



Ni NTA Agarose Beads 6FF

固定化金属亲和层析介质（His标签蛋白纯化）

项目	内容
产品名称	Ni NTA Agarose Beads 6FF
货号	QS01002
版本	V2.0
修订日期	2026年8月
生产企业	江苏千株松生物科技有限公司

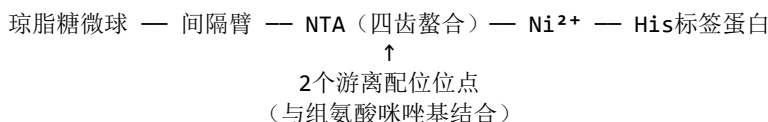
一、产品简介

1.1 产品描述

Ni NTA Agarose Beads 6FF（货号：QS01002）是一种以6%高度交联琼脂糖微球为基质，共价偶联次氨基三乙酸（Nitrilotriacetic acid, NTA）螯合配基，并螯合 Ni^{2+} 的固定化金属亲和层析（IMAC）介质。NTA作为四齿螯合剂，通过四个配位键与 Ni^{2+} 牢固结合，剩余两个配位位点可与多组氨酸标签（6×His-tag）蛋白表面暴露的组氨酸咪唑侧链特异性相互作用，从而实现His标签重组蛋白的高选择性、高载量亲和纯化。

本产品采用高交联度6%琼脂糖基质，兼具优异的耐压性能与化学稳定性，耐受压力可达0.3 MPa（3 bar），支持较高流速操作，适用于实验室规模至工业中试规模的His标签蛋白快速纯化。

1.2 作用原理



NTA为四齿螯合剂，与 Ni^{2+} 形成六个配位键中的四个，剩余两个配位位点可与6×His标签中相邻组氨酸残基的咪唑氮原子配位结合。结合在介质上的目标蛋白可通过咪唑竞争洗脱或降低pH值洗脱。

1.3 产品特点

- **高动态载量**：动态结合载量（DBC）≥50 mg His标签蛋白/mL沉降介质，单次纯化即可获得高产量目标蛋白；
- **低 Ni^{2+} 泄漏**：NTA四齿螯合结构使 Ni^{2+} 结合牢固，显著降低金属离子脱落，减少目标蛋白污染；



- **高流速与耐压**：6%高交联琼脂糖基质，最大耐压0.3 MPa，推荐线性流速150–300 cm/h，适合快速纯化与工艺放大；
- **宽化学兼容性**：兼容多种还原剂（DTT、 β -巯基乙醇、TCEP等）、变性剂（8 M尿素、6 M盐酸胍）、非离子型去污剂及有机溶剂；
- **宽pH稳定性**：工作pH 3–12，在位清洗（CIP）pH 2–14，可耐受0.1 M NaOH等严苛清洗条件；
- **多条件适用**：支持天然（非变性）条件与变性条件下纯化，适用于可溶性蛋白及包涵体蛋白；
- **可再生重复使用**：经剥离 Ni^{2+} 、清洗、重新载镍后可多次循环使用，降低使用成本。

二、技术规格

项目	规格
基质 (Matrix)	6%高交联度球形琼脂糖
配基 (Ligand)	次氨基三乙酸 (NTA) , 螯合 Ni^{2+}
外观	浅蓝色均一悬液
平均粒径	90 μm (粒径分布45–165 μm)
动态结合载量 (DBC, 10%穿透)	≥ 50 mg 6 $\times$ His标签蛋白/mL沉降介质
Ni^{2+} 结合容量	约15 $\mu\text{mol Ni}^{2+}$ /mL沉降介质
最大耐压	0.3 MPa (3 bar, 约43 psi)
推荐线性流速	150–300 cm/h
重力流操作流速	0.5–2 mL/min (依柱径而定)
最高线性流速	≥ 370 cm/h
pH稳定性 (工作)	3–12
pH稳定性 (CIP, 短期)	2–14
储存液	20%乙醇水溶液
储存温度	2–8 $^{\circ}\text{C}$, 避光
介质浓度	约50%悬液 (沉降介质:储存液 = 1:1, v/v)

三、储存与稳定性

1. 本产品以20%乙醇悬液形式提供，应于**2–8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存**，切勿冷冻；
2. 未开封状态下，在规定储存条件下有效期为**24个月**；
3. 开封后建议在**12个月内**用完，每次使用后应及时更换储存液并于2–8 $^{\circ}\text{C}$ 保存；



