

**MBL**

A JSR Life Sciences  
Company

Printed August 6, 2019

Version 3.0

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

# **DDDDK tagged Protein PURIFICATION KIT**

(MoAb. clone FLA-1)

CODE No. 3325

*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 KIT 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. MBL has developed the Anti-DDDDK tag Beads to purify DDDDK 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 DDDDK tagged proteins from the Beads is achieved by the addition of the DDDDK tag peptide (DYKDDDDK). As the DDDDK tag peptide competes with DDDDK tagged proteins on the Beads, the purified proteins do not lose the protein activity. Using a Spin Column resulting in high efficiency has optimized the simple procedure of this kit.

## **Kit Components**

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

- |                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>1. Anti-DDDDK 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>      | DDDDK peptide, 1 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>     | 10 x 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-DDDDK tag Beads varies depending upon the DDDDK tagged protein.

For examples, 5  $\mu$ L of Anti-DDDDK tag Beads (20  $\mu$ L slurry) bound 10  $\mu$ g of a DDDDK tagged protein (32 kDa) and eluted 9  $\mu$ g of purified protein.

## **Materials Required but not Provided**

1. Micro centrifuge capable of 15,000 x g
2. Sampling tube (1.5 mL)
3. End-over-end rotator
4. Distilled water
5. Lysis buffer  
Suitable Lysis buffer varies with cell type.  
**Note:** see Additional Information

### Homemade Lysis buffer

20-50 mM	Tris-HCl (pH7.5) or HEPES-KOH (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)

## **Protocols**

The following protocols are 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 Beads and Elution Peptide Solution proportionally.

