

---

# Uni 系列

金属螯合亲和层析介质

## 产品使用说明书

文件编号：NM-W-DF-0305

版本号：A0



# Uni 系列

## 金属螯合亲和层析介质

重组蛋白的富集和纯化一般采用已知大小的标签，通过重组表达之后，利用标签和填料的特异性相互作用，达到分离纯化效果。固定金属离子或金属螯合亲和层析 (MAC) 利用蛋白表面的某些氨基酸 (如组氨酸、色氨酸、半胱氨酸等) 和固定在层析介质上的过渡金属离子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ 等) 以配位键结合，从而实现在不标签蛋白质的分离。影响蛋白质与金属离子螯合作用大小的因素，主要是蛋白质表面可结合的氨基酸 (种类、数目和分布)、金属离子的种类和密度、层析条件 (pH、盐的种类和浓度、添加剂等)。固定金属离子亲和层析介质具有吸附容量大、选择性好、分辨率高、易于再生、成本较低等优点，被广泛用于生物制药和生物制品的下游蛋白质、核酸及多肽的分离纯化，尤其是组氨酸标记 (His-Tag) 蛋白质的分离纯化。

纳微科技提供的固定金属离子亲和层析介质以多孔聚丙烯酸酯为基质，具有良好的稳定性、生物相容性和溶剂相容性，既有利于保持生物药或制品的生物活性和提高产品的收率，还有利于扩大层析操作条件的选择范围。UniIDA-80L、UniNTA-80L、UniTED-80L 为螯合固定金属离子的介质，使用者可以根据需要螯合不同的过渡金属离子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ 等)；UniIDA-80Ni、UniNTA-80Ni、UniTED-80Ni 为预先螯合了  $\text{Ni}^{2+}$  的介质，使用者不需要螯合金属离子即可直接使用。

产品优势：

- a) 采用单分散微球填料，批次间稳定性更佳
- b) 机械强度高，反压更低，提高生产效率种需求

- c) 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
- d) 可以按照不同项目需要螯合特定的金属离子，达到更高的分离纯化要求
- e) 更全的填料规格，提供客户专业定制化服务



图 1. Uni 系列金属螯合层析产品图

表 1. UniIDA-80L、UniNTA-80L、UniTED-80L 层析介质参数表

名称	UniIDA - 80L	UniNTA - 80L	UniTED - 80L
基质	聚甲基丙烯酸酯 (PMMA)		
粒径	80 $\mu\text{m}$		
配基	IDA	NTA	TED
最大耐压	0.5 MPa		
CIP 在位清洗	0.5 M NaOH		

推荐流速	150-750
pH 稳定性	2-12
化学稳定性	稳定水溶液、0.1M HCl、0.1MNaOH、 2% SDS、 30% 异丙醇、6M盐酸胍、8M尿素、70% 乙醇（脱Ni的条件下）
使用温度	4-30 °C
存储条件	20%乙醇，4-30 °C

**表 2. UniIDA-80Ni、UniNTA-80Ni、UniTED-80Ni 层析介质参数**

名称	UniIDA-80Ni	UniNTA-80Ni	UniTED-80Ni
基质	聚甲基丙烯酸酯 (PMMA)		
粒径	80 μm		
配基	Ni <sup>2+</sup>		
最大耐压	0.5 MPa		
CIP 在位清洗	0.5 M NaOH（必须去除 Ni <sup>2+</sup> ）		
推荐流速	150-750		
pH 稳定性	2-12		
化学稳定性	稳定水溶液、0.1M HCl、0.1MNaOH、 2% SDS、 30% 异丙醇、6M盐酸胍、8M尿素、70% 乙醇（脱Ni的条件下）		
使用温度	4-30 °C		
存储条件	20%乙醇，4-30 °C		

## 层析柱装填

Uni 系列产品储存于 20%乙醇中，1.5 Kg 匀浆液对应 1 L 介质体积，推荐装柱匀浆液流动相为 0.1 - 0.5 M NaCl 或纯水，推荐压缩系数为 1.1。

