

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

# His tagged Protein PURIFICATION KIT

(MoAb. clone 2D8)

CODE No. 3310

*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.

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 bind 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 KIT 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. MBL has developed the Anti-His tag Beads to purify His tagged proteins quickly and efficiently. As the Beads can be used at neutral pH, the purified proteins can maintain the activity and conformation. The elution of His tagged proteins from the Beads is achieved by the addition of the 6xHis peptide. As the 6xHis peptide competes with His tagged proteins on the Beads, the purified proteins do not lose the protein activity. The simple procedures of this kit have been optimized by using a Spin Column resulting in high efficiency.

## **Kit Components**

Components sufficient for conducting 20 times purifications of His tagged protein.

- |                              |  |
|------------------------------|--|
| <b>1. Anti-His tag Beads</b> | 25% slurry: 100 $\mu$ L beads in 400 $\mu$ L total volume in PBS with 0.1% ProClin 150 as preservative |
| <b>2. Elution Peptide</b>    | 6xHis peptide, 2 mg in 1 mL PBS after reconstitution   |
| <b>3. Spin Columns Sets</b>  | 20 columns with pre-inserted bottom plugs and top caps   |
| <b>4. Wash Concentrate</b>   | 10x concentrate, 6 mL x 2 tubes  |

## **Storage**

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

## **Product Capacity**

The purification capacity of the Anti-His tag Beads varies depending upon the His tagged protein. For examples, 5  $\mu$ L of Anti-His tag Beads (20  $\mu$ L slurry) bound 5  $\mu$ g of a His tagged protein (32 kDa) and eluted 3  $\mu$ g of purified protein.

## **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. PBS
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).

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

## **Protocols**

### **Introduction**

The kit 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 can not be purified using this Kit (see Additional Information).

There are two Protocols included in the kit: Protocol I and II. The purity and yield of the His tagged protein can often be improved by increasing the wash volume and wash times. Protocol I can be performed easily and adapted to the expected large amount of His tagged protein to be purified. Protocol II includes increasing the wash volume and wash times. Protocol II can be adapted to obtain higher purity and yield of the His tagged protein. We recommend Protocol II when His tagged protein is expected low expression or expressed using mammalian expression systems.

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

### **Material Preparation**

#### 1. Wash Solution

Dilute Wash Concentrate with 9 times its volume of distilled water.  
(e.g. Dilute 0.1 mL of Wash Concentrate with 0.9 mL of distilled water.)

Protocol I; For each Spin Column, prepare 1 mL of Wash Solution.

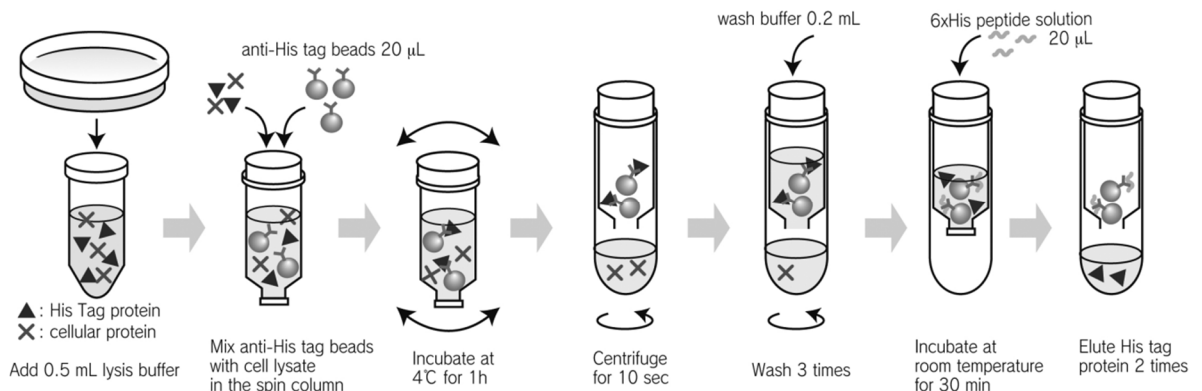
Protocol II; For each Spin Column, prepare 6 mL of Wash Solution.

#### 2. Elution Peptide Solution

Reconstitute the Elution Peptide with 1 mL of distilled water. If you want to store the reconstituted Elution Peptide, prepare appropriate aliquots (e.g. 45  $\mu$ L x 20 tubes) and store at -20°C. Repeated freezing and thawing is not recommended.

## **Protocol I**

### **Procedure Summary (Purification from mammalian cultured cell lysate)**



### **A. Purification from mammalian cultured cell lysate**

**(His 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. Sonicate the sample for 15 seconds.
7. Incubate the sample for 15 minutes on ice.
8. Remove cell debris by centrifugation at 15,000 x g for 5 minutes at 4°C.

#### **(Purification of His tagged Protein)**

9. Transfer the 0.5 mL of cell lysate (supernatant from step 8) to the Spin Column.
10. Resuspend the Anti-His tag Beads by tapping and inverting the vial several times immediately before dispensing. Don't vortex.
11. Dispense 20  $\mu$ L Anti-His tag Beads suspension (5  $\mu$ L Beads) into the Spin Column. Screw on the cap.
12. Incubate with gentle end-over-end mixing for 1 hour at 4°C. If the Spin Column does not fit your end-over-end rotator, put it in a suitable tube (e.g. 15 mL centrifuge tube) that fits your end-over-end rotator.
13. Loosen the top cap on the column. Remove the bottom plug. Don't discard the bottom plug. Place the Spin Column in a sampling tube. Centrifuge for 10 seconds. Discard the flow-through (or save for future analysis).
14. Take off the top cap. Keep the bottom plug off. Place the Spin Column in a sampling tube.
15. Add 0.2 mL of Wash Solution to each column. It is not necessary to stir the Spin Column. Centrifuge for 10 seconds. Discard the flow-through. Repeat this step two additional times.
16. Place the Spin Column in a new sampling tube.

17. For the first elution, screw the bottom plug on tightly. Add 20  $\mu$ L Elution Peptide Solution to the Anti-His tag Beads, then screw the top cap on tightly. Tap the tube gently several times. Incubate for 30 minutes at room temperature. Remove the top cap and bottom plug. Centrifuge for 10 seconds.
18. For the second elution, it is not necessary to place the bottom plugs and top cap on the Spin Column. Add 20  $\mu$ L Elution Peptide Solution to the Anti-His tag Beads, then tap the tube gently several times. Incubate for 5 minutes at room temperature. Centrifuge for 10 seconds. The two eluates (step 17 and 18) may be pooled in one sampling tube.

