

Ni-NTA Chromrose® 6FF

Ni-NTA Chromrose® HP

Ni-NTA Chromrose® Big Beads

His标签蛋白纯化层析介质

使用指南

1 产品简介

科诺赛生物研发生产的Ni-NTA Chromrose® 系列填料是应用最广泛的一种金属螯合亲和层析介质。以高流速琼脂糖为基质，以次氮基三乙酸（NTA）为配基，螯合金属镍离子（Ni²⁺）而成。载量适中但综合性价比，广泛应用于His标签蛋白的分离纯化。

产品特点：

- ◎ 结构稳定：NTA拥有4个金属结合位点，与Ni²⁺形成稳定的四配位八面体结构，极大减少了Ni²⁺的脱落。
- ◎ 高纯度与特异性：非特异性吸附少，一步纯化可获得高纯度的目标蛋白。
- ◎ 耐受性强：能耐受一定浓度的还原剂（e.g. 20 mM β-巯基乙醇、1 mM DTT、5 mM TCEP）和变性剂（e.g. 8 M 尿素、6 M 盐酸胍），适用性更广。

2 产品参数

产品名称	Ni-NTA Chromrose® 6FF	Ni-NTA Chromrose® HP
配基	次氮基三乙酸（NTA）	
平均粒径	90 μm	34 μm
每毫升载量	20~40 mg His标签蛋白	20~40 mg His标签蛋白
螯合量	15 μmol/mL	15 μmol/mL
压力流速	150~600 cm/h（根据柱子规格选择合适流速）	
最大耐压	0.3 MPa	
pH稳定性	工作4~8.5（7~8最佳）；短时CIP 2~14	
化学稳定性	脱镍前：20 mM β-巯基乙醇、1 mM DTT、5 mM TCEP 1 h； 脱镍后：0.01 M HCl、0.1 M NaOH 1周；1 M NaOH、70% 乙酸 12 h；2% SDS 1 h； 30% 异丙醇 20 min	
储存	含20% 乙醇的1XPBS 2~8°C	

产品名称	Ni-NTA Chromrose® Big Beads
配基	次氨基三乙酸 (NTA)
平均粒径	200 μ m
每毫升载量	20~40 mg His标签蛋白
螯合量	15 μ mol/mL
压力流速	150~600 cm/h (根据柱子规格选择合适流速)
最大耐压	0.3 MPa
pH稳定性	工作4~8.5 (7~8最佳) ; 短时CIP 2~ 14
化学稳定性	脱镍前: 20 mM β -巯基乙醇、1 mM DTT、5 mM TCEP 1 h; 脱镍后: 0.01 M HCl、0.1 M NaOH 1 周; 1 M NaOH、70% 乙酸 12 h; 2% SDS 1 h; 30% 异丙醇 20 min
储存	含20% 乙醇的1XPBS 2~8°C

3 使用指南

3.1 填料装柱

科诺赛生物研发生产的Ni-NTA Chromrose® 系列亲和层析介质可以在实验室被填装到HiQumn® 中压层析柱中, 以扩大产量。将填料填装到层析柱中, 根据样品中蛋白含量和填料载量选择合适的层析柱和柱高。

3.2 层析方法

3.2.1 缓冲液参考建议

平衡缓冲液: 20 mM PB或20~50 mM Tris-HCl+300~500 mM NaCl+10~20 mM 咪唑 pH 7.0~8.0

洗涤缓冲液: 20 mM PB或20~50 mM Tris-HCl+300~500 mM NaCl+20~50 mM 咪唑 pH 7.0~8.0

洗脱缓冲液: 20 mM PB或20~50 mM Tris-HCl+300~500 mM NaCl+250~500 mM 咪唑 pH 7.0~8.0

CIP缓冲液: 20 mM PB或20~50 mM Tris-HCl+300~500 mM NaCl+500 mM 咪唑 pH 7.0~8.0

变性条件下纯化, 可在所有缓冲液中添加8 M 尿素或6 M 盐酸胍

3.2.2 样品准备

为避免堵塞层析柱, 样品需离心和0.45 μ m过滤处理。调节样品pH至7.0~8.0。

3.2.3 样品纯化

- 1) 水洗：超纯水冲洗5~10 CV，直至流出液pH和电导率稳定。
- 2) 平衡：平衡缓冲液冲洗5~10 CV，直至流出液pH和电导率稳定。
- 3) 上样：保留时间2~5 min，可收集流穿样重复上样，以提高回收率。
- 4) 洗涤：洗涤缓冲液冲洗5~10 CV，直至流出液pH、电导率和紫外吸收稳定。
- 5) 洗脱：洗脱缓冲液冲洗5~10 CV，直至流出液pH、电导率和紫外吸收稳定。
- ◎ 常规优先使用咪唑竞争性洗脱，首次建议采用20~500 mM咪唑线性梯度洗脱（20 CV），定位洗涤和洗脱咪唑浓度。
- ◎ 也可使用低pH洗脱（e.g. 20~50 mM 醋酸盐/磷酸盐缓冲液+300~500 mM NaCl pH 4~6，2~5 CV），但Ni²⁺会部分脱落，洗脱之后填料直接进入再生流程。
- 6) CIP：CIP缓冲液冲洗5~10 CV，直至流出液pH、电导率和紫外吸收稳定。
- 7) 水洗：超纯水冲洗5~10 CV，直至流出液pH和电导率稳定、紫外吸收回归基线。
- 8) 保存：含20% 乙醇的1XPBS冲洗2~3 CV，2~8 °C保存。

