

ESPERIENZA 10



CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

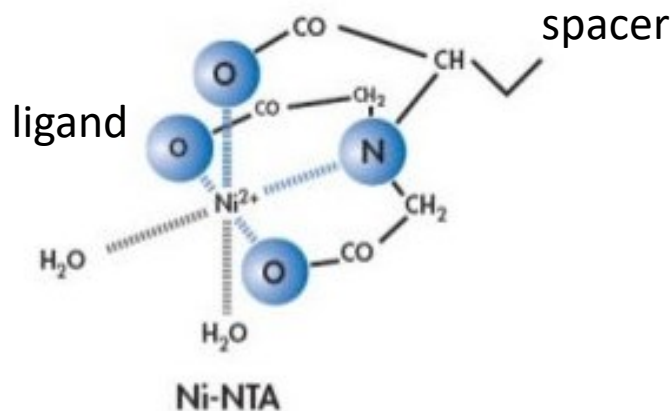
Separazione della proteina verde fluorescente (GFP)
contrassegnata da His-tag

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

RESINA

Informazioni sul prodotto

The term Ni-NTA (Nickel NTA) refers to a nickel 2^+ ion that has been coupled to Nitrilotriacetic acid (NTA). Ni-NTA can then be coupled to agarose resin. This is a purification method to obtain functional His-tagged protein.



10 mL € 157,00

LA FASE STAZIONARIA

La fase stazionaria preferita per la purificazione delle proteine è costituita da gel di agarosio porosi.

Vantaggi:

- facilmente utilizzabile per riempire e "impaccare" colonne di affinità con letti di resina di qualsiasi dimensione
- abbastanza grande da consentire alle biomolecole (proteine, ecc.) di fluire liberamente all'interno e attraverso le sferette di resina
- I ligandi sono attaccati in modo covalente alla resina (superfici esterne e interne) con varie metodologie
- L'agarosio in sferette è utile per le applicazioni di routine in quanto consente una facile configurazione, rendendolo adatto per procedure a flusso per gravità, centrifugazione a bassa velocità e separazioni a bassa pressione

Features

- One-step purification from crude lysate to > 95 % pure protein
- High binding affinity and high capacity
- Choice of purification under native or denaturing conditions
- Precharged, ready-to-use matrices for any scale of purification
- Automated purification and assay protocols

Product Details

Ni-NTA Agarose is an affinity chromatography matrix for purifying recombinant proteins carrying a His tag. Histidine residues in the His tag bind to the vacant positions in the coordination sphere of the immobilized nickel ions with high specificity and affinity. Cleared cell lysates are loaded onto the matrices. His-tagged proteins are bound, and other proteins pass through the matrix. After washing, His-tagged proteins are eluted in buffer under native or denaturing conditions.

Performance

Ni-NTA Agarose provides Ni-NTA coupled to a Sepharose CL-6B support and offers high binding capacity and minimal nonspecific binding. This material has excellent handling properties for most scales of batch and column purification. Ni-NTA Agarose is available separately or as a component of QIAexpress Kits, which are complete kits for efficient expression and purification of His-tagged proteins from *E. coli* .

IL DISTANZIATORE

Il distanziatore di una sferetta di resina di affinità può variare in dimensioni e lunghezza. Resine con catene spaziatrici più lunghe hanno una mobilità maggiore e sono quindi cruciali per i tag con impedimento sterico.

Table 2: Overview of different spacers for affinity beads.

Chemical	Chain length
Cyanogen bromide	C1
Epoxide	C3
Epoxide with C6 acid	C10
Diamin	C10

