

GEBRAUCHSANLEITUNG

Ni-Extrachel™ Agarose Resin

Agarosematrix zur Affinitätsreinigung
von His-Tag-Fusionsproteinen

(Kat.-Nr. 42180)

SERVA

■ serving scientists ■

Carl-Benz-Str. 7, D-69115 Heidelberg
phone +49-6221-138400, fax +49-6221-1384010

Inhaltsverzeichnis

1. NI-EXTRACHEL™ AGAROSE RESIN	2
1.1. ALLGEMEINE HINWEISE.....	2
1.2. LAGERUNGSBEDINGUNGEN.....	2
2. NATIVE AFFINITÄTSREINIGUNG VON PROTEINEN IM BATCH-VERFAHREN.....	2
2.1. BESEITIGUNG DES LAGERPUFFERS	2
2.2. ÄQUILIBRIERUNG DER AGAROSEMATRIX.....	3
2.3. PROBENAUFGABE	4
2.4. WASCHEN DER AGAROSEMATRIX.....	4
2.5. ELUTION DES FUSIONSPROTEINS	4
3. NATIVE AFFINITÄTSREINIGUNG VON PROTEINEN MITTELS GRAVITATIONSSÄULEN.....	5
3.1. PACKEN DER SÄULE UND BESEITIGUNG DES LAGERPUFFERS.....	5
3.2. ÄQUILIBRIEREN DER SÄULE	6
3.3. PROBENAUFGABE	6
3.4. WASCHEN DER SÄULE	6
3.5. ELUTION DES FUSIONSPROTEINS	7
4. NATIVE AFFINITÄTSREINIGUNG VON PROTEINEN MITTELS ZENTRIFUGATIONSSÄULEN	8
4.1. PACKEN DER SÄULE UND BESEITIGUNG DES LAGERPUFFERS	8
4.2. ÄQUILIBRIEREN DER SÄULE	8
4.3. PROBENAUFGABE	8
4.4. WASCHEN DER SÄULE	9
4.5. ELUTION DES FUSIONSPROTEINS	9
5. NATIVE AFFINITÄTSREINIGUNG VON PROTEINEN MITTELS FPLC (FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY).....	10
5.1. PACKEN DER SÄULE UND BESEITIGUNG DES LAGERPUFFERS.....	10
5.2. ÄQUILIBRIEREN DER SÄULE	11
5.3. PROBENAUFGABE	11
5.4. WASCHEN DER SÄULE	12
5.5. ELUTION DES FUSIONSPROTEINS	12
6. AFFINITÄTSREINIGUNG VON PROTEINEN UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN	13
6.1. ISOLIERUNG VON <i>INCLUSION BODIES</i>	13
6.2. SOLUBILISIERUNG DER <i>INCLUSION BODIES</i>	13
6.3. CHEMISCHE KOMPATIBILITÄT.....	15
7. REGENERATION DER AGAROSEMATRIX.....	16
8. PROBLEMBEHANDLUNG	17
8.1. PROBENAPPLIKATION	17
8.2. ADSORPTION	17
8.3. ELUTION.....	18
8.4. VERÄNDERUNGEN DER MATRIX	20
9. BESTELLINFORMATIONEN.....	20

1. Ni-Extrachel™ Agarose Resin

1.1. Allgemeine Hinweise

Ni-Extrachel™ Agarose Resin besteht aus einem quervernetzten Agaroseharz, an das kovalent Nickel-beladene Polychelator-Liganden gekoppelt sind.

Die Agarosematrix ist stabil gegen EDTA, DTT und andere Chemikalien (siehe Tabelle zur chemischen Kompatibilität unten), die mit Standard-Ni-NTA- oder -IDA-Harzen zum Verlust der Nickel-Beladung führen. Das Harz eignet sich zur Affinitätsreinigung sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen von His-Tag-Fusionsproteinen, entweder über eine Säule (Schwerkraft bzw. Niederdruck/FPLC) oder im Batch-Verfahren.

Kompatibilität des Ni-Extrachel™ Agarose Resins:

pH	
Puffer	pH 4 - 9
Zusätze	
100 %	Methanol
100 %	Ethanol
8 M	Harnstoff
6 M	Guanidin•HCl
30 %	Acetonitril
20 mM	Dithiothreitol (DTT)
20 mM	EDTA

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. Native Affinitätsreinigung von Proteinen im Batch-Verfahren

2.1. Beseitigung des Lagerpuffers

Bestimmen Sie zunächst die Menge der benötigten Agarosematrix. Die Ausbeute des gereinigten His-Tag-Proteins hängt von verschiedenen Parametern, wie Primär- und Sekundärstruktur, Molekulargewicht, ab. Die Bindungskapazität der Ni-Extrachel™-Matrix beträgt 80 mg/ml Gel (6xHis-GFPuv, ca. 32 kDa).

