

---

# NM90Agarose Heparin

Protein A 亲和层析介质

## 产品使用说明书

文件编号：NM-W-DF-0602

版本号：A1



# NM90Agarose Heparin

## 亲和层析介质

肝素是一种线性且高度硫酸化的糖胺聚糖，具有抗凝特性。肝素由于其多阴离子性质，可与多种生物分子相互作用，包括血浆凝结蛋白，脂蛋白脂肪酶，胶原酶和 DNA 聚合酶。键合了肝素配基的层析介质被广泛用作亲和层析吸附剂来纯化上述生物物质。NM90Agarose Heparin 是纳微科技以琼脂糖为基质开发出的肝素亲和填料，它采用了特殊的键合技术偶联高纯度肝素钠配基，具有优异的结合载量，而且配基脱落低、非特异性吸附少、宿主蛋白衍生杂质少，主要用于凝血酶 III、凝血因子、脂蛋白、酯酶、激素和干扰素等的亲和层析分离纯化。

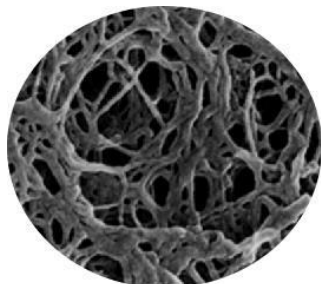


图 1. NM90Agarose Heparin 亲和层析介质电镜图。

表 1. 纳微科技 NAb® Protein A 亲和层析介质技术参数

产品型号	NM90Agarose Heparin
分离原理	肝素亲和
基质	琼脂糖
粒径	90 μm
动态结合载量*	~ 5 mg·mL <sup>-1</sup> (抗凝血酶 III)
最大耐压	0.3 MPa
CIP 在位清洗	2 M NaCl
推荐流速	100-500 cm/h
pH 稳定性	4~12
化学稳定性	在常用水溶性缓冲液 (0.1 M NaOH、0.05 M 乙酸钠、8 M 尿素、6M 盐酸胍、非离子型去污剂、10% 甘油) 中保持稳定。

使用温度	2-40 °C
存储	20% 乙醇, 4-25 °C

## 操作指南

### 匀浆浓度测定

NMab® Pro亲和层析介质保存在20%乙醇溶液装瓶出售, 匀浆浓度(Cs)大约65% (v/v)。匀浆液浓度是指层析介质恒定沉降体积与匀浆液的总体积的比值。如需准确测定 Cs, 可以将原容器内介质摇匀, 然后转移10mL 匀浆到量筒里静置过夜, 读出沉降体积 Vr, 计算匀浆浓度:

$$\text{Eq. 1 } C_s (\%) = 100 \times (V_r/10) = 10 V_r$$

为了获取最佳的装柱效果, 推荐使用0.5 M NaCl 溶液配制50~70%的介质匀浆液。

## 介质前处理

计算所装色谱柱的柱体积 (Vc) :

$$\text{Eq. 2 } V_c = h \times \pi r^2$$

h: 色谱层析柱高度; r: 色谱层析柱半径

计算所需匀浆体积 (Vs): 一般情况下, 层析介质在压力作用下都会被压紧导致体积收缩, 为了获得紧密的柱床, 推荐填料的体积过量一些, 压缩比 (Compression factor, CF) 一般为1.15-1.2。

$$\text{Eq. 3 } V_s = 100 \times (V_c \times CF)/C_s$$

制备装柱介质匀浆: 将原容器中层析介质摇匀, 量取所需原液体积 Vs 至适当容器中, 静置让介质颗粒自然沉降后, 倾斜倒去上清液; 用5倍柱体积以上的装柱溶液, 如0.5 M NaCl, 清洗介质以去除原保存液, 再用装柱溶液调整匀浆浓度到50-70% (v/v)。

## 层析柱装填方法: (以 NmXK 16/20 层析空柱为例)

使用装柱溶液快速冲洗柱子末端的接头以除去气泡, 然后关闭柱子出口, 并在柱子底部保留1-2 cm 装柱液。

用装柱溶液排除上柱头管路中的气泡。

重悬介质, 用玻璃棒紧靠柱内壁引流, 将胶悬液连续倒入层析柱中, 用装柱溶液清洗柱壁并填满柱管, 然后安装上柱头。注意操作过程中避免混入气泡。

打开柱子底部的出口, 开动层析系统泵, 在建议压力范围内用恒流或恒压方法进行压柱。待柱床稳定后, 在胶液界面作标记。

关闭泵和柱子出口, 旋松上柱头入口管线, 用上柱头推压柱床至标记线下2-3 mm, 然后旋紧上柱头入口管线。

## 柱效评价

装好的层析柱先使用2 CV 0.5 M NaCl 溶液平衡, 再用2.0 M NaCl 以100 cm/h 流速进行柱效测试; 亦可使用去离子水平衡层析柱并用丙酮溶液做测试。具体测试参数详见表1:

表 2. NM90Agarose Heparin 层析色谱柱的柱效测试条件。

样品	5% (v/v)丙酮的水溶液或2 M NaCl
上样量	1 ~ 5 %柱体积
流动相	去离子水或0.5 M NaCl
线性流速	50 ~ 200 cm/h
检测	5 %丙酮上样: UV @ 280 nm 2 M NaCl 上样: 电导检测仪
合格标准	As: 0.8-1.5; Plates (N/m) : >2500

