

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

DDDDK-tagged Protein PURIFICATION GEL

(MoAb. clone FLA-1GS)

CODE No. 3329R

*PURIFICATION to Maintain 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.

Recombinant tagged protein purification methods and kits are now widely recognized. The DDDDK epitope tag (DYKDDDDK) has been widely used as a multi-purpose tag, and anti-DDDDK-tag antibodies are optimally suited for identifying, detecting, purifying, and monitoring the expression levels of recombinant DDDDK-tagged proteins.

MBL's DDDDK-tagged Protein PURIFICATION GEL is designed for the isolation of DDDDK-tagged protein from cell culture supernatants 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-DDDDK-tag Gel to purify DDDDK-tagged proteins quickly and efficiently at neutral pH to maintain the activity and conformation of purified proteins. The elution of DDDDK-tagged proteins from the Gel is achieved by the addition of the DDDDK-tag peptide (DYKDDDDK). As the DDDDK-tag peptide competes with DDDDK-tagged proteins on the Gel, the purified proteins do not lose the protein activity.

Components

	Quantity
	CODE No. 3329R
<u>Anti-DDDDK-tag Gel</u>	<u>25 mL × 1 vial</u>
50% slurry: 25 mL Gel in 50 mL total volume in PBS with 0.1% ProClin 150 as preservative.	

Elution Peptide (DYKDDDDK) is NOT included.
It is available as CODE No. 3325-205 (1 mg x 5 vials).

Product Capacity

The purification capacity of the Anti-DDDDK-tag Gel varies depending upon the DDDDK-tagged protein. For example, 1 mL of Anti-DDDDK-tag Gel bound 2 mg of a DDDDK-tagged protein (32 kDa) and eluted 1.8 mg of purified protein in our hands.

Storage

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

Material Preparation

Prepare the following reagents before affinity purification.

Lysis buffer : Suitable Lysis buffer varies with a kind of the DDDDK-tagged protein
(see **Additional Information**).

10-50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
100-300 mM NaCl
1-5 mM EDTA
1% NP-40 or Triton X-100
if necessary add Protease Inhibitor Cocktail
(e.g. SIGMA: code P8340, PIERCE: code 78415)

Washing buffer : Suitable Washing buffer varies with a kind of the DDDDK-tagged protein
(see **Additional Information**).

10-50 mM Tris-HCl (pH 7.5) or HEPES-KOH (pH 7.5)
300-500 mM NaCl
0.1% NP-40 or Triton X-100

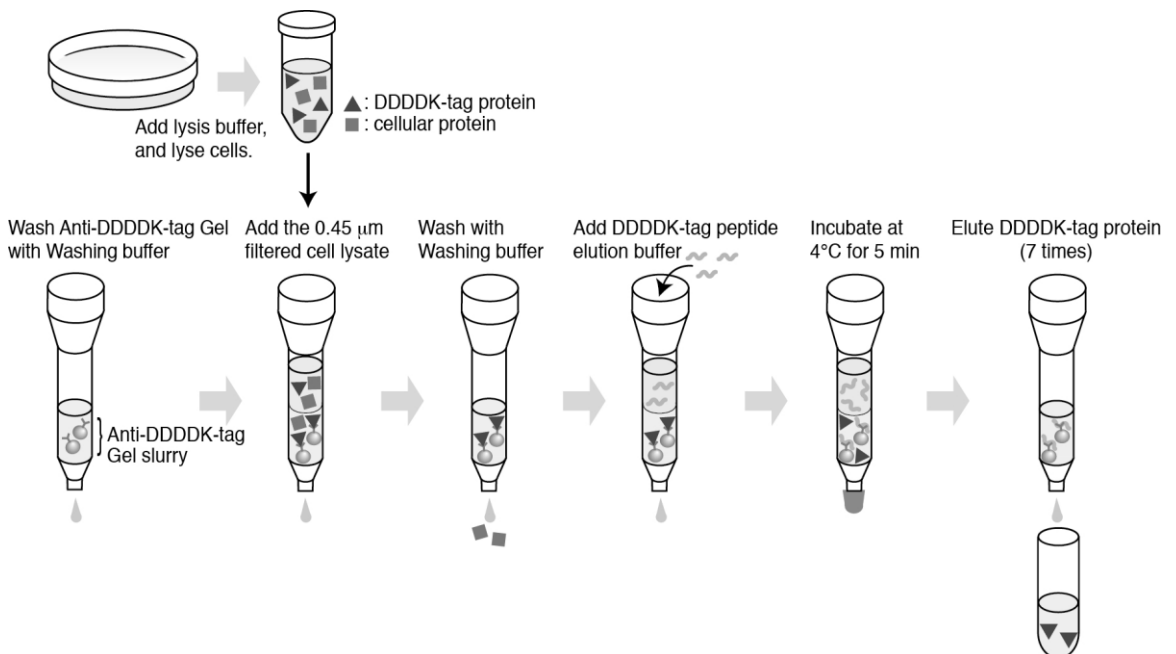
To prevent non-specific protein binding to the gel, salt concentration should be 300-500 mM NaCl.

