

Protein A Nanorose 4FF

产品名称	货号	规格
Protein A Nanorose 4FF 亲和层析介质	NG-BR0012	5mL
		10mL
		25 mL
		100 mL
Protein A Nanorose 4FF 预装重力柱	NG-GC0012	1mL
Protein A Nanorose 4FF 预装层析柱	NG-PC0012	1mL
		4.7mL
		5mL

本说明书适用于以上三种产品：

Protein A Nanorose 4FF 亲和层析介质 — 散装填料，适用于自行装柱/放大验证。

Protein A Nanorose 4FF 预装重力柱 — 免装柱，适合小试/捕获/教学与方法开发。

Protein A Nanorose 4FF 预装层析柱 — 免装柱，直接上系统用于常规纯化。

01 产品简介

Protein A Nanorose 4FF 是一款将 Protein A 配基定向偶联固定在高度交联的 4%琼脂糖凝胶基质上，利用蛋白 A 和 Fc 片段特异性结合的特点进行纯化，广泛应用于单抗、双抗和 Fc 融合蛋白纯化的捕获步骤。

02. 技术参数

表 1 产品参数表

名称	性能
层析介质类型	亲和层析介质
配基	Protein A
基架	高度交联的 4%琼脂糖
平均粒径	~90 μm
动态载量	> 50 mg IgG1 / mL 层析介质 *
最大流速	500 cm/h
耐压	0.3MPa
使用温度	4-40 °C

*注：动态载量的测量条件：装柱高度：10 cm，保留时间 6min，测试缓冲液：0.02M NaH₂PO₄ 溶液，0.15M NaCl, pH7.4，当 IgG 的穿透量达到 10% 时，单位介质体积(mL) 的 IgG1 上样量(mg)

03 化学稳定性

表 2 化学耐受性表

耐受类别	耐受范围及表现
pH 稳定性	工作 pH 3.0~12.0 (40°C放置 7 天, 其理化性质和功能没有明显变化)
试剂兼容性	常用水相缓冲液, 6 M 盐酸胍, 8 M 尿素, 70%乙醇, 30%异丙醇

04 纯化流程

4.1 前期准备

装柱所需用品 (装填层析柱所需用品)

1. 层析介质: Protein A Nanorose 4FF
2. 层析空柱: 实验室规模层析空柱及装柱器
3. 所需溶液: 装柱溶液 0.4 M NaCl 或纯化水; 排气溶液同上
4. 装柱工具: 砂芯漏斗、搅拌棒、量筒等

纯化用品准备

1. 平衡/结合/洗杂缓冲液: 20 mM 磷酸钠、150 mM NaCl, pH 7.2
2. 洗脱缓冲液: 0.1 M 柠檬酸钠, pH 3.0~3.6
3. 上柱前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值, 可以用平衡缓冲液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释, 或者样品用平衡缓冲液透析。样品在上样前建议离心或用 0.22 或 0.45 μm 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

4.2 重力柱装填与纯化

重力柱装填 (购买散装填料可参考本流程装填重力柱)

1. 取合适规格的重力层析柱, 装入下垫片, 加入适量纯水润洗柱管和垫片, 关闭下出口。
2. 将 Protein A Nanorose 4FF 混合均匀, 用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中 (介质实际体积占悬液的一半), 打开下出口流干保护液。
3. 加入适量纯水冲洗介质, 待柱管中液体重力流干后, 关闭下出口。
4. 装入润洗后的上垫片, 确保垫片与填料之前没有空隙, 且保持水平。
5. 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡, 暂不使用时则加入保护液, 4-30°C 保存。

重力柱纯化 (重力柱纯化的参考流程)

