

---

# NW Rose Ni FF

金属螯合亲和层析介质

## 产品使用说明书

文件编号：NM-A-DF-0202

版本号：A1



# NW Rose Ni FF

## 金属螯合亲和层析介质

NW Rose Ni FF 琼脂糖层析介质是一款预螯合金属离子的螯合层析介质，金属螯合层析介质 (Immobilized-metal affinity chromatography, IMAC) 是常用生物分子分离纯化的层析介质。它是高交联度琼脂糖凝胶为原料，偶联 NTA 配基后预螯合 Ni 离子而制成的 NW Rose Ni FF 层析介质，具有亲水、多孔的特性，高流速、低离子脱落，也可以用于多肽、蛋白质等含有组氨酸等生物分子的分离纯化。是标签蛋白 his-tag 标准分离纯化的方法。

NW Rose Ni FF 的分离纯化原理是亲和层析技术中的金属螯合层析原理 (IMAC)。金属螯合和层析原理是利用了蛋白质表面上的电子供体基团，例如：半胱氨酸 (Cys)、组氨酸 (His)、色氨酸 (Try) 等与金属离子 (通常是  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  等) 的相互作用，这种相互作用可以形成特定的复合物，从而达到分离纯化的目的。

NW Rose Ni FF 琼脂糖层析介质有以下特点：

- 快速，方便的分离纯化 His 标签蛋白，适用于蛋白研究中的快速，高纯度的蛋白制备。
- 高动态载量，低金属离子脱落，减少蛋白样品中的金属离子残留。
- 化学稳定性高，适用范围广，可以使用低浓度的还原剂和其他的添加剂。
- 此系列金属螯合层析介质有多种产品可以选择；NW Rose IMAC FF，NW Rose Chelating FF 等。

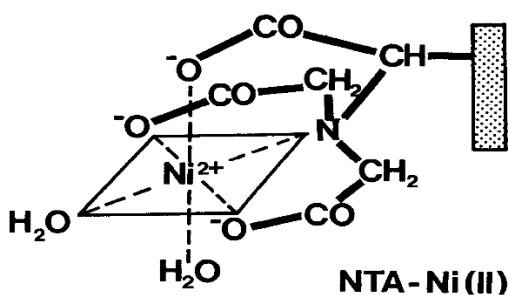


图 1. 螯合 Ni 离子的 NTA 配基琼脂糖层析介质。

NW Rose Ni FF 的技术参数如表 1 所示。

表 1. NW Rose Ni FF 技术参数。

产品型号	NW Rose Ni FF
分离原理	金属螯合亲和
基质	高流速琼脂糖微球
粒径	45-165 $\mu\text{m}$
配基	NTA
动态结合载量	$\sim 40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
离子载量	$15 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}(\text{Ni}^{2+})$
最大耐压	0.3 MPa
CIP 在位清洗	0.5 M NaOH (CIP 时必须去除 $\text{Ni}^{2+}$ )
推荐流速	150 cm/h (50/30 层析柱，柱高 10 cm)
最大流速	600 cm/h，16/20 层析柱 (柱高 10 cm)
pH 稳定性	3-12 (工作)，2-14 (CIP，必须去除 $\text{Ni}^{2+}$ )
化学稳定性	常见水相溶液， 0.1 M HCl、0.1 M NaOH、2% SDS、30% 异丙醇、6 M 盐酸胍、8 M 尿素、70% 乙醇 (脱 $\text{Ni}^{2+}$ 的条件下)
使用温度	4-30 $^{\circ}\text{C}$
存储条件	20% 乙醇，4-30 $^{\circ}\text{C}$

## 使用前的准备工作

### 1. 建议使用的层析柱类型:

根据应用领域选择层析柱:

NW Rose Ni FF 层析介质为吸附层析, 所以一般使用的层析柱的柱高在 10-20 cm (特殊试验, 按照小试条件), 层析柱的直径按照层析载量确定;

在工艺放大设计中, 参照实验室小试的工艺条件, 一般层析柱高不变, 放大层析柱直径。

### 2. NW Rose Ni FF 层析介质处理

根据层析柱的体积计算需要的 NW Rose Ni FF

$$\text{层析柱体积} = \text{层析柱底面积} \times \text{柱高}$$

$$\text{层析介质用量 (mL 或 L)} = (\text{柱体积} \times \text{层析介质的压缩比})$$

NW Rose Ni FF 层析介质的压缩比为 1.15

$$\text{层析介质匀浆用量 (mL 或 L)} = \text{层析介质用量} / \text{层析介质匀浆浓度}$$

注意:

- 1) 使用的缓冲液或水需要脱气处理(如果是注射用水, 可以不用脱气);
- 2) 一般原包装的匀浆浓度为 75%左右。如果不确定匀浆浓度, 可以将层析介质匀浆倒入量筒中, 过夜后 (一般 12-20 小时), 计算层析介质自然沉降体积;
- 3) 原包装 NW Rose Ni FF 是在 20%乙醇中保存, 使用砂芯漏斗, 负压抽滤的方式, 更换装柱缓冲液 (装柱缓冲液一般使用水或 20%的乙醇, 或者平衡缓冲液), 更换 3 次。搅拌时不要用力过度;
- 4) 如果需要高压灭菌, 可以在 121°C, 20 min 高压灭菌;
- 5) 在凝胶溶胀过程中不要使用磁力搅拌子搅拌, 使用磁力搅拌子会导致介质颗粒破裂;
- 6) 上层清液, 使沉降胶的体积占总体积的 50%~75%, 搅匀备用。

## 层析柱装填

请参考层析柱使用手册 (不同公司生产的层析柱, 使用方法不同);

- 1) 装柱缓冲液一般使用去离子水或 0.15 M NaCl 作为平衡缓冲液;
- 2) 调整层析柱水平;
- 3) 层析柱底膜排气, 层析柱底部保留 1 cm 装柱缓冲液;
- 4) 加装装柱器, 一般装柱高度超过层析柱的 2/3 时, 需要加装装柱器;
- 5) 将搅匀后的胶悬液一次性缓慢倒入层析柱内, 注意不要带入气泡, 倒入后用搅胶棒再次搅拌均匀;
- 6) 层析柱柱头连接, 注意柱头与系统或蠕动泵之间加压力表 (工业规

模层析柱需要), 层析柱头膜排气;

- 7) 将层析柱头插入层析柱, 使层析柱头底膜接触到液面, 除去液面与层析柱头膜间的气泡;
- 8) 连接系统或蠕动泵, 调整流速。控制压力, 不要超过 3 bar;
- 9) 随着流速, 层析介质界面逐渐下降。待层析介质界面稳定后 (30 min 内层析界面不再下降), 标记界面位置;
- 10) 停泵, 卸下装柱器 (如果使用)。将柱头下降至层析介质界面 (标记位置再下 0.5 cm);
- 11) 按照停泵前流速继续压胶 20-30 min。如果层析介质界面稳定, 装柱完成;
- 12) 建议装柱流速 300-400 cm/h (根据实际层析系统以及层析柱确定)。

## 柱效评价

表 2. 柱效评价参数表。

样品	1.0% (v/v) 丙酮水溶液	2 M NaCl 溶液
上样量	1.0%柱体积	1~5 % 柱体积
流动相	水	0.4 M NaCl 溶液
线性流速	30 cm/h	30 cm/h
检测	UV 280 nm	电导检测器

### 计算柱效

根据 UV 或者电导率曲线计算理论塔板高度 (HETP)、理论塔板数 (N) 和非对称因子 (As), 公式如下:

$$\text{HETP} = L/N$$
$$N = 5.54(VR/Wh)^2$$

其中: VR=保留体积

Wh=半高峰宽

L=柱高

N=理论塔板数

VR和Wh的单位应一致;

$$As = b/a$$

其中:

a= 在10%峰高处的, 第一个半峰宽;

