

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

PURIFICATION that Maintains Protein Activity

c-Myc tagged Protein
MILD PURIFICATION KIT
(MoAb. clone 1G4) ver. 2

CODE No. 3305

Purification with neutral pH (to maintain Activity and Conformation)

Using Spin Column (Rapid and Easy)

High Quality and Efficiency

High-Yield Purification

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.

The method of purification is one of the important keys for maintaining protein structure and function. The c-Myc tagged Protein MILD PURIFICATION KIT is designed for the isolation of c-Myc tagged protein from cell lysates and culture supernatant. Severe conditions such as acidic or alkaline elution can denature protein structure while maintaining a neutral pH can preserve protein activity and conformation. MBL has developed the Anti-c-Myc tag Gel to quickly and efficiently purify c-Myc-tagged proteins at neutral pH to maintain protein activity and native conformation. The c-Myc tag peptide competitively elutes the c-Myc tagged protein from Anti-c-Myc tag Beads while minimally interfering with protein function.

The affinity of the anti-c-Myc tag antibody is also very important. Very high affinity antibody cannot be dissociated from the c-Myc tagged protein, and low affinity antibody is not sufficient for binding. MBL has optimized the affinity of the anti-c-Myc tag antibody to permit high yields and efficient purification of functional c-Myc-tagged proteins for biochemical studies. This kit is simple and fast, because all procedures of this kit have been optimized by using a Spin Column.

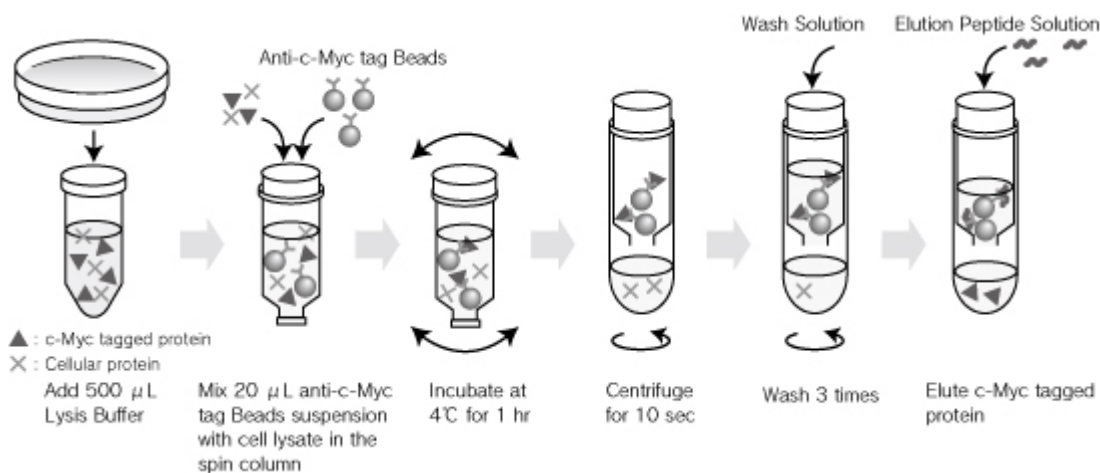
In ver.2, MBL improved the purification capacity of the Anti-c-Myc tag Beads by using the new monoclonal antibody (Clone 1G4). It is easily possible for scale-up by using a c-Myc tagged Protein MILD PURIFICATION GEL (code 3306, 3307).

Kit Components

Components sufficient for conducting 20 purifications of c-Myc tagged protein from 100-mm culture dishes.

- 1. Anti-c-Myc tag Beads** 25% slurry: 100 μ L beads in 400 μ L total volume in PBS with 0.1% ProClin 150 as preservative
- 2. Elution Peptide** c-Myc tag peptide (EQKLISEEDL), 1 mg in 1 mL PBS after reconstitution
- 3. Spin Columns Sets** 20 columns with pre-inserted bottom plugs and top caps
- 4. Wash Concentrate** 10x concentrate, 6 mL

Procedure Summary



Product Capacity

The purification capacity of the Anti-c-Myc tag Beads varies depending upon the c-Myc tagged protein. For examples, 5 μ L of Anti-c-Myc tag Beads (20 μ L slurry) bound 5 μ g of a c-Myc tagged protein (27 kDa) and eluted 3 μ g of purified protein.

