

## Agarosix 系列 Ni 亲和填料产品说明书

### 一、产品简介

Agarosix MC90-NTA Ni & Agarosix MC90-Ni Excel 填料是一种金属亲和层析填料，适用于纯化组氨酸（His）标签的重组蛋白，这类重组蛋白广泛应用于生物技术领域。该填料以高交联度的琼脂糖为基质，平均粒径为 90  $\mu\text{m}$ 。填料表面具有高度亲水性，最大程度地避免了与生物类样品的非特异性吸附。在亲水性表面，以专有连接物链接了能螯合多价金属离子的羧酸基团，再螯合了 Ni 离子制备而成。

Agarosix MC90-NTA Ni 填料可耐受 0.1 M NaOH 溶液清洗循环。该填料不耐 EDTA 及 DTT。使用一段时间后需重新补充金属离子。该填料有两种类型：游离酸型（Agarosix MC90-NTA -CA）和螯合镍离子型（Agarosix MC90-NTA Ni）。游离酸型可用于样品中金属离子的去除，也可根据客户要求螯合其他金属离子型填料。

Agarosix MC90-Ni Excel 填料可长时间重复使用，在一定浓度的 EDTA 溶液下可以将 Ni 离子损失降到最低，每次使用后可以直接用 0.5 M NaOH 溶液在线清洗，无需再补充二价镍离子。同一填料对同一蛋白样品最高可重复使用 100 次以上。

### 层析介质特点

- 📖 高结合载量和极好的生物相容性
- 📖 可忽略的非特异性吸附
- 📖 高分辨率、高柱效和高回收率
- 📖 高批间重现性、易于放大
- 📖 产品供应能力：> 100 L

### 二、安全

有关本产品安全使用的信息，请参阅安全数据书(SDS)。

### 三、产品性质及特征参数

#### 3.1 层析介质化学结构与技术参数

Agarosix MC90-NTA Ni 为 O、N 四配位的亲和层析介质，配基为  $\text{Ni}^{2+}$ ；Agarosix MC90-Ni Excel 为 O、N 五配位的亲和层析介质，配基为  $\text{Ni}^{2+}$ ；结构示意图如图 1 所示。Agarosix MC90-NTA CA 为未螯合金属离子的游离酸型层析介质，配基为 O、N 配位的游离酸型 4 配位结构。具体产品技术参数见表 1。