b= 在10%峰高处的, 第二个半峰宽。

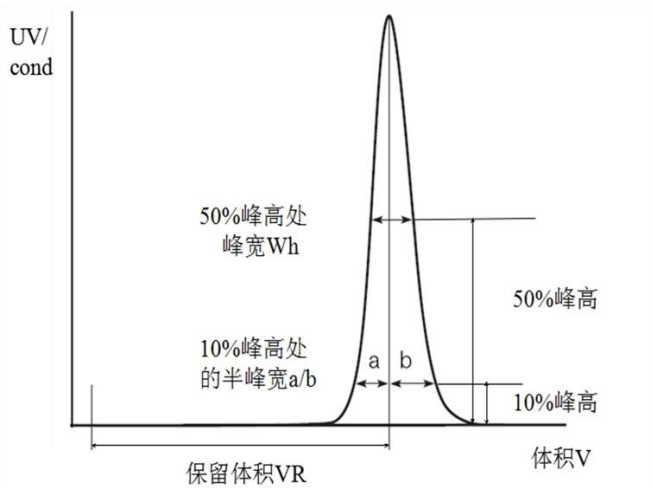


图 2. 柱效检测。

**结果评价**

由以上公式计算出的 HETP 的数值若小于三倍溶胀后的介质平均颗粒大小且非对称因子在 0.8~1.8 则判定为合格。对于不理想的柱效需要分析原因并重新装柱。

对于不同应用领域，所需要的柱效不同：

- a) 当纯化分离需要高分辨率时，柱效要求较高；HETP 在 2-4 倍的介质平均颗粒。
- b) 组份分离时，柱效要求不高。

**层析方法**

**NW Rose Ni FF 的分离原理**

NW Rose Ni FF 的分离纯化原理是亲和层析技术中的金属螯和层析原理 (IMAC)。金属螯合层析原理是利用了蛋白质表面上的电子供体基团，例如：半胱氨酸 (Cys)、组氨酸 (His)、色氨酸 (Try) 等与金属离子 (通常是  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  等) 的相互作用，这种相互作用可以形成特定的复合物，从而达到分离纯化的目的。

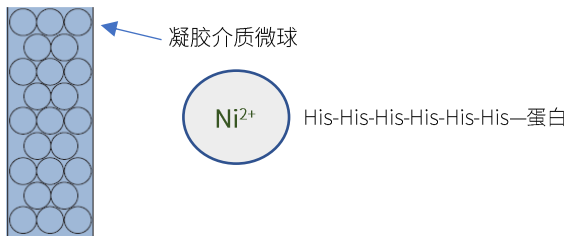


图 3. 层析柱示意图。

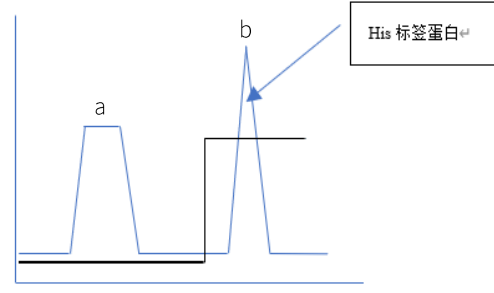


图 4. NW Rose Ni FF 纯化示意图，上样阶段不含 his 标签的蛋白流穿 (a)，咪唑竞争洗脱 his 标签蛋白 (b)。

NW Rose Ni FF 的配基为氨三乙酸 (NTA) 交联而成，可以整合四价的金属离子，使整合的金属离子更稳定，能耐受较高的还原剂，物理和化学稳定性好并具备特异性好、流速快的优点。

**建议使用的层析柱**

NW Rose Ni FF 层析介质，使用的层析柱按照纯化分离的规模确定：

1. 实验室规模  
对于实验室规模的纯化，一般按照需要的处理样品的量决定。此处处理量为层析介质吸附目标蛋白质的量 (不是样品体积)，一般是根据试验确定。
2. 生产规模  
用于生产规模的层析柱，同样也要按照样品量选择层析柱。层析柱的高度与实验小试的柱高一致。

**NW Rose Ni FF 建议使用的缓冲液**

分离纯化过程中的缓冲液选择一般按照以下原则：

- a) 生物分子稳定的缓冲液 pH (一般在 pH 7-8)、盐浓度 (一般在 0.15-1 M NaCl)。如果使用样品不稳定的缓冲液，样品在分离纯化中会聚集、沉淀，堵塞层析柱的筛网以及层析介质，影响柱压以及样品的收率；
- b) 为了减少非特异吸附 (提高收率)，一般缓冲液中加入 0.5 M 的盐 (例如 NaCl)；
- c) 为了减少其他氨基酸的影响纯化纯度，可以样品加入 20 mM 咪唑。如果是非标签蛋白 (his-tag)，在上样缓冲液不建议添加咪唑；
- d) 洗脱是一般使用咪唑竞争方式洗脱蛋白；
- e) 降低 pH 也是一种洗脱的方式，但是使用低 pH 洗脱，整合的金属离子也会一起洗脱；
- f) 样品的一般使用 G-25 层析柱将缓冲液置换为平衡缓冲液，或使用平衡缓冲液溶解；
- g) 缓冲液中不能含有螯合剂或还原剂 (见附录)。

## NW Rose Ni FF 一般的步骤

- 1) 平衡：用 5 CV 以上的平衡缓冲液平衡层析柱；待 UV、电导率以及 pH 曲线稳定后即可上样；
- 2) 上样：一般按照蛋白载量上样，不要超过层析介质载量；
- 3) 冲洗：使用平衡缓冲液冲洗未吸附的样品；
- 4) 洗脱：洗脱缓冲液洗脱体积，一般 1-1.5 CV；

