

3343A
Lot 004FA~

MBL
A JSR Life Sciences
Company

Printed February 04, 2020
Version 3.1

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

DDDDK-tagged Protein
Magnetic PURIFICATION KIT
(Trial Kit)
(mAb. clone FLA-1)
CODE No. 3343A

*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.

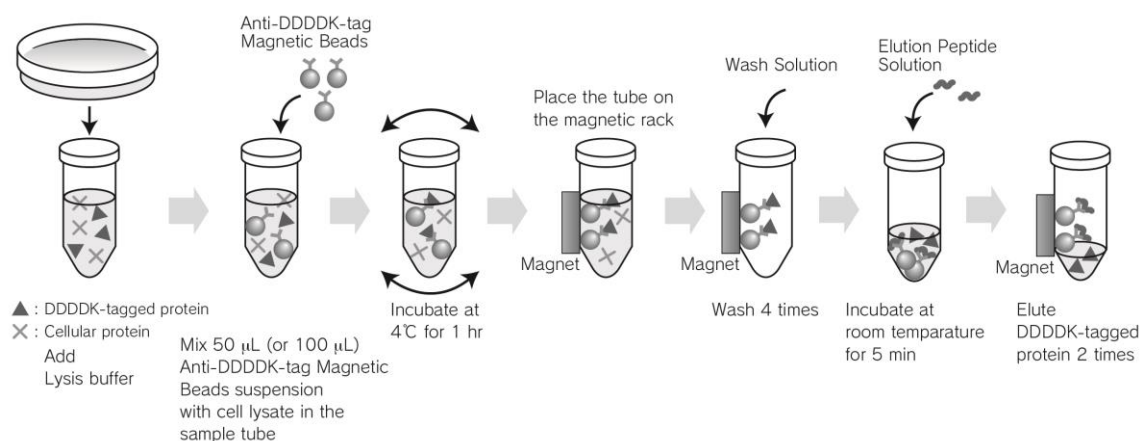
The method of purification is one of the important keys for maintaining protein structure and function. The DDDDK-tagged Protein Magnetic PURIFICATION KIT is designed for the isolation of DDDDK-tagged protein from cell lysates and culture supernatant. Severe conditions such as acidic or alkaline elution can denature protein structure while maintaining a neutral pH can preserve protein activity and conformation. MBL has developed the Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads to quickly and efficiently purify DDDDK-tagged proteins at neutral pH to maintain protein activity and native conformation. The DDDDK-tag peptide competitively elutes the DDDDK-tagged protein from Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads while minimally interfering with protein function.

The affinity of the anti-DDDDK-tag antibody is also very important. Very high affinity antibody cannot be dissociated from the DDDDK-tagged protein, and low affinity antibody is not sufficient for binding. MBL has optimized the affinity of the anti-DDDDK-tag antibody to permit high yields and efficient purification of functional DDDDK-tagged proteins for biochemical studies. This kit is simple and fast, because all procedures of this kit have been optimized.

Kit Components

- 1. Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads** 200 μ L x 1 vial
3 mg magnetic beads in 200 μ L PBS/0.1% BSA with 0.1% ProClin 150 as preservative
- 2. Elution Peptide** 100 μ g x 2 vials (lyophilized)
DDDDK-tag peptide (DYKDDDDK), 100 μ g in 100 μ L PBS after reconstitution
- 3. Wash Concentrate** 1 mL x 1 vial
20 x concentrate

Procedure Summary



Product Capacity

The purification capacity of the Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads varies depending upon the DDDDK tagged protein. For examples, 100 μ L of Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads (100 μ L slurry) can be purified 2.0 μ g of a DDDDK-tagged protein (32 kDa).

Materials Required but not Provided

1. Microcentrifuge capable of 15,000 x g
2. Sampling tube (1.5 mL)
3. End-over-end rotator
4. Magnetic Rack(MBL; code no. 3190)
5. Lysis buffer

Suitable Lysis buffer varies with cell type.

Note: 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).

Storage

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

Protocols

The following protocol is for the isolation of DDDDK-tagged proteins produced in a 100-mm cell culture dish. The expression level of the DDDDK-tagged protein may vary. If necessary, adjust the volume of Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads and Elution Peptide Solution proportionally.

Material Preparation

1. Wash Solution

Dilute Wash Concentrate with 20 times its volume of distilled water. (e.g. Dilute 0.5 mL of Wash Concentrate with 9.5 mL of distilled water.) For each purification, prepare 5 mL of Wash Solution.

