

Immunologie: Primärantikörper

Hochspezifischer Antikörper zum Nachweis von Histidin-Tag
Proteinen



Hintergrund

Rekombinante Proteine haben sowohl in der molekularbiologischen Forschung als auch in der pharmazeutischen Industrie ihren festen Stellenwert. Verschiedene Expressionsmethoden erlauben die Herstellung großer Mengen rekombinanter Proteine. Somit werden Proteine verfügbar, die in natürlichen Zellextrakten nur in sehr geringen Mengen vorliegen und nur sehr aufwendig daraus isoliert werden können.

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgt vielfach als Fusion mit einem Peptid, das ein spezifisches Epitop darstellt. Dieses Epitop ermöglicht nicht nur einen immunologischen Nachweis, sondern ermöglicht auch eine Affinitätsreinigung. Ideal sind dabei kurze Peptidsequenzen, die sich am N- oder C-Terminus befinden und die eigentliche Aktivität des Proteins nicht beeinflussen.

Histidin Tag (HisTag)

Alle genannten Voraussetzungen erfüllt der Histidin-Tag (His-Tag). Entsprechende Expressionskonstrukte codieren für eine Wiederholung einiger Histidinreste an der Insertionsstelle (5' oder 3' Ende) des entsprechenden Gens. Dabei erfolgt die Expression des rekombinanten Proteins mit einem amino (N-) oder carboxy (C-) terminal lokalisierten Histidin-Motiv, das aus mehreren benachbarten Histidinresten besteht. Solch ein His-Tag besitzt eine hohe Affinität zu Ni²⁺-Ionen wodurch poly-His-Tag-Proteine über Ni²⁺-Chelat Matrices bzw. Säulen hochspezifisch chromatographisch aufgereinigt werden können.

Anti-HisTag Antikörper

Mit unserem hochspezifischen monoklonalen anti-His-Tag Antikörper 13/45/31/2 (Zentgraf, DKFZ, Heidelberg, Deutschland) können mit immunologischen Nachweismethoden beliebige His-Tag Fusionsproteine in Zellen und/oder in komplexen Zellysaten nachgewiesen werden. Unser His-Tag Antikörper zeichnet sich durch eine sehr hohe Spezifität und Sensitivität gegenüber rekombinanten Proteinen aus, die ein Epitop von mindestens sechs Histidinresten, idealerweise am N- oder C- Terminus oder an beiden Termini tragen. Ein Expressionskonstrukt mit zehn Histidinresten erhöht die Bindungsaffinität des His-Tag Antikörpers um etwa das 20- bis 40-fache, ohne die Tertiärstruktur des Proteins zu beeinflussen. Die Antikörperbindung ist im Wesentlichen unabhängig von zusätzlichen flankierenden Aminosäuresequenzen, welches eine große Freiheit in der Auswahl der Expressionsvektoren bedeutet. Die Voraussetzung für eine Antikörperbindung ist dann allein die räumliche Zugänglichkeit des Antigens.

dianova GmbH

Warburgstr. 45 | 20354 Hamburg

| www.dianova.de | Tel: 040 - 45067 0 | Fax: 040 - 450 45067 490

Eigenschaften des HisTag Antikörpers von dianova GmbH:

- ü Hohe Spezifität
- ü Sehr hohe Sensitivität
- ü Außer dem 6xHis-Motiv keine weiteren flankierenden Aminosäuren für die Antikörperbindung erforderlich
- ü Nachweis des His-Tags amino (N-) oder carboxy(C-)-terminal möglich
- ü Hohe Stabilität des Antigen-Antikörper Komplexes
- ü Breites Anwendungsspektrum: ELISA, Immunfluoreszenz, Immunpräzipitation, Gefrierschnitte und Western Blot

Produkt	Klon	Anwendung	Menge	Kat.-Nr.	Hinweis
HisTag Antikörper inkl. Positiv- Kontrolle	13/45/31/2 Ms IgG1	FC, EL, IF, GS, IP, WB	200 µg/ml	DIA 900	
HisTag Antikörper Biotin	s.o.	FC, GS, IF, WB	200 µg/ml	DIA 930	a.A
HisTag Antikörper FITC	s.o.	FC, GS, IF	100 Tests	DIA 920	a.A
HisTag Antikörper BSA-	s.o.	EL, Biacore, Immunhistologie	1 mg	DIA 910	a.A
Positiv Kontrolle, 6xHisTag rek. p53			0,1 mg/ml	DIA 900	Nur in Verbindung mit dia PK 900 lieferbar.

