CNBr活性化セファロース4Bは、添加物の存在する状態で凍結乾燥された状態で提供されます。これらの添加剤は、目的のリガンドをカップリングする前に、低いpH（pH3）で洗い流す必要がある。低pH（pH3）を使用することで、高pHで加水分解する反応性基の活性を維持することができます。必要量の粉末を秤量し（凍結乾燥粉末1gで最終容量約3.5mLの培地）、1mM HClに懸濁する。培地はすぐに膨潤するので、焼結ガラスフィルター（気孔率G3）上で1mM HClで15分間洗浄する。凍結乾燥粉末1gあたり約200mLの1mM HClを使用し、数回に分けて添加する。

１カップリングするリガンドを、0.5 M NaCl を含む 0.1 M NaHCO3 pH 8.3 のカップリング緩衝液に溶解させる。カップリング液は、凍結乾燥粉末1gあたり5mL程度を使用する。タンパク質は1mLあたり5～10mg程度を推奨します。小さなリガンドは、1～10μmoles/mLを加えてください。

２必要量の CNBr 活性化セファロース 4B を秤量する。凍結乾燥した粉末を上記のように1mM HClで膨潤・洗浄する。

3リガンドを含むカップリング溶液とゲルを栓付き容器に入れ、混合する。室温で1時間、または4℃で一晩、混合物を端から端まで回転させる。その他の穏やかな攪拌方法を採用してもよい。マグネチックスターラーを使用しない。

4 過剰なリガンドを少なくとも5媒体のカップリングバッファーで洗い落とす。

5 残存する活性基をブロックする。培地を0.1 M Tris- HCl buffer, pH 8.0 または1 M ethanolamine, pH 8.0 に移し替える。2時間静置する。

6 少なくとも3サイクルの交互pHで培地を洗浄する。各バッファーで少なくとも5培地量を洗浄する。各サイクルは、0.1M酢酸/酢酸ナトリウム、pH4.0、0.5M NaClでの洗浄と、0.1M Tris-HCl、pH8、0.5M NaClでの洗浄で構成されている必要がある。

結合は通常、pH5.5-8.5の範囲で起こる。この範囲の上限で結合が最も強くなることが多い。

開始緩衝液の選択は、キレート金属イオンの特性とサンプル分子の結合特性によって異なります。酢酸ナトリウムとリン酸ナトリウムが推奨される緩衝液です。

EDTAやクエン酸のようなキレート剤はバッファーに含まれるべきではありません。

最も一般的に使用される緩衝液は

0.01-0.02Mリン酸ナトリウム

0.05M酢酸ナトリウム

イオン交換効果をなくすために、0.15～0.5MのNaClなどの塩をバッファーに含めることが一般的です。

一般的に、キレートセファロースファーストフローに結合特性が不明なタンパク質を結合させる場合、初期実験ではZn2tと0.15-0.5M NaClを含む中性リン酸または酢酸バッファーを使用することが推奨されます。

通常、緩衝液中の界面活性剤の存在は、タンパク質の吸着に影響を及ぼさない。

タンパク質が吸着されると、キレート金属イオンの部分的な変位がしばしば認められる。これは、特にCu2tのような着色した金属イオン溶液を使用した場合、キレート化イオンのゾーンが下方に伸びることで確認することができる。

IV 遠心分離またはグラビティフローによるヒスチジンタグ融合タンパク質の精製。

ニッケルイオンで荷電したキレート化セファロースファストフローは、ヒスチジンタグを持つタンパク質を選択的に保持する。ヒスチジンタグ付きタンパク質は、イミダゾールを含むバッファーを用いて溶出される。

以下のプロトコルは、ヒスチジンタグ付き融合タンパク質をキレートセファロースファストフローに最大限結合させ、完全に溶出させるために設計されています。結合や溶出に必要な正確な条件が不明な場合に有効です。

最高の純度を得るためには、サンプルのロードと溶出の際のイミダゾールの最適濃度を決定する必要があります。最適濃度は、10mMから500mMまでの段階的なイミダゾールのグラジエントで融合タンパク質を溶出し、各フラクションをSDS-PAGEで融合タンパク質と不純物の存在をテストすることで決定することができます。

ヒスチジンタグ付き難溶性タンパク質（封入体として発現した融合タンパク質）の精製には、変性条件を必要とするため、8M尿素または6M塩酸グアニジンまでのバッファーを使用できます。

を使用することで、不溶性タンパク質を可溶化することができます。

サンプル調製

リコンビナントヒスチジンタグクローンの増殖、誘導、細胞溶解の最適条件については、製造元のプロトコルを参照してください。

サンプルは完全に溶解している必要があります。目詰まりを防ぐため、0.45 μmのフィルターでろ過し、細胞の破片やその他の微粒子を除去することをお勧めします。

試料が0.5M NaCl pHを含む20mMリン酸塩緩衝液以外の緩衝液に溶解している場合。7.4以外の緩衝液に溶解した場合は、pH7-8に調整する必要があります。HiTrap DesaltingカラムまたはPD-10カラム（Sephadex G-25）を用いてバッファー交換を行うことにより、調整することができます。

