

Purification d'une protéine étiquetée polyhistidine par chromatographie d'affinité pour cation métallique immobilisé (IMAC)

Application à la purification de his₆-EGFP (his₆-tagged Enhanced Green Fluorescent Protein) à partir de *E. coli* transformé par la construction pET15-EGFP

Une souche *E. coli* (BL21(DE3)pLys) a été transformée par la construction pET15-EGFP lors des séances de travaux pratiques de génie génétique. Des clones transformés ont été obtenus. On dispose d'une culture induite ayant produit de la his₆-EGFP. L'annexe 1 rappelle quelques caractéristiques de la GFP et de la EGFP et décrit précisément l'étiquette portée par la EGFP, une étiquette his₆ N-terminale plus site de coupure pour la thrombine.

1. Etape d'extraction (obtention de l'extrait brut)

1 1. Discussion

La EGFP étiquetée polyhistidine à purifier est hydrosoluble et intracellulaire (elle n'est pas sécrétée dans le milieu de production). Il va falloir sélectionner une méthode pour lyser les cellules et en extraire le contenu. On obtiendra ainsi un extrait brut contenant la protéine cible à l'état soluble.

(Remarque : l'expérience pratique montre qu'il n'y a manifestement pas beaucoup de corps d'inclusions avec E. coli (BL21(DE3)) transformé par pET-15-EGFP et induit.)

Il existe de nombreuses méthodes de lyse des cellules. Dans le cadre du travail proposé, avec des bactéries productrices *E. coli*, bactéries pourvues d'une paroi de type « Gram négative », la lyse par ultrasons a été choisie. Voir annexe 2.

Il faut se poser la question de la protection de la protéine à purifier après extraction. Voici 3 éléments de discussion :

- Le milieu intracellulaire est un milieu réducteur : un agent antioxydant (qui protégera les fonctions thiols libres) de type 2-mercaptoéthanol ou dithiothréitol est souvent le bienvenu lors de la purification de protéines intracellulaires.
- La présence de protéases peut être fatale pour la protéine à extraire. L'ajout d'inhibiteurs des protéases comme le PMSF est à considérer. Évidemment, on évitera l'ajout d'un complexant comme l'EDTA dans le cadre de la purification d'une protéine étiquetée polyhistidine. Le travail à 0-4°C est également une bonne façon de bloquer les protéases.
- Une protéine à purifier thermo-instable devra être purifiée à basse température (0-4°C)

Dans le cadre pratique qui nous intéresse, aucune précaution particulière n'est nécessaire. La centrifugation du lysat cellulaire obtenu après sonication permettra de récupérer un surnageant extrait brut directement utilisable pour la phase de purification par chromatographie IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography).

(Remarque : E. coli (BL21(DE3)) est déficiente en protéase lon ainsi qu'en protéase OmpT de la membrane externe.)

1.2 Mode opératoire

- 3 fois 50 mL de culture sont centrifugés 10 minutes à 4 000 g. Les 3 culots sont remis en suspension dans 10 mL final de tampon A (voir composition au § 2.2) en tube à centrifuger étroit de 15 mL. L'ensemble est réfrigéré par de la glace pilée fondante.
- Sonication avec le sonicateur Vibracell 72412 Bioblock 20 kHz. Programme de sonication : sonde de 6 mm, a priori 8 pulses à 20-25 W (39%) de 35 secondes entrecoupés d'un refroidissement à 0°C. Le port du casque « anti-bruit » est indispensable.
- Centrifugation du lysat 10 minutes à 5 000 à 10 000 g, filtration sur filtre de porosité 0,2 µm.
- Récupération du surnageant (= extrait brut, crude extract) et stockage à 0-4°C. Une fraction aliquote est préservée pour les analyses ultérieures (SDS-page, Western-blot, dosages protéiques ...)

1.3 Compte-rendu

- Rechercher le mode d'action du PMSF et de l'EDTA en tant qu'inhibiteur des protéases.
- Observations (EGFP dans le culot de débris ?).

