



ABISENSE

141700, Московская область
г. Долгопрудный ул. Дирижабельная, 13, а/я 3
Тел.: +7 (495) 973-39-93
Эл.почта: reagents@abisense.com

Abisense AbiFlow 100 Ni-AZUR Agarose Resin

Название	Кат.№	Упаковка
AbiFlow 100 Ni-AZUR Agarose (10 мл)	FLO-931-102-10ML	20 мл 50% суспензии
AbiFlow 100 Ni-AZUR Agarose (50 мл)	FLO-931-102-50ML	100 мл 50% суспензии
AbiFlow 100 Ni-AZUR Agarose (250 мл)	FLO-931-102-250ML	500 мл 50% суспензии

ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА

AbiFlow 100 Ni-AZUR Agarose представляет собой специально разработанный компанией Абисенс носитель для металл-хелатной аффинной хроматографии. Носитель предназначен в основном для выделения и очистки белков с His-Tag меткой, которые экспрессируются в культурах эукариотических клеток. Очень сильное связывание ионов никеля с **AbiFlow 100 Ni-AZUR Agarose** обеспечивает прямую загрузку больших объемов образцов без необходимости очистки от агентов, которые вызывают удаление иммобилизованных ионов никеля из обычных носителей для металл-хелатной хроматографии при нанесении. Прочное связывание ионов никеля с носителем также обеспечивает очень высокую стойкость к хелаторам (ЭДТА) и восстановителям (ДТТ). **AbiFlow 100 Ni-AZUR Agarose** также подходит для очистки меченых гистидином белков из других образцов, включая лизаты *E. coli*.

СОВМЕСТИМОСТЬ

Специально разработанный носитель с лигандом AZUR очень стабилен и в большинстве применений может быть использован в следующих условиях:

- буферы с pH от 4 до 13,
- 100% метанол,
- 100% этанол,
- 8 М мочевины,
- 6 М гидрохлорид гуанидина,
- 30% (об./об.) ацетонитрил,
- 20 мМ ДТТ,
- 20 мМ ЭДТА

ПРОТОКОЛ ОЧИСТКИ БЕЛКОВ МЕТОДОМ МЕТАЛЛ-ХЕЛАТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (МХХ)

Приготовление буферов

Вода и реактивы, используемые для приготовления буферов, должны быть высокой чистоты. Фильтруйте буферы через фильтр 0.45 мкм перед использованием.

Связывающий буфер, 50 мл

Компонент	Финальная конц-я	Молекулярная масса	Концентрация стока	Кол-ва для стока	Кол-во стока для буфера
NaH ₂ PO ₄	50 мМ	119,98	0,5 М	29,99 г/ 500 мл	5 мл
NaCl	300 мМ	58,44	5 М	146,1 г/ 500 мл	3 мл
Имидазол*	0 мМ	68,08	-	-	-

* Крайне не рекомендуется добавлять имидазол в образец и *Связывающий буфер*.

Инструкция: смешайте компоненты в 40 мл воды. Доведите pH до 7.4 при помощи NaOH и затем довести водой объем до 50 мл. Всегда используйте свежеприготовленный буфер.

Промывочный буфер, 100 мл

Компонент	Финальная конц-я	Молекулярная масса	Концентрация стока	Кол-ва для стока	Кол-во стока для буфера
NaH ₂ PO ₄	50 мМ	119,98	0,5 М	29,99 г/ 500 мл	10 мл
NaCl	300 мМ	58,44	5 М	146,1 г/ 500 мл	6 мл
Имидазол **	0-5 мМ	68,08	1 М	6,8 г/ 100 мл	до 0,5 мл

** Оптимальная концентрация имидазола в *Промывочном буфере* зависит от образца и для каждого белка подбирается индивидуально, в большинстве случаев достаточно 0-5 мМ, но в зависимости от конкретного белка концентрация имидазола может доходить до 30 мМ.

Инструкция: смешайте компоненты в 80 мл воды. Доведите pH до 7.4 при помощи NaOH и затем довести водой объем до 100 мл. Всегда используйте свежеприготовленный буфер.

Элюирующий буфер, 50 мл

Компонент	Финальная конц-я	Молекулярная масса	Концентрация стока	Кол-ва для стока	Кол-во стока для буфера
NaH ₂ PO ₄	50 мМ	119,98	0,5 М	29,99 г/ 500 мл	5 мл
NaCl	300 мМ	58,44	5 М	146,1 г/ 500 мл	3 мл
Имидазол***	40-500 мМ	68,08	1 М	6,8 г/ 100 мл	4-50 мл

*** Длина метки и структура белка могут оказывать влияние на взаимодействие His-Тэг с ионами никеля. Рекомендуется проверить несколько концентраций имидазола для нахождения его минимальной концентрации, которая бы смывала требуемое количество белка с носителя. В большинстве случаев достаточно 250 мМ.

Инструкция: смешайте компоненты в 40 мл воды. Доведите pH до 7.4 при помощи NaOH и затем доведите водой объем до 50 мл. Всегда используйте свежеприготовленный буфер.