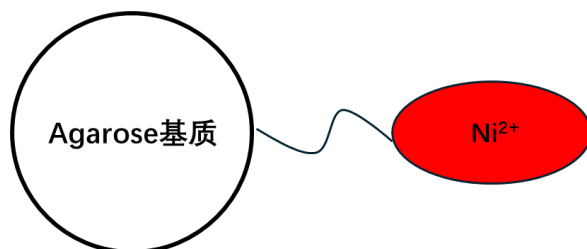


图 1.Ni 亲和层析介质配基结构示意图

表 1.Ni 亲和层析介质技术参数

产品名称	Agarosix MC90-NTA Ni	Agarosix MC90-Ni Excel	Agarosix MC90-NTA CA
基质	6%高交联琼脂糖	6%高交联琼脂糖	6%高交联琼脂糖
平均粒径	90 μm	90 μm	90 μm
配位数	4	5	4
金属离子载量 (/mL 填料)	15~20 μmol Ni <sup>2+</sup>	54 ~70 μmol Ni <sup>2+</sup>	15~20 μmol 金属离子
动态载量* (/mL 填料)	≥ 50 mg (His 标签蛋白)	≥ 35 mg (His 标签蛋白)	—
流速/压力关系*	1100 cm/hr (运行压力 1.5 bar)	1100 cm/hr (运行压力 1.5 bar)	1100 cm/hr (运行压力 1.5 bar)
pH 稳定性 (操作)	3~12	2~12	3~12
pH 稳定性 (CIP)	2~14	2~14	2~14
工作温度	4~35°C	4~35°C	4~35°C
耐受压力	≤ 0.3 MPa (3 bar)	≤ 0.3 MPa (3 bar)	≤ 0.3 MPa (3 bar)
化学稳定性*	稳定时间 40°C 1 周: 10 mM HCl, 0.1 M NaOH, 8 M 尿素, 6 M 盐酸胍 稳定时间 40°C 12 h: 1 M NaOH, 70%乙酸	稳定时间 40°C 1 周: 10 mM HCl 和 10 mM NaOH 稳定时间 40°C 24 h: 10 mM DTT、1 M NaOH、5 mM TCEP、20 mM β-巯基乙醇和 6 M 盐酸胍、500 mM 咪唑和 10 mM EDTA 稳定时间 40°C 2 h: 100 mM EDTA	稳定时间 40°C 1 周: 10 mM HCl, 0.1 M NaOH, 8 M 尿素, 6 M 盐酸胍 稳定时间 40°C 12 h: 1 M NaOH, 70%乙酸
运输条件	4-35°C, 保存于 20%乙醇	4-35°C, 保存于 20%乙醇	4-35°C, 保存于 20%乙醇
保存条件	具体见“九、产品储存”内容		

\*注: 1. DBC 测试方法: 线性流速为 360 cm/h, 上样液为含 5.0 mg/mL His 标签蛋白的 50 mM 磷酸盐缓冲液(pH = 8.0);

2. 流速/压力关系测试方法: 柱高: 200 mm, Operating Pressure 1.5 bar;

3. 填料分别按照表中的化学试剂及条件浸泡相应的时间后测试, 结果: 载量在原载量的 90%以上。

### 3.2 Agarosix MC90-NTA Ni 纯化应用案例

#### 3.2.1 某 His 标签蛋白样品纯化实验方案

层析柱信息: Agarosix MC90-NTA Ni (6.6 × 200 mm, CV=6.842 mL)

检测器: UV 280 nm; 样品: 某 His 标签蛋白样品; 上样量: 40 mg/mL 填料

纯化步骤	流动相	驻留时间	冲洗体积
		min	CV
平衡	50 mM PB, 250 mM NaCl, pH8.0	5	5
上样	上样液	5	—
后平衡	50 mM PB, 250 mM NaCl, pH8.0	5	5
柱冲洗	500 mM NaCl, pH8.0	5	3

洗脱	50 mM PB, 250 mM NaCl, 500 mM 咪唑, pH 8.0	5	3
平衡	50 mM PB, 250 mM NaCl, pH8.0	5	3
CIP	0.1 M NaOH	5	3

### 3.2.2 某 His 标签蛋白样品纯化结果及纯化图谱

Agarosix MC90-NTA Ni 具有高分辨率, 在纯化应用中捕获 His 标签蛋白, 纯化图谱中可观察到目标物都集中在洗脱阶段 (见图 2), 杂蛋白都在前面上样流穿和柱冲洗阶段中去除, 有效提升目标产物纯度至 92.05%, 保持高回收率 90.33%。

