**Ni螯合亲和层析介质**

**1. 产品简介**

Ni螯合亲和层析介质（Ni IDA Beads和Ni NTA Beads）是以高度交联的6%琼脂糖凝胶为基质，通过化学方法偶联了金属螯合配体，螯合镍离子Ni2+。利用重组蛋白表面的氨基酸（如组氨酸、半胱氨酸、色氨酸等）与Ni2+的配位作用，从而实现对不同标签蛋白的分离与富集。

**2. 产品参数**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Ni IDA Beads | Ni NTA Beads |
| 基质 | 高度交联的6%琼脂糖凝胶 | |
| 载量（/mL介质） | ≥40 mg 6×His-tagged protein | ≥30 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. 纯化流程**

3.1 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。**

3.2 样品纯化

(1) **平衡：**Ni螯合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。

3.3 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。

**4. 在位清洗（CIP）**

Ni螯合亲和层析介质在使用过程中，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1520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。

1. **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。

**5. 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。