

Ni Focurose FF (IDA)

为确保产品的性能和无忧的操作，使用前请仔细阅读本手册，有任何疑问请咨询本公司售后技术支持或当地的销售人员（联系方式见附录）。

1. 产品介绍

Ni Focurose FF (IDA) 是利用 Ni^{2+} 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 His 标签蛋白及与 Ni^{2+} 具有相互作用的生物分子的分离纯化。

特点：

- 快速、简单（一步纯化）。
- 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）。
- 多重选择，当 Ni^{2+} 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 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 等）。

备注：当螯合 Ca^{2+} 时，避免使用磷酸盐缓冲液（会形成沉淀）。

表1: Ni Focurose FF (IDA) 性能参数

基质	高度交联 6%的琼脂糖
粒径范围	45-165 μm
平均粒径	90 $\pm$ 5 μm
结合载量	$\geq 30\text{mg}$ (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**	所有常用水溶液和缓冲液 避免使用螯合剂（例如 EDTA、EGTA）和还原剂（例如 DTT 和 DTE）
流速	$\geq 300\text{cm/h}$
操作压力	$\leq 0.3\text{MPa}$
贮存溶液	20%乙醇
贮存温度	4-30 $^{\circ}\text{C}$

*: 此处稳定性指的是在未螯合金属离子时介质的稳定性。

**: Ni Focurose FF (IDA) 在使用过程中，避免使用螯合剂和还原剂。

2. 溶液制备

平衡液：0.02M PB、0.5M NaCl、0.02-0.04M Imidazole, pH 7.4。

洗脱液：0.02M PB、0.5M NaCl、0.5M Imidazole, pH 7.4。

备注：当纯化包涵体时，溶液中要添加8M Urea或6M Gua-HCl。

3. 样品制备

3.1样品所在溶液要和平衡液保持一致，可以用平衡液进行裂解、透析/超滤/G25进行缓冲液置换。

3.2样品过滤（平均粒径 $<45\mu\text{m}$ ，用 $0.22\mu\text{m}$ 过滤； $45\mu\text{m}<\text{平均粒径}<165\mu\text{m}$ ，用 $0.45\mu\text{m}$ 过滤；平均粒径 $>165\mu\text{m}$ ，用 $0.8\mu\text{m}$ 过滤）。

4. 纯化流程（以 XK16/10 为例）

4.1 采用液滴对液滴（避免引入气泡）的方式将柱子连接到层析系统上。

4.2 用纯化水以5ml/min的流速冲洗5个CV。

4.3 用洗脱液以5ml/min的流速冲洗5个CV。

4.4 用平衡液以5ml/min的流速冲洗10个CV。

4.5 将样品以5ml/min的流速上样。

4.6 用平衡液以5ml/min的流速冲洗至紫外吸收值平稳（10-15个CV）。

4.7 用洗脱液以5ml/min的流速洗脱5CV或20CV（阶梯式洗脱5CV/线性梯度洗脱20CV）。

5. 再生（以 XK16/10 为例）

5.1 用纯化水以 5ml/min 的流速冲洗 10 个 CV。

5.2 用剥离液以 5ml/min 的流速冲洗 10 个 CV。

5.3 用平衡液以5ml/min的流速冲洗10个CV。

5.4 用纯化水以5ml/min的流速冲洗10个CV。

5.5 用0.1M NiSO_4 以5ml/min的流速冲洗5个CV。

5.6 用纯化水以5ml/min的流速冲洗5个CV。

5.7 用平衡液以5ml/min的流速冲洗5个CV。

5.8 用20%乙醇以5ml/min的流速冲洗5个CV。

备注：剥离液，0.02M PB、0.5M NaCl、0.05 EDTA, pH 7.4。

6. 清洗（以 XK16/10 为例）

6.1 参照 5.1-5.4 操作将 Ni^{2+} 剥离。

6.2 用 1.5M NaCl 以 5ml/min 的流速冲洗 10 个 CV。

6.3 用纯化水以5ml/min的流速冲洗10个CV。

6.4 用 1.0M NaOH以2.5ml/min的流速冲洗30个CV。

6.5 用平衡液以5ml/min的流速冲洗10个CV。

6.6 用纯化水以5ml/min的流速冲洗10个CV。

6.7 用30%异丙醇以2.5ml/min的流速冲洗10个CV。

6.8 参照5.4-5.8操作将 Ni^{2+} 螯合。

7. 常见问题

表2：常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方案
纯化时目标物不与介质结合或结合量较低	1. 上样量过载	降低上样量
	2. 上样流速过快	降低上样流速
	3. 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
	4. 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
	5. 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
	6. 目标蛋白出现在流穿中	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
洗脱时没有收集到目标物或只收集到少量目标物	1. 目标物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
	2. 洗脱条件不合适	加大洗脱液中咪唑浓度
	3. 洗脱时间不够	降低流速, 延长洗脱液的保留时间
	4. 洗脱体积过小	加大洗脱体积
	5. 洗杂时, 目的蛋白被洗下来	降低洗杂液中的咪唑浓度
	6. 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
目标物纯度较低	1. 样品没有经过前处理	样品上柱前必须要经过离心或过滤
	2. 样品粘度过高	用平衡液适当的稀释样品, 降低粘度。
	3. 洗杂不彻底	加大洗杂体积直至基线平稳并与平衡液一致
	4. 杂质蛋白或脂类在介质中聚集沉淀	及时有效地清洗介质
	5. 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)
	6. 目标物出现降解	检测目标物的稳定性并加入蛋白酶抑制剂
	7. 柱料装填效果不佳	重新装填或购买
	8. 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
	9. 分离柱顶部有较大储样体积	重新装柱或降低储样体积
	10. 介质中有微生物生长	介质使用完后, 请及时正确保存介质
介质载量下降	1. 上样流速过快	降低上样流速
	2. 蛋白或脂类在介质中聚集, 导致载量下降。	及时清洗介质
	3. 使用次数过多	更换新介质
	4. 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	1. 蛋白或脂类聚集	及时清洗介质或滤膜
	2. 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
	3. 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

8. 订购信息

表3：订购信息表

产品	规格	货号
Ni Focurose FF (IDA)	25ml	HQ060311025M
Ni Focurose FF (IDA)	100ml	HQ060311100M
Ni Focurose FF (IDA)	500ml	HQ060311500M
Ni Focurose FF (IDA)	1L	HQ060311001L
Ni Focurose FF (IDA)	5L	HQ060311005L
Ni Focurose FF (IDA)	20L	HQ060311020L

备注：大规格包装产品或其它产品购买，请咨询本公司当地销售或售前技术支持。

9. 联系方式

武汉汇研生物科技有限公司

地址：武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 3.2 期 11 号厂房栋 20 层

电话：027-8777 2229

网址：www.Huiyan-Bio.com

邮箱：Huiyanbio@126.com