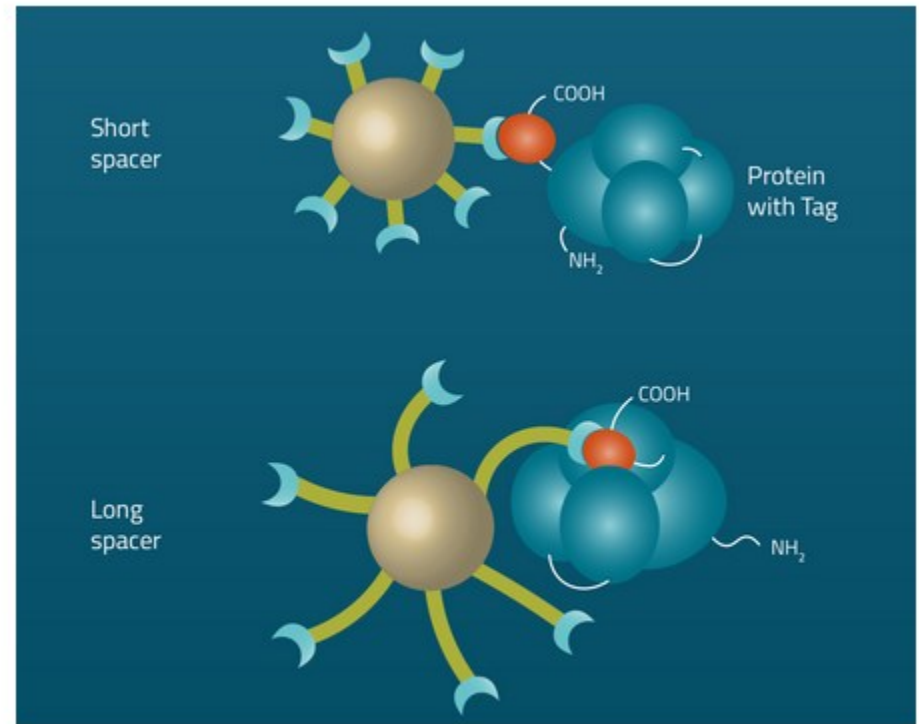
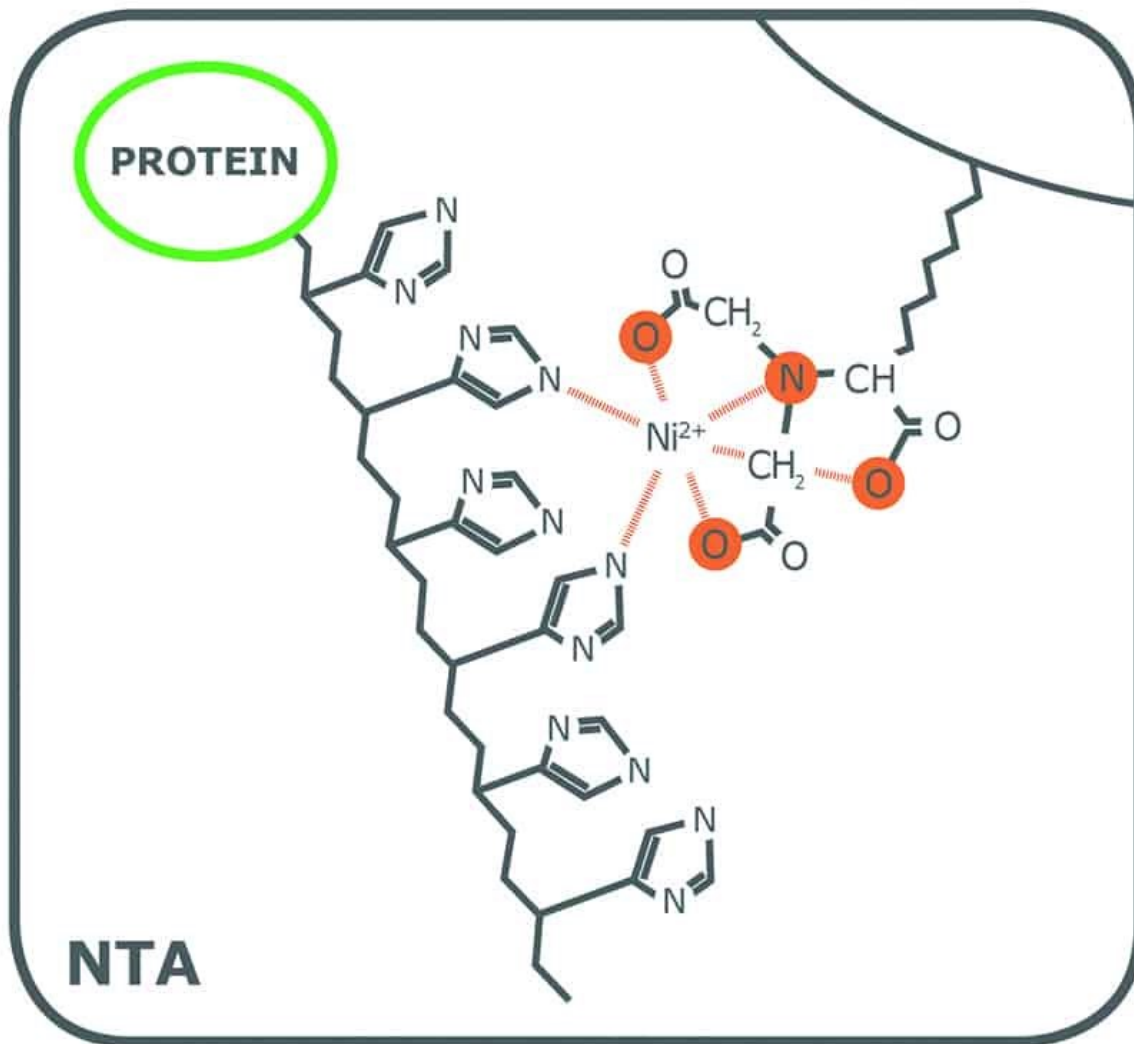


