



IMAC Beads 6FF

目录

1. 产品介绍	1
2. 离子螯合	2
3. 纯化流程	2
4. 在位清洗	4
5. 填料再生	4
6. 订购信息及相关产品	4

1. 产品介绍

IMAC Beads 6FF 是以高度交联的 6%琼脂糖凝胶为基质, 配体结构见图 1 所示, 填料可以用于螯合各种金属离子, 如 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , 对 His 标签的结合能力 $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$, 可根据金属离子对标签蛋白的结合力来选择需要螯合的金属离子。具体性能见表 1。
IMAC Beads 6FF 除了可以耐受苛刻的试剂条件 (见表 2) 外, 因其耐压的基质, 可以耐受最高 0.3 MPa 的压力, 更稳定, 因此该产品更适合用于工业大规模蛋白的纯化, 可以在相对较高的流速下, 实现对目的蛋白的纯化。

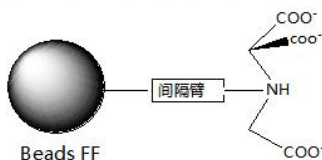


图 1. IMAC Beads 6FF 化学结构示意图

表 1. IMAC Beads 6FF 产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 6%琼脂糖凝胶
粒径范围	45–165 μm
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1XPBS
储存温度	4–30 $^{\circ}\text{C}$

表 2. IMAC Beads 6FF 试剂耐受情况

试剂种类	浓度
还原剂	5 mM DTE
	1 mM DTT
	20 mM β -mercaptoethanol
	5 mM TCEP
	10 mM reduced glutathione
变性剂	8 M urea
	6 M Gua-HCl
去污剂	2% Triton™ X-100 (nonionic)
	2% Tween™ 20 (nonionic)
	2% NP-40 (nonionic)
	2% Cholate (anionic)
	1% CHAPS (zwitterionic)
其他类	500 mM imidazole
	20% ethanol
	50% glycerol
	100 mM Na_2SO_4
	1.5 M NaCl
	1 mM EDTA
	60 mM citrate





2. 离子螯合

- 1) 量取 200 ml 混匀的 IMAC Beads 6FF(柱体积 100 ml), 于 500 ml G-3 漏斗中抽去其保护液。用 400 ml 蒸馏水淋洗三次, 抽干。
- 2) 转移滤饼至 500 ml 锥形瓶中, 加入 200 ml-400 ml 的 100 mM 的金属离子水溶液, 室温下振荡反应 6-10 h。
- 3) 反应结束, 用 5-10 倍体积的去离子水淋洗填料, 洗净残余的金属离子, 抽干水。将填料转移到容器中, 加入 100 ml 的含 20% 的乙醇, 保存于 4℃。

3. 纯化流程

3.1 缓冲液的准备

以镍离子螯合后, 纯化 His 标签蛋白为例。可使用下列推荐缓冲液, 也可根据自己的使用习惯配置不同的缓冲液体系, 基本原理就是低咪唑上样, 高咪唑洗脱, 或者高 pH 上样, 低 pH 洗脱。缓冲液在使用前最好用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤除菌。因为 IMAC Beads 6FF 可以用于可溶蛋白和包涵体蛋白的纯化, 两种方法所需缓冲液不同, 具体配置方法如下。

可溶性组氨酸标签蛋白纯化

平衡液: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0-10 mM 咪唑, pH8.0

洗杂液: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10-20 mM 咪唑, pH8.0

洗脱液: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM 咪唑, pH8.0

包涵体组氨酸标签蛋白纯化

平衡液: 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris-HCl, 8 M 尿素, pH8.0

洗杂液: 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris-HCl, 8 M 尿素, 10-20 mM 咪唑, pH8.0

洗脱液: 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris-HCl, 8 M 尿素, 250 mM 咪唑, pH8.0