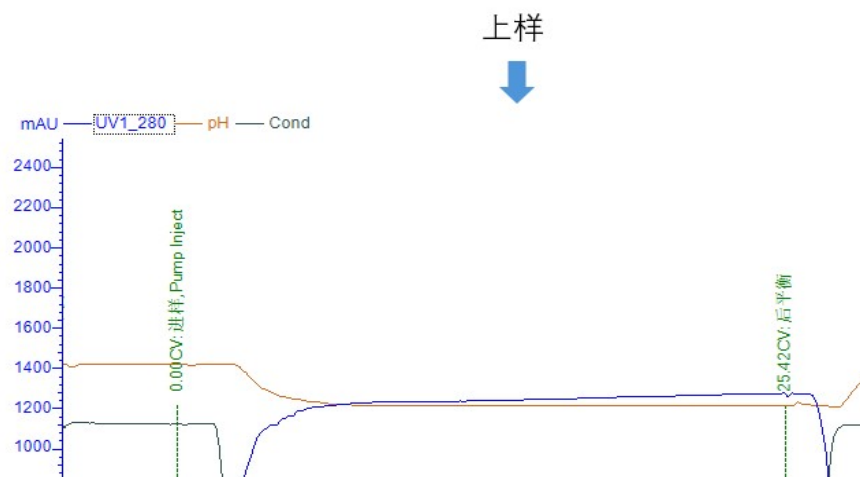


图 2. Agarosix MC90-NTA Ni 纯化某 His 标签蛋白图谱

## 3.3 Agarosix MC90-Ni Excel 纯化应用案例

### 3.3.1 某 His 标签蛋白样品纯化实验方案

层析柱信息: Agarosix MC90-Ni Excel (6.6 × 200 mm, CV=6.842 mL)

检测器: UV 280 nm; 样品: 某 His 标签蛋白样品; 上样量: 30 mg/mL 填料

纯化步骤	流动相	驻留时间	冲洗体积
		min	CV
平衡	50 mM PB, 250mM NaCl, pH8.0	5	5
上样	上样液	5	—
后平衡	50 mM PB, 250mM NaCl, pH8.0	5	5
柱冲洗	500mM NaCl, pH8.0	5	5
平衡	50 mM PB, 250mM NaCl, pH8.0	5	3
洗脱	50 mM PB, 250 mM NaCl, 500 mM 咪唑, pH 8.0	5	8
平衡	50 mM PB, 250mM NaCl, pH8.0	5	3
CIP	0.5 M NaOH	5	3

### 3.3.2 某 His 标签蛋白样品纯化结果及实验图谱

Agarosix MC90-Ni Excel 具有高分辨率, 在纯化应用中捕获 His 标签蛋白, 纯化图谱中可观察到目标物都集中在洗脱阶段 (见图 3), 杂蛋白可在上样流穿和柱冲洗阶段中去除, 有效提升目标产物纯度至 91.57%, 回收率 87.21%。

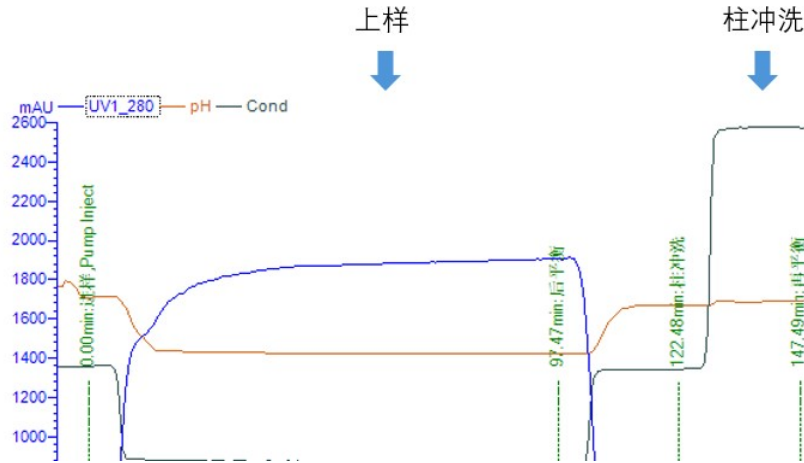


图 3. Agarosix MC90-Ni Excel 纯化 His 标签蛋白图谱

## 四、层析柱装柱

层析介质在不同场景下适用不同装柱方法，实验室装柱方法与规模化生产用装柱有较大差异。装柱与压力-流速相关，图 4 为 Agarosix MC90-Ni Excel 填料压力流速曲线，装柱时也需注意压力变化。

