



Ni-TED Agarose 6FF琼脂糖层析介质

产品信息

组成	PA404-01	PA404-02
Ni-TED Agarose 6FF	5 ml	100 ml

储存条件

在 2-8°C 未开封的情况下，本产品可以保存 2 年。不要冻存产品。

产品说明

Ni-TED Agarose 6FF 是一种用于组氨酸标签蛋白纯化的亲和层析介质，该介质以 6% 交联琼脂糖微球为基质，通过共价偶联的 TED 配基与镍离子形成四个配位键，实现对多组氨酸标签重组蛋白的高亲和力捕获。

产品特性

1. 特异性好，镍离子结合稳定不易脱落。
2. 流速快，适合规模化纯化。
3. 镍离子泄漏率低，蛋白结合动态载量高。
4. 化学耐受性强，可兼容含 EDTA、DTT 等添加剂的缓冲体系，填料使用寿命长。
5. 兼容性强，在变性或还原条件下均保持良好性能，适用于各种复杂样品中的目的蛋白纯化。

Ni-TED Agarose 6FF 的主要指标如下表

外观	蓝色浆状物，球形，表面光滑
基质	6% 交联琼脂糖
功能基团	Tris (carboxymethyl) ethylenediamine (TED)
配基密度	50-70 $\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{mL}$ 介质
动态结合载量	≥ 40 mg 组氨酸标签蛋白/mL 介质
推荐流速	< 300 ml/h
平均粒径	90 μm
耐受压力	0.3 MPa
耐受 pH	长期: 3-12 (脱镍后); 短期在位清洗: 2-14
化学稳定性	0.01 M NaOH; 0.01 M HCl; 24 h 耐受 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 mM TCEP, 20 mM β -巯基乙醇, 1 M NaOH, 8M 尿素, 6 M 盐酸胍; 2 h 耐受 500 mM 咪唑, 100 mM EDTA。

产品使用方法

1. 实验准备

试剂与仪器: Ni-TED Agarose 6FF、层析柱、蛋白纯化仪、蠕动泵等。

缓冲液配制 (变性条件下纯化时, 溶液中含终浓度为 8 M 的尿素或 6 M 盐酸胍):

平衡缓冲液: 20 mM PBS, pH7.0

洗涤缓冲液: 20 mM PBS, 0-30 mM 咪唑, pH7.0

洗脱缓冲液: 20 mM PBS, 500 mM 咪唑, pH7.0

也可根据目标蛋白特性使用自备缓冲液。

2. 填料准备

2.1 根据公式计算所需 Ni-TED Agarose 6FF 介质体积: 介质体积=柱高 \times 截面积 \times 压缩因子 (取 1.15)。

2.2 抽滤去除保存液，用超纯水反复洗涤，最后将介质重悬于超纯水或平衡缓冲液中，制成 50–75%悬浮液备用（溶液需经 0.45 μm 或 0.22 μm 滤膜过滤并脱气）。也可通过超纯水置换保存液至乙醇含量 <2%，再制成悬浮液备用。

3. 层析柱准备

- 3.1 将层析柱清洗、消毒，用超纯水或待用缓冲液冲洗柱壁，排除适配器中气泡。
- 3.2 连接底部适配器，关闭柱底阀门，加入约 3 cm 高缓冲液/超纯水，静置 5 分钟检查是否漏液。

4. 装柱

- 4.1 固定层析柱，校正水平。将介质悬浮液搅拌均匀，沿柱壁一次性倒入，避免产生气泡。
- 4.2 待介质自然沉降后，连接上端适配器至蛋白纯化仪泵或蠕动泵，排除气泡后将适配器置于胶面上方 2–3 cm 处，防止介质再悬浮。

5. 压柱

- 5.1 初始使用较低流速，逐步提高至最大压柱流速（压力不超过 0.3 MPa）。
- 5.2 待胶面高度稳定后标记位置，停泵，将上端适配器压至标记高度下方 0.5 cm 处，锁紧并封闭出口。
- 5.3 若使用装柱器，待介质全部压入柱体内，卸下装柱器，连接柱体上端适配器，将柱头下降至胶面上 0.5cm，再次压柱，标记胶面位置，停泵，将上端柱杆下压至标记高度下 0.5cm，锁紧适配器，封堵出口，完成装柱。

