

Heparin Crysto 50

肝素亲和层析介质

使用指南

1 产品简介

Crysto 基质是超高刚性琼脂糖基质，是通过对传统 Chromrose® 琼脂糖基质进行化学改构和修饰而成，具有良好的机械性能，具有优异的流动性能和高物理稳定性，Heparin Crysto 50 亲和填料是以超高刚性琼脂糖凝胶为基质，采用特殊延长臂和键合技术偶联高纯度肝素，具有良好的载量和选择性；配基脱落低，非特异性吸附少，小粒径设计，分辨率高，配体定向偶联，增强了抗凝血酶 II 的结合能力。

应用领域：乳铁蛋白、凝血酶 I 、凝血因子、脂蛋白、酯酶、蛋白合成因子、激素、类固醇受体、核酸结合酶和干扰素等的分离纯化。

2 技术参数

产品名称	Heparin Crysto 50
配 基	Heparin
基 质	超高刚性琼脂糖
平均粒径	50μm
每毫升载量	>25mg 乳铁蛋白
最高流速	300cm/h (根据柱子规格选择合适流速)
最大耐压	0.5 MPa
pH 稳定性	5~10
化学稳定性	稳定于常用的水缓冲液、0.05M 醋酸钠 (pH4.0)、70%乙醇、4M 氯化钠；8M 尿素、6M 盐酸胍、0.1M 氢氧化钠。
存 储	50mM NaAc +20%乙醇； 4~ 8 °C

3 使用指南

3.1 填料装柱

Heparin Crysto 50 层析介质可以在实验室被填装到 HiQumn® 中压层析柱中，以扩大产量。将填料填装到层析柱中，根据样品中蛋白含量和填料载量选择合适的层析柱和柱高。

3.1.1 填料准备

在装柱前，填料要平衡到室温，建议采用静置沉淀法，确定胶悬液浓度，我们原包装的填料以 50%的浓度储存在 20%的乙醇中。压缩比在 1.15~1.2。

通过真空抽滤，将填料中 20%乙醇溶液更换为装柱所需的溶液（例如水），重复以上步骤 3 次，最后用装柱缓冲液重新悬浮填料，建议胶悬液浓度为 50%~60%。

所需悬浊液体积 (mL) =装柱体积 (mL) X 填料压缩因子/胶悬浊液浓度

3.1.2 层析柱准备

HiQumn® 中压层析柱和装柱器在使用前，应用装柱液润洗，检查层析柱完好无损伤，确保所选筛网（筛板）的孔径和所选填料的粒径相匹配，确保底端部件和顶部适配器的管件连接牢固。

3.1.3 层析柱装柱

- 1) 取清洗干净的 HiQumn® 中压层析柱，借助蛋白纯化仪或注射器，用装柱液通过下端接头排空管线及筛板中的空气，也可用重力法排空筛板及管线中的空气，在柱子底部保留 1cm 高左右的液体，拧紧下堵头，调整柱子使其垂直于地面。
 - 2) 再次混匀胶悬液，确保悬液均一，借助玻璃棒将胶悬液缓慢且一次性贴壁倒入柱管中，用装柱液冲洗柱管并加满。注意不要带入气泡。
- 注：当装柱体积大于柱体积的 50%以上时建议借助配套装柱器装柱。
- 3) 使其自然沉降，胶面上有 1~2cm 澄清液时，将适配器管线连接设备，低流速运行，排出适配器管线中的气泡，打开底部管线堵头，将适配器以 45°角放入玻璃管中，顺时针拧紧上端固定帽，调节适配器使其 O 型圈浸入澄清液中，之后顺时针拧紧上端调节帽。请确保整个操作在一条直线上完成，注意不要引入气泡。
 - 4) 可以采用高流速或者恒压法压至胶面清晰稳定。读取刻度并记录，关闭流速。
 - 5) 如用装柱器装柱，拆除装柱器，用快速锁将调节杆缓慢下移至胶面位置，将上端调节帽顺时针拧紧，继续运行上述流速，如果胶面发生改变，可以重新调节适配器高度。
 - 6) 稍微拧松上端调节帽，按压缩比确定最终柱床高度，拧紧上端调节帽，采用先下后上的方式拧紧上下端堵头，装柱完毕。

3.2 柱效测定

- 1) 通过柱效测定和评价可以确认层析柱装填质量。装柱完成后、层析柱使用期间以及分离纯化效果不理想时都需要进行柱效测定和评价。柱效通常用理论塔板高度 (HETP) 和非对称因子 (As) 来评价。
- 2) 柱效测定可以采用丙酮或者 NaCl 作为样品进行测定，按照下表配制样品溶液和流动相。

丙酮法测柱效		NaCl 法测柱效
样品	1.0% (v/v) 丙酮水溶液	0.8M NaCl (溶于水)
样品体积	1.0% 柱体积	1.0% 柱体积
流动相	纯化水	0.4M NaCl 水溶液
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测器	UV 280 nm	电导率