4. 避免介质长时间暴露于室温或强光下；
5. 已装填的层析柱若长期不用，应置换为20%乙醇后于2-8 °C保存。

四、应用领域

- 大肠杆菌、酵母、昆虫细胞及哺乳动物细胞表达系统中6×His标签重组蛋白的纯化；
- 可溶性胞内蛋白、分泌表达蛋白及包涵体变性蛋白的亲和捕获；
- 实验室规模蛋白功能研究、抗体制备、结构生物学研究；
- 工业中试及大规模重组蛋白生产工艺中的捕获步骤（Capture step）；
- 可与凝胶过滤、离子交换等层析步骤组合，实现多步纯化工艺。

五、纯化工艺

5.1 缓冲液配制通则

- 使用高纯度水（ $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）及分析纯以上级别试剂配制缓冲液；
- 缓冲液配制后建议经0.45 μm （或0.22 μm ）滤膜过滤并充分脱气后使用；
- 咪唑母液（如3 M咪唑，pH 6.0）可提前配制，于4 °C保存；
- 所有缓冲液使用前确认pH值已校准至目标值 ± 0.1 。

5.2 天然（非变性）条件缓冲液配方

适用于可溶性His标签蛋白的纯化，可保持蛋白天然构象与生物活性。

缓冲液名称	配制体积	配方
裂解/平衡缓冲液（LE Buffer）	1 L	50 mM NaH_2PO_4 （7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）；300 mM NaCl（17.54 g NaCl）；10 mM咪唑（0.68 g咪唑）；用NaOH调pH至8.0
洗杂缓冲液（Wash Buffer）	1 L	50 mM NaH_2PO_4 （7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）；300 mM NaCl（17.54 g NaCl）；20 mM咪唑（1.36 g咪唑）；用NaOH调pH至8.0
洗脱缓冲液（Elution Buffer）	1 L	50 mM NaH_2PO_4 （7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）；300 mM NaCl（17.54 g NaCl）；250 mM咪唑（17.0 g咪唑）；用NaOH调pH至8.0

提示：平衡/洗杂缓冲液中10-20 mM咪唑可有效减少非特异结合蛋白；若目标蛋白结合较弱，可将洗杂咪唑浓度降至10 mM。洗脱缓冲液中250 mM咪唑可洗脱大多数His标签蛋白；若洗脱不完全，可提高至500



mM咪唑，或采用pH 4.5的酸性缓冲液洗脱。首次纯化建议进行咪唑梯度洗脱（如20、50、100、250、500 mM）以确定最佳洗脱浓度。

5.3 变性条件缓冲液配方（咪唑洗脱）

适用于大肠杆菌包涵体蛋白的变性纯化。8 M尿素可替换为6 M盐酸胍（Guanidine-HCl）。

缓冲液名称	配制体积	配方
裂解/平衡缓冲液（LE Buffer）	1 L	100 mM NaH_2PO_4 (15.60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ; 10 mM Tris-HCl (1.21 g Tris, 加980 mL水, 用HCl调pH 8.0后定容) ; 8 M尿素 (480.50 g尿素) ; 用NaOH调pH至8.0
洗杂缓冲液（Wash Buffer）	1 L	100 mM NaH_2PO_4 (15.60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ; 10 mM Tris-HCl (1.21 g Tris) ; 8 M尿素 (480.50 g尿素) ; 10 mM咪唑 (0.68 g咪唑) ; 用NaOH调pH至8.0
洗脱缓冲液（Elution Buffer）	1 L	100 mM NaH_2PO_4 (15.60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ; 10 mM Tris-HCl (1.21 g Tris) ; 8 M尿素 (480.50 g尿素) ; 250 mM咪唑 (17.0 g咪唑) ; 用NaOH调pH至8.0

5.4 变性条件缓冲液配方（pH梯度洗脱，可选）

对于部分在咪唑洗脱条件下效果不佳的蛋白，可采用pH梯度洗脱：

缓冲液名称	配方	pH
裂解缓冲液	8 M尿素, 100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM Tris-HCl	8.0
洗杂缓冲液	8 M尿素, 100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM Tris-HCl	6.3
洗脱缓冲液	8 M尿素, 100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM Tris-HCl	4.5

注意：pH 4.5洗脱时 Ni^{2+} 可能部分脱落，洗脱后应立即中和至pH 7.0–8.0，并及时对介质进行再生处理。

5.5 样品制备

5.5.1 胞内可溶性蛋白（大肠杆菌/酵母）

1. 4 °C、5,000–7,000 rpm（约5,000–7,500 ×g）离心10–15 min收集菌体；
2. 按1:10（w/v）比例用预冷的LE缓冲液重悬菌体，加入PMSF（终浓度1 mM）或其他蛋白酶抑制剂；