Протокол очистки белков

В данном протоколе описывается получение лизатов из культуры *E. coli* и последующая очистка меченых гистидином белков из цитоплазматической фракции (в нативной форме) с использованием оригинального носителя **AbiFlow 100 Ni-AZUR Agarose**. Приведенные количества реагентов даны в пересчете на 200 мл бактериальной культуры *E. coli* BL21 (DE3), выращенной в среде 2xYT, с высокой продукцией белка (примерно 10–50 мг/л культуры). Приведенные значения могут потребовать коррекции в случае использования других объемов клеточной культуры с большей или меньшей эффективностью продукции белка, а также использовании других штаммов продуцентов, культуральных сред и условий выращивания культуры. Целевой белок с His-Тэг меткой очищают из лизата в нативных условиях с помощью последовательных операций связывания-промывания-элюирования. Связывание белка с носителем выполняется в периодическом (батч-) режиме. Данный метод более эффективен, особенно когда целевой белок присутствует в низких концентрациях или есть подозрение, что His-Тэг метка может быть не полностью доступна.

Все манипуляции проводить в холодной комнате или при охлаждении. Все буферы предварительно охладить до +4°C.

1. Ресуспендируйте клеточный осадок в расчёте 5-10 мл *Связывающего буфера* на 1 грамм осадка. Добавьте лизоцим до 1 мг/мл и инкубируйте не менее 30 минут во льду, периодически встряхивая.
2. Если раствор очень вязкий, добавьте в буфер 3 единицы Benzonase® на каждый мл объема культуры *E. coli*. Можно добавить ДНКазу I 5 мкг/мл (тогда в буфер должен быть добавлен MgCl₂ до концентрации 100 мМ).
3. Поместите пробирку с лизатом в ледяную баню и обработайте лизат ультразвуком, используя шесть десятисекундных импульсов высокой интенсивности с десятисекундными этапами охлаждения между каждым импульсом (условия будут

зависеть от прибора). Избегайте нагрева лизата и вспенивания, это может привести к денатурации белка.

4. Центрифугируйте лизат в течение 30 минут при 10000-15000 g и 2-8°C. Осторожно соберите супернатант, не касаясь осадка (супернатант содержит осветленную фракцию лизата). Рекомендуется взять аликвоты всех фракций для анализа на SDS-PAGE. Осветленный лизат следует хранить на льду или заморозить при -20°C до появления необходимости использования.
5. Ресуспендируйте **AbiFlow 100 Ni-AZUR Agarose** путем переворачивания емкости для ее хранения до получения однородной суспензии. Перенесите 1 мл 50% суспензии (соответствует объему 500 мкл влажного носителя) в коническую центрифужную пробирку объемом 15 мл. Дайте смоле осесть под действием силы тяжести или мягко осадите носитель с помощью центрифугирования на низких оборотах (1-2 минуты при 500 g). Удалите супернатант.
6. Добавьте 2.5 мл *Связывающего буфера* и осторожно ресуспендируйте смесь, чтобы уравновесить смолу. Дайте смоле осесть под действием силы тяжести или мягко осадите носитель с помощью центрифугирования на низких оборотах (1-2 минуты при 500 g). Удалите супернатант. Уравновешивание смолы можно также проводить непосредственно в хроматографической колонке.
7. Добавьте 10 мл осветленного лизата в уравновешенный носитель **AbiFlow 100 Ni-AZUR Agarose** и инкубируйте при 4°C в течение 1 ч на шейкере при постоянном вращении. В качестве альтернативы данную операцию можно проводить непосредственно в колонке с закрытыми нижним и верхним выпускными отверстиями.
8. Перенесите суспензию в хроматографическую колонку с закрытым нижним выпускным отверстием. Используйте *Связывающий буфер*, чтобы промыть центрифужную пробирку и удалить носитель, прилипший к стенкам.
9. Снимите нижнюю крышку колонки и соберите прошедший объем.
10. Промойте колонку 5 мл *Промывочного буфера*. Повторите этап промывки еще не менее 3 раз.
11. Элюируйте белок 5 раз, используя по 0,5 мл *Элюирующего буфера*. Соберите каждый элюат в отдельную пробирку и определите концентрацию белка в каждой фракции.
12. Проанализируйте все фракции с помощью SDS-PAGE.

Рекомендуемый протокол очистки/регенерации носителей на основе AbiFlow AZUR Agarose от следов белка

Мы рекомендуем проводить очистку/регенерацию агарозных носителей на основе AZUR после каждого использования. Поскольку носители с лигандом AZUR устойчивы к высоким концентрациям ЭДТА и не требуют перезарядки носителя никелем, для их регенерации следует использовать следующий протокол:

1. Промывка 10 CV* H₂O;
2. 10 CV 1 M NaOH;
3. 10 CV H₂O;
4. 10 CV нейтрализующего буфера (0.15 M NaCl; 0.4 M Na₂HPO₄, pH 7.0);
5. 10 CV H₂O;

6. 10 CV 20% (об./об.) этанола, 10 мМ ацетат натрия, рН 6.50**

* «CV» обозначает объем носителя в колонке (column volume), например, для 1 мл объема слоя носителя в колонке используйте 10 CV = 10 мл буфера;

** Буфер состава 20% (об./об.) этанола, 10 мМ ацетат натрия (рН 6.50) является рекомендуемым буфером для хранения носителя.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Температура транспортировки	Температура окружающей среды
Кратковременное хранение	Буферы с нейтральным рН
Долговременное хранение	Буферы с нейтральным рН с добавкой 20% этанола при 4°C