

3326KR
Lot 003~

MBL
A JSR Life Sciences
Company

Printed November 09, 2021
Version 2.0

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

DDDDK-tagged Protein PURIFICATION CARTRIDGE

(Clone FLA-1GS)

CODE No. 3326KR

*PURIFICATION to maintain protein activity
from eukaryote cell lysate and culture supernatant*

Product Description

Recombinant tagged proteins are widely used for protein purification and protein characterization. There are many purification methods and kits available. DDDDK epitope tag (DYKDDDDK) has been widely used as a multi-purpose tag for protein purification.

MBL's DDDDK-tagged Protein PURIFICATION CARTRIDGE is ready-to-use-cartridge for the isolation of DDDDK-tagged protein from cell culture supernatants and cell lysate under neutral pH condition. The cartridge can be used directly on automated ÄKTA FPLC Systems.

The elution of DDDDK-tagged proteins from the cartridge is achieved by the addition of the DDDDK-tag peptide (DYKDDDDK). As the DDDDK-tag peptide competes with DDDDK-tagged proteins on the cartridge, the purified DDDDK-tagged proteins maintain function and retain protein activity.



Components

	Quantity
	CODE No. 3326KR
<u>DDDDK-tagged Protein PURIFICATION CARTRIDGE</u>	<u>1 mL × 1</u>
• DDDDK-tag cartridge (1/16 inch female end) × 1, Stop plugs (1/16 inch male) × 2	

Elution Peptide (DYKDDDDK) is NOT included.

It is available as CODE No. 3325-205 (1 mg × 5 vials).

Storage

Store for up to 1 year from date of receipt at 2-8°C. Do not freeze.

Cartridge Specifications

Specifications	
Column volume	1 mL
Cartridge body material	Polypropylene
Connector size	1/16 inch
Matrix	Cross-linked agarose
Ligand	Anti-DDDDK-tag mAb (clone: FLA-1GS)
Binding capacity	Approx. 2 mg recombinant DDDDK-tagged Protein/mL gel
Maximum pressure	0.3 MPa
Recommended flow rate	0.5-1 mL/min
Storage buffer	0.1% ProClin 150/PBS

Material Preparation

Prepare the following reagents before affinity purification.

1. Lysis buffer : Suitable Lysis buffer varies with a kind of the DDDDK-tagged protein
(See **Additional Information**).
[Example of buffer constitution]
10-50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
100-300 mM NaCl
1% NP-40 or Triton X-100
If necessary add Protease Inhibitor Cocktail
(e.g. SIGMA: code P8340, PIERCE: code 78415)
2. Washing buffer : Suitable Washing buffer varies with a kind of the DDDDK-tagged protein
(See **Additional Information**).
[Example of buffer constitution]
10-50 mM Tris-HCl (pH 7.5) or HEPES-KOH (pH 7.5)
300-500 mM NaCl
To prevent non-specific protein binding to the gel,
salt concentration should be 300-500 mM NaCl.
3. Elution buffer : 0.1 mg/mL DDDDK-tag peptide in PBS (or Washing buffer).
4. Regeneration buffer : 0.17 M Glycine-HCl (pH 2.3)
5. Column storage buffer : 0.1% ProClin 150/PBS
6. A suitable liquid chromatography system with 1/16 inch tubing (e.g. GE Healthcare: ÄKTA system)

Note: For best results, filter all the buffers through 0.45 µm filter and degas before use.

The descriptions of the following protocols are examples. Each user should determine the appropriate condition.

Protocols

A. Sample preparation

The cartridge is optimized under only native conditions. It is not recommended for use under denaturing conditions or 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 cartridge (see **Additional Information**).

Cellular debris and particulate matter must be removed prior to purification. The protein extract should be centrifuged (10,000-20,000 × g for 15 min) and filtered with a 0.45 µm filter to remove any remaining cells and particulates.

Highly viscous samples containing chromosomal DNA or RNA should be sonicated or treated with nuclease to reduce viscosity.

B. Purification

1. Fill the pump A and B in liquid chromatography system with Washing buffer and Elution buffer.
2. Remove one end of the stop plug from the cartridge, and start pumping Washing buffer at a flow rate of 0.5 mL/min until a few drops fill in the top of the cartridge. Connect the cartridge to the pump side tubing.
3. Immediately remove the other end of the stop plug from the cartridge, connect the cartridge to the UV monitor side tubing.
4. Equilibrate the cartridge with 5-10 bed volumes of the Washing buffer at a flow rate of 1 mL/min.
5. Apply the sample to the cartridge at a flow rate of 0.5-1 mL/min. Collect fractions.
6. Wash the cartridge with 20 bed volumes of the Washing buffer until the absorbance approaches baseline at a flow rate of 1 mL/min.
7. Elute with 8 bed volumes of Elution buffer and correct 0.5 mL fractions.