## **Material Preparation**

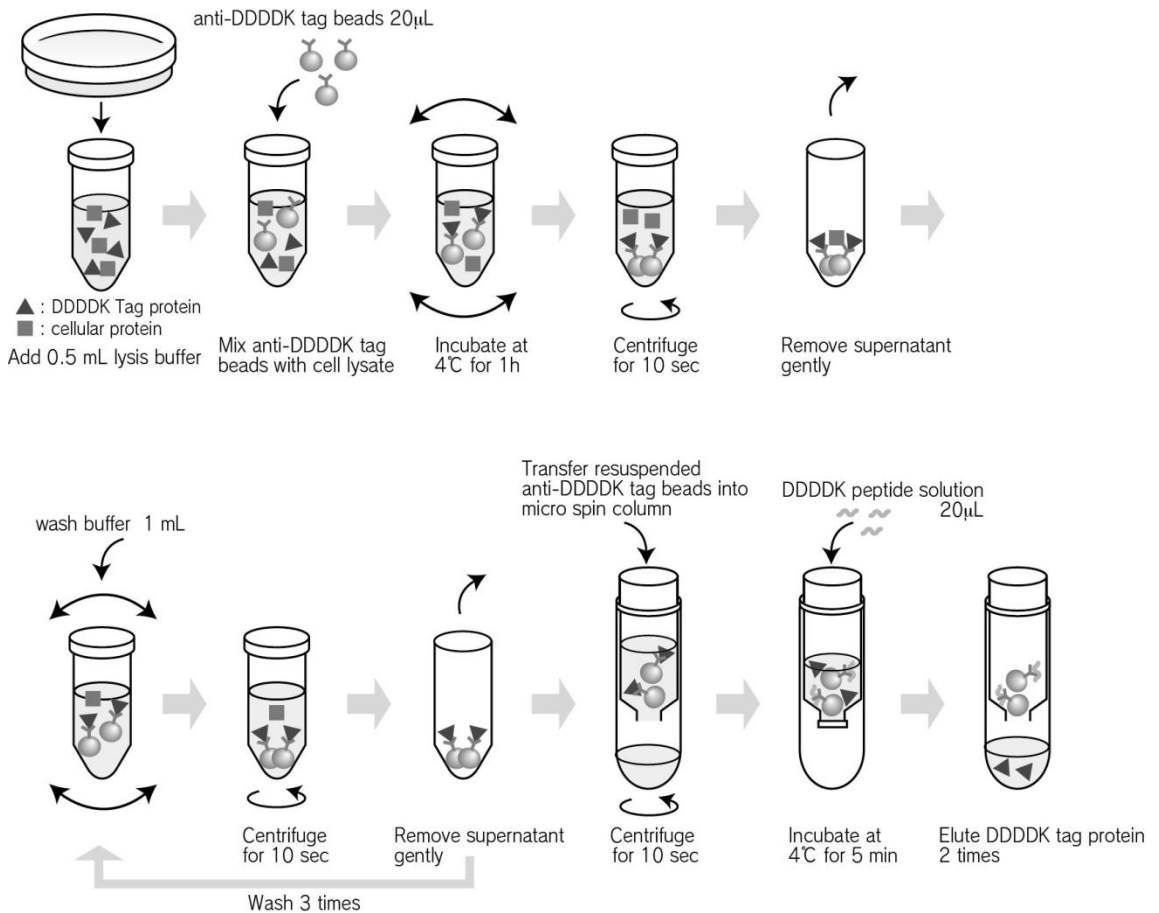
### 1. Wash Solution

Dilute Wash Concentrate with 9 times its volume of distilled water.  
(e.g. Dilute 0.5 mL of Wash Concentrate with 4.5 mL of distilled water.)  
For each Spin Column, prepare 5 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.

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



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

### **(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 DDDDK tagged Protein)**

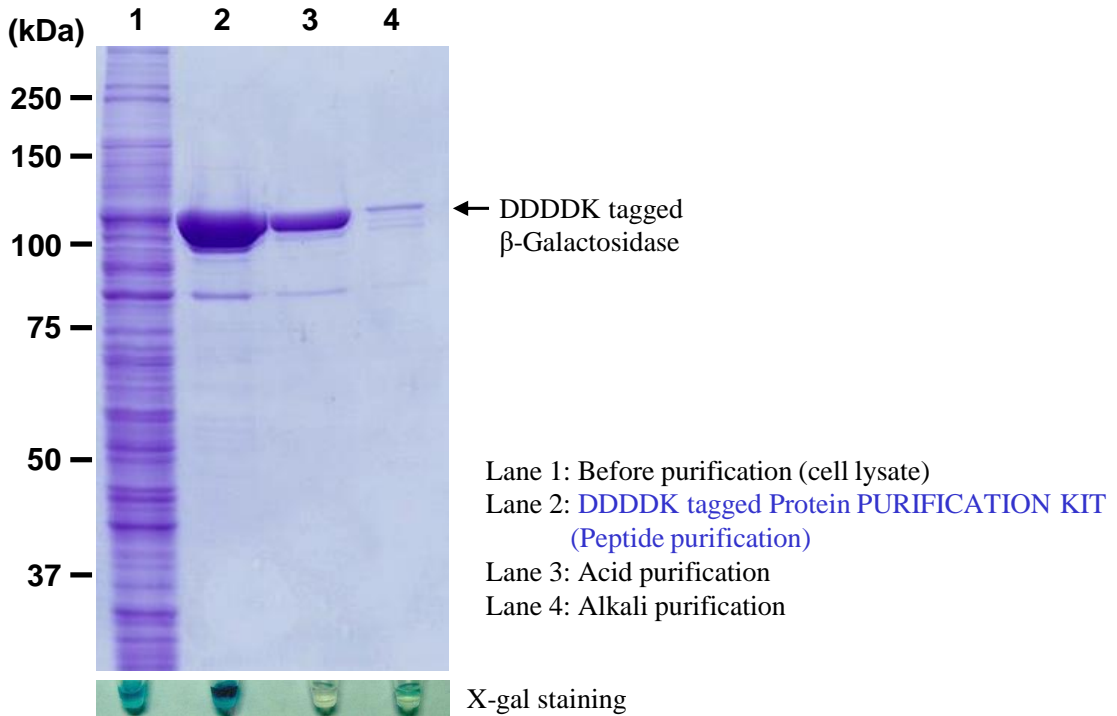
9. Transfer the 0.5 mL of cell lysate (supernatant from step 8) to a 1.5 mL sampling tube.
10. Resuspend the Anti-DDDDK tag Beads by tapping and inverting the vial several times immediately before dispensing. Don't vortex.
11. Dispense 20  $\mu$ L Anti-DDDDK tag Beads suspension (5  $\mu$ L Beads) into the sampling tube (step 9).
12. Incubate with gentle end-over-end mixing for 1 hour at 4°C.
13. Centrifuge at 2,500 x g for 10 seconds. Carefully remove and discard the supernatant (or save for future analysis) using a micropipettor. 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 at 2,500 x g for 10 seconds. Carefully remove and discard the supernatant using a micropipettor. Don't aspirate beads or disturb bead pellet. Repeat this step two additional times.
15. Add 0.2 mL of Wash Solution to the sampling tube. Resuspend the Beads by pipetting up and down several times. Transfer the resuspended the Beads to the Spin Column. Take off the bottom plug.
16. Centrifuge at 2,500 x g 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-DDDDK tag Beads, then screw the top cap on tightly. Tap the tube gently several times. Incubate for 5 minutes at 4°C. Remove the top cap and bottom plug. Centrifuge at 2,500 x g for 10 seconds.
19. For the second elution, add 20  $\mu$ L Elution Peptide Solution to the Anti-DDDDK tag Beads, then tap the tube gently several times. Incubate for 1 minute at 4°C. Centrifuge at 2,500 x g for 10 seconds. The two eluates (step 18 and 19) may be pooled in one sampling tube.