- 注意：所用蛋白酶抑制剂不得含EDTA、EGTA等金属螯合剂；

3. 冰浴超声破碎：超声1 s、间隔3 s，总超声时间约30–45 min（视菌体量调整），至菌液澄清不黏丝；
4. 可选：若裂解液过于黏稠，加入RNase A（终浓度10 µg/mL）和DNase I（终浓度5 µg/mL），冰浴孵育10–15 min；
5. 4 °C、12,000 rpm离心15–30 min去除细胞碎片，收集上清，经0.45 µm滤膜过滤后待上样。

5.5.2 分泌表达蛋白（培养上清）

1. 若培养上清中不含EDTA、组氨酸或高浓度还原剂，可直接上样或经0.45 µm过滤后上样；
2. 若含有上述干扰成分，需用1×PBS（pH 7.4）于4 °C充分透析后上样；
3. 对于大体积上清，可先经硫酸铵沉淀浓缩蛋白，沉淀用1×PBS溶解并透析后上样。

5.5.3 包涵体蛋白（大肠杆菌）

1. 按5.5.1步骤收集菌体并超声破碎；
2. 4 °C、12,000 rpm离心10–20 min，收集包涵体沉淀；必要时用1×PBS多次洗涤包涵体以去除杂蛋白；
3. 按约1:7.5–1:10（w/v）比例用变性LE缓冲液（含8 M尿素）重悬包涵体，室温孵育30–60 min，必要时辅以超声或均质处理以促进溶解；
4. 12,000 rpm离心30 min去除不溶物，收集上清待上样；
5. 变性条件下洗脱的蛋白需根据下游应用进行复性（稀释复性、透析复性或柱上复性）。

5.6 层析柱准备与平衡

1. 轻轻颠倒混匀介质瓶，使介质完全均一悬浮（避免剧烈搅拌产生气泡）；
2. 根据所需柱床体积极量取适量介质悬液（介质悬液中沉降介质约占50%），转移至层析柱中；
3. 待介质自然沉降后，排干储存液；
4. 用3–5倍柱体积（CV）去离子水洗去乙醇；
5. 用至少5倍柱体积LE缓冲液平衡柱子，至流出液A280基线稳定且pH与上柱缓冲液一致。

5.7 上样、洗涤与洗脱

步骤	操作	推荐体积	流速
上样	将预处理后的澄清样品以恒定流速上柱，收集穿流液（Flow-through）留样分析	依样品量而定	0.5–1 mL/min（重力流）或150 cm/h
洗涤	用洗杂缓冲液洗涤，至A280回到基线并稳定	8–15 CV	同上



洗脱	用洗脱缓冲液洗脱目标蛋白，分部收集 (每管0.5–1 CV)	5–10 CV	0.5–1 mL/min
----	-----------------------------------	---------	--------------

- 洗脱可采用一步洗脱 (250 mM咪唑)、分步洗脱 (如50、100、250 mM咪唑阶梯) 或线性梯度洗脱 (20–500 mM咪唑, 20 CV以上) ;
- 梯度洗脱可获得更高纯度, 推荐用于对纯度要求较高的实验;
- 收集各洗脱峰组分, 通过A280、SDS-PAGE或Western blot鉴定目标蛋白;
- 洗脱后根据下游应用, 用20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 或1×PBS (pH 7.4) 于4 °C透析去除咪唑。

5.8 层析柱装填 (工业放大参考)

Ni NTA Agarose Beads 6FF具有良好的装填性能, 适合中压层析柱装填及工艺放大。

1. 用装填缓冲液 (如去离子水或0.9% NaCl) 排除柱底及适配器气泡, 确保柱网下无气泡滞留;
2. 关闭柱出口, 保留柱网上方少量缓冲液;
3. 将介质悬液沿玻璃棒缓缓倾入柱内 (或使用装填reservoir) , 避免引入气泡;
4. 连接泵并打开柱出口, 先以低流速使介质沉降, 再逐步提高流速至恒定压力约0.3 MPa (3 bar) 进行装填;
5. 维持装填流速至少3个柱床体积, 待柱床稳定后标记柱床高度;
6. 关闭出口, 安装适配器并下压至标记处, 再继续装填使柱床进一步压实;
7. 将适配器下调约2 mm压入柱床, 锁紧后即可使用;
8. 后续层析操作流速不应超过装填流速的75%。