キレート型Sepharose Fast Flowの調製法

キレート化セファロースファストフローは、20%エタノールで約75%スラリーとして供給されます。以下の手順で、キレート化セファロースファストフローの50%スラリーにニッケルがチャージされます。

ニッケル

ゲルを洗浄する。

1. キレート化セファロース・ファーストフローの容器を軽く振って、ゲルを再懸濁させる。

2. ピペットを用いて、ヒスチジンタグを結合させるのに十分な量のスラリーを除去し、適切な容器／チューブに移し替える。Chelating Sepharose Fast Flowの結合容量は、5 mg histidine-tagged protein/ml gelである。

3. 500×g、2～5分間の遠心分離によりゲルを沈降させる。

4. 上清を注意深くデカンテーションし、廃棄する。

5. ゲル容量分の蒸留水を加え、ゲルが完全に再懸濁するまで振り混ぜる（例えば、端から端まで回転させて 5 分間）。マグネチックスターラーを使用しないでください。

6. 500×g、2～5分間遠心分離してゲルを再沈殿させる。

7. 上清を注意深くデカンテーションし、廃棄する。

ゲルをチャージする。

1. 0.5 ゲル容量の 0.1 M NiSO4 溶液を加え、ゲルが完全に再懸濁するまで振とうする（例えば、端から端まで回転させて 5 分間）。

2. 500 x gで2～5分間遠心分離し、ゲルを再沈殿させる。

3. 上清を注意深くデカンテーションし、廃棄する。

ゲルを洗浄する。

1. ゲル容量分の蒸留水を加え、端から端まで回転させながら 5 分間攪拌する。

2. 500×gで2～5分間遠心分離し、ゲルを再沈殿させる。

3. 上清を注意深くデカンテーションし、廃棄する。

4. 洗浄ステップをさらに 2 回繰り返す（総洗浄量 3 回×5 ゲル分の蒸留水）。

5.ゲルを1ゲル容量のキレート化セファロースファストフロー開始バッファー（例：20 mM NazHPO4, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole pH 7.4）に再懸濁する。

グラビティ・フロー・カラムを用いたヒスチジンタグ付きタンパク質の精製。

例えば、空のPD-10カラム（Code No.17-0435-01）を用意する。

1. カラムの底にフィルターをセットする。

2. カラムに水を加えてフィルター内の空気を抜き、フローを開始する。(このとき、カラムの底からバキュームをかけ、フィルターを濡らす必要がある場合があります）。

3. 底蓋をし、カラム内に残っている水を捨てる。(PD-10カラムの容量は13mlです。

ゲルの推奨容量は最大2mlです。2mlを推奨し、取り扱いを容易にする。）

サンプルの結合

準備したPD-10カラム（底にフィルターを入れ、底のキャップをした状態）にゲルを注入する。

試料を加え、スパチュラで軽く攪拌し、室温で5～30分インキュベートする（時々軽く攪拌する）、またはカラムを上蓋で密閉し、エンド・エンド・ローテーションなど軽く攪拌し、室温で5～30分インキュベートする。結合速度はタンパク質とサンプル濃度に依存します。

2. 下部のキャップを開け、流出物をチューブに回収し、SDS-PAGE などのさらなる分析に使用する。

ゲルを洗浄する。

1.5ゲル分のStart Bufferを注意深く加える。SDS-PAGEなどのさらなる解析のために、洗浄液をチューブに回収する。

2. 洗浄ステップをさらに2回繰り返す（合計3回×5ゲル量のStart Bufferを洗浄する）。洗浄液を別のチューブに保存し、解析に使用する。

溶出。

1. ボトムキャップをする。2ゲル容量のElution buffer（20mM Na₂HPO₄, 0.5M NaCl, 0.5M imidazole PH 7.4）を加え、穏やかに混合し、-5分間インキュベートする。底面のキャップを開け、溶出液をチューブに回収する。

2. 溶出操作をさらに 4 回繰り返す（合計 5 回の溶出×2 ゲル分の Elution Buffer）。溶出液は、280nm の吸光度測定、SDS-PAGE、ELISA、Western Blotting などの分析用に別のチューブに保存しておく。

目的成分の入ったチューブをプールする。

注：500 mM イミダゾールは A280 =0.5 (5 mm cell)である。溶出液はブランクとして使用する。イミダゾールを除去する必要がある場合は、HiTrap Desalting または Pre-packed PD-10 column (Sephadex G-25)をご使用ください。