



HP Ni NTA Agarose Beads 6FF

货号: QS01032

一、产品概述

HP Ni NTA Agarose Beads 6FF 是一款高流速、高耐压的固定化金属离子亲和层析 (IMAC) 介质, 专为重组氨基酸标签 (His-tag) 蛋白的高效纯化而设计。产品以高度交联的 6% 琼脂糖 (6FF) 为基质, 偶联有 **12 个原子的亲水性长间隔臂**, 末端固定次氨基三乙酸 (NTA) 螯合的镍离子 (Ni^{2+})。该设计极大降低了空间位阻, 使介质对 His 标签蛋白的动态结合载量突破性达到 **> 35 mg/mL**, 且可承受 **0.5 MPa** 的高工作压力, 支持更高流速和更快纯化进程。

本产品适用于实验室级别的小量制备, 也完全适用于中试及生产规模的柱层析系统, 能够配合 ÄKTA 等各类层析设备使用。

二、核心特点

- **超高结合载量**: 10% 动态穿透载量 (DBC) ≥ 35 mg (His-tag 蛋白) /mL 介质, 减少介质用量, 提高单次纯化产量。
- **12 原子间隔臂**: 专利亲水性长间隔臂设计, 将 NTA 配基充分延伸至流动相, 有效消除琼脂糖骨架的空间屏蔽, 大幅提高对融合标签以及大分子量蛋白的可及性。
- **优异的机械强度**: 基于 6% 高度交联琼脂糖 (6 Fast Flow) 基架, 最高工作压力可达 **0.5 MPa (5 bar)**, 支持高达 500 cm/h 以上的线性流速, 显著缩短纯化周期。
- **低非特异性吸附**: 亲水性的基架与间隔臂, 极大降低宿主细胞蛋白、核酸等杂质的非特异性结合, 提高纯化纯度。
- **稳定的镍离子螯合**: NTA 四齿配位结构提供稳定的 Ni^{2+} 结合力, 在合适的操作条件下金属离子脱落率极低, 保证介质可多次重复使用。
- **宽泛的化学耐受性**: 兼容常见高浓度盐、变性剂 (6 M Gua-HCl、8 M Urea)、去垢剂及还原剂 (低浓度), 并可经受 0.5-1.0 M NaOH 在位清洗。
- **可重复性与可放大性**: 粒径分布和批次间一致性好, 无缝放大至生产规模, 满足从研发到 GMP 生产的全流程需求。



三、技术参数

参数	规格
基质	高度交联6%琼脂糖 (6 Fast Flow)
颗粒分布	50–100 μm
配基	Ni^{2+} 螯合次氨基三乙酸 (NTA)
间隔臂原子数	12个原子 (亲水性长间隔臂)
动态结合载量 (DBC 10%)	> 35 mg/mL
最大工作压力	0.5 MPa (5 bar)
工作pH范围	6.0–8.5 (连续使用, 以保持 Ni^{2+} 稳定)
工作温度	+4°C 至 30°C
储存缓冲液	20% 乙醇水溶液
推荐柱床高度	5–20 cm (实验室) , 10–30 cm (工业生产)

四、配基与间隔臂结构

NTA通过一个由12个碳、氧、氮原子组成的亲水性长链 (即12原子间隔臂) 共价偶联于琼脂糖骨架上。长间隔臂极大提升了配基的摆动自由度和空间可达性, 尤其有利于纯化以下目标:

- **大分子量蛋白:** 空间位阻降低, 使柔性较差的巨型 His 标签融合蛋白同样具备高结合量。
- **内部或 C 端 His 标签蛋白:** 标签若部分掩埋, 长臂 NTA 更容易探入蛋白表面裂隙实现结合。
- **多亚基复合物:** 间隔臂为复合物提供了足够空间, 减少因立体排斥导致的回收率下降。

Ni^{2+} 经由NTA的四齿螯合 (三个羧基氧和一个叔胺氮), 保留一个开放的配位位点可逆地结合组氨酸咪唑基团, 从而实现温和洗脱与高纯度纯化。



五、应用领域

- 重组 His-tag 蛋白、多肽的实验室纯化及高通量筛选
- 结构生物学样品的快速制备（兼容变性纯化）
- 疫苗与抗体片段的捕获步骤（Capture step）
- 酶、激素、细胞因子的大规模生产纯化
- 需要原位复性（On-column refolding）的包涵体蛋白

六、操作指南

6.1 缓冲液配制

结合/平衡缓冲液（pH 7.4-8.0）

50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 300–500 mM NaCl, 10–40 mM 咪唑
可根据蛋白稳定性加入 5% 甘油、1–5 mM β -巯基乙醇或 0.1% Tween 20。

洗脱缓冲液

结合缓冲液中加入 250–500 mM 咪唑，pH 调至 7.4–8.0。

变性结合/洗脱缓冲液

100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris·HCl, 8 M 尿素或 6 M 盐酸胍，pH 8.0。相应洗脱缓冲液加入 250–500 mM 咪唑。

所有缓冲液建议经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤并脱气后使用。

6.2 样品制备

- 细胞裂解液经 12,000 g 离心或微滤，完全去除颗粒物。
- 补加 NaCl 至 300–500 mM，咪唑至 10–40 mM（抑制杂蛋白结合）。
- 避免带入 EDTA、EGTA 等强螯合剂（即使微量也会剥离 Ni^{2+} ）。
- 对于含高浓度还原剂的样品，需降至 5 mM 以内，或选用变性纯化流程。
- 调节 pH 至 7.4–8.0，导电性与结合缓冲液保持一致。