Uni 系列产品是高机械强度“硬胶”，既可装低压柱也可装中高压柱，比较合适的柱子筛板型号为 10-23 μm。装柱步骤如下：

### 1) 计算所需层析介质匀浆液质量

所需匀浆液质量 (Kg) = 目标柱体积 (L) × 1.5 Kg/L × 1.1。

例如，装填 40 cm I.D × 20 cm 的 25 L 层析柱所需匀浆液质量为：25 L × 1.5 Kg/L × 1.1 = 41.25 Kg。为保证层析介质体积计量准确度，在称量之前，必须保证匀浆液浓度是均匀的（可以使用塑料勺缓慢搅拌均匀或使用低于 50 rpm 的机械搅拌匀浆，匀浆完毕静置时间不可超过 10 分钟）。

### 2) 装柱匀浆液的准备

开始前，准备足量的 0.1 - 0.5 M NaCl（或纯水）作为装柱液进行装柱。下文以装柱液代指 0.1 - 0.5 M NaCl（纯水）。

#### 实验室规模的小柱子（内径 ≤ 50 mm）：

将计算所需的 20 %乙醇介质悬液转移到过滤漏斗，抽滤后加入介质 3 倍体积的装柱液，用塑料勺缓慢搅拌均匀后再抽滤。重复上述步骤两次使层析介质悬液中原先的 20%乙醇被充分置换成装柱液，最后补加装柱液定容至目标柱体积的 1.67~2 倍（浆液浓度 50%~60%）。

#### 大柱子（内径 > 50 mm）：

将计算所需的 20 %乙醇介质悬液在匀浆罐中静置沉降 2 小时以上，然后去除上清液（上清液中可能会有些轻微浑浊），加入与去除的上清液相同体积的装柱液。缓慢搅拌匀浆后静置沉降 2 小时以上，然后去除上清

液。重复上述步骤两到三次使介质悬液充分置换成装柱液，最后补加装柱液定容至目标柱体积的 1.67~2 倍（浆液浓度 50%~60%）。

注意：在装柱匀浆液的准备过程中，尽量避免碾压摩擦介质，不可用磁力搅拌或挤压式蠕动泵，机械搅拌时桨叶不可离器壁太近，另外层析介质如果需要重新装柱，也须按上述过滤或沉降步骤来准备装柱匀浆液。

### 3) 装柱

- **流动装填：**

3-1) 将上述介质悬液充分匀浆，并转移到柱管中。

3-2) 用装柱液为流动相开始装柱（装柱刚开始时流出液有可能观察到一些浑浊现象，随着装柱进行 1-2 个柱体积之后会变清）。

注意：装柱起始流速不要太高。

3-3) 待柱床高度稳定后，提高流速至目标最高流速（推荐最高流速为使用流速的 2 倍）或者使压强达到目标最高压强（推荐压强不超过 1.0 MPa），压力恒定后再稳定 20 分钟。

3-4) 将活塞调至胶面以下 2-3 毫米位置即可。

- **轴向压缩装填（内径>300 mm）：**

3-1) 将柱子进行清洗，排气。

3-2) 将匀浆罐和柱子连接，然后排除柱子内多余的溶液，将活塞降至距下筛板 5 cm。

3-3) 打开进料阀向上移动活塞进行抽料。抽料速度 200~300 cm/h。根据料液浓度确定抽料的量，换算活塞移动距离。关闭进料阀，向下移动活塞进行压柱，压柱速度 60~100 cm/h。

压至填料全部沉降，柱床高度不再增加，停止移动活塞，读取柱床高度，此时再根据 1.1 的压缩比计算最终活塞最终的位置。

注意：未避免匀浆液在抽料时进气泡，一般按照 120%以上计算填料质量。

## 柱效评价

装好的色谱柱应使用 2 CV 0.5 M NaCl 溶液平衡，以 60 cm/h 流速进行柱效测试，具体测试参数详见表 3：

**表 3. Uni 系列装填层析柱的柱效测试方法。**

可以采用丙酮或者 NaCl 作为指示剂，按照下表配制指示剂溶液和流动相：

样品	1.0% (v/v) 丙酮水溶液	2 M NaCl (溶于水)
样品体积	1.0%柱体积	1.0%柱体积
流动相	水	0.5 M NaCl 水溶液
流速	50~200 cm/h	50~200 cm/h
检测器	UV 280 nm	电导率

