

镍琼脂糖凝胶 FF（镍 NTA 琼脂糖凝胶 FF）

一、简介

金属螯合亲和色谱，又称固定金属离子亲和色谱，其原理是利用蛋白质表面的一些氨基酸，如组氨酸能与多种过渡金属离子 Cu^{2+} ， Zn^{2+} ， Ni^{2+} ， Co^{2+} ， Fe^{3+} 发生特殊的相互作用，利用这个原理可以把富含这类氨基酸的蛋白质吸附，从而达到分离的目的。由于这个原因，偶联这些金属离子的琼脂糖凝胶就能够选择性地分离出这些含有多个组氨酸的蛋白以及对金属离子有吸附作用的多肽、蛋白和核苷酸。半胱氨酸和色氨酸也能与固定金属离子结合，但这种结合力要远小于组氨酸残基与金属离子的结合力。

和镍琼脂糖凝胶相比，镍 NTA 琼脂糖凝胶 FF 具特异性好流速快，螯合镍更稳定，能耐受更高的还原剂，物理和化学稳定性好，批次重复性好。已经螯合好镍离子，使用更方便，由于颗粒粒度均匀，粒径小，所以分离效果更好，可完全代替进口产品。

二、填料特征：

特点	基团密度高，载量大，分辨率高，使用方便。
基质	6% 的交联琼脂糖凝胶
配基	Ni^{2+}
配基密度	20-40 $\mu\text{mol/ml}$
吸附载量	$\leq 15\text{mg/ml}$
填料的颗粒大小	45-165 μm
最大流速	600cm/h
pH 范围	3-10，在位清洗时 pH 范围可到 2-11
保存温度	+4~8 $^{\circ}\text{C}$
保存液体	20%乙醇

三、适用范围

分离能被金属离子吸附的多肽、蛋白、核苷酸、磷酸化蛋白及带 His 标签的重组蛋白。

四、应用实例

实验名称：镍琼脂糖凝胶 FF 色谱分离带 His 标签的重组蛋白

实验步骤：

- 1、镍琼脂糖凝胶 FF 装柱，1.6×20cm，柱床体积为 10ml
- 2、用**缓冲液 1**平衡 2-5 个床体积，流速为 2ml/min
- 3、将 20ml 细胞破碎液(50 mM PBS, pH7.4, 0.5M NaCl)0.45 μm 滤膜过滤，上样，流速为 1ml/min

- 4、用**缓冲液 1**再洗 2-5 个床体积，流速为 2ml/min
- 5、用分别含 10、20、50、100、200、300、400mM mM 咪唑的**缓冲液 3**进行阶段洗脱，流速为 2ml/min，收集各阶段洗脱峰，用 SDS-PAGE 检测融合蛋白的分子量大小和纯度
- 6、用纯水流洗 5 个柱床体积，再用 20%的乙醇流洗 3 个柱床体积，流速为 2ml/min，柱子置于+4~8℃环境中保存
- 7、色谱图见图 1，SDS-PAGE 结果见图 2。

缓冲液组成:

缓冲液 1: 50mM pH7.4 的PBS缓冲液。配制: 0.5M NaH₂PO₄ 19ml, 0.5M Na₂HPO₄ 81ml, NaCl 29.3g, 加适量水溶解后定容到 1000ml。

缓冲液 2: 50mM磷酸盐缓冲液, pH7.4, 即pH7.4 的PBS溶液。配制: 0.5M NaH₂PO₄ 19ml, 0.5M Na₂HPO₄ 81ml, NaCl 29.3g和咪唑 34g, 加适量, 水调pH后定容到 1000ml。

缓冲液 3: 不同咪唑浓度的缓冲液 B 配制:

咪唑浓度	缓冲液 1 量(ml)	缓冲液 2 量(ml)
10 mM	98	2
20 mM	96	4
50 mM	90	10
100 mM	80	20
200 mM	60	40
300mM	40	60
400 mM	20	80

SDS-PAGE 流程:

- 1 BCA 法测量样品蛋白浓度
- 2 根据测定样品的蛋白浓度，算出 5-10μg/孔所需的体积。
- 3 向 1.5ml EP 管中加入含 5-10μg 蛋白的样品溶液，若体积小于 10μl, 则加 20mM PBS pH7.4 补足 10μl; 若体积大于 10μl, 则要加入 1ml 无水乙醇，-20℃下浓缩 1h。
- 4 取浓缩样品 10000rpm 离心 15min, 除去上清, 37℃烘箱 10min 去除残余的乙醇。
- 5 在样品加入 20mM PBS pH7.4 和 2×loading buffer 各 10μl, 100℃下 10min。取出后用冷却 30s, 4000rpm 离心 1s。
- 6 点样，电泳。

实验结果:

(一) 使用镍螯合琼脂糖凝胶色谱分离 His 标签重组蛋白

使用色谱填料为镍琼脂糖凝胶 FF, His 标签重组蛋白的上样量为 20ml, 用分别含 10、20、50、100、200、300、400mM 咪唑的缓冲液 B 进行洗脱, 色谱结果见图 3, 色谱各组分的

SDS-PAGE 结果见图 4。

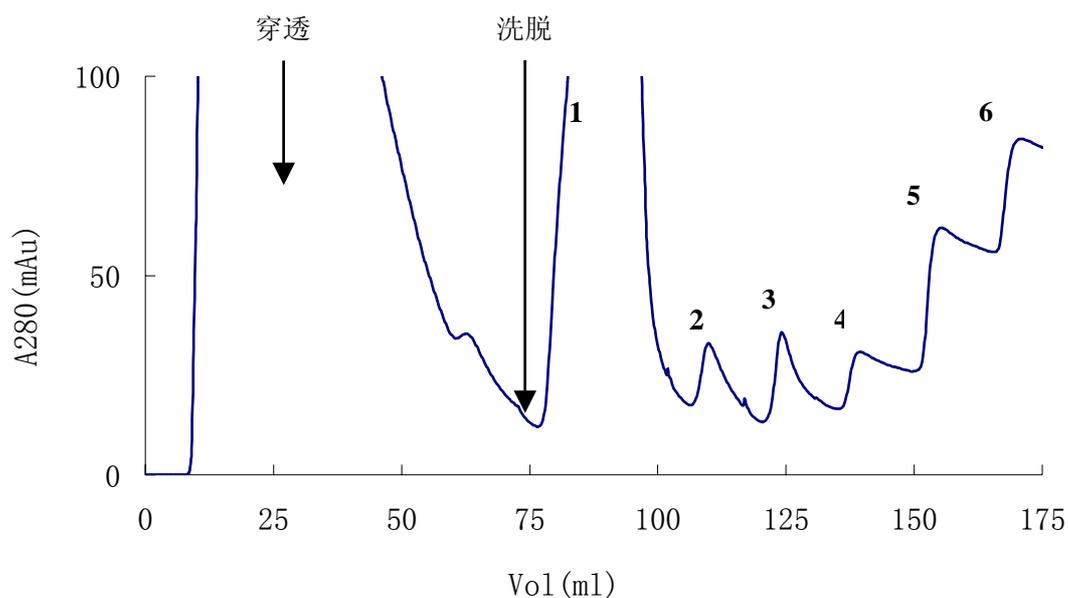


图 1. 镍琼脂糖凝胶 FF 纯化带 His 标签重组蛋白

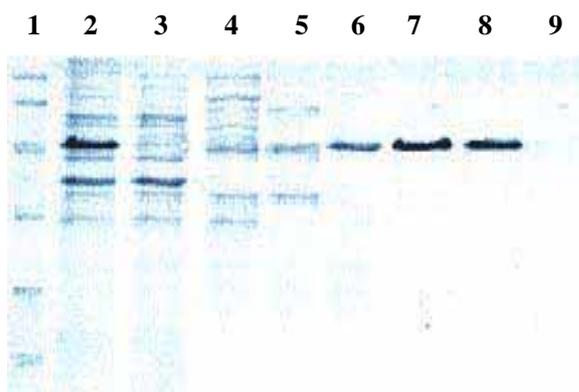


图 2. SDS-PAGE 图谱

1: 标准蛋白, 2: 上样液, 3: 穿透, 4: 20mM 咪唑洗脱, 5: 50mM 咪唑洗脱峰, 6: 100mM 咪唑洗脱峰, 7: 200mM 咪唑洗脱峰, 8: 300mM 咪唑洗脱峰, 9: 400mM 咪唑洗脱峰

(二) 镍螯合琼脂糖凝胶色谱分离 His 标签重组蛋白包涵体

条件和前面的方法基本相同, 只是缓冲液中加了 8M 的脲, 溶液配方如下表, 其纯化色谱图和电泳图见图 3、4。