2. Etapes de purification

2.1 Discussion

Purification sur colonne chargée d'une phase stationnaire greffée nickel-NTA (*nickel-nitrilotriacetic acid*) ou équivalent. Le principe de la chromatographie IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) mise en œuvre et certaines de ses limites sont présentés en annexe 3. Le pouvoir éluant du tampon d'éluion sera contrôlé en pilotant la concentration en imidazole.

2.2 Mode opératoire

- Utilisation de 2 chromatographes de la série AKTA® (Purifier et Explorer) dédiés à la séparation chromatographique des protéines à l'échelle du laboratoire. Avec des colonnes déjà conditionnées de volume 1 mL (1mL « pre-packed ») avec une phase stationnaire His Trap® FF de marque GE Healthcare. Voir aussi l'annexe 5.
- Tampons disponibles :
 - tampon A = tampon Tris-Cl 20 mM, NaCl 200 mM, pH 7,5 ;
 - tampon B = tampon Tris-Cl 20 mM, NaCl 200 mM, imidazole 500 mM, pH 7,5.
- Débit : 1 ml/min.
- Equilibration : n volumes de colonne, $n \geq 5$, en tampon à 0 (ou 20 ou 40) mM en imidazole.
- Injection : n' volumes de colonne, $n' \geq 0,5$ (500 μ L pour débiter par exemple, et on pourra aller à 5 mL pour les derniers essais)
- Suivi de chromatographie en continu = absorbance à 280 nm et à 488 nm (sur Akta-explorer).

Premier programme d'éluion

Eluer d'abord avec le seul tampon A (0% de B) et suivre la sortie des protéines non retenues. Lorsque le pic revient vers la ligne de base, passer à 100% de tampon B (palier brutal). Attendre l'éluion complète des protéines retenues. Enregistrer les résultats. Rééquilibrer la colonne en tampon A.

Programmes d'éluions ultérieurs

En fonction des résultats de ce premier « run », essayer d'optimiser la séparation de l'EGFP : en mode gradient, en tampon plus stringent dès le départ de la chromatographie L'observation de la colonne lors du premier « run » permet d'envisager un changement de volume de boucle d'injection ...

Collecte des fractions

Les fractions devront être soigneusement annotées et préservées pour les analyses ultérieures. Elles seront ultérieurement judicieusement regroupées.

Reconditionnement éventuel des colonnes

Cf document annexe 7.

2.3 Compte rendu

- Détail des programmes de chromatographie choisis et justification des choix.
- Résultats obtenus (graphes annotés et commentés).

3. Regroupement des fraction collectées

A l'issu du travail de purification, pour le groupe de TP :

- Rassembler les fractions EGP purifiée des manipulations les plus intéressantes , par exemple celles des « runs » avec injection à 5 mL (= p-EGFP). Mesurer le volume total. Mesurer l'absorbance à 280 nm et 488 nm. Conserver à 0-4°C.
- Rassembler les fractions « protéines non retenues » (PNR). Mesurer l'absorbance à 280 nm sur une dilution convenable (1/100 par exemple) et à 488 nm (pas de dilution nécessaire). Conserver à 0-4°C.
- Préserver quelques mL d'extrait brut (EB). Mesurer l'absorbance à 280 nm sur une dilution convenable (1/100 par exemple) et à 488 nm (pas de dilution nécessaire). Conserver à 0-4°C.

Puis consigner le tableau rempli suivant dans le **compte-rendu** :

(Notes. Une absorbance de 1 vers 280 nm correspond à un ordre de grandeur de concentration en protéines totales de 1 mg/mL (très variable en fonction des teneurs en acides aminés aromatiques). Le coefficient d'absorbance spécifique de la EGFP est de 61 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹, masse moléculaire his6-EGFP = 29111 Da).

