

GEBRAUCHSANLEITUNG

Glutathione Agarose Resin

**Agarose zur Affinitätsreinigung
von GST-Tag-Fusionsproteinen und
anderen Glutathion-Bindungsproteinen**

(Kat.-Nr. 42172)



SERVA Electrophoresis GmbH - Carl-Benz-Str. 7 - 69115 Heidelberg
Phone +49-6221-138400, Fax +49-6221-1384010
e-mail: info@serva.de -<http://www.serva.de>

Inhaltsverzeichnis

1. GLUTATHIONE AGAROSE RESIN	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Lagerungsbedingungen	2
2. AFFINITÄTSREINIGUNG VON GST-TAG-FUSIONSPROTEINEN IM BATCH-VERFAHREN	2
2.1. Waschen der Agarosematrix	2
2.2. Äquilibrierung der Agarosematrix	3
2.3. Probenaufgabe	3
2.4. Waschen der Agarose	3
2.5. Elution des Fusionsproteins	4
2.6. Regenerierung und Lagerung der Agarosematrix	4
3. REINIGUNG VON GST-TAG-FUSIONSPROTEINEN MITTELS AFFINITÄTSSÄULEN	5
3.1. Waschen der Agarosematrix	5
3.2. Äquilibrierung der Agarosematrix	5
3.3. Probenaufgabe	5
3.4. Waschen der Agarose	6
3.5. Elution des Fusionsproteins	6
3.6. Regenerierung und Lagerung der Agarosematrix	6
4. REINIGUNG VON GST-TAG-FUSIONSPROTEINEN MITTELS ZENTRIFUGATIONSAFFINITÄTSSÄULEN	7
4.1. Waschen der Agarosematrix	7
4.2. Äquilibrierung der Agarosematrix	7
4.3. Probenaufgabe	8
4.4. Waschen der Agarose	8
4.5. Elution des Fusionsproteins	8
4.6. Regenerierung und Lagerung der Agarosematrix	9
5. PROBLEMBEHANDLUNG	9
5.1. Probenapplikation	9
5.2. Adsorption	10
5.3. Elution	11
6. BESTELLINFORMATIONEN	11

1. Glutathione Agarose Resin

1.1. Allgemeine Hinweise

Glutathione Agarose Resin ist optimal zur Affinitätsreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Tag-Fusionsproteinen und anderer Glutathion-Bindungsproteinen entweder über eine Säule oder im Batch-Verfahren. Die Agarose-Matrix wird als 75 % (v/v) Suspension in 20 % (v/v) Ethanol geliefert.

1.2. Lagerungsbedingungen

Lagern Sie das Produkt bei +2 °C bis +8 °C (35 °F – 46 °F). Bitte nicht einfrieren. Wird das Produkt bei der empfohlenen Temperatur gelagert, ist es mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

2. Affinitätsreinigung von GST-Tag-Fusionsproteinen im Batch-Verfahren

2.1. Waschen der Agarosematrix

Bestimmen Sie die benötigte Menge Agarose anhand der nachfolgenden Tabelle.

Expressionsrate	<i>E. coli</i> Kultur	Resuspendiert in	Volumen Proteinlysate
10 mg/L	800 ml (ca. 3,2 g Zellpellet ¹)	ca. 16 ml PBS ²	ca. 20 ml
50 mg/L	160 ml (ca. 0,64 g Zellpellet ¹)	ca. 3,2 ml PBS ²	ca. 4 ml

¹: Im Durchschnitt ergeben 250 ml Bakterienkultur 1 g feuchtes Zellpellet.

²: 1 g Pellet werden in 2 – 5 ml PBS aufgenommen.

Tab. 1: Benötigtes Kulturvolumen pro 1 ml Glutathion-Agarose-Matrix Bettvolumen (entspricht 1,333 ml der 75 % (v/v) Agarose-Suspension).

- Um eine homogene Agarose-Suspension zu erhalten, sollte die Flasche mit der Agarose vor Gebrauch vorsichtig geschüttelt werden.
- Unmittelbar danach wird die benötigte Menge Agarose-Suspension in ein Reaktionsgefäß pipettiert und bei 500 x g für 5 min zentrifugiert.
- Der Überstand wird vorsichtig abgetrennt und verworfen.

Wichtig: Die Bindungskapazität kann proteinabhängig schwanken, z. B. aufgrund von den Eigenschaften des Fusionsproteins, des Expressionsorganismus und den Kulturbedingungen.

