

## Technische Information HIS(6x)-Epitop-Tag Antikörper

### 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 (His-Tag)

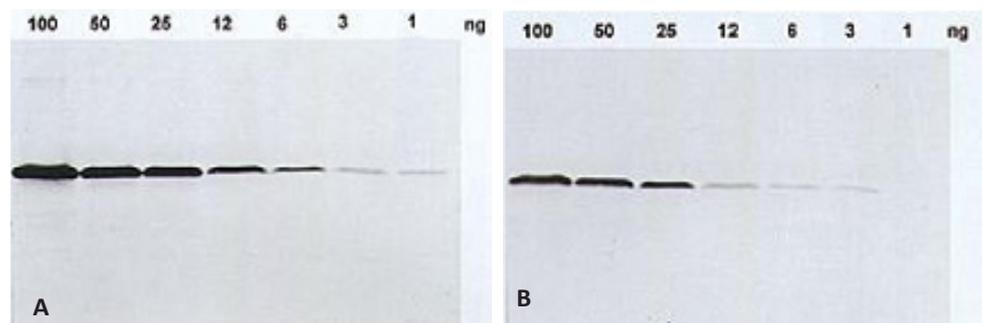
Alle genannten Voraussetzungen erfüllt der Histidin-Tag (His-Tag). Entsprechende Expressionskonstrukte codieren für eine Wiederholung einiger Histidinreste an der Insertionsstelle (5' oder 3' Ende) des entsprechenden Gens. Dabei erfolgt die Expression des rekombinanten Proteins mit einem amino (N-) oder carboxy (C-) terminal lokalisierten Histidin-Motiv, das aus mehreren benachbarten Histidinresten besteht. Solch ein His-Tag besitzt eine hohe Affinität zu Ni<sup>2+</sup>-Ionen wodurch poly-His-Tag-Proteine über Ni<sup>2+</sup>-Chelat Matrices bzw. Säulen hochspezifisch chromatographisch aufgereinigt werden können.

### Anti-HisTag Antikörper

Mit dem 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. Der 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.

### Spezifität des Histidin Tag Antikörpers im Western Blot

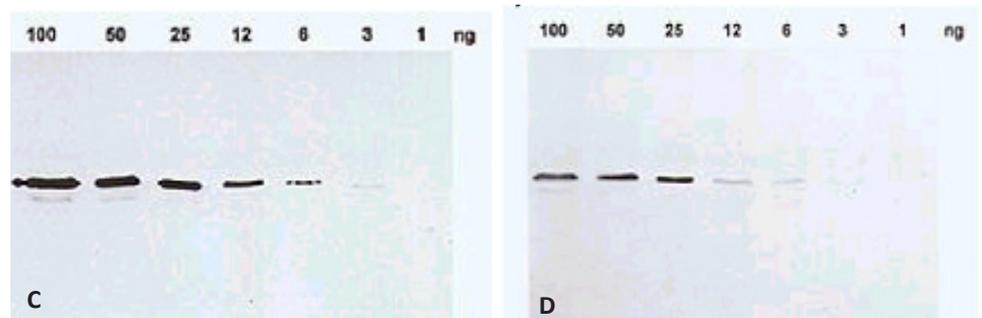
Die angegebenen Mengen an gereinigtem 6xHis p53 (N-terminaler Tag) wurden mit Extrakten von HeLa-Zellen gemixt (8 µg Gesamtprotein) und in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) analysiert. Im anschließenden Western Blot sind bei einer 1/100-fachen His-Tag Antikörperverdünnung noch 1 ng His-Tag Protein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



### Sensitivität des Histidin Tag Antikörpers im Western Blot

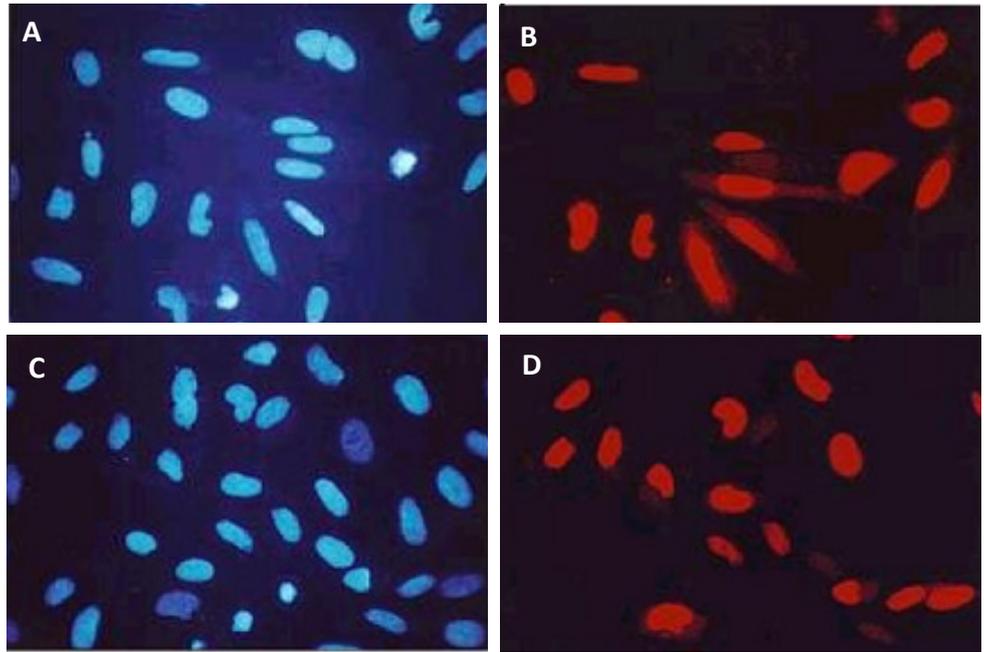
Die angegebenen Mengen an gereinigtem 6xHis p53 (N-terminaler Tag) wurden in der PAGE analysiert und der Western Blot nach Standardbedingungen mit einem Alk.Phos. - konjugierten Ziege-anti-Maus IgG sowie NBT und BCIP durchgeführt. Bei einer 1/1000-fachen (a) bzw. 1/10000-fachen (b) Verdünnung des His-Tag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

