



Ni-IDA Agarose 6FF

- **货 号:** KTSM301
- **规 格:** 5 mL/10 mL/100 mL
- **应 用:** his标签蛋白纯化
- **产品储存**

保存液: 含20%乙醇的PBS

储存条件: 4~8 °C (避免冻存)

保质期: 12个月

运输: 冰袋运输

- **产品简介**

Ni-IDA Agarose 6FF 是利用Ni²⁺与蛋白质侧链上的某些氨基酸(主要为组氨酸、半胱氨酸、色氨酸)相互作用而进行分离纯化,适用于6 x His / 10 x His 标签蛋白及与Ni²⁺具有相互作用的生物分子的分离纯化。

特点:

1. 快速、成本低。
2. 使用范围广、操作简单,适合重力柱和预装柱(蠕动泵或者层析系统)。
3. 多重选择,当Ni²⁺不能获得较好的应用时,可以螯合其它的金属离子进行使用(例如Cu²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Ca²⁺等)。

备注: 当螯合Ca²⁺时,避免使用磷酸盐缓冲液(会形成沉淀)。

- **产品属性**

项目	参数
基质	6%高度交联的琼脂糖
粒径范围	45-165μm
结合载量	>30mg (his标签蛋白)/ml(介质)
pH稳定性	3-12(长期) 2-14(短期)
化学稳定性	避免使用螯合剂(例如EDTA、EGTA)和还原剂(例如DTT和DTE)
流速	≧300cm/h
操作压力	≤0.3 MPa
贮存溶液	含20%乙醇的PBS
贮存温度	2-8°C



● 纯化流程

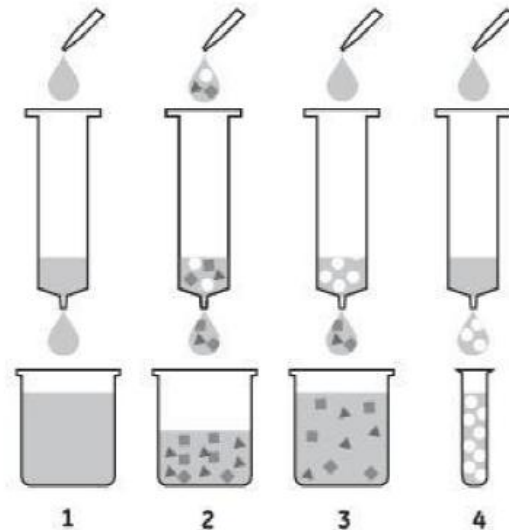


图 1. 使用 Ni-IDA Agarose 6FF 重力柱进行蛋白纯化流程示意图
(Step1:平衡; Step 2:上样; Step 3:洗杂; Step 4:洗脱)

➤ 1.1 缓冲液的准备

裂解液：PBS pH7.4

平衡液：PBS pH7.4, 0.5 M NaCl、5-10 mM Imidazole

洗杂液：PBS pH7.4, 0.5 M NaCl、20-80 mM Imidazole

洗脱液：PBS pH7.4, 0.5 M NaCl、200-500 mM Imidazole

注：所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.45 μm 滤膜过滤；本产品适配各种缓冲液，实际应用中可根据需求配置合适缓冲液。

➤ 1.2 样品准备

样品在上样前建议离心或用0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

➤ 1.3 样品纯化

重力柱的装填

1. 取合适规格的重力层析柱，装入下垫片，加入适量纯水润洗柱管和垫片，关闭下出口。
2. 将 Ni-IDA Agarose 6FF 混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入重力柱中(介质实际体积占悬液的一半)，打开下出口流干保护液。
3. 加入适量纯水冲洗介质，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。
4. 装入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之前没有空隙，且保持水平，避免产生气泡。



5. 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡, 暂不使用时则加入保护液, 2-8℃保存。

➤ 平衡

打开填装好的重力柱, 流干保护液 (20%乙醇溶液), 用 5 倍柱体积去离子水冲洗柱子, 再用 5 倍平衡液平衡柱子, 将蛋白上清液加入平衡好的柱子中, 缓慢流过柱床, 收集流出液, 重复上样 2-3 次, 可提高结合率。

