

# GEBRAUCHSANLEITUNG

---

## SERVA Ni-NTA Magnetic Beads

Magnetbeads zur Affinitätsreinigung  
von His-Tag-Fusionsproteinen

(Kat.-Nr. 42179)

**SERVA**  
Electrophoresis

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

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. SERVA NI-NTA MAGNETIC BEADS</b>	<b>2</b>
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Lagerungsbedingungen	2
<b>2. NATIVE AFFINITÄTSREINIGUNG</b>	<b>2</b>
2.1. Beseitigung des Lagerpuffers	2
2.2. Äquilibrierung der Magnetbeads	3
2.3. Probenaufgabe	3
2.4. Waschen der Magnetbeads	4
2.5. Elution des Fusionsproteins	4
<b>3. DENATURIERENDE AFFINITÄTSREINIGUNG</b>	<b>5</b>
<b>4. DENATURIERENDE AFFINITÄTSREINIGUNG VON PROTEINEN IN „INCLUSION BODIES“</b>	<b>5</b>
4.1. Isolierung der <i>Inclusion Bodies</i>	6
4.2. Solubilisierung der <i>Inclusion Bodies</i>	6
4.3. Chemische Kompatibilität	7
<b>5. REGENERATION DER NI-NTA MAGNETBEADS</b>	<b>8</b>
<b>6. PROBLEMBEHANDLUNG</b>	<b>9</b>
6.1. Probenauftrag	9
6.2. Adsorption	9
6.3. Elution	10
6.4. Veränderungen der Beads	11
<b>7. BESTELLINFORMATIONEN</b>	<b>12</b>

# 1. SERVA Ni-NTA Magnetic Beads

## 1.1. Allgemeine Hinweise

SERVA Ni-NTA Magnetic Beads eignen sich zur schnellen Affinitätsreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen. Das Produkt wird als Suspension von 5 % Magnetbeads in 20 % Ethanol geliefert.

## 1.2. Lagerungsbedingungen

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

# 2. Native Affinitätsreinigung

Die Anwesenheit von geringen Imidazol-Konzentrationen ( $\leq 20$  mM) in Lyse- und Bindungspuffer, beeinflusst das Zielfusionsprotein nicht. Bindet aber das Protein nicht an die Beads, sollte die Imidazol-Konzentration auf 5 - 10 mM reduziert werden.

## 2.1. Beseitigung des Lagerpuffers

Bestimmen Sie zunächst die Menge der benötigten Magnetbeads anhand der folgenden Tabelle. Die Ausbeute des gereinigten His-Tag-Proteins hängt von verschiedenen Parametern, wie Primär- und Sekundärstruktur, Molekulargewicht, ab. Die Bindungskapazität der Ni-NTA-Matrix beträgt  $> 75$  mg/ml Suspension (6xHis-GFP). 1 ml Suspension enthält 50  $\mu$ l Ni-NTA Magnetbeads.

Expressionsrate	Menge His-Tag-Protein pro 10 ml Kultur	Volumen Suspension SERVA Ni-NTA Magnetic Beads pro 10 ml Kultur
< 0,5 mg/L	< 5 $\mu$ g	10 $\mu$ l
1 mg/L	10 $\mu$ g	20 $\mu$ l
5 mg/L	50 $\mu$ g	100 $\mu$ l
10 mg/L	100 $\mu$ g	200 $\mu$ l
50 mg/L	500 $\mu$ g	1 ml

**Tab. 1:** Abhängig von der Expressionsrate benötigtes Volumen der SERVA Ni-NTA Magnetic Beads Suspension. Die Volumina lassen sich linear an die entsprechend Menge Kulturmedium anpassen.

Vorsichtiges Schütteln der Flasche mit den Magnetbeads um eine homogene Suspension zu erhalten. Anschließend werden sofort 200 µl der Suspension (entspricht 10 µl Beads) in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Mit Hilfe eines Magneten oder eines Magnetabscheiders werden die Magnetbeads im Reaktionsgefäß fixiert und der Lagerungspuffer kann als Überstand abgenommen werden.

## 2.2. Äquilibrierung der Magnetbeads

---

**Bindungspuffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0

- Bindungspuffer zu den Beads geben (500 µl Puffer pro 10 µl Beads)
- Beads und Bindungspuffer mischen bis eine homogene Suspension entsteht
- Reaktionsgefäß in den Magnetabscheider stellen
- Überstand abtrennen

---

### 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.

**Wichtig:** Zur Erhöhung der Selektivität der Proteinbindung sollte der Bindungspuffer 10 – 40 mM Imidazol enthalten. Das verwendete Imidazol sollte hoch rein sein, z. B. SERVA Kat.-Nr. 26081, um keine störenden Effekte bei der Absorptionsmessung A<sub>280nm</sub> zu zeigen. Außerdem ist es wichtig, dass kein EDTA und Citrat im Puffer verwendet wird.

