



江苏千株松生物科技有限公司
JIANGSU QIANZHUSONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.

His 标签蛋白纯化介质

HP Ni TED Agarose Beads 6FF

镍螯合亲和层析介质 · 高特异性 · 低金属泄漏 · 真核表达优选



产品名称 HP Ni TED Agarose Beads 6FF

产品货号 QS01004

产品规格 5 / 10 / 50 / 100 / 500 mL

基质类型 6% 高交联度琼脂糖微球

动态载量 ≥ 20 mg His标签蛋白/mL 沉降树脂

平均粒径 $90\ \mu\text{m}$ ($45\text{--}165\ \mu\text{m}$)

储存条件 $2\text{--}8\ ^\circ\text{C}$, 20% 乙醇, 不可冻存

应用场景 真核 His 标签重组蛋白高效纯化

4 配位键

牢固结合 Ni^{2+} , 金属泄漏极低

12 原子间隔臂

减少空间位阻, 提升结合效率

$\geq 20\ \text{mg/mL}$

高动态结合载量

★ 目录

一 产品简介

二 产品特点与优势

三 技术参数指标

四 纯化工艺操作指南

4.1 天然条件缓冲液配制

4.2 可溶性·胞内表达蛋白纯化

4.3 可溶性·分泌表达蛋白纯化

4.4 包涵体蛋白纯化（变性条件）

4.5 批量纯化法（Batch Purification）

4.6 SDS-PAGE 纯化效果检测

五 在位清洗（CIP）

六 填料再生与重新挂镍

七 试剂兼容性表

八 常见问题与解决方案

九 订购信息

十 相关产品推荐

一 产品简介

HP Ni TED Agarose Beads 6FF（货号：**QS01004**）是江苏千株松生物科技有限公司推出的一款高性能固定化金属螯合亲和层析（IMAC）介质。该产品以 **6% 高度交联的琼脂糖微球** 为基质，通过 **12 原子长间隔臂** 与 TED 螯合配基共价偶联，配基以四个配位键牢固结合 Ni^{2+} ，用于多聚组氨酸标签（His-tag）重组蛋白的高亲和力纯化。

TED 配基对 Ni^{2+} 具有极强的螯合约束力，赋予本品 **极低的 Ni^{2+} 泄漏率** 和优异的化学稳定性，可耐受蛋白质纯化中常用的多种化学添加剂（包括一定浓度的还原剂 DTT、螯合剂 EDTA、变性剂及去垢剂）。这一特性使 HP Ni TED Agarose Beads 6FF 尤其适用于**真核表达系统**（哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母等）来源的 His 标签蛋白纯化——此类样品体系通常含有还原剂、金属蛋白酶及更复杂的宿主蛋白背景，对填料的金属稳定性和特异性提出了更高要求。

核心价值： TED 四配位结构 + 12 原子长间隔臂 = 低金属泄漏 · 高特异性 · 高载量 · 宽试剂兼容性，一步纯化即可从复杂真核裂解液中获得高纯度目标蛋白。

二 产品特点与优势

四配位键牢固螯合 Ni^{2+}

TED 配基通过四个配位键与 Ni^{2+} 结合，形成稳定的八面体螯合结构，仅留两个配位位点与 His 标签结合，金属离子泄漏极低，纯化产物中 Ni^{2+} 残留少。

12 原子长间隔臂

配基与基质间引入 12 原子长间隔臂，有效消除琼脂糖微球表面的空间位阻，使大分子蛋白更易接近配基，显著提升结合效率与有效载量。

优异的还原剂/螯合剂耐受性

可耐受 5 mM DTT、10 mM EDTA（24 h）等添加剂，无需对真核表达样品进行繁琐的透析脱盐预处理，即可直接上样，简化操作流程。

高动态结合载量

动态结合载量（DBC） ≥ 20 mg His 标签蛋白/mL 沉降树脂，可满足从实验室筛选到中试放大的载量需求。

6% 高交联琼脂糖基质

6 FF 级高交联琼脂糖微球，粒径均匀（90 μm ），机械强度高，耐压 0.3 MPa，支持重力流及中低压层析系统（FPLC）操作。

再生简便 · 重复使用

常规使用后无需脱镍，直接以 NaOH 在位清洗即可；完全再生流程可快速剥离并重挂 Ni^{2+} ，介质重复利用率高，降低单次纯化成本。

三 技术参数指标

产品名称	HP Ni TED Agarose Beads 6FF
产品货号	QS01004
球型基质	6% 高交联度琼脂糖（Highly Cross-linked 6% Agarose）