要注意的是不同的包涵体溶解度不同, 也可以用 6M 盐酸胍代替 8M 脲, 因为盐酸胍溶解包涵体更完全。

缓冲液组成:

缓冲液 1: 50mM pH7.4 的 PBS 缓冲液。配制: 0.5M NaH_2PO_4 19ml, 0.5M Na_2HPO_4 81ml,

NaCl 29.3g 和脲 480 g, 加热溶解后定容到 1000ml。

缓冲液 2: 50mM磷酸盐缓冲液, pH7.4, 即pH7.4 的PBS溶液。配制: 0.5M NaH₂PO₄ 19ml, 0.5M Na₂HPO₄ 81ml, NaCl 29.3g, 咪唑 34g和脲 480 g, 加热溶解后定容到 1000ml。

缓冲液 3: 不同咪唑浓度的缓冲液 B 配制:

咪唑浓度	缓冲液 1 量(ml)	缓冲液 2 量(ml)
50 mM	90	10
400 mM	20	80

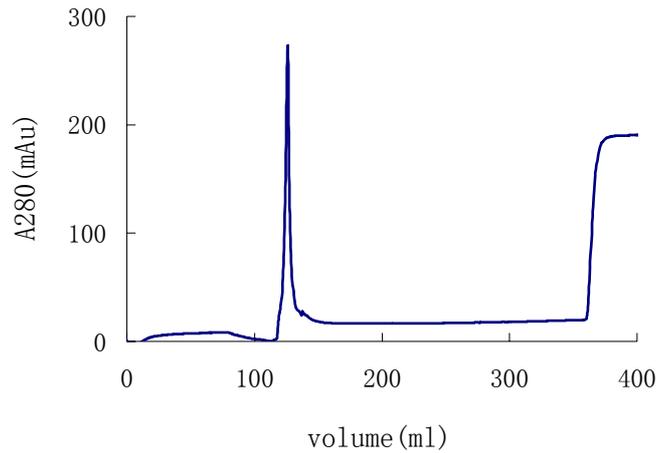


图 3。镍琼脂糖凝胶 FF 纯化包涵体蛋白

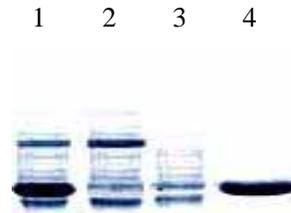


图 4。SDS-PAGE 图

1: 包含体, 2: 穿透, 3: 50mM 咪唑洗脱, 4: 400mM 咪唑洗脱峰。

(三) 不同金属离子及洗脱条件对纯化效果的影响

使用色谱填料为镍琼脂糖凝胶 FF, His 标签重组蛋白的上样量为 10ml, 用含有 20、50、100、200、500mM 咪唑的缓冲液 3 洗脱, 缓冲液 1 和 2 均加入终浓度为 1%的吐温 80, 其结果表明加入表面活性剂可以降低杂吸附。此外分别螯合铜钴金属离子做同样的纯化实验, 结果表明在回收率和纯度上都以螯合镍离子的效果最好, 其分离纯化的纯度可以 >90%, 而