3.2 样品准备

3.2.1 细菌或酵母表达的蛋白

- 1) 挑取单菌落到 LB 培养基中, 根据载体使用说明加入相应浓度的诱导剂诱导相应的时间。
- 2) 表达结束后, 将培养液转移到离心杯中, 7,000 rpm(7,500×g), 离心 15 min 收集菌体, 然后按照菌体: 平衡液=1: 10 (W/V) 加入平衡液, 加入终浓度为 1 mM 的 PMSF。加入溶菌酶 (工作浓度为 0.2-0.4 mg/ml, 如果表达的宿主细胞内含 pLysS 或 pLysE, 可以不加溶菌酶), (同时也可加入其他蛋白酶抑制剂, 但不能影响目的蛋白与填料的结合)。
- 3) 将菌体沉淀悬浮起来, (如果菌液浓度高, 也可考虑加入 10 μg/ml RNase A 和 5 μg/ml DNase I), 混匀, 放置于冰上, 然后冰上超声破碎细胞, 至菌液基本保持澄清。
- 4) 将澄清的破碎液转移至离心管中, 10,000 rpm(15,000×g), 4℃离心 20-30 min。取上清, 置于冰上备用或-20℃保存。

3.2.2 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白

- 1) 将细胞培养液转移至离心杯, 5,000 rpm(3,800×g), 离心 10 min, 收集菌体得上清, 如上清中不含 EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 即可直接加入柱子使用; 如含有 EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 需用结合液透析才能加入柱子。
- 2) 对于大量体积的上清, 需加入硫酸铵沉淀浓缩后, 蛋白还需用结合液透析后才能加入柱子。

3.2.3 包涵体蛋白纯化(变性条件)

- 1) 将培养液转移到离心杯中, 7,000 rpm(7,500×g), 离心 15 min 收集菌体, 去掉上清。
- 2) 按照菌体: 平衡液 (不含 8 M 尿素)=1:10(W/V)将菌体悬浮起来混匀, 冰浴超声破碎。
- 3) 将破碎液转移至离心管中, 10,000rpm(15,000×g), 4℃离心 20-30 min。去掉上清, 步骤 2) 和 3) 可以重复一次。
- 4) 按照菌体: 平衡液(含 8 M 尿素)=1:10(W/V)将包涵体悬浮起来。
- 5) 变性条件下进行 His 标签蛋白纯化。

3.3 填料的装填

3.3.1 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) 将螯合金属离子的 IMAC Beads 6FF 混合均匀, 用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中 (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。
- 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, 4-30℃保存。





3.3.2 中压层析柱的装填

螯合金属离子的 IMAC Beads 6FF 被广泛应用于工业纯化, 因此, 涉及到各种中压色谱层析柱的填装, 下面介绍填装层析柱的方法。

装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积, 根据所需装柱高度计算所需介质体积, 公式如下:

$$V = 1.15\pi r^2 h$$

V: 所需介质体积 ml

1.15: 压缩系数

r: 柱管半径 cm

h: 装填高度 cm

注意: 所取悬液体积应为介质体积的两倍, 因为介质体积只占悬液总体积的一半, 另一半为保护液。

- 1) 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头, 确保柱底筛板上无气泡, 关闭柱底出口, 并在柱底部留出 1-2 cm 的去离子水。
- 2) 将填料悬浮起来, 小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3) 如果使用储液器, 应立即在层析柱和储液器中加满水, 将进样分配器放置于浆液表面, 连接至泵上, 避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4) 打开层析柱底部出口, 开启泵, 使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱, 然后缓慢增加至最终流速, 这样可避免液压对所形成柱床的冲击, 也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速, 可以用你所使用泵的最大流速, 这样也可以得到一个很好的装填效果。(注意: 在随后的色谱程序中, 不要超过最大装柱流速的 75%) 当柱床高度稳定后, 在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
- 5) 关闭泵, 关闭层析柱出口。
- 6) 如果使用储液器, 去除储液器, 将分配器置于层析柱中。
- 7) 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器, 锁紧分配器接头。
- 8) 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中, 开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