功能配基	TED（三羧甲基乙二胺类螯合剂），通过 12 原子间隔臂偶联
螯合金属离子	Ni ²⁺ （四配位键结合）
外观	浅蓝色球状凝胶悬浮液，无臭无味
平均粒径	90 μm（粒径分布 45–165 μm）
动态结合载量（DBC）	≥20 mg His 标签蛋白 / mL 沉降树脂
最大耐压	0.3 MPa（3 bar）
推荐流速	150–600 cm/h（约 0.5–2 mL/min，依柱径而定）
pH 稳定性	工作 pH 4–10；在位清洗（CIP）pH 2–14
化学稳定性	耐受常用变性剂、还原剂、去垢剂及盐溶液（详见第七节兼容性表）
储存缓冲液	20% 乙醇水溶液
储存温度	2–8 °C，避光保存，严禁冻存
适用范围	真核及原核表达系统 His 标签重组蛋白的亲纯化；天然或变性条件下均可使用

说明：本品以 50% 悬液形式供货，每 1 mL 悬液含 0.5 mL 沉降树脂。使用前请轻轻颠倒混匀，避免剧烈涡旋导致微球破碎。

四 纯化工艺操作指南

His 标签蛋白纯化的基本原理为"低咪唑上样、高咪唑洗脱"（或"高 pH 上样、低 pH 洗脱"）。Ni²⁺ 空余配位点特异性识别并结合 His 标签中的连续组氨酸残基，杂蛋白随流穿液排出，经低浓度咪唑洗涤去除非特异性吸附后，以高浓度咪唑竞争性洗脱目标蛋白。

填料平衡



样品上样



洗杂



洗脱收集



填料再生/保存

4.1 天然条件缓冲液配制（可溶性蛋白纯化）

使用高纯度水和化学品配制缓冲液，建议使用前经 0.45 μm 滤膜过滤除菌。以下为 1 L 体系配方：

缓冲液	体积	配方（1 L）
裂解/平衡缓冲液 (LE Buffer)	1 L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (7.80 g NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0
洗杂缓冲液 (Wash Buffer)	1 L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (7.80 g NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 10 mM 咪唑 (0.68 g 咪唑) 用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0
洗脱缓冲液 (Elution Buffer)	1 L	50 mM NaH ₂ PO ₄ (7.80 g NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O) 300 mM NaCl (17.54 g NaCl) 250 mM 咪唑 (17.0 g 咪唑) 用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0

缓冲液优化建议：

- ① 为提高纯度，洗杂缓冲液中咪唑浓度可在 10–40 mM 范围内优化；不建议在结合/上样缓冲液中添加咪唑，以免降低载量。
- ② 缓冲液中 300 mM NaCl 用于抑制离子交换作用导致的非特异性吸附；对疏水性较强的蛋白，可添加 0.1–0.5% Triton X-100 或 Tween-20。
- ③ 若目标蛋白对咪唑敏感，可改用降低 pH（pH 4.0–5.5）的方式洗脱，洗脱后立即用中性缓冲液（如 1 M Tris-HCl pH 9.0）中和。
- ④ 真核样品中含 DTT/EDTA 时，TED 填料可耐受一定浓度（5 mM DTT / 10 mM EDTA，24 h），但仍建议尽量降低其浓度以获得最佳载量。