6.3 装柱与平衡

1. 充分摇匀 HP Ni NTA Beads 浆液，按所需柱体积量取一定沉降介质。
2. 使用与层析柱配套的装柱器，将介质在结合缓冲液中匀浆后一次性倒入柱管。
3. 在 **0.3–0.5 MPa** 下恒压填装，最终柱床稳定后将适配器压至凝胶表面上 2–3 mm。
4. 用 5–10 个柱体积（CV）结合缓冲液平衡至流出液 pH 及电导与平衡液一致（流速建议 150 cm/h）。



6.4 上样

- 控制样品上样流速在 100–200 cm/h，保证足够停留时间（约 2–4 分钟保留时间）。
- 上样量根据 DBC 值估算，建议初次上样不超过预期 DBC 的 80%。
- 收集流穿液以备 SDS-PAGE 分析，避免超载。

6.5 洗涤与洗脱

1. **洗涤**：上样后用 5–10 CV 结合缓冲液清洗至 UV 基线平稳，可提高咪唑至 30–50 mM 去除弱结合杂蛋白。
2. **洗脱**：采用一步梯度洗脱（100%洗脱缓冲液）或线性梯度（20–500 mM 咪唑）。收集洗脱峰。
3. 洗脱后立即用缓冲液置换或透析除去咪唑（如使用脱盐柱），防止长期存放蛋白失活。

6.6 在位清洗 (CIP)

定期清除沉淀蛋白、脂类及强结合杂质，建议每3–5次使用后执行：

1. 2–3 CV 2 M NaCl（去除离子交换结合的杂质）
2. 2 CV 1% Triton X-100 或 0.5% 非离子去污剂（去脂）
3. 3–5 CV 0.5 M NaOH（去蛋白沉淀、内毒素、微生物），接触时间 30–60 分钟
4. 立即用 10 CV 纯水冲洗至中性

6.7 再生与重新挂镍

当介质颜色变浅或结合载量显著下降时，需剥离并重新螯合Ni²⁺：

1. 5 CV 100 mM EDTA, pH 8.0 脱去 Ni²⁺（柱会变为白色）
2. 10 CV 纯水冲洗
3. 2–3 CV 0.1 M NiSO₄ 溶液流过或静态孵育，使介质恢复蓝绿色
4. 5 CV 纯水洗去游离镍离子
5. 结合缓冲液再次平衡即可使用

6.8 保存

长期储存：用 5 CV 20%乙醇水溶液置换，置于 4–8°C，严禁冻结。

七、化学兼容性与稳定性

试剂类型	浓度 / 条件	兼容性
变性剂	8 M 尿素	兼容（工作及清洗）
	6 M 盐酸胍	兼容



试剂类型	浓度 / 条件	兼容性
去污剂	1% Triton X-100, NP-40, Tween 20	兼容
还原剂	≤5 mM DTT, β-巯基乙醇	短期暴露兼容 (避免长期>10 mM)
	TCEP ≤2 mM	需评估, 低浓度短期可兼容
螯合剂	EDTA, EGTA	严禁使用 (导致Ni ²⁺ 剥离)
NaOH	0.5–1.0 M	兼容 (在位清洗)
盐	2 M NaCl, 0.5 M Na ₂ SO ₄	完全兼容
有机溶剂	30% 乙醇, 20% 异丙醇	兼容, 可用于清洗与保存
酸	pH ≥ 3.0	可短暂接触以去除特殊污染物

八、常见问题与解决

问题	可能原因	解决方案
载量低于预期	样品中存在螯合剂或高浓度还原剂; 标签掩埋; 柱床装填不均匀	透析除EDTA, 降低DTT浓度; 提升咪唑洗涤浓度; 重新装柱, 检查上样流速
洗脱峰拖尾严重	咪唑浓度不足或洗脱速度过快; 柱效降低	增加咪唑至500 mM, 降低洗脱流速; 执行CIP或再生
镍离子脱落 (蓝绿色变浅)	操作pH过低、存在还原剂或螯合剂; 反复长时间使用	检查样品缓冲液; 执行再生重新挂镍
纯化蛋白含杂带	非特异性结合或宿主蛋白金属结合	提高结合缓冲液咪唑至20-40 mM; 添加适量Tween 20和甘油; 增加高盐洗涤步



问题	可能原因	解决方案
背压过高	样品颗粒堵塞，蛋白沉淀，微生物污染	样品高速离心/过滤；执行NaOH在位清洗；介质保存时严格添加抑菌剂

九、订购信息

产品名称	规格
HP Ni NTA Agarose Beads 6FF	25 mL
	100 mL
	500 mL
	1 L
	5 L (定制)

可根据需要提供预装柱规格（1 mL、5 mL预装柱）以及散装介质。

相关产品

- 预装柱 HP Ni NTA 6FF 1 mL/5 mL
- 重力空柱及配套滤片
- Ni²⁺ 溶液再生试剂盒
- 脱盐/缓冲液置换柱系列

十、安全与储存

- 介质悬浮于 **20% 乙醇** 中，请于 **4–8°C** 密封保存，远离火源和氧化剂。
- 避免反复冻融，冻融破坏琼脂糖骨架。
- 操作时佩戴手套与护目镜。Ni²⁺ 溶液对皮肤和呼吸道有刺激，再生及重新挂镍时应在通风橱内进行。
- 废弃介质及含镍溶液需按所在地区法规进行无害化处理。