

## Heparin Nanorose FF

产品名称	货号	规格
Heparin Nanorose FF 亲和层析介质	NG-BR0018	5mL
		10mL
		25 mL
		100 mL
		500 mL
		1 L
Heparin Nanorose FF 预装重力柱	NG-GC0018	1mL
Heparin Nanorose FF 预装层析柱	NG-PC0018	1mL
		4.7mL
		5mL

本说明书适用于以上三种产品：

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

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

Heparin 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

Heparin Nanorose FF 是一款将肝素（天然糖胺聚糖）共价偶联到琼脂糖基架上的亲和层析介质。肝素可与多类生物分子发生特异/准特异性相互作用，并在适当条件下表现出阴离子交换样选择性，适用于在温和条件下对多种靶分子进行捕获与纯化。典型应用包括：凝血因子、抗凝血酶 III、生长因子、干扰素、脂蛋白脂肪酶，以及核酸与类固醇受体相关的酶/复合物等。

### 特点

双重机理，覆盖面广：兼具肝素亲和识别与阴离子交换属性，一种介质适配多种分子与样本类型。

温和洗脱，活性更佳：常用盐梯度或轻度 pH 变化即可洗脱，利于保持蛋白活性与结构。

高效工艺表现：琼脂糖球形基质，压降低、流速高、装柱稳定，适合从开发到放大生产。

### 02. 技术参数

表 1 产品参数表

名称	性能
层析介质类型	肝素亲和层析介质
配基	肝素
基架	高度交联琼脂糖
平均粒径	~90 μm
配基密度	~2mg 肝素/ml 层析介质

名称	性能
推荐使用流速	90-300 cm/h
最大流速	400 cm/h
耐压	0.3 MPa
使用温度	4-30 °C

### 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	4~13 (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	常见水溶液、4 M NaCl、0.1 M NaOH、0.05 M 醋酸钠(pH4)、6 M 盐酸胍、8 M 尿素、70%乙醇

### 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: Heparin 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

##### 纯化用品准备

1. 平衡/结合/洗杂缓冲液: 0.02-0.05 M PB 或 Tris, pH7.0-8.0, 可以加入 0.15 M NaCl 降低非 特异吸附。
2. 洗脱缓冲液: 0.02-0.05 M PB 或 Tris, 1-2 M NaCl, pH7.0-8.0。
3. 流速: 根据柱床的高度一般选用 90-300 cm/h 的 线性流速。
4. 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  $\mu\text{m}$  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)

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 Heparin 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。
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℃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 Heparin 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。
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：洗脱是通过增加盐离子浓度实现的，可以通过 线性梯度或者步级梯度，逐渐增加洗脱液中的盐离子浓度，将不同结合强度的分子洗脱下来。
5. 再生：用含有高盐缓冲液(如 2 M NaCl)冲洗层析柱。
6. 再平衡：用 10 倍柱体积的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：1.15

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 50-70 % 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 300 cm/h，使用液流压紧柱床。期间要控制压力不能超过 0.3MPa。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 300 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。
7. 建议工作流速 ≤ 装柱流速的 75%。

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

线性流速(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
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	0.4 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  $As$ 。其计算方式：

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

$$As = b / a$$

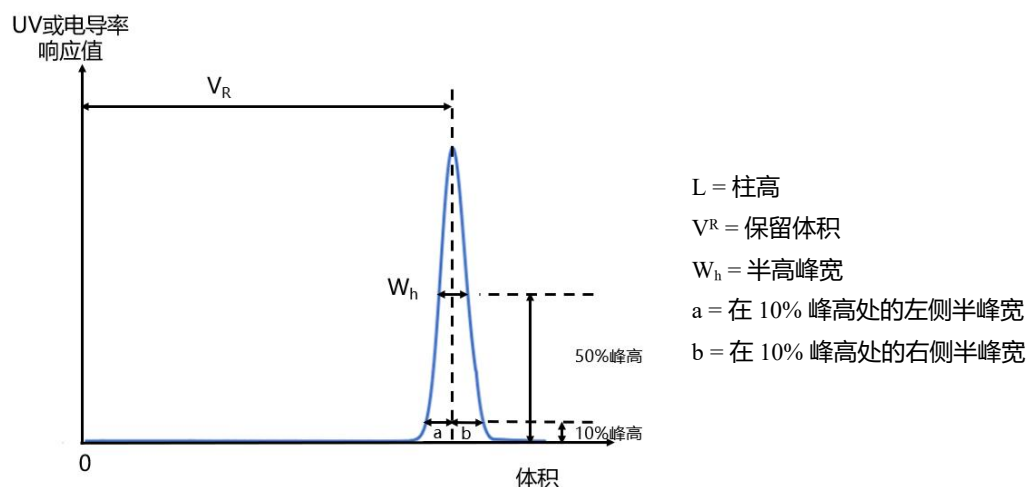


图 5 标准柱效测试色谱图

### 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 0.8~1.5 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）

Heparin 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 Heparin Nanorose FF 上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，此过程通常需要 10-15 倍柱体积。
7. 洗脱：洗脱是通过增加盐离子浓度实现的，可以通过 线性梯度或者步级梯度，逐渐增加洗脱液中的盐离子浓度，将不同结合强度的分子洗脱下来。
8. 再生：用含有高盐缓冲液(如 2 M NaCl)冲洗层析柱。
9. 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. 强结合蛋白：约使用 5 倍柱体积 2 M NaCl 清洗
2. 变性/沉淀蛋白：先用 0.1 M NaOH 清洗（约 5 倍柱床体积），再用纯化水冲至中性（约 5-10 倍）；也可改用 6 M 盐酸胍或 8 M 尿素

疏水/脂类与通用条件：用 0.1-0.5% 非离子去污剂清洗后，再以纯化水充分冲净（约 5-10 倍）；清洗线速度建议 30-60 cm/h，堵塞时可短时反向清洗

后续的灭菌与储存条件：可采用 0.1M NaOH 的 20%乙醇溶液处理 1 小时；若为已装填的层析柱，可使用 20% 乙醇浸泡，再关闭上下柱头，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 $\mu\text{m}$ 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。**