



Abisense AbiFlow 100 Ni-NTA Agarose Resin

Название	Кат.№	Упаковка
AbiFlow 100 Ni-NTA Agarose (10 мл)	FLO-911-102-10ML	20 мл 50% суспензии
AbiFlow 100 Ni-NTA Agarose (50 мл)	FLO-911-102-50ML	100 мл 50% суспензии
AbiFlow 100 Ni-NTA Agarose (250 мл)	FLO-911-102-250ML	500 мл 50% суспензии

ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА

AbiFlow 100 Ni-NTA Agarose используется для выделения и очистки рекомбинантных белков с His-Tag меткой, экспрессирующихся в клетках бактерий, насекомых и млекопитающих. **AbiFlow 100 Ni-NTA Agarose** позволяет проводить очистку белков в нативных, денатурирующих или смешанных условия. Протоколы, приведенные ниже, являются общими и могут не дать 100% чистый белок, важно каждый раз оптимизировать протокол под конкретные свойства каждого белка. Решение об очистке меченых His-Tag белков в нативных или денатурирующих условиях зависит от растворимости белка и необходимости сохранения биологической активности для последующего применения.

- Используйте *нативные* условия, если ваш белок растворим (в супернатанте после лизиса), и вы хотите сохранить активность белка.
- Используйте *денатурирующие* условия, если белок нерастворим (в осадке после лизиса), или если ваше последующее приложение не зависит от активности белка.
- Используйте *смешанный* протокол, если ваш белок нерастворим, но вы хотите сохранить его активность. Приготовьте лизат и подготовьте колонки в денатурирующих условиях, а затем используйте буферы для нативных условий во время этапов промывки и элюирования для рефолдинга белка. Обратите внимание, что этот протокол может не восстанавливать активность для всех белков.

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.

Рекомендуемые буферы

Нативные условия

Связывающий буфер, pH=7.4, 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*	10 мМ	68,08	1 М	6,8 г/ 100 мл	1 мл

* Если меченый белок не связывается в этих условиях, количество имидазола следует уменьшить до 1–5 мМ.

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, pH=7.4, 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**	10-20 мМ	68,08	1 М	6,8 г/ 100 мл	1-2 мл

** Оптимальная концентрация имидазола в Промывочном буфере зависит от образца и для каждого белка подбирается индивидуально, в большинстве случаев оптимальным будет значение 10-20 мМ, в некоторых применениях для получения особо чистых белков концентрацию имидазола в Промывочном буфере можно повышать вплоть до 40 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, pH=7.4, 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***	250-500 мМ	68,08	1 М	6,8 г/ 100 мл	25-50 мл
-------------	------------	-------	-----	------------------	----------

*** Длина метки и структура белка могут оказывать влияние на взаимодействие His-Tag с ионами никеля. Поэтому рекомендуется использовать несколько концентраций имидазола для нахождения его минимальной концентрации, которая бы смывала требуемое количество белка с носителя, в большинстве случаев более чем достаточно 250 мМ.

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

Денатурирующие условия

Денатурирующий связывающий буфер, рН=7.4, 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
Мочевина	8 М	60,07	-	-	24 г
Имидазол*	10 мМ	68,08	1 М	6,8 г/ 100 мл	1 мл

* Если меченый белок не связывается в этих условиях, количество имидазола следует уменьшить до 1–5 мМ.

Инструкция: растворите мочевину в 30 мл воды, после чего добавьте остальные компоненты. Доведите рН раствора до рН 7.4 и доведите объем раствора до 50 мл. Ввиду быстрого разложения мочевины доведение рН следует производить непосредственно перед использованием буфера.

Денатурирующий промывочный буфер, рН=7.4, 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	5 мл
NaCl	300 мМ	58,44	5 М	146,1 г/ 500 мл	3 мл
Мочевина	8 М	60,07	-	-	24 г
Имидазол**	10-20 мМ	68,08	1 М	6,8 г/ 100 мл	1 мл

** Оптимальная концентрация имидазола в Промывочном буфере зависит от образца и для каждого белка подбирается индивидуально, в большинстве случаев оптимальным будет значение 10-20 мМ, в некоторых применениях для получения особо чистых белков концентрацию имидазола в Промывочном буфере можно повышать вплоть до 40 мМ.