3.4 样品纯化

3.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量, 取适量螯合金属离子的 IMAC Beads 6FF 加入离心管中, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 也可加入重力柱中, 流干保护液。
- 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 min, 吸弃上清; 如使用重力柱, 则直接在重力柱中清洗, 直接重力流干平衡液; 重复两次以上。
- 3) 加入样品, 封闭离心管或重力柱管, 4℃振荡孵育 2-4 h 或者 37℃孵育 30 min-2 h。
- 4) 孵育结束后, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清, 或过滤收集介质, 上清保留作为流穿, 用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤, 去除上清 (注意不要吸到介质), 重复 3-5 次, 中间建议更换新离心管。
- 6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱, 室温孵育 10-15 min, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液, 可重复 2-3 次。

3.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的螯合金属离子的 IMAC Beads 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 2 min, 保证样品和介质充分接触, 收集流出液, 可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。
- 4) 使用 5-10 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。

3.4.3 中压层析柱法纯化

螯合金属离子的 IMAC Beads 6FF 装填好后, 可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子, 将层析柱连接至色谱系统中, 打开下出口, 将预装柱接到色谱系统中, 并旋紧。
 - 2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。
 - 3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
 - 4) 利用泵或样品环上样。注: 样品的粘度增加使得即使上样体积很少, 也会导致层析柱很大的反压。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, 使得进样器更难使用。
 - 5) 用洗杂液冲洗柱子, 直到紫外吸收达到一个稳定的基线 (一般至少 10-15 个柱体积)。
 - 6) 用洗脱液采用一步法或线性梯度洗脱。一步洗脱中, 通常 5 倍柱体积洗脱液就足够了。梯度洗脱可以用一个小的梯度, 例如 20 倍柱体积或更多, 来分离不同结合强度的蛋白质。
- 介质洗脱结束后, 先用平衡液冲洗 3 倍柱体积, 然后用纯水冲洗 5 倍柱体积, 再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积, 然后将介质置于 2-8℃保存。





3.5 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品（包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分）以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

4. 在位清洗

当填料使用过程中发现反压过高或者填料上面出现明显的污染时，需要进行在位清洗操作（Cleaning-in-Place, CIP）。建议按照下面操作去除填料上残留的污染物，如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

去除强疏水结合的蛋白，脂蛋白和脂类

通过使用 30% 异丙醇清洗 5-10 个柱体积，接触时间为 15-20 min 可以去除此类污染物。然后，再使用 10 倍柱体积的去离子水清洗。也可以选择使用含有去污剂的酸性或碱性溶液，清洗填料 2 倍柱体积。例如，含有 0.1-0.5% 非离子去污剂的 0.1 M 醋酸溶液，接触时间为 1-2 小时。去污剂处理后，需要使用 70% 的乙醇清洗 5 个柱体积，以彻底去除去污剂。最后使用 10 倍柱体积的去离子水清洗。

去除离子作用结合的蛋白

使用 1.5 M NaCl 溶液清洗 10-15 min。然后，再使用去离子水清洗 10 个柱体积。

5. 填料再生

当填料使用过程中发现颜色变浅，或者填料载量明显变低时，需要进行对填料进行金属离子剥离和重新挂金属离子，也就是填料再生。将填料装填在合适的层析柱内，按照下面操作流程进行金属离子剥离和重新挂金属离子。

- 1) 使用 5 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 2) 使用 5 倍柱体积 100 mM EDTA (pH 8.0) 剥落镍离子；
- 3) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗填料；
- 4) 使用 0.5 M NaOH 清洗 5 倍柱体积，停留 10-15 min；
- 5) 使用去离子水清洗填料，直至 pH 中性；
- 6) 使用 3-5 倍柱体积 100 mM 的金属离子水溶液(Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} etc.)再生；
- 7) 使用 10 倍柱体积去离子水清洗；

填料再生后，可以立即使用，如不立即使用，需要将填料悬浮于等体积的 20% 乙醇中，置于 4-30℃ 保存。

6. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
IMAC Beads 6FF	SA050005	5 ml
	SA050025	25 ml
	SA050100	100 ml
	SA050500	500 ml
	SA05001L	1 L
	SA05010L	10 L
Chelating Beads 6FF	SA051005	5 ml
	SA051025	25 ml
	SA051100	100 ml
	SA051500	500 ml
	SA05101L	1 L
	SA05110L	10 L