## 2.3. Probenaufgabe

- 
- Probe (entweder geklärtes *E. coli*-Lysat oder Proteinextrakt) aufgeben
  - Suspension vorsichtig mischen 30 min bei RT oder 60 min bei 4 °C
  - Reaktionsgefäß in den Magnetabscheider stellen
  - Überstand vorsichtig abtrennen und verwerfen
- 

### Wichtig:

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

## 2.4. Waschen der Magnetbeads

---

**Waschpuffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0

- Waschpuffer zu den Beads geben (500 µl Puffer pro 10 µl Beads)
  - Beads und Bindungspuffer mischen bis eine homogene Suspension entsteht
  - Reaktionsgefäß in den Magnetabscheider stellen
  - Überstand abtrennen und verwerfen
  - Waschschrift 2 Mal wiederholen
- 

## 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.

Expressionsrate	Menge His-Tag-Protein pro 10 ml Kultur	Volumen Suspension SERVA Ni-NTA Magnetic Beads pro 10 ml Kultur	Elutionsvolumen pro 10 ml Kultur
< 0,5 mg/L	< 5 µg	10 µl	25 µl
1 mg/L	10 µg	20 µl	25 µl
5 mg/L	50 µg	100 µl	50 µl
10 mg/L	100 µg	200 µl	100 µl
50 mg/L	500 µg	1 ml	500 µl

**Tab. 2:** Abhängig von der Expressionsrate benötigtes Elutionsvolumen. Die Volumina lassen sich linear an die entsprechend Menge Kulturmedium anpassen.

---

**Elutionspuffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8,0

- Elutionspuffer zu den Beads geben (100 µl Puffer pro 10 µl Beads)
  - Beads und Elutionspuffer 10 min gut mischen, bis eine homogene Suspension entsteht
  - Reaktionsgefäß in den Magnetabscheider stellen
  - Überstand vorsichtig abtrennen, in ein neues Reaktionsgefäß geben und auf Eis lagern
  - Elutionsschritt mind. 2-mal wiederholen
  - Elutionsfraktionen getrennt sammeln und Proteingehalt bestimmen
- 

Der Proteingehalt der Eluate zur Bestimmung der Ausbeute sollte mittels Bradford-Assay, SDS PAGE oder Absorptionsmessung bei 280 nm (A<sub>280</sub>-Messung) überprüft werden.

**Hinweis:**

Für die nachfolgende Lagerung kann das Imidazols problemlos durch Dialyse oder Ultrafiltration beseitigt werden.

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

### 3. Denaturierende Affinitätsreinigung

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

**Bindungspuffer:**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris Base, 8 M Harnstoff, pH 6,3

**Waschpuffer:**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris Base, 8 M Harnstoff, pH 6,3

**Elutionspuffer:**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris Base, 8 M Harnstoff, pH 4,5

**Wichtig:** Aufgrund der Dissoziation des Harnstoffs, sollte der pH-Wert unmittelbar vor Gebrauch eingestellt werden.

### 4. Denaturierende Affinitätsreinigung von Proteinen in „*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 Magnetbeads 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.

## 4.1. Isolierung der *Inclusion Bodies*

- Gefrorene Zellpellets auf Eis vorsichtig auftauen
- 1 g feuchtes Zellpellet in 5 ml „Bindungspuffer“ (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) auf Eis vollständig resuspendieren
- Zugabe von Lysozym (SERVA Kat.-Nr. 28262, 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 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.

## 4.2. Solubilisierung der *Inclusion Bodies*

- Sedimentierte *Inclusion Bodies* in 10 ml „Bindungspuffer“ (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 8 M Harnstoff, pH 8,0) zugegeben.

**Hinweis:** Falls 8 M Harnstoff nicht ausreichend zur Solubilisierung ist, kann alternativ auch 6 M Guanidinium-HCl (Glu-HCl) verwendet werden. Für nachfolgende SDS PAGE, muss Glu-HCl durch Verdünnung reduziert oder durch TCA-Fällung entfernt werden.

- 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 8 M Harnstoff, pH 8,0

### **Waschpuffer:**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 8 M Harnstoff, pH 8,0

### **Elutionspuffer:**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 8 M Harnstoff, pH 8,0

### 4.3. Chemische Kompatibilität

Reagenzien		Anmerkung
<b>Denaturierende Agenzien</b>	Harnstoff Guanidinium-HCl	Solubilisierung von Proteinen, $\leq 8$ M Solubilisierung von Proteinen, $\leq 6$ M
<b>Detergenzien</b>	Nicht-ionische Detergenzien, z. B. Triton <sup>®</sup> X-100, Tween <sup>®</sup> 20	Beseitigung von störenden Proteinen $\leq 2\%$ können verwendet werden
<b>Zusätze</b>	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 $\leq 1$ mM in der Probe möglich
	Ethanol	Verhindert hydrophobe Wechselwirkungen, kann zu Proteinpräzipitaten führen $\leq 20\%$ können verwendet werden
<b>Reduzierende Agenzien</b>	Glutathion, reduziert	Hohe Konzentrationen reduzieren $\text{Ni}^{2+}$ $\leq 30$ mM in der Probe möglich
	2-Mercaptoethanol	Verhindert Disulfid-Brücken Hohe Konzentrationen reduzieren $\text{Ni}^{2+}$ $\leq 20$ mM in der Probe möglich
	Dithioerythritol (DTE) Dithiothreitol (DTT)	Hohe Konzentrationen reduzieren $\text{Ni}^{2+}$ $\leq 10$ mM in der Probe möglich
	SDS	Verhindert hydrophobe Wechselwirkungen, vermindert Kapazität, nicht empfohlen, $\leq 0,3\%$ in Probe möglich
<b>Puffer</b>	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



