +2 to +8°C in 2 bed volumes of Column storage buffer.

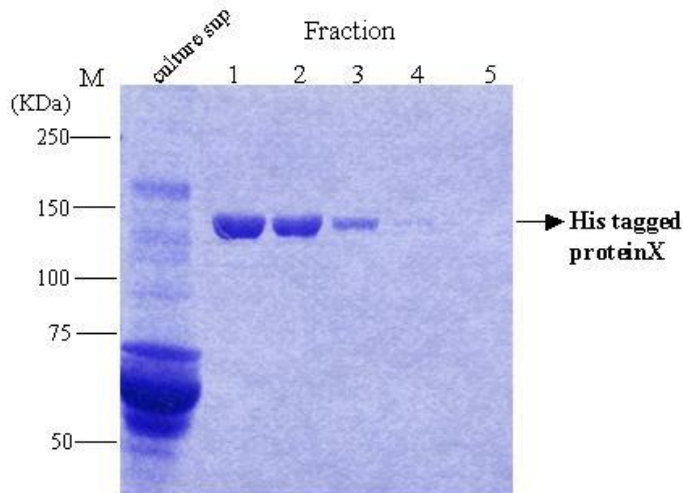
Note: Poured columns containing Anti-His tag Gel may be used at least 10 times, depending on the usage conditions.

Related Products:

Please visit our website at <http://ruo.mbl.co.jp/>.

Example of Purification Results 1

Purification of C-terminus His tagged protein X from culture supernatant

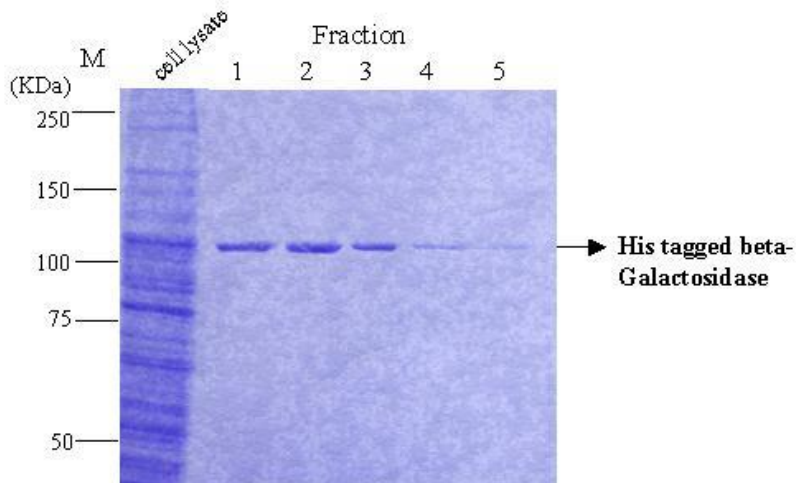


SDS-PAGE (Coomassie Brilliant Blue Staining)

Stable transfectant of CHO (Chinese Hamster Ovary) cells expressing C-terminus His tagged protein were cultured for 7 days in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum. C-terminus His tagged protein was purified from 50 mL of cultured medium according to the preceding protocol. Column bed volume was 0.5 mL. Elution was carried out with 2.5 mL of 1 mg/mL His tag peptide. Each fraction was 0.5 mL.

Example of Purification Results 2

Purification of N-terminus His tagged β -galactosidase



SDS-PAGE (Coomassie Brilliant Blue Staining)

Human embryonic kidney cells (293T) were transfected with pcDNA-His- β -galactosidase and cultured for 60 hours. Cells were then lysed in the Lysis buffer (10 mL/100-mm dish x5) and purified according to the preceding protocol. Column bed volume was 0.5 mL. Elution was carried out with 2.5 mL of 1 mg/mL His tag peptide. Each fraction was 0.5 mL.

Additional Information

Several reagents were examined whether or not they were suitable for use with the His tagged Protein PURIFICATION GEL. For example, RIPA buffer could be used for preparation of cell lysate. The results are listed below.

Chaotropic agents

Urea	1 M	Yes
Guanidine -HCl	1 M	No

Reducing agents

DTT	10 mM	Yes
2-Mercaptoethanol	10 mM	Yes

Surfactants

Nonionic	Tween-20	1%	Yes
	Tween-20	5%	No
	Triton X-100	5%	Yes
	NP-40	1%	Yes
	Digitonin	1%	Yes
	n-Octyl-beta-D-gulcoside	1%	Yes
Zwitterionic	CHAPS	1%	Yes
	CHAPSO	1%	Yes
Anionic	SDS	0.1%	Yes
	Sodium Deoxycholate	0.5%	Yes

Others

NaCl	1 M	Yes
Glycerol	10%	Yes
EDTA	10 mM	Yes

The “Yes” indicates the reagents can be used in the Lysis buffer for this Gel up to the indicated concentration. The “No” indicates the reagents cannot be used in the Lysis buffer for this Gel at the indicated concentration.