Materials Required but not Provided

1. Microcentrifuge capable of 15,000 x g
2. Sampling tube (1.5 mL or 2 mL)
3. End-over-end rotator
4. PBS or TBS
5. Lysis buffer

Suitable Lysis buffer varies with cell type.

Note: Do not use SDS based RIPA buffer (see Additional Information).

A. 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).

B. Commercial Reagent

SIGMA CelLytic M Cell Lysis Reagent, code no. C2978

PIERCE M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent, code no.78503

Storage

Store for up to 1 year from date of receipt at 4°C. Do not freeze.

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

Protocols

The following protocol is for the isolation of c-Myc tagged proteins produced in a 100 mm cell culture dish. The expression level of the c-Myc tagged protein may vary. If necessary, adjust the volume of Anti-c-Myc 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.) For each Spin Column, prepare 1 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 μ L x 20 tubes) and store at -20°C. Repeated freezing and thawing is not recommended.

Purification from cell lysate (c-Myc 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 or TBS.
4. Centrifuge the cell suspension at 400 x g for 5 minutes to pellet the cells. Carefully remove and discard the supernatant.
5. Add 500 μ L of Lysis buffer to the cell pellet and vortex.
6. Incubate the sample for 30 minutes on ice.
7. Remove cell debris by centrifugation at 15,000 x g for 10 minutes at 4°C.

(Purification of c-Myc tagged Protein)

8. Transfer the 500 μ L of cell lysate to the Spin Column.
9. Resuspend the Anti-c-Myc tag Beads by tapping and inverting the vial several times immediately before dispensing. Don't vortex.
10. Dispense 20 μ L Anti-c-Myc tag Beads suspension (5 μ L beads) into the Spin Column. Screw on the cap.
11. 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.
12. Loosen the top cap on the column. Remove the bottom plug. Place the Spin Column in a sampling tube. Centrifuge for 10 seconds. Discard the flow-through (or save for future analysis).
13. Take off the top cap. Keep the bottom plug off. Place the Spin Column in a sampling tube.
14. 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.
15. Place the Spin Column in a new sampling tube.
16. Add 20 μ L Elution Peptide Solution to the Anti-c-Myc tag Beads. It is not necessary to place the bottom plugs and top cap on the Spin Column. Tap the tube gently several times. Incubate for 5 minutes at 4°C. Centrifuge for 10 seconds.
17. Repeat step 16 again. The two eluates may be pooled in one sampling tube.

Purification from culture supernatant (if the c-Myc tagged protein is secreted into the culture supernatant)

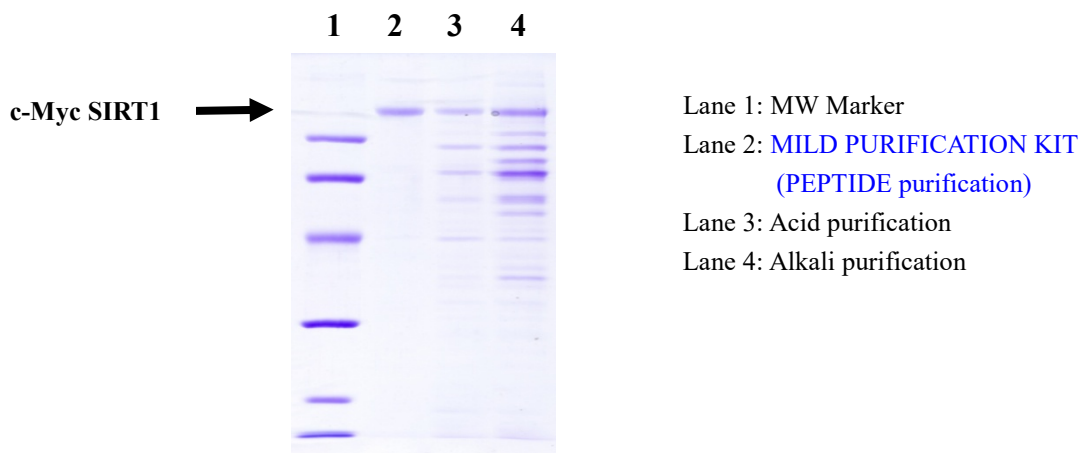
1. Collect the culture supernatant from the cell culture dish into the centrifuge tube.
2. Centrifuge at 400 x g for 5 minutes to remove cell debris.
3. Transfer the supernatant to a new 15 mL centrifuge tube.
4. Resuspend the anti-c-Myc tag Beads by tapping and inverting the vial several times immediately before dispensing. Don't vortex.
5. Dispense 20 μ L anti-c-Myc tag Beads suspension (5 μ 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 μ L supernatant above the Anti-c-Myc tag Beads.