目标蛋白的回收率高达 80%，所以建议首选镍离子螯合填料，别的可以不用考虑。

五、 应用的注意事项：

镍琼脂糖凝胶 FF 的配基是最经典的 IDA，镍离子有六个螯合价数，Ni-IDA 螯合了三价，剩余三价，而 Ni-NTA 是四价的，剩余是两价，因此 Ni-IDA 琼脂糖凝胶作用力要比 Ni-NTA 琼脂糖凝胶的强，也正因为这个原因，所以在同样条件下 Ni-IDA 洗杂质和目标蛋白的要比 Ni-NTA 的咪唑浓度高，但是 NTA 的填料更稳定，耐受更强的还原剂，更不容易脱落。而 IDA 的载量要比 NTA 高，可以反复利用，更加经济。

本公司的镍琼脂糖凝胶由于配基密度高，所以载量和作用力都比进口的都大。和这些填料相比需要更强的洗脱条件，特别是和 NTA 类的填料相比，镍琼脂糖凝胶需要 50-100mM 咪唑洗去杂质，也可以直接在上样的样品中加 30-40mM 咪唑提高特异性，洗脱也许需要高到 500mM 咪唑。所以不能完全照搬 NTA 填料的洗脱条件。此外我们也提供镍 NTA 琼脂糖凝胶，它一般要用 25-40mM 咪唑洗杂蛋白，用 250-400mM 咪唑洗脱目标蛋白，同样可以在上样样品和平衡缓冲液中添加 10-20mM 咪唑提高特异性。而具体用哪个填料完全看个人的习惯以及纯化的条件而决定。

1) 色谱柱装填

- 1、所有需要用到的材料的温度要与色谱操作的温度一样，液体最好做脱气处理。
- 2、在柱子下端加入蒸馏水，以除去柱子中的空气，关闭柱子出口，在柱内保留少量的蒸馏水。
- 3、将琼脂糖凝胶连续倒入柱子时，要用玻璃棒的紧靠柱子内壁引流，以减少气泡的产生，让填料先自然沉降。
- 4、柱压不超过 0.3MPa，如果装柱系统中无法测柱压，则控制流速高于 300cm/h，但是在使用中一般只用最大流速的 75%。

2) 固定金属离子

- 1、金属离子的固定必须用过滤好的金属离子溶液，以防止金属盐在胶上沉淀。
- 2、用 2-5 倍柱床体积的蒸馏水充分平衡柱子。
- 3、选择合适的金属离子 (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} 等)，溶解在中性或弱酸性的溶液中，浓度为 0.1-0.3M。如果是 Fe^{3+} 必须在低 pH 下螯合 (pH 3)，以防止 Fe^{3+} 产生沉淀。
- 4、用 2-5 个柱床体积的金属离子溶液上柱，再用不少于 5 倍柱床体积的蒸馏水洗脱色谱柱，洗去未螯合的金属离子。(当然也可以直接把洗净没有螯合的填料直接和需要的金属离子溶液在摇床上震荡过夜，这样螯合效果更好，镍 NTA 琼脂糖凝胶尤其适合用这样的方法。)
- 5、用 2-5 倍柱床体积的起始缓冲溶液平衡柱子，再上样。
- 6、如果是螯合铁离子，要注意的是在中性条件下， Fe^{3+} 很容易被还原而生成沉淀，所以 Fe^{3+} 溶液的 pH 最好是 3-5。螯合 Fe^{3+} 的色谱柱不能长时间保存在中性溶液中。建议每次用完时都要将螯合的 Fe^{3+} 用 50 mM EDTA 溶液洗净，下次使用时再重新螯合。如果洗不干净，也可以将凝胶浸在 50 mM 的 EDTA 中过夜后再清洗保存。

