

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA Streptavidin Agarose Resin Agarosematrix zur Affinitätsreinigung von biotinylierten Biomolekülen

(Kat.-Nr. 42178)



SERVA Electrophoresis GmbH • Carl-Benz-Str.7 • D-69115 Heidelberg
Telefon: +49 6221 13840-0 • E-Mail: info@serva.de • Internet: www.serva.de

Inhaltsverzeichnis

1. SERVA Streptavidin Agarose Resin.....	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Lagerungsbedingungen	2
2. Säulenchromatographie von biotinylierten Biomolekülen	2
2.1. Waschen der Agarosematrix	2
2.2. Äquilibrieren der Agarosematrix	2
2.3. Probenaufgabe	3
2.4. Waschen der Agarosematrix	3
2.5. Elution	3
3. Immunaffinitätsreinigung von Proteinen im Batch-Verfahren	4
3.1. Bildung des Immunkomplexes	4
3.2. Äquilibrieren der Agarosematrix	4
3.3. Bindung des Immunkomplexes an die Agarosematrix	4
3.4. Waschen der Agarosematrix	5
3.5. Elution	5
4. Immunaffinitätssäulenreinigung von Proteinen	5
4.1. Äquilibrieren der Agarosematrix	5
4.2. Bindung des biotinylierten Antikörpers	6
4.3. Waschen der Agarosematrix	6
4.4. Probenaufgabe	6
4.5. Elution	6
5. Bestellinformationen	7

1. SERVA Streptavidin Agarose Resin

1.1. Allgemeine Hinweise

Streptavidin Agarose Resin ist optimal zur Affinitätsreinigung von biotinylierten Biomolekülen. Die nachfolgenden Protokolle enthalten allgemeine Hinweise, die an die jeweilige Anwendung angepasst werden sollten.

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. Säulenchromatographie von biotinylierten Biomolekülen

Das nachfolgende Protokoll ist für die Reinigung mit schwerkraftgetriebenen Affinitätssäulen, z. B. Kat.-Nr. 42174, 42175.

2.1. Waschen der Agarosematrix

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

2.2. Äquilibrieren der Agarosematrix

Bindungspuffer:

20 mM Na₂HPO₄ (SERVA Kat.-Nr. 30200), 150 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 7,4

- Hierbei wird die Matrix mit Bindungspuffer (5- bis 10-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.

2.3. Probenaufgabe

Nachdem die Agarosematrix äquibriert ist, kann die Probe mit dem zu immobilisierenden Biomolekül auf die unten geschlossene Säule gegeben werden.

- Die Probe wird zur Agarosematrix gegeben.
- Säule oben verschließen.
- Matrix und Probe mind. 30 min bei Raumtemperatur gut mischen.
- Falls notwendig kann die Bindung des Proteins an die Agarosematrix durch eine verlängerte Kontaktzeit unterstützt werden.
- Anschließend wird der obere und untere Verschluss der Säule geöffnet.
- Der Säulendurchlauf (Bindungspuffer) wird verworfen.

2.4. Waschen der Agarosematrix

- Schließen der unteren Säulenöffnung.
- Zugabe von Bindungspuffer (10-faches Bettvolumen).
- Säule oben verschließen, Matrix und Puffer gut mischen.
- Überstand vorsichtig abtrennen und werfen.
- Das Waschen wird so lange wiederholt, bis die Agarosematrix mit 3x 10-fachen Bettvolumen PBS gewaschen wurde oder bei der Absorptionsmessung eine Basislinie erreicht ist.

2.5. Elution

Elutionspuffer:

8 M Guanidinium-HCl (SERVA Kat.-Nr. 24205), pH 1,5

- Säule unten verschließen.
- Zugabe von 1x Bettvolumen Elutionspuffer zur Agarosematrix.
- Säule oben verschließen und ca. 10 min bei Raumtemperatur gut mischen.
- Agarosematrix absetzen lassen.
- Unteren Verschluss der Säule öffnen.
- Durchfluss auffangen und auf Eis lagern.
- Elution mind. 2x wiederholen.
- Einzelfractionen mittels Absorptionsmessung prüfen.
- Danach können die entsprechenden Elutionsfraktionen vereinigt und mittels Dialyse für nachfolgende Anwendungen umgepuffert werden.

Alternative Elution: Kochen der Matrix in 400 mM Harnstoff mit 2 % SDS. Hierbei werden allerdings auch Streptavidin-Monomere eluiert.

3. Immunaффinitätsreinigung von Proteinen im Batch-Verfahren

Zur Immunaффinitätsreinigung wird zunächst ein biotinylierter Antikörper an das spezifische Zielprotein gebunden. Danach wird der Antigen-Antikörper-Komplex an die Streptavidin-Matrix gebunden. Die anschließende Reinigung wird im Batchverfahren durchgeführt.

3.1. Bildung des Immunkomplexes

Wichtig: Antigen-Menge und Inkubationszeit sind abhängig vom Antigen-Antikörpersystem und müssen bei Bedarf angepasst und optimiert werden.

Bindungspuffer:

20 mM Na₂HPO₄ (SERVA Kat.-Nr. 30200), 150 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 7,4

- Das Antigen wird in 50 µl Bindungspuffer in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß solubilisiert.
- Der biotinylierte Antikörper wird zugegeben und das Volumen mit Bindungspuffer auf 200 µl eingestellt.
- Anschließend wird die Probe 3 – 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei +4 °C inkubiert.