Fig. 2: A functionalized bead



CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ PER UNA MOLECOLA CON TAG

Tag di affinità: tipicamente un peptide o una sequenza proteica che può essere aggiunta alla proteina di interesse a livello di DNA. Una volta dotato di un opportuno tag di affinità, il gene di interesse viene espresso e la proteina ricombinante trasporta i rispettivi amminoacidi aggiuntivi. Le resine o le matrici per cromatografia di affinità sono tipicamente sfere di agarosio o sfere di agarosio magnetico che sono accoppiate in modo covalente a una molecola che si lega specificamente al tag di affinità. C'è una grande varietà chimica dei partner tag-resina e dei tipi di interazione.

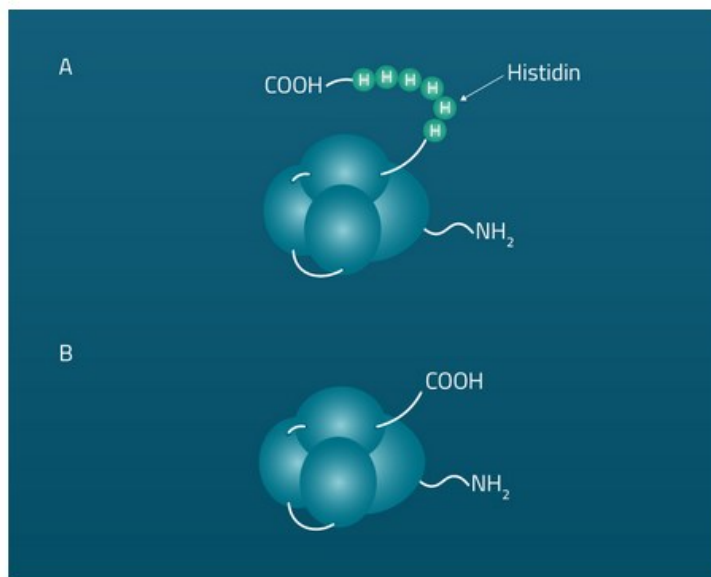
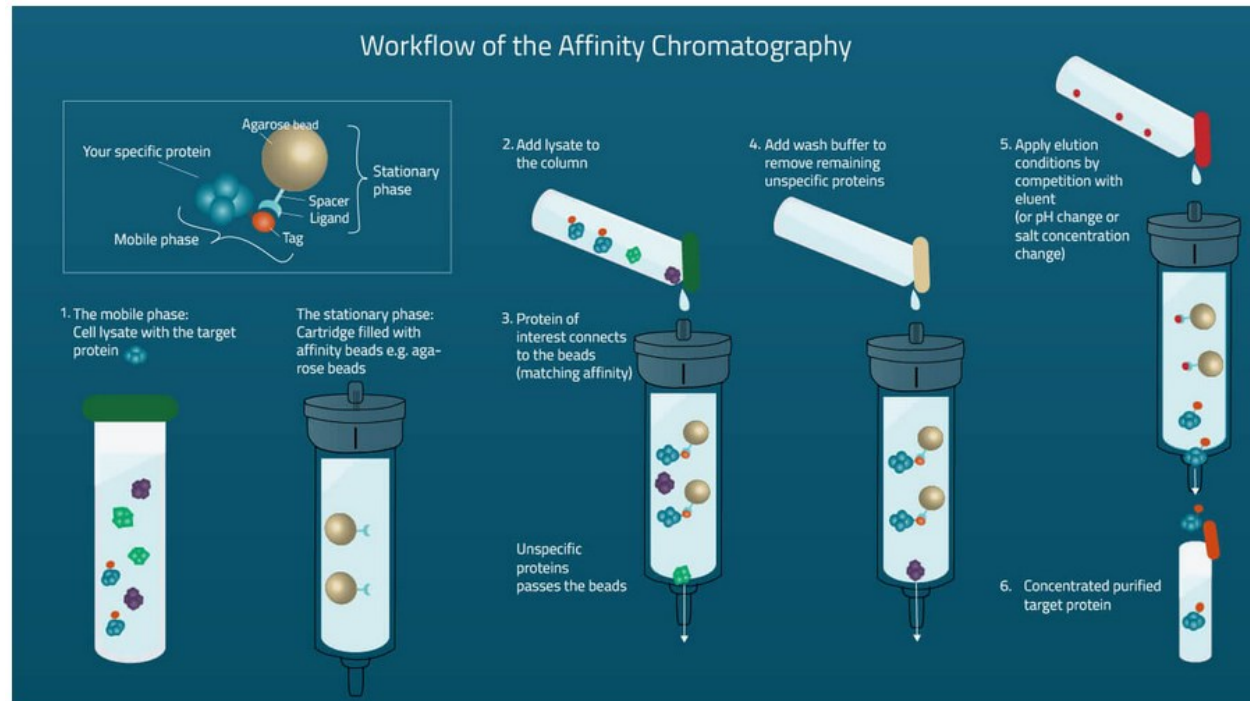