3) 上样

- 1、样品通溶解在 pH5.5-8.5 的缓冲液中，提高上样缓冲液的 pH 值，可以增大载量。
- 2、选择起始缓冲液，主要是依据金属离子的特性及样品与金属离子的结合特性。
- 3、缓冲液中不能含有 EDTA 和柠檬酸盐，也最好不含巯基乙醇等还原剂。
- 4、常用缓冲液有 10-20m M 磷酸钠盐缓冲液和 50mM 醋酸钠缓冲液
- 5、在缓冲液中要加入 0.15-0.5M 的 NaCl，以消除离子交换作用。
- 6、使用金属螯合色谱有一个通常的法则，如果不了解蛋白的结合特性，建议先选用 Zn^{2+} ，缓冲液可以选择中性的磷酸盐或者醋酸盐缓冲液，NaCl 的含量为 0.15-0.5M，作为起始缓冲液。
- 7、缓冲液中的去污剂一般不会影响对蛋白的吸附作用。
- 8、蛋白被吸附时，经常会有一部分的螯合金属离子被替换。这种现象通常是可见的，尤其是使用有色的金属离子时，比如 Cu^{2+} ，所以使用几次后可以先把金属离子洗下来，然后再重新螯合金属离子。

4) 洗脱

- 1、线性降低或一步降低 pH。大多数蛋白在 pH6-4 会被洗脱下来，也可以在 pH 3-4，缓冲液可以是醋酸钠、柠檬酸、磷酸盐缓冲体系。
- 2、竞争性洗脱：线性增加或一步增加与金属离子有亲和力的物质，如 0-0.5M 咪唑，0-50 mM 组氨酸，0-2M NH_4Cl 。梯度洗脱最好在起始缓冲液的恒定 pH 下进行。
- 3、EDTA、EGTA 等螯合剂会与金属离子产生作用力，导致蛋白被洗脱下来。这种方法不能使不同的蛋白分离，此外会影响蛋白吸附，导致融合蛋白不能挂柱。
- 4、所有上述情况中，缓冲液中必须加入 0.15-0.5M 的 NaCl 以消除离子交换作用。
- 5、当螯合离子配基是 Cu^{2+} 时，有以下的三种操作方式：
降低 pH：
上样缓冲液：50 mM Na_2HPO_4 ， 0.5M NaCl， pH 7.4
洗脱缓冲液：50 mM Na_2HPO_4 ， 0.5M NaCl， pH 3.5
竞争洗脱：
上样缓冲液：50 mM Na_2HPO_4 ， 1M NaCl， pH 7.4
洗脱缓冲液：50 mM Na_2HPO_4 ， 1M NH_4Cl ， pH 7.4
脱落洗脱：
上样缓冲液：50 mM Na_2HPO_4 ， 0.5M NaCl， pH 7.4
洗脱缓冲液：50 mM Na_2HPO_4 ， 0.5M NaCl， 50 mM EDTA， pH 7.4
使用降低 pH 和脱落洗脱都会使金属离子掉下来，下次使用就得重新螯合金属离子。

六、 再生、清洗、保存

1) 凝胶的再生

- 1、螯合一种新的金属离子之前，必须将胶再生。用 5-10 倍体积的 50 mM EDTA 淋洗柱子，再用 2-3 倍体积的 0.5M NaCl 洗掉残留的 EDTA。
- 2、金属离子的重新固定的方法如前文所述。在一些操作中，变性蛋白和脂质不能在柱子的再生过程中被洗脱下来，他们可以通过在位清洗被除去。

2) 在位清洗

- 1、除去因离子交换作用吸附的蛋白，用 2-3 倍柱床体积 2M 的 NaCl 溶液淋洗柱子，再反向淋洗。
- 2、除去蛋白沉淀、疏水性蛋白，用 1M 的 NaOH 以 100cm/h 的速度淋洗柱子 1h。
- 3、所有操作中，都要用至少 3 倍柱床体积的初始缓冲液洗柱子。
- 4、除去强的疏水性蛋白和脂质等，用 4 倍柱床体积的 70%的乙醇或者 30%的异丙醇洗柱子，再反向淋洗。