## **B. Purification from culture supernatant**

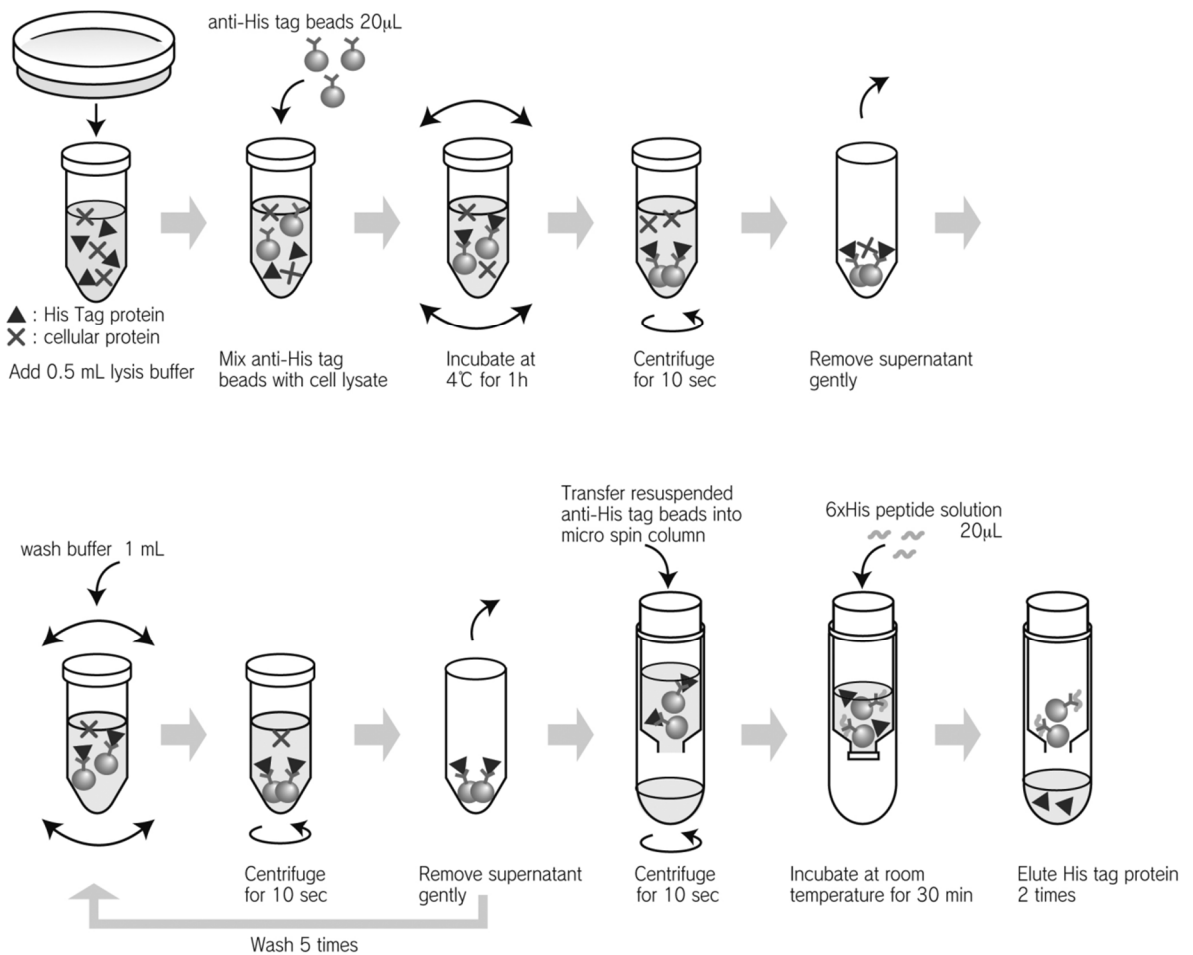
**(His tagged protein is secreted into the culture supernatant)**

1. Collect the culture supernatant from the cell culture dish into a 15 mL centrifuge tube.
2. Centrifuge at 400 x g for 5 minutes to remove cell debris.
3. Transfer the supernatant to a new 15 mL centrifuge tube.
4. Resuspend the Anti-His tag Beads by tapping and inverting the vial several times immediately before dispensing. Don't vortex.
5. Dispense 20  $\mu$ L Anti-His tag Beads suspension (5  $\mu$ L beads) into the 15 mL centrifuge tube with culture supernatant. Screw on the cap.
6. Incubate with gentle end-over-end mixing for 1 hour at 4°C.
7. Centrifuge at 400 x g for 5 minutes. Discard the supernatant (or save for future analysis), but leave 100-400  $\mu$ L supernatant above the Anti-His tag Beads.
8. Resuspend the Anti-His tag Beads in the 100-400  $\mu$ L supernatant by pipetting up and down several times.
9. Transfer the resuspended Anti-His tag Beads in 100-400  $\mu$ L supernatant to the Spin Column.
10. Keep the top cap off. Remove the bottom plug. Don't discard the bottom plug. Place the Spin Column in a sampling tube. Centrifuge for 10 seconds. Discard the flow-through (or save for future analysis). Keep the bottom plug off. Place the Spin Column in a sampling tube.
11. Add 0.2 mL of Wash Solution to each column. It is not necessary to stir the Spin Column. Centrifuge for 10 seconds. Discard the flow-through. Repeat this step two additional times.
12. Place the Spin Column in a new sampling tube.
13. For the first elution, screw the bottom plug on tightly. Add 20  $\mu$ L Elution Peptide Solution to the Anti-His tag Beads, then screw the top cap on tightly. Tap the tube gently several times. Incubate for 30 minutes at room temperature. Remove the top cap and bottom plug. Centrifuge for 10 seconds.
14. For the second elution, it is not necessary to place the bottom plugs and top cap on the Spin Column. Add 20  $\mu$ L Elution Peptide Solution to the Anti-His tag Beads, then tap the tube gently several times. Incubate for 5 minutes at room temperature. Centrifuge for 10 seconds. The two eluates (step 13 and 14) may be pooled in one sampling tube.

(**Note:** Steps 11-14 of this protocol are identical to steps 15-18 of the first protocol.)

## Protocol II

### Procedure Summary (Purification from mammalian cultured cell lysate)



### **Purification from mammalian cultured cell lysate**

**(His 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. Sonicate the sample for 15 seconds.
7. Incubate the sample for 15 minutes on ice.
8. Remove cell debris by centrifugation at 15,000 x g for 5 minutes at 4°C.