EL, ELISA; FC, Durchflusszytometrie; GS, Gefrierschnitte; IF, Immunfluoreszenz; IP, Immunpräzipitation; Ms, Maus; rek, rekombinant; WB, Western Blot

Applikation:

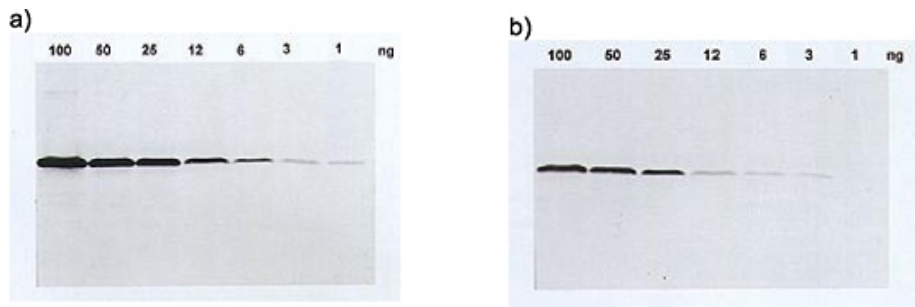
- ü ELISA (EL): 0,1 bis 0,4 µg/ml
- ü Western blot (WB): 1 bis 4 µg/ml
- ü Immunfluoreszenz (IF): 1 bis 4 µg/ml
- ü Immunpräzipitation (IP) : 4 µg/ml

Western Blot Analysen sind bei einer Verdünnung von 1/10000 Immunfluoreszenzfärbungen bei Verdünnungen von 1/1000 bis 1/2000 möglich!

Die **Funktions- und Einsatzmöglichkeiten** unseres hochspezifischen monoklonalen Maus anti-HisTag Antikörpers werden anhand der Veröffentlichung von Zentgraf, H. et al.: Detection of histidine-tagged fusion proteins by using high-specific mouse monoclonal anti-histidine tag antibody. Nucleic Acids Research, 3347-3348 (1995) vorgestellt:

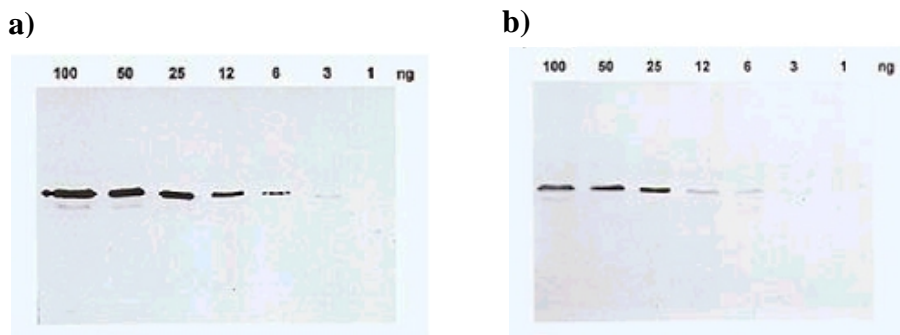
Spezifität des Histidin Tag Antikörpers

Die angegebenen Mengen an gereinigtem 6xHis p53 (N-terminaler Tag) wurden mit Extrakten von HeLa-Zellen gemixt (8 µg Gesamtprotein) und in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) analysiert. Im anschließenden Western Blot sind bei einer 1/100-fachen His-Tag Antikörperverdünnung noch 1 ng His-Tag Protein (a) und selbst bei einer 1/1000-fachen Antikörperverdünnung noch 3 ng His-Tag-Protein (b) aus 8 µg Gesamtproteinauftragsmenge mit einem Alk.Phos. - konjugierten Ziege-anti-Maus IgG sowie NBT und BCIP nachweisbar.



