

Ni-NTA 琼脂糖凝胶 FF

品名: Ni-NTA 琼脂糖凝胶 FF(镍-次氨基三乙酸琼脂糖凝胶 FF, Nickel Nitrilotriacetic acid SePharose Fast Flow, Ni-NTA SePharose FF)

目录号: BN26315 (中压预装柱)、BN26316 (重力预装柱)

贮存: 20%乙醇, 2-25°C

运输: 2-30°C, 常压、避光

保质期: 5年

相关介绍:

Ni-NTA 琼脂糖凝胶 FF 以琼脂糖微球为基质, 通过活化偶联次氨基三乙酸 (NTA), 再螯合 Ni^{2+} 。与亚氨基二乙酸 (IDA) 相比, 具有更好的螯合剂、还原剂、碱性的耐受性, 如样品中含有 1-10mM EDTA 或 1-10mM β -巯基乙醇或 5mM DTT, 可正常纯化; 在螯合镍的情况下, 也可以用 0.1M NaOH 清洗。

Ni-NTA 琼脂糖凝胶 FF 主要用于纯化带组氨酸标签 (His-Tag) 的重组蛋白。纯化原理是利用重组蛋白组氨酸标签的咪唑环可与过渡金属 Ni^{2+} 形成稳定的配位键, 因此能特异、牢固、可逆地吸附于固定这些金属离子的基质, 结合了 His-Tag 重组蛋白的 Ni-NTA 琼脂糖凝胶 FF 一般通过增加咪唑浓度进行竞争洗脱。

技术指标:

基质	4%琼脂糖凝胶
配基	-N(CH ₂ COOH) ₃
配基密度	≥15 μmol/ml
填料粒径	60~180 μm
最大流速	800 cm/h
推荐流速	50-100 cm/h
pH 稳定性	pH 5-12, pH 3~13
耐反压	0.3 MPa
载量	≥20 mg His-tag 重组蛋白/ml

使用方法:

1、色谱柱装填

- (1) 所有需要用到的材料的温度要与色谱操作的温度一样, 液体最好做脱气处理。
- (2) 在柱子下端加入蒸馏水, 以除去柱子中的空气, 关闭柱子出口, 在柱内保留少量的蒸馏水。
- (3) 将琼脂糖凝胶连续倒入柱子时, 要用玻璃棒的紧靠柱子内壁引流, 以减少气泡的

产生，让填料先自然沉降。

(4) 柱压不超过 0.3MPa，如果装柱系统中无法测柱压，则正常流速下填装。

(5) 填装好的 Ni-NTA 琼脂糖凝胶 FF 柱用 2-5 个柱体积的初始缓冲溶液平衡，建议流速 100cm/h，平衡后的柱子可以用于 His-Tag 重组蛋白的上样和洗脱纯化。

2、上样

(1) 缓冲液选择：一般选用 pH6-8 的结合缓冲液，常用缓冲液有 10-00mM 磷酸钠缓冲液、20-200mM Tris-HCl 缓冲液等。在缓冲液中一般要加入 0.15-0.5M 的 NaCl，以消除离子交换作用。在初次使用 Ni-NTA 琼脂糖凝胶 FF，推荐使用 50mM PBS (50 mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, NaOH 调节 pH 7.4) 作为结合缓冲液。

(2) 样品处理：样品的缓冲液应与所选结合缓冲液一致。为保证缓冲液一致，可以在结合缓冲液中破碎细菌、或调解 pH 与结合缓冲液一致、或交换至结合缓冲液（常用方法有透析、超滤、脱盐柱换液等）、或用结合缓冲液稀释 2-10 倍等。样品上柱前应 0.45 μm 过滤。

3、洗脱

(1) Ni-NTA 琼脂糖凝胶 FF 最常用的洗脱方法为增加咪唑浓度进行洗脱。

(2) 咪唑为碱性，相应缓冲液配制后需要用 HCl 进行调节 pH。

(3) 在初次使用 Ni-NTA 琼脂糖凝胶 FF，不知道洗脱的咪唑浓度，建议在结合缓冲液中分别加入 10mM、20mM、50mM、100mM、200mM、500mM 咪唑，浓度从低到高，分别洗脱和收集，通过 SDS-PAGE 电泳等方法鉴定洗脱组份。

(4) 有条件的也可以进行线性咪唑梯度洗脱，确定较佳洗脱条件。

4、在位清洗

在多次使用后需要在位清洗，常用方法为先 5 个柱体积蒸馏水清洗，再用 1-3 个柱体积 50mM NaOH 清洗 10-20min，立即用 5 个柱体积结合缓冲液 (50mM PBS) 清洗平衡。