Elution buffer : 0.1 mg/mL DDDDK-tag peptide in Washing buffer.

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)

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 Gel (see **Additional Information**).
 2. Cellular debris and particulate matter must be removed prior to purification. The protein extract should be centrifuged ($10,000\text{-}20,000 \times g$ for 15 minutes) and filtered with a $0.45 \mu\text{m}$ 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 Washing buffer.
3. Resuspend Anti-DDDDK-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 Washing buffer.

B. Column binding

1. Apply the lysate on the top of the column under gravity flow.
Note: The binding efficiency to Anti-DDDDK-tag Gel depends on the conditions such as a kind of the DDDDK-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 Washing buffer until the OD₂₈₀ is <0.01 .

C. Elution of the DDDDK-tagged protein

1. Prepare 8 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 volume of Elution buffer so that the Gel does not dry.
5. Allow the column to stand at 4°C for 5 minutes. (As the DDDDK-tag peptide competes with DDDDK-tagged protein on the Gel by this incubation, DDDDK-tagged protein is eluted from the Gel.)
6. Remove the bottom cap, and collect the eluate into clean collection tubes (Fraction 1).
7. Add 1 bed volume of Elution buffer, collect the eluate into clean collection tubes (Fraction 2).
8. Repeat the elution and collection step (Step 6 and 7) another 5 times. (Fraction 1-7 contains DDDDK-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 2-8°C in 2 bed volumes of Column storage buffer.

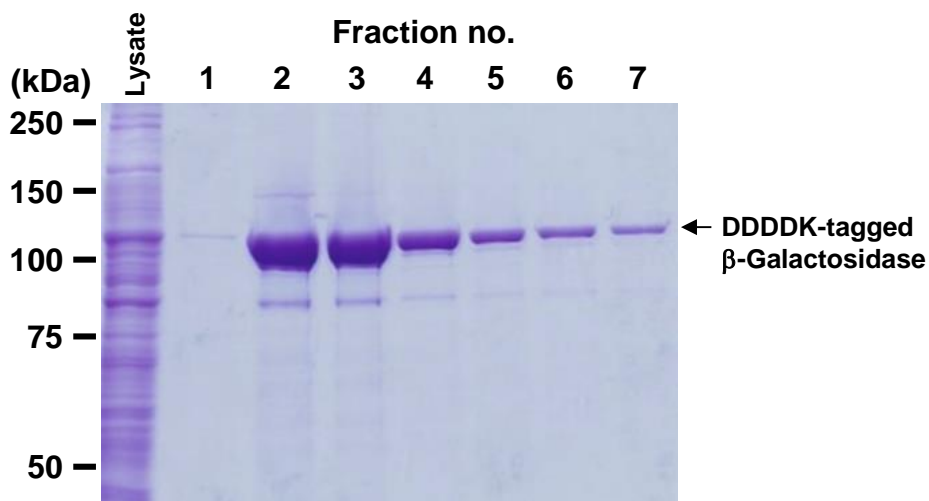
Note: Poured columns containing Anti-DDDDK-tag Gel may be used at least 10 times, depending on the usage conditions.