### **(Purification of His tagged Protein)**

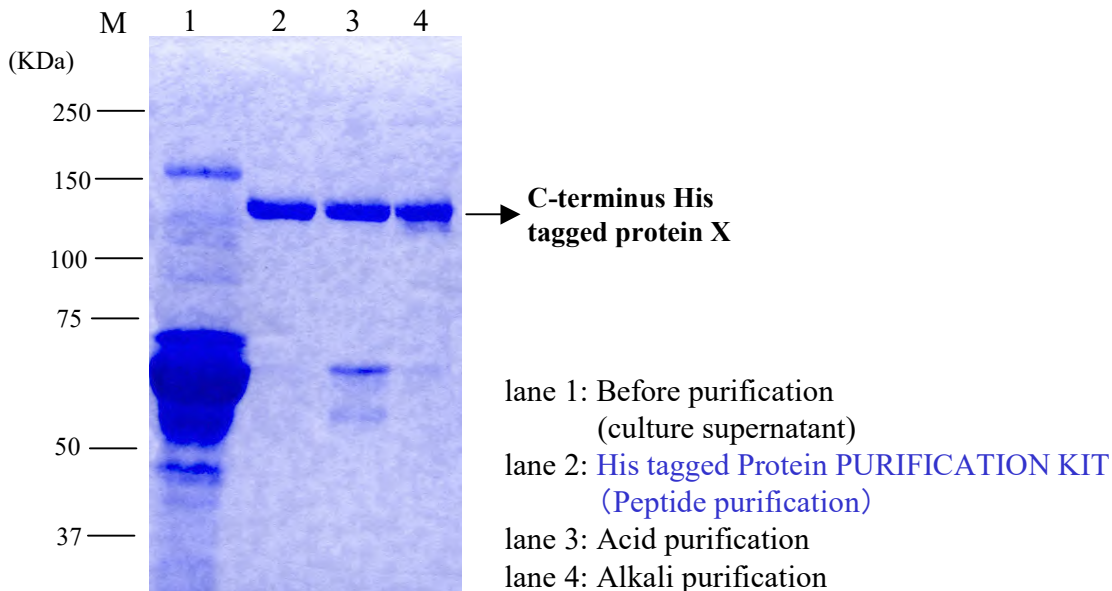
9. Transfer the 0.5 mL of cell lysate (supernatant from step 8) to a 1.5 mL sampling tube.
10. Resuspend the Anti-His tag Beads by tapping and inverting the vial several times immediately before dispensing. Don't vortex.
11. Dispense 20  $\mu$ L Anti-His tag Beads suspension (5  $\mu$ L Beads) into the sampling tube (step 9).
12. Incubate with gentle end-over-end mixing for 1 hour at 4°C.
13. Centrifuge for 10 seconds. Carefully remove and discard the supernatant (or save for future analysis) using a micropipette. Don't aspirate beads or disturb bead pellet.
14. Add 1 mL of Wash Solution to the sampling tube. Inverting the sampling tube several times and centrifuge for 10 seconds. Carefully remove and discard the supernatant using a micropipette. Don't aspirate beads or disturb bead pellet. Repeat this step four additional times\*.  
**\*Note;** Each laboratory is recommended to confirm its own appropriate washing times, because the purity of the His tagged protein may vary depending upon your expression system and so on.
14. Take off the top cap. Keep the bottom plug off. Place the Spin Column in a sampling tube. Don't discard the bottom plug.
15. Add 0.2 mL of Wash Solution to the sampling tube. Resuspend Anti-His tag Beads by pipetting up and down several times. Transfer the resuspended Anti-His tag Beads to the Spin Column. Place the Spin Column in a new sampling tube.
16. Centrifuge for 10 seconds. Discard the flow-through.
17. Place the Spin Column in a new sampling tube.
18. For the first elution, screw the bottom plug on tightly. Add 20  $\mu$ L Elution Peptide Solution to the Anti-His tag Beads, then screw the top cap on tightly. Tap the tube gently several times. Incubate for 30 minutes at room temperature. Remove the top cap and bottom plug. Centrifuge for 10 seconds.
19. For the second elution, it is not necessary to place the bottom plugs and top cap on the Spin Column. Add 20  $\mu$ L Elution Peptide Solution to the Anti-His tag Beads, then tap the tube gently several times. Incubate for 5 minutes at room temperature. Centrifuge for 10 seconds. The two eluates (step 18 and 19) may be pooled in one sampling tube.

### **Related Products:**

Please visit our web site <https://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 0.5 mL of cultured medium according to the preceding protocol I-B. For comparison, elution was carried out not only with peptide solution but also with acid solution and alkaline solution. Each purification was conducted with the same amount of Anti-His tag Beads (5  $\mu$ L) and the same amount of elution solution (20  $\mu$ L x 2 times and then pooled).

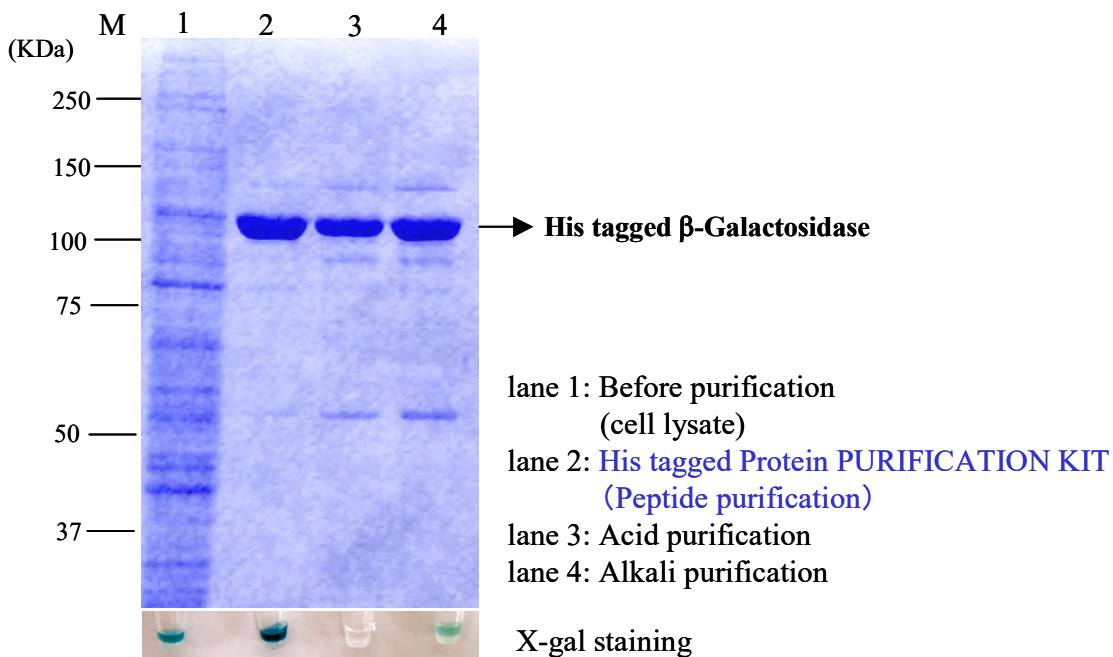
Peptide elution solution: neutral pH

0.1 M Glycine-HCl: pH 3.0 (Neutralize the elution immediately with 1 M Tris-HCl, pH 8.0)  
(Acid elution solution)

0.1 M  $\text{NH}_3$ : pH 11.3 (Neutralize the elution immediately with 1 N acetic acid)  
(Alkali elution solution)

## Example of Purification Results 2

### Purification and enzymatic activity of N-terminus His tagged $\beta$ -galactosidase



### SDS-PAGE (Coomassie Brilliant Blue Staining) & X-gal staining

Human embryonic kidney cells (293T) were transfected with pcDNA-His- $\beta$ -galactosidase and cultured for 60 hours. Cells were then lysed in the Lysis buffer (1 mL/100-mm dish) and purified according to the preceding protocol II. For comparison, elution was carried out not only with peptide solution but also with acid solution and alkaline solution. Each purification was conducted with the same amount of Anti-His tag Beads (5  $\mu$ L) and the same amount of elution solution (20  $\mu$ L x 2 times and then pooled).