3) HETP 和 As 计算方法

根据 UV 或者电导率曲线计算理论塔板高度 (HETP) 、理论塔板数 (N) 和非对称因子 (As) , 公式如下:

$$HETP = L/N$$

$$N = 5.54(V_R/W_h)^2$$

其中:

V_R =保留体积 W_h =半高峰宽

L =柱高 N =理论塔板数 V_R 和 W_h 的单位应一致;

$$As = b/a$$

其中:

a = 在 10% 峰高处的第一个半峰宽

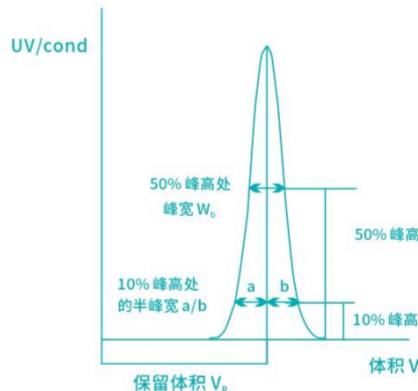
b = 在 10% 峰高处的第二个半峰宽

4) 结果评价

一般来说, HETP 的数值若小于三倍介质平均颗粒大小且非对称因子

在

0.8~1.8 之间, 说明柱效良好。对于不理想的柱效结果需要分析原因并重新装柱。



3.3 层析方法

3.3.1 缓冲液准备

Heparin Crysto 50 建议使用缓冲液:

平衡缓冲液: 20~50 mM PB 或 Tris/HCl, pH 7.4~8.0, 可加入 0.15 M NaCl 抑制非特异吸附;

洗脱缓冲液: 20~50 mM PB 或 Tris/HCl+1~2 M NaCl, pH 7.4~8.0 NaCl 浓度需要根据目标蛋白的结合力进行适当调整。

3.3.2 样品准备

为了避免堵塞层析柱, 样品应经离心或微滤处理。进料量根据介质的载量和料液中目标蛋白的含量计算。

3.3.3 样品纯化

- 1) 平衡: 用 5~10CV 的平衡缓冲液平衡层析柱, 至流出液电导和 pH 不变 (与平衡液一致) ;
- 2) 进料: 样品缓冲液应尽可能与平衡液一致。固体样品可用平衡液溶解配制; 低浓度样品溶液可用平衡液透析; 高浓度样品溶液可用平衡液稀释;
- 3) 淋洗: 上样完毕后继续用平衡缓冲液淋洗至基线;
- 4) 洗脱: 用洗脱缓冲液 (NaCl 浓度需要根据目标蛋白的结合力进行适当调整) 洗脱, 收集流出液。可采用线性梯度或阶跃式梯度洗脱;
- 5) 再生: 用平衡液冲洗 5~10 CV , 然后用纯水冲洗 5~10 CV, 再用 20% 乙醇冲洗 2~3 CV, 置于 2~8°C 保存。

4 在位清洗和储存

4.1 在位清洗

为了避免不同样品间的相互干扰，或者当介质污染比较严重时（反压增加），需要对介质进行在位清洗。

- 对于以离子键结合的蛋白，可用 2~3 CV 以上的 2 M NaCl 清洗，并用 3 CV 以上的纯水冲洗。
- 对沉淀或变性蛋白，可用 0.1 M NaOH 清洗（1~2 h），并用 3~10 CV 平衡液和 3 CV 以上的纯水冲洗。也可用 6 M Gua-HCl 或 8M urea 清洗（0.5~1 h）
- 对疏水性结合的蛋白，可用 0.1~0.5%的非离子去污剂清洗（1~2 h），并用 3~10 CV 的纯水冲洗。

其他注意事项：在装柱、使用和保存柱子的时候，要避免柱子流干，气泡进入。

4.2 储存

4~8°C 20%乙醇，含50mM NaAc ， pH 8.0。

注：防止乙醇挥发以及微生物生长，建议 3 个月更换一次新鲜保存液；在装柱、使用和保存柱子的时候，要避免柱子流干或密封不严，防止气泡进入。

5 订货信息

预装柱

货号	产品名称	规格
31-0520-01		1mL
31-0520-05	Xtrap Heparin Crysto 50	5mL
31-0520-10		8x100mm

层析介质

货号	产品名称	规格
11-0520-02		30mL
11-0520-03		100mL
11-0520-04	Heparin Crysto 50	500mL
11-0520-05		1L
11-0520-07		10L

- Heparin Crysto 50 层析介质可提供试用装
- 如需更大规格或型号定制可联系我公司销售人员



非常感谢您订购科诺赛生物的产品！

如需了解最新产品信息，请拨打服务热线 0532-55679191
或发邮件至 marketing@chromsep.cn
或者登陆官方网站 www.chromsep.cn