4 再生

仅当填料颜色明显变浅发白，或目的蛋白流穿增多、载量明显下降，或非特异性吸附明显增强，或使用低pH洗脱，或更换金属离子时进行：

- 1) 水洗：超纯水冲洗5~10 CV，直至流出液pH和电导率稳定。
- 2) 脱镍：100 mM EDTA pH 8.0冲洗5~10 CV，直至填料变为灰白或乳白，即脱镍完全。
- 3) 水洗：超纯水冲洗10~20 CV，直至EDTA彻底冲洗干净，否则抑制后续挂镍。
- 4) 深度清洗（按污染类型选择一种或多种，但每种清洗液之间必须用超纯水充分冲洗）：
 - ◎ 对于离子类蛋白，1.5~2 M NaCl冲洗2~5 CV。
 - ◎ 对于沉淀、变性蛋白，0.1~0.5 M NaOH冲洗2~5 CV，停留5~15 min；也可用8 M 尿素或6 M 盐酸胍冲洗2~5 CV。
 - ◎ 对于脂类、疏水性蛋白，30% 异丙醇或70% 乙醇或0.1%~0.5% 非离子型去污剂（e.g. Triton X-100、Tween-20、NP-40等）+0.1 M 乙酸冲洗2~5 CV。若使用了去污剂，需再用70% 乙醇冲洗2~5 CV。
- 5) 水洗：超纯水冲洗10~20 CV，直至流出液pH为中性、电导率稳定。
- 6) 挂镍：100 mM NiSO₄缓慢冲洗3~10 CV，直至填料重新变为蓝色。
- 7) 水洗：超纯水冲洗5~10 CV，直至流出液无蓝色。
- 8) 空白运行（可选并推荐）：洗脱缓冲液冲洗5 CV，平衡缓冲液冲洗5~10 CV，超纯水冲洗5~10 CV，去掉螯合不牢的Ni²⁺。
- 9) 保存：含20% 乙醇的1XPBS冲洗2~3 CV，2~8 °C保存。

5 注意事项

- 1) 正常使用时，所有缓冲液及样品禁止含有EDTA、EGTA等强螯合剂，以及柠檬酸、柠檬酸盐。
- 2) 对于易氧化、易聚集沉淀的蛋白，可在裂解液、上样样品、洗涤缓冲液中添加耐受范围内的还原剂，如果可以更推荐洗脱之后单独添加保护填料。若还原剂导致填料颜色变为黄褐色或黑色，需先用 1%~3% HCl短时冲洗（几分钟）再进行再生流程，否则Ni²⁺被还原成Ni¹⁺/Ni⁰将很难剥离。
- 3) 除低pH洗脱缓冲液外，其余所有缓冲液及样品建议调节pH至7.0~8.0，最多不超过pH 6.0~8.5，避免 His标签侧链咪唑质子化，降低结合效率，或增加Ni²⁺脱落风险。

6 订货信息

预装柱

货号	名称	规格
31-0110-01	Xtrap Ni-NTA 6FF	1 mL
31-0110-05		5 mL
31-0110-20		20 mL (16x100mm)
31-0470-01	Xtrap Ni-NTA HP	1 mL
31-0470-05		5 mL
31-0470-20		20 mL (16x100mm)
31-0460-01	Xtrap Ni-NTA Big Beads	1 mL
31-0460-05		5 mL
31-0460-20		20 mL (16x100mm)

层析介质

货号	名称	规格
11-0110-02	Ni-NTA Chromrose® 6FF	30 mL
11-0110-03		100 mL
11-0110-04		500 mL
11-0110-05		1 L
11-0110-07		10 L
11-0470-02	Ni-NTA Chromrose® HP	30 mL
11-0470-03		100 mL
11-0470-04		500 mL
11-0470-05		1 L
11-0470-07		10 L
11-0460-02	Ni-NTA Chromrose® Big Beads	30 mL
11-0460-03		100 mL
11-0460-04		500 mL
11-0460-05		1 L
11-0460-07		10 L



非常感谢您订购科诺赛生物的产品！

如需了解最新产品信息，请拨打服务热线 0532-55679191

或者登录我们官方网站 www.chromsep.cn