

アフィニティゲル担体 Q&A

His-tag タンパク質精製

質問	回答
Q. 試料の粘性が高い	<ul style="list-style-type: none">・試料中にDNAが共存している可能性があります。サンプル破碎時の超音波処理を長くして下さい。・試料を希釈してからカラムに添加する、あるいは、バッチ法で精製して下さい。
Q. 低濃度の試料から精製したい	<ul style="list-style-type: none">・精製の前に、サンプルを濃縮して下さい。・ゲルと試料との結合反応をバッチ法で行い、結合反応後のゲルをカラムに充填して、精製を行って下さい。
Q. His-tagタンパク質がゲルに結合しない	<ul style="list-style-type: none">・His-tagが分解している可能性があります。4°Cで精製を行う、あるいはプロテアーゼインヒビターを添加して精製を行って下さい。・His-tagが表面に露出していない可能性があります。変性条件下で精製する、あるいは別の領域にHis-tagを導入して下さい。・バッファーとpHが適切なものであるかを確認して下さい。イミダゾール存在下で結合反応を行っている場合は、イミダゾールの濃度を下げるか、イミダゾールを含まない条件で行って下さい。
Q. ゲルに結合するタンパク質量が少ない	<ul style="list-style-type: none">・カラムの結合容量を超えている場合、結合率が低下します。アプライ量を減らして下さい。・ゲルの再生処理を行わずに繰り返し使用すると、結合容量が低下してきます。製品添付のプロトコールに従って、ゲルの再生処理を行ってから使用して下さい。還元剤やキレート剤の使用は避けて下さい。・流速が速すぎると、収率が低下します。流速を下げるか、バッチで結合反応をおこなうことで、収量が改善します。・カラムに不均一にゲルが充填されていると、隙間が生じ、試料がその隙間を通過してしまう場合があります。ゲルを充填し直して下さい。 <p>注) 変性条件下で精製すると、結合量が飛躍的に向上する場合があります。</p> <ul style="list-style-type: none">・His-tagタンパク質が菌体内で封入体を形成する場合があります。その場合には、変性条件下で精製を行って下さい。

アフィニティゲル担体 Q&A

His-tag タンパク質精製

質問	回答
Q. 溶出後の純度が低い	<ul style="list-style-type: none">・洗浄バッファーの量を増やす、あるいはカラムの平衡化と洗浄時にバッファーに低濃度(5~10 mM)のイミダゾールを添加して下さい。・結合バッファーにNaClを添加あるいは濃度を上げて下さい。・結合バッファーに低濃度の非イオン性界面活性剤を添加して下さい。・結合バッファーに少量のエチレングリコールあるいはグリセロールを添加して下さい。・結合バッファーに低濃度の低濃度(5~10 mM)のイミダゾールを添加して下さい。 <p>注) 競合阻害が起こるため、20mM以上のイミダゾールの使用は推奨しません。</p> <ul style="list-style-type: none">・カラムサイズを小さくすると、His-tagタンパク質の選択性が向上する場合があります。・LOW DENSITY TEST KITを試してみる、あるいはNiよりも選択性の高いCoを試してみてください。
Q. 溶出液のタンパク質量が少ない	<ul style="list-style-type: none">・溶出バッファーのイミダゾール濃度を高くする、あるいはpHを低くする。可能であれば、溶出時の温度を高くする。・キレート金属との結合が強すぎる場合があります。溶出バッファーにEDTAを添加して下さい。・イミダゾール存在下、pH4.0で溶出して下さい。・溶出時の流速を下げる、または溶出をバッチ法で行って下さい。
Q. His-tagタンパク質の溶出プロファイルの再現性が悪い	<ul style="list-style-type: none">・His-tagが分解している可能性があります。4°Cで精製を行う、あるいはプロテアーゼインヒビターを添加して精製を行って下さい。・ゲル中に付着したタンパク質や脂質などの沈殿物を取り除くため、ゲルの再生処理を行って下さい。

アフィニティゲル担体 Q&A

His-tag タンパク質精製

質問	回答
Q. ABTゲル担体の結合容量は、Ni-NTAと違いはありますか？	<p>・アプリケーションデータ No. A005 では、ライゼート中の His-tag タンパク質の濃度が 0.5 mg/mL となっています。コメントにも記載していますが、結合の検討実験では、10 mg of His-tagged 8 kDa protein/mL gel となるようにライゼートをゲルに添加しています。即ち、1 mL の Ni-resin を使用すれば、20 mL のライゼートを反応させることになります。実際には、ライゼートを結合バッファにて2倍希釈後にレジンを添加していますので、40 mL ライゼート(2倍希釈)/1 mL resin で反応させたのちに、洗浄・溶出を行っています。</p> <p>・アプリケーションデータ No. A005 で使用した His-tag タンパク質は分子量が 8000 と非常に小さいタンパク質ですので、もし BSA のような 8 倍くらいの大きさの His-tag タンパク質を精製すると、80 mg/mL resin の結合容量で精製品を得られる計算になります。実際には不純物等の存在ならびに、目的タンパク質の高次構造も影響しますので、必ずしもこのような数字で精製品が得られるかどうかは疑問の余地があります。また、弊社では、さらに 1.5 倍量の His-tag タンパク質、15 mg/mL resin で反応させましたが、15 mg/mL resin が飽和結合量と判断しました。同時に評価したNi-NTAもほぼ同じ結合量を示しました。この場合、ABT の HIGH Density NICKEL resin の方がNi-NTA よりも不純物の少ない His-tag タンパク質が得られました。以上の結果から、ABT の HIGH Density NICKEL resin と Ni-NTA ではほぼ同様の結合量であると考えられます。</p>