5.9 纯化结果分析

1. 取穿流液、洗涤液及各洗脱组分适量, 与SDS-PAGE上样缓冲液混合, 煮沸变性5 min;
2. 进行SDS-PAGE电泳 (推荐12%–15%分离胶) , 考马斯亮蓝染色或Western blot检测;
3. 通过条带分析评估目标蛋白纯度、回收率及杂蛋白残留情况;
4. 必要时测定A280计算蛋白浓度 (注意咪唑在280 nm附近有微弱吸收, 透析后测定更准确) 。

六、在位清洗 (CIP)

当层析柱反压升高、柱效下降或观察到明显污染时, 应进行在位清洗 (CIP) , 以去除沉淀蛋白、疏水性蛋白、脂蛋白及脂类等污染物。

6.1 常规CIP流程

1. **去除强疏水结合物、脂蛋白和脂类:** 用10倍柱体积的30%异丙醇洗涤, 接触时间15–20 min, 重复5–10次;



2. 用10倍柱体积去离子水冲洗；
3. 可选：用2倍柱体积含0.1%–0.5%非离子型去污剂的0.1 M醋酸溶液洗涤，接触1–2 h；去污剂处理后需用5倍柱体积70%乙醇彻底去除残留去污剂；
4. **去除沉淀蛋白**：用2–3倍柱体积0.1–0.5 M NaOH洗涤，接触时间30–60 min（不超过1 h）；
5. 用10倍柱体积去离子水冲洗至中性；
6. 用至少5倍柱体积起始缓冲液重新平衡。

6.2 注意事项

- CIP后若介质颜色变浅或变白，提示 Ni^{2+} 脱落，需按“介质再生”流程重新载镍；
- 0.1 M NaOH清洗后应立即用水冲洗并平衡，避免介质长时间处于极端pH；
- 建议每5–10次纯化后进行一次CIP，具体频率视样品洁净程度而定。

七、介质再生与重新载镍

为完全恢复介质性能，可按以下流程进行彻底再生（剥离 Ni^{2+} →清洗→重新载镍）：

步骤	溶液	体积
1	6 M盐酸胍（或8 M尿素），0.2 M醋酸	2 CV
2	去离子水	5 CV
3	2% SDS溶液	3 CV
4	去离子水	5 CV
5	100%乙醇	5 CV
6	去离子水	5 CV
7	100 mM EDTA (pH 8.0) ——剥离 Ni^{2+}	5 CV
8	去离子水	5 CV
9	100 mM NiSO_4 溶液——重新载镍	5 CV
10	去离子水（洗去游离 Ni^{2+} ）	10 CV

- 载镍后介质应恢复均匀的浅蓝色；若颜色不均或偏浅，可重复步骤9–10；
- 再生后的介质如长期保存，应置换为20%乙醇，于2–8 °C避光保存；
- 介质可耐受多次再生循环，实际使用次数取决于样品性质与CIP/再生操作规范。

八、故障排除



问题	可能原因	解决方法
目标蛋白产量低或检测不到	蛋白表达量过低	优化表达条件（诱导温度、IPTG 浓度、诱导时间）
	His标签因蛋白折叠未暴露	尝试变性条件下纯化；或更换标签位置（N端/C端）
	上样量不足或上样流速过快	增加上样量；降低上样流速至0.5 mL/min
	洗涤条件过严，目标蛋白被洗出	用LE缓冲液（含10 mM咪唑）替代洗杂缓冲液；降低洗涤咪唑浓度
	洗脱不充分	提高洗脱咪唑浓度（至500 mM）；降低洗脱pH至4.5；增加洗脱体积
	蛋白与介质结合过强	用10–100 mM EDTA或EGTA剥离Ni ²⁺ 并洗脱蛋白
	蛋白被降解	全程4 °C操作；加入足量蛋白酶抑制剂（避免EDTA类）
	上样/平衡缓冲液中含EDTA等螯合剂	透析去除螯合剂后再上样
洗脱组分中出现多条杂带	洗涤不充分	增加洗杂缓冲液体积；提高洗涤咪唑浓度（至30–40 mM）
	非特异杂蛋白共洗脱	尝试咪唑梯度或pH梯度洗脱；在洗脱前增加pH 5–6的高严谨洗涤步骤
	样品中含富组氨酸杂蛋白	采用二次纯化（如换用其他类型介质）；优化梯度洗脱条件
	介质未充分再生	按再生流程彻底清洗并重新载镍
柱床变白/颜色变浅	缓冲液中螯合剂（EDTA、EGTA、柠檬酸等）剥离了Ni ²⁺	避免在上样/洗涤缓冲液中使用螯合剂；按再生流程重新载镍
柱压升高/流速变慢	样品中颗粒物堵塞柱床	样品上样前经0.45 μm滤膜过滤；进行CIP清洗
	脂蛋白或沉淀蛋白污染	按CIP流程清洗，必要时用30%异