4.2 可溶性·胞内表达蛋白纯化（以大肠杆菌为例）

(1) 样品制备

1. 4 °C、5000 rpm 离心 5 min，从 50 mL 培养物中收集菌体。

2. 以 8 mL LE 缓冲液重悬菌体，加入适量 PMSF 或其他蛋白酶抑制剂（须确认不影响 Ni^{2+} 结合）。
3. 冰浴超声破碎：超声 1 s、间隔 3 s，总超声时间约 30–45 min，至菌液基本澄清。
4. （可选）若裂解液过于粘稠，加入 RNase A（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）和 DNase I（5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），冰浴孵育 10–15 min。
5. 4 °C、12,000 rpm 离心 15 min，去除细胞碎片，收集上清，经 0.45 μm 滤膜过滤后备用。

(2) 柱层析纯化

1. **装柱/平衡：**轻轻颠倒瓶身数次充分重悬树脂，取适量浆液加入层析柱，待树脂自然沉降、储存液流尽后，以 4 倍柱体积（CV）LE 缓冲液平衡至 A_{280} 基线稳定。
2. **上样：**以 0.5–1 mL/min 流速将澄清样品加载至柱上，收集流穿液（Flow-through）留待分析。
3. **洗杂：**以 8 CV 洗杂缓冲液洗涤，或洗至 A_{280} 稳定（流速 1 mL/min）。
4. **洗脱：**以 0.5–1 mL/min 流速，用 5–10 CV 洗脱缓冲液洗脱目标蛋白，分管收集。
5. **脱盐/透析：**根据下游应用，将洗脱液对 20 mM Tris-HCl pH 8.0 或 1×PBS pH 7.4 透析，去除咪唑。

4.3 可溶性·分泌表达蛋白纯化（真核培养上清）

对于哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母等真核表达系统分泌至培养基上清中的 His 标签蛋白：

- 若上清中含低浓度 EDTA、组氨酸或低浓度还原剂，可直接（或经 0.45 μm 过滤后）上样。
- 若上清中**含有**上述成分，上样前须用 1×PBS 4 °C 透析过夜，或通过超滤换液。
- 对于大体积上清，可先经硫酸铵沉淀浓缩蛋白，沉淀用 1×PBS 溶解并透析后再上样。

真核样品提示：HP Ni TED Agarose Beads 6FF 的 TED 配基对 Ni²⁺ 结合牢固，可耐受样品中一定浓度的 DTT（≤5 mM）和 EDTA（≤10 mM），是真核分泌蛋白直接捕获的优选介质。若样品中还原剂/螯合剂浓度较高，建议适当稀释或透析后上样。

4.4 包涵体蛋白纯化（变性条件）

对于以包涵体形式表达的不溶性蛋白，需在含 8 M 尿素的变性条件下进行纯化。

变性条件缓冲液配方（1 L）：

缓冲液	配方（1 L）
裂解/平衡缓冲液 (LE Buffer)	100 mM NaH ₂ PO ₄ (15.60 g NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O) 10 mM Tris · Cl (1.21 g Tris, 先加 980 mL ddH ₂ O, 以 HCl 调 pH 8.0) 8 M 尿素 (480.50 g urea) 定容至 1000 mL, 再以 NaOH 微调 pH 至 8.0
洗杂缓冲液	100 mM NaH ₂ PO ₄ (15.60 g NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O) 10 mM Tris · Cl (1.21 g Tris) 8 M 尿素 (480.50 g urea) 10 mM 咪唑 (0.68 g 咪唑) 以 NaOH 调 pH 至 8.0, 定容至 1000 mL
洗脱缓冲液	100 mM NaH ₂ PO ₄ (15.60 g NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O) 10 mM Tris · Cl (1.21 g Tris) 8 M 尿素 (480.50 g urea) 250 mM 咪唑 (17.0 g 咪唑) 以 NaOH 调 pH 至 8.0, 定容至 1000 mL

