Ni-TED Pharose FF

金属螯合亲和填料使用说明书

1、产品介绍

Ni-TED Pharose FF 是金属离子脱落率最低的一款金属螯合亲和填料，配基为三羧甲基乙二胺（tris-carboxymethyl ethylene diamine，TED）基团，配位金属离子为 Ni^{2+}，Pharose 为经典琼脂糖凝胶基础微球，FF 为 Fast Flow 的缩写。

本产品的 TED 配基与 Ni^{2+}形成的五配位结构稳定性好，对螯合剂、还原剂、酸、碱等试剂有着出色的耐受性，可在 10 mM EDTA、100 mM β-ME 或 50 mM DTT 等条件下正常使用，可在 pH=1 或 pH=14 的条件下处理 24 h 后保持出色的色谱性能，也长期保存在 10 mM NaOH 中，洗脱液中需要的咪唑浓度相对其他金属螯合填料更低。因此，Ni-TED Pharose FF 适合用于下列纯化体系：

- 目标蛋白中含半胱氨酸或者对氧敏感，需要添加 β-ME 或 DTT 时；
- 目标蛋白中含半胱氨酸且有金属反应性，需要添加 DTT 和 EDTA 时；
- 目标蛋白容易被金属蛋白酶水解，需要添加 EDTA 时；
- 目标蛋白对高浓度咪唑敏感，需要降低洗脱液中咪唑浓度时；
- 真核细胞表达体系中本身含 β-ME 或 EDTA 的情况；
- 对产物中金属离子含量要求严格时。

Ni-TED Pharose FF 的配基偶联工艺经过了特殊的设计，使得成品的压力/流速特性得到大幅提升。通过配基修饰过程的优化，本产品在亲和力（载量）和特异性（选择性）之间取得良好的均衡：对带组氨酸标签蛋白的结合量大于 20 mg/mL 的同时，一步纯化后样品纯度可达 90%以上。

2、产品特点与技术指标

产品名称	Ni-TED Pharose FF
目录编号	BN22262
基质	6%交联琼脂糖
配基 [a]	三羧甲基乙二胺，螯合~60 μmol Ni^{2+}/mL
粒径范围 [b]	45~165 μm
平均粒径	~90 μm
动态结合载量 [c]	≥20 mg/mL 带组氨酸标签蛋白
推荐工作流速 [d]	60~300 cm/h
最大流速与压力 [e]	900 cm/h，0.3 MPa
使用 pH	3~12（推荐的工作 pH），3~12（长期稳定）；2~14（短期稳定）
化学稳定性	1）纯化缓冲液：常用的水相缓冲液，可含有 10 mM EDTA，100 mM β-ME 或 50 mM DTT。 2）在位清洗（CIP）处理：1 M NaOH、1~2 M NaCl、70%乙醇、30%异丙醇，0.1~0.5%非离子型表面活性剂。 3）在下述溶液中处理特定时间，填料性能保持稳定：10 mM NaOH（长期）、0.1 M 盐酸（24 h）、6 M 盐酸胍（24 h）。
储存与运输	20%乙醇，2~30 ℃
保质期	5 年

注 [a] 三羧甲基乙二胺（TED）基团与基球之间有十个原子长度的间隔臂，为亲和填料提供更加高效的捕获效果。[b]90%体积以上的微球在此粒径范围。[c]10%穿透下的动态结合载量（$DBC_{10\%}$），测试的样品为大肠杆菌表达带组氨酸标签的重组蛋白，6 min 停留时间。[d] 并非指只能在该流速范围内工作。需结合柱高确定适宜的工作流速，通常情况下上样的停留时间 2~6 min 范围内可保持出色的亲和捕获能力和纯化效率。CIP 过程的流速则一般不超过 150 cm/h。[e]10 cm 柱高下的最大测试流速及该最大流速下的压力。

3、金属螯合亲和层析

金属离子亲和层析是基于蛋白质分子表面的组氨酸的咪唑基、半胱氨酸的巯基和色氨酸吲哚基能与 Ni^{2+}、Co^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}等形成配位结合而进行生物大分子分离纯化的过程。其中，以 Ni^{2+}为螯合离子来纯化带 6 个以上组氨酸组成的标签蛋白最为常见，本说明书也以该体系为例简要阐述 Ni-TED Pharose FF 的亲和原理（图 1）。