		丙醇处理
	柱床中有气泡	重新装填柱子；缓冲液充分脱气
洗脱液呈蓝/绿色	Ni ²⁺ 脱落进入洗脱液	检查缓冲液是否含螯合剂；降低洗脱pH不要过低；洗脱后透析去除Ni ²⁺ ；介质重新载镍
蛋白在穿流液中检出	上样流速过快	降低上样流速
	标签未暴露或标签丢失	变性条件纯化；检查构建序列确认标签完整性
	介质载量已饱和	增加介质用量；减少上样量

九、化学兼容性

Ni NTA Agarose Beads 6FF在以下试剂条件下稳定（室温短期接触）：

类别	兼容试剂及浓度
还原剂	1 mM DTT； 5 mM DTE； 20 mM β-巯基乙醇； 5 mM TCEP-HCl； 10 mM还原型谷胱甘肽
变性剂	8 M尿素； 6 M盐酸胍（Gua·HCl）
去污剂	2% Triton X-100； 2% Tween 20； 2% NP-40； 1% CHAPS； 2%胆酸盐
盐类	2 M NaCl； 4 M MgCl ₂ ； 5 mM CaCl ₂ ； 100 mM Na ₂ SO ₄
其他添加剂	50%甘油； 20%乙醇； 1 mM EDTA（短期）； 60 mM柠檬酸钠（短期）； 500 mM咪唑
清洗试剂	0.1 M NaOH（≤1 h）； 0.01 M HCl； 70%乙酸（≤12 h）； 2% SDS（≤1 h）； 30%异丙醇（≤30 min）

注意：

- 高浓度EDTA、EGTA、柠檬酸等强螯合剂会导致Ni²⁺脱落，应避免在平衡/洗杂缓冲液中使用；
- DTT浓度建议不超过1 mM，高浓度还原剂可能影响Ni²⁺结合；
- 如需使用强变性剂或去污剂，使用后应立即按CIP/再生流程处理介质。

十、注意事项

1. 本产品仅供科研使用，不得用于人体、临床诊断或治疗用途；
2. 操作时请穿戴适当的实验服、手套和护目镜；



3. NiSO_4 溶液具有刺激性，避免直接接触皮肤和眼睛；如不慎接触，立即用大量清水冲洗；
4. 咪唑粉末具有刺激性，称量时建议在通风橱中操作并佩戴口罩；
5. 介质不可冷冻、不可干燥，冻融会导致琼脂糖微球破裂；
6. 避免使用磁力搅拌器剧烈搅拌介质，以免破坏微球结构；
7. 不同蛋白的最佳纯化条件存在差异，首次使用建议进行条件优化（咪唑浓度梯度、pH、流速等）；
8. 变性条件纯化后的蛋白如需复性，应注意缓慢去除变性剂以减少蛋白聚集；
9. 本产品批次间可能存在细微色差，属正常现象，不影响产品性能；
10. 请在有效期内使用，过期产品可能出现载量下降或 Ni^{2+} 泄漏增加。

十一、订购信息

产品名称	货号	规格
Ni NTA Agarose Beads 6FF	QS01002	10 mL / 25 mL / 50 mL / 100 mL / 500 mL / 1 L
Ni IDA Agarose Resin 6FF	QS01001	10 mL / 25 mL / 50 mL / 100 mL / 500 mL
Ni TED Agarose Resin 6FF	QS01003	10 mL / 25 mL / 50 mL / 100 mL / 500 mL
HP Ni TED Agarose Resin FF	QS01004	10 mL / 25 mL / 50 mL / 100 mL
Co-NTA Agarose Beads 6FF	QS01005	10 mL / 25 mL / 50 mL / 100 mL
Co-TED Agarose Beads 6FF	QS01006	10 mL / 25 mL / 50 mL / 100 mL

大包装及工业级定制规格请联系千株松技术支持。

十二、联系方式

- 地址：江苏省镇江市宝华镇仙林东路16号双创大厦1207室
- 官网：www.qianzhusong.com
- 技术支持：请通过官网或销售渠道联系我们的技术团队，（17302508337，微信同号）

本手册内容如有更新，恕不另行通知。请以随产品附带的最新版本为准。

© 江苏千株松生物科技有限公司 版权所有