

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA IDA LD pre-packed columns

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

(Kat.-Nr. 42154, 42155, 42156, 42157, 42158, 42159)



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 IDA LD PRE-PACKED COLUMNS	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. 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 IDA LD pre-packed columns

1.1. Allgemeine Hinweise

Die SERVA IDA LD (*low density*) Columns sind gebrauchsfertige Säulen mit einer Agarosematrix, die eine hohe Selektivität für die Affinitätsreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen besitzt.

Kat.-Nr.	Produkt	Menge	Matrixvolumen
42154	SERVA Ni-IDA LD Mini Column	8	1 ml
42155	SERVA Ni-IDA LD Midi Column	5	5 ml
42156	SERVA Zn-IDA LD Mini Column	8	1 ml
42157	SERVA Zn-IDA LD Midi Column	5	5 ml
42158	SERVA Cu-IDA LD Mini Column	8	1 ml
42159	SERVA Cu-IDA LD Midi Column	5	5 ml

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 löslichen Proteinen

Bitte beachten Sie, dass diese Agarose für die Affinitätsreinigung sowohl unter nativen Bedingungen optimiert ist. Für die Eignung unter denaturierenden Bedingungen, prüfen Sie bitte die verwendeten Puffer anhand der Kompatibilitätstabelle in Abschnitt 3.

2.1. Beseitigung des Lagerungspuffers aus der Agarosematrix

Öffnen Sie die Minisäule zunächst oben und dann unten. Der Lagerungspuffer tropft dann aus der Säule heraus.

2.2. Äquilibration der Säule

Zur Äquilibration werden 5 - 10 Säulenbettvolumen Bindungspuffer auf die Agarosematrix der Säule aufgegeben und die Säule unten verschlossen. Anschließend wird durch mehrmaliges Invertieren der Säule die Matrix mit dem Bindungspuffer gemischt. Bei der Pufferaufgabe auf die Säule sollten Luftblasen vermieden werden.

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, 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 werden. Hierbei sollte die Säule unten verschlossen werden und die Probe mind. 15 min mit der Matrix inkubieren.

Die Inkubationszeit kann probenabhängig auch verlängert werden, um die Bindungseffektivität zu erhöhen.

Zur Vermeidung der Bildung von Luftblasen kann die Probe über einen Glasstab an der inneren Wand der Säule aufgegeben werden.

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 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

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 Ni-IDA HD Mini Column	42148.01
SERVA Ni-IDA HD Midi Column	42149.01
SERVA Zn-IDA HD Mini Column	42150.01
SERVA Zn-IDA HD Midi Column	42151.01
SERVA Co-IDA HD Mini Column	42152.01
SERVA Co-IDA HD Midi Column	42153.01
SERVA Ni-IDA LD Mini Column	42154.01
SERVA Ni-IDA LD Midi Column	42155.01
SERVA Zn-IDA LD Mini Column	42156.01
SERVA Zn-IDA LD Midi Column	42157.01
SERVA Cu-IDA LD Mini Column	42158.01
SERVA Cu-IDA LD Midi Column	42159.01