Pharose 基球修饰上 TED 配基后，该配体拥有五个配位基团，其中两个氮原子和三个氧原子与 Ni^{2+}形成牢固的螯合物。Ni^{2+}可形成 6 配位数的八面体结构，剩余的一个自由配位点可以与溶剂分子或蛋白质分子结合。Ni^{2+}与组氨酸标签蛋白的咪唑基团配位结合的过程即为金属螯合填料与目标蛋白的特异性结合过程。提高缓冲液中咪唑的浓度可以将目标蛋白洗脱，洗脱过程中咪唑和目标蛋白竞争与 Ni^{2+}的结合。

金属离子亲和层析过程的非特异性吸附可能会来自离子相互作用、金属离子与含组氨酸、半胱氨酸、色氨酸蛋白之间的相互作用。前者可通过提高缓冲液的离子强度得到抑制，通常添加 500 mM 的 NaCl；后者可在上样缓冲液中添加少量的咪唑（例如~5 mM）或者在冲洗过程中添加咪唑而除去。经过优化，可以得到样品纯度和收率均较高的结果。

Ni-TED Pharose FF 填料在使用过程中 Ni^{2+}掉落量极少，可连续使用多次。

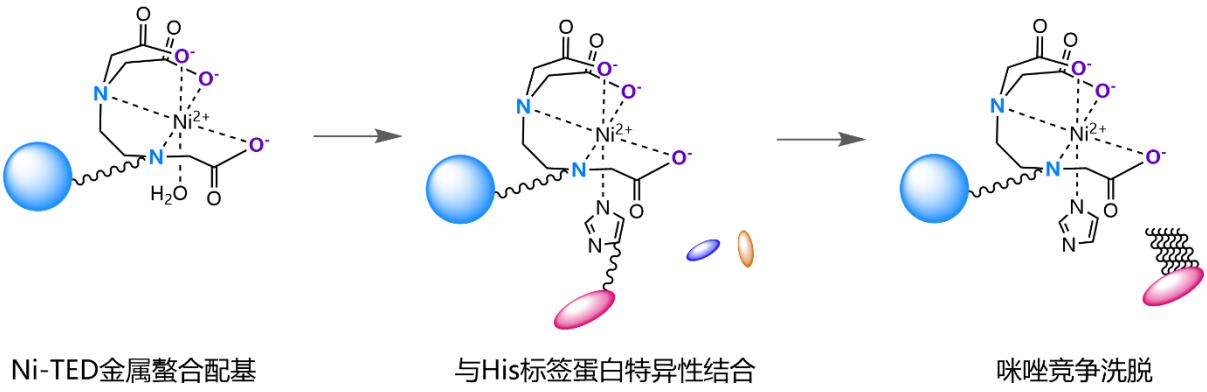


图 1. Ni-TED Pharose FF 金属螯合填料的纯化原理示意图

4、使用方法参考

4.1 色谱柱装填

以下阐述与层析系统连接时，填料的色谱柱装填方法。

（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）填料用量计算：通过沉降定量填料体积，需要的沉降填料体积=柱体积×压缩比（也称压缩因子）。沉降体积是指填料在 20%乙醇保存液中自然沉降完全读取的稳定体积。Ni-TED Pharose FF 的压缩比为 1.15。为使达到压缩比，可通过柱头下压的方法，也可以通过高流速压柱。

（3）填料清洗：将填料悬液充分摇匀后量取相应体积，抽去液体，并用约 3 倍填料体积的纯化水洗涤，重复 3 次，以除去保存液。

（4）装柱填料悬液准备：将填料转移到适当的容器中，加入适量的装柱液，制成 50~75 v%的装柱填料悬液（原包装中填料体积分数为 67%），使用前搅匀。

（5）装填前准备：在清洗干净的层析柱下端加入装柱液，以除去下垫片及层析柱下端的空气，在柱内保留少量的蒸馏水，拧紧下堵头，调整柱子使其垂直于地面。

（6）装填：将搅匀后的填料悬液一次性缓慢倒入层析柱内（必要时使用装柱器），为避免引入气泡，应使之沿层析柱内壁自然流下。将所有填料加入后，用装柱液将装柱器加满，拧紧装柱器上盖，将柱子与层析系统连接。

（7）压柱：使柱内填料自然沉降（或 50~150 cm/h 的低流速下沉降），待填料沉降完全后（填料与液体的界面清晰），去除装柱器，装上上柱头，并将柱头下降至界面处；通过高流速（推荐流速见下表，注意柱压不超过 0.3 MPa），继续压柱至界面清晰稳定，标记界面稳定时的柱高。停泵，打开柱头上的阀门/堵头，关闭柱底的阀门/堵头，下压柱头至标记位置下方与压缩比对应的位置，旋紧柱头，装柱完成。装柱完成后，需用高流速平衡柱内的填料。

