Ni-琼脂糖凝胶 6FF

【规格】：25mL/ 100mL/500mL（凝胶体积）

【保存】：2—8℃保存，有效期一年。

【产品说明】

Ni NTA Beads 6FF 是以高度交联的 6%琼脂糖凝胶为基质，配体与 Ni NTA Beads 相同，蛋白的载量可以大于 40mg 6×His-taggedprotein/ml 介质；微球粒径为 45－165μm。Ni NTA Beads 6FF 除了可以耐受苛刻的试剂条件（多种还原剂、去污剂、高浓度变性剂等）外，因其耐压的基质，可以耐受最高 0.3 MPa 的压力，更稳定，因此该产品更适合用于工业大规模蛋白的纯化，可以在相对较高的流速下，实现对目的蛋白的纯化。本产品悬浮液为含 20%乙醇的 1×PBS，已螯合 Ni2+。

【操作方法】

1、 样品制备

（1）细菌或酵母表达的蛋白

1） 挑取单菌落到LB 培养基中，根据载体使用说明加入相应浓度的诱导剂诱导相应的时间。

2） 表达结束后，将培养液转移到离心杯中，7,000rpm，离心15min收集菌体，然后加入1/10 体积的Lysis Buffer 和PMSF,PMSF在破碎前加入,最终浓度为1mM。加入溶菌酶(工作浓度为0.2-0.4mg/ml，如果表达的宿主细胞内含pLysS 或pLysE，可以不加溶菌酶），（同时也可加入其他蛋白酶抑制剂，但不能影响目的蛋白与树脂的结合）。

3） 将菌体沉淀悬浮起来，（如果菌液浓度高，也可考虑加入10μg/ml RNase A 和5μg/ml DNase I），混匀，放置于冰上，然后冰上超声破碎细胞，至菌液基本保持澄清。

4） 将澄清的破碎液转移至离心管中，10,000rpm下，4 度离心20-30 分钟。取上清，置于冰上备用或-20℃保存。

（2）酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

1） 将细胞培养液转移至离心杯，5000rpm 下，离心10min，收集菌体得上清，如上清中不含EDTA、组氨酸和还原剂等物质，即可直接加入柱子使用；如含有EDTA、组氨酸和还原剂等物质，需用1×PBS 4℃下透析才能加入柱子。

2） 对于大量体积的上清，需加入硫酸氨沉淀浓缩后，蛋白还需用1×PBS 4℃透析后才能加入柱子。

2、 包涵体蛋白纯化(变性条件)

1） 将培养液转移到离心杯中，7,000rpm，离心 15min 收集菌体，去掉上清。

2） 按照菌体:Lysis buffer=1:10(W/V)将菌体悬浮起来，混匀，冰浴超声破碎。

3） 将破碎液转移至离心管中，10,000rpm 下，4 度离心 20-30 分钟。去掉上清，步骤 2）和 3）可以重复一次。

4） 按照菌体:Lysis buffer(含 8M 尿素)=1:10(W/V)将包涵体悬浮起来。

5） 变性条件下进行 His 标签蛋白纯化，具体缓冲液配方见表 2。

3、 样品纯化

Ni NTA Beads 6FF 装填好后，可以用各种常规的中压色谱系统，以 ÄKTA 仪器使用为例介绍其使用方法。

1） 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子，将层析柱连接至色谱系统中，打开下出口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。

2） 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。

3） 使用至少 5 倍柱床体积的 Lysis Buffer 平衡色谱柱。

4） 利用泵或注射器上样。注:样品的粘度增加使得即使上样体积很少，也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器更难使用。

5） 用 Wash Buffer 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咪唑可以提高样品纯度。

6） 用 Elution Buffer 采用一步法或线性梯度洗脱。一步洗脱中，通常 5 倍柱体积洗脱液就足够了。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。

填料清洗与再生：

1）去除强疏水结合的蛋白，脂蛋白和脂类

通过使用 30%异丙醇清洗 5-10 个柱体积，接触时间为 15-20 分钟可以去除此类污染物。然后，再使用 10 倍柱体积的去离子水清洗。也可以选择使用含有去污剂的酸性或碱性溶液，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 小时。去污剂处理后，需要使用 70%的乙醇清洗 5 个柱体积，以彻底去除去污剂。最后使用 10 倍柱体积的去离子水清洗。2）去除离子作用结合的蛋白使用 1.5M NaCl 溶液接触时间为 10-15 分钟清洗。然后，再使用去离子水清洗 10 个柱体积。

2）填料再生

组氨酸标签蛋白亲和纯化填料所带的镍离子不需要经常螯合去除和重新挂镍离子。当填料使用过程中发现反压过高，填料上面出现明显的污染，或者填料载量明显变低时，需要进行对填料进行镍离子剥离和重新挂镍离子，也就是填料再生。

将填料装填在合适的层析柱内，按照下面步骤：

1）使用 0.2 M 醋酸溶液（含 6 M GuHCl）清洗 2 倍柱体积；2）使用去离子水清洗 5 倍柱体积；

3）使用 2% SDS 清洗 3 倍柱体积；

4）使用去离子水清洗 5 倍柱体积；5）使用乙醇清洗 5 倍柱体积；6）使用去离子水清洗 5 倍柱体积；7）使用 100 mM EDTA (pH 8.0)清洗 5 倍柱体积；8）使用去离子水清洗 5 倍柱体积；9）使用 100 mM NiSO4 清洗 5 倍柱体积；10）使用去离子水清洗 10 倍柱体积；填料再生后，可以立即使用，如不立即使用，需要将填料悬浮于等体积的 20%乙醇中，置于 4℃保存。