

FUJIFILM

Wako

Code No. 143-09763 (10 mL, Net 5 mL)
141-09764 (100 mL, Net 50 mL)

for genetic research
Ni-NTA Agarose

Ni-NTA Agarose is designed for affinity purification of 6×His fusion protein. Ni-NTA Agarose consists of a metal ion and a chelate that is coated with 6% cross-linked agarose coupled to Ni²⁺ ions via a nitrilotriacetic acid (NTA) ligand. 6×Histidine tag binds to Ni²⁺ ions. Protein purification with Ni-NTA agarose is simple and this affinity purification is used for a wide range of proteins : soluble proteins, insoluble proteins, and membrane proteins.

[Matrix]	Cross-linked 6% agarose
[Ligand]	Nitrilotriacetic acid (NTA)
[Protein binding capacity]	> 50mg/mL gel*
[Bead size]	50 ~ 150 μm
[Storage buffer]	50% slurry in 30% ethanol

* Binding capacity is different from each target protein

[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.

[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×g for 5 minutes.
- 3) Remove the supernatant. Be careful not to aspirate the resin.

— 1/6 —

- 4) Add 10 resin-bed volumes of Equilibration buffer and suspend with a vortex mixer.
- 5) Centrifuge at 500×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×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×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×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-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.

— 2/6 —

- 3) Repeat 1) ~ 2) step 2 times.
 4) Store the collected fraction at 2 ~ 8°C.
 Note : If it is necessary to prepare a fresh sample, please run the protocol at 2-8°C.

【Compatibility of reagents】

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

	30 mmol/L Reduced glutathione
Reducing agents	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
	50% Glycerol
Other additives	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.	Packages
143-09763	10 mL (Net 5 mL)
141-09764	100 mL (Net 50 mL)

【Related products】

Code No.	Product Name	Packages
146-09731	Ni-NTA Cartridge	1 Cartridge (5 mL)
142-09733		1 Cartridge (5 mL) × 5
149-09684	Ni-NTA Agarose HP	2 mL (NET 1 mL)
145-09681		10 mL (NET 5 mL)
141-09683		100 mL (NET 50 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://fwwk.fujifilm.co.jp>

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

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

コード No. 143-09763 (10mL, Net 5mL)
 141-09764 (100mL, Net 50mL)

遺伝子研究用

Ni-NTA アガロース

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。金属イオンとキレートで構成されており、6% 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 Ni^{2+} イオンが結合しています。この Ni^{2+} イオンに 6 × ヒスチジンタグが結合します。簡便な方法でタンパク質の精製が可能であり、可溶性タンパク質、不溶性タンパク質、膜タンパク質など幅広いタンパク質の精製に利用されています。

【ゲルマトリックス】 6% 架橋アガロース

【リガンド】 ニトリロ三酢酸 (NTA)

【タンパク質結合容量】 > 50mg/mL gel*

【ビーズサイズ】 50-150 μm

【保存液】 30% エタノールの 50% 懸濁液

* タンパク質結合容量は、目的のタンパク質ごとに異なります。

【推奨バッファー】

非変性条件下 :

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

変性条件下 :

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

【プロトコール】

1. バ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×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、ボルテックミキサーで懸濁する。
- 5) 500×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×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×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×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 2～8℃ 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 2～8℃ で保管する。

注意：フレッシュなサンプルが必要な場合は、2～8℃ の条件下実験を行って下さい。

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

【貯 法】

2～10℃

【包 製】

コード No.	容 量
143-09763	10mL (Net 5mL)
141-09764	100mL (Net 50mL)

【関連製品】

コード No.	品 名	容 量
146-09731	Ni-NTA カートリッジ	1 本 (5mL)
142-09733		1 本 (5mL) × 5
149-09684	Ni-NTA アガロース HP	2mL (NET 1mL)
145-09681		10mL (NET 5mL)
141-09683		100mL (NET 50mL)

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

2304KA3