**Related Products:**

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

## Example of Purification Results 1

### Purification and enzymatic activity of N-terminal DDDDK tagged $\beta$ -galactosidase



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

Human embryonic kidney cells (293T) were transfected with pcDNA-DDDDK tagged  $\beta$ -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. 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-DDDDK 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

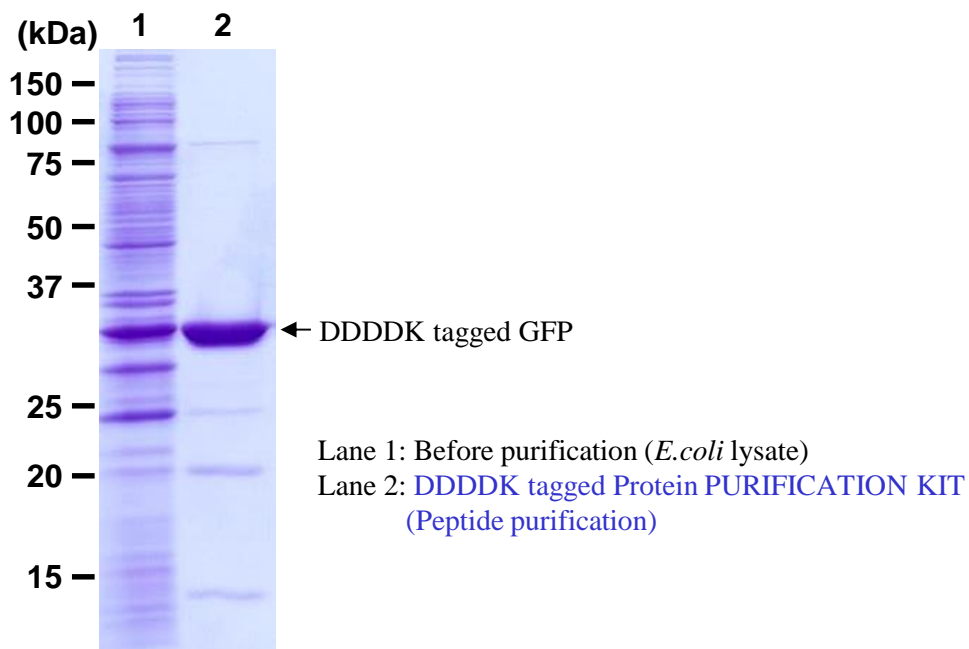
0.1 M Glycine-HCl: pH 3.0 (Neutralize the eluate immediately with 1 M Tris-HCl, pH 8.0)  
(Acid elution solution)

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

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

## Example of Purification Results 2

### Purification of Internal 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 1 mL LB media at 27°C for 12 hours.

Cells were then lysed in the 0.5 mL Lysis buffer and purified according to the preceding protocol.