1 ml Gel entspricht 2 ml der 50 % (v/v) Ni-Extrachel™ Agarose Suspension.

Zur Beseitigung des Lagerpuffers gibt es zwei Möglichkeiten:

- A. Vorsichtiges Schütteln der Flasche mit dem Ni-Extrachel™ Agarose Resin um eine homogene Suspension zu erhalten. Anschließend wird sofort die benötigte Menge der Suspension in ein geeignetes Gefäß überführt und bei 500 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand (Lagerpuffer) wird abgetrennt und verworfen.
- B. Nach vorsichtigem Schütteln der Flasche wird die Suspension filtriert (siehe Abb. 1). Die getrocknete Matrix wird dann in einem geeigneten Behälter gelagert. 0,7 g der trockenen Matrix entsprechen 1,0 ml feuchter Matrix.

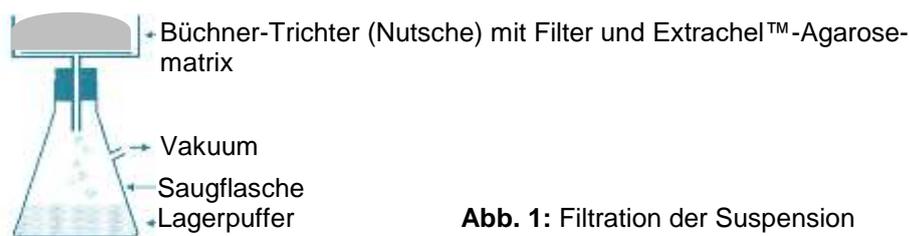


Abb. 1: Filtration der Suspension

2.2. Äquilibrierung der Agarosematrix

Bindungspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0

- Bindungspuffer (10-faches Agarosematrix-Volumen) zur Matrix geben
 - Matrix und Bindungspuffer mischen bis eine homogene Suspension entsteht
 - Zentrifugation: 500 x g 5 min
 - Überstand abtrennen und verworfen
-

Hinweise zum Bindungspuffer:

Die Wahl des Bindungspuffers hängt von den jeweiligen Eigenschaften des Proteins ab. Der meist verwendete Puffer ist 50 mM Phosphat-Puffer. Der pH-Wert des Bindungspuffers liegt hier in der Regel im Bereich 7,0 - 8,0. Zur Vermeidung von ionischen Wechselwirkungen sollte der Puffer noch 150 – 500 mM NaCl enthalten.

Wichtig: Zur Erhöhung der Selektivität der Proteinbindung sollte der Bindungspuffer 10 – 40 mM Imidazol enthalten. Das verwendete Imidazol sollte hochrein sein, z. B. SERVA Kat.-Nr. 26081, um keine störenden Effekte bei der Absorptionsmessung A_{280nm} zu zeigen. Außerdem ist es wichtig, dass kein EDTA (> 20 mM) und Citrat im Puffer verwendet wird.

2.3. Probenaufgabe

- Probe (entweder *E. coli*-Lysat oder Proteinextrakt) aufgeben
 - Suspension vorsichtig mischen
 - 30 – 60 min* bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
 - Zentrifugation: 500 x g 5 min
 - Überstand vorsichtig abtrennen und verwerfen
-

* Falls notwendig kann die Bindung des Proteins an die Agarosematrix durch eine verlängerte Kontaktzeit unterstützt werden.

Wichtig: Die Bindungskapazität kann durch verschiedene Faktoren, z. B. Proteinkonzentration oder Kontaktzeit zwischen Protein und Matrix, beeinflusst werden.

2.4. Waschen der Agarosematrix

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0

- Waschpuffer (10-faches Agarosematrix-Volumen) zur Matrix geben
 - Matrix und Bindungspuffer mischen bis eine homogene Suspension entsteht
 - Zentrifugation: 500 x g 5 min
 - Überstand abtrennen und verwerfen
 - Waschschrift 2 Mal wiederholen
-

Das Waschen der Matrix kann mit Hilfe der Absorptionsmessung bei 280 nm kontrolliert werden. Zeigt der Durchlauf den gleichen Absorptionswert wie der eingesetzte Waschpuffer kann das Fusionsprotein eluiert werden.

2.5. Elution des Fusionsproteins

Die Elution des Fusionsproteins erfolgt durch Zugabe eines kompetitiven Liganden. Als kompetitiver Ligand zur Proteinelution wird meist Imidazol verwendet. Das Imidazol verdrängt das als Chelat-Komplex an der Agarosematrix gebundene His-Tag und setzt so das Fusionsprotein frei.