C. Regeneration and storage

1. Wash the cartridge with 10 bed volumes of Regeneration buffer.
2. Immediately wash the column with 10 bed volumes of Column storage buffer.
3. Screw the stop plug tightly, store the cartridge at 2-8°C.

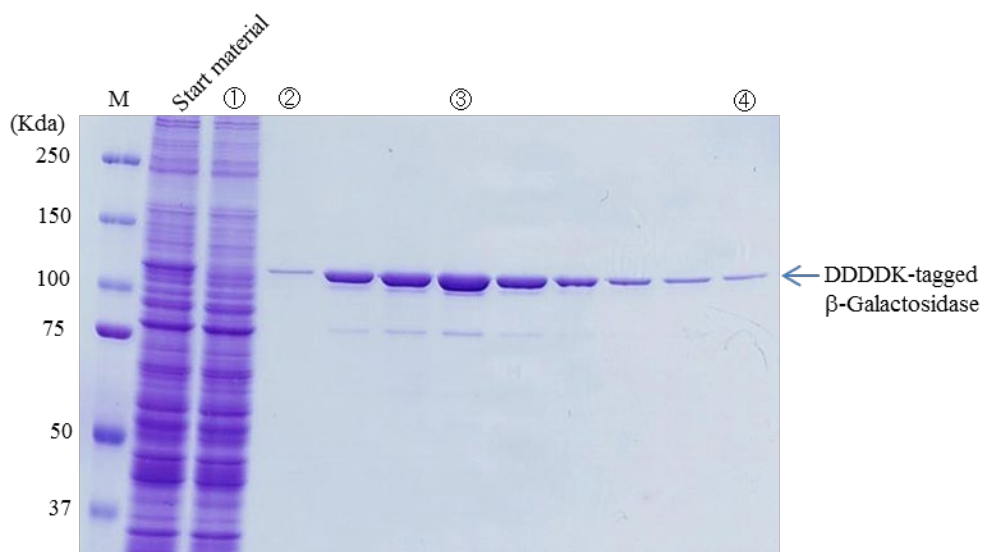
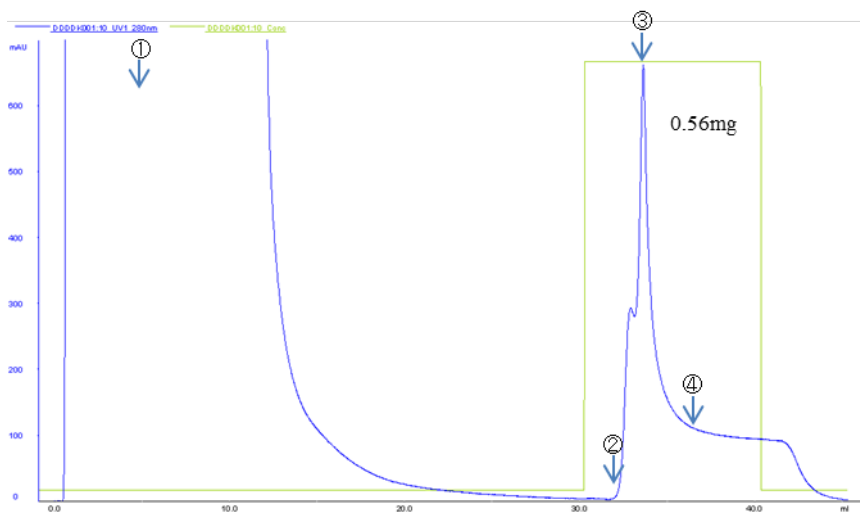
Note: This cartridge may be used multiple times, depending on the usage conditions.

Related Products:

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

Example of Purification Result

Purification of N-terminus DDDDK-tagged β -Galactosidase



Cartridge	: DDDDK-tagged Protein PURIFICATION CARTRIDGE
Sample	: DDDDK-tagged β -Galactosidase/293T transient transfectant (1×10^8 cells)
Cell lysis buffer	: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40 (pH 7.5)
Wash buffer	: 10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl (pH 7.5)
Elution buffer	: 0.1 mg/ml DYKDDDDK peptide in PBS
Flow rate	: 1.0 mL/min (0.5 mL/min for elution)
Chromatography system	: ÄKTAexplorer 10S (GE Healthcare)

Additional Information

Several reagents were examined whether or not they were suitable for use with the DDDDK-tagged Protein PURIFICATION CARTRIDGE. 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	5%	Yes
	TritonX-100	5%	Yes
	NP40	1%	Yes
	Digitonin	1%	Yes
	n-Octyl-β-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 cartridge up to the indicated concentration. The “No” indicates the reagents cannot be used in the Lysis buffer for this cartridge at the indicated concentration.