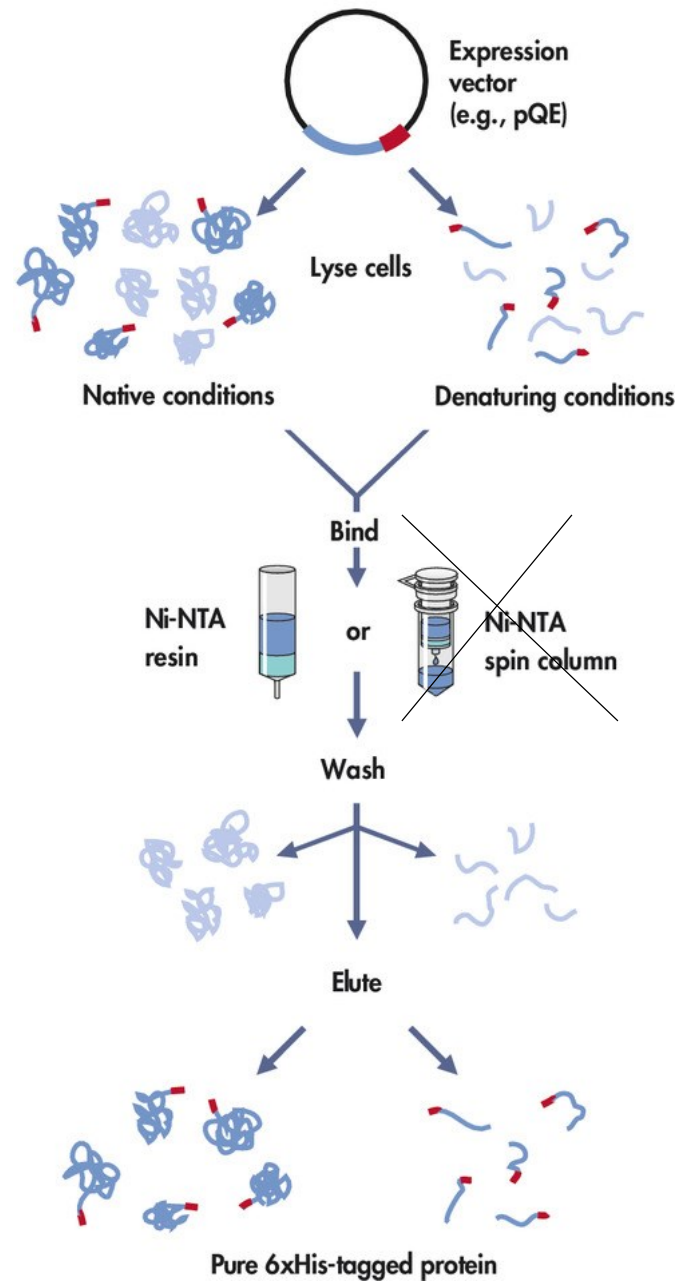
Fig. 3: A protein with a 6xHis-tag (A) and the native protein without the tag (B).