Total des volumes d'EB (injectés) à l'origine de la p-EGFP (his ₆ -EGFP purifiée) collectée : Donc cela correspond à un volume de départ de milieu de culture de (150 mL de culture → 10 mL d'EB) :	
p-EGFP	Abs 280 nm p-EGFP : (attention au fond d'absorbance 280 nm des tampons très chargés en imidazole ... être critique !)
Volume total de p-EGFP (EGFP purifié) collecté :	Abs 488 nm p-EGFP :
	Calcul, [his ₆ -EGFP] de p-EGFP = mg/mL
EB	Dilution = Abs 280 nm =
milieu légèrement diffusif : oui/non	Calcul, [protéines totales EB] estimée vers : mg/mL
	Dilution = Abs 488 nm =
	Calcul [his ₆ -EGFP] de EB = mg/mL (être critique si le milieu est diffusif ...)
PNR	Dilution = Abs 280 nm =
milieu légèrement diffusif : oui/non	Calcul, [protéines totales EB] estimée vers : mg/mL
	Abs 488 nm
	Calcul [his ₆ -EGFP] de PNR = mg/mL (être critique si le milieu est diffusif ...)

4. Conditionnement de l'his₆-EGFP purifiée (finale-EGFP)

l'his₆-EGFP purifiée obtenue est en solution dans un tampon très chargé en imidazole. Il s'agit d'éliminer l'imidazole, de passer en tampon PBS et de concentrer vers 1 g/L en his₆-EGFP.

Ceci sera réalisé par diafiltration/ultrafiltration tangentielle. Voir document annexe 4.

Compte-rendu : consigner le volume total de solution his₆-EGFP finalement obtenue (=finale-EGFP), l'absorbance à 488 nm et la concentration déduite en his₆-EGFP.

5. Analyse des fractions collectées lors de la purification par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)

5.1 SDS-PAGE puis coloration des protéines totales

Analyse de EB, PNR et finale-EGFP par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, après dénaturation thermique en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol.

→ Solutions protomères acrylamide/bis-acrylamide 40%-37,5:1 ou 30%-29:1 disponibles. Un gel de séparation vers 12 à 15% devrait donner de bons résultats compte-tenu de la masse moléculaire de l'EGFP.

→ Marqueur de tailles disponible : par exemple, « Biorad Dual Color » = marqueur prêt à l'emploi en tampon de charge et à protéines colorées : 10, 15, 20 kDa en bleu, 25 kDa très intense en rouge, 37 kDa en bleu, 50 kDa très intense en bleu, 75 kDa très intense en rouge, 100, 150, 250 kDa en bleu.

→ Travailler selon les indications du document déjà utilisé en première année et intitulé « Manipulation d'initiation à l'électrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) » (fichier « tp_sdsbase.odt »). Voir aussi l'annexe 5.

→ Préparer les gels et l'ensemble des montages d'électrophorèse.

→ Préparer les échantillons à analyser : EB, EB dilué au 1/10, PNR, PNR au 1/10, finale-EGFP. Dénaturation à 100°C en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol en tampon de charge 5x. (Attention à bien homogénéiser le tampon 5x après décongélation. Anticiper les problèmes d'évaporation à l'ébullition !). Déposer en puits sous des volumes de 10 µL.

→ Après l'étape de migration électrophorétique, les gels sont d'abord rapidement observés sous éclairage bleu + filtre orange puis fixés et colorés au bleu de Coomassie. (Photographier). Travailler selon les indications du document « Manipulation d'initiation à l'électrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) ».