Related Products:

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

Example of Purification Results 1

Purification of N-terminus DDDDK-tagged β -galactosidase

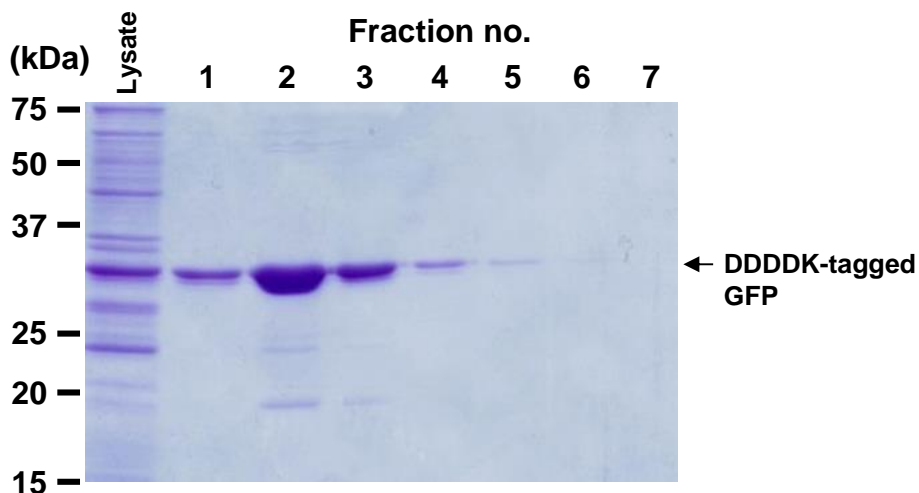


SDS-PAGE (Coomassie Brilliant Blue Staining)

Human embryonic kidney cells (293T) were transfected with pcDNA-DDDDK-tagged 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 0.25 mL. Elution was carried out with 2 mL of 0.1 mg/mL DDDDK-tag peptide. Each fraction was 0.25 mL.

Example of Purification Results 2

Purification of C-terminus DDDDK-tagged GFP from *E.coli* lysate



SDS-PAGE (Coomassie Brilliant Blue Staining)

DDDDK-tagged GFP plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3)RIL and cultured in 5 mL LB media at 27°C for 12 hours. Cells were then lysed in the 5 mL Lysis buffer and purified according to the preceding protocol. Column bed volume was 1 mL. Elution was carried out with 8 mL of 0.1 mg/mL DDDDK-tag peptide. Each fraction was 1 mL.

Additional Information

Several reagents were examined whether or not they were suitable for use with the DDDDK-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	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 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。

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。このゲルは、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 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. 3329R
Anti-DDDDK-tag Gel	25 mL × 1 本

50%スラリー：保存剤として 0.1%の ProClin 150 を含有します。

PBS に 25 mL のビーズが入り 50 mL となっています。

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

CODE No. 3325-205 (1 mg x 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。

精製のキャパシティー

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

32 kDa の DDDDK-tag タンパク質 2 mg を精製した例では 1 mL の Anti-DDDDK-tag Gel を用いて、1.8 mg の DDDDK-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. 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

1-5 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)