2. Elution Peptide Solution

Reconstitute the Elution Peptide with 100 μ L of distilled water. If you want to store the reconstituted Elution Peptide, prepare appropriate aliquots (e.g. 45 μ L x 2 tubes) and store at -20°C. Repeated freezing and thawing is not recommended.

A. Purification from mammalian cultured cell lysate

(DDDDK-tagged protein is not secreted from the cells)

(Lysis of Mammalian Cells)

1. Detach the cells from the culture dish if necessary, and collect the cell suspension into the centrifuge tube.
2. Centrifuge the cell suspension at 400 x g for 5 minutes to pellet the cells. Carefully remove and discard the supernatant.
3. Wash cells by resuspending the cell pellet in ice-cold PBS.
4. Centrifuge the cell suspension at 400 x g for 5 minutes to pellet the cells. Carefully remove and discard the supernatant.
5. Add 0.5 mL of Lysis buffer to the cell pellet and vortex.
6. Incubate the sample for 15 minutes on ice.
7. Remove cell debris by centrifugation at 15,000 x g for 5 minutes at 4°C.

(Purification of DDDDK-tagged Protein)

8. Transfer the 0.5 mL of cell lysate to the 1.5 mL sampling tube.
9. Resuspend Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads by vortexing for a few seconds immediately before dispensing.
10. Dispense 50 μ L of the Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads suspension into the sampling tube prepared in step 8. If necessary, please use 100 μ L of the Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads suspension to increase protein yield.
11. Incubate with gentle end-over-end mixing for 1 hour at 4°C.
12. Place the tube on Magnetic Rack (MBL; code no. 3190) for 10 seconds. And remove the supernatant.
13. Add 1 mL of Wash Solution to the tube. Resuspend the magnetic bead pellet by vortexing for a few seconds.
14. Place the tube on the Magnetic Rack for 10 seconds. And remove the supernatant.
15. Repeat steps 13-14 three additional times.
16. Add 20 μ L Elution Peptide Solution to the tube. Vortex the tube for a few seconds. Incubate for 5 minutes at room temperature.
17. Place the tube on the Magnetic Rack for 10 seconds. Transfer the supernatant to another tube.
18. Repeat steps 16-17 again. The two eluates may be pooled in one sampling tube.

B. Purification from culture supernatant

(DDDDK-tagged protein is secreted into the culture supernatant)

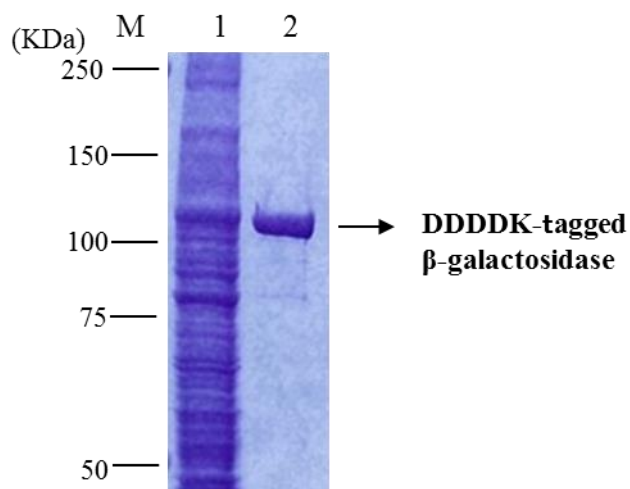
1. Collect the culture supernatant from the cell culture dish into 15 mL centrifuge tube.
2. Centrifuge at 400 x g for 5 minutes to remove cell debris.
3. Transfer the supernatant to new 15 mL centrifuge tube.
4. Resuspend Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads by vortexing for a few seconds immediately before dispensing.
5. Dispense 50 μ L of the Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads suspension into the 15 mL centrifuge tube with culture supernatant. If necessary, please use 100 μ L of the Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads suspension to increase protein yield.
6. Incubate with gentle end-over-end mixing for 1 hour at 4°C.
7. Centrifuge at 400 x g for 5 minutes using swinging bucket rotor. Carefully remove the supernatant, but leave 100-400 μ L supernatant above the magnetic bead pellet.