包涵体溶解与纯化：

1. 4 °C 以 1×PBS（约 7.5 mL/g 湿菌）重悬菌体，按 4.2 节方法超声破碎。
2. 4 °C、12,000 rpm 离心 10 min，收集包涵体沉淀；必要时以 1×PBS 多次洗涤。
3. 将包涵体溶解于 LE Buffer（约 7.5 mL/g 沉淀），室温孵育 30–60 min；可辅以均质或超声助溶。
4. 12,000 rpm 离心 30 min，去除不溶物，取上清上样至经 LE Buffer 预平衡的 Ni 柱。

5. 以 LE Buffer 洗柱至 A_{280} 基线稳定；再以 2 CV 洗杂缓冲液洗涤。
6. 以 0.5–1 mL/min 流速，用 5–10 CV 洗脱缓冲液洗脱目标蛋白。
7. 收集洗脱液，对 20 mM Tris-HCl pH 8.0 或 1×PBS pH 7.4 透析。

注意：变性条件下洗脱的蛋白处于去折叠状态，如需获得有生物学活性的可溶蛋白，须通过梯度透析等方法进行复性（Refolding）。复性条件需根据目标蛋白特性优化。

4.5 批量化法（Batch Purification）

对于大体积样品或稀浓度蛋白，可采用离心管批量孵育法提高结合效率：

1. 取适量 50% 树脂悬液至离心管， $500\times g$ 离心 3–5 min，弃上清。
2. 加入 5 倍柱体积结合缓冲液，轻柔混匀， $500\times g$ 离心 3–5 min，弃上清；重复 2–3 次以平衡树脂。
3. 加入处理好的样品，室温旋转孵育 30–60 min（4 °C 可适当延长），使蛋白与树脂充分结合。
4. $500\times g$ 离心 3–5 min，收集流穿液。
5. 加入 5–10 倍柱体积洗杂缓冲液，混匀后离心弃上清，重复 3–5 次。
6. 加入 3–5 倍柱体积洗脱缓冲液，室温旋转孵育 10–15 min，离心收集上清；重复洗脱 2–3 次。

操作警示：离心树脂时转速勿超过 $700\times g$ ，高速离心会导致微球变形破碎；操作时使用宽口吸头（剪去尖端的 1 mL 枪头），避免吸头损伤微球。

4.6 SDS-PAGE 纯化效果检测

纯化完成后，分别取原始样品、流穿液、洗杂液和各洗脱组分适量，与 SDS-PAGE 上样缓冲液混合制样，进行凝胶电泳，通过考马斯亮蓝染色或 Western Blot 分析各组分中目标蛋白的纯度与收率，评估纯化效果并指导后续条件优化。

五 在位清洗（CIP）

当层析柱反压升高、流速明显下降或填料出现可见污染时，需进行在位清洗（Cleaning-in-Place, CIP），以去除沉淀蛋白、疏水性蛋白、脂蛋白及脂类等残留污染物。建议每使用 5–10 次进行一次 CIP，具体频率依样品洁净度调整。

污染物类型	清洗方案
强疏水结合蛋白、脂蛋白、脂类	方案 A：以 10 CV 的 30% 异丙醇洗涤，接触 15–20 min，随后以 10 CV 去离子水冲洗。 方案 B：以 2 CV 含 0.1–0.5% 非离子型去垢剂的 0.1 M 醋酸溶液洗涤，接触 1–2 h；去垢剂处理后以 5 CV 70% 乙醇洗涤以彻底去除去垢剂，最后以 10 CV 去离子水冲洗。
离子作用结合的蛋白	以 1.5 M NaCl 溶液洗涤 10–15 min，随后以 10 CV 去离子水冲洗。
沉淀蛋白、强结合污染物	以 1–2 CV 的 0.5–1 M NaOH 溶液反向清洗，接触 30 min–2 h（去除内毒素需延长接触时间），随后以 10 CV 去离子水或平衡缓冲液冲洗至中性。

提示：HP Ni TED Agarose Beads 6FF 常规使用后**无需脱镍再生**，直接以 0.1–0.5 M NaOH 清洗即可有效去除污染物并灭活微生物，大幅缩短清洗周期。仅当填料颜色明显变浅（Ni²⁺ 流失）或载量显著下降时，才需执行第六节的完全再生流程。

