**New Ni Beads 6FF亲和层析介质**

**1. 产品简介**

New Ni Beads 6FF是一种新型的Ni螯合亲和层析介质。它是以6%琼脂糖凝胶为基质，在凝胶表面螯合了非常牢固的镍离子Ni2+。因此，本产品可以在含有低浓度EDTA或DTT的样品中，高效的分离纯化目的蛋白。

**2. 产品参数**

|  |  |
| --- | --- |
| 基质 | 高度交联的6%琼脂糖微球 |
| 载量（/mL介质） | ＞10 mg 6×His-tagged protein |
| 微球粒径（μm） | 45~165 |
| 最大压力（MPa） | 0.3 |
| 储存缓冲液 | 20%乙醇 |
| 储存温度（℃） | 4~30 |

**3. 溶剂耐受情况**

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂种类** | **时间** |
| 0.01M HCl，0.01M NaOH | 一周 |
| 10mM EDTA，1M NaOH，5mM DTT，5mM TCEP，20mM巯基乙醇，6M盐酸胍 | 24小时 |
| 500mM咪唑，100mM EDTA | 2小时 |
| 30%异丙醇 | 20分钟 |

**4. 纯化流程**

4.1 缓冲液准备

根据实际需求，配制不同的缓冲体系。其基本原理为：低浓度咪唑上样，高浓度咪唑洗脱，或者高pH缓冲液上样，低pH缓冲液洗脱。

***建议：*缓冲液在使用前，使用0.22 μm或0.45 μm滤膜过滤除菌。**

4.2 样品纯化

(1) **平衡：**Ni亲和层析介质装填柱子后，先用3~5倍柱体积的去离子水冲洗，去除匀浆液，再用5倍柱体积的上样缓冲液平衡。

(2) **上样：**利用泵或注射器上样。

***注意：***样品的粘度增加会导致层析柱的反压增大。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，导致进样器不好使用。

(3) **淋洗：**用淋洗缓冲液冲洗柱子，直到紫外检测器基线稳定（一般至少10~15倍柱体积）。

***注意：***在样品和结合缓冲液中加入咪唑可以提高样品纯度。

(4) **洗脱：**用洗脱缓冲液将结合在柱子上的蛋白洗脱，洗脱方法分一步法与梯度洗脱。一步法洗脱，通用5倍柱体积的洗脱液即可将蛋白从柱子上洗脱下来；梯度洗脱，可以更好地将结合在柱子上的蛋白进行分离，以便收集不同组分。

4.3 SDS-PAGE检测

经纯化后的样品（包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分）、原始样品用SDS-PAGE检测，考察纯化效果。

**5. 在位清洗（CIP）**

Ni螯合亲和层析介质使用过程中，发现反压过高或者亲和介质上面出现明显污染时，需要进行在位清洗操作（Cleaning-in-Place，CIP）。建议按照以下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**

**方法一：**用5~10倍柱体积的30%异丙醇清洗，接触时间为15~20分钟，再用10倍柱体积的去离子水清洗，即可去除此类污染物。

**方法二：**用2倍柱体积的含去污剂的酸性或碱性溶液清洗介质。

例如：用2倍柱体积的0.1 M醋酸溶液（含0.1~0.5%非离子去污剂）清洗介质，接触时间为1~2小时；去污剂处理后，再用5倍柱体积的70%乙醇清洗，去除去污剂；最后，用10倍柱体积的去离子水清洗。

**(2)** **去除离子作用结合的蛋白**

用1.5 M NaCl溶液清洗10~15分钟，再用10倍柱体积的去离子水清洗。

**6. 介质再生**

Ni螯合亲和层析介质所带的Ni2+不需要经常去除和重新螯合。使用过程中，发现介质颜色变浅或者载量明显变低时，需要对介质进行Ni2+去除和重新螯合，也就是介质再生。将介质装填在合适的层析柱内，按照以下操作进行Ni2+去除和重新螯合：

(1) 用5倍柱体积的去离子水清洗介质；

(2) 用5倍柱体积的100 mM EDTA（pH 8.0）去除Ni2+；

(3) 用5倍柱体积的20 mM pH7.4磷酸盐缓冲液（含0.5 M NaCl）清洗；

(4) 用3~5倍柱体积的100 mM NiSO4·6H2O再生螯合Ni2+；

(5) 用10倍柱体积的去离子水清洗。

介质再生后，即可使用。如不使用，在4~30℃条件下，储存于20%乙醇中。