

Ni NTA Nanorose 6FF

产品名称	货号	规格
Ni NTA Nanorose 6FF 亲和层析介质	NG-BR0016	5mL
		10mL
		25 mL
		100 mL
		500 mL
		1 L
Ni NTA Nanorose 6FF 预装重力柱	NG-GC0016	1mL
Ni NTA Nanorose 6FF 预装层析柱	NG-PC0016	1mL
		4.7mL
		5mL

本说明书适用于以上三种产品：

Ni NTA Nanorose 6FF 亲和层析介质 — 散装填料，适用于自行装柱/放大验证。

Ni NTA Nanorose 6FF 预装重力柱 — 免装柱，适合小试/捕获/教学与方法开发。

Ni NTA Nanorose 6FF 预装层析柱 — 免装柱，直接上系统用于常规纯化。

01 产品简介

Ni NTA Nanorose 6FF 是一款以 6% 琼脂糖凝胶为基质，化学偶联四配位氮川三乙酸（NTA）；在螯合 Ni^{2+} 后形成稳定的八面体配位结构，镍离子位于中心，可有效抵御小分子对金属中心的攻击。该介质利用 Ni^{2+} 与蛋白质中特定氨基酸侧链（以组氨酸为主）之间的相互作用，实现含有与不含有这些氨基酸、以及组氨酸数量不同的蛋白质的分离与纯化。Ni NTA Nanorose 6FF 尤其适用于组氨酸标签蛋白的纯化，具备高载量、易再生、成本低等优势。

产品优势：

结合谱广：对 6×His/多 His 标签及部分天然富组氨酸蛋白具有选择性。

捕获效率高：专一配位识别，非特异吸附低，洗脱峰集中。

兼容性好：可在 8 M 尿素/6 M 盐酸胍 等变性条件下运行，适配多种裂解/缓冲体系。

工艺友好：装柱稳定、通量可调，可实现再生、脱金属与重金属充装，便于工艺放大。

使用成本优：介质可多次循环使用，综合成本低。

02. 技术参数

表 1 产品参数表

名称	性能
层析介质类型	亲和层析介质
配基	NTA- Ni^{2+}
基架	高度交联的 6%琼脂糖

名称	性能
平均粒径	~60 μm
配基密度	~30 $\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{mL}$ 层析介质
动态载量	$\geq 40 \text{ mg}$ 组氨酸标签蛋白/ mL 层析介质*
最大流速	250 cm/h (D:300 mm, H:15 cm)
耐压	0.3 MPa
使用温度	4–30 $^{\circ}\text{C}$

* 动态载量的测量条件：装柱高度：10cm，测试流速 150 cm/h ，测试缓冲液：0.02M PB, 0.5M NaCl, 5mM 咪唑, pH7.4，测试样品：1mg/mL 的带 6 个 His 标签的蛋白质，当蛋白质的穿透量达到 10%时，单位介质体积(mL) 的蛋白质上样量(mg)

03 化学稳定性

表 2 化学耐受性表

耐受类别	耐受范围及表现
pH 稳定性	2.0~12.0 (40 $^{\circ}\text{C}$ 放置 7 天，其理化性质和功能没有明显变化，脱镍后填料可耐受 2~14)
试剂兼容性	常见水溶液、6M 盐酸胍、8 M 尿素、0.01M HCl、0.01M NaOH 等，避免使用螯合剂（如 EDTA 等）和还原剂（DTT 等）

04 纯化流程

4.1 前期准备

装柱所需用品（装填层析柱所需用品）

1. 层析介质：Ni NTA Nanorose 6FF
2. 层析空柱：实验室规模层析空柱及装柱器
3. 所需溶液：装柱溶液：纯化水；排气溶液同上
4. 装柱工具：砂芯漏斗、搅拌棒、量筒等

纯化用品准备

1. 平衡/结合/洗杂缓冲液：：20mM 磷酸钠，0.5M NaCl, 20-40mM 咪唑，pH 7.4。
2. 洗脱缓冲液：20mM 磷酸钠, 0.5 M NaCl, 500 mM 咪唑，pH 7.4。
3. 上柱前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用平衡缓冲液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用平衡缓冲液透析。样品在上样前建议离心或用 0.22 或 0.45 μm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

4.2 重力柱装填与纯化

重力柱装填（购买散装填料可参考本流程装填重力柱）

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 Ni NTA Nanorose 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。