## 使用方法

- 分离纯化过程中的缓冲液选择一般按照以下原则：

- 生物分子稳定的缓冲液 pH（一般在 pH7-8）、盐浓度（一般在 0.15-1M 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；
- 为了减少非特异吸附（提高收率），一般缓冲液中加入 0.5M 的盐（例如 NaCl）；
- 为了减少其他氨基酸的影响纯化纯度，可以样品加入 20mM 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；
- 洗脱是一般使用咪唑竞争方式洗脱蛋白；
- 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；
- 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；

注：缓冲液中不能含有螯合剂（EDTA、EGTA）或还原剂（B-巯基乙醇、DTT、DTE）。

- **操作步骤：**

- 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；
- 上样：一般按照蛋白载量上样，不要超过层析介质载量；
- 冲洗：使用平衡缓冲液冲洗未吸附的样品；
- 洗脱：洗脱缓冲液洗脱体积，一般 1-1.5CV；

- **最常用的缓冲液：**

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

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

- **金属离子的剥离步骤：**

20mM PB +0.5M NaCl+0.1M EDTA, pH 7.4 5CV

20mM PB +0.5M NaCl, pH7.4 5CV

超纯水（或去离子水） 5CV

20%乙醇保存

- **金属离子的再生：**

超纯水（或去离子水） 5CV

0.1M NiSO<sub>4</sub> 1-2CV

超纯水（或去离子水） 5CV

20%乙醇保存

## 清洗和再生

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. 20mM PB +0.5M NaCl+0.1M EDTA, pH 7.4 5CV
3. 20mM PB +0.5M NaCl, pH7.4 5CV
4. 超纯水（或去离子水） 5CV

5. 1M NaCl 冲洗 1-2 个柱体积
6. 用 0.2-1M NaOH 冲洗 1-2 柱体积
7. 超纯水（或去离子水） 5CV
8. 0.1M NiSO<sub>4</sub> 1-2CV

## 层析介质长期储存

使用后的 Uni 系列层析介质密闭保存储存于 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。

## 订货信息

产品型号	包装	货号
UniIDA-80Ni	30 mL	04087-080100-2030
	50 mL	04087-080100-2050
	100 mL	04087-080100-2100
	300 mL	04087-080100-2300
	500 mL	04087-080100-2500
	1 L	04087-080100-1001
	5 L	04087-080100-1005
	10 L	04087-080100-1010
	50 L	04087-080100-1050
	100 L	04087-080100-1100
UniNTA-80Ni	30 mL	04088-080100-2030
	50 mL	04088-080100-2050
	100 mL	04088-080100-2100
	300 mL	04088-080100-2300
	500 mL	04088-080100-2500
	1 L	04088-080100-1001
	5 L	04088-080100-1005
	10 L	04088-080100-1010
	50 L	04088-080100-1050
	100 L	04088-080100-1100
UniTED-80Ni	30 mL	04089-080100-2030
	50 mL	04089-080100-2050
	100 mL	04089-080100-2100
	300 mL	04089-080100-2300
	500 mL	04089-080100-2500
	1 L	04089-080100-1001
	5 L	04089-080100-1005
	10 L	04089-080100-1010
	50 L	04089-080100-1050
	100 L	04089-080100-1100
UniIDA-80L	30 mL	04085-080100-2030
	50 mL	04085-080100-2050

	100 mL	04085-080100-2100
	300 mL	04085-080100-2300
	500 mL	04085-080100-2500
	1 L	04085-080100-1001
	5 L	04085-080100-1005
	10 L	04085-080100-1010
	50 L	04085-080100-1050
	100 L	04085-080100-1100
UniNTA-80L	30 mL	04086-080100-2030
	50 mL	04086-080100-2050
	100 mL	04086-080100-2100
	300 mL	04086-080100-2300
	500 mL	04086-080100-2500
	1 L	04086-080100-1001
	5 L	04086-080100-1005
	10 L	04086-080100-1010
UniTED-80L	50 L	04086-080100-1050
	100 L	04086-080100-1100
	30 mL	04090-080100-2030
	50 mL	04090-080100-2050
	100 mL	04090-080100-2100
	300 mL	04090-080100-2300
	500 mL	04090-080100-2500
	1 L	04090-080100-1001
	5 L	04090-080100-1005
	10 L	04090-080100-1010
	50 L	04090-080100-1050
	100 L	04090-080100-1100

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

(本公司产品仅限科研或工业使用)

中文网站：www.nanomicrotech.com

英文网站：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12月第一版