8. Resuspend the Anti-c-Myc tag Beads in the 100-400 μL supernatant by pipetting up and down several times.
9. Transfer the resuspended Anti-c-Myc tag Beads in 100-400 μL supernatant to the Spin Column.
10. Keep the top cap off. Remove the bottom plug. Place the Spin Column in a sampling tube. Centrifuge for 10 seconds. Discard the flow-through (or save for future analysis).
11. Keep the bottom plug off. Place the Spin Column in a sampling tube.
12. 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.
13. Place the Spin Column in a new sampling tube.
14. Add 20 μL Elution Peptide Solution to the Anti-c-Myc tag Beads. It is not necessary to place the bottom plugs and top cap on the Spin Column. Tap the tube gently several times. Incubate for 5 minutes at 4°C. Centrifuge for 10 seconds.
15. Repeat step 14 again. The two eluates may be pooled in one sampling tube.

(Note: Steps 14-17 of the first protocol are identical to steps 12-15 of the second protocol.)

Example of Purification Results

Purification of c-Myc tagged SIRT1/Sir2 Deacetylase



SDS-PAGE (Coomassie Brilliant Blue Staining)

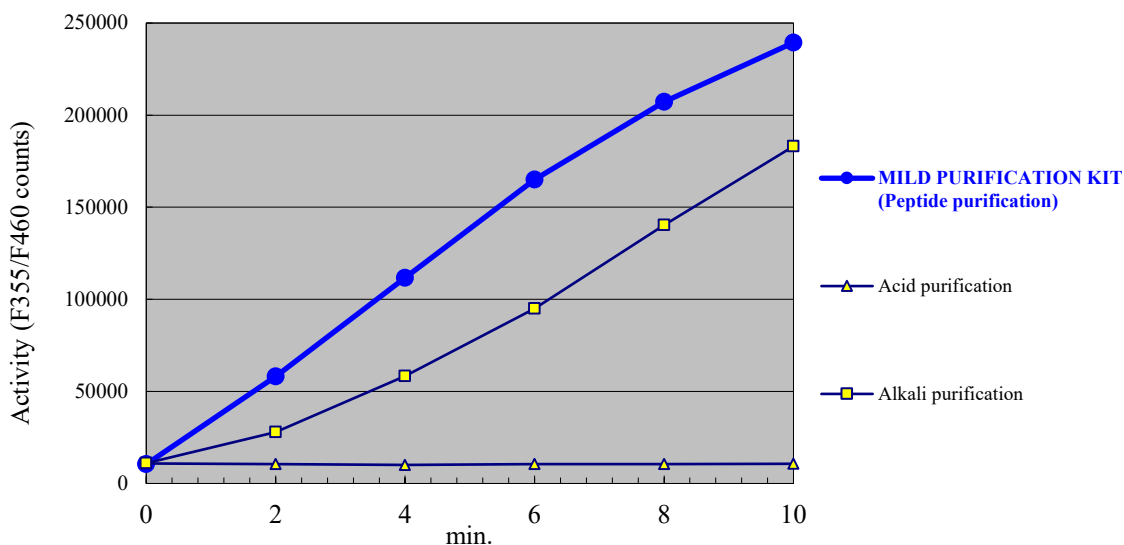
Human embryonic kidney cells (293T) were transfected with pCMV-c-Myc-SIRT1/Sir2 Deacetylase and cultured for 70 hours. Cells were then lysed in the Lysis buffer (500 μ L/100 mm dish) without any protease inhibitor and purified according to the preceding protocol. For comparison, elution was carried out not only with peptide solution but also with acid solution and alkaline solution. Each purification was conducted with the same amount of Anti-c-Myc tag Beads (5 μ L) and the same amount of elution solution (20 μ L x 2 times and then pooled).