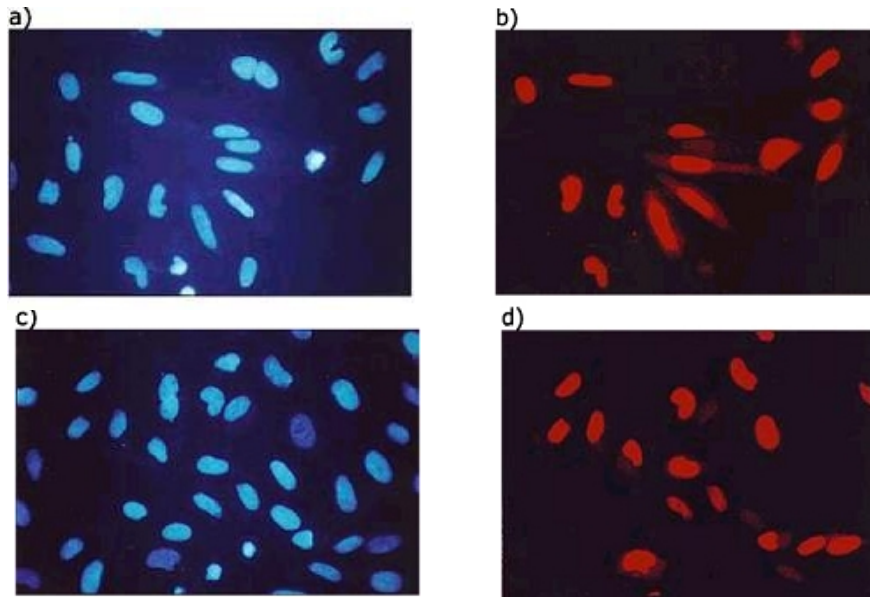
Sensitivität des Histidin Tag Antikörpers

Die angegebenen Mengen an gereinigtem 6xHis p53 (N-terminaler Tag) wurden in der PAGE analysiert und der Western Blot nach Standardbedingungen mit einem Alk.Phos. - konjugierten Ziege-anti-Maus IgG sowie NBT und BCIP durchgeführt. Bei einer 1/1000-fachen (a) bzw. 1/10000-fachen (b) Verdünnung des His-Tag Antikörpers sind noch 3 ng (a) bzw. 6 ng (b) His-Tag-Protein nachweisbar.