FLUSSO DI LAVORO DI UNA CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ SU COLONNA



- 1: Le due fasi di una cromatografia di affinità: la fase mobile e quella stazionaria.
- 2: Primo passaggio: aggiungi il lisato cellulare alla colonna.
- 3: La proteina di interesse interagirà con le sferette di resina per affinità con il ligando
- 4: Aggiungere il tampone di lavaggio e rimuovere le proteine non specifiche e altre sostanze.
- 5: Eluire la proteina di interesse dalle sferette di affinità con un tampone di eluizione cambiando il pH o la concentrazione di sale rispetto al tampone di lavaggio.
- 6: Viene raccolta la proteina di interesse purificata e attiva!

Protein Purification with the Ni-NTA Protein Purification System



LEGA – LAVA - ELUISCI: i tre passaggi della purificazione per affinità

La maggior parte dei protocolli di purificazione per affinità segue gli stessi tre passaggi:

1. Legame: Una soluzione complessa contenente la proteina marcata viene applicata alla colonna e si lega in base all'interazione tag di affinità – matrice
2. Lavaggio: Altre proteine che si legano in modo non specifico vengono lavate via con opportuni tamponi
3. Eluizione: La proteina legata in modo specifico viene eluita dalla colonna, tipicamente mediante legame competitivo di una molecola simile (ad esempio istidina e imidazolo), tagliando il tag con una proteasi, o destabilizzando l'interazione tag di affinità - matrice ad es. con cambiando il pH

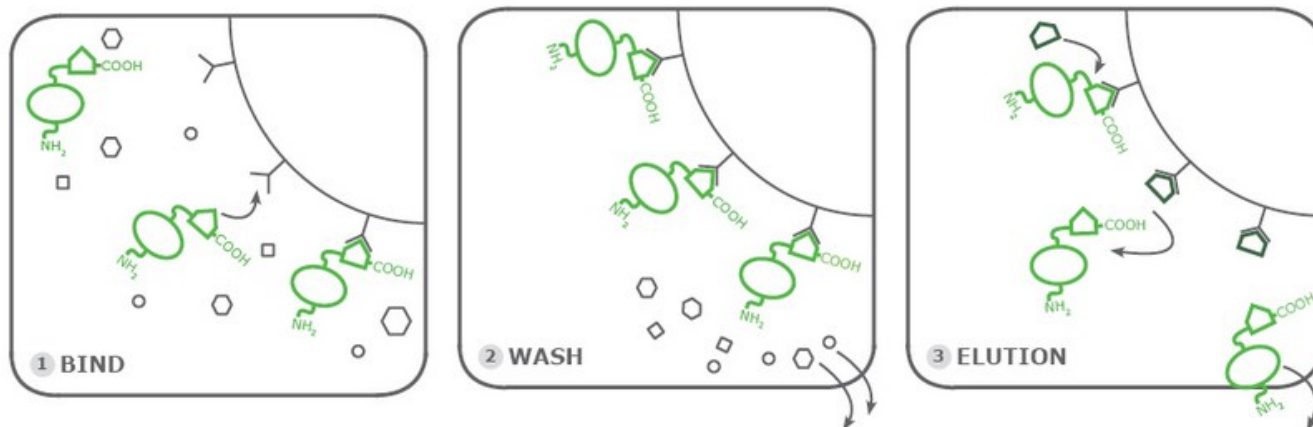


Fig. 4: Bind-wash-elute principle exemplified by an antibody-based affinity matrix (e.g. Rho1D4)

APPLICAZIONI DELLA CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

Colonnine a goccia

Con le colonne gocciolanti si può lavorare direttamente al banco di laboratorio. Sono piccole colonne di plastica usa e getta riempite con resina di affinità per cromatografia. A differenza del metodo FPLC, non è possibile controllare la pressione e la portata. Ma è un metodo molto più economico.