Peptide elution solution: neutral pH

Acid elution solution: pH 2.8 (Neutralize the elution immediately)

Alkali elution solution: pH 11.3 (Neutralize the elution immediately)

Protein Activity



Protein activity was measured by SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit.

Additional Information

Several reagents were examined whether or not they were suitable for use with the c-Myc tagged Protein MILD PURIFICATION KIT. The results are listed below.

Chaotropic agents

	Urea	1 M	Yes
	Guanidine-HCl	1 M	No

Reducing agents

	DTT	10 mM	Yes
	2-Mercaptoethanol	10 mM	Yes

Surfactants

Nonionic	Tween-20	5%	Yes
	TritonX-100	5%	Yes
	NP40	5%	Yes
	Digitonin	1%	Yes
	n-Octyl-β-D-gulcoside	1%	Yes
Zwitterionic	CHAPS	1%	Yes
	CHAPSO	1%	Yes
Anionic	SDS	0.05%	No
	Sodium Deoxycholate	0.1%	Yes
	Sodium Deoxycholate	0.5%	No

Others

	NaCl	1 M	Yes
	Glycerol	10%	Yes
	EDTA	10 mM	Yes

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、マイルドな中性条件下で精製できることが理想的です。このキットは、哺乳動物細胞などで発現させた c-Myc tag 融合タンパク質をマイルドな中性条件下で、スピнкаラムを使い短時間で精製可能にしたキットです。

キットに含まれる抗 c-Myc tag ビーズには抗 c-Myc tag 抗体が結合しています。スピнкаラムの中で c-Myc tag 融合タンパク質（哺乳動物細胞などで発現させた c-Myc tag 融合タンパク質など、以下目的タンパク質と略す）と抗 c-Myc tag ビーズを混合します。インキュベーション後の洗浄で目的タンパク質以外を洗い流します。続けて過剰量の c-Myc tag ペプチドを含む溶液を加えることで、目的タンパク質と競合させ、抗 c-Myc tag ビーズから目的タンパク質を解離させて回収します。スピнкаラムを使用することにより、全工程、1 時間 30 分以内（細胞抽出液の調製工程は除く）で迅速に目的タンパク質を精製することができます。

MBL では、このキットのために、最適な親和性を持った抗体を開発しました。抗体と抗原の親和性が弱いと十分な結合が起こらず、強すぎると抗体と抗原の解離をマイルドな中性条件下では行うことができません。本キットで使用している抗 c-Myc tag 抗体は c-Myc tag 融合タンパク質をマイルドな中性条件下で精製するために最適な親和性を示します。

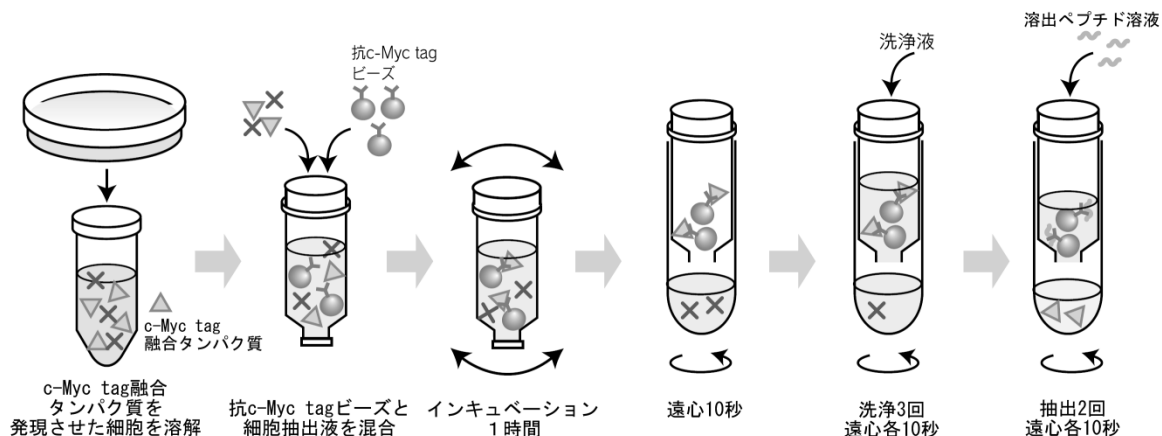
Ver.2 では親和性をより最適化したモノクローナル抗体 (Clone 1G4) をゲル結合抗体として用いることで精製キャパシティを向上させることができました。また、別売のゲルを用いることにより簡単にスケールアップすることもできます (code 3306, 3307)。

