



96 Wells, One Protein Purification System

HisLink™ 96 Protein Purification System : ポリヒスチジンタグ (Hisタグ) タンパク質の迅速な精製

By Laurie Engel, B.S., Rod Flemming, Ph.D., Tonny Johnson, Ph.D., Cristopher Cowan, Ph.D., Natalie Betz, Ph.D., and Brian Almond, Ph.D., Promega Corporation.

アブストラクト

HisLink™ 96 Protein Purification Systemは1mlの培養液からポリヒスチジンタグ融合タンパク質を効率的に精製する吸引フォーマットを採用したシステムです。本システムは培養した細菌、昆虫、哺乳動物細胞から直接Hisタグ融合タンパク質を精製することができ、培養物やレジンの前処理は不要です。これらの前処理を省くことにより、自動化が容易になり、迅速なスクリーニングプロセスに適した頑健な精製法を提供することができます。

イントロダクション

タグの大きさ、入手可能なベクターの豊富さ、精製の容易さなどの点からポリヒスチジンタグ (Hisタグ) は組換えタンパク質の精製ツールとして汎用されており、未変性または変性条件下でも使用できる頑健なタグとしても認知されています。Hisタグ-タンパク質はその多くが細菌で発現させますが、昆虫や哺乳動物細胞株など他の発現システムでの利用も増える傾向にあります。HisLink™ 96 Protein Purification Systemはマルチウェル用のタンパク質精製システムで、未変性、変性条件下での精製が可能で、培養した細菌、昆虫、哺乳動物の各細胞で同等の効率で組換えタンパク質を精製することができます。最適な培養条件やタンパク質誘導条件を迅速に決めることができるので、複数の組換えタンパク質を並行して調べる場合に有用です。

HisLink™ 96 Protein Purification System

HisLink™ 96 Protein Purification Systemは96ウェルプレート、ディープウェルプレートおよび複数の1mlサンプルの培養物から直接Hisタグタンパク質を精製します。図1ではHisLink™ 96 Systemを使用したタンパク質精製の概略図を示します。まず、FastBreak™ Cell Lysis ReagentおよびDNaseの混合液を培養物に直接添加した後、HisLink™ Resinを分注します。FastBreak™ Reagentは効率的に細胞を溶解し、遊離したタンパク質がレジンを結合します。インキュベーションの後、ライセートとレジンをフリット付の濾過プレートに移し、これを保持します。DNaseの添加はライセートの粘性を下げ、レジンの凝集を防ぎます。レジンとタンパク質の複合体は洗浄され、タンパク質はVac-Man® 96 Vacuum Manifold (図1) を用いて溶出します。

細菌からのHisタグ-タンパク質精製

通常、Hisタグ-タンパク質の発現は細菌を用いて行われます。温度、培地など培養あるいは誘導の条件の変動は培養密度に影響を与えます。たとえ1枚のディープウェルプレート内でさえ、内部変動が各ウェル間の菌体密度のバラツキにつながります。このような精製にともなう問題を解決するために、我々は広範な菌体密度 (最大8.0 O.D.₆₀₀ ユニット/ml) からのタンパク質精製のためにHisLink™ 96 Protein Purification Systemをデザインしました。図2では、菌体密度1.0~8.0 O.D.₆₀₀ ユニット/mlの菌体から精製したHisタグ- Monster® Green Fluorescent Protein (hMGFP) を示します。

1枚のマルチウェルプレート内で発現タンパク質を比べた場合、プレート内で一貫した精製結果が得られるという利点が確認されました。我々は、HisLink™ 96 Systemのウェル間のバラツキの低さを示すために、複数の菌体培養液1mlからhMGFPを精製しました (図3)。

菌体で発現したタンパク質は不溶性のインクルージョンボディーを形成する可能性があります。これらの不溶性タンパク質は菌体に6M尿素あるいはグアニジンを添加した変性条件下で精製することができます。変性条件下でのHisLink™ 96 Protein Purification Systemによるタンパク質精製能をテストするために、菌体培養液にHisタグ-ホタルルシフェラーゼをスパイクしました。6Mグアニジンを菌体培養液に直接添加した変性条件下で標準プロトコルに従いタンパク質を精製しました。変性条件下での精製法を最適化するために、500mM NaClを洗浄バッファーに添加しました。この条件で精製したタンパク質収量は、未変性条件下での精製結果と同等でした (図4)。