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

0.1% NP-40 又は Triton X-100

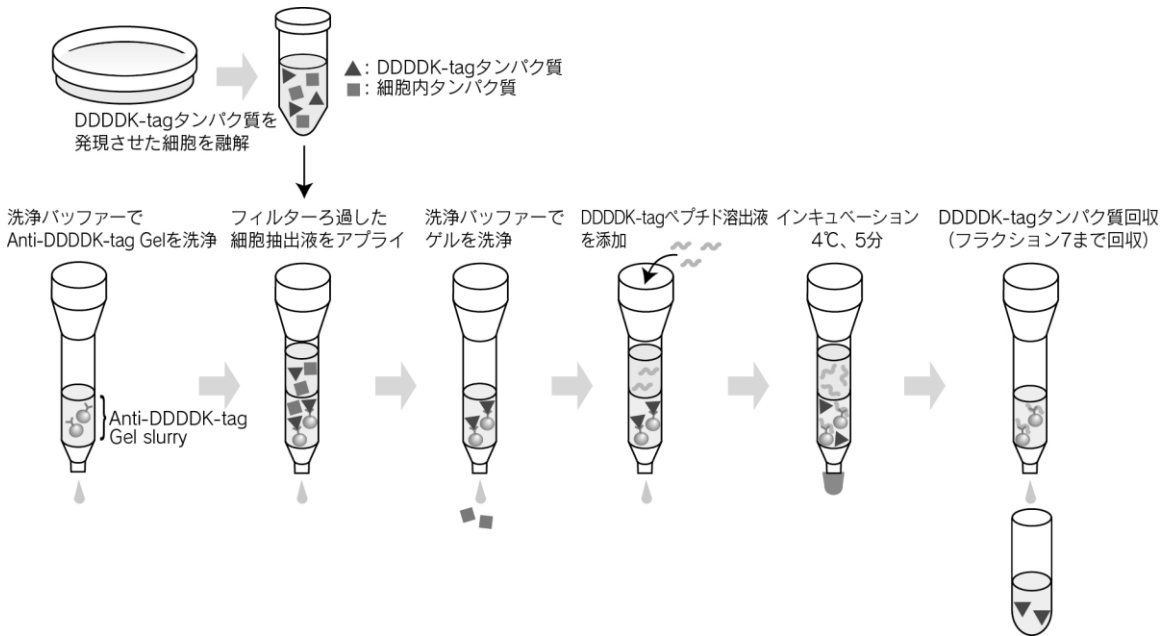
*ゲルへの目的タンパク以外の非特異的吸着を防ぐため、塩濃度を 300-500 mM NaCl とすることをお勧めします。

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 : PBS/Preservative (例 : 0.1% ProClin 150 又は 0.09% NaN₃)

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おりません。また、6 M Guanidine-HCl や 8 M Urea で可溶化したサンプルは、このゲル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 のフィルターを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. カラムを適当量の洗浄バッファーで洗浄します。
3. Anti-DDDDK-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。ボルトテックスは使わないでください。
4. 必要量の Anti-DDDDK-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 倍量の洗浄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. DDDDK-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：DDDDK-tag タンパク質の種類、流速、温度などの条件によって Anti-DDDDK-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-DDDDK-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. カラムを洗浄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. DDDDK-tag タンパク質の溶出

1. ベッドボリュームの 8 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、洗浄バッファーを排出します。
3. Anti-DDDDK-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 4°C で 5 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、DDDDK-tag タンパク質と DDDDK-tag ペプチドの競合が生じ、ゲルから DDDDK-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. 7.8.の操作を繰り返し、Fraction 7 まで回収します。(Fraction 1-7 には DDDDK-tag タンパク質が含まれます。)