重力柱纯化（重力柱纯化的参考流程）

1. 平衡：使用 5 倍柱体积的平衡缓冲液对装填好的 Ni NTA Nanorose 6FF 重力柱进行平衡。此过程应重复 2 至 3 次，确保填料完全处于与目的蛋白一致的缓冲液环境中。
2. 上样：将样品加入已平衡的重力柱，控制流速确保样品在柱内的保留时间不少于 2 分钟，以保证与填料的充分接触。收集流穿液，为提升结合效率，可进行反复上样。
3. 洗杂：使用 10 至 15 倍柱体积的洗杂缓冲液进行清洗，以去除非特异性吸附的杂蛋白，此过程中需收集洗杂液。
4. 洗脱：洗脱是通过增加咪唑浓度实现的，可以通过线性梯度或者步级梯度，逐渐增加洗脱液中的咪唑浓度，将不同结合强度的分子洗脱下来。
5. 再平衡：用平衡缓冲液再次平衡层析柱。

4.3 层析柱的装填与纯化

层析柱的装填（购买散装填料可参考本流程装填层析柱）

装柱前的准备：

1. 计算所需介质体积：

$$V_m = \text{柱横截面积} \times \text{计划柱床高度} \times \text{介质压缩比}$$
 建议压缩比：1.20
2. 介质置换：用约 3 倍体积的装柱溶液清洗、抽滤，将介质完全置换到装柱溶液中
3. 制备 50-70% 胶悬液；为获得准确体积，可沉降过夜或低速离心（3000 rpm，5 min）后量取。
4. 检查空柱：干净、无漏液。

装柱

1. 用纯化水为柱底滤膜排气；随后封闭柱底并加入少量装柱溶液覆盖柱底。
2. 调整层析柱至垂直；连接柱头，以 ~5 mL/min 低流速为柱头滤膜排气。
3. 轻轻搅拌均匀胶悬液，一次性缓慢倒入空柱中（胶悬超出柱容积时，可用装柱器或接延长管）。
4. 放入排气后的柱头并贴合液面，排尽气泡后拧紧密封圈。
5. 恒流装柱：启动系统泵，调整流速至 200 cm/h，使用液流压紧柱床。期间要控制压力不能超过 0.3 MPa。如超压，需要降低流速。
 恒压装柱：启动系统泵，调整流速将压力控制在 0.15MPa 以下，压紧柱床。
6. 柱床稳定后标记胶面高度，停泵将柱头下压至标记以下 2-3 mm，重新给予 600 cm/h 的流速；若胶面不再下降，即装柱完成。若下降，重复该步骤。
7. 建议工作流速 ≤ 装柱流速的 75%。

表 3 不同规格层析柱流速换算表

线性流速(cm/h)	10 mm (ml/min)	16 mm (ml/min)	26 mm (ml/min)	50 mm (ml/min)
60	0.8	2	5.3	19.6
100	1.3	3.3	8.8	32.7
150	2	5	13.3	49.1
200	2.6	6.7	17.7	65.4
300	3.9	10	26.5	98.1
600	7.9	20.1	53.1	196.3

柱效测定

选择以下两种测试方法中的一种进行柱效测试。使用流动相平衡层析柱至基线平稳，将样品加载到层析柱中，继续使用流动相进行冲洗，待色谱峰出完至回到基线后，结束运行，对色谱峰进行积分，评价装柱果。

表 4 两种柱效测定方法

项目	丙酮法	NaCl 法
样品	1% (v/v) 丙酮水溶液	2 M NaCl 水溶液
样品体积	1% 柱体积	1% 柱体积
流动相	水	0.2 M NaCl 水溶液
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测器	UV 280 nm	电导率