1. 平衡: 使用 5 倍柱体积的平衡缓冲液对装填好的 Protein A Nanorose 4FF 重力柱进行平衡。此过程应重复 2 至 3 次, 确保填料完全处于与目的蛋白一致的缓冲液环境中。
2. 上样: 将样品加入已平衡的重力柱, 控制流速确保样品在柱内的保留时间不少于 2 分钟, 以保证与填料的充分接触。收集流穿液, 为提升结合效率, 可进行反复上样。
3. 洗杂: 使用 10 至 15 倍柱体积的洗杂缓冲液进行清洗, 以去除非特异性吸附的杂蛋白, 此过程中需收集洗杂液。
4. 洗脱: 采用降低 pH 进行洗脱。建议采用分段收集 (如每 1 个柱体积收集一管) 并分别检测, 此举既能确保目的蛋白被完全洗脱, 也有助于获得高纯度与高浓度的样品。
5. 再平衡: 用平衡缓冲液再次平衡层析柱。

4.3 层析柱的装填与纯化

层析柱的装填（购买散装填料可参考本流程装填层析柱）

装柱前的准备：

1. 计算所需介质体积：

$V_m = \text{柱横截面积} \times \text{计划柱床高度} \times \text{介质压缩比}$ ；

建议压缩比：纯化水：1.15；0.4 M NaCl：1.10。

2. 介质置换：用约 3 倍体积的装柱溶液清洗、抽滤，将介质完全置换到装柱溶液中。

3. 制备 50% 胶悬液；为获得准确体积，可沉降过夜或低速离心（3000 rpm，5 min）后量取。

4. 检查空柱：干净、无漏液。

装柱

1. 用装柱溶液为柱底滤膜排气；随后封闭柱底并加入少量装柱溶液覆盖柱底。

2. 调整层析柱至垂直；连接柱头，以 ~5 mL/min 低流速为柱头滤膜排气。

3. 轻轻搅拌均匀胶悬液，一次性缓慢倒入空柱中（胶悬超出柱容积时，可用装柱器或接延长管）。

4. 放入排气后的柱头并贴合液面，排尽气泡后拧紧密封圈。

5. 恒流装柱：~300 cm/h 压紧柱床（压力 ≤ 0.3 MPa）；或恒压装柱：将压力控制在 ≤ 0.15 MPa。

6. 柱床稳定后标记胶面高度，停泵将柱头下压至标记以下 3–5 mm，再启动流速；若胶面不再下降，即装柱完成。

7. 建议工作流速 $\leq$ 装柱流速的 75%。

表 3 不同规格层析柱流速换算表

线速度(cm/h)	10 mm (mL/min)	16 mm (mL/min)	26 mm (mL/min)	50 mm (mL/min)
150	2	5	13.3	49.1
200	2.6	6.7	17.7	65.4
300	3.9	10	26.5	98.1

柱效测定

选择 所示的两种测试方法中的一种进行柱效测试。使用流动相平衡层析柱至基线平稳，将样品加载到层析柱中，继续使用流动相进行冲洗，待色谱峰出完至回到基线后，结束运行，对色谱峰进行积分，评价装柱果。

表 4 两种柱效测定方法

项目	丙酮法	NaCl 法
样品	1% (v/v) 丙酮水溶液	2 M NaCl 水溶液
样品体积	1% 柱体积	1% 柱体积
流动相	水	0.2 M NaCl 水溶液
流速	30 cm/h	30 cm/h

