

(90×210mm Size)

FUJIFILM

Wako

Code No. 145-09681 (10 mL, NET 5 mL)
141-09683 (100 mL, NET 50 mL)
149-09684 (2 mL, NET 1 mL)

for genetic research

Ni-NTA Agarose HP

Ni-NTA Agarose is designed for affinity purification of 6× His fusion protein. Nickel is used for a wide range of protein purification, because it has high affinity for 6× His fusion proteins. Ni-NTA Agarose consists of a metal ion and a chelate that is coated with 6% cross-linked agarose coupled to Ni^{2+} ions via a nitrilotriacetic acid (NTA) ligand. Therefore this product can be used for purification of denatured proteins. In addition, Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), is a method of liquid chromatography often used to purify mixtures of proteins. This product is available to these purifications also.

This product is for laboratory use only; use in any such application is the responsibility of users.

[Matrix] Highly cross-linked 6% agarose

[Ligand] Nitrilotriacetic acid (NTA)

[Metal ion capacity] $\geq 15 \mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{mL gel}$

[Bead size] 50~150 μm

[Storage buffer] 50% slurry in 20% ethanol

[Maximum total pressure] 0.6MPa

[Maximum liner flow rate] 1,800cm/h or 60 mL/min

[Recommended buffers]

For native conditions :

- Equilibration buffer : 50 mmol/L Sodium Dihydrogenphosphate, 300 mmol/L Sodium Chloride, 10 mmol/L Imidazole, pH 8.0
- Wash buffer : 50 mmol/L Sodium Dihydrogenphosphate, 300 mmol/L Sodium Chloride, 20 mmol/L Imidazole, pH 8.0
- Elution buffer : 50 mmol/L Sodium Dihydrogenphosphate, 300 mmol/L Sodium Chloride, 250 mmol/L Imidazole, pH 8.0

For denaturing conditions :

- Equilibration buffer : 50 mmol/L Sodium Dihydrogenphosphate, 300 mmol/L Sodium Chloride, 10 mmol/L Imidazole, 8 mol/L Urea, pH 8.0
- Wash buffer : 50 mmol/L Sodium Dihydrogenphosphate, 300 mmol/L Sodium Chloride, 20 mmol/L Imidazole, 8 mol/L Urea, pH 8.0
- Elution buffer : 50 mmol/L Sodium Dihydrogenphosphate, 300 mmol/L Sodium Chloride, 250 mmol/L Imidazole, 8 mol/L Urea, pH 8.0

Note : It is important to avoid agents such as EDTA or citrate in the above buffers.

- 1/6 -

[Protocol]

1. Procedure for batch purification of His-tagged proteins

1-A Resin equilibration

- 1) Thoroughly suspend Ni-NTA resin and immediately transfer an appropriate amount of Ni-NTA resin to a tube.
- 2) Centrifuge at $500 \times g$ for 5 minutes.
- 3) Remove the supernatant. Be careful not to aspirate the resin.
- 4) Add 10 resin-bed volumes of Equilibration buffer and suspend with a vortex mixer.
- 5) Centrifuge at $500 \times g$ for 5 minutes.
- 6) Remove the supernatant. Be careful not to aspirate the resin.

1-B Sample application

- 1) Add the prepared protein extract.
- 2) Incubate with rotation for 30~60 minutes.
- 3) Centrifuge at $500 \times g$ for 5 minutes.
- 4) Remove the supernatant. Be careful not to aspirate the resin.

1-C Washing

- 1) Add 10 resin-bed volumes of Wash buffer and suspend with a vortex mixer.
- 2) Centrifuge at $500 \times g$ for 5 minutes.
- 3) Remove the supernatant. Be careful not to aspirate the resin.
- 4) Repeat 1)~3) step 2 times.

1-D Elution

- 1) Elute the His-tagged proteins using a resin-bed volume of Elution Buffer.
- 2) Incubate with rotation for 10 minutes.
- 3) Centrifuge at $500 \times g$ for 5 minutes.
- 4) Transfer the supernatant into a new tube. Be careful not to aspirate the resin.
- 5) Repeat 1)~4) step 2 times.
- 6) Store the collected supernatant at 2~8 °C.