七、保存

在 20%乙醇中，4℃下长期保存。

本产品有严格的生产质量控制标准，我们力求为您提供最满意的产品、最完备的技术支持和服务，欢迎业内朋友交流合作。

除了为您提供各种包装规格的**镍琼脂糖凝胶 FF**和**镍 NTA 琼脂糖凝胶 FF**外，**还新推出 HIS 纯化 Kit，使纯化更简单**。我们还提供其它各种填料、柱子和其他服务，包括：

- 1、填料和柱子选择以及预实验
- 2、开发各种生物大分子的分离纯化工艺，为您解决分离纯化的难题
- 3、帮助您合成特殊要求的色谱填料，包括偶联各种配基
- 4、按客户要求提供各种填料及规格的预装柱，并配相应接口用于各种纯化设备。
- 5、代理各种进口填料，为客户提供最专业的售前和售后服务。

产品目录：

产品序列号	产品名称	包装	载量 mg/ml	特性及应用	平价 粒径 (μm)	耐压 (MPa)	最大流速 (cm/h)
CS-A01-00	镍琼脂糖凝胶 FF	1ml 预装柱	≤ 45	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	5ml/min
CS-A01-0A	镍琼脂糖凝胶 FF	5ml 预装柱	≤ 45	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	20ml/min
CS-A01-0B	镍琼脂糖凝胶 FF	20ml 预装柱	≤ 45	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	15ml/min
CS-A01-01	镍琼脂糖凝胶 FF	25ml	≤ 45	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	750
CS-A01-02	镍琼脂糖凝胶 FF	100ml	≤ 45	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	750
CS-A01-03	镍琼脂糖凝胶 FF	500ml	≤ 45	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	750
CS-A01-04	镍琼脂糖凝胶 FF	大包装	≤ 45	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	750
CS-A01b-00	镍 NTA 琼脂糖凝胶 FF	1ml 预装柱	≤ 12	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	5ml/min
CS-A01b-00	镍 NTA 琼脂糖凝胶 FF	5ml 预装柱	≤ 12	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	20ml/min
CS-A01b-00	镍 NTA 琼脂糖凝胶 FF	20ml 预装柱	≤ 12	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	15ml/min
CS-A01b-01	镍 NTA 琼脂糖凝胶 FF	10ml	≤ 12	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	750

CS-A01b-02	镍 NTA 琼脂糖凝胶 FF	25ml	≤12	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	750
CS-A01b-03	镍 NTA 琼脂糖凝胶 FF	100ml	≤12	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	750
CS-A01b-04	镍 NTA 琼脂糖凝胶 FF	大包装	≤12	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	90	0.3	750

经济型镍填料(尤其适合离心操作,特异性好)

产品序列号	产品名称	包装	载量	应用	粒径 μ m	耐压 MPa	最大流速
CS-A01C-00	Ni –Resin HP	10ml	约 8mg/ml	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	50	0.3	300cm/h
CS-A01C-01	Ni –Resin HP	25ml	约 8mg/ml	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	50	0.3	300cm/h
CS-A01C-02	Ni –Resin HP	100ml	约 8mg/ml	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	50	0.3	300cm/h
CS-A01C-03	Ni –Resin HP	500ml	约 8mg/ml	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	50	0.3	300cm/h
CS-A01C-04	Ni –Resin HP	大包装	约 8mg/ml	分离和金属作用的多肽、蛋白核苷酸	50	0.3	300cm/h

北京韦氏博慧色谱科技有限公司

电话: 010-67804548 13911415318: 联系人:韦新桂 E-mail: weixingui@263.net

公司网站: www.wsac.cn 传真: 010-67804548。

定货请参考光盘中的定货须知。购买本公司产品可获得一张内容非常丰富的纯化光盘,包括表达,提取,分离,酶切等操作指南以及各公司纯化产品的说明书及手册,是生物大分子分离纯化难得的学习材料。