キット構成

哺乳動物培養細胞に発現させた c-Myc tag 融合タンパク質を 100-mm dish で 20 枚分を精製するための試薬類が含まれます。

- | | |
|-------------------------|--|
| 1. Anti-c-Myc tag Beads | 400 μ 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 μ L のビーズが入っています) |
| 2. Elution Peptide | c-Myc tag ペプチド(EQKLISEEDL), 1 mg/1 mL PBS (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) |

精製法の概略 (培養細胞からの精製)



精製のキャパシティー

精製のキャパシティーは c-Myc tag 融合タンパク質の種類によって異なります。
27 kDa の c-Myc tag 融合タンパク質で測定した例では、5 μ L の抗 c-Myc tag ビーズ (20 μ L スラリー) は 5 μ g の c-Myc tag 融合タンパク質と結合し、3 μ g 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. サンプルングチューブ (1.5 mL または 2.0 mL)
3. ローテーター
4. PBS あるいは TBS
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。

注意: SDS が含まれる RIPA buffer は使えません。(最終ページの試薬の使用可否表をご覧ください)

A. 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

必要ならば Protease Inhibitor Cocktail を加えて下さい。

(例: SIGMA code P8340, PIERCE code 78415)

B. 市販品の例

CellLytic M Cell Lysis Reagent (SIGMA; code C2978)

M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (PIERCE; code 78503)

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。凍結はお避け下さい。

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

次のプロトコルは 100-mm dish で培養した哺乳動物細胞で発現させた c-Myc tag 融合タンパク質を精製する場合の例です。c-Myc tag 融合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、抗 c-Myc tag ビーズの量と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) を脱イオン水で 10 倍希釈して下さい。
(例: 0.1 mL の Wash Concentrate に 0.9 mL の脱イオン水を加えて下さい。)

1 回の精製につき 1 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 c-Myc tag ペプチド EQKLISEEDL を 1 mL の PBS に溶解後、凍結乾燥してあります) に 1 mL の脱イオン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 μ 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。

培養細胞からの精製 (c-Myc tag 融合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. c-Myc tag 融合タンパク質を発現させた細胞を遠沈チューブに移します。(必要なら、培養皿から細胞を剥がして下さい。)
2. 遠沈チューブを 400 x g で 5 分間遠心後、上清を捨てます。
3. 冷却した PBS 又は TBS に細胞を懸濁します。
4. 遠沈チューブを 400 x g で 5 分間遠心後、上清を捨てます。
5. 500 μ L 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. 30 分間、氷の上に静置して下さい。
7. 15,000 x g、4°C で 10 分間遠心します。(上清を使用します)

(c-Myc tag 融合タンパク質の精製)

8. 細胞抽出液 (7 遠心上清) 500 μ L をスピнкаラムに入れます。
9. 使用直前に Anti-c-Myc tag Beads 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。
10. Anti-c-Myc tag Beads のサスペンション 20 μ L (5 μ L ビーズ) をスピнкаラムに加え、キャップをします。
11. 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 の遠沈チューブなど) にスピнкаラムを入れてセットして下さい。
12. スピнкаラムの上のキャップをゆるめ、下のプラグを外して下さい。スピнкаラムをサンプリングチューブに入れて 10 秒間遠心します。サンプリングチューブの液を捨てます (必要ならば、後の分析のためにとっておきます)。
13. 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ラムをサンプリングチューブに入れます。
14. 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。
10 秒間遠心しサンプリングチューブの液を捨てます。これを 3 回繰り返します。