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

- Elutionspuffer (1-faches Agarosematrix-Volumen) zu Matrix geben
- Matrix und Elutionspuffer mischen, bis eine homogene Suspension entsteht
- 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Zentrifugation: 500 x g 5 min
- Überstand vorsichtig abtrennen, in ein neues Reaktionsgefäß geben und auf Eis lagern
- Elutionsschritt mind. 2 Mal wiederholen, Fraktionen sammeln und vereinigen

Die meisten Proteine werden bei 250 mM Imidazol eluiert. Jedoch sollte der Proteingehalt des Eluats zur Bestimmung der Ausbeute mittels Bradford-Assay, SDS PAGE oder Absorptionsmessung bei 280 nm (A_{280} -Messung) überprüft werden.

Hinweis:

Die nachfolgende Beseitigung des Imidazols für optimale Lagerung der Probe kann durch Dialyse oder Ultrafiltration erfolgen.

Für viele Anwendungen ist eine Abspaltung des His-Tags nicht notwendig. Falls doch erforderlich, erfolgt dies über eine spezielle Protease-Schnittstelle zwischen Protein und His-Tag.

3. Native Affinitätsreinigung von Proteinen mittels Gravitationssäulen

Neben dem Batch-Verfahren kann die Affinitätsreinigung auch mittels Säulenchromatographie erfolgen. Je nach Gesamtvolumen können folgende Leersäulen verwendet werden:

Kat.-Nr.	Produkt	Matrixvolumen	Gesamtvolumen
42173	Mini Columns	0,1- 0,25 ml	1,5 ml
42174	Midi Columns	0,5 – 2 ml	12 ml
42175	Maxi Columns	2 – 6 ml	35 ml

3.1. Packen der Säule und Beseitigung des Lagerpuffers

Bestimmen Sie zunächst die Menge der benötigten Agarosematrix. Die Ausbeute des gereinigten His-Tag-Proteins hängt von verschiedenen Parametern, wie Primär- und Sekundärstruktur, Molekulargewicht, ab. Die Bindungskapazität der Ni-Extrachel™-Matrix beträgt 80 mg/ml Gel (6xHis-GFPuv, ca. 32 kDa).

1 ml Gel entspricht 2 ml der 50 % (v/v) Ni-Extrachel™- Agarose-Suspension.

-
- Schütteln der Flasche, um eine homogene Suspension der Agarosematrix im Puffer zu erhalten
 - Die Suspension in die unten geschlossene Säule pipettieren
 - Die oben geöffnete Säule anschließend auch unten öffnen, so dass der Lagerpuffer abfließen kann
-

3.2. Äquilibrieren der Säule

Bindungspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0

- Gepackte Säule unten verschließen
 - Bindungspuffer (5-faches Agarosematrix-Volumen) zur Matrix geben
Keine Luftblasen in Matrix einbringen
 - Säule unten und oben verschließen, mehrmals invertieren
 - Vorsichtiges mischen von Bindungspuffer und Matrix
 - Säule oben und unten öffnen
 - Säulendurchlauf abtrennen und verwerfen
 - Äquilibrierungsschritt 2 Mal wiederholen
-

3.3. Probenaufgabe

-
- Säule nach der Äquilibrierung der Matrix unten schließen
 - Probe (entweder *E. coli*-Lysat oder Proteinextrakt) aufgeben
 - Säule oben verschließen
 - 30 – 60 min* Inkubation bei Raumtemperatur (RT) und vorsichtigem invertieren der Säule zum Mischen von Probe und Matrix
 - Säule oben und unten öffnen
 - Säulendurchlauf auffangen und anschließend verwerfen
-

* Falls notwendig kann die Bindung des Proteins an die Agarosematrix durch eine verlängerte Kontaktzeit unterstützt werden.

Wichtig: Die Bindungskapazität kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, z. B. Proteinkonzentration oder Kontaktzeit zwischen Protein und Matrix.

3.4. Waschen der Säule

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0

- Säule unten wieder verschließen
 - Waschpuffer (10-faches Agarosematrix-Volumen) zugeben
 - Säule oben wieder verschließen
 - Mehrmals invertieren, um Matrix und Waschpuffer vorsichtig zu mischen
 - Säule wieder oben und unten öffnen
 - Waschpuffer abfließen lassen
 - Durchlauf verwerfen
 - Waschschrift noch 2 Mal wiederholen, so dass die Agarosematrix insgesamt 3 Mal gewaschen wird
-

Das Waschen der Matrix kann mit Hilfe der Absorptionsmessung bei 280 nm kontrolliert werden. Zeigt der Durchlauf den gleichen Absorptionswert wie der eingesetzte Waschpuffer kann das Fusionsprotein eluiert werden.

