

Protein G Nanorose 4FF

产品名称	货号	规格
Protein G Nanorose 4FF 亲和层析介质	NG-BR0014	5mL
		10mL
		25 mL
		100 mL
		500 mL
		1 L
Protein G Nanorose 4FF 预装重力柱	NG-GC0014	1mL
Protein G Nanorose 4FF 预装层析柱	NG-PC0014	1mL
		4.7mL
		5mL

本说明书适用于以上三种产品：

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

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

Protein G 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 G Nanorose 4FF 是一款通过 CNBr 活化将 Protein G 定向偶联至琼脂糖基架的亲和层析介质，专用于多物种 IgG 的高效捕获与纯化。Protein G 可与 IgG 的 Fc 区域高亲和结合，并对 Fab 区域具有一定弱亲和力；相比 Protein A，具备更宽广的物种/亚类结合谱。该介质适用于从细胞培养上清、血清等不同类型样品中纯化整分子 IgG 以及其片段，并可用于免疫复合物的分离。

产品优势：

结合谱更广：覆盖多种哺乳动物 IgG 与若干亚类，适配性优。

捕获效率高：Fc 定向识别，非特异背景低，洗脱峰集中。

对分子友好：温和洗脱条件可有效保护抗体活性与结构。

工艺兼容性好：适用于常见缓冲体系与上游样品基质，便于工艺放大。

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 G(E.coli 重组表达)
基架	高度交联的 4%琼脂糖
平均粒径	~90 μm

名称	性能
配基密度	~ 2 mg Protein G / ml 层析介质
动态载量	≥20 mg 人 IgG / ml 层析介质*
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

* 动态载量的测量条件：装柱高度：10cm，测试流速 200 cm/h，测试缓冲液：0.02M NaH₂PO₄ 溶液，pH 7.0，测试样品：2mg/ml 的人 IgG 样品，当 IgG 的穿透量达到 10%时，单位介质体积(ml)的 IgG 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	3.0~9 (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、30%异丙醇、75%乙醇、6M 盐酸胍、8M 尿素

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 G 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 20%溶液；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：0.1 M 柠檬酸钠，pH 2.5-3.0
3. 中和液：1M Tris-HCl，pH 9
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 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 G 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℃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 G 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 的方式进行洗脱。为保护产物，洗脱组分应立即用中和缓冲液进行中和。建议按每 1 mL 洗脱液加入 60–200 μL 中和液的比例加入，具体体积可根据目标 pH 微调。
5. 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% 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 20%乙醇为柱底滤膜排气；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. 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 3–5 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。
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
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：

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

$$As = b / a$$

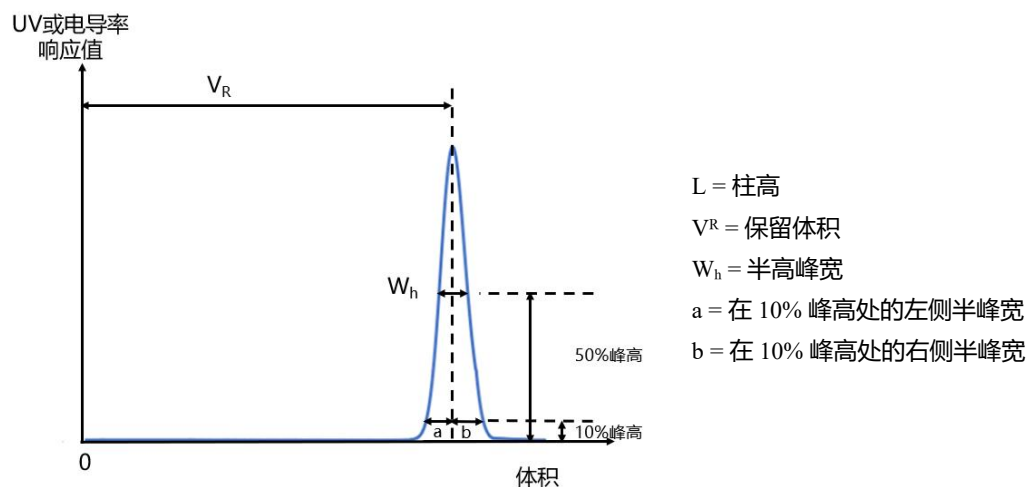


图 5 标准柱效测试色谱图

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 A_s 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 G 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，确定样品在 Protein G Nanorose 4FF 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。
6. 洗脱：采用降低 pH 的方式进行洗脱。为保护产物，洗脱组分应立即用中和缓冲液进行中和。建议按每 1 mL 洗脱液加入 60–200 μ L 中和液的比例加入，具体体积可根据目标 pH 微调。
7. 再平衡：用 10 倍柱体积的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：

去除强疏水蛋白、脂蛋白和脂质等，可用 0.1% 非离子型去垢剂在 37°C 下处理，接触时间为 1 min，然后用至少 5 个柱体积的结合液冲洗。

也可使用 70% 乙醇浸泡 12 h 去除脂类物质，然后用至少 5 个柱体积的结合液冲洗。

后续的灭菌与储存条件：可采用 20% 乙醇作用 6h 以上；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 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 μ 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。