15. スピнкаラムを新しいサンプリングチューブに移します。
16. 20 μL の溶出ペプチド溶液を抗 c-Myc tag ビーズに加えます。上のキャップ、下のプラグともに外したままにしておきます。サンプリングチューブの外から、数回、軽く指で弾いて溶出ペプチド溶液と抗 c-Myc tag ビーズをなじませた後、5 分間 4°C に置きます。その後、10 秒間遠心し、溶出した c-Myc tag 融合タンパク質をサンプリングチューブに回収します。
17. 16 の操作をもう一度繰り返します。16 と 17 のステップで溶出した c-Myc tag 融合タンパク質は 1 つのチューブに合わせて回収してもかまいません。

培養上清からの精製 (c-Myc tag 融合タンパク質が培養上清に分泌されている場合)

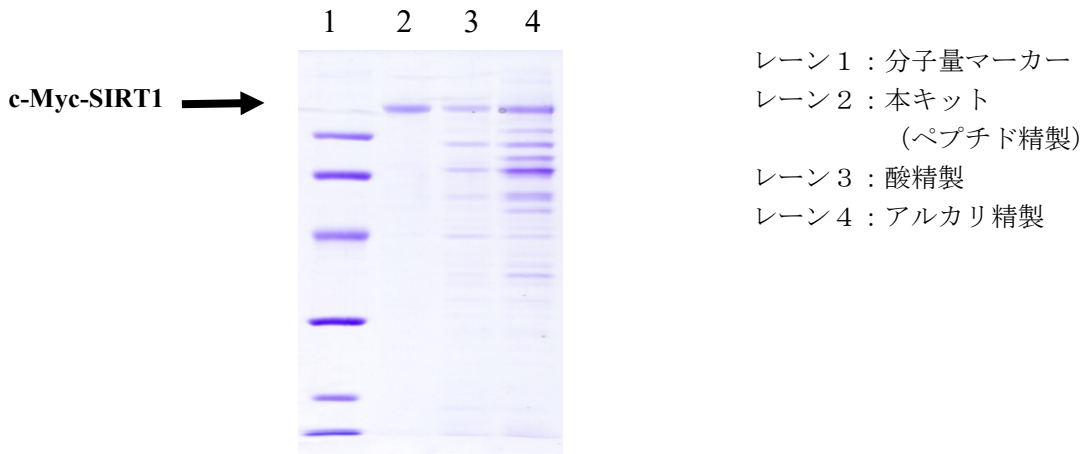
1. c-Myc tag 融合タンパク質を発現させた細胞の培養上清を遠沈チューブに集めます。
2. 遠沈チューブを 400 x g で 5 分間遠心して細胞を沈殿させます。
3. 培養上清を新しい 15 mL の遠沈チューブに移します。
4. 使用前に Anti-c-Myc tag Beads の容器を指で弾き、転倒混和することで均一なスラリーにして下さい。ボルテックスはかけないで下さい。
5. Anti-c-Myc tag Beads のサスペンション 20 μL (5 μL ビーズ) を培養上清の入った遠沈チューブに加えます。キャップをします。
6. ローテーターにセットし、4°C で 1 時間穏やかに転倒混和します。
7. 遠沈チューブを 400 x g で 5 分間遠心します。上清を捨てます (必要ならば、後の分析のためにとっておきます) が、上清を完全に除去しないで、100~400 μL は抗 c-Myc tag ビーズといっしょに遠沈チューブの中に残しておきます。
8. 遠沈チューブの中に残した 100~400 μL の培養上清と抗 c-Myc 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 c-Myc tag ビーズと 100~400 μL の培養上清の懸濁液をスピнкаラムに移します。
10. スピнкаラムの上のキャップははしません。また、下のプラグを外して下さい。スピнкаラムをサンプリングチューブに入れて 10 秒間遠心します。サンプリングチューブの液を捨てます (必要ならば、後の分析のためにとっておきます)。
11. スピнкаラムの下のプラグは外したままで、サンプリングチューブに入れます。
12. 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。10 秒間遠心しサンプリングチューブの液を捨てます。これを 3 回繰り返します。
13. スピнкаラムを新しいサンプリングチューブに移します。
14. 20 μL の溶出ペプチド溶液を抗 c-Myc tag ビーズに加えます。上のキャップ、下のプラグともに外したままにしておきます。サンプリングチューブの外から、数回、軽く指で弾いて溶出ペプチド溶液と抗 c-Myc tag ビーズをなじませた後、5 分間 4°C に置きます。その後、10 秒遠心し、溶出した c-Myc tag 融合タンパク質をサンプリングチューブに回収します。
15. 14 の操作をもう一度繰り返します。14 と 15 のステップで溶出した c-Myc tag 融合タンパク質は 1 つ