3.5. Elution des Fusionsproteins

Die Elution des Fusionsproteins erfolgt durch Zugabe eines kompetitiven Liganden. Als kompetitiver Ligand zur Proteinelution wird meist Imidazol verwendet. Das Imidazol verdrängt das als Chelat-Komplex an der Agarosematrix gebundene His-Tag und setzt so das Fusionsprotein frei.

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

- Säule wieder unten verschließen
 - Agarosematrix mit Elutionspuffer (1-faches Agarosematrix-Volumen) versetzen
 - Säule oben wieder verschließen
 - Mehrmals invertieren, um Matrix und Elutionspuffer 10 min bei Raumtemperatur vorsichtig zu mischen
 - Säule wieder oben und unten öffnen
 - Eluat in einem neuen Reaktionsgefäß sammeln und auf Eis lagern
 - Elutionsschritt mindestens 2 Mal wiederholen, Bei Bedarf auch mehrmals möglich.
 - Elutionsfraktionen sammeln und vereinen
-

Die meisten Proteine werden bei 250 mM Imidazol eluiert.

Jedoch sollte der Proteingehalt des Eluats zur Bestimmung der Ausbeute mittels Bradford-Assay, SDS PAGE oder Absorptionsmessung bei 280 nm (A₂₈₀-Messung) überprüft werden.

Hinweis:

Die nachfolgende Beseitigung des Imidazols für optimale Lagerung der Probe kann durch Dialyse, Ammoniumsulfat-Fällung oder Ultrafiltration erfolgen.

Für viele Anwendungen ist eine Abspaltung des His-Tags nicht notwendig. Falls doch erforderlich, erfolgt dies über eine spezielle Protease-Schnittstelle zwischen Protein und His-Tag.

4. Native Affinitätsreinigung von Proteinen mittels Zentrifugationssäulen

Bei der Säulenchromatographie können auch Zentrifugationssäulen eingesetzt werden. Hierzu sind folgende Leersäulen verfügbar:

Kat.-Nr.	Produkt	Matrixvolumen	Gesamtvolumen
42176	Mini Spin Columns	50 – 100 µl	800 µl

4.1. Packen der Säule und Beseitigung des Lagerpuffers

Bestimmen Sie zunächst die Menge der benötigten Agarosematrix. Die Ausbeute des gereinigten His-Tag-Proteins hängt von verschiedenen Parametern, wie Primär- und Sekundärstruktur, Molekulargewicht, ab. Die Bindungskapazität der Ni-Extrachel™-Matrix beträgt 80 mg/ml Gel (6xHis-GFPuv, ca. 32 kDa).

100 µl der 50 % (v/v) Ni-Extrachel™ Agarose-Suspension entsprechen 50 µl Gel.

-
- Schütteln der Flasche, um eine homogene Suspension der Agarosematrix im Puffer zu erhalten
 - 100 µl Suspension in die unten geschlossene Säule pipettieren
 - Säule unten öffnen und in ein Auffangtube stellen
 - Zentrifugation: 30 s bei 500 x g.
-

4.2. Äquilibrieren der Säule

Bindungspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0

- Säule unten verschließen
 - 500 µl Bindungspuffer zu Matrix geben
 - Säule unten und oben verschließen, mehrmals invertieren
 - Vorsichtiges mischen von Bindungspuffer und Matrix
 - Säule unten öffnen und in ein Auffangtube stellen
 - Zentrifugation: 30 s bei 500 x g
-

4.3. Probenaufgabe

-
- Säule nach der Äquilibrierung der Matrix unten schließen
 - Probe (entweder *E. coli*-Lysat oder Proteinextrakt) aufgeben
 - Säule oben verschließen

- 30 – 60 min* Inkubation bei Raumtemperatur (RT) und vorsichtigem invertieren der Säule zum Mischen von Probe und Matrix
 - Säule unten öffnen und in ein Auffangtube stellen
 - Zentrifugation: 30 s bei 500 x g
 - Säulendurchlauf auffangen und anschließend verworfen
-

*Falls notwendig kann die Bindung des Proteins an die Agarosematrix durch eine verlängerte Kontaktzeit unterstützt werden.

Wichtig: Die Bindungskapazität kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, z. B. Proteinkonzentration oder Kontaktzeit zwischen Protein und Matrix.

4.4. Waschen der Säule

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0

- Säule unten wieder verschließen
 - 500 µl Waschpuffer zugeben
 - Säule oben wieder verschließen
 - Mehrmals invertieren, um Matrix und Waschpuffer vorsichtig zu mischen
 - Säule unten öffnen und in ein Auffangtube stellen
 - Zentrifugation: 30 s bei 500 x g
 - Durchlauf verwerfen
 - Waschschrift noch 2 Mal wiederholen, so dass die Agarosematrix insgesamt 3 Mal gewaschen wird
-

Das Waschen der Matrix kann mit Hilfe der Absorptionsmessung bei 280 nm kontrolliert werden. Zeigt der Durchlauf den gleichen Absorptionwert wie der eingesetzte Waschpuffer kann das Fusionsprotein eluiert werden.