## Additional Information

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

<b>Chaotropic agents</b>			
	<b>Urea</b>	<b>1 M</b>	<b>Yes</b>
	<b>Guanidine-HCl</b>	<b>1 M</b>	<b>No</b>
<b>Reducing agents</b>			
	<b>DTT</b>	<b>10 mM</b>	<b>Yes</b>
	<b>2-Mercaptoethanol</b>	<b>10 mM</b>	<b>Yes</b>
<b>Surfactants</b>			
<b>Nonionic</b>	<b>Tween-20</b>	<b>5%</b>	<b>Yes</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-<math>\beta</math>-D-glucoside</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>
<b>Others</b>			
	<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。

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。このキットは、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、スピンカラムを使い簡便に精製可能にしたキットです。

本キットには DDDDK tag を特異的に認識する抗 DDDDK tag 抗体が結合したビーズを使用しています。マイクロスピンカラム内で DDDDK tag タンパク質を含む溶液とビーズを混合します。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、ビーズに過剰量の DDDDK 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 ペプチドの競合を生じさせ、ビーズから DDDDK 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 DDDDK 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. **Anti-DDDDK tag Beads** 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. **Elution Peptide** DDDDK ペプチド (DYKDDDDK), 1 mg (凍結乾燥品)
3. **Spin Columns Sets** カラム 20 個とキャップ 20 個
4. **Wash Concentrate** 6 mL (10 倍濃縮品) x 2 本

## 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 DDDDK tag 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 10  $\mu$ g を精製した例では 20  $\mu$ L の抗 DDDDK tag ビーズ (25% スラリー) を用いて、9  $\mu$ g の DDDDK 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. 超純水
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)
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 を加えて下さい。

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

## プロトコール

以下のプロトコールは 100-mm dish で培養した哺乳動物細胞で発現させた DDDDK tag タンパク質を精製する場合の例です。DDDDK 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、ビーズの量、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 (10 倍濃縮品) を超純水で 10 倍希釈して下さい。

(例 : 0.5 mL の Wash Concentrate に 4.5 mL の超純水を加えて下さい。)