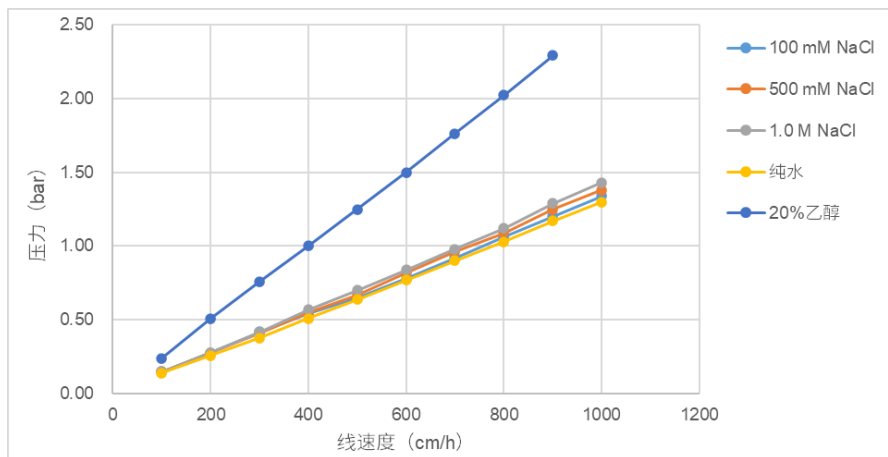


图 4. Agarosix MC90-NTA Ni 压力流速曲线

### 4.1 实验室用装柱方法（内径 ID 6.6 mm ~25 mm 实验室用层析柱）

#### 4.1.1 准备工作

4.1.1.1 装柱设备及层析柱：检查蛋白纯化仪是否正常，特别是压力检测模块和电导检测模块；

4.1.1.2 缓冲液配制：配制足量的装柱测试缓冲液 0.1 M NaCl 水溶液、1.0 M NaCl 水溶液。

#### 4.1.2 置换保存溶剂

Ni 亲和填料出厂时保存在 20%乙醇中，体积比为 50%，装柱前需将 20%乙醇置换为 0.1 M NaCl。

快速置换方法：将填料混合后取所需匀浆液倒入柱管中，安装好柱头并用 0.1 M NaCl 冲 5.0 CV，将填料打出至广口瓶中，添加 0.1 M NaCl 至填料体积比为 50 ~70%之间，也可采用沉降的方法置换保存溶剂。

#### 4.1.3 填料匀浆比测算

将置换好的填料混匀，取 20 mL 加入到玻璃柱管中，如 Generik FPLC 10 × 400 mm 玻璃柱管，打开下堵头，让水漏出，直至填料沉降高度不再变化，用直尺测量柱床高度，计算填料体积，例如柱床高度为 14 cm，填料体积则为  $14 \times 0.7854 = 10.9956$  mL，匀浆比则为 54.98%。也可用在量筒

中沉降过夜的方式测算匀浆比，沉降时间要保持在 14~16 h。

#### 4.1.4 填料需求量计算

$$V_{\text{slurry}} = V / P = S \times H \times F / P$$

V: 目标柱体积

P: 匀浆比

H: 目标装柱高度

S: 柱管横截面积

F: 压缩系数

H: 装柱高度

例如：内径为10 mm的手动柱横截面积为 $0.7854 \text{ cm}^2$ ，装柱目标高度为20 cm，则填料的需求量为 $V_{\text{slurry}} = 0.7854 \text{ cm}^2 \times 20 \text{ cm} \times 1.15 / 54.98\% = 32.9 \text{ mL}$

\*注：实验室规模、用盐水装柱条件下，填料的用量按照1.15压缩系数计算。

#### 4.1.5 具体操作步骤

4.1.5.1 用移液器吸取 32.9 mL 匀浆液，加入到 Generik FPLC 10 × 250 mm-AF 层析柱管中（使用装柱连接环）；

4.1.5.2 开启 100 cm/h 流速，将上柱头拧紧至柱管上，以 100 cm/h、200 cm/h、300 cm/h...线流速压缩填料，每级流速保持 3.0 min，直到柱压达到 3.0 bar 后保持 15 min，关闭层析系统，然后以 1:1.04 的压胶比（标记的柱床高度为基准）下降柱头至目标高度，装柱完成。