4.5. Elution des Fusionsproteins

Die Elution des Fusionsproteins erfolgt durch Zugabe eines kompetitiven Liganden. Als kompetitiver Ligand zur Proteinelution wird meist Imidazol verwendet. Das Imidazol verdrängt das als Chelat-Komplex an der Agarosematrix gebundene His-Tag und setzt so das Fusionsprotein frei.

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

- Säule wieder unten verschließen
- 500 µl Elutionspuffer zu Matrix zugeben
- Säule oben wieder verschließen
- Mehrmals invertieren, um Matrix und Elutionspuffer 10 min bei Raumtemperatur vorsichtig zu mischen

- Säule unten öffnen und in ein Auffangtube stellen
 - Zentrifugation: 30 s bei 500 x g
 - Eluat sammeln und auf Eis lagern
 - Elutionsschritt mindestens 2 Mal wiederholen
Bei Bedarf auch mehrmals möglich.
 - Elutionsfraktionen sammeln und vereinen
-

Die meisten Proteine werden bei 250 mM Imidazol eluiert. Jedoch sollte der Proteingehalt des Eluats zur Bestimmung der Ausbeute mittels Bradford-Assay, SDS PAGE oder Absorptionsmessung bei 280 nm (A_{280} -Messung) überprüft werden.

Hinweis:

Die nachfolgende Beseitigung des Imidazols für optimale Lagerung der Probe kann durch Dialyse, Ammonium-sulfat-Fällung oder Ultrafiltration erfolgen.

Für viele Anwendungen ist eine Abspaltung des His-Tags nicht notwendig. Falls doch erforderlich, erfolgt dies über eine spezielle Protease-Schnittstelle zwischen Protein und His-Tag.

5. Native Affinitätsreinigung von Proteinen mittels FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*)

Die Affinitätsreinigung kann auch mittels Niederdruck-Säulenchromatographie, z. B. FPLC erfolgen. Je nach Gesamtvolumen können folgende Leersäulen verwendet werden:

Kat.-Nr.	Produkt	max. Druck
42278	1 ml-FliQ Columns	5 bar (70 psi)
42279	5 ml-FliQ Columns	
42280	10 ml-FliQ Columns	3 bar (42 psi)
42281	20 ml-FliQ Columns	

5.1. Packen der Säule und Beseitigung des Lagerpuffers

Bestimmen Sie zunächst die Menge der benötigten Agarosematrix. Die Ausbeute des gereinigten His-Tag-Proteins hängt von verschiedenen Parametern, wie Primär- und Sekundärstruktur, Molekulargewicht, ab. Die Bindungskapazität der Ni-Extrachel™-Matrix beträgt 80 mg/ml Gel (6xHis-GFPuv, ca. 32 kDa).

1 ml Gel entspricht 2 ml der 50 % (v/v) Ni-Extrachel™ Agarose-Suspension.

-
- Schütteln der Flasche, um eine homogene Suspension der Agarosematrix im Puffer zu erhalten
 - Die Suspension nach Herstellerangaben in die FPLC-Säule füllen bis die gewünschte Füllhöhe erreicht ist.

Wichtig: Das Füllen der Säule sollte möglichst langsam erfolgen, so dass keine Luftblasen entstehen. Optional ist auch das Entgasen der Agarose-Suspension vor der Befüllung der Säule möglich.

- Entfernen des über der Agarose-Matrix befindlichen Lagerpuffers – entweder durch Pipettieren oder Ablaufen lassen

Wichtig: Den Lagerpuffer während des Füllens der Säule nicht vollständig entfernen, da sonst die Agarosematrix austrocknet. Über der Agarose-Matrix sollte nach Möglichkeit ca. 1 cm Puffer verbleiben.

- Den Adapter vorsichtig in die Säule einsetzen bis der Lagerpuffer verdrängt wird. Hierbei unbedingt beachten, dass keine Luftblasen im Bereich des Netzes auftreten.
 - Mit dest. Wasser spülen bis eine konstante Füllhöhe der Agarosematrix erreicht ist. Wird hierbei die gewünschte Füllhöhe nicht erreicht, Säule weiter befüllen wie oben beschrieben.
 - Ist die konstante Füllhöhe erreicht, mit dest. Wasser (mindestens 5-faches Agarosematrix-Volumen) den Lagerpuffer vollständig entfernen.
-

5.2. Äquilibrieren der Säule

Bindungspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0

- Säule mit dem Bindungspuffer (mindestens 5-faches Agarosematrix-Volumen) äquilibrieren bis bei der Absorptionsmessung (A₂₈₀-Messung) eine stabile Basislinie erreicht wird.