➤ 纯化步骤:

重力柱法纯化

1. 将装填好的 Ni-IDA Agarose 6FF 重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡, 使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下, 重复 2-3 次。
2. 将样品加到平衡好的重力柱中, 样品保留时间至少 15 分钟, 样品量大的情况下可持续循环流穿, 保证样品和介质充分接触, 收集流出液, 反复上样可增加结合效率。
3. 用 20-40 倍柱体积的洗杂液进行洗杂, 洗杂过程中逐渐提高 Imidazole 浓度 (比如 20、40、60、100mM 依次梯度洗杂或其他合适浓度梯度洗杂), 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。
4. 使用 10 倍柱体积的洗脱液洗脱, 分段收集, 每一个柱体积收集一管, 分别检测, 既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱, 又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。
5. 通过透析、G25 脱盐柱或其他方法对纯化后的蛋白样品进行换液处理, 使蛋白保存在不含 Imidazole 的适宜缓冲液中。

离心管孵育法纯化

1. 根据纯化的样品量, 取适量 Ni-IDA Agarose 6FF 加入离心管中, 1000 rpm 离心 1 分钟, 弃上清。
2. 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质, 1000 rpm 离心 1 分钟, 弃上清。
3. 加入样品, 封闭离心管或重力柱管, 4℃振荡孵育 1 小时。
4. 孵育结束后, 1000 rpm 离心 1 分钟, 上清保留作为流穿样品, 用于电泳鉴定。
5. 用 10 倍介质体积的洗杂液清洗介质, 1000 rpm 离心 1 分钟, 去除上清液, 注意不要吸到介质, 重复 3-5 次, 逐步提高 Imidazole 浓度。
6. 加入 10 倍柱体积的洗脱液进行洗脱, 孵育 5 分钟, 1000 rpm 离心 1 分钟, 收集洗脱液, 可重复 2-3 次。
7. 通过透析或其他方法对纯化后的蛋白样品进行换液处理, 使蛋白保存在不含 Imidazole 的适宜缓冲液中。



➤ SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品以及原始样品使用SDS-PAGE检测纯化效果。

➤ 再生

1. 用 10 倍体积去离子水冲洗 Ni-IDA Agarose 6FF;
2. 用 10 倍体积剥离液冲洗 Ni-IDA Agarose 6FF;
3. 用 10 倍体积平衡液冲洗 Ni-IDA Agarose 6FF;
4. 用 10 倍体积去离子水冲洗 Ni-IDA Agarose 6FF;
5. 用 5 倍体积 0.1M NiSO₄ 冲洗 Ni-IDA Agarose 6FF, 并室温孵育 30 分钟;
6. 用 5 倍体积去离子水冲洗 Ni-IDA Agarose 6FF;
7. 用 5 倍体积平衡液冲洗 Ni-IDA Agarose 6FF;
8. 用 5 倍体积含 20%乙醇的 1XPBS 冲洗 Ni-IDA Agarose 6FF,并于 4 度保存。
9. 备注: 剥离液成分为 PBS pH7.4, 0.5M NaCl, 0.05 EDTA。

● 常见问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
纯化时目的蛋白不与介质结合或结合量较低	上样量过载, 上样流速过快	降低上样量, 降低上样流速
	蛋白或脂类在介质中聚集影响结合	及时有效地清洗介质或更换新的介质
	表达条件过于剧烈, His 标签被包裹, 不能与介质结合	建议做一个空载体作为表达和纯化的对照, 确定表达条件是否合适
	初始样品中没有组氨酸标签蛋白	通过基因序列或 His 标签抗体核实
	目的蛋白出现在流穿中	目标蛋白没有成功表达或样品与平衡液中 pH 及组分不正确
洗脱组分别没有收集到目的蛋白或只收集到少目的蛋白	目的蛋白没有与介质结合或结合量较少	先确认目标物是否与介质结合
	蛋白折叠导致标签不能暴露	尝试使用变性条件
	洗脱时间不够	降低流速, 延长洗脱液的保留时间
	洗脱体积过小	加大洗脱体积