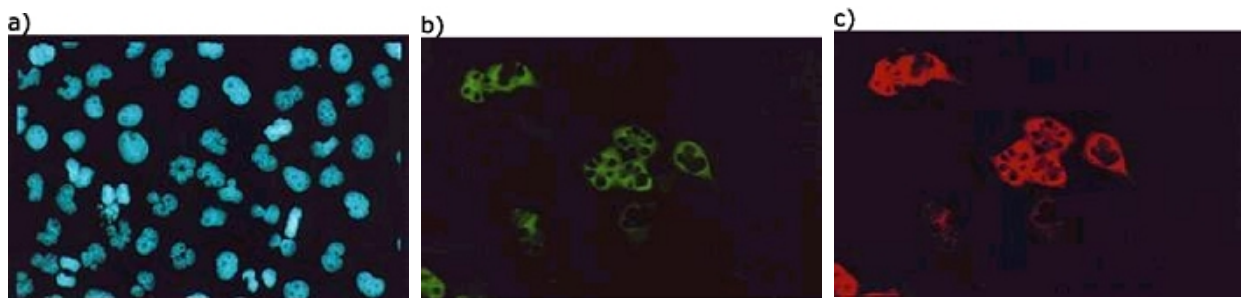


Histidin Tag Antikörper in der Immunfluoreszenz

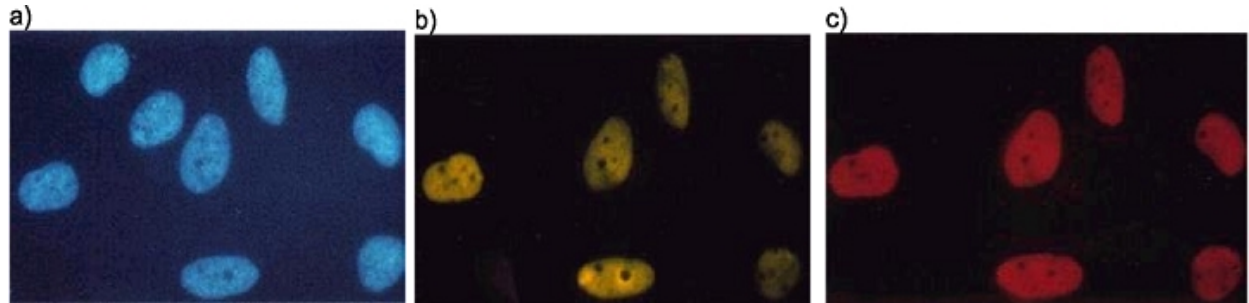
SAOS-2 Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCMV(His)6p53 transfiziert und in der Immunfluoreszenz simultan mit DAPI (a, c) bzw. mit dem His-Tag Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 (b) oder 1:2500 (d) in Kombination mit einem Cy3-markierten Ziege-anti-Maus Zweitantikörper dargestellt.



HeLa-Zellen wurden mit dem Plasmid pCMV-(His)6-GFP-APKD1-5a transfiziert und in der Immunfluoreszenz mit DAPI (a) und dem His-Tag Antikörper (1/100-fache Verdünnung) in Kombination mit einem Cy3-markierten Ziege-anti-Maus Antikörper dargestellt (b). Der Nachweis der GFP-Fluoreszenz (c) erfolgte mit einem Fluoreszeinfilter. Deutlich wird die cytoplasmatische Lokalisation des exprimierten Proteins (b, c).

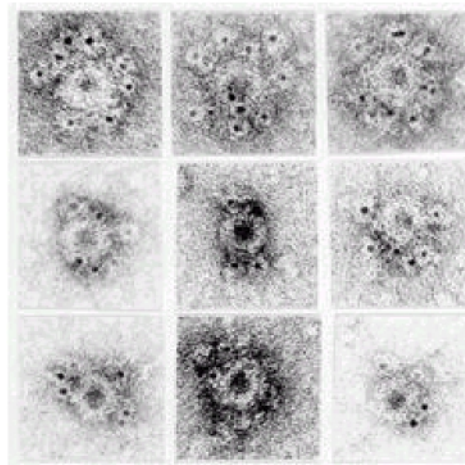


HeLa-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCMV-(His)₆-GFP-H1° transfiziert. Die Zellkerne wurden in einer DAPI-Färbung (a) und das exprimierte Fusionsprotein mit dem His-Tag Antikörper in Kombination mit einem Cy3-markierten Sekundärantikörper (c) dargestellt. Der Nachweis der GFP-Fluoreszenz erfolgte mittels eines FITC-Filters (b). Das Fusionsprotein zeigt eine eindeutige Lokalisation in den Zellkernen (b, c).



Histidin Tag Antikörper in der Elektronenmikroskopie

Mittels Immun-Elektronenmikroskopie lassen sich His-Tag Proteine mit dem His-Tag Antikörper und Gold-markierten Sekundärantikörpern darstellen. HeLa-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCMV(His)₆HbC transfiziert. Rekombinante core-Partikel wurden isoliert und mittels der Immun-Elektronenmikroskopie nach Dekoration mit Anti-Kaninchen-HbC-Antiserum (obere drei Partikel) oder Histidin-Tag Antikörper (übrige Partikel) als Erstantikörper und mit 5nm Gold markiertem Ziege-anti-Kaninchen IgG bzw. 5nm Gold markiertem Ziege-anti-Maus IgG als Zweitantikörper markiert. n Zellkernen (b, c).



Detection of- histidine tagged fusion proteins by using a- high specific mouse monoclonal- anti histidine tag antibody

© by Zentgraf, H.1, Frey, M.1, Schwinn, S.1, Tessmer, C.1, Willemann, B.1, Samstag, Y.21, Velhagen, I.1 Nucl. Acids Res., 23, 3347-3348 (1995).

