**金属螯合亲和层析介质**

**1. 产品简介**

蛋白质表面的氨基酸（如组氨酸、色氨酸、半胱氨酸等）能与固定在介质表面的过渡金属（如Ni2+、Co2+、Cu2+、Zn2+、Fe3+等）以配位键的形式相结合。根据过渡金属对不同氨基酸结合力强弱的差异，可实现金属螯合亲和层析介质对不同蛋白质的分离。

金属螯合亲和层析介质具有蛋白载量大、选择性好、分辨率高、容易再生、使用成本低等特点，被广泛用于蛋白纯化、生物制药等相关领域。

**2. 纯化流程**

2.1 金属螯合

根据实际需求，螯合不同的过渡金属离子，如Ni2+、Co2+、Cu2+、Zn2+、Fe3+等。通常情况下，Cu2+与蛋白结合能力最强，Ni2+次之，Zn2+最弱。具体螯合步骤如下：

(1) 将螯合介质装柱后，用5倍柱体积去离子水冲洗；

(2) 选择合适的金属离子对应的盐，如NiSO4·7H2O、CuSO4·5H2O等，在中性或弱酸性条件下溶解并过滤（Fe盐需在pH<3的条件下溶解），备用；

(3) 用5倍柱体积的金属离子溶液流经层析柱，螯合金属离子；

(4) 用5倍柱体积的去离子水冲洗层析柱，去除未螯合的金属离子。

2.2 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。**

2.3 样品纯化

(1) **平衡：**螯合好的层析柱用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。

2.4 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。

**3. 在位清洗（CIP）**

金属螯合亲和层析介质使用过程中，发现反压过高或者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介质上残留的污染物（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。

**4. 介质再生**

金属螯合亲和层析介质固定金属离子后，不需要经常去除和重新螯合金属离子。使用过程中，发现介质颜色变浅或者载量明显变低时，需要对介质进行金属离子去除和重新螯合，也就是介质再生。将介质装填在合适的层析柱内，按照以下操作进行金属离子去除和重新螯合：

(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）去除金属离子；

(3) 重复2.1中的1~4步。

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。