はじめに

さまざまな研究分野で、活性のあるタンパク質、構造を保ったタンパク質を精製することは大変重要です。活性や構造を保ったままでタンパク質を精製するためには、酸、アルカリなどの過酷な条件下ではなく、中性条件下で精製できることが理想です。このキットは、哺乳動物細胞などで発現させた 6×His tag 融合タンパク質（以下 His tag タンパク質）を中性条件下で、精製可能にしたゲルです。

His tag タンパク質の精製には金属イオンキレートカラムが良く使用されますが、有血清培養上清中の His tag タンパク質の精製には血清成分がキレートカラムに吸着するため使用できません。また、細胞内に発現させた場合でも細胞ライセート中の His 残基を多く含有するタンパク質が非特異的に結合してしまうため、溶出液のイミダゾール濃度の検討などが必要になるなどの欠点がありました。

MBL ではキレートカラムとは異なる原理で、有血清培養上清中や哺乳動物細胞内に強制発現させた His tag タンパク質を簡便かつ高純度に精製できるゲルを開発しました。ゲルに含まれる抗 His tag ゲルには抗 His tag 抗体が結合しています。His tag タンパク質を含む溶液を抗 His tag ゲルカラムにアプライします。インキュベーション後の洗浄で His tag タンパク質以外を洗い流します。その後、抗 His tag ゲルに過剰量の 6×His tag ペプチドを含む溶液を加えることで、His tag タンパク質と His tag ペプチドの競合を生じさせ、抗 His tag ゲルから His tag タンパク質を解離させて回収します。

構成

	Quantity	
	CODE No. 3311	CODE No. 3312
Anti-His tag Gel	1 mL × 1 本	1 mL × 5 本

50% スラリー：保存剤として 0.1% の ProClin 150 を含有する。

PBS に 1 mL のビーズが入り 2 mL となっています。

Elution Peptide	2 mg × 5 本	2 mg × 25 本
------------------------	------------	-------------

凍結乾燥品：His tag peptide

1 本に 1 mL の超純水を加えて溶解してください。

溶解後に His tag ペプチド 2 mg/mL の PBS 溶液となります。

保存

製品有効期限は、出荷後 1 年間です。2~8°C で保存してください。凍結は避けてください。

精製のキャパシティー

精製のキャパシティーは His tag 融合タンパク質の種類によって異なります。

32 kDa の His tag タンパク質 1 mg を精製した例では 1 mL の Anti-His tag Gel を用いて、0.6 mg の His tag タンパク質を回収することができました。

試薬の準備

1. 平衡化バッファー : PBS

2. 溶出バッファー : 1 mg/mL His tag ペプチド

Elution Peptide に 1 mL の超純水を加えて溶解した後、平衡化バッファーで 2 倍希釈してください。

*ペプチド溶液を保存する場合は適切な量に分注して、-20°C に保存してください。凍結融解の繰り返しは避けてください。

3. 再生バッファー : 0.17 M Glycine-HCl, pH 2.3

4. 保存バッファー : PBS/Preservative (例 : 0.1% ProClin 150 又は 0.09% NaN₃)

5. 細胞溶解バッファー

細胞によって最適な細胞溶解バッファーの種類は異なります。

試薬の使用可否表をご覧ください。

自家製の例

20-50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 又は HEPES-KOH (pH 7.5)