Инструкция: растворите мочевину в 50 мл воды, после чего добавьте остальные компоненты. Доведите рН раствора до рН 7.4 и доведите объем раствора до 100 мл.

Ввиду быстрого разложения мочевины доведение рН следует производить непосредственно перед использованием буфера.

Денатурирующий элюирующий буфер, рН=7.4, 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
Мочевина	8 М	60,07	-	-	24 г
Имидазол***	250-500 мМ	68,08	1 М	6,8 г/ 100 мл	25-50 мл

*** Длина метки и структура белка могут оказывать влияние на взаимодействие His-Tag с ионами никеля. Поэтому рекомендуется использовать несколько концентраций имидазола для нахождения его минимальной концентрации, которая бы смывала требуемое количество белка с носителя, в большинстве случаев более чем достаточно 250 мМ.

Инструкция: растворите мочевины в 30 мл воды, после чего добавьте остальные компоненты. Доведите рН раствора до рН 7.4 и доведите объем раствора до 50 мл. Ввиду быстрого разложения мочевины доведение рН следует производить непосредственно перед использованием буфера.

Смешанные условия

Связывающий буфер для смешанных условий, рН=7.4, 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
Мочевина	8 М	60,07	-	-	24 г
Имидазол*	10 мМ	68,08	1 М	6,8 г/ 100 мл	1 мл

* Если меченый белок не связывается в этих условиях, количество имидазола следует уменьшить до 1–5 мМ.

Инструкция: растворите мочевины в 30 мл воды, после чего добавьте остальные компоненты. Доведите рН раствора до рН 7.4 и доведите объем раствора до 50 мл. Ввиду быстрого разложения мочевины доведение рН следует производить непосредственно перед использованием буфера.

Промывочный буфер для смешанных условий, pH=7.4, 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**	10-20 мМ	68,08	1 М	6,8 г/ 100 мл	1-2 мл

** Оптимальная концентрация имидазола в Промывочном буфере зависит от образца и для каждого белка подбирается индивидуально, в большинстве случаев оптимальным будет значение 10-20 мМ, в некоторых применениях для получения особо чистых белков концентрацию имидазола в Промывочном буфере можно повышать вплоть до 40 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 для смешанных условий, pH=7.4, 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***	250-500 мМ	68,08	1 М	6,8 г/ 100 мл	25-50 мл

*** Длина метки и структура белка могут оказывать влияние на взаимодействие His-Tag с ионами никеля. Поэтому рекомендуется использовать несколько концентраций имидазола для нахождения его минимальной концентрации, которая бы смывала требуемое количество белка с носителя, в большинстве случаев более чем 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.

Приготовление клеточных лизатов из клеток бактерий

Нативные условия

Используйте следующую процедуру для приготовления лизата бактериальных клеток в нативных условиях. Масштабируйте при необходимости.

1. Ресуспандируйте клеточный осадок в расчёте 5-10 мл *Связывающего буфера для нативных условий* 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 Benzopase® 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.

Денатурирующие условия

Используйте следующую процедуру для приготовления лизата бактериальных клеток в денатурирующих условиях. Масштабируйте при необходимости.

1. На льду разморозьте клетки *E. coli*.
2. Ресуспендируйте клеточный осадок в 10 мл *Связывающего буфера для денатурирующих условий*. Если раствор очень вязкий, в буфер для лизиса добавьте 3 единицы Benzopase® на каждый мл объема культуры *E. coli*. Нуклеиновые кислоты также могут быть разрушены путем продавливания лизата через тонкую иглу 10 раз.
3. Обработайте лизат ультразвуком до тех пор, пока не станет прозрачным и не вязким. Избегайте вспенивания и не допускайте перегрева образца.
4. Инкубируйте на шейкере в течение 30 мин в режиме постоянного вращения пробирки при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте лизат в течение 30 минут при 10 000 g и 2-8°C. Осторожно соберите супернатант, не касаясь осадка. Супернатант содержит очищенную фракцию лизата. Мы рекомендуем взять аликвоты всех фракций для анализа на SDS-PAGE.