2.2. Äquilibrierung der Agarosematrix

Bindungspuffer:

Der Bindungspuffer (PBS) hat folgende Zusammensetzung

10 mM Na₂HPO₄ (SERVA Kat.-Nr. 30200), 1,8 mM KH₂PO₄ (SERVA Kat.-Nr. 26870), 2,7 mM KCl (SERVA Kat.-Nr. 26868), 140 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 7,3

- Hierbei wird die Matrix mit Bindungspuffer (10-faches Bettvolumen) gemischt und anschließend bei 500x g für 5 min zentrifugiert.
- Der Überstand wird vorsichtig abgetrennt und verworfen.
- Eine 50 % (v/v) Suspension der äquilibrierten Matrix kann entweder direkt verwendet oder bei + 4 °C (39 °F) für ca. 1 Monat gelagert werden.

2.3. Probenaufgabe

- Nachdem die Agarose äquilibriert ist, kann die Probe mit dem zu reinigenden Fusionsprotein aufgegeben werden.
- Das Zellpellet der Expressionskultur wird in Bindungspuffer (PBS) suspendiert (siehe Tab. 1) und geklärt.
- Das geklärte Lysat wird zur Agarosematrix gegeben, 30 min bei Raumtemperatur gut mischen.
- Falls notwendig kann die Bindung des Proteins an die Agarose durch eine verlängerte Kontaktzeit unterstützt werden.
- Anschließend wird die Agarose durch Zentrifugation (5 min bei 500x g) sedimentiert.

2.4. Waschen der Agarose

- Zugabe von Bindungspuffer (10-faches Bettvolumen).
- Mischen und 5 min bei 500x g zentrifugieren.
- Überstand vorsichtig abtrennen und werfen.
- Das Waschen wird solange wiederholt bis die Agarose mit 3x 10-fachen Bettvolumen PBS gewaschen wurde oder bis bei der Absorptionsmessung A_{280nm} eine Basislinie erreicht ist.

2.5. Elution des Fusionsproteins

Elutionspuffer:

Der Elutionspuffer hat folgende Zusammensetzung

10 mM Glutathion reduziert (SERVA Kat.-Nr. 23180) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

- Zugabe von 1x Bettvolumen Elutionspuffer zur Agarosematrix.
- 10 min bei Raumtemperatur gut mischen.
- Zentrifugation: 5 min bei 500x g
- Überstand vorsichtig abtrennen, in ein Reaktionsgefäß überführen und auf Eis lagern.
- Elution mind. 2x wiederholen
- Proteingehalt der Einzelfraktionen mittels $A_{280\text{nm}}$ -Messung, Bradford-Assay oder SDS PAGE prüfen.
- Danach können Elutionsfraktionen, die das Fusionsprotein enthalten, vereinigt werden.

2.6. Regenerierung und Lagerung der Agarosematrix

Regenerierungspuffer:

Die Regenerierung erfolgt mit unterschiedlichen Puffern

Puffer 1: 100 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 8,5

Puffer 2: 100 mM Natriumacetat (SERVA Kat.-Nr. 21249), 500 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 4,5

- Schrittweise Zugabe von 10 Bettvolumen **Puffer 1** zur Agarosematrix.
- Agarosematrix sedimentieren (5 min, 500 x g).
- Anschließend Zugabe von 10 Bettvolumen **Puffer 2**.
- Die Regenerierungsschritte mit beiden Puffern werden 2x wiederholt.
- Danach wird die Matrix mit 5 Bettvolumen Bindungspuffer (PBS) gewaschen.
- Wird die Matrix nicht unmittelbar wieder eingesetzt, so wird mit 5 Bettvolumen 20 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend bei + 4°C (39 °F) gelagert.

3. Reinigung von GST-Tag-Fusionsproteinen mittels Affinitätssäulen

Das nachfolgende Protokoll ist für die Proteinreinigung mit gravitationsgetriebenen Affinitätssäulen, z. B. Kat.-Nr. 42175, 42176.

3.1. Waschen der Agarosematrix

Bestimmen Sie die benötigte Menge Agarose anhand von Tabelle Tab.1.

- Um eine homogene Agarose-Suspension zu erhalten, sollte die Flasche mit der Agarose vor Gebrauch vorsichtig geschüttelt werden.
- Unmittelbar danach wird die benötigte Menge Agarose-Suspension in die entsprechende Säule pipettiert.
- Durch Öffnen des unteren Verschlusses der Säule läuft der Lagerungspuffer ab.

