

## 亲和层析填料 IMAC 6FF 使用说明书

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。

### 1. 产品介绍

IMAC 6FF 是利用其螯合的金属离子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 标签蛋白及与金属离子作用的生物分子的分离纯化。

特点如下：

- 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，可以螯合各种金属离子进行使用（例如  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 等）。
- 相对于 IDA 6FF 来说， $\text{Ni}^{2+}$ 脱落低、试剂兼容性广（见表 2）。

备注：当螯合  $\text{Ca}^{2+}$ 时，避免使用磷酸盐缓冲液（会形成沉淀）。

表1：介质性能参数

基质	高度交联 6%的琼脂糖
粒径范围	45-165 $\mu\text{m}$
平均粒径	90 $\mu\text{m}$
结合载量	40mg(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*	0.01M 盐酸、0.01M 氢氧化钠（一周） 1M 氢氧化钠、70%乙醇(12 小时) 2% SDS(1 小时) 30% 异丙醇（0.5 小时）
流速	600cm/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。



表2：常用试剂兼容性

缓冲液	0.05M sodium phosphate, pH 7.4 0.1M Tris-HCl, pH 7.4 0.1M Tris-acetate, pH 7.4 0.1M HEPES, pH 7.4 0.1M MOPS, pH 7.4 0.1M sodium acetate, pH 4
变性剂	8M Urea 6M Gua-HCl
去污剂	2% Triton X-100 2% Tween 20 2% NP-40 2% Cholate 1% CHAPS
还原剂*	0.005M DTE 0.005M DTT 0.02M $\beta$ -mercaptoethanol 0.005M TCEP 0.01M reduced glutathione
其它添加剂	0.5M Imidazole 20% Ethanol 50% Glycerol 0.1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.5M NaCl 0.001M EDTA ** 0.06M Citrate

\*: IMAC 6FF 螯合金属离子后，允许在样品和纯化溶液中加入低浓度的还原剂，但在不使用时切不可用含有还原剂的溶液长时间浸泡或保存。

\*\*：IMAC 6FF 螯合金属离子后，允许在小体积样品中加入极低浓度的金属离子螯合剂（例如 0.001M EDTA），但不得在纯化溶液中加入或者加载大体积含螯合剂的样品。

## 2. 螯合方法

可选择不同的金属离子进行螯合，争对不同的样品可选择不同的金属离子溶液（NiSO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub>/CoSO<sub>4</sub>/ZnCl<sub>2</sub>/ CaCl<sub>2</sub>/FeCl<sub>2</sub>）。