Tipp: Alle für die FPLC verwendeten Lösungen sollten entgast werden, um die Bildung von Luftblasen während der Chromatographie zu verhindern.

5.3. Probenaufgabe

- Zentrifugierte/filtrierte Probe (entweder *E. coli*-Lysat oder Proteinextrakt) auf die Säule geben
- Falls notwendig kann die Bindung des Proteins an die Agarosematrix durch eine verlängerte Kontaktzeit unterstützt werden.
- Die Kontaktzeit kann durch Verringerung der Flussrate erhöht werden.

Wichtig: Die Bindungskapazität kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, z. B. Proteinkonzentration oder Flussrate. Deshalb sollte durch Analyse des gesammelten Säulendurchfluss sichergestellt werden, dass das Fusionsprotein an die Säule gebunden hat.

5.4. Waschen der Säule

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0

- Säule mit Waschpuffer (10- bis 20-faches Agarosematrix-Volumen) waschen bis bei der Absorptionsmessung (A₂₈₀-Messung) eine stabile Basislinie erreicht wird.
-

5.5. Elution des Fusionsproteins

Die Elution des Fusionsproteins erfolgt durch Zugabe eines kompetitiven Liganden. Als kompetitiver Ligand zur Proteinelution wird meist Imidazol verwendet. Das Imidazol verdrängt das als Chelat-Komplex an der Agarosematrix gebundene His-Tag und setzt so das Fusionsprotein frei.

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

- Fusionsprotein mit Elutionspuffer (5- bis 10-faches Agarosematrix-Volumen) eluieren
 - Elutionsfraktionen auf Eis sammeln
-

Die meisten Proteine werden bei 250 mM Imidazol eluiert.

Jedoch sollte der Proteingehalt des Eluats zur Bestimmung der Ausbeute mittels Bradford-Assay, SDS PAGE oder Absorptionsmessung bei 280 nm (A₂₈₀-Messung) überprüft werden.

Hinweis:

Die nachfolgende Beseitigung des Imidazols für optimale Lagerung der Probe kann durch Dialyse, Ammonium-sulfat-Fällung oder Ultrafiltration erfolgen.

Für viele Anwendungen ist eine Abspaltung des His-Tags nicht notwendig. Falls doch erforderlich, erfolgt dies über eine spezielle Protease-Schnittstelle zwischen Protein und His-Tag.

6. Affinitätsreinigung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen

Da viele rekombinante Proteine in unlöslichen *Inclusion Bodies* exprimiert werden, ist die weitere Reinigung unter denaturierenden Bedingungen, z. B. mit Harnstoff oder Guanidiniumchlorid notwendig. In der nachfolgenden Tabelle ist die Kompatibilität der Agarosematrix mit unterschiedlichen Pufferbestandteilen dargestellt.

Zellen werden normalerweise unter nativen Bedingungen lysiert. Nach der Zentrifugation befindet sich das Fusionsprotein im Sediment und muss mit Hilfe von denaturierenden Reagenzien wieder solubilisiert und extrahiert werden.

6.1. Isolierung von *Inclusion Bodies*

- Gefrorene Zellpellets auf Eis vorsichtig auftauen
- 1 g feuchtes Zellpellet in 5 ml „Bindungspuffer“ (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) auf Eis vollständig resuspendieren
- Zugabe von Lysozym (SERVA Kat.-Nr. 28263, Endkonzentration: 1 mg/ml)
- Inkubation 30 min unter Rühren auf Eis und Ultraschall, um die Viskosität zu verringern, ggf. Zugabe 5 µg/ml DNase I (SERVA Kat.-Nr. 18535) und 15 min Inkubation unter Rühren auf Eis)
- Zentrifugation des Lysats bei 10.000 x g und 4 °C 30 min zum Abtrennen der *Inclusion Bodies* zu erhalten
- Der Überstand wird verworfen

6.2. Solubilisierung der *Inclusion Bodies*

- Sedimentierte *Inclusion Bodies* in „Bindungspuffer“ (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) resuspendieren
- Zentrifugation der Suspension bei 10.000 x g und 4 °C 30 min
- Überstand wird verworfen
- Pro g feuchtes Zellpellet werden 2,0 ml Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 8 M Harnstoff, pH 8,0) zugegeben
- Homogenisieren oder Ultraschall können notwendig sein, um das Pellet zu resuspendieren
- Inkubation der *Inclusion Bodies* 60 min auf Eis unter Rühren
- Abtrennung unlöslicher Bestandteile:
Zentrifugation: 10.000 x g und 20 °C 30 min
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugationsschritt so oft wiederholen bis der Überstand klar ist
- Überstand wird für die anschließende Affinitätsreinigung eingesetzt