2. Procedure for gravity purification of His-tagged proteins

2-A Resin equilibration

- 1) Thoroughly suspend Ni-NTA resin. Immediately add an appropriate amount of the Ni-NTA resin to an appropriate column.
- 2) Remove the storage buffer up to the vicinity of the resin surface by gravity flow.
- 3) Add 5 resin-bed volumes of Equilibration buffer.
- 4) Remove Equilibration buffer up to the vicinity of the resin surface by gravity flow.
- 5) Repeat 3)~4) step 2 times.

2-B Sample application

- 1) Add the prepared protein extract.
- 2) Remove the sample buffer up to the vicinity of the resin surface by gravity flow as much as possible.

- 2/6 -

2-C Washing

- 1) Add 10 resin-bed volumes of Wash buffer to the resin.
- 2) Remove the Wash buffer up to the vicinity of the resin surface by gravity flow.
- 3) Repeat 1)~2) step 2 times.

2-D Elution

- 1) Add a resin-bed volume of Elution buffer and elute the His-tagged proteins by gravity flow.
- 2) Store the fraction on ice.
- 3) Repeat 1)~2) step 2 times.
- 4) Store the collected fraction at 2~8 °C.

[Compatibility of reagents]

Ni-NTA Agarose HP is compatible with the following compounds up to the concentrations given.

Reducing agents	30 mmol/L Reduced glutathione
	20 mmol/L β -Mercaptoethanol
	10 mmol/L DTT
	10 mmol/L DTE
	0.3% SDS
Denaturing agents	8 mol/L Urea
	6 mol/L Guanidine Hydrochloride
Detergents	2% Triton® X-100
	2% Tween® 20
Other additives	50% Glycerol
	1 mmol/L EDTA
	20% Ethanol

Triton is a registered trademark of Dow Chemical Company.
Tween is a registered trademark of ICI Americas, Inc.

[Storage]

2~10 °C

[Packages]

Code No.	Packaging
145-09681	10 mL (NET 5 mL)
141-09683	100 mL (NET 50 mL)
149-09684	2 mL (NET 1 mL)

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshimachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : +81-6-6203-3741
Facsimile : +81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation
1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : +1-804-271-7677
Facsimile : +1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH
Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : +49-2131-311-0
Facsimile : +49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

- 3/6 -

コード No. 145-09681 (10 mL, NET 5 mL)
141-09683 (100 mL, NET 50 mL)
149-09684 (2 mL, NET 1 mL)

遺伝子研究用

Ni-NTA アガロース HP

Ni-NTAアガロースは、6×ヒスチジン融合タンパク質をアフィニティー精製するために使用されます。ニッケルは多くの6×ヒスチジンタグ融合タンパク質に対して、高い結合性を有するため、タンパク質精製に広く使われています。Ni-NTAアガロースHPは、金属イオンとキレートで構成されており、6%高度架橋アガロースにニトリロ三酢酸(NTA)のリガンドを介してNi²⁺イオンが結合しています。さらに、現在では液体クロマトグラフィーの一種であるFast Protein Liquid Chromatography(FPLC)は、タンパク質混合液の精製によく使用されています。本品はこのようなアプリケーションにも使用できます。

[ゲルマトリックス] 6%高度架橋アガロース

[リガンド] ニトリロ三酢酸(NTA)

[ニッケル結合容量] ≥15 μmol Ni²⁺/mL gel

[ビーズサイズ] 50~150 μm

[保存液] 20%エタノールの50%懸濁液

[最大圧力] 0.6 MPa

[最大流速] 1,800 cm/h or 60 mL/min

[推奨バッファー]

非変性条件下:

- ・平衡化バッファー: 50 mmol/L Sodium Dihydrogenphosphate, 300 mmol/L Sodium Chloride, 10 mmol/L Imidazole, pH 8.0
- ・洗浄バッファー: 50 mmol/L Sodium Dihydrogenphosphate, 300 mmol/L Sodium Chloride, 20 mM Imidazole, pH 8.0
- ・溶出バッファー: 50 mmol/L Sodium Dihydrogenphosphate, 300 mmol/L Sodium Chloride, 250 mmol/L Imidazole, pH 8.0

変性条件下:

- ・平衡化バッファー: 50 mmol/L Sodium Dihydrogenphosphate, 300 mmol/L Sodium Chloride, 10 mmol/L Imidazole, 8 mol/L Urea, pH 8.0
- ・洗浄バッファー: 50 mmol/L Sodium Dihydrogenphosphate, 300 mmol/L Sodium Chloride, 20 mmol/L Imidazole, 8 mol/L Urea, pH 8.0
- ・溶出バッファー: 50 mmol/L Sodium Dihydrogenphosphate, 300 mmol/L Sodium Chloride, 250 mmol/L Imidazole, 8 mol/L Urea, pH 8.0

注意: EDTAやくえん酸を含まないバッファーを使用してください。

- 4/6 -

[プロトコール]

1. パッチ法によるヒスチジン融合タンパク質の精製

1-A レジンの平衡化

- 1) 本品を十分に懸濁し、速やかに適当な量をチューブへ移す。
- 2) $500 \times g$ で 5 分間遠心分離する。
- 3) レジンを吸い込まないように上清を除去する。
- 4) 平衡化バッファーをレジンの10倍量添加した後、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 5) $500 \times g$ で 5 分間遠心分離する。
- 6) レジンを吸い込まないように上清を除去する。

1-B サンプルの添加

- 1) タンパク質抽出液を添加する。
- 2) 30~60分間ローテーターなどで転倒混和する。
- 3) $500 \times g$ で 5 分間遠心分離する。
- 4) レジンを吸い込まないように上清を除去する。

1-C 洗浄

- 1) 洗浄バッファーをレジンの10倍量添加した後、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 2) $500 \times g$ で 5 分間遠心分離する。
- 3) レジンを吸い込まないように上清を除去する。
- 4) Step 1)~3) を 2 回繰り返す。

1-D 溶出

- 1) 溶出バッファーをレジンの等量添加する。
- 2) 10分間ローテーターなどで転倒混和する。
- 3) $500 \times g$ で 5 分間遠心分離する。
- 4) レジンを吸い込まないように上清を新しいチューブへ移す。
- 5) Step 1)~4) を 2 回繰り返す。
- 6) 回収した上清を $2\sim8^\circ\text{C}$ で保管する。

2. 自然落下法（オープンカラム）によるヒスチジン融合タンパク質の精製

2-A レジンの平衡化

- 1) 本品を十分に懸濁し、速やかに適当な量をカラムへ移す。
- 2) 自然落下により、保存液をレジンの表面近くまで排出する。
- 3) 平衡化バッファーをレジンの 5 倍量添加する。
- 4) 自然落下法により平衡化バッファーをカラムから除去する。
- 5) Step 3)~4) を 2 回繰り返す。

2-B サンプルの添加

- 1) タンパク質抽出液を添加する。
- 2) 自然落下により、サンプルの溶液を可能な限りレジン表面まで排出する。

2-C 洗浄

- 1) 洗浄バッファーをレジンの10倍量添加する。
- 2) 自然落下により、バッファーをレジン表面まで排出する。
- 3) Step 1)~2) を 2 回繰り返す。

2-D 溶出

- 1) 溶出バッファーをレジンの等量添加し、自然落下により、ヒスチジンタグ融合タンパク質を溶出させる。
- 2) 回収したフラクションを氷上で保管する。
- 3) ステップ 1)~2) を 2 回繰り返す。
- 4) 回収したフラクションを $2\sim8^\circ\text{C}$ で保管する。

[安定性]

本製品は下記溶液の記載濃度までは安定性かつ耐性があります。

還元剤	30 mmol/L Reduced glutathione
	20 mmol/L β -Mercaptoethanol
	10 mmol/L DTT
	10 mmol/L DTE
	0.3% SDS
変性剤	8 mol/L Urea
	6 mol/L Guanidine Hydrochloride
界面活性剤	2% Triton [®] X-100
	2% Tween [®] 20
他添加剤	50% Glycerol
	1 mmol/L EDTA
	20% Ethanol

Triton は Dow Chemical Company の登録商標です。

Tween は ICI Americas, Inc. の登録商標です。

[保管条件]

2~10°C

[容量]

コード No.	容量
145-09681	10 mL (NET 5 mL)
141-09683	100 mL (NET 50 mL)
149-09684	2 mL (NET 1 mL)

製造発売元

富士フィルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

1801KA1