

Protein from a Small Sample? No Problem

HisLink™ Spin Protein Purification System : 小さなスピncラムに秘める優れた汎用性 - His/HQタグタンパク質精製

By Laurie Engel, B.S., Rod Flemming, Ph.D., Becky Godat, M.A., Elaine Schenborn, Ph.D., and Tonny Johnson, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

HisLink™ Spin Protein Purification SystemはポリヒスチジンタグあるいはHQタグタンパク質 1mgを精製するためのシステムで、添付されるシングルスピncラムは吸引マニホールドあるいは卓上遠心機で処理することができます。本システムは菌体培養液から直接タンパク質を精製できるため、迅速で簡便な精製ツールとして機能します。

HisLink™ Spin Protein Purification Systemは、遠心機または吸引マニホールドを用いて菌体培養液からポリヒスチジンまたはHQタグタンパク質を精製するシステムです。

イントロダクション

タンパク質融合タグは、タンパク質間相互作用およびタンパク質-リガンド相互作用の解析や機能解析および構造解析で行われるタンパク質の単離・精製において必須なツールとなっています。発現リコンビナントタンパク質の精製、検出において最も汎用されるタグはポリヒスチジンタグです(1)。我々は近年ポリヒスチジンタグとサイズが同等のHQ融合タグ (HQHQHQ; H=ヒスチジン、Q=グルタミン)を開発しました。両方のタグともに固定化金属アフィニティークラム (IMAC; 2)を用いて精製することができます。また、ポリヒスチジンタグと同様にHQ融合タグはN末端あるいはC末端融合タグとして使用することができます。

ポリヒスチジンあるいはHQタグタンパク質を小容量カラムで個別に精製するためにHisLink™ Spin Protein Purification Systemを開発しました。このシステムでは、多用途で用いられるHisLink™ Resinを吸引または遠心フォーマットで使用します。未変性あるいは変性条件下でHisLink™ Protein Purification Resinを用いて、様々な発現システムから直接ポリヒスチジンタグタンパク質を精製しました(2, 3)。レジン、修飾シリカベースレジンで、未修飾シリカの特徴である非特異的結合が抑えられており、高い結合容量を持つ四座配位金属キレート支持担体を提示します。このレジン、ポリヒスチジンまたはHQタグタンパク質のバッチによる大量精製あるいはカラム精製用として導入されました(4)。本稿ではHisLink™ Spin Protein Purification Systemのアプリケーションおよび利点について記述します。

HisLink™ Spin Protein Purification Systemの使用

HisLink™ Spin Protein Purification Systemは卓上遠心機または吸引マニホールドを用いて菌体培養液から精製します(図1参照)。FastBreak™ Cell Lysis Reagent、DNase IおよびHisLink™ Resinとの混合液を菌体培養液700μlに直接添加すると菌体の溶解、レジンへのタンパク質結合が効率的に行われます。インキュベーション後、ライセートとレジンスピncラムに移し、レジン捕捉します。目詰まりを抑えるためのDNase Iが添加されているので菌体密度が著しく高くなければライセートは簡単にスピncラムを通過します。レジンの洗浄は吸引または卓上遠心機を用いて行います。最後に目的のタンパク質は卓上遠心機により溶出されます。遠心法または吸引法でも同量程度のタンパク質を精製することができます(図2)。