## 4.2 中试装柱方法（内径 ID 100 mm ~300 mm 手动柱填装）

### 4.2.1 准备工作

4.2.1.1 场所：装柱场所应清洁、无尘，室温 18°C ~35°C，湿度 45% ~65%；

4.2.1.2 装柱设备及管道：蛋白纯化设备及层析柱管路冲洗干净，管道连接完毕，检查设备管路是否漏液，必要时试漏，压力等各参数显示正常；

4.2.1.3 层析柱排气泡：层析柱清洗干净，排除上下筛板处气泡待用；

4.2.1.4 QC 检测设备：低压层析系统；

4.2.1.5 缓冲液配制：配制足量的装柱测试缓冲液 0.1 M NaCl 水溶液、1.0 M NaCl 水溶液。

### 4.2.2 置换保存溶剂

Ni 亲和填料出厂时保存在 20%乙醇中，体积比为 50%，装柱前需将 20%乙醇置换为 0.1 M NaCl。

对于直径为 100 mm ~300 mm 内径手动柱置换方式可以为：将填料混合后取所需匀浆液倒入柱管中，打开出口阀，使液体漏出，用 0.1 M NaCl 置换三次。

### 4.2.3 填料需求量计算

$$V_{\text{slurry}} = V / 50\% = S \times H \times F / 50\%$$

V: 目标柱体积

H: 目标装柱高度

S: 柱管横截面积

F: 压缩系数

H: 装柱高度

例如：内径为 200 mm 的手动柱横截面积为  $314 \text{ cm}^2$ ，装柱目标高度为 18 cm，则填料的需求量

为  $V_{\text{slurry}} = 314 \text{ cm}^2 \times 18 \text{ cm} \times 1.20/50\% = 13.6 \text{ L}$

**\*注：**填料保存在 20%乙醇水中，填料的用量按照 1.20 压缩系数计算。

#### 4.2.4 具体操作步骤

- 4.2.4.1 如置换保存溶剂过程中所述，重新匀浆后关好底阀使填料自然沉降，待胶面下降距离大于 5.0 cm 后安排好气泡的柱头，拧紧密封圈，打开底阀，开启低压层析系统，以 0.1 M NaCl 水溶液为流动相、100 cm/h 线速度加速填料沉降，柱床沉降稳定后标记柱床高度；
- 4.2.4.2 关闭层析系统，等柱压降为零后关闭底阀，旋转柱头上的四通阀至排液管，然后以 1:1.13 的压缩系数（标记的柱床高度为基准）下降柱头至目标高度，装柱完成；此装柱方法可保证柱压达到 2.0 bar 时柱床不塌陷。

### 4.3 生产层析柱装柱（ID 450 mm 及以上内径电动柱填装）

#### 4.3.1 准备工作

- 4.3.1.1 场所：装柱场所应清洁、无尘，室温 18°C ~35°C，湿度 45% ~65%；
- 4.3.1.2 装柱设备及管道：蛋白纯化设备及层析柱管路冲洗干净，管道连接完毕，检查设备管路是否漏液，必要时试漏，压力等各参数显示正常；
- 4.3.1.3 层析柱排气泡：层析柱清洗干净，排除上下筛板处气泡待用；
- 4.3.1.4 QC 检测设备：低压层析系统；
- 4.3.1.5 缓冲液配制：配制足量的装柱测试缓冲液 0.1 M NaCl 水溶液、1.0 M NaCl 水溶液。

#### 4.3.2 置换保存溶剂

Ni 亲和填料出厂时保存在 20%乙醇中，体积比为 50%，装柱前需将 20%乙醇置换为 0.1 M NaCl。根据以下方法计算所需填料倒入匀浆罐中，待沉降好后倒出上清，加入等体积 0.1 M NaCl，混匀后继续沉降，置换三次。