最常用的缓冲液：

Buffer A: 20 mM PB+0.5 M NaCl, pH7.4

Buffer B: 20 mM PB+0.5 M NaCl+0.5 M 咪唑, pH7.4

注意：

- 1) 洗脱后按照试验要求，可以连续上样。一般可以连续上样 5-10 次；
- 2) 如果样品在提取过程中杂质较多，一般在连续上样 5-10 次后，洗脱金属离子后使用 NaOH 清洗层析介质。这样可以延长介质使用寿命；
- 3) 使用低 pH 洗脱方式，Ni 离子脱落高，会影响下一次样品的载量，所以需要重新将 Ni 离子吸附后，再次上样；
- 4) 对于生产规模，每批生产时需要层析介质灭菌消毒。所以在每批使用完成后必须脱 Ni 离子，使用 NaOH 做 CIP (CIP 方法请参考说明书中“层析介质的清洗与再生”)；
- 5) 如果试验结束，需要使用保存液 (脱过气的 20%乙醇) 1.5-2 CV 保存。

## NW Rose Ni FF 条件优化

洗脱梯度的选择

### 一步洗脱

对于 his-tag 蛋白的纯度要求不高时，可以使用一步洗脱；平衡缓冲液中加入 500 mM 咪唑。

平衡 5 CV—上样—冲洗 2 CV—洗脱 2-3 CV。

优点：方便，快速，样品浓度高，不必使用层析系统。

缺点：纯度不高。

### 线性洗脱

对于 his-tag 蛋白的纯度要求较高，或者天然蛋白的纯化，建议使用线性梯度洗脱。平衡 5 CV—上样—冲洗 2 CV—洗脱 (0-100%洗脱缓冲液)

15-20 CV。

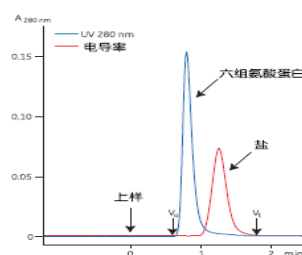
### 工艺探索

对于工艺开发的项目，从以下几个方面：

- a) His-tag 蛋白或蛋白序列中富含 His, Cys, Try 的蛋白，在样品中加入 20-40 mM 咪唑，减少吸附较弱的杂质吸附；
- b) 线性洗脱后，分析收集样品，找到对应纯度高的咪唑浓度，在制备时使用步级梯度洗脱；
- c) 可以探索不同离子的纯化结果。

## 去除脱落在样品中的金属离子和咪唑

脱落在样品中的金属离子以咪唑均是小分子物质，分子量<100 Da。所以可以使用凝胶过滤的方式去除，参照纳微科技 NW Dex G-25 使用说明书。



His-tag 标签

蛋白纯化后

对于大规模的样品制备，也可以使用膜过滤的方式去除金属离子和咪唑。

## 金属离子的剥离和金属离子再生

在 NW Rose Ni FF 的使用过程中，样品中的杂质 (例如：核酸，杂蛋白，细胞碎片等) 污染层析介质；如果不及时清洗再生，会导致纯化的样品纯度下降、载量降低、柱压升高、层析介质的寿命会缩短。所有必须在使用过 5-10 个循环后清洗层析介质 (CIP)。在 CIP 前必须先剥离金属离子，CIP 后还需将金属离子再生。

### 金属离子的剥离步骤

- 1) 20 mM PB +0.5 M NaCl+0.1 M EDTA, pH 7.4, 5 CV
- 2) 20 mM PB +0.5 M NaCl, pH 7.4, 5 CV
- 3) 超纯水 (或去离子水), 5 CV
- 4) 20%乙醇保存

### 金属离子的再生

- 1) 超纯水 (或去离子水), 5 CV
- 2) 0.1 M NiSO<sub>4</sub>, 1-2 CV
- 3) 超纯水 (或去离子水), 5 CV
- 4) 20%乙醇保存