## 5. Regeneration der Ni-NTA Magnetbeads

Generell ist die Regeneration der Beads 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 Beads (Angaben für 10 µl Beads) regeneriert werden sollte, um optimale Ergebnisse zu erhalten.

- Beseitigung von Verunreinigungen: Waschen mit 500 mM NaOH, 30 min
- Beseitigen der NaOH-Lösung: Waschen mit 100 µl dest. Wasser (10-faches Bead-Volumen)
- Für den direkten Gebrauch mit 100 µl 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0 waschen (10-faches Bead-Volumen)
- Werden die Beads 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 Ni<sup>2+</sup>-Ionen der Matrix verändert ist. Dann ist es erforderlich die komplette Beladung mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen zu beseitigen und neu zu beladen.

- Waschen der Beads mit 100 µl dest. Wasser (10-faches Bead-Volumen)
- Beseitigung der Metall-Ionen: Waschen mit 100 µl 100 mM EDTA, pH 8,0 (10-faches Bead-Volumen)
- Beseitigung des überschüssigen EDTA:  
Waschen der Beads mit 100 µl dest. Wasser (10-faches Bead-Volumen)
- Beladen der Beads mit Metall-Ionen:  
Zugabe von 2x 100 µl 100 mM Salz (NiCl<sub>2</sub> oder NiSO<sub>4</sub>)
- Beseitigung überschüssiger Metall-Ionen:  
Waschen der Beads mit 100 µl dest. Wasser (10-faches Bead-Volumen)
- Zugabe von 100 µl 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0 (10-faches Bead-Volumen)

## 6. Problembehandlung

### 6.1. Probenauftrag

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
	Hochkonzentrierte Probe	Verdünnen der Probe

### 6.2. Adsorption

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Zielprotein bindet nicht an die Beads	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 den Beads

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Zielprotein bindet unvollständig an die Beads	Bindungskapazität erschöpft	Weniger Proteinbeladung Regeneration der Beads
	Verlust des Metallions	Regeneration der Beads 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

### 6.3. Elution

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Große Mengen an Verunreinigungen	Ungenügendes Waschen der Beads	Größeres Volumen Waschpuffer verwenden Zusatz von Imidazol (max. 40 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
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 Beads	Elution mit EDTA Elution bei pH 4,0 und mit Imidazol Imidazolkonzentration auf 1 M erhöhen Elution unter denaturierenden Bedingungen
	Präzipitation des Fusionsproteins	Zugabe von Detergenzien Inkubation der Beads mit Elutionspuffer (8 - 10 h) vor der Elution
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 bis + 8 °C
	Präzipitation von Proteinen und/oder Lipiden	Verwendung neuer Beads
	Variation des pH-Wertes und/oder der Ionenstärke	Neue Puffer ansetzen

#### 6.4. Veränderungen der Beads

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Verlust der Farbe	Chelat-Bildner in der Probe	Reinigung der Probe durch Gelfiltration und Regeneration bzw. Verwendung neuer Beads
Braunfärbung	Reduzierende Agenzien in der Probe	Reinigung der Probe und Regeneration bzw. Verwendung neuer Beads

## 7. Bestellinformationen

Produkt	Kat.-Nr.	Menge
SERVA Ni-NTA Magnetic Beads	42179.01	2 ml
	42179.02	10 ml
SERVA Ni-NTA Agarose Resin	42139.01	25 ml
	42139.02	100 ml
SERVA IDA Metal-free HD Agarose Resin	42140.01	25 ml
	42140.02	100 ml
SERVA IDA Metal-free LD Agarose Resin	42144.01	25 ml
	42144.02	100 ml
SERVA Ni-IDA HD Agarose Resin	42141.01	25 ml
	42141.02	100 ml
SERVA Ni-IDA LD Agarose Resin	42145.01	25 ml
	42145.02	100 ml
SERVA Zn-IDA HD Agarose Resin	42142.01	25 ml
	42142.02	100 ml
SERVA Zn-IDA LD Agarose Resin	42146.01	25 ml
	42146.02	100 ml
SERVA Co-IDA HD Agarose Resin	42143.01	25 ml
	42143.02	100 ml
SERVA Cu-IDA LD Agarose Resin	42147.01	25 ml
	42147.02	100 ml