

## Ni Sepharose 6 Fast Flow クイックガイド

このクイックガイドは Ni Sepharose 6 Fast Flow のもつ高い結合容量に基づいた、これまでのバッチ精製法に比べ極めて短時間で目的タンパク質の精製が行えるプロトコール\*です。

\*サンプルに依存します。

### 推奨バッファー

バッファーA（結合バッファー）：50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20~40 mM\* imidazole, pH7.5

バッファーB（溶出バッファー）：50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH7.5

\*非特異的な結合を抑えるために結合バッファー中のイミダゾール濃度を 20~40 mM に上げます。

### スラリー溶液の調製

- 1) ゆるやかにボトルを振り担体を均一に懸濁した後、約 2.7 ml（75%スラリー）を遠心管に移します。
- 2) 500 x g で 5 分間遠心分離後、上清を捨てます。
- 3) 5 ml の超純水を加え、3 分間転倒混和します。
- 4) 2 および 3 の操作をバッファーA で繰り返します。
- 5) 上清を捨て、2 ml のバッファーA を加えて 50%スラリー溶液を調製します。

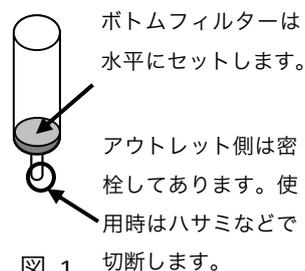
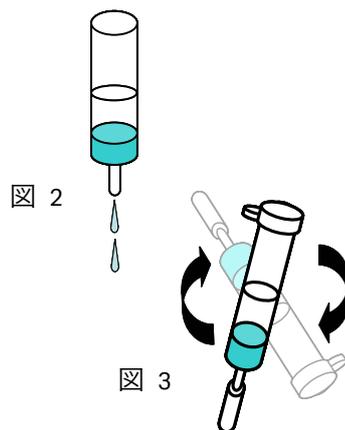


図 1

### PD-10 カラムの準備\*

- 6) ボトムフィルターを 20%エタノールで洗浄後、超純水で洗浄します。
- 7) PD-10 空カラムにボトムフィルターをセットします（図 1）。
- 8) 50%スラリー調製済み Ni Sepharose 6 Fast Flow 全量（担体量は 2 ml）を PD-10 カラムに移し、10 ml の結合バッファーで平衡化を行います（図 2）。  
\*カラムからの滴下が困難な場合、手袋をつけた親指でカラム頂部から下方に弱い圧力を加えると改善されます。
- 9) 担体が乾燥しないようにカラムアウトレット側にボトムキャップをします。  
\*本カラムは自然落下用空カラムです。



### サンプル添加・結合

- 10) PD-10 カラムに 5 ml のサンプルを添加し、カラムインレット側にトップキャップをします。
- 11) PD-10 カラムを 1 分間手で緩やかに転倒混和させ反応させます\*（図 3）。  
\*泡立てないように注意します。

### サンプル洗浄・溶出

- 12) カラムを垂直に固定した後、インレットおよびアウトレットのキャップを外し、自然落下で素通り画分を回収します。
- 13) 1 ml の結合バッファーでカラム内壁に付着した担体を洗い流し（3 回）、素通り画分を回収します。
- 14) さらに 10 ml の結合バッファーでカラムを洗浄し、素通り画分を回収します（各画分につき 0.5~1 ml 程度）。
- 15) 10 ml の溶出バッファーで溶出を行い、溶出画分を回収します（各画分につき 0.5~1 ml 程度）。

### サンプル画分の確認とバッファー交換

- 16) 各画分の A<sub>280</sub> を測定あるいは電気泳動により確認します。
- 17) HiTrap Desalting\*や PD-10\*カラムによりバッファー中のイミダゾール等を除去します。

\*HiTrap Desalting（17140801、5x5 ml）、PD-10（17085101、30 本）は本製品には付属していません。

### 目的タンパク質

\*本プロトコールは約 3 mg の GFP-(His)<sub>6</sub> を含むサンプル（5 ml）を使用しています。



Cytiva（サイティバ）  
グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社  
お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL：03-5331-9336 FAX：03-5331-9370

e-mail：Tech-JP@cytiva.com