## 层析柱以及层析介质的保存

长期不使用的介质：建议层析介质从层析介质拆卸出来，使用 20%乙醇室温，密封保存；

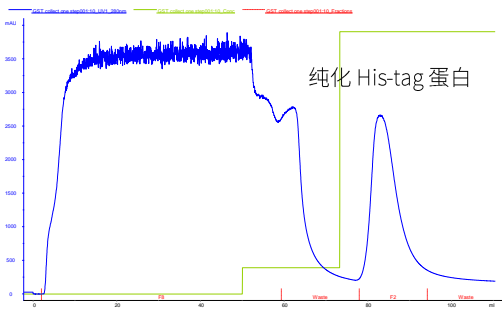
短期保存：可以在层析柱中使用 20%的乙醇室温保存。

## 层析应用

### 不同的应用领域

1. his-tag 标签蛋白纯化

按照 NW Rose Ni FF 的一般纯化步骤操作



## 2. 天然蛋白纯化

天然蛋白系列中含有 Cys、Try、His 等氨基酸可以使用 NW Rose Ni FF 分离纯化，对于已知的 3D 结构的蛋白质，可以从蛋白质数据库中获得关于表面氨基酸残基的数量和排列的数据。随着蛋白质组学的发展，已知的一级结构的蛋白质的数量以及 3D 结构的更加明确，基于已知的初级氨基酸序列的结构建模也将变得更有用和更精确。

生物制药中也有许多产品可以使用 NW Rose Ni FF 生产制备。例如：干扰素、疫苗、抗体以及生化酶产品等。

纯化分离方案可以按照本说明书中 NW Rose Ni FF 的条件优化、探索生产的纯化工艺。

## 层析介质清洗与再生 (CIP)

NW Rose Ni FF 层析介质在使用一段时间后，如发现柱效下降、分离效果变差，可采用下面的流程进行清洗和再生。

注意：使用 NaOH 清洗前必须将金属离子剥离。

1. 用超纯水（去离子水）冲洗 2 个柱体积
2. 20 mM PB +0.5 M NaCl+0.1 M EDTA, pH 7.4, 5 CV
3. 20 mM PB +0.5 M NaCl, pH7.4, 5 CV
4. 超纯水（或去离子水），5 CV
5. 1 M NaCl 冲洗 1-2 个柱体积
6. 用 0.2-1 M NaOH 冲洗 1-2 柱体积
7. 超纯水（或去离子水），5 CV
8. 0.1 M NiSO<sub>4</sub>, 1-2CV
9. 超纯水（或去离子水），5 CV
10. 20%乙醇保存

## 层析介质灭菌

NW Rose Ni FF 灭菌可以使用 CIP 程序达到灭菌的目的。灭菌使用的溶液一般是超纯水或去离子水。

## 层析介质长期储存

NW Rose Ni FF 在阴凉干燥处密闭存放，储存于 20%乙醇中；为了防止乙醇挥发以及微生物生长，建议 3 个月更换一次新鲜的 20%乙醇，保存在 4-8 °C 环境中的效果更好。

## 包装

纳微科技公司生产的 NW Rose Ni FF 琼脂糖层析介质所有包装储存液为 20%乙醇，在运输过程中使用室温运输,最高温度<40 °C。

## 销毁及回收

由于 NW Rose Ni FF 层析介质在自然界很难降解，为了保护环境建议采用焚烧处理。

### NW Rose Ni FF 不影响分离纯化的添加剂

添加剂		常用浓度
缓冲盐	磷酸钠	50 mM, pH 7.4
	Tris-HCl	100 mM, pH 7.4
	Tris-Acetate	100 mM, pH 7.4
	MOPS	100 mM, pH 7.4
	HEPES	100 mM, pH 7.4
非离子去污剂	Triton X-100	2%
	Tween-20	2%
尿素		8 M
盐酸胍		6 M
甘油		50%
异丙醇		30%
乙醇		70%
蛋白酶抑制剂	PMSF	1 mM
	胃蛋白酶抑制剂	1 μM

**NW Rose Ni FF 影响分离纯化的添加剂**

添加剂		最高添加浓度
还原剂	B-巯基乙醇	5 mM
	DTT, DTE	1 mM
螯合剂	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
组氨酸		用于替代咪唑洗脱
柠檬酸盐		10 mM

## 问与答

如果您在使用 NW Rose Ni FF 金属螯合亲和层析产品遇到任何问题，请参考下表进行解决或联系我们。

---

### 问题 1 纯化后检测不到目标蛋白？

- a) 检测表达的目标蛋白位置；大肠杆菌表达的 His-tag 蛋白可能为：包涵体、胞内可溶。不同的表达方式样品处理的方法不同。通过 SDS-PAGE 电泳确定，同时估算表达量；
- b) 样品检测，使用 SDS-PAGE 检测样品中目标蛋白是否存在以及目标物含量；如果是包涵体溶解的复性液，检测溶液是否澄清。有可能复性后，蛋白形成聚体或聚集沉淀。上样后，蛋白沉淀在层析柱上；
- c) 流穿检测，检测样品在上样过程中是否吸附在层析介质上。如果流穿中含有大量样品，可能样品没有吸附。将样品中的 20-40 mM 咪唑去除，再次上样测试；
- d) 样品的粘度以及核酸的含量，使用超声或核酸酶减少核酸的影响；
- e) 可能蛋白的表达 His-tag 没有完全暴露，重新构建 10 个 His 的标签。