#### 4.3.3 填料需求量计算

$$V_{\text{slurry}} = V / 50\% = S \times H \times F / 50\%$$

V：目标柱体积

H：目标装柱高度

S：柱管横截面积

F：压缩系数

H：装柱高度

例如：内径为 600 mm 的手动柱横截面积为 2826 cm<sup>2</sup>，装柱目标高度为 18 cm，则填料的需求量为  $V_{\text{slurry}} = 2826 \text{ cm}^2 \times 18 \text{ cm} \times 1.20/50\% = 122 \text{ L}$

**\*注：**填料保存在 20%乙醇水中，填料的用量按照 1.20 压缩系数计算。

#### 4.3.4 具体操作步骤

排除吸胶口管道内气泡；

以 300 cm/h 线速度上抬柱头吸取所需填料；

吸胶结束后用水冲洗管道中的填料；

压胶：以 60 cm/h 线速度下降柱头压胶，当柱头下降至距离胶面 2~3 cm 时读取胶面高度，按照 1:1.12 的压胶比压紧柱床，完成装柱。

#### 4.4 柱效测试及参考评价标准

Agarosix 系列 Ni 亲和填料装柱后，层析柱柱效测试方法及评价标准可参考表 2 操作。

表 2. Agarosix 系列 Ni 亲和填料测试方法及参考评价标准

样品	1.0 M NaCl
样品体积	1.0-2.0%CV
流动相	0.1-0.5 M NaCl
流速	60-180 cm/h
检测器	Cond.
合格标准	拖尾因子：0.8-1.8； 柱效：≥ 2000 /m

#### 4.5 非理想柱效的解决办法

4.5.1 出现拖尾峰时，解决方法包括：

降低浆液浓度：降低填料在总体积占比；

提高装填流速：增加装柱最高压力。

4.5.2 出现前沿峰时，解决方法与拖尾峰相反。

4.5.3 柱效低：重装层析柱，降低测试流速。

4.5.4 峰分裂：清洗更换滤片，检查测试样品。

4.5.5 层析柱裂开：装柱时提高装柱压力，检查流动相是否脱气，连接柱头时充分排除气泡。

### 五、纯化方法优化简介

在实际纯化过程中，可能会出现以下常见问题，现对常见问题和解决方法给出建议（表 3），可根据建议查找和排除相应问题，顺利推进方法开发或者生产。

表 3. 纯化中常见问题及排查方法

常见问题	解决方法
运行过程中背压高	1、层析系统堵塞压力高：分段排查堵塞部位，或联系厂家； 2、层析柱筛板堵塞：清洗筛板或更换筛板； 3、填料孔径有污染物堵塞：执行 CIP 操作。
蛋白不挂柱	1、可能蛋白标签丢失； 2、蛋白疏水性强，标签被折叠包裹。
洗脱液中没有目标物	1、洗杂被洗掉，降低洗杂的咪唑浓度； 2、蛋白结合力太强没被洗下来，提高洗脱液咪唑浓度。
填料呈褐色	缓冲液中含有 DTT，建议 DTT 浓度降低 2mM 以下，或者用巯基乙醇替代
Ni 柱颜色变浅或发白	Ni 离子脱落，考虑再生操作

### 六、在位清洗（CIP）

CIP 的目的是去除柱子上和系统中的顽固结合的杂质、沉淀物或者变性蛋白。这些杂质的累积会影响色谱柱的性能，污染填料。严重的话，会导致柱子堵塞，增加背压。可通过正向或反向的在线清洗来恢复

层析柱的性能。常规 CIP 程序可以防止这些杂质在柱子上残留，从而保持色谱柱的载量和分离性能。

具体在线清洗方法应视杂质的特性而定：

#### 普通杂质及常规清洗：

Agarosix MC90-NTA Ni 每次实验可用 0.1 M NaOH 清洗 3-5 CV，Agarosix MC90- Ni Excel 每次实验可用 0.1-0.5 M NaOH 清洗 3-5 CV，NaOH 清洗后建议先用纯水清洗后用平衡液冲洗以快速降低 pH。