D. 再生及び保存

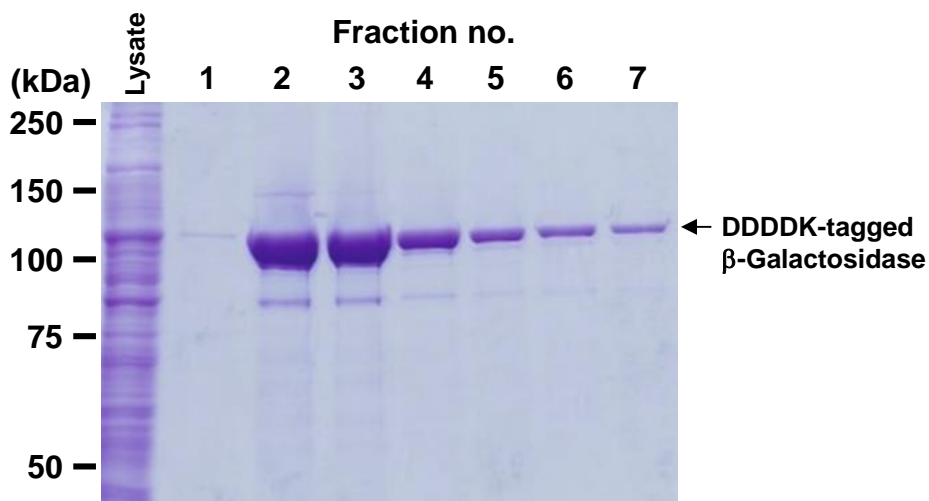
1. カラムをベッドボリュームの 10 倍量の再生バッファーで洗浄します。
2. 直ちにベッドボリュームの 10 倍以上の保存バッファーで洗浄し、排出液の pH が中性に戻っていることを確認します。
3. 保存バッファーを加えて密閉し 2-8°C で保存します。
*使用条件により異なりますが 10 回程度は再使用できます。

関連製品

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

精製の例①

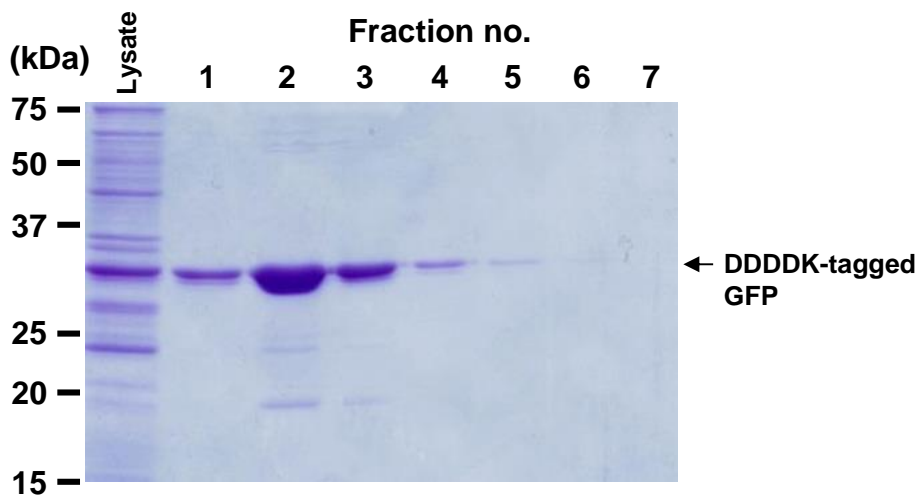
N 末端 DDDDK-tagged β -Galactosidase の精製 (SDS-PAGE クマシー染色)



ヒト胎児腎由来細胞株 (293T) に pcDNA-DDDDK-tagged 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 \times 5 枚) に溶解させ、カラム (Gel vol. 0.25 mL) にアプライし、0.1 mg/mL ペプチドで溶出しました。フラクションは各 0.25 mL です。

精製の例②

Internal DDDDK-tagged GFP の精製 (SDS-PAGE クマシー染色)



5 mL LB 培地で Internal DDDDK-tagged GFP を発現誘導した *E.coli* BL21(DE3)RIL を培養しました。*E.coli* ペレットを 5 mL 細胞溶解バッファーに溶解させ、上清をカラム (Gel vol. 1 mL) にアプライし、0.1 mg/mL ペプチドで溶出しました。フラクションは各 1 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	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 <https://ruo.mbl.co.jp>

e-mail support@mbi.co.jp