

Ni-TED 琼脂糖纯化树脂

货号: Cat.No: P5105 Size: 5ml Resin (Total 10ml); Cat.No: P5106 Size: 25ml Resin (Total 50ml)

产品介绍

新赛美 Ni-TED 琼脂糖纯化树脂是一种固定化金属离子亲和层析 (IMAC) 介质, 专门用于纯化带有组氨酸标签 (His-Tag) 的重组蛋白。它以高度交联的 6%琼脂糖凝胶为基质, 一种新型 IMAC 填料, 整合有非常牢固的 Ni 离子, 与传统的 Ni-NTA 相比, Ni-TED 树脂因对 Ni²⁺ 更强的螯合能力而展现出更出色的化学耐受性。

技术参数

技术指标	详细参数
基质	高度交联的 6%琼脂糖凝胶 (6FF)
粒径范围	45-165 μm
平均粒径	90 μm
动态结合载量	>10mg 6×His 标签蛋白 (25KD) /mL 基质
最大耐压	0.3 MPa (3 bar)
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8° C, 切勿冷冻
化学稳定性	24 h 耐受 10mM EDTA, 5mM DTT, 5mM TCEP, 20mM β -巯基乙醇, 1M NaOH, 6M 盐酸胍; 2h 耐受 500mM 咪唑, 100mM EDTA

纯化流程

缓冲液准备

所有缓冲液须用高纯水配制, 使用前建议用 0.22 或 0.45 μm 滤膜过滤。

推荐使用的缓冲液配方:

缓冲液	配方	PH (NaOH 调节)
平衡缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 0.5 M NaCl, 10 mM 咪唑	8.0
漂洗缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 0.5 M NaCl, 20 mM 咪唑	8.0
洗脱缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 0.5 M NaCl, 250mM 咪唑	8.0

缓冲液注意事项:

建议在含 0.5~1.0 M NaCl 的缓冲液中进行结合, 中性至弱碱性 pH 7~8 条件效果最佳, 常用磷酸钠缓冲液也可使用 Tris-HCl 缓冲液, 但在金属-蛋白质亲和力较弱时应避免使用, 因其可能降低结合强度

样品准备

可溶性蛋白样品: 细胞裂解后离心 (12,000 rpm, 4°C, 20~30 分钟), 上清用 0.22 或 0.45 μm 滤膜过滤后上样

包涵体蛋白样品: 在所有缓冲液中加入 6 M 盐酸胍或 8 M 尿素

样品缓冲液应尽可能与平衡缓冲液一致

根据介质载量和料液中目标蛋白含量计算进料量 细胞裂解与样品澄清

裂解方法: 常用方法包括超声破碎或高压匀浆。为防止蛋白降解, 裂解缓冲液中建议加入适量的蛋白酶抑制剂。如果样品中核酸过多导致粘稠, 可加入 DNase I (终浓度 5 $\mu\text{g/ml}$) 和 Mg²⁺ (终浓度 1 mM), 冰上孵育 10-15 分钟以降低粘度。

澄清处理 (非常关键): 裂解后, 必须彻底去除细胞碎片等不溶物, 以防堵塞柱子。建议首先以 10,000-15,000×g 的离心力, 在 4°C 下离心 20-30 分钟, 取上清。为确保效果, 上清液最好再通过 0.45 μm (或 0.22 μm) 的滤膜过滤

以下是使用预装柱进行纯化的一般步骤。

准备: 将所有试剂恢复至室温。根据说明书建议的柱体积 (CV) 计算各缓冲液用量。

平衡: 用 5-10 个柱体积的平衡缓冲液 (不含或含低浓度咪唑, 如 10mM) 冲洗层析柱, 直至流出液的 pH 和电导率与平衡液一致。

上样: 将处理好的样品以适中流速 (推荐 60-100 cm/h) 加入层析柱, 使目标蛋白与 Ni²⁺ 充分结合。建议收集流穿液以备分析。

洗涤：上样后，用 10-15 个柱体积的洗涤缓冲液（平衡液中加入 10-40mM 咪唑）清洗柱子，去除非特异性结合的杂蛋白。

洗脱：用 5-10 个柱体积的洗脱缓冲液（平衡液中加入高浓度咪唑，如 250-500mM）将目标蛋白竞争下来。建议分段收集洗脱液（例如每 1 个柱体积收集一管），以便后续通过 SDS-PAGE 等分析确定目标蛋白所在组分。

再生与保存

（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 15-20min 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 0.1M 醋酸溶液，接触时间为 1-2h。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 1.5MNaCl 溶液清洗 10-15min。再使用去离子水清洗 10 个柱体积，清洗好的柱子可再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积，置于 2-8℃保存。

常见问题与解决方案

问题	可能原因	解决方案
柱子反压过高	样品未完全澄清或有微粒	再次离心或过滤样品
	样品或缓冲液太粘稠	加入 DNase I 降解核酸；适当降低流速
洗脱液中无目的蛋白	蛋白可能在包涵体中	检查沉淀。若是包涵体，需在变性条件下纯化。
	蛋白表达量太低	优化蛋白表达条件
	结合/洗脱条件不合适	优化咪唑浓度或 pH
洗脱产物不纯	洗涤不充分	增加洗涤缓冲液的体积或适当提高咪唑浓度
柱子颜色异常（变褐）	缓冲液中含有还原剂	将样品透析以去除还原剂，或更换耐受性更强的填料
蛋白在上样时沉淀	操作温度过低或蛋白聚集	在室温下进行上样；在样品和缓冲液中加入 0.1% Triton X-100 或 Tween-20 等稳定剂