Recombinant proteins are utilized for various purposes in molecular biology such as the production of antibodies or investigation of the mechanism of protein-nucleic acid or protein-protein interactions. Many prokaryotic expression vectors have been established enabling synthesis of the protein of interest as a fusion with a peptide, thus facilitating purification. Expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* as a fusion protein with neighbouring histidine residues is one of the most popular methods (1; Qiagen), because these proteins have useful attributes. The affinity of the histidine tag motif to Ni²⁺ by chelation is strong and selective enough to enable purification of the protein to homogeneity by affinity chromatography on a Ni²⁺-NTA adsorbant (1). Additionally, an enterokinase cleavage site engineered between the N- or C- terminus of the protein of interest and the polyhistidine fusion partner facilitates the removal of the tag. A drawback of the polyhistidine fusion system so far may be the lack of sera specific for the affinity tag. To circumvent this limitation we raised mouse monoclonal anti-histidine tag antibodies by immunizing mice with mixtures histidine-tagged proteins, engineered in our laboratory using standard immunizing protocols (2). Such an antibody allows the detection of proteins with a histidine tag without the need to raise specific sera against the protein of interest. Here we present data obtained using the anti-histidine tag antibody mAb 13/45/31(subclass IgG2a).

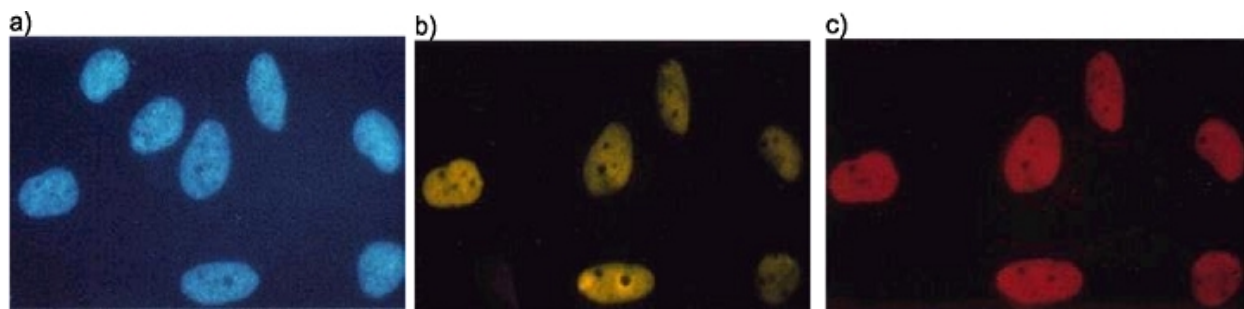


Fig. 1 Immunofluorescence of SAOS-2 cells transfected with the expression plasmid pUHD-His-p53mt267. Cells were stained simultaneously with (a) DAPI, (b) mAb 13/45/31 as first and a FITC coupled goat-anti-mouse antibody as secondary antibody and (c) a polyclonal rabbit anti-p53 serum and, subsequently, a Cy3 coupled goat-anti-rabbit antibody.

First we tested mAb 13/45/31 in immunofluorescence analysis. For this we transfected p53-negative SAOS-2 cells with the expression plasmid pUHD-His-p53mt267. This plasmid is a derivative of plasmid pUHD 10-1 (3) with additional six histidine residues and an enterokinase cleavage site at the N-terminus of the p53 coding region. Staining with DAPI (4',6-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride; Boehringer) allowed detection of cell nuclei. (Fig. 1a) Most of the cells expressed p53 histidine fusion protein clearly demonstrated by immunofluorescence with mAb 13/45/31 (1b) or rabbit anti-p53-serum (Fig 1c). With both antibodies the identical staining pattern of cell nuclei was observed. In another set of experiments we performed immunoblot analyses using mAb 13/45/31. Lysates of bacteria transformed with pQE/HBx comprising the X-reading frame of the hepatitis B virus and an enterokinase cleavage site cloned into pQE-8 were analysed before and after induction with IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; Serva) by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Coomassie-blue staining (Fig. 2, lanes 1 and 2).



Fig. 2 Detection of HBx protein with N-terminal histidine-tag and enterokinase cleavage site in bacterial lysates after PAGE and Coomassie-blue staining (lanes 1 and 2) and immunoblotting of a gel run in parallel with the mAb 13/45/31 (lanes 1' and 2'). Samples were analysed before (lanes 1 and 1') and after IPTG induction of the bacteria (lanes 2 and 2'). Marker, M; 10kDa ladder (Gibco-BRL).