はじめに

DDDDK-tag は 8 アミノ酸配列 (DYKDDDDK) からなるエピトープタグで、大腸菌および哺乳動物細胞の発現ベクターによく使用されています。DDDDK-tagged Protein PURIFICATION CARTRIDGE は、ÄKTA や FPLC 等の液体クロマトグラフィーシステムに直接接続して使用することができ、培養上清中や哺乳動物細胞内に強制発現させた DDDDK-tag 融合タンパク質 (以下 DDDDK-tag タンパク質) を中性条件下で、簡便かつ高純度に精製できます。

このゲルには DDDDK-tag を特異的に認識する抗 DDDDK-tag 抗体が結合しています。DDDDK-tag タンパク質を含む溶液をカートリッジにアプライします。次に、洗浄を行い DDDDK-tag タンパク質以外を洗い流します。その後、ゲルに過剰量の DDDDK-tag ペプチド (配列: DYKDDDDK) を含む溶液を加えることで、DDDDK-tag タンパク質と DDDDK-tag ペプチドの競合を生じさせ、ゲルから DDDDK-tag タンパク質を解離させて回収します。



構成

	Quantity
	CODE No. 3326KR
<u>DDDDK-tagged Protein PURIFICATION CARTRIDGE</u>	1 mL × 1 本

- DDDDK-tag カートリッジ (1/16 inch female end) 1 本、ストッププラグ (1/16 inch male) 2 個

Elution Peptide (DYKDDDDK) は同梱されておりません。

CODE No. 3325-205 (1 mg × 5 本) で別売しておりますので、ご参照ください。

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。

カートリッジの仕様

仕様	
カラム容量	1 mL
カートリッジ素材	Polypropylene
コネクターサイズ	1/16 inch
ゲル担体	cross-linked agarose
リガンド	Anti-DDDDK-tag mAb (clone: FLA-1GS)
結合容量	約 2 mg recombinant DDDDK-tagged Protein /mL gel
限界圧	0.3 MPa
推奨流速	0.5-1 mL/min
保存バッファー	0.1% ProClin 150/PBS

ご準備いただく試薬・機器

1. 細胞溶解バッファー

目的タンパク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

10-50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

100-300 mM NaCl

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)

2. 洗浄バッファー

目的タンパク質によって最適な洗浄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

10-50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

300-500 mM NaCl

*ゲルへの目的タンパク質以外の非特異的吸着を防ぐため、NaCl 濃度は 300-500 mM で使用するをお勧めします。

3. 溶出バッファー : 0.1 mg/mL DDDDK-tag ペプチド

4. 再生バッファー : 0.17 M Glycine-HCl (pH 2.3)

5. 保存バッファー : 0.1% ProClin 150/PBS

*すべてのバッファーは使用直前に 0.45 μm フィルターでろ過し、脱気してください。

6. 液体クロマトグラフィーシステム (コネクターサイズ規格 1/16 インチ)

(例：GE Healthcare ÄKTA)

データシート中のプロトコールは参考例です。研究によって最適な条件は異なりますので、事前に条件検討を行うことを推奨します。

プロトコール

A. サンプルの調製

このカートリッジは、凝集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。また、6 M Guanidine-HCl や 8 M Urea で可溶化したサンプルは、このカートリッジでは精製できません（試薬の使用可否をご参照ください）。サンプルは遠心処理（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）で核酸を断片化して粘性を下げてください。

B. 精製手順

1. 液体クロマトグラフィシステムのポンプ A の内液を洗浄バッファーに、ポンプ B を溶出バッファーに置換します。
2. カートリッジの片方のストッププラグを外します。洗浄バッファーを送液し（流速 0.5 mL/min）、数滴の洗浄バッファーでカートリッジの上部を満たした後、ポンプ側のチューブとカートリッジを接続します。
3. すぐにもう片方のストッププラグを外し、UV モニター側のチューブとカートリッジを接続します。
4. ベッドボリュームの 5-10 倍量の洗浄バッファーを流し（流速 1 mL/min）、カートリッジを平衡化します。
5. 調製したサンプルをカートリッジにアプライします（流速 0.5-1 mL/min）。素通り画分を回収します。
6. カートリッジをベッドボリュームの 20 倍量の洗浄バッファーで、吸光度がベースラインに近づくまで洗浄します。（流速 1 mL/min）
7. 溶出バッファーをベッドボリュームの 8 倍量流し（流速 0.5 mL/min）、DDDDK-tag タンパク質を溶出します。0.5 mL ずつフラクションを回収します。