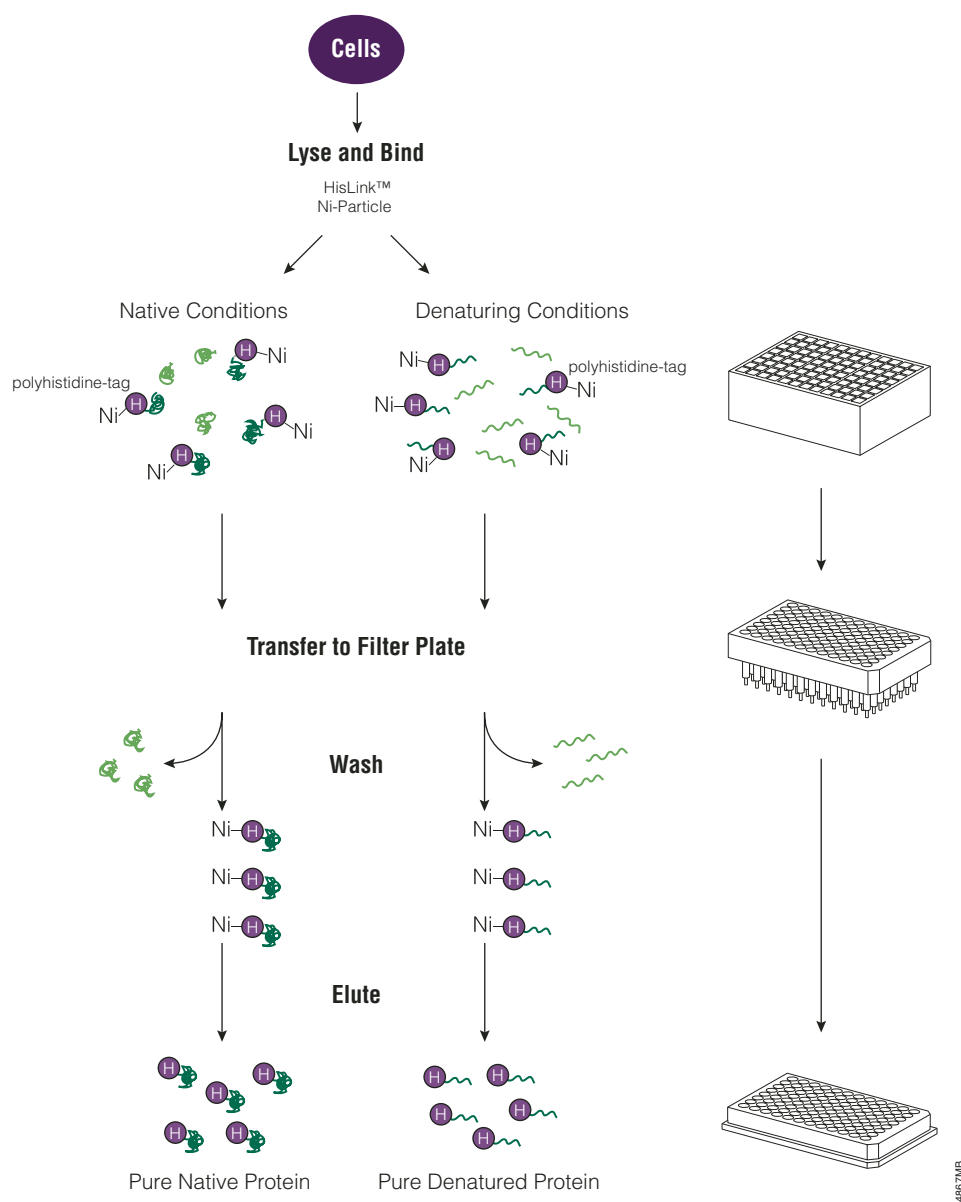


図1. HisLink™ 96 Systemによるタンパク質精製法の概要



図2. 菌体密度増加にともなうHisLink™ 96 Systemより精製されたMonster Green® 蛍光タンパク質

Hisタグ- hMGFPを発現する菌体培養液を新鮮なTerrific Brothで1ウェルあたり1、2、4、8.0 O.D.₆₀₀ユニットになるように希釈した。希釈した各菌体培養液の一部（1ml）からHisLink™ 96 Protein Purification Systemを用いて精製した。Typhoon™ 9410 workstation（励起 488nm, 蛍光フィルター 520BP40）を用いて溶出プレート内の精製タンパク質からの蛍光を可視化した。



