



Ni NTA Agarose Beads 6FF预装柱 (1 mL, 5 mL, 20mL)

货号: QS01002A

Ni NTA Agarose Beads 6FF是一种预先装载了Ni NTA Agarose Beads 6FF的预装柱。这种预装柱非常适合通过金属离子亲和色谱 (IMAC) 对带有组氨酸标签的重组蛋白质进行制备性纯化。

该预装柱提供了一种快速、简单、方便的分离方式, 包括用于放大生产的理想起点。Ni NTA Agarose Beads 6FF的镍离子 (Ni^{2+}) 泄漏量低, 与用于蛋白质纯化的多种添加剂兼容。

该预装柱可用注射器、蠕动泵或如AKTA design™液相色谱系统等设备操作。

目录

一、产品描述	1
二、通用知识	4
三、预备实验	5
四、纯化操作	5
五、优化方法	6
六、填料再生	7
七、在线清洗	7
八、储存条件	8
九、故障排除	8
十、更多信息	9
十一、订购信息	10

一、产品描述

预装柱特点

预装柱柱体由生物相容性聚丙烯制成, 不会与生物分子发生相互作用。滤膜孔径经过优化, 可直接在柱上加载超声波处理的未澄清裂解液, 而不会造成背压问题或介质泄漏。



柱体配有入口的密封件和出口的快拆端。表1列出了预装柱的特性。

注意：预装柱不能打开或重新填充；确保适配器紧固以防止泄漏。

表 1 预装柱的特点。

柱子体积	1 mL, 5 mL, 20mL
柱子尺寸	7.8 × 25 mm (1 ml); 15.8× 27 mm (5 ml); 15.8 × 100 mm (20 ml)
最大流速	1 mL: 4 mL/min, 5 mL: 20 mL/min, 20 mL: 4 mL/min,
推荐流速	1 mL: 1 mL/min, 5 mL: 5 mL/min, 20 mL: 1 mL/min,
最大背压	3 bar (0.3 MPa)

填料特性

该预装柱预装有Ni NTA Agarose Beads 6FF，这是一种由 90 微米高度交联的琼脂糖珠粒组成，并带有固定的螯合基团

几种氨基酸，例如组氨酸，会与许多金属离子形成复合物。如果蛋白质表面有合适的复合物形成氨基酸残基暴露，Ni NTA Agarose Beads 6FF 会选择性地结合蛋白质。例如，添加额外的组氨酸（如组氨酸标签）会增加对镍离子的亲和力，通常会使得带有组氨酸标签的蛋白质成为例如大肠杆菌提取物中其他蛋白质的最强结合物。

表2 Ni NTA Agarose Beads 6FF的特点

基质	高交联球形琼脂糖，6%
平均粒径 ¹	90 μm (d _{50v})
流速	在温度为20°C、柱高1米、柱床高度20厘米的条件下，使用与水在3 bar (0.3 MPa) 以下时粘度相同的缓冲液，流速可达700厘米/小时。
动态结合载量 ²	大约50 mg His ⁶ 标记蛋白/ mL填料
pH工作范围	2 – 12
pH 稳定性 ³	短期：2 – 14 长期：2 – 12
工作温度	4°C – 30°C
化学稳定性	所有常用的水缓冲液，1 M醋酸，1 M NaOH ⁴ ，8 M尿素，6 M盐酸胍，30%异丙醇，70%乙醇



储存溶液	20%乙醇
------	-------

- ¹ d_{50v} 是累积体积分布中的中等颗粒大小。
- ² 在Tricorn™ 5/100柱中，以1分钟的停留时间、600 cm/h的流速，在50 mM Tris-HCl缓冲液 (pH 8.0) 中测量的10%穿透时的动态结合能力。
- ³ 短期pH：可以在不影响功能的情况下进行清洁或消毒的pH范围。长期pH：可以在不影响功能的情况下操作的pH范围。