Peptide elution solution: neutral pH

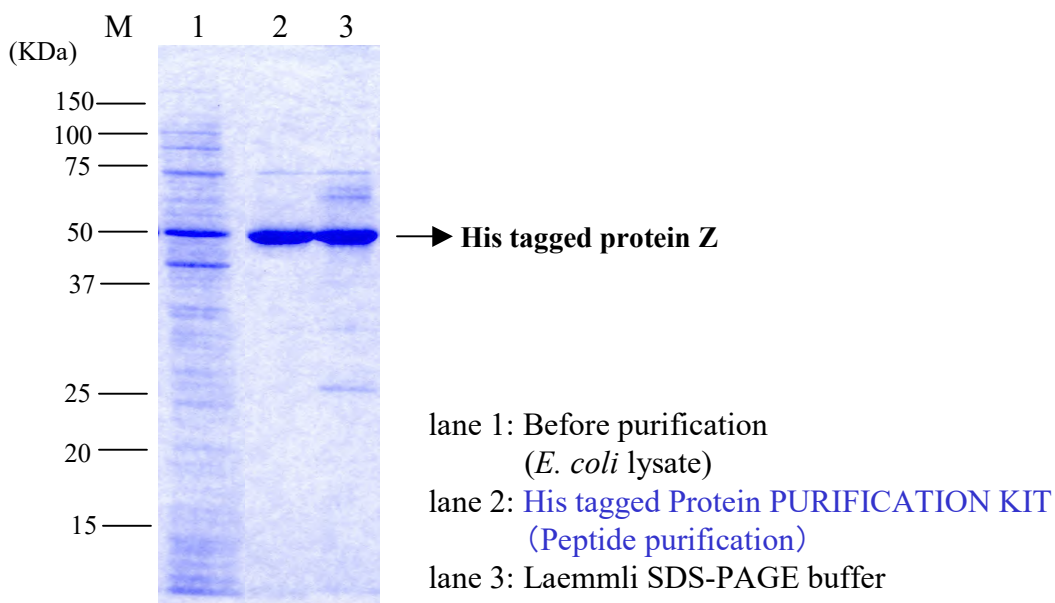
0.1 M Glycine-HCl: pH 3.0 (Neutralize the elution immediately with 1 M Tris-HCl, pH 8.0)  
(Acid elution solution)

0.1 M  $\text{NH}_3$ : pH 11.3 (Neutralize the elution immediately with 1 N acetic acid)  
(Alkali elution solution)

Enzymatic activity of each purification was performed using standard X-gal staining method.

### Example of Purification Results 3

Purification of N- and C-terminus His tagged protein Z from transformed *E. coli*



#### SDS-PAGE (Coomassie Brilliant Blue Staining)

The transformed competent *E. coli* BL21(DE3) cells were induced by the addition of IPTG in the culture medium (1 mL) to express the N- and C-terminus His tagged protein Z. After an induction period, the cells were pelleted by centrifugation and then resuspended in 0.3 mL of the Lysis buffer. His tagged protein Z was purified according to the preceding protocol I-A. For comparison, elution was carried out not only with peptide solution but also with Laemmli SDS-PAGE buffer. Each purification was conducted with the same amount of Anti-His tag Beads (5  $\mu$ L) and the same amount of elution solution (20  $\mu$ L x 2 times and then pooled).

## Additional Information

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

### Chaotropic agents

<b>Urea</b>	<b>1 M</b>	<b>Yes</b>
<b>Guanidine-HCl</b>	<b>1 M</b>	<b>No</b>

### Reducing agents

<b>DTT</b>	<b>10 mM</b>	<b>Yes</b>
<b>2-Mercaptoethanol</b>	<b>10 mM</b>	<b>Yes</b>

### Surfactants

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

### Others

<b>NaCl</b>	<b>1 M</b>	<b>Yes</b>
<b>Glycerol</b>	<b>10%</b>	<b>Yes</b>
<b>EDTA</b>	<b>10 mM</b>	<b>Yes</b>

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.

## 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、スピncラムを使い簡便に精製可能にしたキットです。

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キットを開発しました。キットに含まれる抗 His tag ビーズには抗 His tag 抗体が結合しています。マイクロスピncラム内で His tag タンパク質を含む溶液と抗 His tag ビーズを混合します。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 ビーズに過剰量の 6×His 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 ペプチドの競合を生じさせ、抗 His tag ビーズから His tag タンパク質を解離させて回収します。

## キット構成

哺乳動物細胞などに発現させた His tag タンパク質を 20 回分精製するための試薬類が含まれます。

- |                              |   |
|------------------------------|---|
| 1. <b>Anti-His tag Beads</b> | 400 $\mu$ L (25%スラリー：保存剤として 0.1%の Proclin 150 を含有する PBS に 100 $\mu$ L のビーズが入っています。) |
| 2. <b>Elution Peptide</b>    | 6×His ペプチド, 2 mg (凍結乾燥品)  |
| 3. <b>Spin Columns Sets</b>  | カラム 20 個とキャップ 20 個  |
| 4. <b>Wash Concentrate</b>   | 6 mL×2 本 (10 倍濃縮品)  |

## 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。凍結は避けて下さい。

## 精製のキャパシティー

精製のキャパシティーは His tag 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 5  $\mu$ g を精製した例では 20  $\mu$ L の抗 His tag ビーズ (25%スラリー) を用いて、3  $\mu$ g の His tag 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. 1.5 mL マイクロチューブ
3. ローテーター
4. PBS
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)

データシート中のプロトコルは参考例です。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。

## プロトコル

以下のプロトコルは 100-mm dish で培養した哺乳動物細胞で発現させた His tag タンパク質を精製する場合の例です。His tag 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、細胞種、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、哺乳動物細胞の培養量や、抗 His tag ビーズの量、溶出ペプチド溶液の量を調整して下さい。

本キットは2つの精製方法を記載しています。通常の前製方法は簡便なプロトコル①ですが、His tag タンパク質の発現量の少ない哺乳動物細胞からの精製や、高純度に His tag タンパク質を精製したい場合はプロトコル②の前製法をお勧めします。