図3. HisLink™ 96 Protein Purification Systemによる一貫した精製結果

Hisタグ- hMGFPを発現する菌体培養液の一部（2.5 O.D.₆₀₀ ユニット/ml）を96ディープウェルプレートの10ウェルに分注した。サンプルはHisLink™ 96 Systemを用いたマニュアル法により精製された。溶出タンパク質からの蛍光は、溶出プレートをTyphoon™ 9410 workstationで測定し、スキニングした（CV < 15%、励起 488nm、蛍光フィルター 520BP40）。

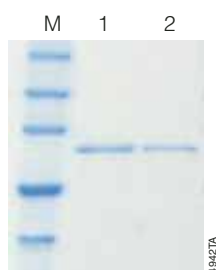


図4. 未変性および変性条件下でのHisタグ- ホタルルシフェラーゼの精製

Hisタグ-ホタルルシフェラーゼを菌体培養液にスパイクし、いくつかのウェルに6M グアニジン-HClを直接添加した。サンプルはBiomek® 2000 instrumentを用いてHisLink™ 96 Systemで精製した。通常、変性条件下でのタンパク質精製でバックグラウンドを低減するために汎用される方法に従い500mM NaClを洗浄バッファーに添加した。レーンM, タンパク質マーカー; レーン1, 未変性溶解条件 (FastBreak™ Reagent); レーン2, 変性溶解条件 (FastBreak™ Reagent+6Mグアニジン)。

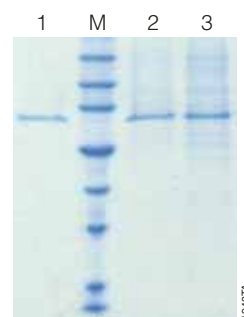


図5. Sf9昆虫細胞溶解液からのHisタグ- ホタルルシフェラーゼの精製

Sf9昆虫細胞にHisタグ-ホタルルシフェラーゼをスパイクした。Biomek® 2000 instrumentを用いてHisLink™ 96 Systemでサンプルを精製した。バックグラウンドを低下させるために 500mM NaClを洗浄バッファーに添加した。レーンM, タンパク質マーカー; レーン1, Hisタグ-ホタルルシフェラーゼでスパイクした培地; レーン2, Hisタグ-ホタルルシフェラーゼでスパイクした 5×10^6 個の細胞; レーン3, Hisタグ-ホタルルシフェラーゼでスパイクした 1.0×10^6 個の細胞。

タンパク質発現の迅速な最適化

細菌による発現システムの利点として培養条件とタンパク質の発現条件を容易に最適化できる点が挙げられます。HisLink™ 96 Protein Purification Systemを使用すれば、Hisタグ-タンパク質を並行して精製することができるため、1枚のプレートでさまざまな培養条件をテストすることができます。いくつもの条件を直接比較することにより、最適な発現条件を迅速に決定することができます。

HisLink™ 96 Systemは1枚のプレートで複数のHisタグ-タンパク質を並行して発現、精製する場合に使用することができます。そのため、機能分析の際に行う精製タンパク質の迅速なスクリーニングにも適しています。

昆虫および哺乳動物細胞株からのHisタグ-タンパク質精製

昆虫および哺乳動物細胞の発現システムもHisタグ-タンパク質精製に使用することができます。HisLink™ 96 Protein Purification Systemはこれらの発現システムへ容易に適用することができます。FastBreak™ Cell Lysis Reagentの溶解作用については細菌、昆虫、哺乳動物細胞で実証されています (1, 2)。そのため、HisLink™ 96 Systemは、昆虫や哺乳動物細胞発現システムの発現条件の最適化にも使用することができます。このアプローチは、細菌、昆虫、哺乳動物からの発現タンパク質を1回の精製実験で直接比較できることを示唆しています。