带Ni²⁺电荷的填料与所有常用的水性缓冲液、还原剂、变性剂（如6M Gua-HCl和8M 尿素）以及一系列其他添加剂兼容（见表3）。

表3 Ni NTA Agarose Beads 6FF至少在给定浓度下与下列化合物相容

还原剂	5 mM DTE 5 mM DTT 20 mM β-mercaptoethanol 5 mM TCEP 10 mM reduced glutathione
变性剂	8 M urea 6 M guanidine hydrochloride
去污剂	2 % Triton X-100 (nonionic) 2 % Tween 20 (nonionic) 2% NP-40 (nonionic) 2 % cholate (anionic) 1 % CHAPS (zwitterionic)
其它添加剂	500 mM imidazole 20 % ethanol 50 % glycerol 100 mM Na ₂ SO ₄ 1.5 M NaCl 1 mM EDTA 60 mM citrate
缓冲试剂	50 mM sodium phosphate, pH 7.4



	100 mM Tris-HCl, pH 7.4
	100 mM Tris-acetate, pH 7.4
	100 mM HEPES, pH 7.4
	100 mM MOPS, pH 7.4
	100 mM sodium acetate, pH 4

二、通用知识

预装柱预先充入镍离子(Ni^{2+})。一般来说, Ni^{2+} 是纯化重组组氨酸标签蛋白的首选金属离子。然而, 在某些情况下, 测试其他金属离子(如 Zn^{2+} 和 Co^{2+})可能是明智的, 因为结合强度取决于组氨酸标签蛋白的性质以及金属离子(参见优化部分)。

我们建议在存在0.5-1.0 M NaCl的情况下, 在中性至略碱性pH(pH 7-8)下进行结合。通常使用磷酸钠缓冲液。Tris-HCl通常可以使用, 但在金属-蛋白亲和力很弱的情况下应避免使用, 因为它可能会降低结合强度。避免在缓冲液中使用螯合剂, 如EDTA或柠檬酸盐, 参见表3。通常使用咪唑进行组氨酸标签蛋白的洗脱。

在缓冲液和样品中加入盐(如0.5-1.0 M NaCl)可以消除离子交换效应, 但也会对蛋白质的保留产生微小影响。

在结合和洗涤缓冲液中使用低浓度的咪唑可以最小化宿主细胞蛋白的结合。同样地, 在样本中加入咪唑也是很重要的(通常与洗涤缓冲液中的浓度相同)。在较高浓度时, 咪唑也可能会降低带有组氨酸标签的蛋白质的结合能力。因此, 必须优化咪唑的浓度, 以确保高纯度(低宿主细胞蛋白质结合)和高产量之间的最佳平衡。

(与组氨酸标签目标蛋白的强结合)。用于获得最佳纯化结果的咪唑浓度因蛋白质而异, 使用高度纯化的咪唑; 这种咪唑在280纳米处几乎不吸收。

作为咪唑洗脱的替代方法, 可以通过多种方法或方法组合将组氨酸标签蛋白从介质中洗脱出来——例如, 在2.5至7.5的pH范围内降低pH。在pH值低于4时, 金属离子将从介质中被去除。

注意: 如果蛋白质对低pH敏感, 我们建议将洗脱的馏分收集在含有1M Tris-HCl (60-200 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 馏分)的试管中, 以将pH恢复到中性。

EGTA和EDTA会从介质中去除金属离子, 从而导致蛋白质洗脱, 但目标池中将含有 Ni^{2+} 离子。在这种情况下, 可以通过脱盐来去除 Ni^{2+} 离子(参见表3)。对于要求纯化过程中的泄漏极低的应用, 可以通过进行空白运行降低泄漏。同样, 在向缓冲液/含有还原剂的样本中添加样品之前, 也应进行空白运行。



预装柱都可以通过注射器、蠕动泵或色谱系统进行操作。

三、预备实验

缓冲液配制

用于缓冲液配制的水和化学试剂应为高纯度。使用0.22 μ m或0.45 μ m滤膜过滤缓冲液后再使用。

使用高纯度咪唑，因为其在280 nm处的吸光度非常低或为零。

推荐缓冲液：

结合缓冲液：20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 20–40 mM imidazole, pH 7.4（咪唑的理想浓度取决于蛋白质；20-40毫摩尔适用于许多蛋白质。）

洗脱缓冲液：20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4（洗脱所需的咪唑浓度取决于蛋白质。）

如果重组的组氨酸标签蛋白以包涵体形式表达，请在所有缓冲液和样品中加入6摩尔盐酸胍或8摩尔尿素。可能可以在柱上使变性的蛋白质重新折叠。

注意：当使用高浓度的盐酸胍或尿素时，蛋白质通常会解折叠。柱上（或洗脱后）的原位折叠取决于蛋白质。

提示：含有尿素的样品可以直接通过SDS-PAGE进行分析，而含有盐酸胍的样品必须在SDS-PAGE之前用不含尿素的缓冲液进行缓冲液交换。

样品制备

通过向样品中添加缓冲液、NaCl、咪唑以及从浓缩的溶液中添加添加剂来调整样品的组成和pH值；或者通过用结合缓冲液稀释样品；或者通过缓冲液交换（见表3）。不要使用强酸或强碱进行pH调整（有沉淀的风险）。

用0.22微米或0.45微米滤膜过滤样品，或者在将样品应用于柱子之前立即离心。

为了防止暴露的组氨酸与宿主细胞蛋白结合，在样品和结合缓冲液中加入咪唑是至关重要的（见优化部分）。

四、纯化操作

1. 用蒸馏水填充注射器或泵管。取出橡皮塞，将色谱柱连接到注射器（使用提供的适配器）、实验室泵或色谱系统管线，以“drop-to-drop”的方式连接，以避免将空气引入系统。

2. 将柱出口处的快拆端取下。



3. 用3-5倍柱体积的蒸馏水清洗柱子。
4. 至少用5个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。1毫升和5毫升柱子的推荐流速分别为1毫升/分钟或5毫升/分钟。在进行最终平衡/样品分析之前，在某些情况下建议先进行空白运行。
5. 使用注射器或泵将预处理后的样本应用于样品上。
6. 用结合缓冲液洗涤，直到吸光度达到稳定的基线（通常至少需要10-15个柱体积）。

注意：在样品和结合缓冲液中加入咪唑可以提高纯化效果。

7. 用一步法或线性梯度洗脱。

对于一步洗脱，通常需要5个柱体积的洗脱缓冲液。

例如，一个20个柱体积以上的线性梯度（如线性梯度）可以分离具有相似结合强度的蛋白质。

注意：Ni NTA Agarose Beads 6FF与还原剂兼容。然而，在使用包括还原剂在内的缓冲液/样品之前，建议进行不包含还原剂的空白运行以去除任何弱结合的镍离子（如以下所述）。在不使用时，不要将预装柱置于包含还原剂的缓冲液中。

空白运行：

使用不含还原剂的结合缓冲液和洗脱缓冲液。

1. 用5倍柱体积的蒸馏水清洗柱子（以去除20%的乙醇）。
2. 用5倍柱体积的洗脱缓冲液洗涤。
3. 用10倍柱体积的结合缓冲液平衡。

五、优化方法

咪唑的浓度

低浓度的咪唑通常用于结合和洗涤缓冲液中，以最小化宿主细胞蛋白的结合。出于同样的原因，在样品中（通常与洗涤缓冲液中的浓度相同）含有咪唑也很重要。在较高浓度时，咪唑也可能会降低组氨酸标记蛋白的结合。因此，必须优化咪唑的浓度以确保最佳的平衡，即高纯度（低宿主细胞蛋白结合）和高产量（强组氨酸靶蛋白结合）。对于不同的组氨酸标记蛋白，该最佳浓度不同。为特定的组氨酸标记蛋白找到最佳的咪唑浓度是一个反复尝试的过程，但对于许多蛋白质来说，在结合和洗涤缓冲液中使用20-40 mM的咪唑是一个不错的起点。使用高纯度的咪唑，例如在280 nm处几乎不吸收。



选择金属离子

Ni^{2+} 通常是纯化大多数带有组氨酸标签的重组蛋白中非标签宿主细胞蛋白的首选金属离子，也是最常用的离子。蛋白质与金属离子之间的结合强度受到多种因素的影响，包括蛋白质上亲和标签的长度、位置和暴露程度，使用的离子类型以及缓冲液的pH值，因此某些蛋白质可能更容易用除 Ni^{2+} 以外的离子进行纯化。

一项研究比较了使用不同金属离子纯化六个带有组氨酸标签的重组蛋白（包括三种麦芽糖结合蛋白的变体）的结果，结果表明 Ni^{2+} 通常在组氨酸标签蛋白与非标签宿主细胞蛋白之间提供最佳的选择性。

六、填料再生

注意：如果要纯化同一种蛋白质，则不需要在每次纯化后都脱柱再生；在大约进行5次纯化之后，根据细胞提取物、提取体积、目标蛋白质等情况，只需填料再生一次即可。

推荐的脱镍缓冲液：20 mM磷酸钠、0.5 M NaCl、100 mM EDTA, pH 7.4

使用至少5-10倍柱体积的脱柱缓冲液洗涤柱子。在重新再生之前，使用至少5-10倍柱体积的结合缓冲液和蒸馏水洗涤柱子。

用水洗涤后的柱子可以通过0.1 M NiSO_4 溶液来重新挂镍。也可以使用其他金属盐、氯化物或硫酸盐。在储存在20%乙醇之前，用水洗涤5倍柱体积，并使用5倍柱体积的结合缓冲液（以调节pH）。

七、在线清洗

当看到背压增加时，应该清洗柱子。在清洗之前，按照上述推荐的步骤去除 Ni^{2+} 离子。

清洗后，将其存放在20%的乙醇中（用5柱体积的乙醇清洗）或在存放前用 Ni^{2+} 重新充电。

可以使用以下方法清洗 Ni^{2+} 去除的柱子：

- 用至少5倍柱体积的1.5 M NaCl溶液去除离子结合的蛋白质，然后用约10倍柱体积的蒸馏水清洗。
- 用1 M NaOH溶液清洗柱子，接触时间通常为1-2小时（12小时或更长时间用于去除内毒素）。然后用约10柱体积的结合缓冲液清洗，再用5-10柱体积的蒸馏水清洗。
- 用5-10柱体积的30%异丙醇（约15-20分钟）清洗以去除亲水性结合的蛋白质、脂蛋白和脂质。然后用约10柱体积的蒸馏水清洗。

或者，在碱性或酸性溶液中使用2柱体积的洗涤剂清洗。例如，在0.1 M醋酸（pH 1.0）中使用0.1-0.5%的非离子洗涤剂，接触时间1-2小时。治疗后，请用至少7倍柱体积的70%



乙醇溶液洗涤以去除残留的洗涤剂。

然后用约10倍柱体积的蒸馏水洗涤。

八、储存条件

将预装柱保存在20%乙醇中，温度为4至30°C。

九、故障排除

柱子被堵塞：

- 样品中的细胞碎片可能会堵塞柱子。请按照“在线清洗”部分进行清洗。
- 重要的是要通过0.22 μm或0.45 μm滤膜对样本进行离心和/或过滤。

样本太粘稠：

• 如果裂解液由于宿主核酸浓度较高而过于粘稠，请继续超声处理直至粘度降低，或者添加5 μg/ml的DNase I、1 mM的Mg²⁺，并在冰上孵育10-15分钟。或者，将裂解液通过注射器针头几次。

蛋白质难以溶解或在纯化过程中沉淀：

• 可以使用以下添加剂：2% Triton™ X-100、2% Tween™ 20、2% NP-轻轻搅拌30分钟以帮助溶解带有标签的蛋白质（包含体可能需要更长时间的搅拌）。请注意，Triton X-100和NP-40（而非Tween）在280纳米处有较高的吸光度。此外，洗涤剂不易通过缓冲液交换去除。

纯化后的组分中未检测到带有组氨酸标签的蛋白质：

• 洗脱条件太温和（组氨酸标签蛋白仍结合在柱上）：采用逐步增加咪唑浓度或降低pH的方法确定最佳洗脱条件。

• 蛋白质在柱上沉淀：下次实验时，减少样品量或通过使用线性咪唑梯度代替等度咪唑步骤来降低蛋白质浓度。尝试使用去污剂或改变NaCl浓度，或在变性（解折叠）条件下洗脱（使用4-8 M脲或4-6 M胍-HCl）。