a. 用 5-10 倍柱体积（CV）纯化水冲洗。

备注：用于去除 20% 乙醇（使用前清洗）。

b. 用 5-10 倍柱体积 0.1M 金属离子溶液冲洗，静置 0.5 小时后再用 5-10 倍柱体积纯化水。

备注：用于螯合金属离子及清洗。



c. 用 5-10 倍柱体积 20%乙醇冲洗后保存备用。

备注：20%乙醇可以防止微生物的生长，20%乙醇保存的介质可以在 4-30℃（4-8℃更佳）保存。

### 3. 使用（以 HT 1ml 和 HT 5ml 为例）

#### a. 水洗

用 5-10CV 纯化水以 0.5ml/min(HT 1ml)或 2.0ml/min(HT 5ml)清洗介质。

备注：此步骤用于去除介质中 20%乙醇。

#### b. 平衡

用 5-10CV 平衡液以 0.5ml/min(HT 1ml)或 2.0ml/min(HT 5ml)平衡介质，直至基线平稳后调零。

备注：此步骤用于平衡介质，保证介质中的溶液的组分和 pH 与样本一致。

#### c. 上样

样品经过离心、过滤（0.45um）后以 0.2ml/min(1ml)或 1.0ml/min(5ml)进行上样，上样完成后用平衡液清洗直至基线为零。

备注：蛋白的结合能力随着裂解物类型、目标蛋白性质、流速、pH 变化而变化，低流速常常能增加样本的结合效率。

#### d. 洗杂

用 5-10CV 洗杂液以 0.5ml/min(HT 1ml)或 2.0ml/min(HT 5ml)洗杂，并收集洗杂液。

备注：洗杂液用于清洗一些非特异吸附的杂质蛋白。

#### e. 洗脱

用 5-10CV 洗脱液以 0.5ml/min(1ml)或 2.0ml/min(5ml)进行洗脱，并收集洗脱液。

备注：低流速常常能增加洗脱液中目标蛋白的浓度。

#### f. 水洗

用 5-10CV 纯化水以 0.5ml/min(1ml)或 2.0ml/min(5ml)清洗介质。

备注：此步骤用于去除介质中洗脱液。

#### g. 保存

用 5-10CV 20%乙醇以 0.5ml/min(1ml)或 2.0ml/min(5ml)清洗介质后保存。

备注：20%乙醇可以防止微生物的生长，20%乙醇保存的介质可以在 4-30℃（4-8℃更佳）保存。

#### h. 溶液配制（如果是包涵体纯化，在下述平衡液、洗杂液、洗脱液中添加 8M 尿素或 6M 盐酸胍）

平衡液：0.02M PB、0.5M NaCl，调节 pH 7.4，室温保存。

备注：平衡液中 NaCl 是为了抑制介质的离子交换作用。

洗杂液：0.02M PB、0.5M NaCl、0.02-0.04M 咪唑，调节 pH 7.4，室温保存。

备注：根据最终使用需求（优先考虑的是纯度，还是收率），在洗杂液中加入 0.02-0.04M 咪唑（优先考虑回收率）或者直接在平衡液中加入 0.02-0.04M 咪唑（优先考虑纯度）。