5.2 PAGE en conditions natives

En gel de polyacrylamide sans SDS. Pas de dénaturation des échantillons ! Comme la EGFP possède un pI à 5,8, on peut travailler avec un gel de concentration classique à pH 6,8 (cf SDS-PAGE mais sans SDS !). Un gel de séparation vers 6% et à pH 8,8 doit donner de bons résultats (cf SDS-PAGE mais sans SDS !). Le tampon d'électrode sera évidemment du RB pH 8,3 classique de SDS-PAGE (pour l'effet discontinu/concentration ...). Attention le tampon de charge ne devra contenir ni SDS ni 2-mercaptoéthanol. Voir document annexe 5 pour des données techniques. Déposer EB, EB dilué au 1/10, PNR, PNR au 1/10, final-EGFP. Après l'étape de migration électrophorétique, les gels sont d'abord observés et photographiés sous éclairage bleu + filtre orange puis fixés et colorés au bleu de Coomassie et à nouveau photographiés. Les 2 photographies, ramenées à la même échelle seront alors superposées.

5.3 SDS-PAGE puis révélation par Western blot

Voir le polycopié de travaux pratiques dédié : « tp-westernblot.odt ».

5.4 Compte rendu

- Cf. polycopié de travaux pratiques dédié : « tp-westernblot.odt ».
- Résultats obtenus commentés, conclusions.

6. Fluorescence de la solution EGFP purifiée

Spectre d'absorption puis spectres de fluorescence - émission et excitation - sur la solution his₆-EGFP purifiée.
Compte-rendu : mode opératoire, spectres annotés, conclusions.

7. Fin d'analyse de la purification par mesures de concentrations en protéines

7.1 Mesures spécifiques de concentration en his₆-EGFP par l'absorbance à 488 nm

Cf. travail réalisé aux § 3 et 4.

7.2 Mesures de protéines totales

Il est important d'avoir à l'esprit que la solution purifiée de his₆-EGFP après IMAC (p-EGFP) est très chargée en imidazole ! Un interférant possible pour de nombreuses méthodes de dosage des protéines (l'imidazole présente un fond d'absorbance à 280nm et est un interférant de la méthode BCA, ...). Ne pas oublier aussi que le tampon de base de l'IMAC était à base de Tris, un autre interférant possible. Une recherche à ce sujet est conseillée.

On utilisera les estimations issues des mesures à 280 nm pour mettre finalement en œuvre un dosage par la méthode du biuret (insensible à la composition particulière en amino-acides des protéines mesurées mais qui exige des concentrations au delà de 1g/L). La méthode au biuret est décrite dans le document de première année intitulé « Dosage des protéines par la méthode dite du biuret » (fichier tp-modopbiuret.odt). Mais le dosage sera adapté en plaque 96 puits (200 µL de réactif de Gornall par tube réactionnel, voir annexe 6).

le lecteur de plaques utilisé permet une lecture à 570 nm.

Remarque importante : il sera intéressant de montrer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser un témoin de compensation échantillon pour la solution finale-EGFP en observant le spectre d'absorption réalisé au §6.

7.3 Compte rendu :

- Détails opératoires des manipulations réalisées
- Résultats obtenus commentés.
- Pureté, enrichissement, quantité d'his₆-EGFP finalement obtenue par L de culture bactérienne...

8. Conclusion générale

En 3 ou 4 lignes en fin de compte-rendu.

Remerciements, bibliographie, liens internet

- Remerciements à Xavier Santarelli qui a proposé la manipulation de purification pour les élèves de STS Biotechnologies dans le cadre de la convention ENSTBB (Ecole Nationale Supérieure de Technologie des Biomolécules de Bordeaux) Lycée St-Louis Bordeaux. Remerciements à W. Dieryck et A.M. Noubhani qui ont fourni le matériel de construction de pET15-EGFP et la souche bactérienne receveuse.
- Poster "Cloning, expression and two-step purification of recombinant His-tag Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) over-expressed in *E.coli*" ; W. Dieryck , A.M. Noubhani, D. Coulon and X. Santarelli, (*ENSTBB*)

– http://www.biotek.com/products/tech_res_detail.php?id=55
<http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/fpintro.html>

et

Annexe 1. A propos de la EGFP et de pET-15-EGFP

GFP originally comes from the jellyfish *Aequorea victoria*.

