

Maxwell™ 16 Polyhistidine Protein Purification Kit Protocol

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS AS1060

Quick
PROTOCOL

Maxwell™ 16 Instrument(AS1000)とMaxwell™ 16 Polyhistidine Protein Purification Kit(AS1060)を用いたHisタグあるいはHQタグタンパク質自動精製におけるサンプル調製では、サンプルの種類や量によって、次の点にご注意ください。詳しいプロトコルの内容は、製品プロトコル TM285 をご参照ください。

表 1 このシステムを用いて精製したHisタグあるいはHQタグタンパク質の収量

サンプルの種類	サンプル量	収量
バクテリア培養液	20 O.D. ₆₀₀	300µg
哺乳類培養細胞	5 × 10 ⁶ 個	50µg
昆虫培養細胞	5 × 10 ⁶ 個	50µg

表 2 最大サンプル処理量

サンプルの種類	処理能力
バクテリア培養液	20 O.D. ₆₀₀ ^{※1}
哺乳類培養細胞	5 × 10 ⁶ 個まで ^{※1, 2}
昆虫培養細胞	5 × 10 ⁶ 個まで ^{※1, 2}
哺乳類および昆虫培養細胞上清	1ml ^{※2}

※1 : ≥ 4 O.D.₆₀₀ のバクテリア培養液および 2×10^6 個以上の細胞は、サンプルの粘性を低下させるため DNase I を加える。

※2 : 血清を含む培養細胞および培養上清は、非特異的な吸着を減らすため、wash buffer に 200-500mM NaCl を加える。

サンプルの調製

HisタグあるいはHQタグタンパク質を発現するバクテリア培養液は、O.D.₆₀₀ が 0.4-0.6 の時期に IPTG (終濃度 1mM) を添加して、発現誘導を行い、37°C で 3 時間あるいは 25°C で一晩培養する。培地をブランクとして、培養液の吸光値を測定し、サンプルとする。

注意 : バクテリア培養液および培養細胞は、細胞をそのまま well #1 に加えるよりも、遠心操作によりペレットにし 100mM HEPES (pH 7.5) で再懸濁した方が精製度および収量ともに良くなる場合があります。

注意 : バクテリア培養液は、目的タンパク質を十分にフォールディングさせるために培養終了後、4°C で 3-16 時間さらにインキュベーションすることで、より効率よく精製できるかもしれません。

< Hisタグタンパク質の精製 >

バクテリア培養液

標準的なバクテリア培養 (O.D.₆₀₀ < 4 の培養液)

O.D.₆₀₀ < 4 の培養液の 1ml、または、1ml の培養液を遠心操作によりペレットにし、100mM HEPES (pH 7.5) で再懸濁したものをサンプルとして、Maxwell 16 カートリッジの well #1 に加える。

注意 : pLysS や pLysE を含む細菌株の場合、O.D.₆₀₀ < 4 であっても、Dnase 処理が必要になるかもしれません。

高密度に培養したバクテリア培養 (O.D.₆₀₀ ≥ 4 の培養液)

培養液の 1ml、または遠心後に 100mM HEPES (pH 7.5) でペレットを再懸濁したものを Maxwell 16 カートリッジの well #1 に加え、さらに 10-50µg/ml DNase (2-10µl の 5mg/ml DNase I) を加える。

注意 : 1 個のカートリッジにつき、20 O.D.₆₀₀ まで処理できます。

哺乳類培養細胞および昆虫培養細胞

5 × 10⁶ 個までの培養細胞を Maxwell 16 カートリッジの well #1 に加える。また、血清に由来するバックグラウンドを減らすため、well #3 ~ #6 に含まれる wash buffer に 200-500mM NaCl (40-100µl の 5M NaCl) を加える。

注意 : 2 × 10⁶ 個以上の細胞をサンプルとする場合には、サンプル 1ml あたり 2-10µl の 5mg/ml DNase I を加える。

哺乳類および昆虫細胞 培養上清

培養上清 1ml をサンプルとして、Maxwell 16 カートリッジの well #1 に加える。また、血清に由来するバックグラウンドを減らすため、well #3 ~ #6 に含まれる wash buffer に 200-500mM NaCl (40-100µl の 5M NaCl) を加える。

< HQ-タグタンパク質の精製 >

バクテリア培養液

O.D.₆₀₀ ≥ 4 の場合には、サンプルの粘性を低下させるため 2-10µl の 5mg/ml DNase I を加える。バックグラウンドを減らし、HQ タグタンパク質の精製度を高めるため、well #1 に含まれるサンプルおよび well #3 ~ #6 に含まれる wash buffer に 200-500mM NaCl (40-100µl の 5M NaCl) を加える。

注意 : 1 個のカートリッジにつき、20 O.D.₆₀₀ まで処理できます。



技術的なお問合せは:

e-mail: prometec@jp.promega.com · Tel: 03-3669-7980 · Fax: 03-5614-6097

Revised 7/06

Maxwell™ 16 Polyhistidine Protein Purification Kit Protocol

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTSAS1060

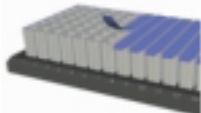
Quick
PROTOCOL

Maxwell™ 16 Instrument(AS1000) によるHisタグタンパク質精製

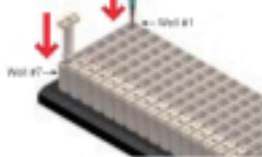


手前(ドア)側

1. カートリッジの密閉シールをはがす。



2. それぞれのカートリッジのウエル番号 7 にプランジャーを挿入し、ウエル番号 1 にサンプルを加える。



注意：プランジャーの向きにご注意ください。

青色のElution Tubeに300ulのMagneHis™ Elution Bufferを加える。



4. Maxwell 16 の電源を ON にし、Research Mode (Rsch)を確認する。



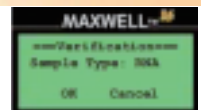
5. "Run" を選択して、【Run/Stop】ボタンを押す。



6. "Protein" を選択して、【Run/Stop】ボタンを押す。



7. Protein のプロトコールが選択されていることを確認して、【Run/Stop】ボタンを押す。



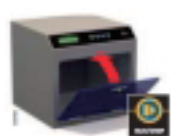
8. ドアを開けて、【Run/Stop】ボタンを押す。



9. カートリッジを Maxwell 16 のトレイに移す。Elution Tube を Maxwell 16 の elution tube slot に差し込む。



10. 【Run/Stop】ボタンを押し、ドアを閉める。



11. Maxwell 16 が精製工程を開始する。



12. 精製工程の終了後、ドアを開けて、ロッドにぶら下がっているプランジャーを落とす。【Run/Stop】ボタンを押す。



13. Elution Tube を Magnetic Elution Tube Rack に移し、溶出されたHis/HQ タグタンパク質を保存容器に移す。