装柱条件	Ni-TED Pharose FF
压缩比	1.15
装柱流速	600 cm/h

4.2 柱效测定和评价

完成装柱后、使用前可通过柱效测定和评价可以确认层析柱装填质量。柱效通常用理论塔板高度（HETP）和非对称因子（As）来评价。

柱效测定可以采用丙酮或者 NaCl 作为样品进行，按照下表配制样品溶液和流动相。

样品	1.0%丙酮	0.8~1.0 M NaCl
样品体积	1.0%柱体积	1.0%柱体积
流动相	纯水	0.4 M NaCl
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测器	UV-280 nm	电导

根据 UV 或者电导率曲线计算理论塔板高度（HETP）、理论塔板数（N）和非对称因子（As），公式如下：

HETP=L/N

$N=5.54(V_R/W_h)^2$

As=a/b

其中：L 为柱高；V_R 为保留体积；W_h 为半高峰宽；a 为在 10%峰高处的第一个半峰宽；b 为在 10%峰高处的第二个半峰宽。

一般来说，HETP 的数值应小于填料平均粒径的三倍（即 HETP/D50<3，D50 为填料的平均粒径），As 应在 0.8~1.5 之间。

4.3 平衡与上样（Equilibration & Loading）

金属螯合填料与磷酸盐、Tris-HCl 等缓冲体系兼容，其中 20 mM PB+500 mM NaCl（pH=7.4）的体系最为常用。初始的缓冲液称为平衡缓冲液，记为缓冲液 A。缓冲液 A 的特点为不含或者含少量咪唑，pH 在 7~8 之间居多，呈弱碱性。实际使用过程中，如果上样料液的体积特别大，从降低成本的角度考虑，可不往料液中添加咪唑和 NaCl 来抑制非特异性吸附，而是在上样后进行冲洗来去除杂质。

在上样前，需用缓冲液 A 在操作流速下平衡层析柱，该过程通常需要 5~10 个柱体积的缓冲液 A，以电导、pH 等检测信号参数不变且与缓冲液 A 对应为准。

上样量可按“mg 目标蛋白/mL 填料”来设定，通常为 $DBC_{10\%}$的 50~80%，例如 Ni-TED Pharose FF 产品对重组金黄色葡萄球菌蛋白 A（r-SPA）的$DBC_{10\%}$为~20 mg/mL，纯化 r-SPA 时的上样量可为 10~16 mg/mL。除了 $DBC_{10\%}$，也可以测试上样流穿液中的目标蛋白确定上样量。

上样后需要 3~10 个柱体积的缓冲液 A 再平衡层析柱。

4.4 洗杂（Wash）

在缓冲液 A 中添加 5~40 mM 的咪唑冲洗层析柱，可以将非特异性结合的杂蛋白除去。咪唑浓度越高，杂蛋白被除去得越彻底，但会降低目标蛋白的收率。洗杂过程咪唑的浓度与不同蛋白的特性相关，可通过阶跃洗杂过程（例如 5 mM、10 mM、20 mM……）快速优化洗杂条件。洗杂的体积通常为 3~10 个柱体积。

4.5 洗脱（Elution）

最常用的洗脱方式为提高洗脱液中咪唑的浓度（在缓冲液 A 中加入咪唑），推荐在 0~500 mM 范围内进行阶跃洗脱或者线性梯度洗脱，确定最优的洗脱浓度。对于大多数带组氨酸标签的蛋白，50~150 mM 的咪唑浓度可以将目标蛋白洗脱完全。

4.6 在位清洗（CIP）

若发生柱压升高，或为了避免交叉污染，可进行在位清洗过程。可采用以下溶剂进行在位清洗：2 mol/L NaCl，1 mol/L NaOH、70%乙醇或 30%异丙醇等。在位清洗可有效去除介质上的杂质，反向效果更佳。清洗后需用 3~5 柱体积的纯水除去上述溶剂。

CIP 过程	目的
2 M NaCl，0.5~2 CV；水，3~5 CV。	除去通过离子相互作用结合的杂质
1 M NaOH，1~2 h 的接触时间，若除去内毒素则需更长时间；缓冲液 A，5~10 CV；水，3~5 CV。	去除蛋白沉淀、疏水性蛋白或去除热源等其他杂质
30%异丙醇或 70%乙醇，5~10 CV；水，3~5 CV。	去除紧密结合的脂蛋白和脂质体等

4.7 填料保存

填料的初始保存液为 20%乙醇，使用过后可继续用 20%乙醇保存。保存温度在 2~30 ℃为宜，不可冻存。