

Ni-TED Chromrose[®] 6FF 使用指南

1 摘要

科诺赛生物研发的Ni亲和层析介质属于一类金属螯合介质,以高流速琼脂糖为基质,以IDA、NTA、TED为配基,并螯合金属离子Ni²⁺而形成的一种亲和层析介质,因螯合方式不同,Ni²⁺离子结合力也存在细微差距,在对不同蛋白的纯化过程中表现出不同的选择性,广泛用于His标签蛋白的分离纯化,其中,Ni-TED Chromrose[®]6FF可耐受100mM EDTA和10mM DTT,在含有EDTA及DTT的情况下直接进行目的蛋白纯化,此介质的清洗再生工作简单,无需脱镍直接进行NaOH清洗。

2 技术指标

名称	Ni-TED Chromrose [®] 6FF
配基	三(羧甲基)乙二胺(TED)
基质	6%高度交联琼脂糖
螯合量	30~60μmol/mL
每毫升载量	30mg His标签蛋白
平均粒径	90μm,分布45~165μm
推荐流速	150~600cm/h (根据柱子规格选择合适流速)
最大耐压	0.3MPa
pH稳定性	3~12(工作) 2~14(清洗)
化学稳定性	0.01M 盐酸、0.01M 氢氧化钠(一周);100mM EDTA、10mM DTT、1M 氢氧化钠、8M 尿素、6M 盐酸胍(24小时);100mM EDTA、0.5M 咪唑(2小时);30% 异丙醇(20分钟)。
储存	2~8℃(20%乙醇)
应用	用于生物制药和生物工程下游蛋白质、及多肽的分离纯化,尤其是组氨酸标记蛋白质的高效制备

3 操作说明

Ni-TED Chromrose[®]6FF可以在实验室被填充到HiQumn[®]中压层析柱中,以扩大产量。将填料填充到层析柱中,根据样本量和填料载量选择合适的层析柱和柱高。

3.1 缓冲液准备

所用缓冲液需要采用高纯水配制,使用前建议用0.45μm滤膜过滤。

平衡缓冲液:0.2M NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, PH=7.4
淋洗缓冲液:0.2M NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, 30mM 咪唑, PH=7.4



洗脱缓冲液:0.2M NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, 500mM 咪唑, PH=7.4

3.2 样品准备

样品所在溶液要和平衡液保持一致,可以用平衡液进行裂解、透析/超滤/G25进行缓冲液置换。

样品过滤(平均粒径<45μm,用0.22μm过滤;45μm<平均粒径<165μm,用0.45μm过滤;平均粒径>165μm,用0.8μm过滤)。

3.3 样品纯化

- 1) 用3~5CV的纯水冲洗出存储缓冲液;
- 2) 用5~10CV的平衡缓冲液平衡层析柱,至流出液电导与pH不变(与平衡液一致);
- 3) 利用泵或者上样环上样;
- 4) 上样完毕后用淋洗缓冲液冲洗10~15CV,至基线稳定;
- 5) 用洗脱缓冲液采用一步法或线性梯度洗脱。一步洗脱一般5CV,梯度洗脱可以用一个小的梯度,例如20倍柱体积来分离不同结合强度的蛋白;
- 6) 依次用3CV平衡缓冲液,5CV纯水,2CV 20%乙醇冲洗层析柱后,置于2~8℃保存。

3.4 在位清洗

当填料在使用过程中发现反压过高或者填料上出现明显污染,需要进行在位清洗操作。

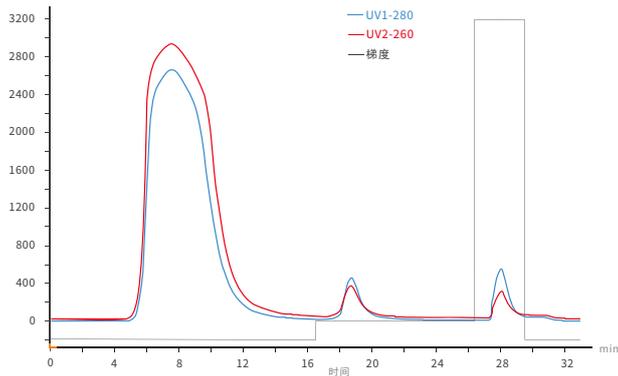
1) 去除强疏水性结合的蛋白、脂蛋白和脂类

方法一:使用30%异丙醇清洗5~10CV,接触时间为15~20min可以去除此类污染物,再用10CV的纯水清洗;

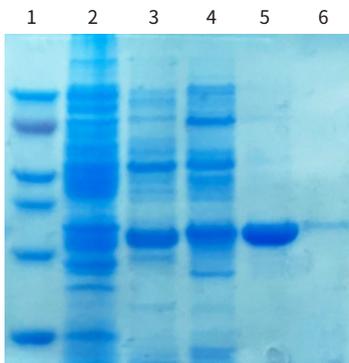
方法二:使用0.3M或0.5M NaOH溶液冲洗填料3CV,然后用10~15CV的纯水清洗。

2) 去除离子作用结合的蛋白

使用1.5M NaCl溶液清洗10~15min,再用10CV纯水清洗,清洗好的柱子用2CV的20%乙醇冲洗,置于2~8℃保存。

图1. Ni-TED Chromrose[®]6FF 纯化青霉素酶发酵液谱图

- ▶ 层析介质: Ni-TED Chromrose[®]6FF
- ▶ 样品: 青霉素酶发酵液
- ▶ 实验设备: 1 mL Xtrap Ni-TED 6FF 镍凝胶柱、蛋白纯化仪
- ▶ 平衡缓冲液: 0.2M NaCl 50mM Tris-Hcl 0.1mM EDTA PH7.4
- ▶ 淋洗缓冲液: 0.2M NaCl 50mM Tris-Hcl 0.1mM EDTA 30mM 咪唑 PH7.4
- ▶ 洗脱缓冲液: 0.2M NaCl 50mM Tris-Hcl 0.1mM EDTA 500mM 咪唑 PH7.4
- ▶ 样品处理: 青霉素酶发酵液经离心过滤后取上清pH调至7.4。
- ▶ 纯化过程: 填料装柱1mL, 平衡缓冲液平衡10CV; 样品上样, 流速为0.5mL/min; 用10CV淋洗缓冲液洗杂; 用洗脱缓冲液洗脱, 流速1mL/min。



- L1. Marker
- L2. 原样
- L3. 流穿
- L4. 30mM咪唑洗脱
- L5. 50mM咪唑洗脱
- L6. 1M咪唑洗脱

图2. Ni-TED Chromrose[®]6FF 纯化青霉素酶发酵液电泳图

5 订货信息

Ni-TED 预装柱

货号	产品名称	规格
31-0280-01	Xtrap Ni-TED 6FF	1mL
31-0280-05	Xtrap Ni-TED 6FF	5mL
31-0280-10	Xtrap Ni-TED 6FF	8x100mm

Ni-TED 层析介质

货号	产品名称	规格
11-0280-03	Ni-TED Chromrose [®] 6FF	100mL
11-0280-04	Ni-TED Chromrose [®] 6FF	500mL
11-0280-05	Ni-TED Chromrose [®] 6FF	1L
11-0280-07	Ni-TED Chromrose [®] 6FF	10L

1. Ni-TED Chromrose[®]6FF层析介质可提供试用装
2. 如需更大包装可联系我公司销售人员

非常感谢您订购科诺赛生物的产品!
 如需了解最新产品信息, 请拨打服务热线 0532-55679191
 或者发邮件至 marketing@chromsep.cn
 或者登陆我们官方网站 www.chromsep.cn