## 使用方法

### 吸附结合

NM90Agarose Heparin 主要用作亲合层析介质纯化凝血因子或核酸结合蛋白。不同生物分子和 NM90Agarose Heparin 的亲合力可能不同。它们的结合能力也将取决于层析条件, 例如缓冲液组成、pH、流速和温度。另外, 由于肝素配基具有带负电荷的硫酸根和羧酸根, NM90Agarose Heparin 也可能以阳离子交换作用与蛋白结合。NM90Agarose Heparin 在血浆蛋白纯化应用时, 结合缓冲液通常是10-20 mM 柠檬酸钠缓冲液, pH 7.4。与血浆蛋白的结合是亲和作用, 因此建议在结合缓冲液中加入低浓度的 NaCl 以消除非特异性离子相互作用。在其他应用中, 建议用pH7.0的10 mM 磷酸钠, pH7.0或者20 mM 的 Tris-HCl, pH8.0 作为结合缓冲液。

### 吸附洗脱

洗脱通常通过增加缓冲液离子强度来进行, 可使用连续线性梯度洗脱或阶梯梯度洗脱。最常用的洗脱缓冲液是 NaCl、KCl 或硫酸氨, 浓度最高可达1.5-2M。

### 清洗再生

定期 CIP 在位清洗可以防止污染物在介质柱床上堆积, 并有助于维持 NM90Agarose Heparin 肝素亲合的载量, 流动性和一般性能。NM90Agarose Heparin 可用0.1 M NaOH 作为 CIP 清洗液。不建议使用过高浓度的 NaOH 清洗否则会导致介质功能下降、载量变低。其中能保持介质稳定性的 CIP 清洗液有8 M 尿素和6 M 盐酸胍。

推荐 CIP 清洗程, 如下:

离子吸附蛋白：

1 CV 2 M NaCl, 10-15 min;

沉淀或变性蛋白：

2-4 CV 0.1M 氢氧化钠、6 M 盐酸胍或 8 M 尿素, 1 h;

疏水吸附蛋白：

4 CV 0.1-0.5 %非离子型表面活性剂, 1-2 h;

根据不同污染物类型选择不同 CIP 条件, 由于料液的不同, CIP 的频率也不同, 但通常 CIP 周期建议每 5 个分离周期进行一次, 结束后一定要使用平衡缓冲液彻底清洗层析柱。

### 长期储存

介质密封保存在 20%乙醇中, 建议保存温度为 4~25℃。注意防止乙醇挥发以及微生物生长, 建议 3 个月更换一次 20%乙醇。

注意：使用过程中, 所用样品及流动相必须用孔径为 0.45 μm 滤膜过滤。

### 故障排除

如果您在使用 NM90Agarose Heparin 产品遇到任何问题, 请参考下表进行解决或联系我们。

现象	原因分析	建议措施
柱压升高	流速过高	降低流速
	仪器的在线过滤器堵塞	去除杂质并清洗, 或者替换, 在使用前对样品和缓冲液进行过滤
	柱床被压缩	重新填充柱子
	层析柱使用过久	更换层析柱或更换层析介质
	泵和收集器之间的阀门未打开	打开出口
出现柱上沉淀	疏水性蛋白、脂蛋白或者脂类累积	用非离子型表面活性剂冲洗 (如 0.1% Tergitol 15-S-9 或 Triton X-100 reduced/还原态), 或者 0.5 M NaOH, 或者 1 M 盐酸胍; 然后使用至少 5 倍柱体积经过消毒过滤的结合缓冲液 (pH 7-8) 冲洗
	蛋白质变性沉淀	使用 2 倍柱体积的 50 mM NaOH, 或者 50 mM NaOH 和 1.0 M NaCl, 或者 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 或者 6 M 盐酸胍和 10 mM NaOH 冲洗柱子, 至少冲洗 10 分钟以上; 然后使用至少 5 倍柱体积经过消毒过滤的结合缓冲液 (pH 7-8) 冲洗

## 订货信息

产品型号	包装	货号
NM90Agarose Heparin	30 mL	17012-090001-2030
	50 mL	17012-090001-2050
	100 mL	17012-090001-2100
	300 mL	17012-090001-2300
	500 mL	17012-090001-2500
	1 L	17012-090001-1001
	5 L	17012-090001-1005
	10 L	17012-090001-1010
	50 L	17012-090001-1050
	100 L	17012-090001-1100

注：可以提供 7.7 mm × 22 mm 、 16 mm × 25 mm 、 7.7 mm × 100 mm 的层析预装柱。更多规格型号或定制需求，请联系我们。

## 苏州纳微科技股份有限公司

全国咨询热线：400-828-1622

邮箱：info@nanomicrotech.com

(本公司产品仅限科研或工业使用)

中文网站：www.nanomicrotech.com

英文网站：en.nanomicrotech.com

2022-苏州纳微科技股份有限公司版权所有

总部地址：苏州工业园区百川街2号 215123

2022年6月第二版