• 非特异性疏水或其他相互作用：向洗脱缓冲液中添加非离子型去污剂（例如0.2% Triton X-100）或增加NaCl浓度。

• 样品和/或结合缓冲液中的咪唑浓度过高：蛋白质存在于流出物中。降低咪唑浓度。

• 组氨酸标签可能暴露不足：蛋白质存在于流出物中；对于包涵体，采用尿素或胍-HCl对未折叠蛋白进行纯化。为了尽量减少样品稀释，可将固体尿素或胍-HCl添加到样品中。缓冲液/样本组成不正确：在流出物中发现了蛋白质。检查样本和结合缓冲液的pH值和组成。确保样本中没有高浓度的螯合剂或强还原剂，以及咪唑的浓度不要太高。



带有组氨酸标签的蛋白在沉淀物中被发现：

在制备细菌裂解物样品的过程中进行的SDS-PAGE分析可能表明，大多数带有组氨酸标签的蛋白位于离心沉淀物中。可能的原因和解决方法如下：

- 超声处理可能不足：可以通过显微镜观察或通过测量A260处的核酸释放情况来检查细胞破碎情况。在超声处理前加入溶菌酶（在25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中加入0.1体积的10 mg/ml溶菌酶溶液）可以改善结果。避免起泡和过热，因为这可能会使目标蛋白变性。过度超声也会导致宿主蛋白与目标蛋白共纯化。

- 蛋白可能不溶（包涵体）：通常可以使用如4-6 M 胍-HCl、4-8 M 尿素或强洗涤剂 etc 通用变性剂从包涵体中溶解（并展开）蛋白。

准备含有20 mM 磷酸钠、8 M 尿素或6 M 胍-HCl以及合适浓度的咪唑 (pH 7.4-7.6) 的缓冲液。使用这些缓冲液进行样本准备、结合缓冲液和洗脱缓冲液。对于样本制备和结合缓冲液，可使用10-20 mM的咪唑或在优化试验中选定的浓度（包括尿素或胍-HCl）。为了尽量减少样本的稀释，可添加固体尿素或胍-HCl。

洗脱的蛋白质不纯（SDS聚丙烯酰胺凝胶上有多个条带）：

- 标签蛋白被蛋白酶部分降解：添加蛋白酶抑制剂（谨慎使用EDTA）。
- 污染物与镍离子具有高亲和力：用逐步或线性咪唑梯度洗脱以确定用于结合和洗涤的最佳咪唑浓度；向样品中加入与结合缓冲液中相同浓度的咪唑。用尽可能高浓度的含有咪唑的结合缓冲液洗涤后再进行洗脱。在洗脱前，使用尽可能高浓度的咪唑，但不要导致标签蛋白的洗脱。浅咪唑梯度（20柱体积或更多）可能分离出具有相似结合强度的蛋白质。如果优化条件不能去除污染物，可能需要进一步采用离子交换色谱和/或凝胶过滤进行纯化。

- 污染物与标签蛋白结合：在超声细胞之前添加去垢剂和/或还原剂。增加洗涤剂浓度（例如使用2%的吐温20或2%的吐温X-100），或者向洗涤缓冲液中添加甘油（至多50%），以破坏非特异性相互作用。

带有组氨酸标签的蛋白质在样品加载/洗涤过程中被洗脱：

- 缓冲液/样品组成不正确：检查样品和结合缓冲液的pH和组成。确保样品中不含过高浓度的螯合剂或强还原剂，并且咪唑的浓度不高。

- 组氨酸标签部分受损：在变性条件下纯化（使用4-8M胍或4-6M胍-HCl）。

- 柱容量已达到极限：将两个或三个1 ml预装柱连接在一起，或者更换为5 ml预装柱或20 ml预装柱。

十、更多信息



更多有关优化、故障排除、清洗等其他主题的信息可以在[公众号：千株松生物](#)上查找。

十一、订购信息

产品名称	产品规格	产品货号
Capto Q预装柱	1 ml, 5ml, 20ml	QS01048A
SP 预装柱		QS01047A
Ni NTA Agarose Beads 6FF预装柱		QS01002A
Ni TED Agarose Beads 6FF预装柱		QS01003A
Glutathione Agarose Beads 4FF预装柱		QS01012A
rProtein A Agarose 4FF预装柱		QS01008A
rProtein G Agarose 4FF预装柱		QS01009A