

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA IMAC HD Test Kit

**Agarose zur Affinitätsreinigung
von His-Tag-Fusionsproteinen**

(Kat.-Nr. 42160, 42161)



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. SERVA IMAC HD TEST KIT	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Kit Komponenten	2
1.3. Lagerungsbedingungen	2
2. AFFINITÄTSREINIGUNG VON LÖSLICHEN PROTEINEN	2
2.1. Beseitigung des Lagerungspuffers aus der Agarosematrix	2
2.2. Äquilibrierung der Säule	2
2.3. Probenaufgabe	3
2.4. Waschen der Agarose	3
2.5. Elution des Fusionsproteins	3
2.5.1. Zugabe eines kompetitiven Liganden	3
2.5.2. Reduzieren des pH-Wertes	4
2.5.3. Zugabe von anderen Chelat-Bildnern	4
3. AFFINITÄTSREINIGUNG VON PROTEINEN IN UNLÖSLICHEN <i>INCLUSION BODIES</i>	5
4. PROBLEMBEHANDLUNG	6
4.1. Probenapplikation	6
4.2. Adsorption	6
4.3. Elution	7
4.4. Veränderungen der Matrix	9
5. BESTELLINFOMATIONEN	10

1. SERVA IMAC HD Test Kit

1.1. Allgemeine Hinweise

Die SERVA IMAC HD (*high density*) Test Kits sind ist eine schnelle und einfache Methode zur Findung der geeigneten Agarosematrix mit hoher Bindungskapazität für die Affinitätsreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen.

1.2. Kit Komponenten

Kat.-Nr.	Komponente	Menge
42160	SERVA IDA Metal-Free HD Agarose Resin	Je 2 ml
42161	SERVA Ni-IDA HD Agarose Resin	
	SERVA Zn-IDA HD Agarose Resin	
	SERVA Co-IDA HD Agarose Resin	
42161	Enthält zusätzlich Mini Columns	40 Stück

1.3. 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 löslichen Proteinen

Bitte beachten Sie, dass diese Agarose für die Affinitätsreinigung unter nativen Bedingungen optimiert ist.

2.1. Beseitigung des Lagerungspuffers aus der Agarosematrix

Öffnen Sie die Minisäule zunächst unten und setzen Sie diese in ein Mikrozentrifugationsröhrchen. Aus der Flasche mit der zuvor gut geschüttelten Agarosematrix werden anschließend 400 µl der Suspension auf die Minisäule gegeben. Nach der Zentrifugation* wird der aufgefangene Lagerungspuffer verworfen.

***Wichtig:** Für alle aufgeführten Zentrifugationsschritte sind 1000 – 1500 rpm ausreichend.

2.2. Äquilibrierung der Säule

Zur Äquilibrierung wird 1 ml Bindungspuffer auf die Agarosematrix der Säule aufgegeben und zentrifugiert. Der aufgefangene Bindungspuffer aus dem Säulendurchfluss wird anschließend verworfen.

Hinweise zum Bindungspuffer:

Der normalerweise verwendete Bindungspuffer besteht aus 20 mM Na₂HPO₄ (SERVA Kat.-Nr. 30200), 500 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), 10 mM Imidazol (SERVA Kat.-Nr. 26081), pH 7,5.

Die Wahl des Bindungspuffers hängt von den jeweiligen Eigenschaften des Proteins sowie des verwendeten Chelat-Bildners ab. Die meist verwendeten Puffer sind entweder 50 mM Acetat- oder 10 - 150 mM Phosphat-Puffer. Der pH-Wert des Bindungspuffers liegt hier in der Regel im Bereich 7,0 - 8,0, aber generell ist der Bereich von 5,5 - 8,5 möglich. 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 $A_{280\text{nm}}$ zu zeigen. Außerdem ist es wichtig, dass kein EDTA und Citrat im Puffer verwendet wird.

2.3. Probenaufgabe

Nachdem die Agarose äquilibriert ist, kann die Probe mit dem zu reinigenden Fusionsprotein aufgegeben und zentrifugiert werden. Falls notwendig kann die Bindung des Proteins an die Agarose durch eine verlängerte Kontaktzeit unterstützt werden. Der Durchfluss wird verworfen.

2.4. Waschen der Agarose

Die Agarose wird so lange mit dem Bindungspuffer gewaschen bis bei der Absorptionsmessung $A_{280\text{nm}}$ eine Basislinie erreicht ist.

2.5. Elution des Fusionsproteins

Die Elution des Fusionsproteins kann nach verschiedenen Protokollen erfolgen.

2.5.1. Zugabe eines kompetitiven Liganden

Als kompetitiver Ligand zur Proteinelution wird meist Imidazol verwendet. Das Imidazol verdrängt das, als Chelat-Komplex an der Agarose gebundene, His-Tag und setzt so das Fusionsprotein frei. Aber auch Histidin und Ammoniumchlorid können eingesetzt werden.