8. Resuspend the magnetic bead pellet in the 100-400 μ L supernatant by vortexing for a few seconds. Transfer the suspension to 1.5 mL sampling tube.
9. Place the tube on Magnetic Rack (MBL; code no. 3190) for 10 seconds. Remove the supernatant.
10. Add 1 mL of Wash Solution to the tube. Resuspend the magnetic bead pellet by vortexing for a few seconds.
11. Place the tube on the Magnetic Rack for 10 seconds. Remove the supernatant.
12. Repeat steps 10-11 three additional times.
13. Add 20 μ L Elution Peptide Solution to the tube. Vortex the tube for a few seconds. Incubate for 5 minutes at room temperature.
14. Place the tube on the Magnetic Rack for 10 seconds. Transfer the supernatant to another tube.
15. Repeat steps 13-14 again. The two eluates may be pooled in one sampling tube.

(Note: Steps 14-18 of protocol A are identical to steps 11-15 of protocol B.)

Example of Purification Result

Purification of DDDDK-tagged β -galactosidase



Lane 1: Input

Lane 2: Eluate (purified using DDDDK-tagged Protein Magnetic PURIFICATION KIT)

Human embryonic kidney (HEK293T) cells were transfected with pcDNA-DDDDK-tagged β -galactosidase and cultured for 60 hours. Cells were then lysed in the Lysis buffer (0.5 mL/100-mm dish) and purified according to the preceding protocol A.

Additional Information

Several reagents were examined whether or not they were suitable for use with the DDDDK-tagged Protein Magnetic PURIFICATION KIT. 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
	NP-40	5%	Yes
	Digitonin	1%	Yes
	n-Octyl-β-D-gulcoside	1%	Yes
Zwitterionic	CHAPS	1%	Yes
	CHAPSO	1%	Yes
Anionic	SDS	0.05%	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 kit up to the indicated concentration. The “No” indicates the reagents cannot be used in the Lysis buffer for this kit at the indicated concentration.

Related Products:

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

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、マイルドな中性条件下で精製できることが理想的です。このキットは、哺乳動物細胞などで発現させた DDDDK-tag 融合タンパク質をマイルドな中性条件下で、磁気ビーズを使い短時間で精製可能にしたキットです。

キットに含まれる抗 DDDDK-tag 磁気ビーズには抗 DDDDK-tag 抗体が結合しています。サンプルチューブの中で DDDDK-tag 融合タンパク質（哺乳動物細胞などで発現させた DDDDK-tag 融合タンパク質など、以下目的タンパク質と略す）と抗 DDDDK-tag 磁気ビーズを混合します。インキュベーション後の洗浄で目的タンパク質以外を洗い流します。続けて過剰量の DDDDK-tag ペプチドを含む溶液を加えることで、目的タンパク質と競合させ、抗 DDDDK-tag 磁気ビーズから目的タンパク質を解離させて回収します。スピナラムを使用することにより、全工程、1 時間 30 分以内（細胞抽出液の調製工程は除く）で迅速に目的タンパク質を精製することができます。

MBL では、このキットのために、最適な親和性を持った抗体を開発しました。抗体と抗原の親和性が弱いと十分な結合が起らず、強すぎると抗体と抗原の解離をマイルドな中性条件下では行うことができません。本キットで使用している抗 DDDDK-tag 抗体は DDDDK-tag 融合タンパク質をマイルドな中性条件下で精製するために最適な親和性を示します。

キット構成

1. Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads 200 μ L x 1 本

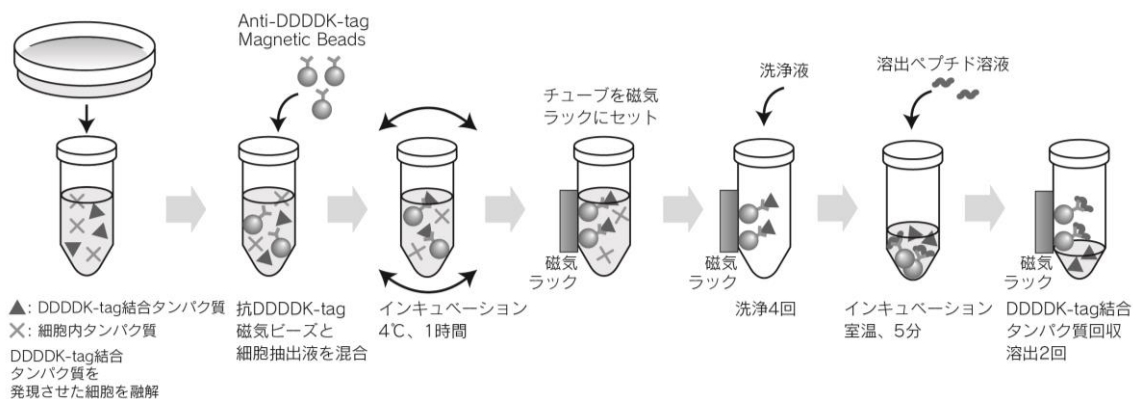
保存剤として 0.1% の ProClin 150 を含有する PBS/0.1% BSA に 3 mg の磁気ビーズが入っています。