50-250 mM NaCl

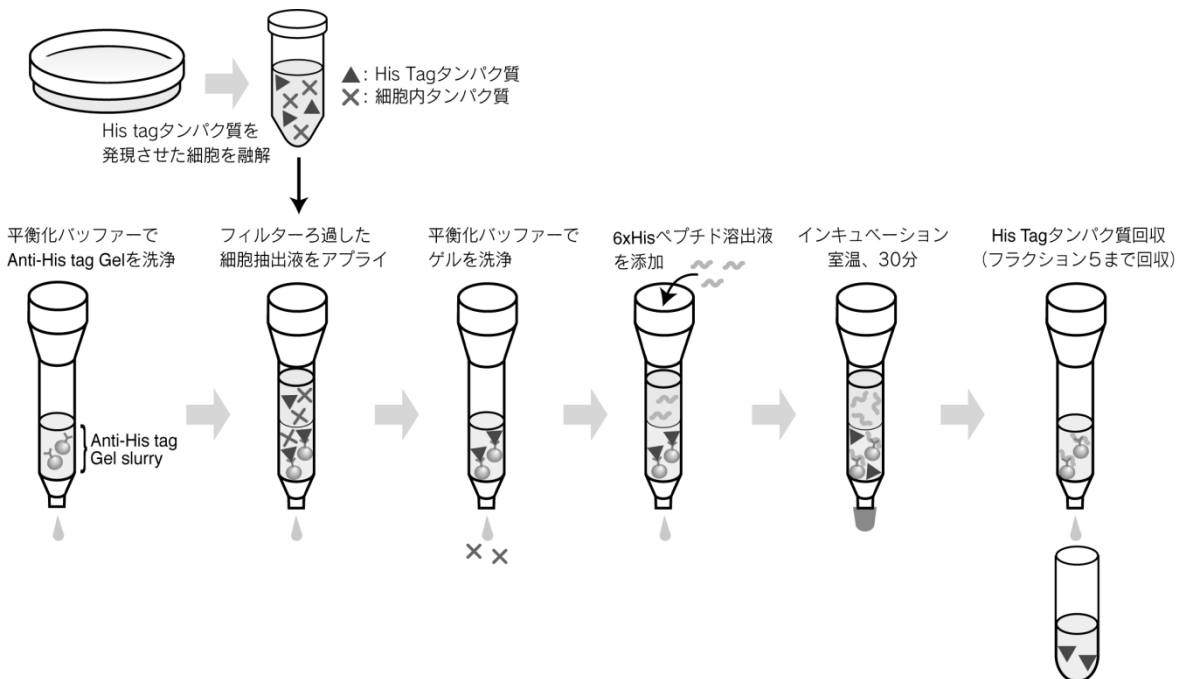
5 mM EDTA

1% NP-40 又は Triton X-100

必要に応じて Protease Inhibitor Cocktail を加えてください。

(例 : SIGMA code P8340, PIERCE code 78415)

精製の概略図



プロトコール

このゲルはアグリゲートしやすいタンパク質や、大腸菌に発現させた不溶性のタンパク質の精製には適していません。サンプル中に微粒子が含まれている場合には精製前に取り除く必要があります。遠心処理（10,000 - 20,000 × g、15 分間）した後、上清を 0.45 μm のフィルターに通して微粒子を除去してください。ゲノム DNA や RNA 等を含むサンプルで、粘性が高い場合には超音波処理または適当な試薬（ヌクレアーゼなど）で処理をして粘性を下げてください。

A. カラム準備

1. 空のカラム（PIERCE code, 29920 等）を垂直に立てます。
2. カラムを適量の平衡化バッファーで洗浄します。
3. Anti-His tag Gel の容器を指ではじき転倒混和することで均一なスラリーにしてください。ボルテックスは使わないでください。
4. 必要量の Anti-His tag Gel をカラムに入れ保存液を排出します。
5. カラムボリュームの 10 倍量の平衡化バッファーを流します。
*ゲルベッドを乾燥させないでください

B. His tag タンパク質のゲルへの吸着

1. 自然落下流速によりサンプルをカラムにローディングします。
(注意：His tag タンパク質の種類、流速、温度などの条件によって Anti-His tag Gel への結合効率が変わることがあります。結合効率が低い場合には①カラムにサンプルを複数回通す、②サンプルと Anti-His tag Gel を 15 mL チューブなどに入れて、ローテーターにセットし、穏やかに転倒混和することにより改善することがあります。)
2. 素通り画分をチューブに回収します。
3. カラムを平衡化バッファーで洗浄し、OD280 が 0.01 以下になるまで洗浄してください。

C. His tag タンパク質の溶出

1. ベッドボリュームの 5 倍量の溶出バッファーを用意します。
2. 下のキャップをはずし、平衡化バッファーを排出します。
3. Anti-His tag Gel 内のバッファーを溶出バッファーに置換するため、1 ベッドボリュームの溶出バッファーを加え、1 ベッドボリュームのバッファーを排出します。
4. 下のキャップを閉めます。ゲルが乾燥しないように 1 ベッドボリュームの溶出バッファーを加えます。
5. カラムを室温で 30 分インキュベートします。(このインキュベーションにより、His tag タンパク質と 6×His tag ペプチドの競合が生じ、Anti-His tag Gel から His tag タンパク質が解離します。)
6. 下のキャップをはずして 1 ベッドボリューム溶出し、溶出液を適当なチューブに回収します (Fraction 1)。

7. 下のキャップを閉めて、1 ベッドボリュームの溶出バッファーを加え、室温 5 分インキュベートします。
8. 下のキャップをはずして 1 ベッドボリューム溶出し、溶出液を適当なチューブに回収します (Fraction 2)。
9. 上記ステップ C-7.および C-8.の操作を繰り返し、Fraction 5 まで回収します。(Fraction 1～5 には His tag タンパク質が含まれます。)

D. 再生及び保存

1. カラムをベッドボリュームの 10 倍量の再生バッファーで洗浄します。
2. 直ちにベッドボリュームの 10 倍量以上の保存バッファーで洗浄し、排出液の pH が中性に戻っていることを確認します。
3. 保存バッファーを加えて密閉し 2～8°C で保存します。