洗脱液：0.02M PB、0.5M NaCl、0.5M 咪唑，调节 pH 7.4，室温保存。

备注：一般情况下，洗脱液中咪唑浓度在 0.05-0.25M 即可洗脱下目标蛋白。



### 4. 清洗

清洗后可以去除一些强结合性物质（例如一些强结合的蛋白、变性蛋白、脂类等），从而达到恢复介质的优良性能（例如载量、流动性、柱效等）。

建议每使用 5-10 次后进行一次清洗和再生，具体清洗频率需根据纯化的初始样品的洁净度进行调整。

d.用 5-10 倍柱体积纯化水冲洗。

备注：用于去除洗脱液（使用后直接清洗）或 20%乙醇（使用前清洗）。

e.用 5-10 倍柱体积 0.02M Tris-HCl、0.1M EDTA pH 8.0 冲洗，再用 5-10 倍柱体积纯化水冲洗。

备注：用于脱 Ni<sup>2+</sup>。

f.用 5-10 倍柱体积 1.0M NaOH 冲洗，静置 1.0 小时后再用纯化水冲洗至中性。

备注：用于清洗一些聚集在介质上的蛋白沉淀、脂类等物质。

g.用 5-10 倍柱体积 0.1M NiSO<sub>4</sub> 冲洗，静置 0.5 小时后再用 5-10 倍柱体积纯化水冲洗。

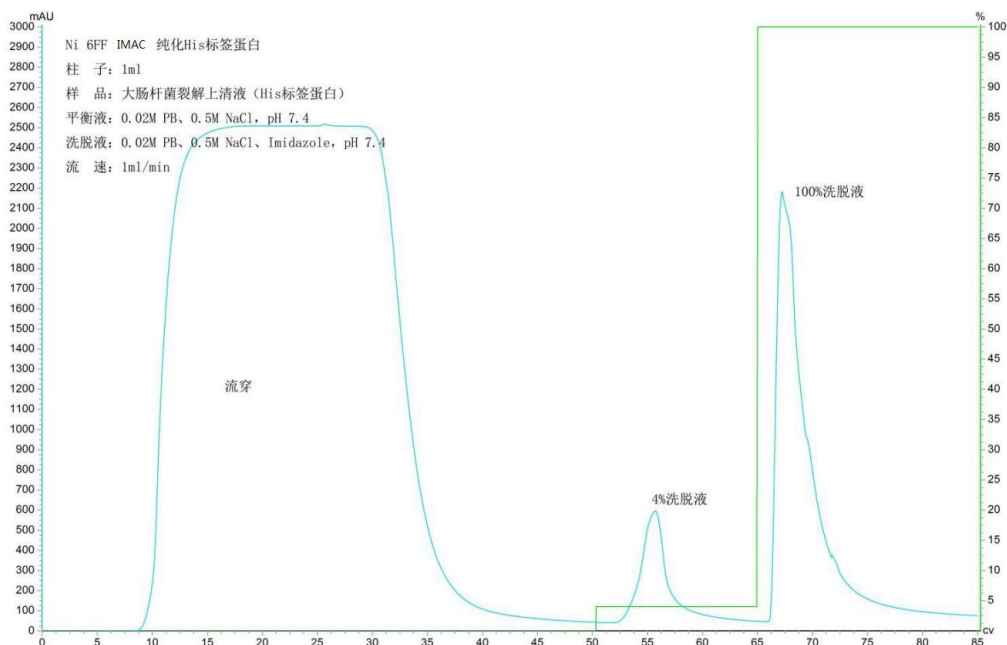
备注：用于螯合 Ni<sup>2+</sup>。

h.用 5-10 倍柱体积的 20%乙醇冲洗后保存。

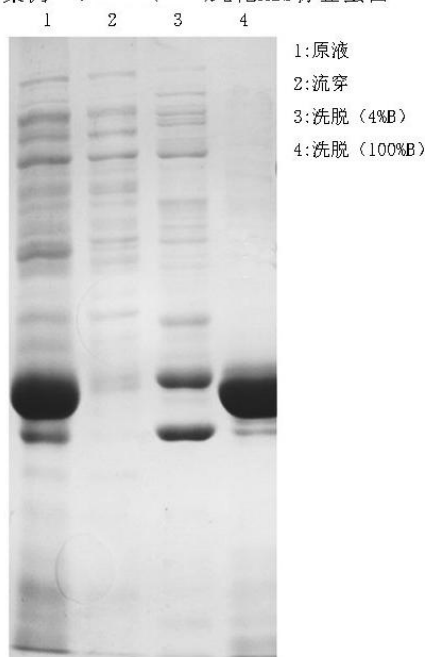
备注：20%乙醇可以防止微生物的生长，20%乙醇保存的介质可以在 4-30℃（4-8℃更佳）保存。

### 5. 应用案例

#### 案例一、Ni Focurose 6FF (IMAC)纯化 His 标签蛋白



### 案例一、Ni 6FF(IMAC)纯化His标签蛋白



1:原液  
2:流穿  
3:洗脱 (4%B)  
4:洗脱 (100%B)

## 6. 常见问题

表3: 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.上样速度过快	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 <sup>2+</sup> 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,可以尝试在样品溶液中加入一些添加剂：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	介质使用后，请及时正确保存介质
介质载量下降	1.上样速度过快	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
色谱峰上升缓慢	介质装填过紧	重新装柱
色谱峰拖尾	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





## 北京慧德易科技有限责任公司

地址：北京市回龙观西大街118号龙冠置业大厦609室

电话：010-59812370/1/2/3 传真：010-59812400

网址：www.prep-hplc.com

	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
--	-------------	--------------------------------

### 7. 订购信息

表4：订购信息表

产品	规格(ml)	货号
IMAC 6FF	25	HZ1007-2
IMAC 6FF	100	HZ1007-2
IMAC 6FF	500	HZ1007-2
IMAC 6FF	1000	HZ1007-2