	洗杂时, 目的蛋白被洗下来	降低洗杂液中的咪唑浓度或者提高 wash Buffer 的 pH
	目标物在洗脱液条件下出现聚集沉淀	检测目标物在洗脱液条件 (pH 和盐浓度) 下的溶解度和稳定性。可以尝试在洗脱液中加入一些添加剂: 如 0.2% Triton X-100 或 0.5% Tween-20
	目的蛋白可能是包涵体, 没有在上清中	可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白, 包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式
	重组蛋白表达量太低	优化表达条件
	重组蛋白和纯化介质之间的亲和力过高	降低 Elution Buffer 的 pH 值, 或增加 Elution Buffer 中咪唑浓度; 使用 10~100 mM EDTA 溶液剥离镍离子, 同时得到目的蛋白
	蛋白降解	在 4℃ 下进行纯化操作, 菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂
目的蛋白纯度较低	样品没有经过前处理	样品上柱前必须要经过离心或过滤
	样品粘度过高	样品中含有高浓度核酸, 加长破碎时间直至粘度降低, 或者添加 DNase I (终浓度 5ug /ml), Mg ²⁺ (终浓度 1mM), 冰上孵育 10~15min
	洗杂不彻底	加大洗杂体积直至基线平稳并与平衡液一致
	杂质蛋白或脂类在介质中聚集沉淀	及时有效地清洗介质
	杂质与 Ni ²⁺ 具有较高的亲和力。	用其它类型介质进行纯化 (如离子或分子筛)
	柱料装填效果不佳	重新装填或购买
	杂质与介质出现非特异性吸附	适当选择添加剂降低非特异性吸附, 可以尝试在样品中加入一些添加剂: 如 0.5% Triton X-100、1.0% Tween 20 或 50% 甘油
	分离柱顶部有较大储样体积	重新装柱或降低储样体积
	介质中有微生物生长	介质使用完后, 请及时正确保存介质
	样品中含有其他的组氨酸标签蛋白	通过调节 PH 值, 或者咪唑浓度来优化洗杂条件。再使用其他的纯化手段 (如离子交换, 疏水等) 进一步纯化洗



		脱组分
填料颜色变浅或者变成白色	镍离子脱落或被剥离	填料重新挂镍离子
填料呈现褐色	缓冲液中有 DTT	对 Ni IDA Beads, 不能耐受 DTT, 建议使用 Ni NTA Beads。使用时建议降低 DTT 的浓度至 2 mM 以下, 或者改用巯基乙醇
上样过程中蛋白发生沉淀	操作温度过高	4℃ 下进行上样, 在样品核所有缓冲液中添加稳定剂
	蛋白沉降	改变缓冲液, pH 与等电点相差至少一个单位
介质载量下降	上样流速过快	降低上样流速
	蛋白或脂类在介质中聚集, 导致载量下降	及时清洗介质
	使用次数过多	更换新介质
	表达条件过于剧烈, His 标签被包裹, 不能较好与介质结合	建议做一个空载体作为表达和纯化的对照, 确定表达条件是否合适
色谱峰上升过陡	介质装填过紧	重新装柱
色谱峰上升过缓或拖尾	介质装填太松	重新装柱
柱床有裂缝或干涸	出现泄露或大体积气泡引入	检查管路是否有泄露或气泡, 重新装柱
液流较慢	蛋白或脂类聚集	及时清洗介质或滤膜
	蛋白沉淀在介质中	调整平衡液和洗脱液组分, 以维持目标物的稳定性和介质的结合效率
	分离柱中微生物生长	所用试剂必须经过过滤和脱气; 样品上柱前必须离心或过滤

仅供科研使用, 不用于动物或人类诊断或治疗用途