C. 再生及び保存

1. カートリッジ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 倍以上の保存バッファーで洗浄し、カートリッジ内の pH を中性に戻します。
3. ストッププラグを締め、カートリッジを密閉し 2-8°C で保存します。

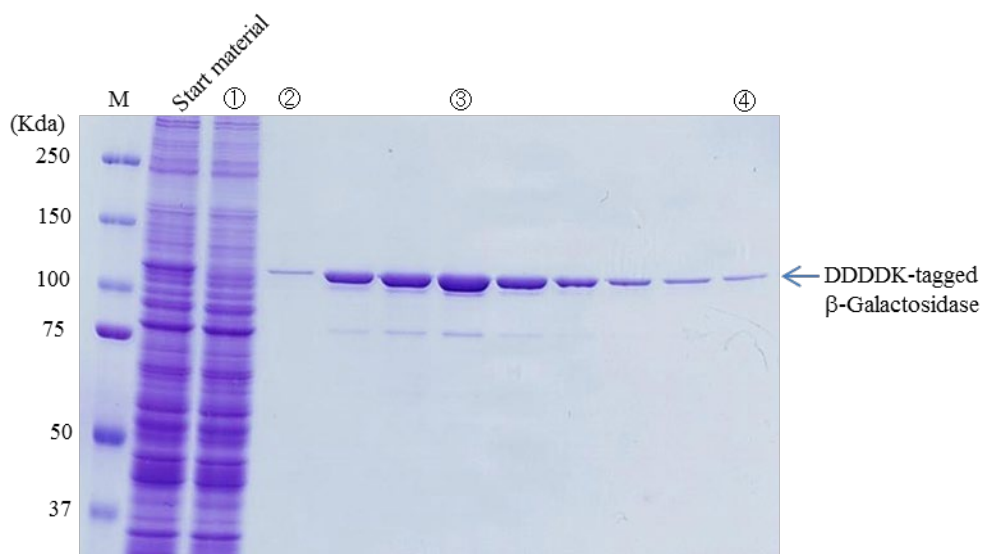
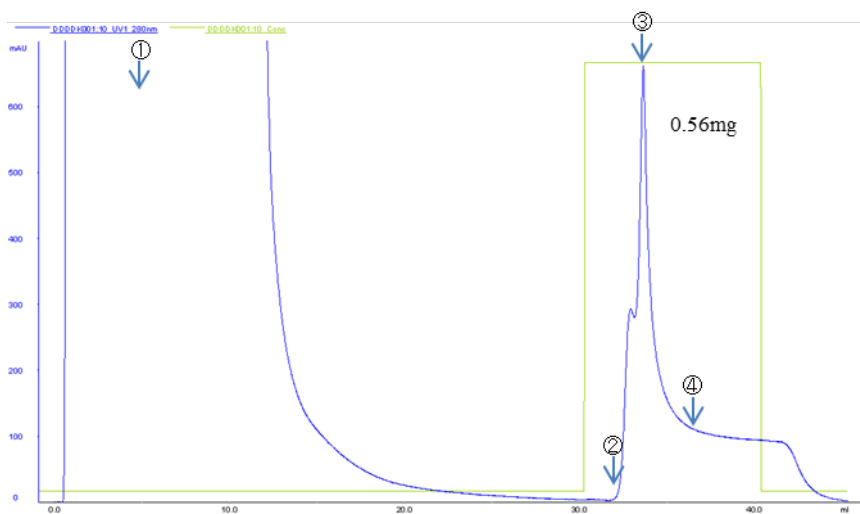
*使用条件により異なりますが、カートリッジは再生することで複数回再利用できます。

関連製品

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

精製の例

N 末端 DDDDK-tagged β -Galactosidase の精製



Cartridge : DDDDK-tagged Protein PURIFICATION CARTRIDGE
Sample : DDDDK-tagged β -Galactosidase/293T transient transfectant (1×10^8 cells)
Cell lysis buffer : 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40 (pH 7.5)

Wash buffer : 10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl (pH 7.5)
 Elution buffer : 0.1 mg/ml DYKDDDDK peptide in PBS
 Flow rate : 1.0 mL/min (0.5 mL/min for elution)
 Chromatography system : ÄKTAexplorer 10S (GE Healthcare)

試薬の使用可否

下記の試薬を細胞溶解バッファの成分に加えた場合、本製品で使えるか調べました。

* RIPA バッファは使用可能です。

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	5%	Yes
	TritonX-100	5%	Yes
	NP40	1%	Yes
	Digitonin	1%	Yes
	n-Octyl-β-D-galcoside	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に加えて使用できます。

No: 表に示した濃度を細胞溶解バッファ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 <https://ruo.mbl.co.jp>

e-mail support@mbi.co.jp