3.2. Äquilibrieren der Agarosematrix

Bindungspuffer:

20 mM Na₂HPO₄ (SERVA Kat.-Nr. 30200), 150 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 7,4

Wichtig: Pro ml Agarosematrix werden ca. 3 mg biotinylierter Antikörper eingesetzt.

- Um eine homogene Suspension zu erhalten, sollte die Flasche mit der Agarosematrix vor Gebrauch vorsichtig geschüttelt werden.
- Matrix und Bindungspuffer mischen, bis eine homogene Suspension entsteht.
- Überstand abtrennen und verwerfen

3.3. Bindung des Immunkomplexes an die Agarosematrix

- Die äquilibrierte Matrix wird zu dem Immunkomplex in das 1,5 ml-Reaktionsgefäß zugegeben.
- Anschließend unter Mischen 1 h bei Raumtemperatur oder +4 °C inkubieren.

3.4. Waschen der Agarosematrix

Bindungspuffer:

20 mM Na₂HPO₄ (SERVA Kat.-Nr. 30200), 150 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 7,4

- Der Matrix-gebundene Immunkomplex wird dann mit 0,5 – 1,0 ml Bindungspuffer versetzt und vorsichtig gemischt.
- Zentrifugation: 1 – 2 min bei 1000x g.
- Überstand verwerfen.
- Waschschritt mind. 4x wiederholen

3.5. Elution

Elutionspuffer:

100 mM Glycin (SERVA Kat.-Nr. 23390)-HCl, pH 2,5

- Zugabe des Elutionspuffers zur Matrix und vorsichtig mischen.
- Zentrifugation: 1 – 2 min bei 1000x g.
- Überstand in separates Reaktionsgefäß mit 1 M Tris, pH 8,0 (100 µl pro 1 ml Überstand) überführen.

Alternative Elution: Kochen der Matrix in SDS PAGE Probenpuffer.

4. Immunitätssäulenreinigung von Proteinen

Zunächst wird hierbei der biotinylierte Antikörper an die Streptavidin-Matrix gebunden. Danach erfolgt die Inkubation der Matrix mit der Probe, die das zu reinigende Protein (Antigen) enthält.

4.1. Äquilibrieren der Agarosematrix

Bindungspuffer:

20 mM Na₂HPO₄ (SERVA Kat.-Nr. 30200), 150 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), pH 7,4

- Um eine homogene Suspension zu erhalten, sollte die Flasche mit der Agarosematrix vor Gebrauch vorsichtig geschüttelt werden.
- Unmittelbar danach wird die benötigte Menge Suspension in die entsprechende Säule pipettiert.
- Anschließend wird die Matrix mit Bindungspuffer (5 – 10 Säulenvolumen) gewaschen.

4.2. Bindung des biotinylierten Antikörpers

- Schließen der unteren Säulenöffnung.
- Zugabe des biotinylierten Antikörpers (ca. 3 mg/ml Matrix).
- Säule oben verschließen, Matrix und Puffer gut mischen.
- Mindestens 1h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
- Falls notwendig kann die Bindung des Proteins an die Agarosematrix durch eine verlängerte Kontaktzeit unterstützt werden.
- Anschließend wird der obere und untere Verschluss der Säule geöffnet.
- Der Säulendurchlauf wird verworfen.

4.3. Waschen der Agarosematrix

- 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 so lange wiederholt bis die Werte der Absorptionsmessung (280 nm) unterhalb von 0,01 – 0,02 liegen.

4.4. Probenaufgabe

- Schließen der unteren Säulenöffnung.
- Zugabe der Probe.
- Säule oben verschließen, Matrix und Probe gut mischen.
- Mindestens 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
- Falls notwendig kann die Bindung des Proteins an die Agarosematrix durch eine verlängerte Kontaktzeit unterstützt werden.
- Anschließend wird der obere und untere Verschluss der Säule geöffnet.
- Der Säulendurchlauf wird verworfen.
- Anschließend wird die Matrix gewaschen, wie unter 4.3. beschrieben.

4.5. Elution

Elutionspuffer:

100 mM Glycin (SERVA Kat.-Nr. 23390)-HCl, pH 2.5)

- Schließen der unteren Säulenöffnung.
- Zugabe von 1 Säulenvolumen Elutionspuffer.
- Säule oben verschließen.
- Matrix und Probe 10 min bei Raumtemperatur gut mischen.
- Agarosematrix absetzen lassen.
- Unteren Verschluss der Säule öffnen.
- Durchfluss auffangen und auf Eis lagern.

- Elution mind. 2x wiederholen.
- Der Proteingehalt der Fraktionen wird mittels Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt.
- Die Fraktionen werden mit 1 M Tris, pH 8.0 (100 µl pro 1 ml Eluat) neutralisiert und vereinigt.

Alternative Elution: 0,1 M Essigsäure

5. Bestellinformationen

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
Guanidinium-HCl	24205.02	1 kg
Harnstoff	24524.02	1 kg
	24524.03	5 kg
Glycin	23390.02	500 g
	23390.04	1 kg
	23390.03	5 kg