238 amino acids. Molecular weight 27 kDa. GFP fluoresces green when exposed to U.V. light (excitation 395 nm, emission 475 nm). The fluorophore is internal and consists of cyclisation of the sequence Phe₆₄-Ser-Tyr-Gly-Val-Gn₆₉. GFP exposes many hydrophobic amino acids residues.

The fluorescence properties of GFP have been changed by genetic engineering leading to several mutants, especially EGFP (Enhanced GFP, fluorophore = Leu₆₄-Thr-Tyr-Gly-Val-Gn₆₉) which have red-shifted excitation spectra (maximal excitation peak at 488 nm) and fluoresces (at 509 nm) 35 more brightly than wild-type GFP. EGFP extinction coefficient at 488 nm = 61 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹

pET15-EGFP = MGSSHHHHHSSGLVPRGSH MVSKGEELFT GVPVILVELD GDVNGHKFSV SGEGEDATY GKLTLLKFICT
 TGKLPVPWPT LVTTLTYGVQ CFSRYPDHMK QHDFKFSAMP EGYVQERTIF FKDDGNYKTR AEVKFEGDTL VNRIELKID FKEDGNILGH
 KLEYNYNSHN VYIMADKQKN GIKVNFKIRH NIEDGSVQLA DHYQQNTPIG DGPVLLPDNH YLSTQSALS KDPNEKRDMV LLEFVTAAGI
 TLGMDELYK ; 20+239 = 259 aa : **29,11 kda** ; **pi calculé = 5,83**.

LVPR↓GS = THROMBIN CLEAVAGE SITE SEQUENCE

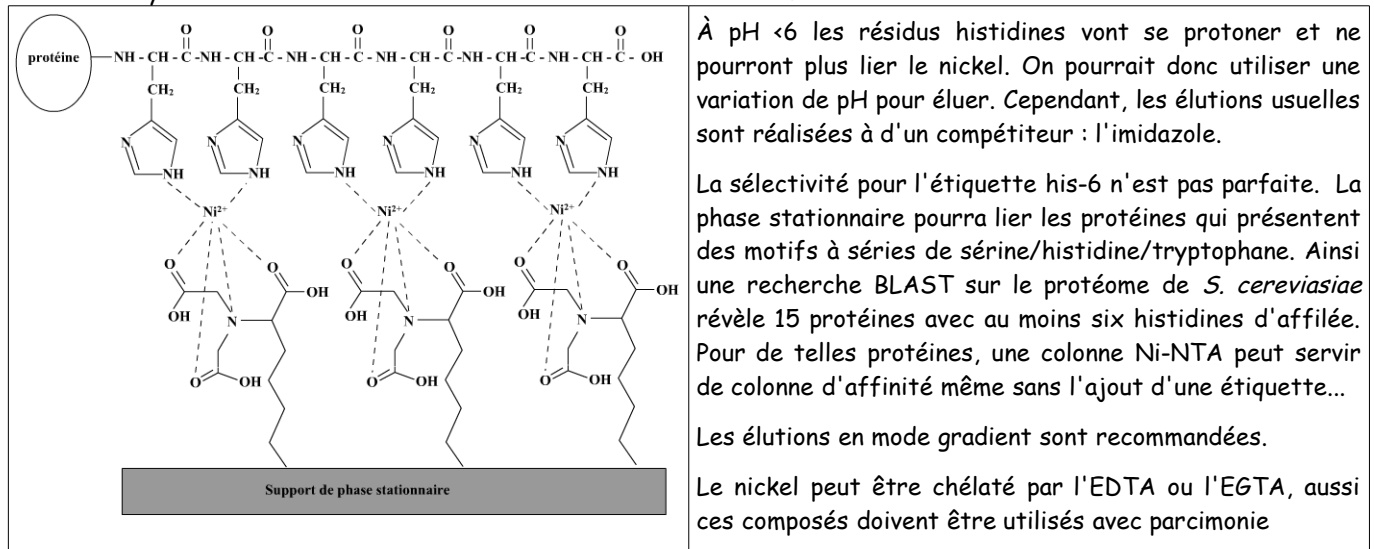
Annexe 2. Lyse de bactéries par ultrasons.