6. 柱效测定

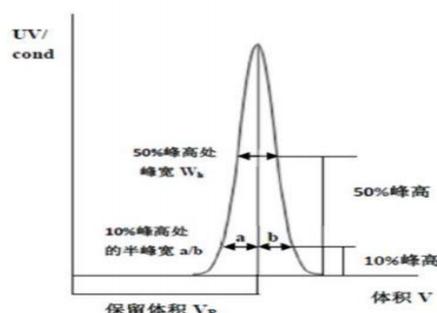
6.1 柱效测定

柱效是衡量色谱柱性能的一项重要指标，主要有两种柱效测试方法：一种是用丙酮，另一种是用氯化钠；前者是在 UV280nm 条件下测定紫外吸收峰，后者是考察电导峰。

	方法一	方法二
样品	1% (v/v) 丙酮水溶液	0.8-2M NaCl 溶液
缓冲液	去离子水	0.4 NaCl 溶液
上样量	1%柱体积	1%柱体积
流速	15-30 ml/h	15-30 ml/h
检测器	cm/hUV280nm	电导率仪

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

6.2 柱效计算 (HETP 和 AS 计算方法)



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

$$N = 5.54 \left(\frac{V_R}{W_h} \right)^2, \quad HETP = \frac{L}{N}, \quad A_s = \frac{b}{a}$$

其中：VR：保留体积；Wh：50%峰高处的半峰宽；VR 和 Wh 的单位应一致；L：柱高；N：理论塔板数；a/b：将 10%峰高处前半峰的宽度设为 a,同高度处后半峰的宽度设为 b；

6.3 判断标准

柱效较高时满足：

$$\frac{\text{HETP}}{d_p} \leq 3 \quad (\text{或 } N > \frac{1,000,000}{\text{平均粒径} \times 3}), \quad A_s \in [0.8, 1.8]$$

d_p 为填料粒径。

7. 平衡

7.1 根据样品的稳定性、活性、等电点选择合适的缓冲液、pH 范围。结合缓冲液常用浓度为 20~50mM，可在结合缓冲液中加入 300mM 或 500mM 的氯化钠以减少非特异性吸附。

7.2 层析实验开始前需测定结合缓冲液电导、pH，以合适的流速平衡层析柱，当仪器检测电导、pH 值达到结合缓冲液的初始值说明层析柱平衡好，一般需要 2~5CV。

8. 上样

样品需经 0.45 μm 或 0.2 μm 滤膜过滤并脱气处理，可以用样品环或蠕动泵等装置上样。

样品配制溶液应尽可能与结合缓冲液一致，上样量可根据介质的动态结合载量或实际测定载量来确定。

9. 清洗

上样后继续用平衡缓冲液清洗，直至紫外吸收值恢复基线。

10. 洗脱

金属螯合层析介质可使用 pH 4~6 缓冲液或 200~500 mM 咪唑进行洗脱，可采用线性梯度、步阶梯度或等度洗脱，分管收集以确定最佳洗脱条件。

11. 再生

每次使用后，使用高浓度盐溶液冲洗层析柱，确保结果可重复性。

12. 层析柱在位清洗 CIP (Cleaning In Place)

金属螯合层析介质在使用后，会结合并聚集大量杂蛋白，造成柱子堵塞，反压增大，影响流速与载量，需要剥落金属离子、清洗、重新螯合金属离子。

12.1 使用含 EDTA 的缓冲液（如 50 mM PB + 500 mM NaCl + 200 mM EDTA，pH 7.0）去除金属离子；

12.2 用 500mM NaCl 溶液冲洗层析柱，除去柱中残留的 EDTA；

12.3 用 1M NaOH 溶液冲洗以除去沉淀及疏水性较强物质；

12.4 使用 70%乙醇或 30%异丙醇去除脂类物质（使用高浓度有机溶剂时，为避免气泡产生，应逐步增加有机溶剂浓度如采取梯度方式）。

13. 层析介质储存

13.1 清洁再生后的介质应保存于 20%乙醇中，置于 4~30°C 环境。

13.2 建议每 2~3 个月更换一次保存液，防止微生物污染。