2. Elution Peptide 100 μ g x 2 本（凍結乾燥品）

DDDDK-tag ペプチド(DYKDDDDK)、100 μ L の脱イオン水に溶解すると 100 μ g /100 μ L PBS になります。

3. Wash Concentrate 1 mL x 1 本（20 倍濃縮品）

精製法の概略（培養細胞からの精製）



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 融合タンパク質で測定した例では、100 μ L の抗 DDDDK-tag ビーズは 2.0 μ g の DDDDK-tag 融合タンパク質を回収することができました。

必要なもの (Kit 以外)

1. マイクロ遠心機 (15,000 x g まで遠心できるもの)
2. サンプルチューブ (1.5 mL)
3. ローテーター
4. 磁気ラック (MBL; code no. 3190)
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 を加えて下さい。

(例: SIGMA; code P8340, PIERCE; code 78415)

保存

製品有効期限は、出荷後 1 年間です。2-8°C で保存して下さい。凍結は避け下さい。

プロトコル

次のプロトコルは 100-mm dish で培養した哺乳動物細胞で発現させた DDDDK-tag 融合タンパク質を精製する場合の例です。DDDDK-tag 融合タンパク質の発現のレベルはさまざまです。発現させるタンパク質の種類、発現系、細胞の種類、遺伝子導入用試薬あるいは培養日数などに影響されます。必要に応じて、抗 DDDDK-tag ビーズの量と溶出ペプチド溶液の量を調整して下さい。

試薬の準備

1. 洗浄液

Wash Concentrate (20 倍濃縮品) を脱イオン水で 20 倍希釈して下さい。

(例: 0.5 mL の Wash Concentrate に 9.5 mL の脱イオン水を加えて下さい。)

1 回の精製につき 5 mL の洗浄液を用意して下さい。

2. 溶出ペプチド溶液

Elution Peptide (100 µg の DDDDK-tag ペプチド DYKDDDDK を 1 mL の PBS に溶解後、凍結乾燥してあります) に 100 µL の脱イオン水を加えて数回ピペッティングして溶解して下さい。

溶解後の溶出ペプチド溶液を保存する場合は適切な量にサンプルチューブに分注して、-20°C に保存して下さい (例: 45 µL x 2 本)。凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

培養細胞からの精製 (DDDDK-tag 融合タンパク質が細胞外に分泌されない場合)
(細胞抽出液の調製)

1. DDDDK-tag タンパク質を発現させた細胞を 1.5 mL マイクロチューブに移します。
(必要に応じて、培養皿から細胞を剥がして下さい。)
2. 遠心チューブを 400 x g で 5 分間遠心後、上清を捨てます。
3. 冷却した PBS に細胞を懸濁します。
4. 遠心チューブを 400 x g で 5 分間遠心後、上清を捨てます。
5. 0.5 mL の細胞溶解バッファーを細胞ペレットに加え、ボルテックスします。
6. 氷上に 15 分間静置します。
7. 15,000 x g、4°C で 5 分間遠心します。(上清を使用します。)

(DDDDK-tag 融合タンパク質の精)

8. 細胞抽出液 (ステップ 7 の遠心後の上清) 0.5 mL を 1.5 mL サンプルチューブに入れます。
9. 使用直前に Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads が入った容器をボルテックスし、混和して均一なスラリーにします。
10. Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads のサスペンション 50 μ L (タンパク質を多く回収したい場合は 100 μ L) をステップ 8 のサンプルチューブに加えます。
11. サンプルチューブをローターターにセットし、4°C で 1 時間穏やかに転倒混和します。
12. サンプルチューブを磁気ラックにセットし、10 秒静置します。その後上清を取り除きます。
13. 1 mL の洗浄液を加え、ボルテックスすることによりペレットを洗浄液に懸濁します。
14. サンプルチューブを磁気ラックにセットし、10 秒静置します。その後上清を取り除きます。
15. ステップ 13 と 14 を 3 回繰り返します。
16. 20 μ L の溶出ペプチド溶液を洗浄後のサンプルチューブに加えます。サンプルチューブをボルテックスし、ペレットをペプチド溶液に懸濁します。5 分間室温に置きます。
17. サンプルチューブを磁気ラックにセットし、10 秒静置します。溶出した DDDDK-tag 融合タンパク質を別のサンプルチューブに回収します。
18. ステップ 16 と 17 の操作をもう一度繰り返します。溶出した DDDDK-tag 融合タンパク質は 1 つのチューブに合わせて回収してもかまいません。