La lyse par ultrasons est une méthode brutale. La sonde du sonicateur va mettre le milieu en vibration ultrasonique (fréquence de 20 ou 40 kHz classiquement). Les ondes de pression des vibrations vont déclencher un phénomène de "cavitation". Des microbulles d'eau à l'état gazeux vont se former, grandir subitement puis imploser. L'implosion est accompagnée d'une très haute et très brève augmentation locale de la pression et de la température : pression locale de plusieurs centaines d'atmosphère et température locale de 4000 à 5000°C. De quoi pulvériser localement les cellules. Les conditions opératoires de fréquence de la sonde, de puissance délivrée, de nombre et de durée phases de sonication, de contrôle de température ... devront permettre la lyse cellulaire tout en respectant l'intégrité de la protéine à purifier (pas toujours évident).

Annexe 3. Principe des chromatographies IMAC

Ni²⁺ (ou Co²⁺) peut former des complexes avec 4 ou 6 liaisons. On peut l'immobiliser sur des phases stationnaires greffées de motifs chimiques qui pourront le lier avec 4 coordinences et telles que Ni²⁺ (ou Co²⁺) ainsi immobilisé puisse réaliser ses 2 dernières liaisons de coordinence avec une étiquette his₆ ajoutée à une protéine à purifier.

La figure ci-dessous présente une résine « classique » nickel-NTA (*nickel-nitrilotriacetic acid*). Le motif acide nitriloacétique greffé forme un chélate tétradentate avec Ni²⁺. Il reste 2 coordinences pour interagir avec les atomes d'azote du cycle de la chaîne latérale de deux résidus histidines liées.

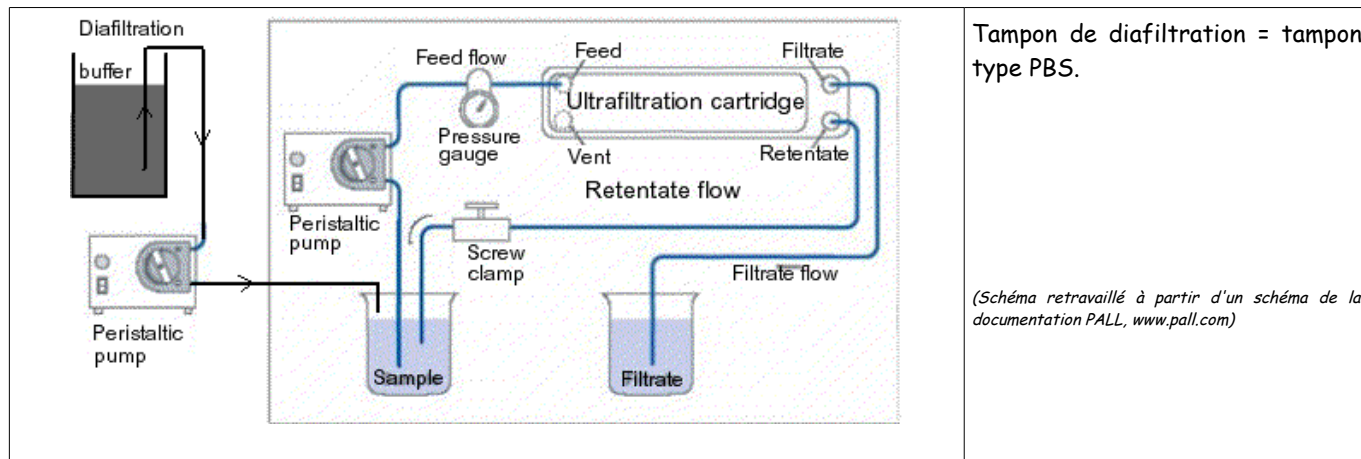


Annexe 4. Diafiltration et concentration d'une fraction purifiée EGFP par ultrafiltration tangentielle

Matériel ultrafiltrant proposé : cassette d'ultrafiltration tangentielle Minimate TFF de marque PALL à seuil de coupure 3 000 Da, surface 50 cm², volume capturé 1,6 mL, débit d'ultrafiltrat recommandé : 60/70 mL/min, pression maximum 4 bars.

