

## DEAE Nanorose FF

产品名称	货号	规格
DEAE Nanorose FF 强阳离子交换层析介质	NG-BR0006	5mL
		10mL
		25 mL
		100 mL
		500 mL
		1 L
DEAE Nanorose FF 预装重力柱	NG-GC0006	1mL
DEAE Nanorose FF 预装层析柱	NG-PC0006	1mL
		4.7mL
		5mL

本说明书适用于以上三种产品：

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

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

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

### 01 产品简介

DEAE Nanorose FF 是基于高度交联琼脂糖的弱阴离子交换层析介质，表面配基为二乙氨基乙基（DEAE）。在适当的 pH/离子强度下，可与带负电荷的分子（蛋白在 pI 以上、核酸、病毒/类病毒颗粒、多糖等）发生可逆静电吸附，通过盐梯度或 pH 调整实现分离纯化。

#### 产品优势：

1. 放大友好·高通量：高度交联琼脂糖骨架刚性强、压降低，允许较高线速度与更大处理量，在低反压下提高产能。
2. 选择性可调·温和洗脱：弱阴离子交换特性带来更柔和的洗脱条件与更强的方法可塑性，有利于活性与结构完整性。
3. 化学相容性广：配基与基质经优化化学修饰，对常见缓冲体系与 NaOH 等 CIP 清洗具有良好耐受，支持长期复用。

### 02. 技术参数

表 1 产品参数表

名称	性能
层析介质类型	弱阴离子交换层析介质
配基	-O-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> H
基架	高度交联琼脂糖

名称	性能
平均粒径	~90 $\mu\text{m}$
离子载量	0.11-0.16 mmol Cl <sup>-</sup> / ml 层析介质
动态载量	>90 mg 溶菌酶/ ml 层析介质*
推荐使用流速	300~600 cm/h
最大流速	700 cm/h
耐压	0.3 MPa
使用温度	4-30 $^{\circ}\text{C}$

\* 动态载量的测量条件：装柱高度：10 cm，测试流速 300 cm/h，测试缓冲液：0.05M Tris-HCl 溶液，pH8.0，测试样品：6mg/ml 的卵清蛋白样品，当卵清蛋白的穿透量达到 10%时，单位介质体积(ml)的卵清蛋白上样量(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	pH 2.0~14.0, (40 $^{\circ}\text{C}$ 放置 7 天, 其理化性质和功能没有明显变化)
试剂兼容性	常见水溶液、30% 异丙醇、75% 乙醇、1M NaOH、1M 乙酸、6M 盐酸胍、8M 尿素
不耐受	氧化剂、阴离子去垢剂

### 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：DEAE Nanorose FF
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

#### 1. 缓冲液选择

原则：选用与介质不发生特异相互作用的缓冲体系与盐。

结合—洗脱模式

平衡缓冲液：低盐 (电导 < 5 mS/cm) + 低 pH (通常低于目标分子等电点约 1 个 pH 单位)，以利于目标分子结合；同时需验证样品在该条件下的稳定性。

洗脱缓冲液：在平衡缓冲液基础上加入高盐 (例如 1.0 M NaCl)。

## 流穿模式

平衡缓冲液：设置为有利于杂质结合、目标分子流穿的条件。

操作：待目标分子完全流穿后，直接以高盐溶液冲洗柱床以移除结合杂质。

## 2. 流速

根据柱床高度与装柱质量，通常建议线性流速 300–600 cm/h。

实际流速应依据系统允许压差 ( $\Delta P$ )、柱效与产物回收/活性进行优化与确认。

- 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 0.45  $\mu\text{m}$  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)

- 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。
- 将 DEAE Nanorose FF 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。
- 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。
- 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。
- 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)

- 平衡：使用 5 倍柱体积的平衡缓冲液对装填好的 Q Nanorose FF 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。
- 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。
- 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。
- 洗脱：洗脱可通过提高盐离子浓度实现，可采用线性梯度或阶梯梯度逐步升高盐度，使不同结合强度的分子依次洗脱；对洗脱峰进行分段收集。亦可选择 pH 梯度洗脱或混合式洗脱。
- 再生：用含有高盐缓冲液 (如 2M NaCl) 冲洗层析柱。
- 再平衡：用平衡缓冲液再次平衡层析柱。

## 4.3 层析柱装填与纯化

### 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：

- 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：1.15。

- 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 50-60% 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. 用纯化水为柱底滤膜排气；随后封闭柱底并加入少量纯化水覆盖柱底。
2. 调整层析柱至垂直；连接柱头，以 ~5 mL/min 低流速用纯化水为柱头滤膜排气。
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. 启动系统泵，调整流速至 600 cm/h，使用液流压紧柱床。期间要控制压力不能超过 0.3 MPa。如超压，需要降低流速。
6. 柱床稳定后标记胶面高度，停泵将柱头下压至标记以下 2-3 mm，重新给予 600 cm/h 的流速；若胶面不再下降，即装柱完成。若下降，重复该步骤。