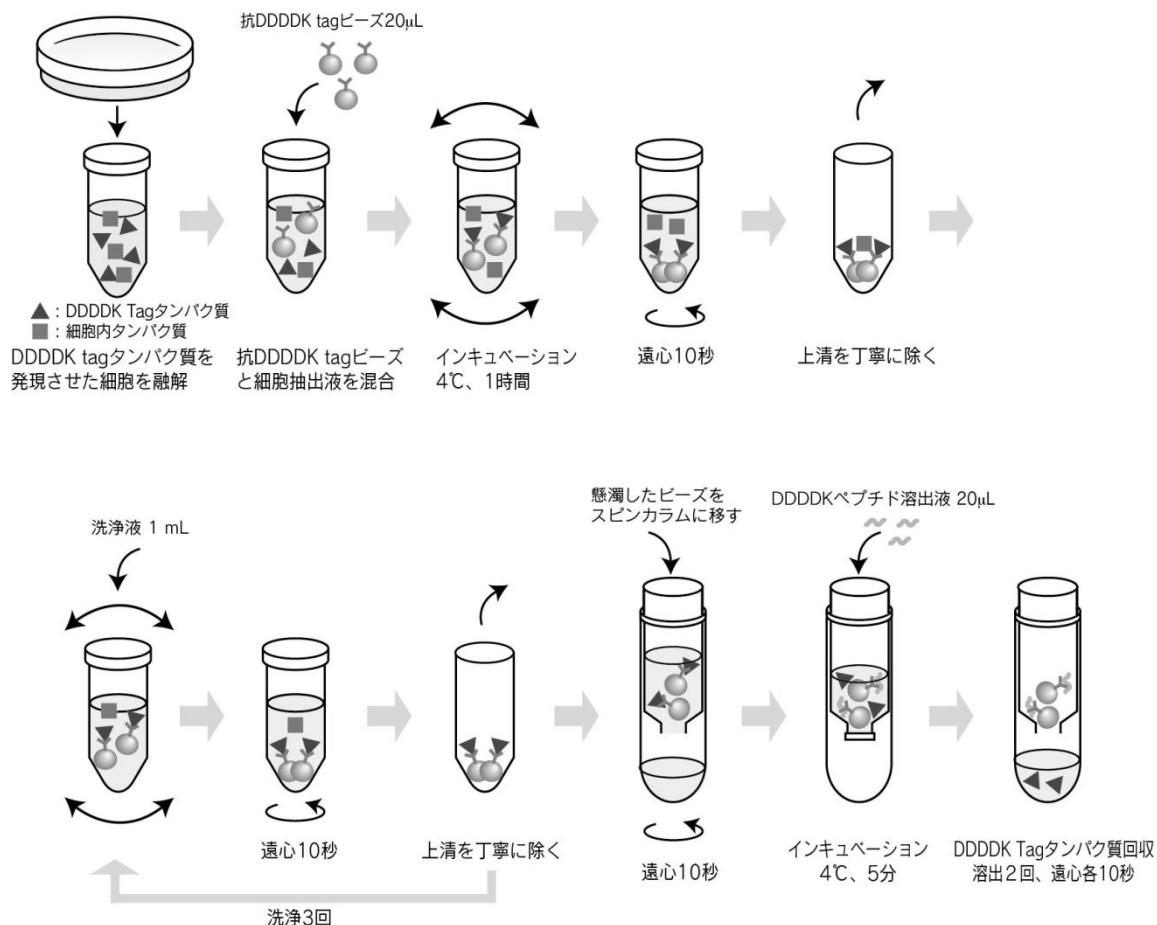
1 回の精製につき 5 mL の洗浄液を用意して下さい。

#### 2. 溶出ペプチド溶液

Elution Peptide (1 mg の DDDDK 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。

## 精製法の概略図



## (細胞抽出液の調製)

- 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。)
- 遠心チューブを 400 x g で 5 分間遠心後、上清を捨てます。
- 冷却した PBS に細胞を懸濁します。
- 遠心チューブを 400 x g で 5 分間遠心後、上清を捨てます。
- 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。
- 15 秒超音波処理を行います。
- 15 分間、氷の上に静置して下さい。
- 15,000 x g、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心します。(上清を使用します。)

## (DDDDK tag タンパク質の精製)

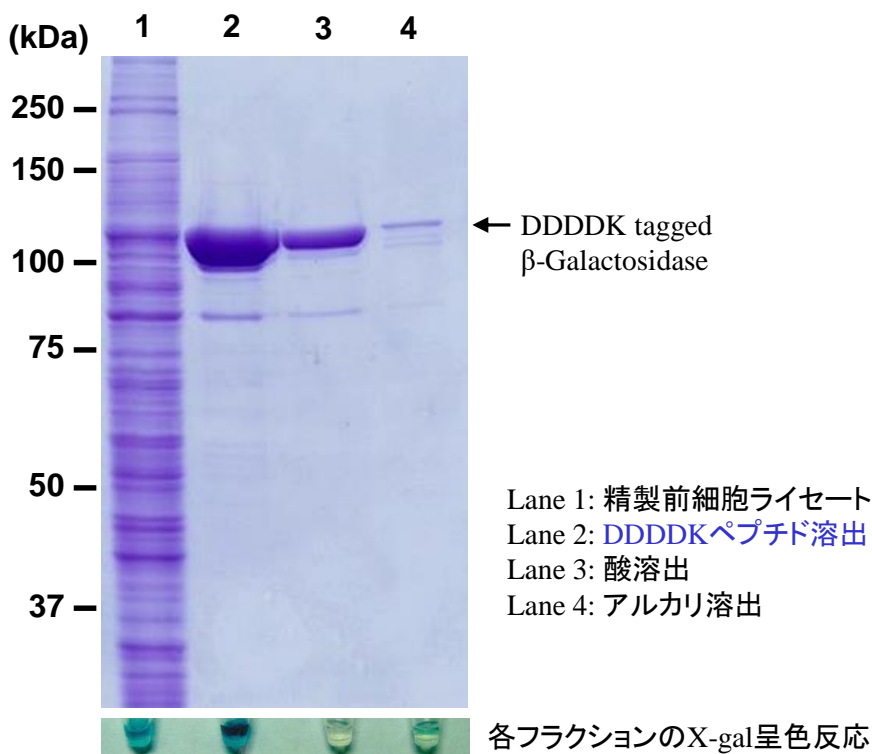
9. 細胞抽出液 0.5 mL を 1.5 mL マイクロチューブに入れます。
10. 使用直前にビーズの容器を指で弾き、転倒混和することで均一なスラリーにして下さい。ボルテックスはかけないで下さい。
11. ビーズのサスペンション 20  $\mu$ L (5  $\mu$ L ビーズ) をステップ 2. のマイクロチューブに加えます。
12. マイクロチューブをローテーターにセットし、4°C で 1 時間穏やかに転倒混和します。
13. マイクロチューブを 2,500 x g で 10 秒間遠心します。ピペットマン等を用いて沈殿したビーズを除去しないように注意してマイクロチューブ内の上清を捨てます。(必要に応じて、後の分析のために取っておきます。)
14. 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 2,500 x g 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 3 回繰り返します。
15. 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。) スピncラムをマイクロチューブに入れて 2,500 x g で 10 秒間遠心します。マイクロチューブの液を捨てます。
16. スピnc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ビーズをなじませた後、**4°C に 5 分間**に置きます。その後、上のキャップ、下のプラグをはずし、2,500 x g で 10 秒間遠心し、溶出した DDDDK 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ビーズをなじませた後、**4°C に 1 分間**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もかまいません。) 2,500 x g で 10 秒間遠心し、溶出した DDDDK 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 DDDDK 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。