---

### 问题 2 层析介质变白、变黑、变黄？

- a) NW Rose Ni FF 层析介质变白说明 Ni 离子脱落，需要 Ni 离子再生；
- b) 层析介质变黑，一般是没有脱 Ni 的情况下使用还原剂或 NaOH，会导致层析介质损坏，无法继续使用；
- c) 层析介质变黄，一般是介质污染严重，需要再生清洗。

---

### 问题 3 在上样时层析介质不断上升？

- a) 样品中的细胞碎片没有去除，建议使用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜或是 8000-10000 rpm 离心去除；
- b) 样品中的核酸没有去除，使得样品比较黏；建议：使用核酸酶或者超声破碎的方式，将核酸剪切成碎片；
- c) 样品为包涵体表达，复性后，蛋白聚集或沉淀，造成层析介质堵塞。建议：a. 使用 6-8 M 尿素溶解包涵体，直接上样，上样后使用 0.5-1 M 尿素柱上复性，待柱上复性完全后使用平衡缓冲液去除尿素，再洗脱样品，这样操作会提高样品收率；但是复性过程中未复性的蛋白会沉淀在层析柱中，所以每个循环后就需要脱 Ni 离子，做 CIP 清洗；  
改变复性方式或样品经过 0.45  $\mu\text{m}$  过滤，除去聚集物和沉淀。

---

### 问题 4 为什么我的样品会在流穿中检测到？

- a) 可能样品没有吸附到层析柱上，参考 1 中的解决方案；
- b) 流穿中检测到样品，洗脱中也检测到样品，这种情况是样品过载，一般 NW Rose Ni FF 的 His-tag 载量在 40 mg/mL 的载量，确认层析介质载样量，从而确认是否过载。不同蛋白的载量不同，分子量小的载量高一些；分子量大的蛋白载量低，对于某些蛋白来说情况可能要更复杂，需要按实际的情况决定。

---

### 问题 5 是否可以重复上样，可以重复上样多少次？

检测纯化目的是否达到，层析介质是否被污染：一般样品澄清、无颗粒、无沉淀，分离后的样品同样澄清，此类样品可以重复上样 10-15 次。

---

### 问题 6 样品中的咪唑和脱落到样品中的 Ni 离子一定要去除吗？

按照试验的具体目的而定：实验室纯化 His-tag 蛋白时，一般不需要去除。生物制品的工艺开发中，脱落的 Ni 和咪唑必须去除，因为 Ni 离子为重金属离子，其次咪唑有一定毒性。所以工艺中一定要设计去除步骤，一般可以使用凝胶过滤或离子交换等技术去除，也可以使用膜过滤的方法在浓缩样品的同时去除小分子物质。同时还要有 Ni 离子残留以及咪唑残留的检测。

---

### 问题 7 如何确定层析介质的寿命

在实验室使用：一般从层析介质的柱压、流速、颜色等简单判断介质寿命。在工业生产中：需要严格按照工艺验证的方法确定介质寿命。

---



## 订货信息

产品型号	包装	货号
NW Rose Ni FF	25 mL	60042-531800-2025
	100 mL	60042-531800-2100
	500 mL	60042-531800-2500
	1 L	60042-531800-1001
	5 L	60042-531800-1005
	10 L	60042-531800-1010

注：可以提供 7.7 mm × 22 mm 、 16 mm × 25 mm 、 7.7 mm × 100 mm 的层析预装柱。更多规格型号或定制需求，请联系我们。

### 苏州纳微科技股份有限公司

全国咨询热线：400-828-1622

邮箱：[info@nanomicrotech.com](mailto:info@nanomicrotech.com)

(本公司产品仅限科研或工业使用)

中文网站：[www.nanomicrotech.com](http://www.nanomicrotech.com)

英文网站：[en.nanomicrotech.com](http://en.nanomicrotech.com)

2022-苏州纳微科技股份有限公司版权所有

总部地址：苏州工业园区百川街2号 215123

2022年6月第二版