表 3 不同规格层析柱流速换算表

线性流速(cm/h)	10 mm (ml/min)	16 mm (ml/min)	26 mm (ml/min)	50 mm (ml/min)
60	0.8	2	5.3	19.6
100	1.3	3.3	8.8	32.7
150	2	5	13.3	49.1
200	2.6	6.7	17.7	65.4
300	3.9	10	26.5	98.1
600	7.9	20.1	53.1	196.3

### 柱效测定

选择以下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
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  $A_s$ 。其计算方式：

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

$$A_s = b / a$$

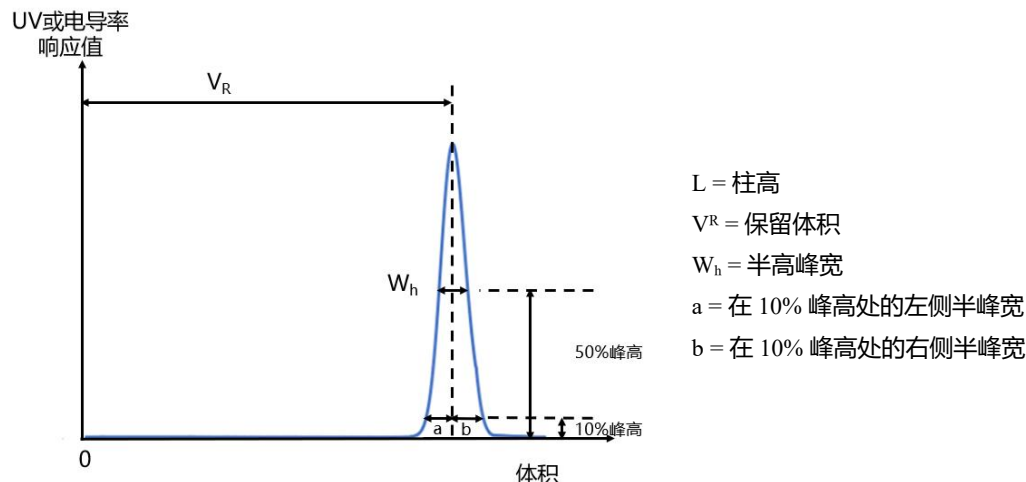


图 5 标准柱效测试色谱图

### 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  $A_s$  应在 0.8~1.5 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）

Q Nanorose FF 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，确定样品在 DEAE Nanorose FF 上的上样体积和上样量。
5. 洗杂\*：使用平衡缓冲液冲洗柱子，直至紫外吸收信号稳定于基线水平，此过程通常需要 10-15 倍柱体积。
6. 洗脱\*：可通过提高盐离子浓度实现，可采用线性梯度或阶梯梯度逐步升高盐度，使不同结合强度的分子依次洗脱；对洗脱峰进行分段收集。亦可选择 pH 梯度洗脱或混合式洗脱。
7. 再生：用含有高盐缓冲液（如 2M NaCl）冲洗层析柱。
8. 再平衡：用平衡缓冲液再次平衡层析柱。

\* 若采用流穿模式，“上样”步骤就应设置收集；“洗杂”步骤，确保目标分子全部流穿后，即可停止收集；“洗脱”步骤，直接用高盐缓冲液将杂质洗脱干净即可。

### 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，对于不同类型的杂质和污染物。建议清晰条件如下：

1. 结合力较强蛋白的去除  
用 2 M NaCl 溶液柱体积清洗；

亦可使用 pH 不低于 2 的高盐缓冲液（例如 1 M 醋酸钠 NaAc 溶液）进行清洗。

2. 强疏水性蛋白或沉淀蛋白的去除

先以 1 M NaOH 溶液 5 倍柱体积清洗；  
随后以纯化水 5–10 倍柱体积彻底冲洗，确保碱液清除干净。

3. 脂蛋白及脂类物质的去除

先以 70% 乙醇 或 30% 异丙醇 5 倍柱体积清洗；  
再以纯化水 5–10 倍柱体积冲洗至无残留溶剂。

注：70% 乙醇或 30% 异丙醇使用前应进行脱气处理；在位清洗过程中流速可选择 30-60 cm/h；堵塞严重的时候可以采用反向清洗。  
后续的灭菌与储存条件：可采用 0.5-1 M NaOH 作用 15–30 分钟；若为已装填的层析柱，可使用 20% 乙醇作为保存液，并于 4–30°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
柱子反压偏高	填料可能被堵塞	按照第 5 部分进行树脂清洗。
	裂解液中含有微小颗粒	上柱前用 0.45 μm 滤膜过滤，或离心去除杂质。
洗脱样品较杂	树脂重复使用次数过多	按第 5 部分清洗树脂，或更换新树脂。
	洗涤不充分	增加洗涤液体积，确保充分平衡与洗涤。
	样品带电性能相似	优化洗脱条件（如调整盐浓度/梯度、pH 等）。

**注意：本产品仅供科研使用（RUO），不得用于人体诊断或治疗。**