我々は、昆虫細胞ライセートからのHisタグ-タンパク質精製におけるHisLink™ 96 Protein Purification Systemの実用性について示しました。Sf9昆虫細胞 (Invitrogen) をHisタグ- ホタルルシフェラーゼでスパイクし、FastBreak™ Cell Lysis Reagentにより溶解しました。このライセート1mlをディープウェルプレートの各ウェルに分注し、HisLink™ 96 Systemを用いて精製しました。コントロールとして、Hisタグ-タンパク質を培地にスパイクし、同じプレートで精製しました。精製を最適化するために洗浄バッファーに500mM NaClを添加しました。その結果、Hisタグ-ホタルルシフェラーゼは、培地からの精製と同様に、昆虫細胞ライセートから効率的に精製され、非特異的なタンパク質の混入も最低限であることを示していました (図5)。

HisLink™ 96 Protein Purification Systemは、哺乳動物細胞ライセートからのHisタグ-タンパク質の精製にも使用することができます。我々はCHO細胞にHisタグ-ユビキチンをスパイクし、FastBreak™ Cell Lysis Reagentを用いて溶解しました。このライセートを1mlずつディープウェルプレートに分注し、HisLink™ 96 Systemを使用して精製しました。哺乳動物細胞抽出液からの精製を最適化するために洗浄バッファーに500mM NaClを添加しました。図6では非特異的なタンパク質の混入が最低限に抑えられたHisタグ-ユビキチンの効率的な精製結果を示しました。

HisLink™ 96 Protein Purification Systemを用いた自動精製

HisLink™ 96 Protein Purification Systemの有する、培養細胞から効率的、直接的にタンパク質を精製する能力、レジンの使いやすさはシステムの自動化をシンプルにします。ロボットプラットフォームに適應させるために必要なものは、吸引ポンプと口径の大きいピペットチップだけです。我々は、ベックマン・コールター社のBiomek® 2000 instrument上でのHisLink™ 96 System使用法を開発しました。このシステムでは、デッキ上のセットアップが完了していれば、スタートするだけで完全に自動化された工程 (hands-off) になるようにプログラムできます。自動化法の詳細についてはwww.promega.com/automethods/を参照ください。



図6. CHO細胞ライセートからのHisタグ-ユビキチンの精製

Hisタグ-ユビキチンを 1.5×10^6 個のCHO細胞にスパイクした。サンプルはマニュアル法によるHisLink™ 96 Systemにより精製した。バックグラウンドを低減するために500mM NaClを洗浄バッファーに添加した。レーンM, タンパク質マーカー; レーン1, Hisタグ-ユビキチンでスパイクしたクルードなライセート (精製前); レーン2および3, 精製されたHisタグ-ユビキチン。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
HisLink™ 96 Protein Purification System	1×96回分	V3680	45,000
	5×96回分	V3681	190,000
FastBreak™ Cell Lysis Reagent, 10X	15ml	V8571	5,000
	60ml	V8572	15,000
	100ml	V8573	30,000
Vac-Man® 96 Vacuum Manifold	1each	A2291	60,000

結論

HisLink™ 96 Protein Purification Systemは培養細胞からHisタグを直接精製するための吸引をベースにした方法です。HisLink™ 96 Systemは、大規模な細胞培養やレジンの調製が不要であるため、容易に自動化することができます。細胞溶解の工程でDNaseを使用することによりライセートの粘性が低下するため、菌体密度が8.0 O.D.₆₀₀ユニット程度までフィルターの詰まりを起こさずにタンパク質を精製することができます。このシステムの柔軟性により、様々な細菌、昆虫、哺乳動物細胞株を含む様々なタンパク質発現システムから未変性あるいは変性条件下でのタンパク質精製を可能にします。HisLink™ 96 Systemは、複数の細胞培養条件あるいはタンパク質の誘導条件をスクリーニングできる迅速で容易な方法を提供するため、タンパク質発現の最適化に要する時間を短縮化します。

参考文献

1. Betz, N. (2004) *Promega Notes* **87**, 29–32.
2. Betz, N. (2004) *Cell Notes* **9**, 6–9.

関連資料

1. Simpson, D. and Godat, B. (2004) *Promega Notes* **86**, 11–4.
2. Kobs, G. (2004) *Cell Notes* **9**, 2–4.

プロトコル

- ◆ HisLink™ 96 Protein Purification System Technical Bulletin #TB342
Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tb342/tb342.html)
- ◆ FastBreak™ Cell Lysis Reagent, 10X, Product Information #9PIV857
Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/9piv857/9piv857.html)