

Ni-TED 6FF Chromatography Column, 5 mL

His 标签蛋白纯化预装柱，5 mL

产品简介

Ni-TED Agarose Resin 6FF 以高度交联的 6%琼脂糖凝胶为基质，通过化学方法偶联三（羧甲基）乙二胺（TED）为配体，螯合镍离子（Ni²⁺）而制备成的一种介质。Ni-TED Agarose Resin 6FF 与 Ni²⁺ 具有 5 个螯合位点，使得其对于 Ni²⁺ 具有很强的约束力，这一特性赋予了本品具有优异的 DTT 以及 EDTA 耐受性，特别适用于纯化真核细胞培养上清液中的 His 标签蛋白。本品用于带有 His 标签的蛋白纯化时拥有稳定性高、复杂环境中一步纯化蛋白、目标蛋白质吸附量大（但会低于 Ni-NTA）、蛋白洗脱条件温和、介质易再生、重复利用率高等优点。

Ni-TED 6FF Chromatography Column 是一种以 Ni-TED Agarose Resin 6FF 为填料的中压预装柱，规格 5 mL，该预装柱具有标准接口，可以适配商品化的各类中压色谱系统，如 ÄKTA 等，方便客户操作。

产品信息

货号	20498ES08 / 20498ES25
规格	5 mL / 5×5 mL

产品性质

基质 (Matrix)	高度交联的 6%琼脂糖凝胶
粒径 (Bead size)	45-165 μm
载量 (Capacity)	>15 mg His-tagged protein (27.5 kDa) /mL 基质
耐压 (Tolerance Pressuremax)	0.3 MPa, 3 bar
储存缓冲液 (Storage Buffer)	20%乙醇
pH 稳定性	4-10 (工作) ; 2-14 (CIP)
化学稳定性	24 h 耐受 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 mM TCEP, 20 mM β-巯基乙醇, 1 M NaOH, 6 M 盐酸胍; 2 h 耐受 500 mM 咪唑, 100 mM EDTA
柱子尺寸 (Column Size)	1.6×2.5 cm (5 mL)

储存条件

2~8°C 保存，有效期 4 年。

使用说明

1. 纯化流程

1) 缓冲液的准备

缓冲液使用原理：低咪唑上样，高咪唑洗脱。Buffer 在使用前最好用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

平衡缓冲液：20 mM PBS, 0.5 M NaCl, pH 7.4

洗杂缓冲液：20 mM PBS, 0.5 M NaCl, 0-30 mM 咪唑, pH 7.4

洗脱缓冲液：20 mM PBS, 0.5 M NaCl, 50-500 mM 咪唑, pH 7.4

2) 样品准备

在上样前将宿主细胞碎片通过离心等方式去除，7000 rpm 离心 15 min，收集上清。然后过 0.45 μm 的微孔滤膜。为了获得最大的载量，不要在样品蛋白溶液中添加咪唑。

3) 样品纯化（以 AKTA 使用为例）

a) 将泵管道注满去离子水。将预装柱顶端堵头卸掉，连接到层析设备入口，然后将底端堵头打开，连接到层析设备。

b) 3-5 倍柱体积去离子水冲洗出存储缓冲液。

c) 至少 5 倍柱体积的平衡缓冲液平衡色谱柱。推荐流速为 1-5 mL/min。

d) 利用泵或注射器上样。【注】若样品粘度增加，即使上样体积很少也会导致层析柱很大的反压；上样量不要超过柱子的结合能力；大量的样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器更难使用。

e) 洗杂缓冲液冲洗柱子，直到紫外吸收达到一个稳定的基线（一般至少 10-15 个柱体积）。

【注】在样品和结合缓冲液中加入低浓度咪唑可以提高样品纯度。

f) 洗脱缓冲液一步法或梯度法进行洗脱。一步法洗脱中一般 5 倍柱体积洗脱液即可。梯度洗脱可以用一个小的梯度，例如 20 倍柱体积或更多来分离不同结合强度的蛋白质。

g) 随后依次用 2 倍柱体积的 1 mol/L NaOH 和 5 倍柱体积的去离子水清洗填料。5 倍柱体积的 20%乙醇平衡填料，最后将填料保存在 20%乙醇的 1 \times PBS 中，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4) SDS-PAGE 检测

将纯化过程中得到的样品（包括原始样品、流出组分、洗杂及洗脱组分等）利用 SDS-PAGE 进行检测，判定其纯化效果。

2. 在位清洗

当填料使用过程中发现反压过高 (>0.5 Mpa) 或者填料上面出现明显的污染时，需对其进行在位清洗 (Cleaning-in-Place, CIP)。建议按照下面操作去除填料上残留的污染物，如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

1) 去除强疏水结合的蛋白，脂蛋白和脂类

使用 30%异丙醇清洗 5-10 个柱体积，接触时间为 15-20 min 可以去除此类污染物。之后再用去离子水清洗 10 倍柱体积。

也可以选择使用含有去污剂的酸性或者碱性溶液清洗填料 2 倍柱体积。例如含有 0.1-0.5%非离子去污剂的 0.1 M 醋酸溶液，接触时间为 1-2 h。去污剂处理后，需用 70%的乙醇清洗 5 倍柱体积，彻底去除去污剂。最后利用去离子水清洗 10 倍柱体积。

2) 去除离子作用结合的蛋白

使用 1.5 M NaCl 溶液接触 10-15 min，之后用去离子水清洗 10 倍柱体积。

清洗好的柱子可再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积，最后将填料保存在 20%乙醇的 1 \times PBS 中，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。