

## Ni-TED Agarose Resin 6FF (His 标签蛋白琼脂糖高速纯化树脂)

### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
Ni-TED Agarose Resin 6FF (His 标签蛋白琼脂糖高速纯化树脂)	20497ES10	10 mL
	20497ES50	50 mL
	20497ES60	100 mL
	20497ES76	500 mL

### 产品描述

Ni-TED Agarose Resin 6FF 以高度交联的 6%琼脂糖凝胶为基质，通过化学方法偶联三（羧甲基）乙二胺（TED）为配体，螯合镍离子（Ni<sup>2+</sup>）而制备成的一种介质。Ni-TED Agarose Resin 6FF 与 Ni<sup>2+</sup>具有 5 个螯合位点，使得其对于 Ni<sup>2+</sup>具有很强的约束力，这一特性赋予了本品具有优异的 DTT 以及 EDTA 耐受性。本品用于带有 His 标签的蛋白纯化时拥有稳定性高、复杂环境中一步纯化蛋白、目标蛋白质吸附量大（但会低于 Ni-NTA）、蛋白洗脱条件温和、介质易再生、重复利用率高等优点。

### 产品性质

基质	高度交联的 6%琼脂糖凝胶
粒径	45-165 μm
动态载量	>15 mg His-tagged protein (27.5 KD) /mL 基质
耐压	0.3 MPa, 3 bar
储存缓冲液	20%乙醇
PH 稳定性	4-10 (工作) ; 2-14 (CIP)
化学稳定性	24 h 耐受 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 mM TCEP, 20 mM β-巯基乙醇, 1 M NaOH, 6 M 盐酸胍 ; 2 h 耐受 500 mM 咪唑, 100 mM EDTA

### 运输和保存方法

冰袋运输。2-8°C保存。有效期 4 年。

### 注意事项

- 1) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 2) 本产品仅作科研用途！

### 使用方法

#### 一、纯化流程

##### 1 缓冲液的准备

**缓冲液使用原理：**低咪唑上样，高咪唑洗脱。Buffer 在使用前最好用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

平衡缓冲液：20 mM PB, 0.5 M NaCl, pH 7.4

洗杂缓冲液：20 mM PB, 0.5 M NaCl, 0-30 mM 咪唑, pH 7.4

洗脱缓冲液：20 mM PB, 0.5 M NaCl, 50-500 mM 咪唑, pH 7.4

##### 2 样品准备

在上样前将宿主细胞碎片通过离心等方式去除，7000 rpm 离心 15 min，收集上清。然后过 0.45um 的微孔滤膜。为了获得最大的载量，不要在样品蛋白溶液中添加咪唑。

### 3 装柱

- 1) 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头，确保柱底筛板上无气泡，关闭柱底出口，并在柱底部留出 1-2 cm 的去离子水。
- 2) 将树脂悬浮，小心地将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3) 如果使用储液器，应立即在层析柱和储液器中加满水，将进样分配器放置于浆液表面，连接至泵上，避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4) 打开层析柱底部出口，开启泵，使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱，然后缓慢增加至最终流速，这样可避免液压对所形成柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。如达不到推荐的压力或流速，可以用所用泵的最大流速，这样也可以达到一个较好的装填效果。当柱床高度稳定后，在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱体积的去离子水。标上柱床高度。【注】在随后的色谱程序中，不要超过最大装柱流速的 75%。
- 5) 关闭泵，关闭层析柱出口。
- 6) 如使用储液器，去除储液器，将分配器置于层析柱中。
- 7) 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器，锁紧分配器接头。
- 8) 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中，开始平衡。如需要可重新调整分配器。

### 4 样品纯化

装柱后，可用各种常规的中压色谱系统，以 AKTA 使用为例进行说明：

- 1) 将泵管道注满去离子水。去掉产品上塞，连接至色谱系统中，打开下出口，将纯化柱连接到色谱系统中，注意旋紧。
- 2) 3-5 倍柱体积去离子水冲洗纯化柱。
- 3) 至少 5 倍柱体积的平衡缓冲液平衡色谱柱。1 mL 规格预装柱推荐流速为 1 mL/min，5 mL 预装柱推荐流速为 5 mL/min。
- 4) 利用泵或注射器上样，收集流出液，以便 SDS-PAGE 检测蛋白结合情况。【注】若样品粘度增加，即使上样体积很少也会导致层析柱很大反压；上样量不要超过柱子的结合能力；大量样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器更难使用。
- 5) 洗杂缓冲液冲洗柱子，直到紫外吸收达到一个稳定的基线（一般至少 10-15 个柱体积）。  
【注】在样品和结合缓冲液中加入低浓度咪唑可以提高样品纯度。
- 6) 洗脱缓冲液一步法或梯度法进行洗脱。一步法洗脱中一般 5 倍柱体积洗脱液即可。梯度洗脱可以用一个小的梯度，例如 20 倍柱体积或更多来分离不同结合强度的蛋白质。
- 7) 随后依次用 2 倍柱体积的 1 mol/L NaOH 和 5 倍柱体积的去离子水清洗填料。5 倍柱体积的 20%乙醇平衡树脂，最后将填料保存在 20%乙醇的 1×PBS 中，置于 4 °C 保存。

### 5 SDS-PAGE 检测

将纯化过程中得到的样品（包括原始样品、流出组分、洗杂及洗脱组分等）利用 SDS-PAGE 进行检测，判定其纯化效果。

## 二、在位清洗

当填料使用过程中发现反压过高或者填料上面出现明显的污染时，需对其进行在位清洗（Cleaning-in-Place, CIP）。建议按照下面操作去除填料上残留的污染物，如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

#### 1 去除强疏水结合的蛋白，脂蛋白和脂类

使用 30%异丙醇清洗 5-10 个柱体积，接触时间为 15-20 min 可以去除此类污染物。之后再用去离子水清洗 10 倍柱体积。也可以选择使用含有去污剂的酸性或者碱性溶液清洗填料 2 倍柱体积。例如含有 0.1-0.5%非离子去污剂的 0.1 M 醋酸溶液，接触时间为 1-2 h。去污剂处理后，需用 70%的乙醇清洗 5 倍柱体积，彻底去除去污剂。最后利用去离子水清洗 10 倍柱体积。

#### 2 去除离子作用结合的蛋白

使用 1.5 M NaCl 溶液接触 10-15 min，之后用去离子水清洗 10 倍柱体积。