(このキット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前製には適していません。ご注意ください。)

## **試薬の準備**

### 1. 洗浄液

Wash Concentrate (10 倍濃縮品) を超純水で 10 倍希釈して下さい。

(例 : 0.1 mL の Wash Concentrate に 0.9 mL の超純水を加えて下さい。)

プロトコル①で精製を行う場合は 1 回の精製につき 1 mL の洗浄液を用意して下さい。

プロトコル②で精製を行う場合は 1 回の精製につき 6 mL の洗浄液を用意して下さい。

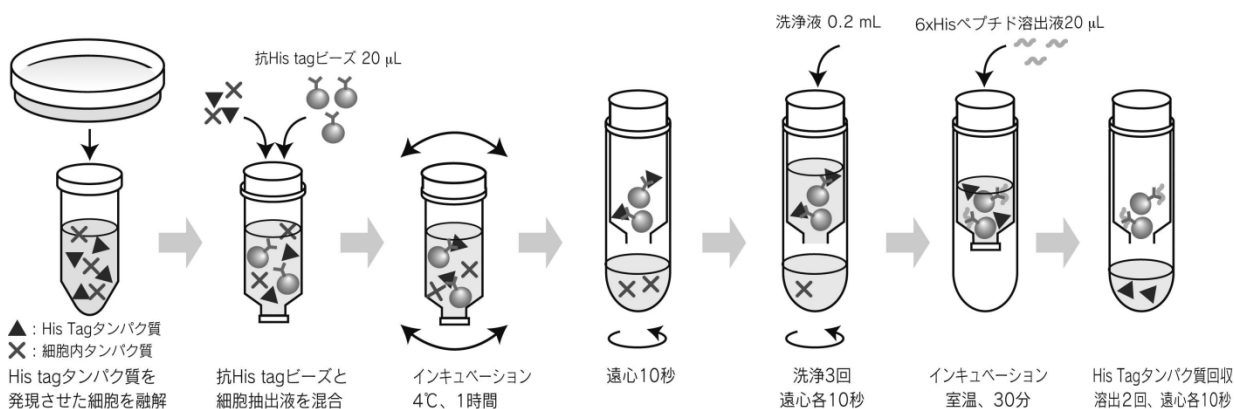
## 2. 溶出ペプチド溶液

Elution Peptide (2 mg の 6×His ペプチドを 1 mL の PBS に溶解後、凍結乾燥してあります) に 1 mL の超純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分注 (例: 45  $\mu$ L x 20 チューブ) して、-20°C に保存して下さい。凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

### プロトコル①

#### 精製法の概略図 (哺乳動物培養細胞からの精製)



#### A. 哺乳動物培養細胞からの精製 (His tag 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. His 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×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×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. 15 秒超音波処理を行います。
7. 15 分間、氷の上に静置して下さい。
8. 4°C、15,000×g で 5 分間遠心します。(上清を使用します。)

## (His tag タンパク質の精製)

9. 細胞抽出液（ステップ 8. 遠心上清）0.5 mL をスピнкаラムに入れます。
10. 使用直前に抗 His tag ビーズの容器を指で弾き、転倒混和することで均一なスラリーにして下さい。ボルテックスはかけないで下さい。
11. スピнкаラムに抗 His tag ビーズのサスペンション 20  $\mu$ L (5  $\mu$ L ビーズ) を加え、キャップをしましず。
12. スピнкаラムをローテーターにセットし、4°C で 1 時間穏やかに転倒混和します。  
ご使用のローテーターにスピнкаラムがセットできない場合は、ローテーターにセットできる適当なチューブ（15 mL の遠心チューブなど）にスピнкаラムを入れてセットして下さい。
13. スピнкаラムの上のキャップをゆるめ、下のプラグを折り取ってください。（折り取った部分はカラムの下のプラグになりますので捨てないでください。） スピнкаラムをマイクロチューブに入れて Flash で 10 秒間遠心します。マイクロチューブの液を捨てます（必要に応じて、後の分析のために取っておきます）。
14. スピнкаラムの上のキャップを取ります。下のプラグは外したままにしておきます。  
スピнкаラムをマイクロチューブに入れます。
15. スピнкаラムに洗浄液を 0.2 mL 入れます。スピнкаラムをゆすったりする必要はありません。  
Flash で 10 秒間遠心しマイクロチューブの液を捨てます。これを 3 回繰り返します。
16. スピнкаラムを新しいマイクロチューブに移します。
17. 下のプラグを開めます。20  $\mu$ L の溶出ペプチド溶液を抗 His tag ビーズに加えます。上のキャップを開めます。マイクロチューブの外から、数回、軽く指で弾いて溶出ペプチド溶液と抗 His tag ビーズをなじませた後、**30 分間室温**に置きます。その後、上のキャップ、下のプラグをはずし、Flash で 10 秒間遠心し、溶出した His tag タンパク質をマイクロチューブに回収します。
18. 2 回目の溶出を行います。再度 20  $\mu$ L の溶出ペプチド溶液を抗 His tag ビーズに加えます。マイクロチューブの外から、数回、軽く指で弾いて溶出ペプチド溶液と抗 His tag ビーズをなじませた後、**室温に 5 分**置きます。（このときは上のキャップ、下のプラグははずしたままでかまいません。）  
Flash で 10 秒間遠心し、溶出した His tag タンパク質をマイクロチューブに回収します。  
ステップ 17 と 18 で溶出した His tag 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。

