

GEBRAUCHSANLEITUNG

SERVA IDA LD Agarose

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

(Kat.-Nr. 42144, 42145, 42146, 42147)



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 AGAROSE	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Lagerungsbedingungen	2
2. AFFINITÄTSREINIGUNG VON LÖSLICHEN PROTEINEN	2
2.1. Waschen der Agarosematrix	2
2.2. Äquilibration der Agarosematrix	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>	4
4. PACKEN DER SÄULE	5
5. REGENERATION DER AGAROSE-MATRIX	6
6. PROBLEMBEHANDLUNG	7
6.1. Probenapplikation	7
6.2. Adsorption	7
6.3. Elution	8
6.4. Veränderungen der Matrix	10
7. BESTELLINFORMATIONEN	10

1. SERVA IDA LD Agarose

1.1. Allgemeine Hinweise

Die SERVA IDA LD (*low density*) Agarose mit hoher Selektivität ist optimal zur Affinitätsreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen entweder über eine Säule oder im Batch-Verfahren.

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 unter nativen Bedingungen optimiert ist.

2.1. Waschen der Agarosematrix

Zur Beseitigung des Lagerungspuffers sollte das Material mit dest. Wasser (5 – 10-faches Agarosevolumen) gewaschen werden.

Wichtig: Im Fall von Metall-freier Agarose (Kat.-Nr. 42144), muss zunächst noch das entsprechende Metall-Ion vor Gebrauch wie nachfolgend beschrieben adsorbiert werden.

- **Metalladsorption:** Herstellen einer Lösung (neutral oder sauer) mit 100 mM Salz (Chlorid oder Sulfat) des entsprechenden bivalenten Kations (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}) und Zugabe des 5-fachen Agarosevolumens zur Matrix.
- **Beseitigung der nicht-gebundenen Kationen:** Waschen der Agarose mit dest. Wasser(10-faches Agarosevolumen).

2.2. Äquilibrierung der Agarosematrix

Hierbei wird die Matrix mit Bindungspuffer (5 -10-faches Agarosevolumen) äquilibriert.

Hinweise zum Bindungspuffer:

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

Normalerweise sind 500 mM Imidazol für die Proteinelution ausreichend. Es ist auch möglich einen Konzentrationsgradienten von 0 – 500 mM Imidazol zu verwenden. Die meisten Proteine werden bei ca. 250 mM eluiert.

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* expremiert 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

4. Packen der Säule

- Schütteln der Flasche , um eine homogene Suspension der Agarose im Puffer zu erhalten
- Einsetzen eines Trichters in die Säule und die Suspension langsam in die unten geschlossene Säule einfüllen.

Wichtig: Durch das langsame Befüllen sollen Luftblasen vermieden werden. Es ist empfehlenswert sowohl die Suspension als auch alle zusätzlich verwendeten Lösungen oder Puffer zuvor zu entgasen, so dass sich während des Packens keine Luftblasen bilden.

Während des Befüllens immer wieder die Säule unten öffnen und die überschüssige Flüssigkeit herauslaufen lassen. Um das Austrocknen zu vermeiden, sollte der Flüssigkeitsspiegel ca. 1 cm über der Agarosematrix stehen.

- Diese Schritte werden entsprechend wiederholt bis die Säule das gewünschte Packvolumen hat.
- Anschließend der Adapter vorsichtig in den Säulenkopf einbringen, so dass er langsam auf die Agarose absinkt. Hierbei sollten wiederum Luftblasen vermieden werden, besonders unter dem Netz.
- Danach wird dest. Wasser auf die Säule gegeben bis die Agarose nicht weiter absinkt.
- Bleibt die Füllhöhe der Agarosematrix konstant, wird die Säule mit 5 Säulenbettvolumen (Füllhöhe x Kreisfläche der Säule) dest. Wasser gewaschen, um den Lagerungspuffer vollständig zu entfernen.
- Schließlich wird die Säule mit Bindungspuffer (5 – 10-faches Säulenbettvolumen) äquilibriert.

Empfohlene Bedingungen für den Säulenbetrieb:

Flußrate: 0,5 – 1,0 ml/min

max. Druck: 0,18 bar (2,6 psi)

5. Regeneration der Agarose-Matrix

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.

- Beseitigen der Metall-Ionen aus der Matrix:
Waschen der Matrix mit folgendem Puffer (5-faches Säulenbett/Agarose-matrixvolumen):
 - 20 mM Natriumphosphat
 - 500 mM NaCl
 - 50 mM EDTA
 - pH 7,0
- Beseitigen des überschüssigen EDTA vor der erneuten Beladung der Matrix mit Metall-Ionen:
Waschen der Matrix mit dest. Wasser (5-faches Säulenbett/Agarose-matrixvolumen)
- Beladen der Matrix mit Metall-Ionen: Zugabe von 5x Volumen auf die 100 mM Salz (Chlorid oder Sulfat) des entsprechenden bivalenten Kations (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}) zur Agarose.
- Waschen der Matrix mit dest. Wasser (5-faches Säulenbett/Agarose-matrixvolumen)
- Zugabe von Bindungspuffer (5-faches Säulenbett/Agarose-Matrixvolumen)

Wird die Säule/Matrix nicht unmittelbar wieder eingesetzt, sollte beim letzten Schritt nicht der Bindungspuffer, sondern 20 % (v/v) Ethanol für die Matrixlagerung verwendet werden.

6. Problembehandlung

6.1. Probenapplikation

Beobachtung	Grund	Empfehlung
Hohe Probenviskosität	DNA in der Probe	Behandlung mit Nuklease 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

6.2. 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

6.3. 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	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

6.4. 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

7. Bestellinformationen

Säulen					
Produkt	Porengröße der Fritte	Resin-volumen	Gesamt-kapazität	Kat.-Nr.	Menge
Mini Columns	20 µm	100 - 250 µl	1,5 ml	42173.01	25 Säulen
				42173.02	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