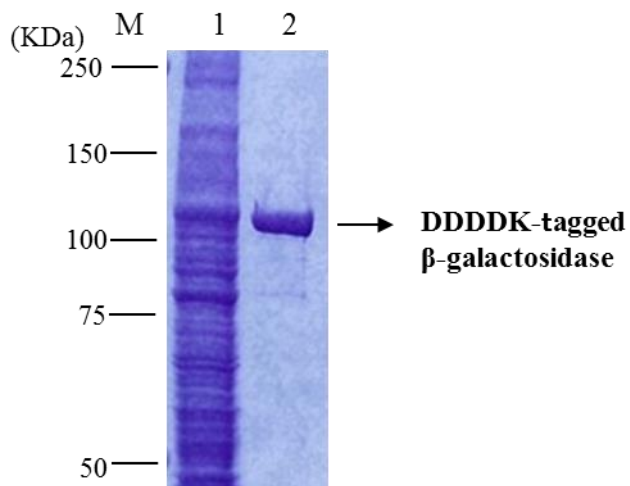
培養上清からの精製 (DDDDK-tag 融合タンパク質が培養上清に分泌されている場合)

1. DDDDK-tag 融合タンパク質を発現させた細胞の培養上清を遠心チューブに集めます。
2. 遠心チューブを 400 x g で 5 分間遠心して細胞を沈殿させます。
3. 培養上清を新しい 15 mL の遠心チューブに移します。
4. 使用直前に Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads が入った容器をボルテックスし、混和して均一なスラリーにします。
5. Anti-DDDDK-tag Magnetic Beads のサスペンション 50 μL (タンパク質を多く回収したい場合は 100 μL) を培養上清の入った遠心チューブに加えます。
6. ローターにセットし、4°C で 1 時間穏やかに転倒混和します。
7. 遠心チューブをスウィングローターにセットし、400 x g で 5 分間遠心します。上清を除きますが、上清を完全に除去しないで、100~400 μL はペレットと一緒に遠心チューブの中に残しておきます。
8. 遠心チューブの中に残した 100~400 μL の上清とペレットをピペティングを数回繰り返すことによって懸濁します。
9. ペレットと 100~400 μL の上清の懸濁液を 1.5 mL サンプルチューブに移します。
10. サンプルチューブを磁気ラックにセットし、10 秒静置します。その後上清を取り除きます。
11. 1 mL の洗浄液を加え、ボルテックスすることにより磁気ビーズを洗浄液に懸濁します。
12. サンプルチューブを磁気ラックにセットし、10 秒静置します。その後上清を取り除きます。
13. ステップ 11 と 12 を 3 回繰り返します。
14. 20 μL の溶出ペプチド溶液を洗浄後のサンプルチューブに加えます。サンプルチューブをボルテックスし、磁気ビーズをペプチド溶液に懸濁します。5 分間室温に置きます。
15. サンプルチューブを磁気ラックにセットし、10 秒静置します。溶出した DDDDK-tag 融合タンパク質を別のサンプルチューブに回収します。
16. ステップ 14 と 15 の操作をもう一度繰り返します。溶出した DDDDK-tag 融合タンパク質は 1 つのチューブに合わせて回収してもかまいません。

(注意: 培養細胞からの精製プロトコルの 14-18 は培養上清からの精製プロトコルの 12-16 と同じです)

精製の例

DDDDK-tag 融合 β -galactosidase タンパク質の精製



Lane1: Input

Lane2: Eluate (purified using HA-tagged Protein Magnetic PURIFICATION KIT)

ヒト胎児腎由来細胞株 (HEK293T) 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 (0.5 mL/100-mm dish) に溶解させ、プロトコルに記載した方法で精製しました。

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、本キットで使えるか調べました。

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
	NP-40	5%	Yes
	Digitonin	1%	Yes
	n-Octyl-β-D-gulcoside	1%	Yes
Zwitterionic	CHAPS	1%	Yes
	CHAPSO	1%	Yes
Anionic	SDS	0.05%	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。

関連製品 : 当社のウェブサイト <https://ruo.mbl.co.jp> をご覧ください。

発売元



株式会社 医学生物学研究所

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

e-mail support@mbl.co.jp