TFF cassettes are shipped wet, in liquid containing a humectant and bactericidal storage solution. This solution consists of 15 - 20 % glycerin and 0.05 - 0.1 % sodium azide.

The storage solution must be removed and the cassette flushed well with water prior to use to prevent product contamination. Cassettes are also available with circa 0.3 N sodium hydroxide as the storage agent.



Le montage proposé, à réservoir en V, permet de travailler avec un volume échantillon/rétentat qui peut descendre à 15 mL (tous volumes morts compris). On peut donc diafiltrer sans problème en maintenant le rétentat à 15 mL avec le tampon final choisi.

Annexe 5. Données opératoires techniques pour les électrophorèses SDS-PAGE et PAGE-native

SDS-PAGE, Gel de séparation (14%)	
volume total préparé	10 mL
Acryl. Bis acryl. 40% (29:1)	3,5 mL
Tris-HCl 1 M pH 8,8 pour obtenir 0,375 M final	3,75 mL
SDS 10 %	0,1 mL
H ₂ O	Qsp 10 mL (2,54)
Mélange doux pour ne pas oxygéner (inhibiteur de polymérisation) et au dernier moment, avant de couler	
TEMED	15 µL
persulfate 10 %	10 0 µL
Couler rapidement. Laisser polymériser sans bouger le gel.	

SDS-PAGE, Gel de concentration (3%)	
volume total préparé	5 mL
Acryl. Bis acryl. 40% (29:1)	0,375 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 pour obtenir 0,125 M final	1,25 mL
SDS 10 %	0,05 mL
H ₂ O	Qsp 5 mL (3,27)
Mélange doux pour ne pas oxygéner (inhibiteur de polymérisation) et au dernier moment, avant de couler	
TEMED	7,5 µL
persulfate 10 %	50 µL
Couler rapidement. Laisser polymériser sans bouger le gel, en présence d'un peigne.	

PAGE native, Gel de séparation (6 %)	
volume total préparé	10 mL
Acryl. Bis acryl. 40% (29:1)	1,5 mL
Tris-HCl 1 M pH 8,8 pour obtenir 0,375 M final	3,75 mL
H ₂ O	Qsp 10 mL (4,64)
Mélange doux pour ne pas oxygéner (inhibiteur de polymérisation) et au dernier moment, avant de couler	
TEMED	15 µL
persulfate 10 %	10 0 µL
Couler rapidement. Laisser polymériser sans bouger le gel.	

PAGE native, Gel de concentration (3%)	
volume total préparé	5 mL
Acryl. Bis acryl. 40% (29:1)	0,375 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 pour obtenir 0,125 M final	1,25 mL
H ₂ O	Qsp 5 mL (3,32)
Mélange doux pour ne pas oxygéner (inhibiteur de polymérisation) et au dernier moment, avant de couler	
TEMED	7,5 µL
persulfate 10 %	50 µL
Couler rapidement. Laisser polymériser sans bouger le gel, en présence d'un peigne.	

SB5x PAGE native = Tris-HCl 0,313 M pH 6,8 + glycérol 50% (v/v) + BBP 0,5 g/L (un peu de bleu)

Annexe 6. Dosage des protéines totale par la méthode du biuret (microméthode)Travailler en microplaque 96 puits. Étalonner en triplicate selon le tableau ci-dessous.