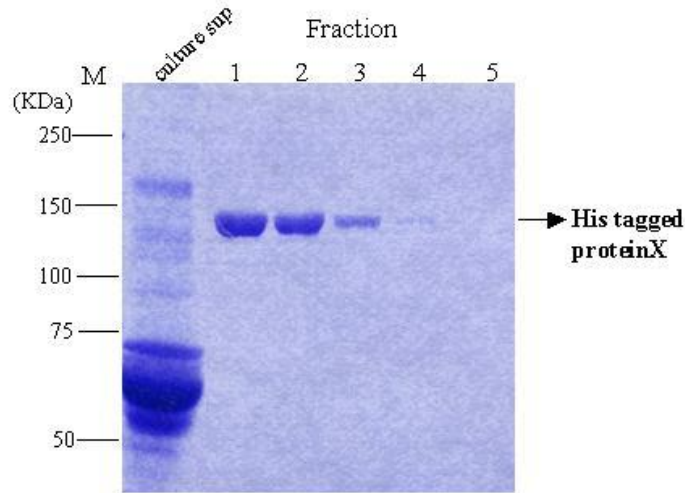
*使用条件により異なりますが 10 回程度は再使用できます。

関連製品

MBL HP をご覧ください。 <http://ruo.mbl.co.jp/>

精製の例①

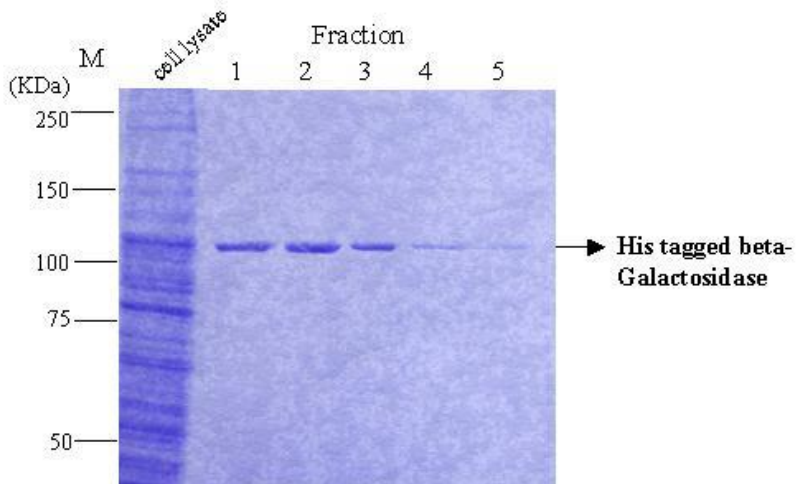
C 末端 His tag タンパク質 X の精製 (SDS-PAGE クマシー染色)



チャイニーズハムスター繊維芽細胞(CHO)のC末端 His tag タンパク質 X 安定発現細胞を DMEM/10% FCS で7日間培養しました。50 mL の培養上清をカラム (Gel vol. 0.5 mL) にアプライし、1 mg/mL ペプチドで溶出しました。フラクションは各 0.5 mL です。

精製の例②

N 末端 His tag β -galactosidase の精製 (SDS-PAGE クマシー染色)



ヒト胎児腎由来細胞株 (293T) に pcDNA-His- β -galactosidase プラスミド DNA をトランスフェクションし、60 時間培養しました。細胞を細胞溶解バッファー (10 mL/100-mm dish×5 枚) に溶解させ、カラム (Gel vol. 0.5 mL) にアプライし、1 mg/mL ペプチドで溶出しました。フラクションは各 0.5 mL です。

試薬の使用可否

下記の試薬を細胞溶解バッファーの成分に加えた場合、本ゲルで使えるか調べました。

* RIPA バッファーは使用可能です。

Chaotropic agents

Urea	1 M	Yes
Guanidine-HCl	1 M	No

Reducing agents

DTT	10 mM	Yes
2-Mercaptoethanol	10 mM	Yes

Surfactants

Nonionic	Tween-20	1%	Yes
	Tween-20	5%	No
	Triton X-100	5%	Yes
	NP-40	1%	Yes
	Digitonin	1%	Yes
	n-Octyl-beta-D-galactoside	1%	Yes
Zwitterionic	CHAPS	1%	Yes
	CHAPSO	1%	Yes
Anionic	SDS	0.1%	Yes
	Sodium Deoxycholate	0.5%	Yes

Others

NaCl	1 M	Yes
Glycerol	10%	Yes
EDTA	10 mM	Yes

Yes : 表に示した濃度まで細胞溶解バッファーに加えて使用できます。

No : 表に示した濃度で細胞溶解バッファーに加えると使用できません。

発売元



株式会社 医学生物学研究所

URL <http://ruo.mbl.co.jp>

e-mail support@mbi.co.jp