3.2. Äquilibrierung der Agarosematrix

Bindungspuffer:

Der Bindungspuffer (PBS) hat folgende Zusammensetzung

10 mM Na_2HPO_4 (SERVA Kat.-Nr. 30200), 1,8 mM KH_2PO_4 (SERVA Kat.-Nr. 26870), 2,7 mM KCl (SERVA Kat.-Nr. 26868), 140 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 7,3

- Hierbei wird die Matrix mit Bindungspuffer (5-faches Bettvolumen) versetzt.
- Die Vermeidung von Luftblasen ist sehr wichtig. Der Puffer kann hierzu über einen Glasstab, der an die Säulenwand angelegt wird, aufgegeben werden.
- Die verschlossene Säule wird anschließend vorsichtig invertiert, so dass Puffer und Matrix gut vermischt werden.
- Säule unten und oben öffnen.
- Der Säulendurchlauf (Bindungspuffer) wird verworfen.
- Der Äquilibrierungsschritt wird 2x wiederholt.
- Eine 50 % (v/v) Suspension der äquilibrierten Matrix kann entweder direkt verwendet oder bei + 4 °C (39 °F) für ca. 1 Monat gelagert werden.

3.3. Probenaufgabe

Wichtig: Die Bindungskapazität kann proteinabhängig schwanken, z. B. aufgrund von den Eigenschaften des Fusionsproteins, des Expressionsorganismus und den Kulturbedingungen.

- Nachdem die Agarose äquilibriert ist, kann die Probe mit dem zu reinigenden Fusionsprotein auf die unten geschlossene Säule gegeben werden.
- Das Zellpellet der Expressionskultur wird in Bindungspuffer (PBS) suspendiert (siehe Tab. 1) und geklärt.
- Das geklärte Lysat wird zur Agarosematrix gegeben.
- Säule oben verschließen.
- Matrix und Probe 30 min bei Raumtemperatur gut mischen.
- Falls notwendig kann die Bindung des Proteins an die Agarose durch eine verlängerte Kontaktzeit unterstützt werden.
- Anschließend wird der obere und untere Verschluss der Säule geöffnet.
- Der Säulendurchlauf (Bindungspuffer) wird verworfen.

3.4. Waschen der Agarose

- Schließen der unteren Säulenöffnung.
- Zugabe von Bindungspuffer (10-faches Bettvolumen).
- Säule oben verschließen, Matrix und Puffer gut mischen.
- Überstand vorsichtig abtrennen und verwerfen.
- Das Waschen wird solange wiederholt bis die Agarose mit 3x 10-fachen Bettvolumen PBS gewaschen wurde oder bis bei der Absorptionmessung $A_{280\text{nm}}$ eine Basislinie erreicht ist.

3.5. Elution des Fusionsproteins

Elutionspuffer:

Der Elutionspuffer hat folgende Zusammensetzung:

10 mM Glutathion reduziert (SERVA Kat.-Nr. 23180) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

- Säule unten verschließen.
- Zugabe von 1x Bettvolumen Elutionspuffer zur Agarosematrix.
- Säule oben verschließen und 10 min bei Raumtemperatur gut mischen.
- Agarosematrix absetzen lassen.
- Unteren Verschluss der Säule öffnen.
- Durchfluss auffangen und auf Eis lagern.
- Elution mind. 2x wiederholen.
- Proteingehalt der Einzelfractionen mittels $A_{280\text{nm}}$ -Messung, Bradford-Assay oder SDS PAGE prüfen.
- Danach können Elutionsfraktionen, die das Fusionsprotein enthalten, vereinigt werden.

3.6. Regenerierung und Lagerung der Agarosematrix

Regenerierungspuffer:

Die Regenerierung erfolgt mit unterschiedlichen Puffern

Puffer 1: 100 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 8,5

Puffer 2: 100 mM Natriumacetat (SERVA Kat.-Nr. 21249), 500 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 4,5

- Schrittweise Zugabe von 10 Bettvolumen **Puffer 1** zur Agarosematrix.
- Agarosematrix sedimentieren (5 min, 500 x g).
- Anschließend Zugabe von 10 Bettvolumen **Puffer 2**.
- Die Regenerierungsschritte mit beiden Puffern werden 2x wiederholt.
- Danach wird die Matrix mit 5 Bettvolumen Bindungspuffer (PBS) gewaschen.
- Wird die Matrix nicht unmittelbar wieder eingesetzt, so wird mit 5 Bettvolumen 20 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend bei + 4°C (39 °F) gelagert.

4. Reinigung von GST-Tag-Fusionsproteinen mittels Zentrifugationsaffinitätssäulen

Zur Reinigung von max. 400 µg GST-Fusionprotein werden 50 µl Glutathion-Agarose-Matrix benötigt.