のチューブに合わせて回収してもかまいません。

(注意:培養細胞からの精製プロトコルの 14-17 は培養上清からの精製プロトコルの 12-15 と同じです)

精製の例

c-Myc tag 融合 SIRT1/Sir2 脱アセチル化酵素の精製

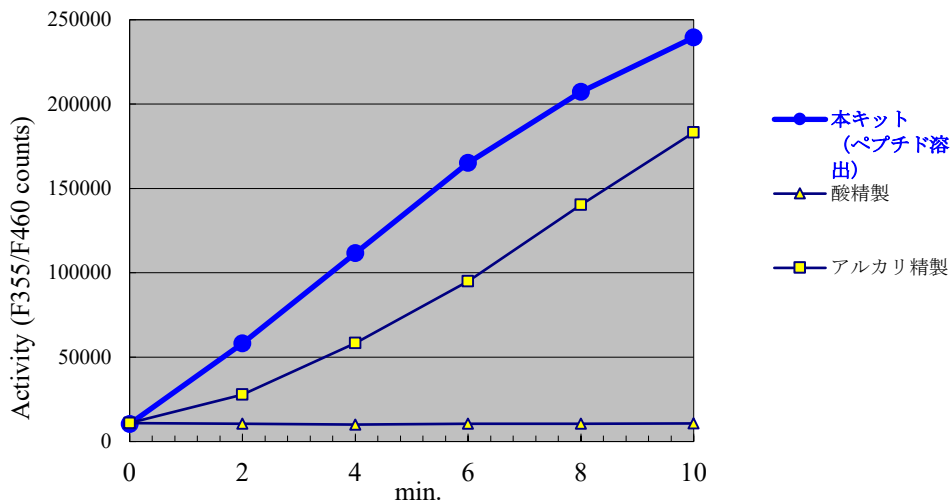


SDS-PAGE (クマシー・ブリリアント・ブルー染色)

ヒト胎児腎由来細胞株 (293) に pCMV-c-Myc-SIRT1/Sir2 脱アセチル化酵素の遺伝子をトランスフェクションし、70 時間培養しました。細胞を細胞溶解バッファー(500 μ L/100-mm dish)に溶解させ、プロトコルに記載した方法で精製しました。比較のために、酸での精製、アルカリでの精製も行いました。各々の精製は同じ量の抗 c-Myc tag ビーズ(5 μ L)と同じ量の溶出液 (20 μ L x 2 回溶出をブール) を用いました。

ペプチド溶出液 (本キット) : 中性
酸溶出液 : pH 2.8 (溶出後ただちに中和)
アルカリ溶出液 : pH 11.3 (溶出後ただちに中和)

タンパク質の活性



タンパク質の活性は SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit で測定しました。

試薬の使用可否

下記の試薬を細胞溶解バッファの成分に加えた場合、本キットで使えるか調べました。

Chaotropic agents

Urea	1 M	Yes
Guanidine-HCl	1 M	No

Reducing agents

DTT	10 mM	Yes
2-Mercaptoethanol	10 mM	Yes

Surfactants

Nonionic	Tween-20	5%	Yes
	TritonX-100	5%	Yes
	NP40	5%	Yes
	Digitonin	1%	Yes
	n-Octyl-β-D-gulcoside	1%	Yes
Zwitterionic	CHAPS	1%	Yes
	CHAPSO	1%	Yes
Anionic	SDS	0.05%	No
	Sodium Deoxycholate	0.1%	Yes
	Sodium Deoxycholate	0.5%	No

Others

NaCl	1 M	Yes
Glycerol	10%	Yes
EDTA	10 mM	Yes

Yes : 表に示した濃度まで細胞溶解バッファ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に加えると使用できません。

発売元



株式会社 医学生物学研究所

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

e-mail support@mbi.co.jp