## 関連製品

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

## 精製の例 ①

DDDDK tagged  $\beta$ -Galactosidase の精製 (SDS-PAGE クマシー染色) と酵素活性の確認



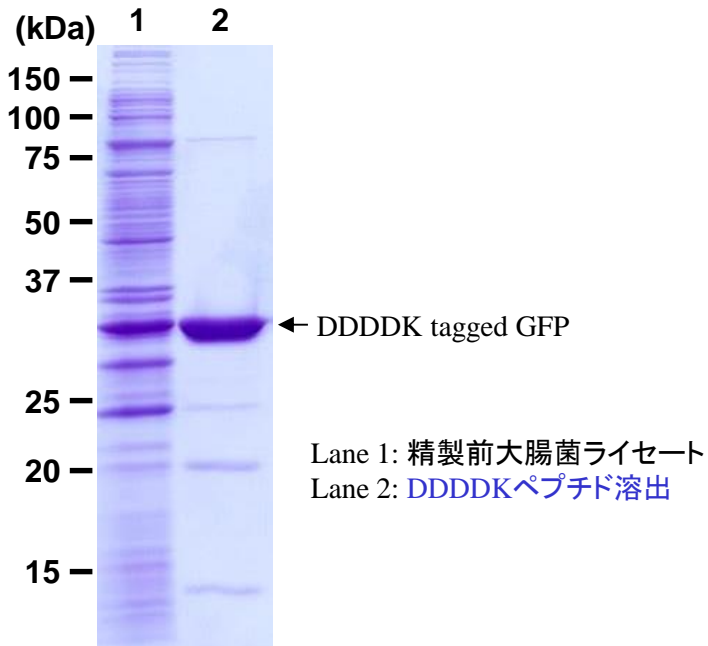
ヒト胎児腎由来細胞株 (293T) に pcDNA-DDDDK tagged  $\beta$ -Galactosidase プラスミドDNA をトランスフェクションし、60 時間培養しました。細胞を細胞溶解バッファー (0.5 mL/100-mm dish) に溶解させ、プロトコールに記載した方法で精製しました。比較のために、酸およびアルカリでの溶出も行いました。各々の精製は同じ量の抗 DDDDK tag ビーズ (5  $\mu$ L) と同じ量の溶出液 (20  $\mu$ L x 2 回溶出をプール) を用いました。

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 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  で中和)

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

## 精製の例 ②

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



DDDDK tagged GFP プラスミド DNA で形質転換した大腸菌 BL21(DE3)RIL を 1 mL LB 培地で 27°C、12 時間培養しました。大腸菌ペレットを細胞溶解バッファー 0.5 mL に溶解させ、プロトコー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。

\* 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>5%</b>	<b>Yes</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-<math>\beta</math>-D-glucoside</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。

技術資料や関連する情報は、ホームページ (<http://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



株式会社 医学生物学研究所

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

e-mail [support@mbi.co.jp](mailto:support@mbi.co.jp)