HeLa-Zellen wurden mit dem Plasmid pCMV-(His)<sub>6</sub>-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 Fluoreszenzfilter. Deutlich wird die cytoplasmatische Lokalisation des exprimierten Proteins (b, c).



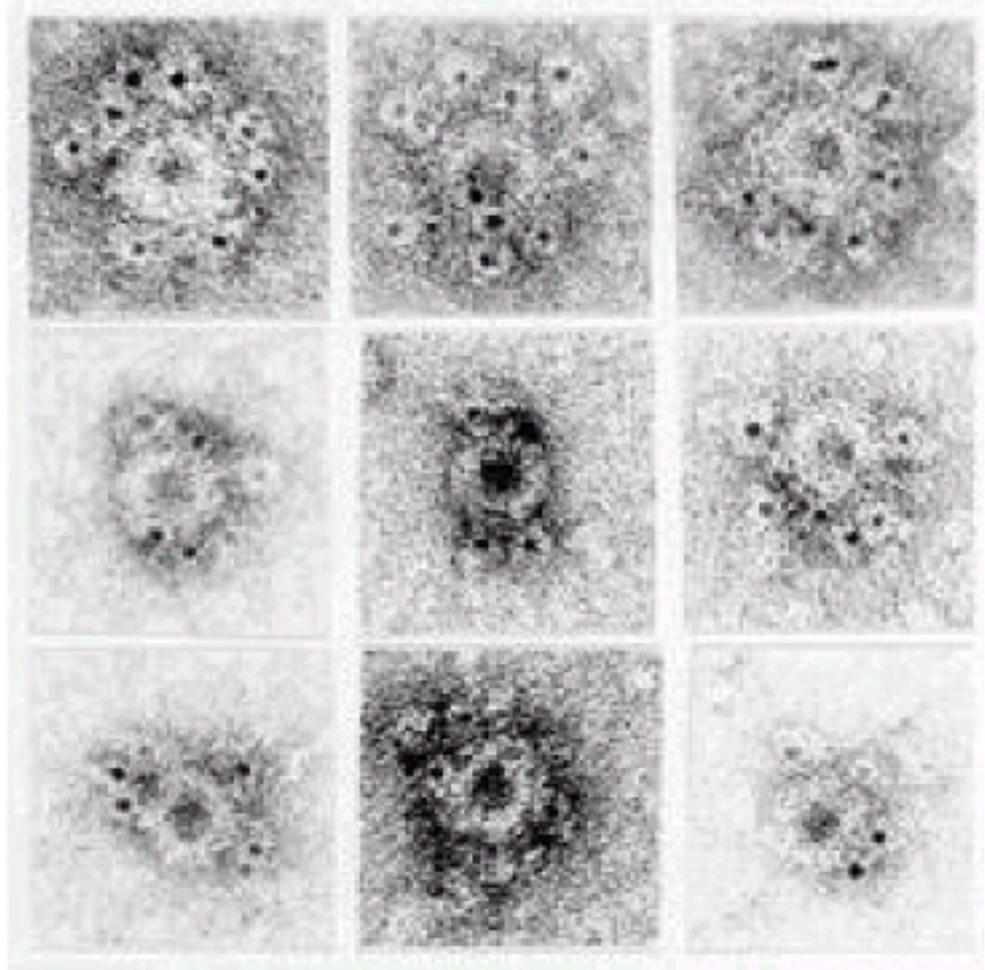
### Sensitivität des HIS-Tag Antikörpers in der indirekten Immunfluoreszenz

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.



### Evaluation des 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. Zellkernen.



### Bestellinformationen

Spezifität	HIS <sub>6</sub> -Tag, erkennt N-/C-terminale und interne Tags
Klon	13/45/31-2
Wirt / Isotyp	Maus / IgG1
Affinität (Biacore™)	3x 10 <sup>-10</sup> M
Anwendungen	WB, ELISA, IHC, FACS, EM

Bestellnummer	Menge
DIA-900	200 µg
DIA-910-1MG	1 mg
DIA-920 FITC	100 Test
DIA-900-M	Muster