Standard-Elutionspuffer:

20 mM Na₂HPO₄ (SERVA Kat.-Nr. 30200), 500 mM NaCl (SERVA Kat.-Nr. 30183), 500 mM Imidazol (SERVA Kat.-Nr. 26081), pH 7,5

Normalerweise sind 500 mM Imidazol für die Proteinelution ausreichend. Die meisten Proteine werden bei ca. 250 mM eluiert. Es ist auch möglich bei Bedarf die Konzentration auf bis zu 2,0 M zu erhöhen.

Hinweis:

Die nachfolgende Beseitigung des Imidazols ist normalerweise nicht notwendig, kann aber problemlos durch Dialyse, Ammoniumsulfat-Fällung oder Ultrafiltration erfolgen.

2.5.2. Reduzieren des pH-Wertes

Die pH-Wert-Absenkung auf pH-Bereich 3,0 – 4,0 kann mit und ohne Gradient erfolgen und ermöglicht die Elution des Fusionsproteins.

2.5.3. Zugabe von anderen Chelat-Bildnern

Die Zugabe von Chelat-Bildner wie EDTA oder EGTA führt zur Elution des Fusionsproteins und der bivalenten Metallionen der Agarosematrix.

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

3. Affinitätsreinigung von Proteinen in unlöslichen *inclusion bodies*

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.

Reagenzien		
Chemische Stabilität	10 mM HCl 100 mM NaOH 20 % (v/v) Ethanol 100 mM Natriumacetat, pH 4,0	2 % (w/v) SDS 30 % (v/v) 2-Propanol 1 M NaOH 70 % (v/v) Essigsäure
Denaturierende Agenzien	8 M Harnstoff	6 M Guanidinium-HCl
Detergenzien	2 % (w/v) Triton [®] X-100 2 % (w/v) Tween [®] 20	1 % (w/v) CHAPS
Zusätze	2 M Imidazol 20 % (v/v) Ethanol + 50 % (w/v) Glycerin 100 mM Na ₂ SO ₄ 1,5 M NaCl	1 mM EDTA 1 mM EDTA + 10 mM MgCl ₂ 60 mM Citrat 60 mM Citrat + 80 mM MgCl ₂
Reduzierende Agenzien	10 mM Glutathion, reduziert 20 mM 2-Mercaptoethanol	5 mM Dithioerythritol (DTE) 5 mM Dithiothreitol (DTT)
Puffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,5 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM MOPS, pH7,5	100 mM Tris-Acetat, pH 7,5 100 mM HEPES, pH 7,5

Vorbehandlung der Säule um schwach gebundene Kationen zu beseitigen:

1. Waschen der Säule mit 5 Säulenbettvolumen dest. Wasser
2. Waschen der Säule mit 5 Säulenbettvolumen Bindungspuffer (ohne reduzierende Agenzien).
3. Waschen der Säule mit 5 Säulenbettvolumen Elutionspuffer (ohne reduzierende Agenzien).
4. Äquilibrieren der Säule mit 10 Säulenbettvolumen Bindungspuffer (ohne reduzierende Agenzien).

4. Problembehandlung

4.1. Probenapplikation

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Hohe Probenviskosität	DNA in der Probe	Behandlung mit DNase und/oder Ultraschall
	Sterische Hinderung des Substrats	Verdünnen der Probe Reinigung mittels Batch-Format anstelle über eine Säule
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

4.2. 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
Geringe Bindungskapazität der Matrix	Kation mit geringerer Selektivität verwenden	

4.3. 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

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Große Mengen an Verunreinigungen	Säule zu groß	Matrixmenge verringern
	Geringe Selektivität der Matrix	SERVA IDA LD Agarose testen Imidazol-Konzentrationsgradient
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 Agarose-Matrix 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 Elutions-schritte 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

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Fehlende Reproduzierbarkeit der Elutionsprofile	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

4.4. 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

5. Bestellinformationen

Produkt	Kat.-Nr.
SERVA IMAC LD Test Kit	42162.01
SERVA IMAC LD Test Kit plus columns	42163.01
SERVA IMAC Ni-IDA Test Kit	42164.01
SERVA IMAC Ni-IDA Kit plus columns	42165.01
SERVA IMAC Ni- and Co-IDA Test Kit	42166.01
SERVA IMAC Ni- and Co-IDA Kit plus columns	42167.01
SERVA IMAC Zn-IDA Test Kit	42168.01
SERVA IMAC Zn-IDA Kit plus columns	42169.01
SERVA IMAC Zn- and Cu-IDA Test Kit	42170.01
SERVA IMAC Zn- and Cu-IDA Kit plus columns	42171.01