Die Affinitätsreinigung erfolgt wie zuvor für die nativen Bedingungen beschrieben.
Die verwendeten Puffer sind wie folgt:

Bindungspuffer:

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 8 M Harnstoff, pH 8,0

Waschpuffer:

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 8 M Harnstoff, pH 8,0

Elutionspuffer:

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 8 M Harnstoff, pH 8,0

6.3. Chemische Kompatibilität

Reagenzien		Anmerkung
Denaturierende Agenzien	Harnstoff Guanidinium-HCl	Solubilisierung von Proteinen, ≤ 8 M Solubilisierung von Proteinen, ≤ 6 M
Detergenzien	Nicht-ionische Detergenzien, z. B. Triton [®] X-100, Tween [®] 20	Beseitigung von störenden Proteinen $\leq 2\%$ können verwendet werden
Zusätze	Imidazol	Kompetiert mit His-Tag Reduziert unspez. Bindungen (20 mM) Elution His-Tag-Protein (100 mM) Verhindert hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Proteinen
	Glycerin	$\leq 50\%$ können verwendet werden
	EDTA	Verringert Kapazität, da Chelat-Bildner Nicht empfohlen, aber ≤ 20 mM in der Probe möglich
	Acetonitril	$\leq 30\%$ (v/v) ist möglich
Reduzierende Agenzien	Glutathion, reduziert	Hohe Konzentrationen reduzieren Ni ²⁺ ≤ 30 mM in der Probe möglich
	2-Mercaptoethanol	Verhindert Disulfid-Brücken Hohe Konzentrationen reduzieren Ni ²⁺ ≤ 20 mM in der Probe möglich
	Dithioerythritol (DTE) Dithiothreitol (DTT)	Hohe Konzentrationen reduzieren Ni ²⁺ ≤ 20 mM in der Probe möglich
	SDS	Verhindert hydrophobe Wechselwirkungen, vermindert Kapazität, nicht empfohlen, $\leq 0,3\%$ in Probe möglich
Puffer (pH 4 – 9)	Natriumphosphat Tris, HEPES, MOPS	Natriumphosphatpuffer 50 mM pH 8,0 wird empfohlen Zusatz von Metallionen führt zu verringerter Bindungskapazität, bis zu 100 mM können verwendet werden
	Natriumchlorid	Verhindert unspezifische Bindungen

7. Regeneration der Agarosematrix

Generell ist die Regeneration der Matrix notwendig, wenn das zu reinigende Protein wechselt. Wird das Protein beibehalten, ist nach mehreren Reinigungszyklen eine nachlassende Bindungskapazität zu beobachten, so dass auch hier die Matrix regeneriert werden sollte, um optimale Ergebnisse zu erhalten.

- Beseitigung von Verunreinigungen:
Waschen der Matrix mit 500 mM NaOH, 30 min
- Beseitigen der NaOH-Lösung: Waschen mit dest. Wasser (10-faches Agarosematrix-Volumen)
- Für den direkten Gebrauch wird die Matrix mit 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0 (10-faches Agarosematrix-Volumen) gewaschen
- Wird die Säule/Matrix nicht unmittelbar wiedereingesetzt, sollte beim letzten Schritt 30 % (v/v) Ethanol verwendet werden

In manchen Fällen kann die beschriebene Regeneration unzureichend sein, z. B. wenn die Farbe durch den Verlust von Ni²⁺-Ionen der Matrix verändert ist. Dann ist es erforderlich die komplette Beladung mit Ni²⁺-Ionen zu beseitigen und neu zu beladen.

- Waschen der Matrix mit dest. Wasser (10-faches Agarosematrix-Volumen)
- Beseitigung der Metall-Ionen: Waschen mit 100 mM EDTA, pH 8,0 (10-faches Agarosematrix-Volumen)
- Beseitigung des überschüssigen EDTA: Waschen der Matrix mit dest. Wasser (10-faches Agarosematrix-Volumen)
- Beladen der Matrix mit Metall-Ionen: Zugabe von 2x Volumen auf die 100 mM Salz (Chlorid oder Sulfat) des entsprechenden bivalenten Kations (Zn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Co²⁺) zur Agarosematrix.
- Beseitigung überschüssiger Metall-Ionen: Waschen der Matrix mit dest. Wasser (10-faches Agarosematrix-Volumen)
- Zugabe von 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0 (10-faches Agarosematrix-Volumen)