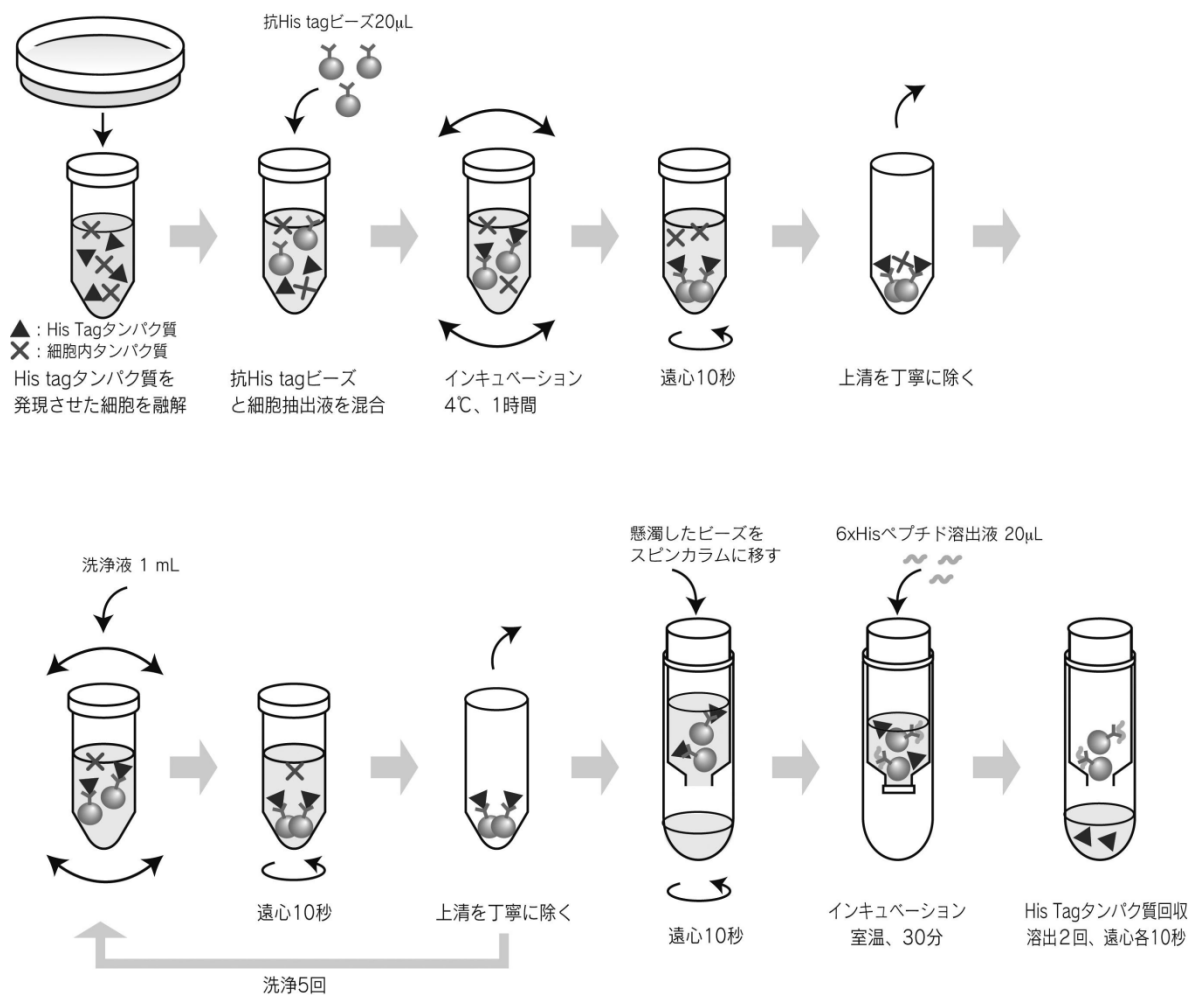
## B. 培養上清からの精製 (His tag タンパク質が培養上清に分泌されている場合)

1. His tag タンパク質を発現させた細胞の培養上清を 15 mL 遠心チューブに集めます。
2. 遠心チューブを 400×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 遠心チューブに移します。
4. 使用直前に抗 His tag ビーズの容器を指で弾き、転倒混和することで均一なスラリーにしてください。  
ボルテックスはかけないでください。
5. 抗 His tag ビーズのサスペンション 20  $\mu$ L (5  $\mu$ L ビーズ) を培養上清の入った遠心チューブに加え  
ます。キャップをします。
6. ローテーターにセットし、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 400×g で 5 分間遠心します。上清を捨てますが (必要に応じて、後の分析のために  
取っておきます)、上清を完全に除去しないで、100~400  $\mu$ L は抗 His tag ビーズといっしょに遠心  
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  $\mu$ L の培養上清と抗 His tag ビーズをピペッティングを数回繰り  
返すことによって懸濁します。
9. 抗 His tag ビーズと 100~400  $\mu$ L の培養上清の懸濁液を下のプラグを折り取ったスピncラムに移し  
ます。(折り取った部分はカラムの下のプラグになりますので捨てないでください。)
10. スピncラムの上のキャップはしません。スピncラムをマイクロチューブに入れて Flash で 10 秒  
間遠心します。マイクロチューブの液を捨てます (必要に応じて、後の分析のために取っておきま  
す)。スピncラムの下のプラグは外したままで、マイクロチューブに入れます。
11. 以下、A. 哺乳動物細胞からの精製 15~18 に従い、精製を行います。

## プロトコル②

### 精製法の概略図 (哺乳動物培養細胞からの精製)

(発現量が低い場合、高純度に精製したい場合)



### (細胞抽出液の調製)

1. プロトコル① A. 培養細胞からの精製 1~8 に従い、細胞抽出液を調製します。

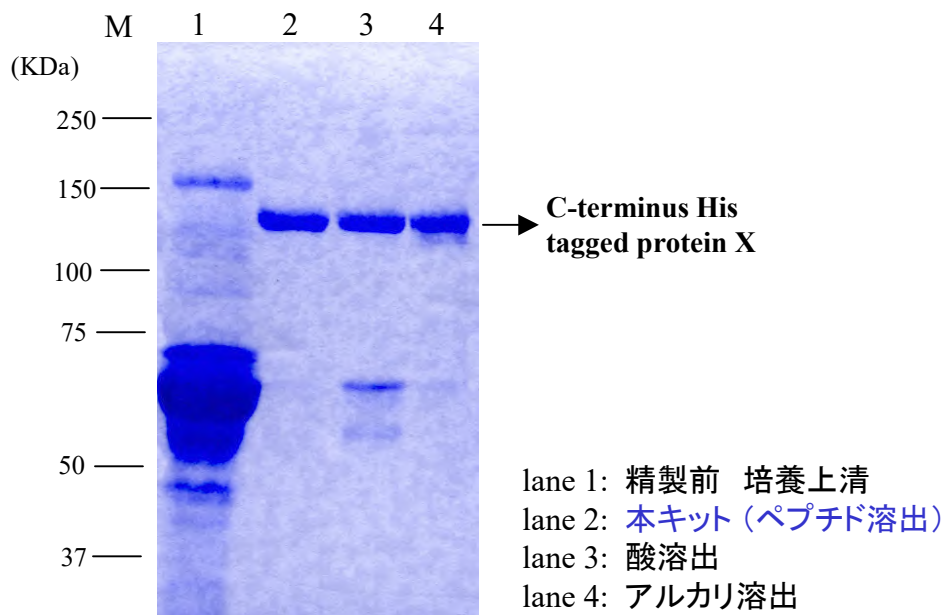
### (His tag タンパク質の精製)

2. 細胞抽出液 0.5 mL を 1.5 mL マイクロチューブに入れます。
3. 使用直前に抗 His tag ビーズの容器を指で弾き、転倒混和することで均一なスラリーにして下さい。  
ボルテックスはかけないで下さい。