#### 疏水性杂质清洗：

可用 3-5 CV 70%乙醇或 30%异丙醇进行洗涤。若仍达不到清洗效果可用 0.5 M NaOH+30% 异丙醇强清洗条件清洗。在清洁过程中使用低流速（大约是工作流速的一半）。此外，在高盐缓冲液与有机相溶液替换时中间需要用纯化水冲洗层析柱，以避免盐析出产生沉淀。

#### 其它杂质清洗：

对于层析柱中的沉淀，可以用变性剂（如尿素或盐酸胍）洗涤，再按正常 CIP 条件清洗。

## 七、再生

### 7.1 Agarosix MC90-NTA Ni 填料再生

在实际纯化过程中，由于 Agarosix MC90-NTA Ni 在使用过程中 Ni 离子会脱落，因此使用一段时间后需要重新补充 Ni 离子，在补充 Ni 离子之前需要将填料进行脱 Ni 处理及彻底清洗，推荐工艺如下。

步骤	流动相	驻留时间 min	冲洗体积 CV
脱 Ni	0.1 M EDTA	5	3
碱洗	0.5 M NaOH	5	3
盐洗	50 mM PB+500 mM NaCl, pH7.5	5	5
上 Ni	0.1 M NiSO <sub>4</sub>	5	3
洗游离 Ni 离子	50 mM PB+200 mM NaCl+500 mM 咪唑, pH8.0	5	2
保存	10 mM NaOH	5	3

**注：**若填料上吸附的杂质比较多，在盐洗后可以配合使用有机试剂 70%乙醇或 30%异丙醇进行洗涤，或者用变性剂（如尿素或盐酸胍）洗涤。待清洗完成后，再进行后续上 Ni 步骤。

### 7.2 Agarosix MC90-Ni Excel 再生

Agarosix MC90-Ni Excel 填料可重复使用，每次使用后可以直接用 0.1-0.5 M NaOH 溶液在线清洗，无需再补充二价镍离子。

## 八、灭菌

由于 20%乙醇保存液不具有杀菌、除热原作用，建议层析柱在使用前及使用过程中，可以采用 0.1-0.5 M NaOH 处理 0.5 h 以减少微生物污染风险。

## 九、产品储存

产品用 20%乙醇为保存液进行保存运输。收到填料后请按以下条件进行保存：

未拆封填料：4-35°C，整个包装桶密闭保存，有效期 60 个月；



使用后填料：

1) 层析柱保存：4-35°C，20%乙醇冲洗 3-5 CV 后密闭保存，为了防止乙醇挥发以及微生物滋生，建议每两个月更换一次新鲜的保存液。因有机溶剂、碱、纯化水等对层析柱管材质可能存在影响且层析柱长期保存柱床容易干裂，不建议长期将填料放在层析柱中保存；

2) 层析柱拆卸后填料：拆卸前层析柱需经过常规的再生及灭菌处理步骤，无菌注射用水冲洗 3-5 CV，用保存溶液 20%乙醇冲洗 3-5 CV，取出层析填料置于已经清洗干净并消毒后的包装容器中，加入保存液 20%乙醇使保存液体积与填料体积接近，4-35°C密闭保存。

## 十、销毁及回收

由于 Ni 亲和填料产品在自然界很难降解，为了保护环境建议采用焚烧处理或者第三方委外处理。

## 十一、产品订购信息

产品名称	类型	粒径	订货号
Agarosix MC90-NTA Ni	螯合 Ni 离子型	90 μm	251390990
Agarosix MC90-NTA CA	游离酸型	90 μm	252290990
Agaroisx MC90-Ni Excel	螯合 Ni 离子型	90 μm	251590990

预装柱规格：4.2 mL、5.0 mL；层析介质包装规格：1.0 L、5.0 L、10 L、50 L。



扫码关注公众号

### 公司信息：

苏州赛分科技股份有限公司

联系电话：400-636-8880

官网网站：<http://www.sepax-tech.com.cn/>