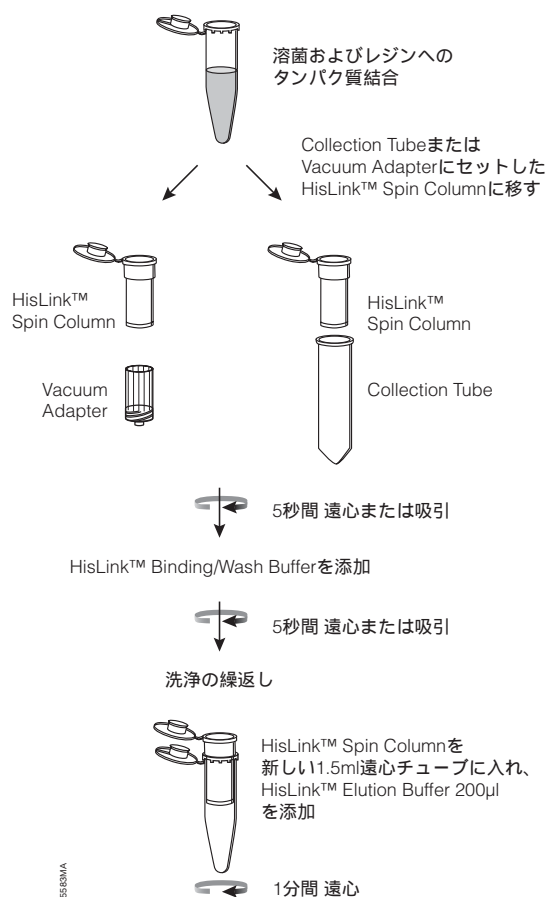


図1. HisLink™ Spin Protein Purification Systemプロトコル概要

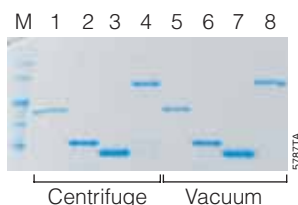


図2．吸引法と遠心法の比較

HisLink™ Spin Protein Purification System を用いてBL21(DE3) 菌株よりポリヒスチジンおよびHQタグタンパク質を精製した。精製タンパク質は4-20% Tris-glycine gel (Invitrogen) を用いた電気泳動により分離し、SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) で染色後、NANOpure® waterで脱色した。レーンM, Broad Range Protein Molecular Weight Markers (カタログ番号 V8491) ; レーン1-4, 遠心法による精製; レーン5-8, 吸引法による精製; レーン1, 5; HQ-マルトース結合タンパク質; レーン2, 6, ポリヒスチジン-GFP; レーン3, 7, HQ-クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT); レーン4, 8, ポリヒスチジン-ホタルシフェラーゼ。

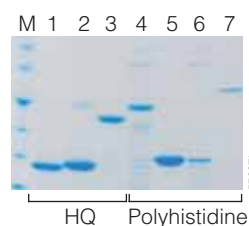


図3．複数種のポリヒスチジンおよびHQタグタンパク質の精製

HisLink™ Spin Protein Purification System を用いてBL21(DE3) 菌体培養液より直接、複数のポリヒスチジンおよびHQタグタンパク質を精製した。HisLink™ Spin Protein Purification System を用いた遠心法による精製後、図2の脚注と同様にゲル電気泳動および染色を行った。レーンM, Broad Range Protein Molecular Weight Markers (カタログ番号 V8491) ; レーン1, HQ-クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT); レーン2, HQ-グルタチオントランスフェラーゼ (GST); レーン3, HQ-マルトース結合タンパク質; レーン4, ポリヒスチジン-MAPK; レーン5, ポリヒスチジン-GFP; レーン6, ポリヒスチジン-カルモジュリン; レーン7, ポリヒスチジン-ホタルシフェラーゼ。

精製法の最適化

HisLink™ Spin Protein Purification Systemを用いて様々なポリヒスチジンまたはHQタグタンパク質を精製することができます (図3)。しかし、タンパク質によっては精製法の最適化を必要とする場合があります。例えば、インクルージョンボディを形成するタンパク質などは最大収量を得るためにバッファー条件の最適化や添加剤が必要です。尿素やグアニジンHClなどのカオトロピック剤はHisLink™ Resinを用いたポリヒスチジンタグタンパク質の結合や溶出に影響を与えません(4)。HisLink™ Spin Protein Purification Systemは1つの培養について複数の条件を検討する際にも有用なシステムです。

スケールの変更ができるタンパク質精製法

HisLink™ Spin Protein Purification SystemはHisLink™ Protein Purification ResinおよびHisLink™ 96 Protein Purification Systemと同じ化学的性質を持つレジンを採用しているため、プロトコルは簡単にスケール変更できます。例えば、700μl菌体培養液の処理のために開発され最適化された強力な洗浄プロトコルは、HisLink™ 96 System (5) を用いたハイスループット自動化システム用あるいはHisLink™ Resinを用いた大量精製用へ簡単にスケールを変更することができます。

結論

HisLink™ Spin Protein Purification Systemは吸引マニホールドあるいは卓上遠心機を用いた少量、シングルチューブ、シングルステップのタンパク質精製システムです。HisLink™ Resinの高い結合容量および特殊な細胞溶解剤を利用することにより、ポリヒスチジンおよびHQタグタンパク質を未変性/変性条件あるいは強力な結合/溶出条件下で精製することができます。菌体の溶解およびタンパク質の結合はシングルステップで同時におこり、吸引または遠心で洗浄することができます。HisLink™ Spin Protein Purification Systemは少量、シングルカラムで迅速、簡便に精製でき、大量培養または96ウェルフォーマットに合わせたスケールにも変更可能です。

参考文献

1. Yip, T.T. *et al.* (1989) *Anal. Biochem.* **183**, 159–71.
2. Godat, B. *et al.* (2005) *Promega Notes* **91**, 17–20.
3. Engel, L. *et al.* (2005) *Promega Notes* **90**, 15–8.
4. Simpson, D. and Godat, B. (2004) *Promega Notes* **86**, 11–4.
5. *Automated HisLink™ 96 Protein Purification System Automated Protocol* #EP028, Promega Corporation.

プロトコル

- ◆ *HisLink™ Spin Protein Purification System Technical Manual #TM281*, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm281/tm281.html
- ◆ *HisLink™ Protein Purification Resin Technical Bulletin #TB327*, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb327/tb327.html
- ◆ *HisLink™ 96 Protein Purification System Technical Bulletin #TB342*, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb342/tb342.html
- ◆ *HisLink™ 96 Protein Purification System Automated Protocol #EP028*, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/ep028/ep028.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
HisLink™ Spin Protein Purification System	25 回分	V1320	27,000
HisLink™ Protein Purification Resin	50 ml	V8821	44,000
	5 ml	V8823	5,000
HisLink™ 96 Protein Purification System	1 × 96	V3680	45,000
	5 × 96	V3681	190,000

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Broad Range Protein Molecular Weight Markers	100 レーン分	V8491	16,000
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	1 セット	A7231	45,000