六 填料再生与重新挂镍

当填料经多次使用后出现颜色变浅、载量明显降低，或曾使用低 pH 洗脱（pH < 4.0）导致 Ni²⁺ 脱落时，需按以下流程进行完全再生（剥离残余 Ni²⁺ 后重新挂镍）：

步骤	清洗溶液	用量
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 —— 重新挂镍	5 CV
10	去离子水 (洗去未结合的游离 Ni ²⁺)	10 CV
11	20% 乙醇 —— 长期保存	5 CV, 2-8 °C 保存



七 试剂兼容性表

HP Ni TED Agarose Beads 6FF 具有优异的化学稳定性，可耐受蛋白纯化中常用的多种添加剂。下表列出了各类试剂的推荐耐受条件：

试剂类别	兼容试剂及浓度	耐受时间/说明
变性剂	6 M 盐酸胍 (Gua · HCl)	24 h
	8 M 尿素 (Urea)	24 h
还原剂	5 mM DTT	24 h
	5 mM TCEP / 20 mM β-巯基乙醇	24 h
	10 mM 还原型谷胱甘肽	24 h
去垢剂	2% Triton X-100	工作浓度
	2% Tween-20 / 1% CHAPS	工作浓度
盐/其他	2 M NaCl / 4 M MgCl ₂ / 5 mM CaCl ₂	工作浓度
	50% 甘油 / 20% 乙醇	工作浓度
	100 mM Na ₂ SO ₄ / 60 mM 柠檬酸盐	工作浓度
碱/酸	1 M NaOH	24 h (CIP 推荐 0.1–0.5 M)
	0.01 M HCl	1 周
螯合剂	10 mM EDTA	24 h
	100 mM EDTA	2 h (超出建议浓度后需重新挂镍)
其他	30% 异丙醇	20 min

重要提示：

- ① 上表为填料可耐受的上限条件，实际纯化时建议尽量降低 EDTA/DTT 浓度，以获得最佳结合载量。
- ② 避免在结合/洗杂缓冲液中使用高浓度咪唑 (>40 mM)，否则会竞争性抑制目标蛋白结合。
- ③ 避免使用强碱 (NaOH) 或强酸直接调节样品 pH，建议以缓冲液置换方式调整体系。
- ④ 若缓冲液中使用 Tris、HEPES 等含仲胺/叔胺的缓冲体系，可能对 Ni²⁺ 有微弱还原作用，建议优先使用磷酸盐缓冲液。

八 常见问题与解决方案

问题现象	可能原因	解决方案
洗脱液中目标蛋白产量很低或检测不到	蛋白折叠导致 His 标签未暴露	改用变性条件（8 M 尿素）纯化；或在标签位置/连接肽上优化
	表达水平过低	优化诱导条件（温度、IPTG 浓度、诱导时间）；更换表达菌株或载体
	上样量不足	增加样品上样量或按比例增加填料体积
	洗杂条件过严，目标蛋白被洗下	降低洗杂缓冲液咪唑浓度（如改用 LE Buffer 洗涤）；提高洗杂 pH
	蛋白与树脂结合过强，未被洗脱	提高洗脱液咪唑浓度（至 500 mM）；降低洗脱 pH 至 4.0–5.5；或用 10–100 mM EDTA/EGTA 洗脱（洗脱后需重新挂镍）
	蛋白被降解	全程 4 °C 操作；裂解时加入足量蛋白酶抑制剂（PMSF、抑蛋白酶肽等）
洗脱蛋白中出现多条杂带（纯度低）	洗杂不充分	增加洗杂缓冲液体积（至 15–20 CV）；提高洗杂液咪唑浓度（20–40 mM）
	样品中存在其他富组氨酸宿主蛋白	洗脱前增加 pH 4–6 的高严谨性洗涤步骤；采用咪唑/pH 梯度洗脱分步收集；结合离子交换或凝胶过滤进行第二步纯化
	非特异性疏水/离子吸附	缓冲液中添加 0.1–0.5% Triton X-100/ Tween-20 或 300–500 mM NaCl
柱床变白/颜色明显变浅	缓冲液中螯合剂（EDTA/EGTA）或强还原剂将 Ni ²⁺ 剥离	按第六节流程重新挂镍再生；后续降低样品中 EDTA/DTT 浓度或透析后上样
层析柱反压过高/流速慢	样品中细胞碎片或聚集体堵塞柱床	上样前充分离心并经 0.45 μm 滤膜过滤；降低流速
	填料污染、蛋白沉淀	按第五节进行 CIP 在位清洗；必要时完全再生
流穿液中出现大量目标蛋白	上样过载或流速过快	