项目	丙酮法	NaCl 法
检测器	UV 280 nm	电导率

柱效评价的主要指标：塔板数 N/m 与不对称因子 As 。其计算方式：

$$N/m = 5.54 \times (V^R / W_h)^2 \times 1/L$$

$$As = b / a$$

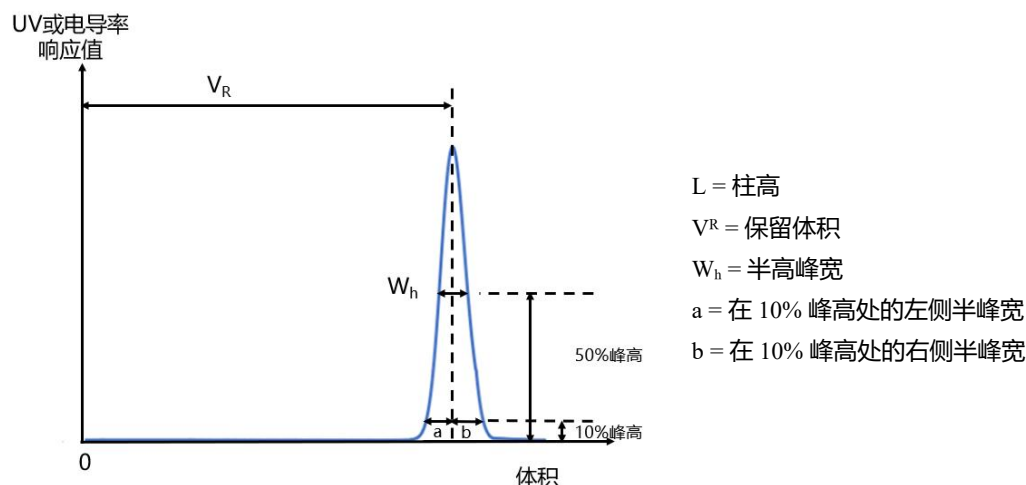


图 5 标准柱效测试色谱图

柱效评估标准

1. 柱效良好的层析柱，其理论塔板高度 HETP 的数值应小于介质平均颗粒大小的三倍；
2. 检测峰形必须对称，非对称因子数值 As 应在 0.8~1.8 之间，越接近 1 柱效越好；
3. 如柱效检测不达标，则需重新装柱。

层析法纯化（层析柱纯化的参考流程）

Protein A Nanorose 4FF 装填后，可适配各类常规中低压色谱系统。

1. 将泵管道注满去离子水。取下层析柱上塞，将其连接至色谱系统，打开下出口并旋紧。
2. 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗，以置换出填料中的储存缓冲液。
3. 平衡：使用至少 5 倍柱体积的平衡液对色谱柱进行平衡。
4. 上样：根据小试实验测得的结合载量，确定样品的上样体积和上样量。
5. 洗杂：使用洗杂液冲洗柱子，直至紫外吸收信号稳定于基线水平。
6. 洗脱：采用降低 pH 进行洗脱。
7. 再平衡：用平衡缓冲液再次平衡层析柱。

05 清洗与再生 (CIP)

随使用次数增加，脂质、内毒素、蛋白质等污染物会在层析柱上逐渐累积。为维持柱性能并延长其使用寿命，建议定期执行以下在位清洗流程：

1. 使用 3 倍柱体积的平衡液冲洗层析柱。
2. 使用 3 倍柱体积的 1 M 醋酸 (HAC) 对层析柱进行再生处理。
3. 使用至少 2 倍柱体积的 0.1 M NaOH 溶液冲洗层析柱。此外，建议每间隔 10 个纯化批次后，使用 0.5 M NaOH 溶液进行强化清洗。
4. 最后，使用至少 5 倍柱体积的平衡缓冲液充分冲洗层析柱，以彻底去除清洗剂。

后续的灭菌与储存条件：可采用 0.5 M NaOH 作用 15–30 分钟；若为已装填的层析柱，可使用 20% 乙醇或 2% 苯甲醇作为保存液，并于 2–8 °C 条件下储存。

06 常见问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	筛板堵塞	清洗筛板或直接更换新筛板。
	填料堵塞	按第 5 部分执行树脂 CIP 清洗，恢复通透性。
	裂解液含微粒	上柱前以 0.22 或 0.45 μm 滤膜过滤，或离心去除悬浮颗粒。
纯化过程中曲线不稳定	样品/缓冲液夹带气泡	排除柱内气泡；必要时对样品与缓冲液脱气。
洗脱组分无目的蛋白	样品中抗体浓度偏低	选用以其抗原为配体的亲和介质进行捕获。
	抗体发生降解	适度提高洗脱阶段的 pH（按工艺窗口），以改善结合/洗脱。
回收率逐步下降	上样量过大	降低上样量，避免超载。
	柱床鼓胀（“大肚”），有效载量下降	按第 5 部分进行树脂 CIP 清洗以恢复柱效。

注意：本产品仅供科研使用 (RUO)，不得用于人体诊断或治疗。