



Ni Bestarose FF /HP IMAC Bestarose FF/HP

金属螯和层析 immobilized metal chelating affinity chromatography 是常用的一种亲和层析方法，利用蛋白质或多肽中含有的组氨酸、半胱氨酸和色氨酸与金属离子（如：Cu、Zn、Ni、Co、Fe等离子）的相互作用达到分离纯化的目的。蛋白研究或生物药物的研发中也常用His-tag 表达目标蛋白。

Ni Bestarose FF/HP 以及IMAC Bestarose HP/FF 是由氨三乙酸（NTA）偶联于琼脂糖而成，可以螯合金属离子的四价位，使螯合的金属离子更稳定，强度更强，还可以同微量还原剂 DTT 及 β -巯基乙醇兼容，物理和化学稳定性好并具备特异性好、流速快的优点。因此，成为在纯化重组组氨酸标签蛋白时的首选介质。

层析介质	Ni Bestaresoe FF	Ni Bestaresoe HP	IMAC Bestaresoe FF	IMAC Bestaresoe HP
骨架	6% 的高交联琼脂糖			
配基的功能集团	氨三乙酸 NTA			
配基密度	12-18umol Ni ²⁺ /ml	12-18umol Ni ²⁺ /ml	15umol Ni ²⁺ /ml	15 umol Ni ²⁺ /ml
颗粒范围	45-165um	22-44um	45-165um	22-44um
适用范围	捕获	精细纯化	捕获	精细纯化
工作pH范围	4-8.5			
化学稳定性	40°C 1 周: 10mM HCl, 0.1M NaOH, 8M尿素, 6M 盐酸胍; 40°C 12h: 1M NaOH, 70% 乙酸;			

使用HCl 和NaOH 时必须将金属离子剥离。

在生化制品中，例如：核苷二磷酸酶、蛋白酶抑制因子、超氧化物歧化酶、酸性蛋白酶、丝氨酸羧基酶、糖原磷酸化酶、乳酸脱氢酶等；以及生物技术制药中，例如：抗体的纯化，重组蛋白药物，重组白蛋白，乙肝核心抗原，VLP、动物疫苗的抗原亚单位等项目已经有大规模的应用生产。

Ni Bestarose FF 和IMAC Bestarose FF是采用6% 琼脂糖骨架，颗粒范围在45-165um，主要用于纯化工艺中的捕获步骤（或粗样品的分离纯化）；Ni Bestarose HP 和IMAC Bestarose HP也是采用6% 琼脂糖骨架，颗粒范围在22-44um，主要用于高分辨率的分离。

Ni Bestarose FF在组氨酸标签重组蛋白的纯化应用实例：

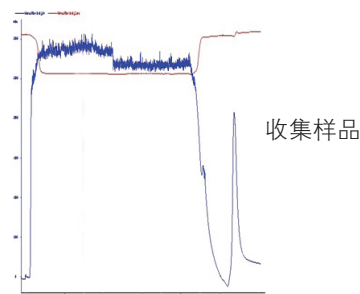
层析柱：EZfast 1ml

缓冲液：

A: 20mM PB, 0.5MNaCl, 20mM 咪唑, pH7.6

B: 20mM PB, 0.5MNaCl, 500mM 咪唑, pH7.6

样品：大肠杆菌表达His-tag 蛋白裂解液，经过澄清后上样



分离纯化条件优化

Ni Bestarose FF/HP 和IMAC Bestarose FF/HP金属螯和层析是一种具有良好操控性的层析技术，可以通过优化缓冲液条件，选择不同的金属离子来提高目标蛋白的纯度和收率，也可以选择高分辨率的层析介质提高分辨率，从而达到高纯度和高收率的要求。

- 1.由于金属螯和层析介质能特异的和以下几种氨基酸结合（例如：Glu, Asp, Arg, Lys, Tyr, His, Cys, Met等），在纯化His-tag蛋白的时候，杂蛋白也可能吸附在层析介质上；所以使用线性咪唑梯度探索杂蛋白和目标蛋白的洗脱浓度，找到最佳his-tag 蛋白纯度结合和洗脱的咪唑浓度。
- 2.在金属螯和层析过程中，可以使用咪唑竞争洗脱，也可以使用降低pH洗脱目标His-tag蛋白。在纯化工艺探索时，如果需要目标his-tag蛋白在低盐的条件下，可以使用低pH（pH3-4）洗脱方式。
- 3.IMAC Bestarose FF不仅可以Ni离子，也可以使用Cu, Co, Zn等金属离子，不同的金属离子的吸附能力不同，所以可以筛选不同离子的亲和力，探索最合适的金属离子以及洗脱条件。
- 4.大肠杆菌表达的His-tag蛋白多为包涵体，可以使用Ni Bestarose FF柱上复性，在分离纯化的同时还可以柱上在位复性。
- 5.金属螯和层析也可以与某些蛋白结合，例如白蛋白，干扰素，某些抗体分子。
- 6.IMAC Bestarose FF/HP金属螯和层析还可以在药物检测的预处理中去除金属离子，例如：四环素类、喹诺酮类、大环内酯类、 β -内酰胺类、氨基糖苷类以及用于检测血清、尿液和组织中生物标志物的预处理。