Fig. 3 Detection of purified recombinant Cofilin expressed as fusion protein tagged at the N-terminus with an enterokinase site and six histidine residues. Immunoblotting was performed before (lanes 1 and 3) and after cleavage with enterokinase (lanes 2 and 4) with mAb 13/45/31 (lanes 1 and 2) or a polyclonal rabbit anti-Cofilin antibody (lanes 3 and 4). Marker positions are 15, 18, 30, 45 and 67 kDa, respectively.

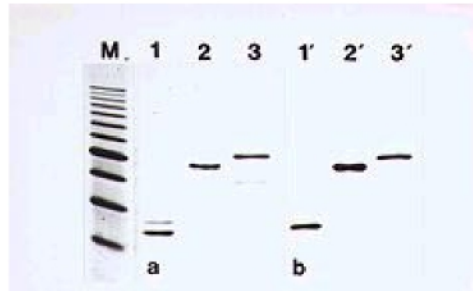


Fig. 4 Detection of purified recombinant fusion proteins tagged at the C-terminus with six histidine residues by PAGE and Coomassie-blue staining (a) and immunoblotting (b) with mAb 13/45/31. Proteins were C22 (lanes 1 and 1'), C33 (lanes 2 and 2') and Ba (lanes 3 and 3'). Marker, M; 10 kDa ladder with



lowest band 20 kDa.

Fig. 5 Immunoprecipitation of recombinant histidine and enterokinase site tagged fusion protein hsp70 from bacterial extracts with mAb 13/45/31. Precipitation was performed with bacterial lysate before (lane 1) and after (lane 2) induction and analyzed following PAGE and immunoblotting with a polyclonal rabbit anti-hsp70 serum. Marker, M; 10kDa ladder.

The ~18kDa fusion protein was clearly detectable after IPTG induction (Fig. 2, lane 2). The corresponding immunoblot is shown in Fig. 2 (lane 1' and 2') and documents the high specificity of mAb 13/45/31. Even low amounts of protein not attributable to the recombinant protein after Coomassie-blue staining were detectable after immunoblotting with the mAb 13/45/31 (Fig. 2, lane 1 and 1'). Cleavage of the N-terminal-tagged histidine-enterokinase-fusion protein with enterokinase (Boehringer) prior to immunoblotting resulted in the complete loss of the specific signal of mAb 13/45/31 as shown for the Cofilin fusion protein (Fig. 3, compare lane 1 and 2). A blot prepared in parallel using a polyclonal rabbit anti-Cofilin serum served as a control (Fig. 3, lane 3 and 4). In a further assay we performed PAGE followed by immunoblotting with purified fusion proteins tagged solely with six histidine residues at the C-terminus. After Coomassie-blue staining (Fig. 4a) the pattern of the proteins C22 (lane 1 and 1'), C33 (lanes 2 and 2'), and Ba (lanes 3 and 3') was identical to that observed after immunoblotting using mAb 13/45/31 (Fig. 4b) thus demonstrating the highly specific affinity of mAb 13/45/31 to the epitop formed by the six histidine residues. To prove further applicabilities of mAb 13/45/31 we performed immunoprecipitation studies. One example is given in Fig. 5. Bacteria were transformed with a histidine-enterokinase-heat shock protein (hsp70) construct and expression was induced with IPTG. Using the mAb 13/45/31 we performed immunoprecipitation with bacterial lysates before and after induction. After PAGE of the precipitate and immunoblotting with a polyclonal rabbit anti-hp70 serum we detected the precipitated hsp70 fusion protein at the expected mol. wt of



~70 kDa. Other applications we have successfully examined are the use of mAb 13/45/31 in ELISA and microinjection studies (data not shown).

From the data presented here, using mAb 13/45/31 in immunofluorescence, immunoblotting and immunoprecipitation studies and, in addition, in analysis using ELISA and microinjection techniques, we believe mouse monoclonal anti-histidine tag antibody 13/45/31 is a powerful tool in molecular and cellular biology.

References

1. Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. and Stüber, D. (1988) *Biotechnology* 6, 1321-1325
2. Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
3. Deuschle, U., Pepperkok, R., Wang, F., Giordano, T.J., McAllister, W.T., Ansorge, W. and Bujard, H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5400-5404.

1 Angewandte Tumorstudiologie, INF 242 und

2 Angewandte Immunologie, INF 280, Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany