

High Affinity Ni-Charged Resin FF

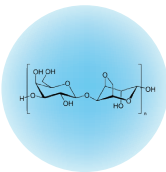
高亲和性镍树脂FF



Agaros系列填料

Agaros的结构

- 基本结构是1,3连结的β-D-半乳糖和1,4连结的3,6-内醚-L-半乳糖交替连接起来的长链。
- 含糖浓度（一般也称为交联度）为2%、4%、6%时分别称为2B、4B、6B。



琼脂糖微球

Agaros 2/4/6B

- 适合分离分子量大小差异大，对分辨率要求不高的样本。
- Agaros 6B： 分离范围10 k-4000 k
- Agaros 4B： 分离范围 60 k-20000 k

Ni- (NTA,IDA,TED) -IMAC的技术原理

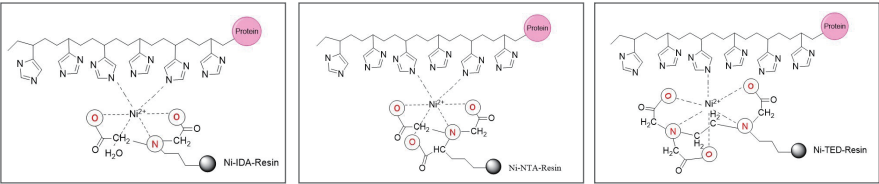


图1 Ni- (NTA,IDA,TED) -Resin亲和原理

来源：《Methods in Enzymology》

基质/基架	可以共价偶联配基的高分子聚合材料。
间隔臂	减少空间位阻效应，大大增加配基对待分离的生物大分子的吸附效率，如：PEG和脂肪链等。
配基	和目标物有特异性相互作用的物质，如：Ni-IDA、Ni-NTA、Ni-TED。
配位化学	研究金属的原子或离子与无机、有机的离子或分子相互反应形成配位化合物的特点以及它们的成键、结构、反应、分类和制备的学科。

金斯瑞——His标签蛋白纯化介质选择指南

应用	产品名称	配基	基质	平均粒径	操作压力	动态载量	规格	产品货号
His 标签蛋白 的纯化	Ni-IDA纯化介质	IDA	4%琼脂糖	90 μm	低	>20mg / ml	10/25/50/100ml	L00223
	Ni-NTA纯化介质	NTA	4%琼脂糖	90 μm	低	>20mg / ml	10/25/50/100ml	L00250
	Ni Resin FF	IDA	6%琼脂糖	90 μm	高 <0.3 Mpa (3 bar)	>40mg / ml	10/25/50/100ml	L00465
	High Affinity Ni-Charged Resin FF	NTA	6%琼脂糖	90 μm	高 <0.3 Mpa (3 bar)	>50mg / ml	5/25/100ml	L00666
His标签 蛋白的纯 化(预装 柱)	High Affinity Ni-Charged Resin FF Prepacked Column	NTA	6%琼脂糖	90 μm	高 <0.3 Mpa (3 bar)	>50mg / ml	2/5/25ml	L00683
	Ni-IDA Resin FF Prepacked Column	IDA	6%琼脂糖	90 μm	高 <0.3 Mpa (3 bar)	>40mg / ml	2/5/25ml	L00684

应用案例一：高动态载量

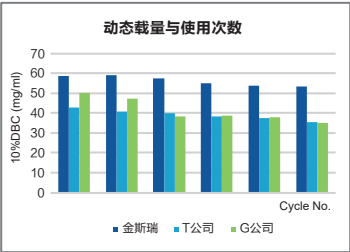
测试条件：

样品：5 mg/ml MBP-His6纯蛋白 (44 kD)

测试产品：1 ml High Affinity Ni-Charged Resin FF Prepacked Column (货号：L00683)

厂商	金斯瑞	T公司	G公司 (Sepharose 6FF)
使用次数	10%DBC (mg/ml)	10%DBC (mg/ml)	10%DBC (mg/ml)
1	58.5	42.82	49.9
2	59.1	40.88	47.04
3	57.45	40.08	38.07
4	54.85	38.34	38.51
5	53.65	37.61	37.83
6	53.65	35.47	34.94

结果：金斯瑞的High Affinity Ni-Charged Resin FF (L00666) 连续使用6次后动态载量无明显降低，其它两家竞品动态载量降幅均在15%以上。

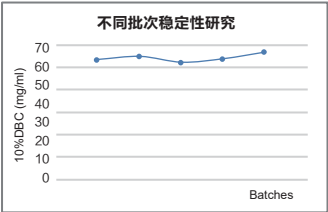


应用案例二：批次间动态载量稳定性高

测试条件：
样品：5 mg/ml MBP-His6纯蛋白 (44 kD)
测试产品：1 ml High Affinity Ni-Charged Resin FF Prepacked Column (货号：L00683)

批次	上样MBP蛋白浓度 (mg/mL)	保留时间 (min)	上样流速 (mL/min)	10% DBC (mg/mL)
C46661910	5	3	0.333	52.85
C46662006	5	3	0.333	54.25
C46662011	5	3	0.333	51.54
C46662005	5	3	0.333	53.2
C46662008	5	3	0.333	56.27

结果：采用相同的条件测试不同批次的L00666,其动态载量均在50mg/ml以上，批间差较小。

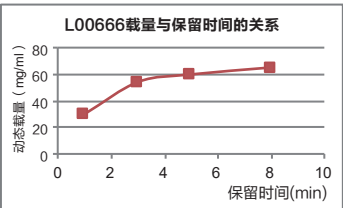


应用案例三：不同保留时间对动态载量的影响

测试条件：
样品：MBP-His6纯蛋白 (44 kD)
测试产品：1 ml High Affinity Ni-Charged Resin FF Prepacked Column (货号：L00683)

厂商	保留时间 (min)	上样蛋白浓度(mg/mL)	流速(mL/min)	动态载量 (mg/mL)
金斯瑞	1	5	1	30.49
	3	5	0.333	54.25
	5	5	0.2	59.55
	8	5	0.125	64.97

结果：随着保留时间的增加，动态载量也会随之增加，最终会趋于最大饱和载量。



应用案例四：大体积纯化案例

测试条件：

产品货号：L00666（High Affinity Ni-Charged Resin FF）

样品：21升大肠杆菌破碎液，目标蛋白分子量14Kda

层析柱信息：BPG 200/500

填料使用量：4 升

流速：700 ml/min

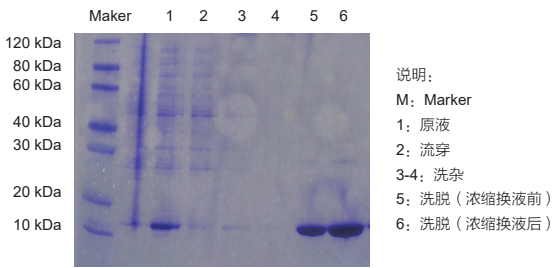
平衡缓冲溶液：60 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0; 500 ml/min, 5*CV

上样缓冲溶液：60 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0; 500 ml/min

洗杂缓冲溶液：60 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10-20 mM imidazole, pH 8.0; 700 ml/min, 10*CV

洗脱缓冲溶液：60 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0; 500 ml/min

浓缩换液：置换到磷酸缓冲盐溶液中。



SDS-PAGE

实验结果：

- (1) 纯化出的目的蛋白纯度如右图SDS-PAGE所示
- (2) 回收蛋白量：89.3g (14kDa)，蛋白回收率85%以上
- (3) 目标蛋白纯度达95%以上。

附录一：在天然条件下纯化多组氨酸标记蛋白所需的缓冲液和配方

名称	体积	配方
裂解平衡缓冲溶液 (LE buffer)	1 L	50 mM NaH_2PO_4 (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 用 NaOH 调节 pH 至 8.0
洗涤缓冲溶液	1 L	50 mM NaH_2PO_4 (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 10 mM imidazole (0.68 g imidazole) 用 NaOH 调节 pH 至 8.0
洗脱缓冲溶液	1 L	50 mM NaH_2PO_4 (7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 250 mM imidazole (17.0 g imidazole) 用 NaOH 调节 pH 至 8.0

附录二：在变性条件下从大肠杆菌中纯化所需的缓冲液和配方

名称	体积	配方
裂解平衡缓冲溶液 (LE buffer)	1 L	100 mM NaH_2PO_4 (15.60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10 mM Tris•Cl (1.21 g Tris, 加入 980mL dd H_2O , 用 HCl 调节 pH 到 8.0, 定容到 1000 mL.) 8 M Urea (480.50 g urea) 用 NaOH 调节 pH 至 8.0
洗涤缓冲溶液	1 L	100 mM NaH_2PO_4 (15.60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10 mM Tris•Cl (1.21 g Tris, add 980mL dd H_2O , 用 HCl 调节 pH 到 8.0, 定容到 1000mL.) 8 M Urea (480.50 g urea) 10 mM imidazole (0.68 g imidazole) 用 NaOH 调节 pH 至 8.0
洗脱缓冲溶液	1 L	100 mM NaH_2PO_4 (15.60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10 mM Tris•Cl (1.21 g Tris, add 980mL dd H_2O , 用 HCl 调节 pH 到 8.0, 定容到 1000mL.) 8 M Urea (480.50 g urea) 250 mM imidazole (17.0 g imidazole) 用 NaOH 调节 pH 至 8.0

附录三：疑难问题处理

问题	原因	解决方案
样品太粘稠	裂解物中含有宿主的核酸	1. 样品中加入1.7 μ/ml Benzonase 和1 mmol/L MgCl ₂ , 在冰上保温15分钟或更长时间 2. 用带针头的注射器反复抽吸, 使核酸断裂分子变小。
	匀浆缓冲溶液体积太小	稀释样品
洗脱不出蛋白	目的蛋白在提取物中浓度很低, 在洗脱液中无法检测到	1. 加大样品上样量 2. 检查和减少非特异性吸附的发生, 如蛋白浓度较低时, 避免使用聚苯乙烯试管, 防止蛋白质通过疏水作用吸附于管壁
	因样品和结合缓冲溶液中咪唑浓度过高, 目的蛋白出现在穿透液中。	降低咪唑浓度
	因PH太低, 目的蛋白出现在穿透液中。	调节样品的PH至7.5 (7.5-8.0), 或匀浆时使用较高缓冲容量的缓冲液。
	因组氨酸标签不突出, 目的蛋白出现在穿透液中	1. 在变性条件下纯化目的蛋白 2. 在质粒上将组氨酸标签序列构建在蛋白质的另一端 3. 纯化膜蛋白时, 溶液中的去污剂微团可能会掩盖组氨酸标签
	因有电子供体复合物干扰目的蛋白的吸附	在纯化前用脱盐SEC, 或增加一步色谱捕获, 将小分子复合物除掉
目的蛋白回收率低	或有EDTA等强整合剂使固定在柱上的金属离子解离	通过加入≥3 mmol/L MgSO ₄ 来消除EDTA的影响
	1. 流速太快 2. 超过了柱子的结合容量	1. 降低流速 2. 增大柱子体积或减少样品体积
	目的蛋白以很强的非特异性吸附在吸附剂上	1. 洗脱液中加入去污剂或有机溶剂以减少疏水性吸附 2. 增加NaCl浓度减少离子相互作用
	加样后的清洗不充分, 非结合杂质未能除去	延长清洗时间或提高咪唑浓度以提高清洗的效果
	洗脱液中咪唑浓度太高, 比目的蛋白结合力强的杂质被洗脱	降低洗脱液中咪唑的浓度
洗脱后组氨酸标签蛋白不纯	目的蛋白中混杂强结合的非标签蛋白	用Tris缓冲溶液代替磷酸缓冲溶液来降低非标签蛋白的结合力, 如果可能, 在洗脱前的清洗过程中使用较高咪唑浓度
	杂蛋白可能与标签蛋白以二硫键结合	加入20 mmol/L 2-巯基乙醇还原。DTT和DTE会还原金属离子, Ni离子被还原后会变为褐色。
	组氨酸标签蛋白与杂蛋白发生缔合	1. 加入特定的蛋白质-蛋白质相互作用抑制剂 2. 非离子型去污剂 3. 加入≥20%乙醇或≥50%甘油以减少疏水相互作用 4. 增加NaCl浓度至1 mol/L以减少静电相互作用
	等电聚焦发现条带增多	使用新鲜的尿素溶液。尿素分解产生的异氰酸盐会不可逆的结合氨甲酰化蛋白的自由氨基基团。
	SDS-PAGE检测到一些蛋白质因天冬氨酸-脯氨酸肽键发生酸性蛋白水解而产生认为条带。	将Tris缓冲溶液替换使用含磷酸缓冲液的SDS上样缓冲液。

附录四：Ni NTA Resin (货号: L00666) 对部分化学试剂的耐受性

试剂类型	化学成分	限度	试剂类型	化学成分	限度
缓冲溶液	Tris-HCl, HEPES	100 mM	盐	NaCl	2 M
	MOPS	100 mM		MgCl ₂	1 M
	Citrate	60 mM		CaCl ₂	5 mM
洗涤剂 (300 mM NaCl 溶液里)	n-Hexadecyl-β-D-maltoside	0.0003% (w/v)	蛋白酶抑制剂	EDTA	1 mM
	n-Tetradecyl-β-D-maltopyranoside	0.005% (w/v)		Complete cocktail (EDTA-free)	1 X concentrated
	n-Tridecyl-β-D-maltopyranoside	0.016% (w/v)		PMSF	1 mM
	Brij 35	0.1% (v/v)		Pepstatin	1 μM
	Digitonin	0.6% (w/v)		E64	1 μM
	Cymal 6	1% (w/v)		Benzamidine	1 mM
	n-Nonyl-β-D-glucopyranoside (NG)	1% (w/v)	变性剂	Urea (尿素)	8 M
	n-Decyl-β-D-maltopyranoside (DM)	2% (w/v)		Gu-HCl (盐酸胍)	6 M
	n-Dodecyl-β-D-maltoside (DDM)	2% (w/v)	氨基酸	Histidine	1-2 mM
	C12-E9	1% (w/v)		Cysteine	不推荐使用
	n-Octyl-β-D-glucopyranoside (OG)	1.5% (w/v)	有机溶剂	Isopropanol (异丙醇)	60% (v/v)
	Triton X-100, Tween, NP-40	2% (v/v)		Ethanol (乙醇)	20% (v/v)
	Triton X-114	2% (v/v)	还原剂	β-ME	20 mM
	Fos-Cholines	0.05% (w/v)		TCEP	5-10 mM
	Dodecylmethyl-phosphineoxide	0.15% (w/v)		DTT	5 mM
	N,N-Dimethyldodecylamine N-oxide (LDAO)	0.7% (w/v)		DTE	5 mM
	CHAPS	1% (w/v)	其他	Imidazole	10-20 mM
	Laurosyl-sarcosine	1% (w/v)		Glycerol	50% (v/v)
	SDS	0.3% (w/v)		EGTA	1 mM

参考文献：《Methods in Enzymology》