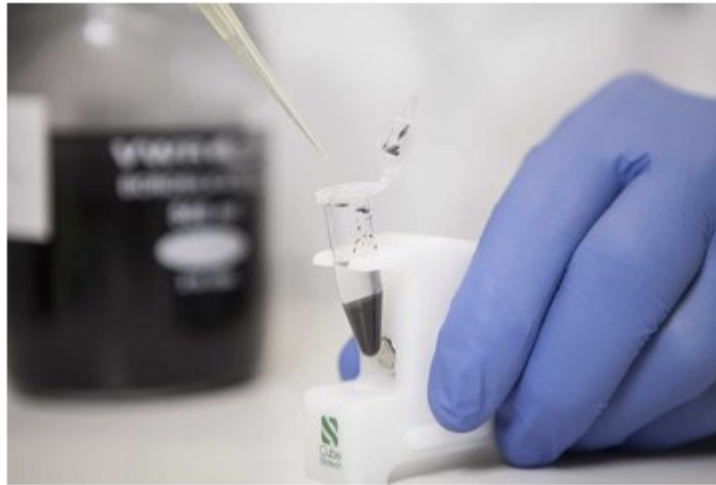


Fig. 8: A drip column filled with our INDIGO agarose. The agarose filled in this columns have big diameters to prevent the column from clogging.

APPLICAZIONI DELLA CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

Sferette magnetiche

I ligandi legati alle sferette di agarosio magnetizzate sono un modo veloce e intelligente per purificare le proteine. La proteina di interesse si lega al ligando sulle sferette magnetiche e viene separata dal resto delle molecole che non si sono legate mediante un separatore di sferette magnetiche che separa le sferette magnetiche con legate le proteine di interesse.



*Fig. 5: A tube with magnetic beads. Put your sample into the tube and mix well. Your protein of interest binds to the magnetic beads. With a **magbead separator** you can isolate your protein of interest from the rest of the sample.*

APPLICAZIONI DELLA CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

Fast protein liquid chromatography (FPLC)

FPLC è una cromatografia a media pressione utilizzata per la purificazione delle proteine tramite affinità.

Vantaggi della FPLC:

- La portata del tampone è controllata da una pompa volumetrica e la portata totale è mantenuta costante.
- I risultati sono riproducibili.
- La pressione utilizzata è tipicamente inferiore a 5 bar.

Lo svantaggio del metodo è che è necessario acquistare un sistema di cromatografia molto costoso.

APPLICAZIONI DELLA CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

Separazione con il metodo batch spin

Il metodo consiste nell'effettuare la separazione per affinità utilizzando una resina per affinità in una provetta adatta alla centrifugazione, invece di utilizzare una colonna. Ogni step (lavaggio resina, aggiunta tampone di legame, aggiunta campione, etc) viene seguito da una centrifugazione per eliminare l'eccesso di soluzione). È un metodo molto semplice per ottenere proteine purificate in poco tempo.



Fig. 7: This batch spin is done on ice to prevent protein denaturation.

Limitazioni della cromatografia di affinità

Accessibilità del tag:

l'interazione tra il tag della proteina e la matrice di purificazione è possibile solo se il **tag è accessibile** e non sepolto all'interno della proteina bersaglio. I **detergenti possono seppellire la sequenza del tag** e avere un effetto negativo sull'interazione tag/matrice. In molti casi, può essere d'aiuto spostare il tag all'altro capolinea della proteina, o anche a un anello accessibile all'interno della proteina. Se ciò non ha successo, la purificazione delle proteine tramite l'His-tag (ma non tramite altri tag) può essere eseguita anche in condizioni denaturanti, esponendo così il tag alla superficie della matrice.

Influenza del tag sull'espressione:

A seconda della proteina, i **tag possono interferire con i tassi di espressione, il ripiegamento e l'attività**. Questo effetto è piuttosto imprevedibile a meno che non siano già disponibili informazioni strutturali. Pertanto, può essere utile lo screening di tag e posizioni di tag diversi.

Discriminazione tra conformazioni proteiche/varianti di ripiegamento:

Le matrici di affinità purificano tutte le proteine che portano il tag di affinità, indipendentemente dalla corretta piegatura o conformazione. Per discriminare tra diverse conformazioni proteiche, multimeri, o per separare correttamente proteine piegate da proteine inattive, le matrici di purificazione specifiche per proteine (anticorpo o ligando specifico) sono un'utile alternativa o un metodo aggiuntivo.