

镍-琼脂糖凝胶 6FF

产品货号: CS20361

储存条件: RT

产品规格: 25 mL/100 mL

英文名称: Ni Sepharose 6 Fast Flow

性能参数:

基质	6%交联琼脂糖凝胶
配体	Ni ²⁺
配体密度	10-15 μmol /mL
吸附载量	15 mg/mL
颗粒大小	45-165 μm
最大流速	300 cm/h
pH范围	3-10, 在位清洗时pH范围可到2-11
化学稳定性	0.01 M HCl, 0.1 M NaOH
保存温度	4-25°C
保存液体	20%乙醇

检测条件: 层析柱 16mm×200mm, 柱床高 5cm, 25°C

产品说明:

金属螯合亲和层析介质, 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如 Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Fe³⁺发生特殊的相互作用, 能够吸附富含这类氨基酸的蛋白质, 从而达到分离纯化的目的。因此, 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。一般来说, Ni²⁺是用于纯化组氨酸标记的蛋白质的优选金属离子。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于组氨酸残基与金属离子的结合力。镍-琼脂糖凝胶 6FF 具有特异性好、流速快等优点。

使用说明:

(一) 相关溶液配制方法:

1. 非变性裂解液 (1L):

50 mM Tris: 6.06 g; 500 mM NaCl: 29.22 g; 用盐酸调 pH 至 7.5。

2. 非变性洗涤液 (1L) :

50 mM Tris, 6.06 g; 500 mM NaCl, 29.22 g; 10-20 mM imidazole, 0.68-1.36 g; 用盐酸调 pH 至 7.5。

3. 非变性洗脱液 (1L) :

50 mM Tris, 6.06 g; 500 mM NaCl, 29.22 g; 250 mM imidazole, 17.02; 用盐酸调 pH 至 7.5。

4. 变性裂解液 (1L) :

50 mM Tris, 6.06 g; 500 mM NaCl, 29.22 g; 8M 尿素, 480.48 g 或 6M 盐酸胍, 573.18 g; 用盐酸调 pH 至 7.5。

5. 变性洗涤液 (1L) :

50 mM Tris, 6.06 g; 500 mM NaCl, 29.22 g; 8M 尿素, 480.48 g 或 6M 盐酸胍, 573.18 g; 10-20 mM imidazole 0.68-1.36 g; 用盐酸调 pH 至 7.5。

6. 变性洗脱液 (1L) :

50 mM Tris 6.06 g; 500 mM NaCl 29.22 g; 8M 尿素, 480.48 g 或 6M 盐酸胍, 573.18 g; 250 mM imidazole 17.02 g; 用盐酸调 pH 至 7.5。

(二) 样品的制备

收集菌液至离心管中, 4,000 g, 4°C 离心 20 min 或 15,000 g, 4°C 离心 1min, 弃上清, 收集沉淀。随后即可进入细菌裂解步骤, 也可以在 -20°C 或 -80°C 冻存储备。冷冻保存的菌体使用前需置于冰上解冻 15 min。

(三) 非变性条件下 His 标签蛋白的小量纯化

1. 1 mL 菌液沉淀加入 100 μ L 非变性裂解液, 将细菌沉淀充分重悬, 可轻微涡旋振荡或移液器吹打, 尽量避免产生气泡。

注: 根据 His 标签重组蛋白表达的丰度, 菌液和裂解液的体积比可以在 25:1 至 5:1 范围内适当调整。表达丰度非常高时, 每毫升菌液沉淀可以加入 200 μ L 裂解液; 表达丰度非常低时, 每毫升菌液沉淀可以加入 40 μ L 裂解液。裂解后可以直接用于 SDS-PAGE。如有必要, 可以在裂解细菌之前, 在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂。

2. 加入溶菌酶至 1 mg/mL 并轻轻混匀, 尽量避免产生气泡, 冰上放置 30 min。

注: 也可以直接冰上超声裂解细菌, 超声功率 200-300 W, 每次超声处理 10 s, 间隔 10 s, 超声处理 6 次, 随后进入步骤 4。须根据特定型号的超声仪器进行摸索和优化具体超声处理的方式。

3. 轻轻涡旋振荡数下, 以充分裂解细菌, 尽量避免产生气泡。

4. 4°C, 15000 g 离心 10 min, 取 10 μ L 上清留作后续检测, 收集余下上清至一新的洁净离心管中。

5. 加入 20 μ L 混合均匀的凝胶, 4°C 摇床上缓慢摇动 30 min, 以充分结合带 His 标签的目的蛋白。

注: 可以缓慢摇动更长时间甚至缓慢摇动过夜。

6. 4°C, 1000 g离心10 s沉淀凝胶, 取20 μL上清留作后续检测, 其余上清弃去。
7. 加入100 μL非变性洗涤液重悬凝胶, 4°C, 1000 g离心10 s, 取20 μL上清留作后续检测, 弃去其余上清。
8. 重复步骤7, 再进行一次洗涤。
9. 加入20 μL非变性洗脱液, 轻轻重悬凝胶。4°C, 1000 g离心10 s, 收集上清及凝胶。上清即为纯化的带有His标签的目的蛋白。
10. 重复步骤9两次。共洗脱收集约60 μL纯化的蛋白样品。

(四) 变性条件下His标签蛋白的小量纯化

1. 1 mL菌液沉淀加入100 μL变性裂解液, 将细菌沉淀充分重悬, 可轻微漩涡振荡, 尽量避免产生气泡。
注: 根据His标签重组蛋白表达的丰度, 菌液和裂解液的体积比可以在25:1-5:1范围内适当调整。表达丰度非常高时, 每毫升菌液沉淀可以加入200 μL裂解液; 表达丰度非常低时, 每毫升菌液沉淀可以加入40 μL裂解液。含尿素的裂解液裂解产物可以直接用于SDS-PAGE, 含盐酸胍的裂解液裂解产物需透析除去盐酸胍才可用于SDS-PAGE。
2. 冰上超声裂解细菌。超声功率200-300 W, 每次超声处理10 s, 间隔10 s, 超声处理6次。须根据特定型号的超声仪器进行摸索和优化具体超声处理的方式。
3. 4°C, 15000 g离心10 min, 取10 μL上清留作后续检测, 收集余下上清至一新的洁净离心管中。
4. 加入20 μL混合均匀的50%凝胶, 4°C摇床上缓慢摇动30 min, 以充分结合带His标签的目的蛋白。
注: 可以缓慢摇动更长时间甚至缓慢摇动过夜。
5. 4°C, 1000 g离心10 s沉淀凝胶, 取20 μL上清留作后续检测, 弃去其余上清。
6. 加入50-100 μL变性裂解液重悬凝胶, 4°C, 1000 g离心10 s, 取20 μL上清留作后续检测, 弃去其余上清。
7. 重复步骤6, 再进行一次洗涤。
8. 加入20 μL变性洗脱液, 轻轻重悬凝胶。4°C, 1000 g离心10 s, 收集上清及凝胶。上清即为纯化的带有His标签的目的蛋白。
9. 重复步骤8两次。共洗脱收集约60 μL纯化的蛋白样品。

注意事项:

1. 请勿在-20°C或更低温度冻存本产品。
2. 本产品使用过程中, 缓冲试剂如Tris、HEPES、MOPS等的浓度不宜超过100mM, SDS和sarkosyl的浓度不宜超过0.3%, Triton X-100、Tween-20、NP-40的浓度不宜超过2%, 脱氧胆酸钠、CHAPS的浓度不宜超过1%, 组氨酸浓度不宜超过20 mM, 钙离子浓度不宜超过5 mM。钠离子和镁离子浓度可以高达2 M, 盐酸胍浓度可以高达6 M, 尿素浓度可以高达8 M, 甘油浓度可以高达50%。本产品不能耐受还原剂、螯合剂和强酸强碱。其它未提及试剂的兼容性可以参考上述试剂, 但还有待实验验证。

3. 保存和纯化过程中应始终保持凝胶湿润。
4. 若离心不能完全除去蛋白样品中的不溶物，可以将样品溶液用 0.45 μ m 的滤膜过滤。
5. 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作，并应始终放置在 4°C 或冰浴，以减缓蛋白降解。为有效抑制蛋白降解，可以在裂解液中添加适量的蛋白酶抑制剂。
6. 若使用本说明书提供的条件无法达到理想的纯化效果，可尝试改变洗涤液和洗脱液中咪唑的浓度或其 pH，以达到最优效果。

凝胶再生：

纯化相同的蛋白质可以纯化 5-7 次后再进行再生，再生的凝胶最好用于相同蛋白的纯化。凝胶最多再生 3-4 次，一次或多次再生后，凝胶的蛋白结合能力会有所下降，并且非特异性结合也会升高。

具体步骤如下：

1. 5 倍柱体积的去离子水洗柱一次。
2. 1 倍柱体积的 25%、50%、75%乙醇各洗柱一次。
3. 5 倍柱体积的 100%乙醇洗柱一次。
4. 1 倍柱体积的 75%、50%、25%乙醇各洗柱一次。
5. 2 倍柱体积的去离子水洗柱一次。
6. 2 倍柱体积的 200 mM EDTA (pH 8.0)，洗柱一次。
7. 5 倍柱体积的去离子水洗柱一次。
8. 3 倍柱体积的 50 mM NiSO₄ 洗柱一次。
9. 3 倍柱体积的非变性裂解液洗柱一次。
10. 加入 3 倍柱体积的去离子水洗柱一次。
11. 随后把凝胶存放在 20%乙醇中，4°C 保存。

常见问题：

如果纯化不成功，可以对纯化过程中收集的每个组分进行 SDS-PAGE 电泳检测，并分析其原因。

1. 蛋白无法与凝胶结合

- a. 测序检查基因序列的读码框是否正确。
- b. 尝试将标签加在蛋白的另一端。
- c. 增加凝胶与蛋白结合时间，如 4°C 过夜。
- d. 如果使用预装柱，可收集裂解液上柱后的穿流液并多次重复上柱。
- e. 检查所有缓冲液和溶液的 pH 值是否正确。

f. 确认体系中所用各种试剂的浓度在镍柱的耐受范围以内。

g. 降低裂解液中的咪唑浓度。

2. 目的蛋白被洗涤液洗脱

a. 降低洗涤液中的咪唑浓度或者稍微提高其 pH 值。

b. 检查洗涤液的 pH 和成分。

c. 确认洗涤液中各种试剂的浓度在耐受范围内。

3. 蛋白在纯化过程中形成沉淀

a. 将纯化温度控制在室温。

b. 加入去垢剂，如 0.1% Triton X-100 或者 Tween-20。

4. 蛋白无法洗脱

a. 用梯度 pH 及咪唑洗脱，确定最优洗脱条件。

5. 目的蛋白与其它蛋白共同洗脱

a. 提高裂解液和洗涤液中的咪唑浓度。

b. 降低凝胶使用量。

c. 增加盐或者去垢剂浓度，或者向洗涤液中加入乙醇或甘油以降低非特异相互作用。

d. 检查基因内部是否含有起始密码子（C 端标记蛋白）或者提前终止位点（N 端标记蛋白）。