Протокол очистки белков

Нативные условия

1. Ресуспендируйте **AbiFlow 100 Ni-NTA 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.
2. Добавьте 2,5 мл *Связывающего буфера для нативных условий* 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.
3. Добавьте 10 мл осветленного лизата в уравновешенный носитель **AbiFlow 100 Ni-NTA 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.

4. Перенесите суспензию в хроматографическую колонку с закрытым нижним выпускным отверстием. Используйте *Связывающий буфер для нативных условий*, чтобы промыть центрифужную пробирку и удалить носитель, прилипший к стенкам.
5. Снимите нижнюю крышку колонки и соберите прошедший объем.
6. Промойте колонку 5 мл *Промывочного буфера для нативных условий*. Повторите этап промывки еще не менее 3 раз.
7. Элюируйте белок 5 раз, используя по 0,5 мл *Элюирующего буфера для нативных условий*. Соберите каждый элюат в отдельную пробирку и определите концентрацию белка в каждой фракции.
8. Проанализируйте все фракции с помощью SDS-PAGE.

Денатурирующие условия

1. Ресуспендируйте **AbiFlow 100 Ni-NTA 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.
2. Добавьте 2,5 мл *Связывающего буфера для денатурирующих условий* 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.
3. Добавьте 10 мл осветленного лизата в уравновешенный носитель **AbiFlow 100 Ni-NTA 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.
4. Перенесите суспензию в хроматографическую колонку с закрытым нижним выпускным отверстием. Используйте *Связывающий буфер для денатурирующих условий*, чтобы промыть центрифужную пробирку и удалить носитель, прилипший к стенкам.
5. Снимите нижнюю крышку колонки и соберите прошедший объем.
6. Промойте колонку 5 мл *Промывочного буфера для денатурирующих условий*. Повторите этап промывки еще не менее 3 раз.
7. Элюируйте белок 5 раз, используя по 0,5 мл *Элюирующего буфера для денатурирующих условий*. Соберите каждый элюат в отдельную пробирку и определите концентрацию белка в каждой фракции.
8. Проанализируйте все фракции с помощью SDS-PAGE.

Смешанные условия

1. Ресуспандируйте **AbiFlow 100 Ni-NTA 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.
2. Добавьте 2,5 мл *Связывающего буфера для смешанных условий* и осторожно ресуспандируйте 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.
3. Добавьте 10 мл осветленного лизата, полученного в денатурирующих условиях, в уравновешенный носитель **AbiFlow 100 Ni-NTA 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.
4. Перенесите суспензию в хроматографическую колонку с закрытым нижним выпускным отверстием. Используйте *Связывающий буфер для смешанных условий*, чтобы промыть центрифужную пробирку и удалить носитель, прилипший к стенкам.
5. Снимите нижнюю крышку колонки и соберите прошедший объем.
6. Промойте колонку 5 мл *Промывочного буфера для смешанных условий*. Повторите этап промывки еще не менее 3 раз.
7. Элюируйте белок 5 раз, используя по 0,5 мл *Элюирующего буфера для смешанных условий*. Соберите каждый элюат в отдельную пробирку и определите концентрацию белка в каждой фракции.
8. Проанализируйте все фракции с помощью SDS-PAGE.

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

Носитель **AbiFlow 100 Ni-NTA Agarose** можно использовать несколько раз для очистки разных партий одного и того же белка без перезарядки никелем. Между партиями промойте смолу 0.5 М раствором NaOH в течение 30 минут, а затем уравновесьте соответствующим Связывающим буфером. Если носитель белеет из-за потери ионов никеля, то его следует перезарядить. Процедура выглядит следующим образом:

1. 4 CV* 50 мМ ЭДТА;
2. 16 CV 0,5 М NaOH;
3. 16 CV H₂O;
4. 16 CV 0.1 М Ni²⁺;
5. 16 CV H₂O;
6. 10 CV 20% (об./об.) этанола

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

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