柱效评价的主要指标：塔板数 N/m 与不对称因子 As 。其计算方式：

$$N/m = 5.54 \times (V^R / W_h)^2 \times 1/L$$

$$As = b / a$$

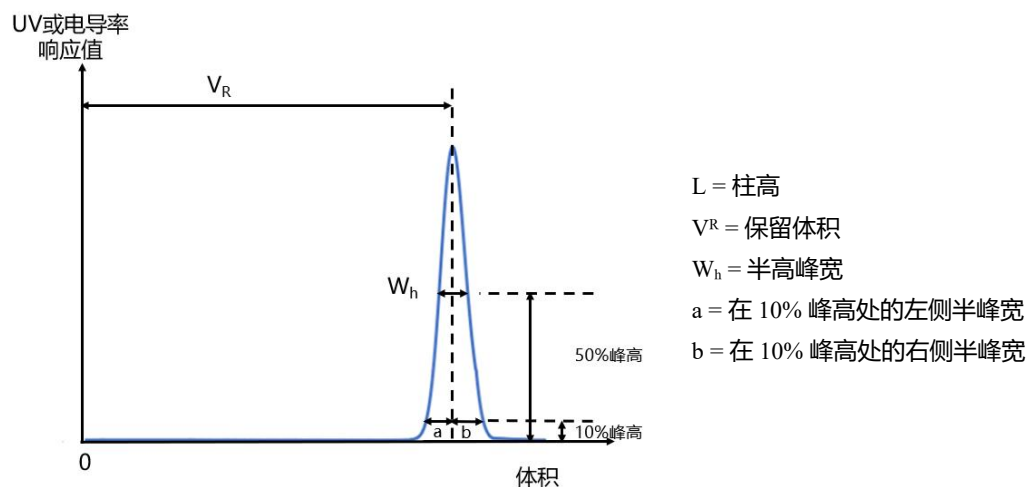


图 5 标准柱效测试色谱图

柱效评估标准

- 1.柱效良好的层析柱，其理论塔板高度 HETP 的数值应小于介质平均颗粒大小的三倍；
- 2.检测峰形必须对称，非对称因子数值 A_s 应在 0.8~1.8 之间，越接近 1 柱效越好；
- 3.如柱效检测不达标，则需重新装柱。

层析法纯化（层析柱纯化的参考流程）

Ni NTA Nanorose 6FF 装填后，可适配各类常规中低压色谱系统。

1. 将泵管道注满去离子水。取下层析柱上塞，将其连接至色谱系统，打开下出口并旋紧。
2. 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗，以置换出填料中的储存缓冲液。
3. 平衡：使用至少 5 倍柱体积的平衡液对色谱柱进行平衡
4. 上样：根据小试实验测得的结合载量，确定样品在 Ni NTA Nanorose 6FF 上的上样体积和上样量
5. 洗杂：使用洗杂液冲洗柱子，直至紫外吸收信号稳定于基线水平，此过程通常需要 10-15 倍柱体积
6. 洗脱：洗脱是通过增加咪唑浓度实现的，可以通过线性梯度或者步级梯度，逐渐增加洗脱液中的咪唑浓度，将不同结合强度的分子洗脱下来
7. 再平衡：用平衡缓冲液再次平衡层析柱。

05 清洗与再生（CIP）

随使用次数增加，脂质、内毒素、蛋白质等污染物会在层析柱上逐渐累积。为维持柱性能并延长其使用寿命，建议定期执行以下在位清洗流程：

1. 去除残留 Ni^{2+}
以 5 倍柱体积（CV）的金属离子剥离缓冲液（20 mM 磷酸钠、50 mM EDTA，pH 7.4）冲洗柱床，彻底螯合并带走残留 Ni^{2+} 。
2. 去除 EDTA
以 5 CV 纯化水冲洗，清除柱内残余 EDTA。
3. 按污染类型进行在位清洗（CIP）
强离子吸附蛋白：用 2 M NaCl 溶液 5 CV 清洗。
变性/沉淀蛋白：先用 1 M NaOH 溶液 5 CV 清洗，再以 5-10 CV 纯化水冲至无碱残留。
疏水物/脂类污染：先以 70% 乙醇或 30% 异丙醇 2 CV 清洗，再用 5-10 CV 纯化水彻底置换。

注：CIP 建议线速度 30-60 cm/h；若压差升高或堵塞明显，可进行反向清洗以恢复通量。

4.重新挂镍并恢复使用

以 0.1 M $NiSO_4$ 溶液 0.5 CV 充装配体金属，随后按工艺缓冲液充分平衡，即可恢复正常使用。

后续的灭菌与储存条件：可采用 20%乙醇作用 6h 以上；若为已装填的层析柱，可使用 20% 乙醇或 2%苯甲醇浸泡，再关闭上下柱头，并于 4-30 °C条件下储存。

06 常见问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
----	------	--------

柱子反压过高	筛板堵塞	清洗筛板或直接更换新筛板。
	填料堵塞	按第 5 部分执行树脂 CIP 清洗，恢复通透性。
	裂解液含微粒	上柱前以 0.22 或 0.45 μm 滤膜过滤，或离心去除悬浮颗粒。
纯化过程中曲线不稳定	样品/缓冲液夹带气泡	排除柱内气泡；必要时对样品与缓冲液脱气。
洗脱组分无目的蛋白	样品中抗体浓度偏低	选用以其抗原为配体的亲和介质进行捕获。
	抗体发生降解	适度提高洗脱阶段的 pH（按工艺窗口），以改善结合/洗脱。
回收率逐步下降	上样量过大	降低上样量，避免超载。
	柱床鼓胀（“大肚”），有效载量下降	按第 5 部分进行树脂 CIP 清洗以恢复柱效。

注意：本产品仅供科研使用（RUO），不得用于人体诊断或治疗。