4. 抗 His tag ビーズのサスペンション 20  $\mu$ L (5  $\mu$ L ビーズ) を 2. のマイクロチューブに加えます。
5. マイクロチューブをローテーターにセットし、4°C で 1 時間穏やかに転倒混和します。
6. マイクロチューブを Flash で 10 秒間遠心します。ピペットマン等を用いて沈殿したビーズを除去しないように注意してマイクロチューブ内の上清を捨てます。(必要に応じて、後の分析のために取っておきます。)
7. マイクロチューブに 1 mL の洗浄液を入れ、転倒混和し、マイクロチューブを Flash で 10 秒間遠心し、沈殿したビーズを除去しないように注意して上清を捨てます。この操作を 5 回繰り返します。  
(ビーズを洗浄バッファーに懸濁して回数を多く洗浄することで、高純度に His tag タンパク質を精製出来ます。)
8. マイクロチューブに洗浄液を 0.2 mL 入れ、ビーズをよくピペットで混和し、下のプラグを折り取ったスピнкаラムに移します。(折り取った部分はカラムの下のプラグになりますので捨てないでください。) スピнкаラムをマイクロチューブに入れて Flash で 10 秒間遠心します。マイクロチューブの液を捨てます。
9. 以下、**プロトコル① A. 培養細胞からの精製 16~18** に従い、精製を行います。

## 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。培養上清 500  $\mu$ L からプロトコル①に記載した方法で精製しました。比較のために、酸およびアルカリでの溶出も行いました。各々の精製は同じ量の抗 His tag ビーズ (5  $\mu$ L) と同じ量の溶出液 (20  $\mu$ L x 2 回溶出をプール) を用いました。

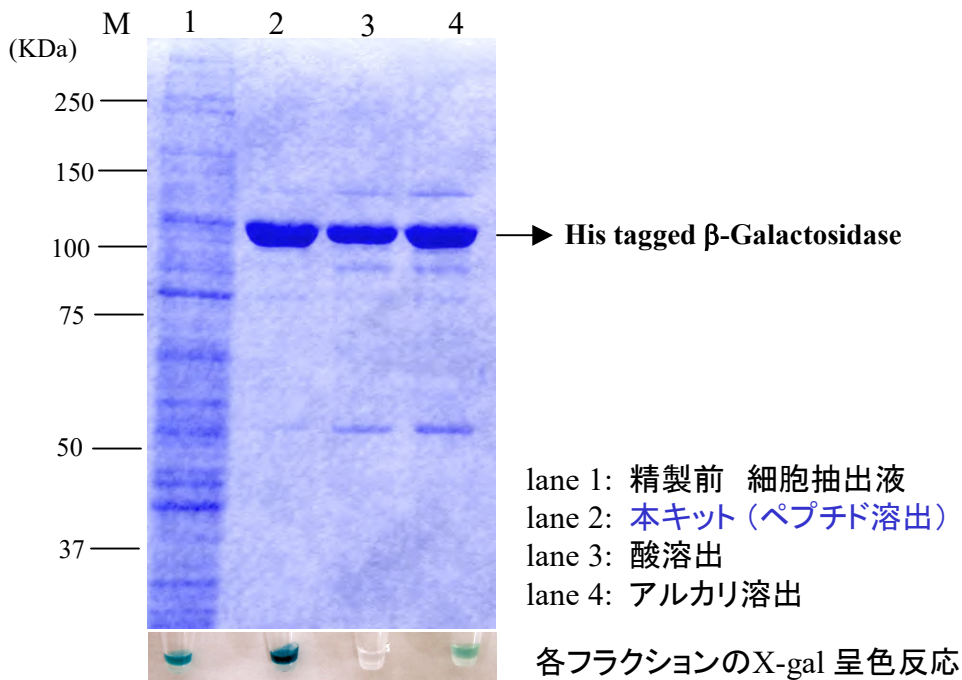
ペプチド溶出液 (本キット) : 中性

0.1 M Glycine-HCl (酸溶出液) : pH 3.0 (溶出後ただちに 1 M Tris-HCl, pH 8.0 で中和)

0.1 M  $\text{NH}_3$  (アルカリ溶出液) : pH 11.3 (溶出後ただちに 1 N  $\text{CH}_3\text{COOH}$  で中和)

## 精製の例②

N 末端 His tag  $\beta$ -Galactosidase の精製 (SDS-PAGE クマシー染色) と酵素活性の確認



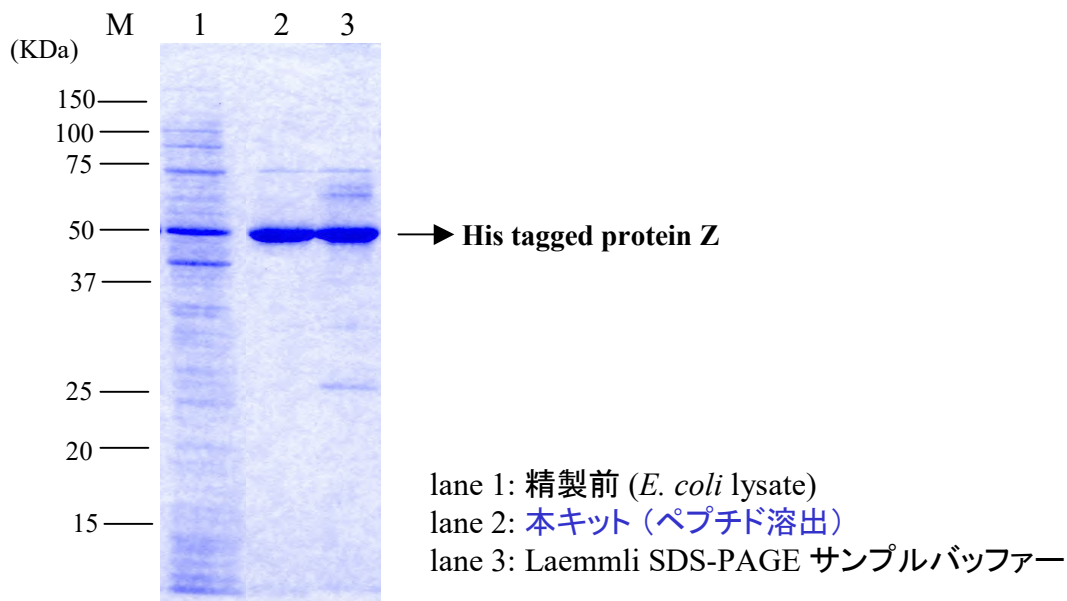
ヒト胎児腎由来細胞株 (293T) に pcDNA-His- $\beta$ -Galactosidase プラスミド DNA をトランスフェクションし、60 時間培養しました。細胞を細胞溶解バッファー (1 mL/100-mm dish) に溶解させ、プロトコル②に記載した方法で精製しました。比較のために、酸およびアルカリでの溶出も行いました。各々の精製は同じ量の抗 His tag ビーズ (5  $\mu$ L) と同じ量の溶出液 (20  $\mu$ L x 2 回溶出をプール) を用いました。