	TR	1	2	3	4	5
Etalon SAB 5mg/mL en NaCl 0,15 M	0	10 μ L	20 μ L	30 μ L	40 μ L	50 μ L
NaCl 0,15 M	50 μ L	40 μ L	30 μ L	20 μ L	10 μ L	0
Réactif de Gornall	200 μ L					
Protéines par tube réactionnel (q en μ g)	0	50	100	150	200	250
Recouvrir la plaque. <u>Homogénéiser sur agitateur de plaques</u> , incuber 40 minutes à 37°C puis remettre à température ambiante.						
Lire les absorbances (A) entre 540 et 590 nm contre le TR. Étalonnage $A = f(q)$ par régression linéaire.						

Essais : échantillon à doser qsp 50 μ L plus 200 μ L de réactif de Gornall.**Annexe 7. Données techniques concernant le support His Trap FF****His Trap FF, 1 mL column , TECHNICAL SPECIFICATIONS**

Medium : Ni Sepharose 6 Fast Flow

Column volume : 1 ml

Column dimensions : 0.7 x 2.5 cm

Dynamic binding capacity: Approx. 40 mg histidine-tagged protein/ml medium (*Protein binding capacity is protein-to-protein dependent*)

Recommended flow rate : 1 ml/min

Max. pressure 3 bar (0.3 MPa, 42 psi)

pH stability and Compatibility : Stable in all commonly used buffers, reducing agents, denaturants, and detergents

Storage 20% ethanol Storage temperature 4°C to 30°C

Notice : 11-0008-88AE

[http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/62743F04C34D5EBBC1256F24000846BD/\\$file/11000888AE.pdf](http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/62743F04C34D5EBBC1256F24000846BD/$file/11000888AE.pdf)**His trap FF****Stripping and recharging**

Note: The column does not have to be stripped and recharged between each purification if the same protein is going to be purified; it is sufficient to strip and recharge it after approximately 5 purifications, depending on the cell extract, extract volume, target protein, etc.

Recommended stripping buffer: 20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 7.4

Strip the column by washing with at least 5–10 column volumes of stripping buffer. Wash with at least 5–10 column volumes of binding buffer and 5–10 column volumes of distilled water before recharging the column.

Recharge the water-washed column by loading 0.5 ml or 2.5 ml of 0.1 M NiSO₄ in distilled water on HisTrap FF 1 ml and 5 ml column, respectively. Salts of other metals, chlorides, or sulfates, may also be used (see Optimization). Wash with 5 column volumes distilled water, and 5 column volumes binding buffer (to adjust pH) before storage in 20 % ethanol.

His trap FF**cleaning**

When an increase in backpressure is seen, the column should be cleaned. Before cleaning, strip off Ni²⁺ ions using the recommended procedure described above.

After cleaning, store in 20 % ethanol (wash with 5 column volumes) or recharge with Ni²⁺ prior to storage in ethanol.

The Ni²⁺-stripped column can be cleaned by the following methods;

- Remove ionically bound proteins by washing with several column volumes of 1.5 M NaCl; then wash with approx. 10 column volumes of distilled water.
- Remove precipitated proteins, hydrophobically bound proteins, and lipoproteins by washing the column with 1 M NaOH, contact time usually 1–2 hours (12 hours or more for endotoxin removal). Then wash with approx. 10 column volumes of binding buffer, followed by 5–10 column volumes of distilled water.
- Remove hydrophobically bound proteins, lipoproteins, and lipids by washing with 5–10 column volumes 30 % isopropanol for about 15–20 minutes. Then wash with approx. 10 column volumes of distilled water.

Alternatively, wash with 2 column volumes of detergent in a basic or acidic solution. Use, for example, 0.1–0.5% nonionic detergent in 0.1 M acetic acid, contact time 1–2 hours. After treatment, always remove residual detergent by washing with at least 5 column volumes of 70 % ethanol. Then wash with approx. 10 column volumes of distilled water.