		减少上样量或增加填料体积；降低上样流速至 150 cm/h 以下；检查样品 pH 是否在 7-8 范围内
洗脱时蛋白发生沉淀	蛋白在高咪唑/洗脱条件下不稳定	洗脱液中添加 0.1-0.2% Triton X-100 或 5-10% 甘油；降低蛋白浓度；洗脱后立即透析换液

九 订购信息

产品名称	货号	规格	储存条件
HP Ni TED Agarose Beads 6FF 镍螯合亲和层析介质 (His 标签蛋白纯化)	QS01004-5	5 mL	2-8 °C 20% 乙醇 避光保存
	QS01004-10	10 mL	
	QS01004-50	50 mL	
	QS01004-100	100 mL	
	QS01004-500	500 mL	

供货形式：50% 悬液（1 mL 悬液 = 0.5 mL 沉降树脂），含 20% 乙醇保存液。常温运输，收到后 2-8 °C 保存。

开票与售后：免费开票，满百包邮。如在使用过程中遇到任何技术问题，请联系千株松生物技术支持团队获取协助。

+ 相关产品推荐

千株松生物提供完整的 His 标签蛋白纯化介质产品线，可根据样品类型、表达系统和纯度需求灵活选择：

产品名称	货号	配基/金属	特点与适用场景
Ni IDA Agarose Beads 6FF	QS01001	IDA / Ni^{2+}	三配位，载量高、成本经济，适合原核表达常规纯化
Ni NTA Agarose Beads 6FF	QS01002	NTA / Ni^{2+}	四配位，金属泄漏低，通用性强，原核/真核均可
Ni TED Agarose Beads 6FF	QS01003	TED / Ni^{2+}	四配位，高特异性，耐受 EDTA/DTT，适合真核样品
HP Ni TED Agarose Beads 6FF	QS01004	TED / Ni^{2+}	12 原子长间隔臂，高载量高耐压，真核 His 标签蛋白纯化优选
HP Ni NTA Agarose Beads 6FF	QS01032	NTA / Ni^{2+}	12 原子间隔臂，载量 >35 mg/mL，耐压 0.5 MPa，工业级放大
Co NTA Agarose Beads 6FF	QS01005	NTA / Co^{2+}	钴离子特异性更高，适合纯度要求高、本底低的纯化

Co TED Agarose Beads 6FF	QS01006	TED / Co ²⁺	钴离子 + TED 配基，超高特异性，低丰度蛋白纯化
-----------------------------	---------	---------------------------	----------------------------



▲ 千株松生物 His 标签蛋白纯化介质及预装柱系列产品



江苏千株松生物科技有限公司

专注生物制药分离纯化介质研发与生产

His 标签蛋白纯化 • 抗体纯化 • 内毒素去除 • 定制化填料

官方网站

www.qianzhusong.com

产品咨询

请通过官网或微信公众号联系我们

技术支持

专业技术团队为您提供纯化工艺开发支持

公司地址

江苏省



扫码关注千株松生物
获取更多产品资讯与技术资料

本手册内容仅供科研使用，不用于临床诊断或治疗。

产品信息如有更新，恕不另行通知，请以官网最新版本为准。

© 2026 江苏千株松生物科技有限公司 版权所有