金属螯和层析常见的问题以及解决方案

纯化中的问题	产生的原因	解决方案
样品粘度高	DNA没有完全破碎	增加超声破碎时间，注意样品最好在冰浴条件下。也可以加入适量的DNA酶。
样品没有吸附 (在流穿峰中检测到样品)	样品超载	检测上样量以及介质的动态载量，Ni Bestarose FF/HP 和IMAC Bestarose FF/HP通常的载量在30-50mg/ml His-tag 蛋白，不同的样品载量不同，需要检测动态载量
	不适合的吸附条件	检测缓冲液的pH以及缓冲盐的使用，含有还原剂，螯合剂等会影响吸附。 不同表达体系的培养基中可能含有金属离子
	使用过的层析柱没有及时再生，或离子脱落过多。	进行CIP步骤，参照Ni Bestarose FF/HP 和IMAC Bestarose FF/HP 使用说明书
	His-tag没有完全暴露	降低流速 批次吸附 变性蛋白没有完全暴露，更改表达体系
洗脱的样品纯度太低	洗脱条件没有优化	按照优化的方法优化纯化条件
重复性差	样品不稳定 层析柱没有再生，清洗彻底	检查样品的稳定性，低温条件纯化进行CIP步骤，参照Ni Bestarose FF/HP 和IMAC Bestarose FF/HP使用说明书
层析柱颜色变灰或黑	使用不正确的缓冲液（含有还原剂，或pH过高），使金属离子还原	层析柱再生 按照CIP步骤清洗层析柱
	层析柱使用次数过多	更换新柱
	样品没有过滤，杂质过多	样品预处理，离心，盐析沉淀，过滤

订货信息

预装柱

货号	产品名称	包装	货号	产品名称	包装
EA208301	EzFast Ni FF	1 × 1ml	EA208101	EzFast Ni HP	1 × 1ml
EA006	EzFast Ni FF	5 × 1ml	EA208103	EzFast Ni HP	1 × 5ml
EA007	EzFast Ni FF	5 × 5ml	EA004	EzFast Ni HP	5 × 1ml
EA208302	EzScreen Ni FF	1 × 4.2ml	EA005	EzFast Ni HP	5 × 5ml
EA008	EzScreen Ni FF	5 × 4.2ml	EA208102	EzScreen Ni HP	1 × 4.2ml
EA208304	EzLoad 16/10 Ni FF	16*10mm*cm	EA003	EzScreen Ni HP	5 × 4.2ml
EA208306	EzLoad 26/10 Ni FF	26*10mm*cm	EA208104	EzLoad 16/10 Ni HP	16*10mm*cm
EA207301	EzFast IMAC FF	1 × 1ml	EA207302	EzScreen IMAC FF	1 × 4.2ml
EA207303	EzFast IMAC FF	1 × 5ml	EA011	EzScreen IMAC FF	5 × 4.2ml
EA009	EzFast IMAC FF	5 × 1ml	EA207304	EzLoad 16/10 IMAC FF	16*10mm*cm
EA010	EzFast IMAC FF	5 × 5ml	EA207306	EzLoad 26/10 IMAC FF	26*10mm*cm

层析介质

货号	产品名称	包装	货号	产品名称	包装
AA0051	Ni Bestarose FF	25ml	AA0041	Ni Bestarose HP	25ml
AA0052	Ni Bestarose FF	100ml	AA0042	Ni Bestarose HP	100ml
AA0053	Ni Bestarose FF	500ml	AA0043	Ni Bestarose HP	500ml
AA0054	Ni Bestarose FF	1L	AA0044	Ni Bestarose HP	1L
AA0055	Ni Bestarose FF	5L	AA0045	Ni Bestarose HP	5L
AA0056	Ni Bestarose FF	10L			
AA208315	Ni Bestarose FF	20L			
AA0061	IMAC Bestarose FF	25ml	AA207105	IMAC Bestarose HP	25ml
AA0062	IMAC Bestarose FF	100ml	AA207107	IMAC Bestarose HP	100ml
AA207310	IMAC Bestarose FF	500ml	AA207110	IMAC Bestarose HP	500ml
AA0063	IMAC Bestarose FF	1L	AA207112	IMAC Bestarose HP	1L
AA0064	IMAC Bestarose FF	5L	AA207113	IMAC Bestarose HP	5L
AA0065	IMAC Bestarose FF	10L			
AA207315	IMAC Bestarose FF	20L			