- ペプチド溶出液 (本キット) : 中性
- 0.1 M Glycine-HCl (酸溶出液) : pH 3.0 (溶出後ただちに 1 M Tris-HCl, pH 8.0 で中和)
- 0.1 M  $\text{NH}_3$  (アルカリ溶出液) : pH 11.3 (溶出後ただちに 1 N  $\text{CH}_3\text{COOH}$  で中和)

タンパク質の活性は精製後の His tag  $\beta$ -Galactosidase の酵素活性を X-gal 呈色反応で検定しました。

### 精製の例③

N 末端と C 末端に His tag を融合させたタンパク質 Z の精製 (SDS-PAGE クマシー染色)



pET28a-protein Z プラスミド DNA で形質転換した大腸菌(BL21(DE3))を培養し、IPTG を加えてタンパク質発現を誘導しました。大腸菌ペレットを細胞溶解バッファー (0.3 mL/1 mL *E. coli* culture) に溶解させ、プロトコル①に記載した方法で精製しました。比較のために、SDS-PAGE サンプルバッファーでの溶出も行いました。各々の精製は同じ量の抗 His tag ビーズ (5  $\mu$ L) と同じ量の溶出液 (20  $\mu$ L x 2 回溶出をプール) を用いました。

ペプチド溶出液 (本キット) : 中性

SDS-PAGE サンプルバッファー

## 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。

\* RIPA バッファーは使用可能です。

### **Chaotropic agents**

<b>Urea</b>	<b>1 M</b>	<b>Yes</b>
<b>Guanidine-HCl</b>	<b>1 M</b>	<b>No</b>

### **Reducing agents**

<b>DTT</b>	<b>10 mM</b>	<b>Yes</b>
<b>2-Mercaptoethanol</b>	<b>10 mM</b>	<b>Yes</b>

### **Surfactants**

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

### **Others**

<b>NaCl</b>	<b>1 M</b>	<b>Yes</b>
<b>Glycerol</b>	<b>10%</b>	<b>Yes</b>
<b>EDTA</b>	<b>10 mM</b>	<b>Yes</b>

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。

## Troubleshooting Guide

### Q-1. 目的 His tag タンパク質が回収できないのですが。

A-1. 精製前のサンプル中に His tag タンパク質が存在する事がウエスタンブロット等の検討により明らかであるにもかかわらず、目的の His tag タンパク質が本キットを用いて精製できなかった場合は、実験に用いた His tag ビーズに SDS-PAGE サンプルバッファーを直接加え、5 分間煮沸処理後 SDS-PAGE またはウエスタンブロットにて解析して下さい。その結果、目的のサイズにバンドが確認できない場合は A-2 を、バンドが確認できた場合は A-3 をご参照下さい。

### Q-2. 目的 His tag タンパク質がビーズに吸着しないのですが。

A-2. 次のような原因が考えられます。

本キットはビーズに抗 His tag 抗体を結合させておりますので、不溶性の His tag タンパク質や、アグリゲートしている His tag タンパク質は抗 His tag ビーズに結合しない場合があります。また、このキットはグアニジンおよび高濃度の Urea を含むバッファーは使用できません。データシートの 21 ページに細胞溶解バッファー試薬の使用可否を添付しておりますのでご参照下さい。

### Q-3. 抗 His tag ビーズに His tag タンパク質は結合するのですが、ペプチド溶出バッファーを加えても His tag タンパク質が溶出されないのですが。

A-3. 次のような原因が考えられます。

本キットでは His tag タンパク質の溶出にはペプチド溶出バッファーを加えて室温で 30 分間インキュベーションする必要があります。4°C でのインキュベーションや、インキュベーションの時間が短いと溶出効率が低下します。4°C で溶出する際はペプチド溶液を添加後、一晩インキュベーションして下さい。

また、アグリゲートしやすい His tag タンパク質の場合、ゲルに目的 His tag タンパク質が結合した状態でアグリゲートし、溶出できない場合があります。そのようなサンプルの場合は His tag タンパク質をアグリゲートさせない条件での精製を行ってください。（例；添付の洗浄バッファーに替えて細胞溶解バッファーをゲルの洗浄バッファーとして用いるなど。）

まずは Trial サイズのキット（code no. 3310A）で検討されることをお勧めします。

### Q-4. 使用できる細胞溶解バッファーの種類は？

A-4. データシート 21 ページの試薬の使用可否をご参照ください。NP-40 Lysis buffer、Tween Lysis buffer のように一般的な界面活性剤を含むバッファー、0.1% SDS を含有する RIPA buffer は使用可能です。

### Q-5. 精製する際に His tag の位置は関係しますか？

A-5. His tag の位置はどこであっても精製できます。

当社内検討では、N 末と C 末の 2 箇所 His tag の付いたタンパク質も精製出来ています。データシートの 18~20 ページの精製例①②③をご参照ください。

### Q-6. ペプチド溶出の時の温度を室温ではなく 4°C で行いたいのですが？

A-6. 溶出を 4°C で行った場合、溶出効率は室温の場合に比較して 1/2 以下になります。室温での溶出をお勧めします。（4°C で溶出したい場合はペプチド溶出液を加えて抗 His tag ビーズを一晩インキュベーションしてから溶出して下さい。）

**Q-7. 大腸菌に発現させた His tag タンパク質をインクルージョンボディから精製できますか？**

A-7. このキットは抗 His tag 抗体をカラムに結合させたビーズを用いておりますので、高濃度の Urea や、グアニジンなどの試薬は使用できません。また、不溶性の His tag タンパク質はカラムに結合しませんので使用できません。

**Q-8. 精製法が 2 種類ありますが、プロトコル①と、プロトコル②はどのようなときに使い分ければよいでしょうか。**

A-8. 通常精製法はプロトコル①ですが、哺乳動物細胞内に目的 His tag タンパク質を発現させたケースで、サンプル内に His tag タンパク質の量が 1 µg 以下の場合はプロトコル②での精製をお勧めします。

**Q-9. ペプチド溶出液以外のバッファーで His tag タンパク質の溶出は可能ですか？**

A-9. SDS-PAGE サンプルバッファーや、酸性バッファー（0.1 M Glycine-HCl pH 2.3～3.0 で溶出後、1 M Tris pH 8.0 で中和）、アルカリバッファー（0.1 M アンモニア水 pH 11.3 で溶出、1 N 酢酸で中和）などを用いた溶出が可能です。それらのバッファーで溶出した場合、精製は可能ですが His tag タンパク質の活性は失われます。

技術資料や関連する情報は、ホームページ (<https://ruo.mbl.co.jp>) から利用できます。最新の情報をご利用ください。

発売元

**MBL** MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

URL <https://ruo.mbl.co.jp> e-mail [support@mbi.co.jp](mailto:support@mbi.co.jp)