

## Ni-TED 琼脂糖凝胶 FF

**品 名:** Ni-TED 琼脂糖凝胶 FF(镍-三羧甲基乙二胺琼脂糖凝胶 FF, Nickel Tris(carboxymethyl) ethylene diamine SePharose Fast Flow, Ni-TED SePharose FF)

**目 录 号:** BN26317 (中压预装柱)、BN26318 (重力预装柱)

**贮 存:** 20%乙醇, 2-25℃

**运 输:** 2-30℃, 常压、避光

**保 质 期:** 5 年

### 相关介绍:

Ni-TED 琼脂糖凝胶 FF 以琼脂糖微球为基质, 通过活化偶联三羧甲基乙二胺 (TED), 再螯合  $\text{Ni}^{2+}$ 。与亚氨基二乙酸 (IDA) 相比, Ni-TED 琼脂糖凝胶 FF 具有很好的螯合剂、还原剂、碱性的耐受性, 如样品中含有 10-100mM EDTA 或 10-100mM  $\beta$ -巯基乙醇或 5-20mM DTT, 均可正常纯化; 无需脱镍, 也可以用 1M NaOH 再生清洗。

Ni-TED 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  $\text{Ni}^{2+}$  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-TED 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	6%琼脂糖凝胶
配基	$-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$
配基密度	$\geq 30 \mu\text{mol/ml}$
填料粒径	60~180 $\mu\text{m}$
最大流速	800 cm/h
推荐流速	50-100 cm/h
pH 稳定性	pH 3-12 (清洗 pH 2-14)
耐反压	0.3 MPa
载量	$\geq 20 \text{ mg His-tag 重组蛋白/ml}$

### 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。

本产品仅用于科研

(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-TED 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-TED 琼脂糖凝胶 FF，推荐使用 50mM PBS (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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 0.45μm 过滤。

## 3、洗脱

(1) Ni-TED 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-TED 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 5mM、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

使用完的层析柱出现堵塞、压力增大、流速减慢、载量下降等情况时，就需要进行在位清洗。Ni-TED 琼脂糖凝胶 FF 的优势为无需脱镍即可用 1M NaOH 再生清洗，所以清洗最常用的方法：使用完的层析柱用蒸馏水清洗 3-5 个柱体积，然后用 1M NaOH 清洗 3-5 个柱体积（保持时间 0.5-1h），然后用蒸馏水清洗至中性即可。同其它层析介质一样，为了达到更好的清洗目的，可以采用反向清洗；如需去除热源，可在 1M NaOH 中保持更长时间（1-2h）。

除了 NaOH 清洗外，强电荷蛋白可以用 1-2M NaCl 进行清洗；脂类、脂蛋白、强疏水蛋白可以用 30%异丙醇（或 70%乙醇）进行清洗。