8. Problembehandlung

8.1. Probenapplikation

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Hohe Probenviskosität	DNA in der Probe	Behandlung mit Nuklease und/oder Ultraschall
	Unlösliche Bestandteile in der Probe	Zentrifugation oder Filtration (0,45 µm Membran)
Zu hohe oder zu niedrige Proteinkonzentration	Hochverdünnte Probe	Konzentrieren der Probe vor dem Aufgeben auf die Säule Reinigung mittels Batch-Format
	Hochkonzentrierte Probe	Verdünnen der Probe

8.2. Adsorption

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Zielprotein bindet nicht an Matrix	His-Tag ist nicht vorhanden oder degradiert	Verwendung von Protease-Inhibitoren Reinigung bei 4 °C
	His-Tag durch Faltungen des nativen Proteins nicht zugänglich	Reinigung unter denaturierenden Bedingungen Variation der His-Tag-Position (N-, C-Terminal, oder beide Positionen)
	Ungeeignete Bindungsbedingungen	Prüfung des Puffers und des pH-Wertes Falls der Puffer Imidazol enthält, Konzentration verringern Prüfung der Pufferbestandteile auf mögliche Wechselwirkung mit der Matrix

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Zielprotein bindet unvollständig an die Matrix	Bindungskapazität erschöpft	Weniger Proteinbeladung Regeneration der Matrix
	Verlust des Metalls in der Matrix	Regeneration der Matrix Keine Verwendung reduzierender Agenzien oder Chelat-Bildnern
	His-Tag ist zum Teil verdeckt	Flussrate verringern Batch-Verfahren
	Schlechte Expressionsrate des Proteins	Optimierung der Expressionsbedingungen
	Bildung von <i>Inclusion bodies</i>	Modifikation der bakteriellen Wachstumsbedingungen Reinigung unter denaturierenden Bedingungen
	Kanalbildung im Säulenbett	Säule neu packen

8.3. Elution

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Große Mengen an Verunreinigungen	Ungenügendes Waschen der Matrix	Größeres Volumen Waschpuffer verwenden Zusatz von Imidazol (5 - 10 mM)
	Ungeeignete Adsorptionsbedingungen	pH-Wert überprüfen Zugabe bzw. Erhöhen des NaCl im Bindungspuffer Zugabe von nicht-ionischen Detergenzien, Ethylenglykol oder Glycerin Erhöhung des Imidazolgehalts im Bindungspuffer
	Säule zu groß	Matrixmenge verringern

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Schlechte Elution des Zielproteins	Zu milde Elutionsbedingungen	Erhöhung des Imidazolgehalts oder Verringerung des pH-Werts Falls möglich, Elutionspuffer mit höherer Temperatur verwenden
	Zu starke Bindung zwischen Protein und Matrix	Elution mit EDTA Elution bei pH 4,0 und mit Imidazol Verwendung einer anderen Agarosematrix Imidazolkonzentration auf 1 M erhöhen Flussrate der Elution verringern Elution unter denaturierenden Bedingungen
	Präzipitation des Fusionsproteins	Zugabe von Detergenzien Inkubation der Matrix mit Elutionspuffer (8 - 10 h) vor der Elution Bindungs- und Elutionsschritte im Batch-Format
Fehlende Reproduzierbarkeit der Elutionsprofile	Variation der Probe, z. B. Verlust des His-Tags durch Proteasen	Verwendung frischer Proben Zugabe von Protease-Inhibitoren Durchführung bei +2 °C - +8 °C
	Präzipitation von Proteinen und/oder Lipiden	Regeneration der Matrix
	Variation des pH-Wertes und/oder der Ionenstärke	Neue Puffer ansetzen
	Verringerung der Bindungskapazität	Regeneration der Matrix

8.4. Veränderungen der Matrix

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Verlust der Farbe	Chelat-Bildner in der Probe	Reinigung der Probe durch Gelfiltration und Regeneration der Matrix
Braunfärbung	Reduzierende Agenzien in der Probe	Reinigung der Probe und Regeneration der Matrix

9. Bestellinformationen

Säulen					
Produkt	Porengröße der Fritte	Matrix-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
	max. Druck	Matrix-volumen	Flussrate [ml/min]	Kat.-Nr.	Menge
1 ml-FliQ Columns	5 bar (70 psi)	1 ml	0,5 bis 2,0	42278.01	1 Säule
5 ml-FliQ Columns	3 bar (42 psi)	5 ml	0,5 bis 2,0	42279.01	1 Säule
10 ml-FliQ Columns		10 ml	0,5 bis 2,0	42280.01	1 Säule
20 ml-FliQ Columns		20 ml	0,5 bis 2,0	42281.01	1 Säule