Für das nachfolgende Protokoll werden Minizentrifugationssäulen benötigt, deren Fritte eine Porengröße von 10 – 20 µm besitzt, z. B. Kat.-Nr. 42173.

4.1. Waschen der Agarosematrix

- Um eine homogene Agarose-Suspension zu erhalten, sollte die Flasche mit der Agarose vor Gebrauch vorsichtig geschüttelt werden.
- Unmittelbar danach werden 67 µl Agarose-Suspension (entspricht 50 µl Bettvolumen) in die Säule pipettiert.
- Öffnen des unteren Verschlusses und Säule in ein Reaktionsgefäß stellen.
- Zentrifugation: 30 s bei 500x g.
- Säulendurchfluss verwerfen.

4.2. Äquilibrierung der Agarosematrix

Bindungspuffer:

Der Bindungspuffer (PBS) hat folgende Zusammensetzung:

10 mM Na₂HPO₄ (SERVA Kat.-Nr. 30200), 1,8 mM KH₂PO₄ (SERVA

Kat.-Nr. 26870), 2,7 mM KCl (SERVA Kat.-Nr. 26868), 140 mM NaCl (SERVA

Kat.-Nr. 30183), pH 7,3

- Säule unten verschließen und die Matrix mit 500 µl Bindungspuffer versetzen.
- Die verschlossene Säule wird anschließend vorsichtig invertiert, so dass Puffer und Matrix gut vermischt werden.

- Öffnen der unteren Verschlusses und Säule in ein Reaktionsgefäß stellen
- Zentrifugation: 30 s bei 500x g.
- Säulendurchfluss verwerfen.
- Eine 50 % (v/v) Suspension der äquilibrierten Matrix kann entweder direkt verwendet oder bei + 4 °C (39 °F) für ca. 1 Monat gelagert werden.

4.3. Probenaufgabe

Wichtig: Die Bindungskapazität kann proteinabhängig schwanken, z. B. aufgrund von den Eigenschaften des Fusionsproteins, des Expressionsorganismus und den Kulturbedingungen.

- Nachdem die Agarose äquilibriert ist, kann die Probe mit dem zu reinigenden Fusionsprotein auf die unten geschlossene Säule gegeben werden.
- Das Zellpellet der Expressionskultur wird in 700 µl Bindungspuffer (PBS) suspendiert und geklärt.
- Das geklärte Lysat wird zur Agarosematrix gegeben.
- Säule oben verschließen.
- Matrix und Probe 30 min bei Raumtemperatur gut mischen.
- Falls notwendig kann die Bindung des Proteins an die Agarose durch eine verlängerte Kontaktzeit unterstützt werden.
- Öffnen des unteren Verschlusses und Säule in ein Reaktionsgefäß stellen
- Zentrifugation: 30 s bei 500x g.
- Säulendurchfluss verwerfen.

4.4. Waschen der Agarose

- Schließen der unteren Säulenöffnung.
- Zugabe von 500 µl Bindungspuffer.
- Säule oben verschließen, Matrix und Puffer gut mischen.
- Öffnen der unteren Verschlusses und Säule in ein Reaktionsgefäß stellen.
- Zentrifugation: 30 s bei 500x g.
- Säulendurchfluss verwerfen.
- Das Waschen wird solange wiederholt bis die Agarose mit 3x 500 µl PBS. gewaschen wurde oder bis bei der Absorptionsmessung A_{280nm} eine Basislinie erreicht ist.

4.5. Elution des Fusionsproteins

Elutionspuffer:

Der Elutionspuffer hat folgende Zusammensetzung

10 mM Glutathion reduziert (SERVA Kat.-Nr. 23180) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

- Säule unten verschließen.
- Zugabe von 50 µl Elutionspuffer zur Agarosematrix.
- Säule oben verschließen und 10 min bei Raumtemperatur gut mischen.
- Öffnen des unteren Verschlusses und Säule in ein Reaktionsgefäß stellen.
- Zentrifugation: 30 s bei 500x g.
- Durchfluss auf Eis lagern.
- Elution mind. 2x wiederholen.
- Proteingehalt der Einzelfraktionen mittels A_{280nm} -Messung, Bradford-Assay oder SDS PAGE prüfen.
- Danach können Elutionsfraktionen, die das Fusionsprotein enthalten vereinigt werden.

4.6. Regenerierung und Lagerung der Agarosematrix

Regenerierungspuffer:

Die Regenerierung erfolgt mit unterschiedlichen Puffern

Puffer 1: 100 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 8,5

Puffer 2: 100 mM Natriumacetat (SERVA Kat.-Nr. 21249), 500 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 4,5

- Schrittweise Zugabe von 500 µl **Puffer 1** zur Agarosematrix.
- Agarosematrix sedimentieren (1 min, 500 x g).
- Anschließend Zugabe von 500 µl **Puffer 2**.
- Die Regenerierungsschritte mit beiden Puffern werden 2x wiederholt.
- Danach wird die Matrix mit 250 µl Bindungspuffer (PBS) gewaschen.
- Wird die Matrix nicht unmittelbar wieder eingesetzt, so wird mit 250 µl 20 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend bei + 4°C (39 °F) gelagert.

5. Problembehandlung

5.1. Probenapplikation

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Geringe Proteinausbeute	Probleme bei der	Prüfen, ob Protein und GST-Tag im richtigen

	Vektorkonstruktion	Leserahmen
	Geringe Proteinexpression	Optimierung der Expressionsbedingungen
	Bildung von <i>Inclusion bodies</i>	Verringerung der Wachstumstemperatur von 37 °C auf 30 °C – 15 °C
	Ungenügende Proteinextraktion	Prüfung der Extraktionsbedingungen (Lysozym, Ultraschall) 20 % nicht-ionisches Detergenz zur besseren Extraktion und/oder Proteinsolubilisierung
Zu hohe oder zu niedrige Proteinkonzentration	Hochverdünnte Probe	Konzentrieren der Probe vor dem Aufgeben auf die Säule Adsorption im Batch-Format und anschließend ggf. Wechsel auf Säulenformat
	Hochkonzentrierte Probe	Verdünnen der Probe

5.2. Adsorption

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Zielprotein bindet nicht an Matrix	Zu stringente Ultraschallbehandlung	Mildere Ultraschallbehandlung, da Konformationsänderungen möglich, die Bindung an Matrix verhindern
	Reduzierendes Agens fehlt	Zugabe von Dithiothreitol (DTT, Endkonzentration 5 mM) zum Lysepuffer
	Hochverdünnte Probe	Konzentrieren der Probe vor dem Aufgeben auf die Säule

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Zielprotein bindet nicht an Matrix	Flussrate zu hoch	Adsorption im Batch-Format verbessert Kontakt zwischen Probe und Matrix
	Kanalbildung in der Matrix	Säule erneut packen

	Bedingungen für Proteinbindung nicht optimal	Prüfung der Bedingungen
	Bindungskapazität erschöpft	Geringere Proteinmenge einsetzen Regenerierung der Matrix Verwendung frischer Matrix

5.3. Elution

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Große Mengen an Verunreinigungen	Zu stringente Ultraschallbehandlung	Mildere Ultraschallbehandlung, da Konformationsänderungen möglich, die Bindung an Matrix verhindern
	Abbau des Fusionsproteins	Zugabe von Protease-Inhibitoren Durchführung bei +2 °C - +8 °C Protease-defizientes Expressionssystem
	Zu wenige Waschschrte	Zahl der Waschschrte erhöhen
	Co-Reinigung von Chaperonen	Zugabe von 5 mM MgCl ₂ und 5 mM ATP zum Lysat vor der Reinigung
Schlechte Elution des Zielproteins	Zu milde Elutionsbedingungen	Erhöhung der Elutionsvolumens
	Flussrate zu hoch	Flussrate der Elution verringern
	Ungeeignete Elutionsbedingungen	Überprüfung der Elutionsbedingungen, Zugabe von 50 mM red. Glutathion verbessert Elution

6. Bestellinformationen

Säulen					
Produkt	Porengröße der Fritte	Resin-volumen	Gesamt-kapazität	Kat.-Nr.	Menge

Mini Columns	20 µm	100 - 250 µl	1,5 ml	42173.01 42173.02	25 Säulen 100 Säulen
Midi Columns	20 µm	0,5 – 2 ml	12 ml	42174.01	50 Säulen
Maxi Columns	20 µm	2 – 6 ml	35 ml	42175.01	50 Säulen
Mini Spin Columns	35 µm	50 - 100 µl	0,8 ml	42176.01	25 Säulen

Reagenzien		
Produkt	Kat.-Nr.	Menge
Na ₂ HPO ₄	30200.01	500 g
KH ₂ PO ₄	26870.01	500 g
KCl	26868.02	1 kg
NaCl	30183.01	1 kg
L-Glutathion red.	23150.02 23150.03 23150.04	5 g 25 g 100 g
Tris	37190.01 37190.02 37190.03	250 g 1 kg 5 kg
Natriumacetat	21249.02	500 g