



NHS-activated Bestarose 4FF 预活化介质

使用说明书



博格隆(上海)生物技术有限公司
Bestchrom (Shanghai) Biosciences Ltd.

目 录

1、产品简介	1
2、技术参数	1
4、在位清洗	5
5、灭菌	6
6、储存	6
7、销毁及回收	6
8、订货信息	6

1、产品简介

NHS-activated Bestarose 4FF为预活化的琼脂糖凝胶，基质为高流速琼脂糖Bestarose 4FF。带有间隔臂适合偶联小分子配基。

该预活化介质具有以下特点：

- 易与蛋白形成酰胺键，化学稳定性强
- 带有10个碳原子的延伸臂，降低了配基与琼脂糖表面的空间位阻
- 操作简便，避免使用剧毒原料
- 流速快，适于大规模应用

2、技术参数

外观	白色浆状物，放置可分层
基架	4%高度交联的琼脂糖
颗粒大小 ⁺	45~165μm
活化基团	N-羟基琥珀酰亚胺
配基密度	16~23μmolNHS/ml填料
偶联官能团	-NH ₂
耐压	0.3 MPa
流速范围	~150cm/h, 0.1MPa, BXK50/60, h=25cm, 25°C
化学稳定性 ⁺⁺	所有常用水溶性缓冲液中稳定：8M尿素，6M盐酸胍，70%乙醇
pH稳定性 ⁺⁺⁺	3~13（工作）2~13（CIP）
储存	2~8°C，100%异丙醇
建议流速	<150cm/h

+颗粒大小呈正态分布，在该范围内的颗粒占总数的95%以上

++是在偶联的配基同样稳定时的数据

+++没有偶联配基

3、使用方法

3.1 偶联

- NHS-activated Bestarose 4FF 是保存在异丙醇中供货的。以下是介绍除去保存液异丙醇和与配基偶联制备方法。

- 偶联溶液 A: 1mM HCl

偶联溶液B: 0.1M NaHCO₃、0.5M NaCl, pH8.3

- 取已知体积的保存于异丙醇中的介质于砂芯漏斗中, 用预冷的偶联溶液 A (0~4℃) 洗涤, 至少洗涤 30min, 1ml 介质用约 20ml 的偶联溶液 A 洗涤;

注意: NHS 对应配基在 pH 较高时会迅速水解。

- 配基用偶联溶液 B 溶解, 或用 Bestdex G-25 层析柱置换于偶联溶液 B 中 (配基偶联浓度 5~10mg/ml 填料)。
- 将洗好的介质用偶联溶液 A 稀释 (1ml 介质约 0.5ml 偶联溶液 A), 并与配基溶液等体积混合, 室温混匀 4h 或 4℃ 搅拌过夜 (不能使用磁力搅拌器)。

说明: 在室温下, 偶联过程通常非常快, 因此, 通过优化偶联时间来维持配基的生物活性是很重要的。

- 配基偶联完成后需要对填料进行封闭和清洗。
- 封闭: 抽去偶联上清并加入封闭液 (0.1M Tris-HCl, pH8.5), 室温封闭 2~4h;
- 清洗: 0.1M Tris-HCl+0.5M NaCl, pH8~9 与 0.1M 醋酸盐缓冲液+0.5M NaCl, pH3~4 交替洗涤 3~6 次, 每次用 3 倍凝胶体积的液体洗涤。
- 用 PBS 清洗后使用或保存于 20%乙醇 (配基必须在 20%乙醇中稳定) 中。

3.2 层析柱装填

偶联配基后的介质需要装填在层析柱中才能应用于下一步的纯化操作

- 用量计算: 根据计划装填的层析柱的柱体积计算需要的 NHS-activated Bestarose 4FF 的量。

需要的沉降介质体积=柱体积×1.15 (即压缩比约为 1.15)

根据需要的沉降介质体积计算需要量取的介质悬液体积, 计算公式为:

需要的介质悬液¹体积=沉降介质体积÷介质悬液¹浓度。介质悬液¹原始浓度见下表。

包装规格	介质悬液 ¹ 浓度(%)
25ml、100ml、500ml	80

1: 指博格隆销售的原包装介质悬液。

注: 对于非原始浓度的介质悬液, 客户可根据介质悬液的实际浓度计算所需体积。

- 介质清洗: 将介质悬液充分摇匀后量取上述方法计算所得的体积, 后倒入漏斗, 抽去液体, 并用约 3ml 纯化水/ml 介质洗涤, 重复洗涤 3 次, 每次加洗液时需用玻璃棒或者搅胶棒搅拌, 以便更好地清洗掉原保存液。
- 装柱介质悬液准备: 将清洗好的介质从漏斗转移到烧杯或其它适当的容器中, 加入沉降介质体积的二分之一到一倍的纯化水制成 50~75% 的装柱介质悬液, 搅匀备用。
- 取清洗干净的 BXK 层析柱, 利用纯化水通过层析柱排液口排净下筛网内气泡, 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。
- 将搅匀后的胶悬液一次性缓慢倒入层析柱内 (必要时使用装柱器), 注意不要带入气泡。

装柱器: 与 BXK 柱相同直径的空柱管。

- ✧ 用装柱液将装柱器加满, 将装柱器与层析系统连接, 开启流速, 排空软管中气泡, 关闭流速, 再拧紧装柱器上盖。

注: 此操作仅用于 BXK 50 及以下层析柱。

- ✧ 倒入后用搅胶棒再次搅匀, 然后用装柱液沿内壁从上而下冲洗柱子上的介质颗粒, 让介质自然沉降, 直至悬液上有大约 1cm 澄清液。安装上柱头, 将上柱头与层析系统或者蠕动泵连接。调节适配器使其下降到与澄清液接触, 待密封圈全部浸入澄清液后拧紧密封圈。确保层析柱顶部阀门打开情况下, 慢慢下移适配器至所有气泡排净。

注: 此操作仅用于 BXK 100 及以上层析柱。冲洗内壁可减少介质颗粒粘在密封圈和柱壁之间, 避免泄漏风险。

- 设定好流速 (柱高为 10~20cm 时 NHS-activated Bestarose 4FF 可设为 350cm/h), 打开层析柱底阀/堵头, 开启流速, 使用设定流速压至胶面稳定, 如果在装柱过程中压力超过 0.3MPa, 需要适当降低流速。标记胶面稳定时的位置。
- 待胶悬液沉降完成需要再保持 30min 以上, 标记胶面的位置, 然后停泵。

- 去掉装柱器（如果有的话），将柱头下降至胶面上约 0.5cm 的位置，按照上面的流速继续压柱至胶面稳定，标记胶面稳定时的柱高。
- 停泵，打开柱头上的阀门/堵头，关闭柱底的阀门/堵头，稍微放松柱头密封圈，下压柱头至标记位置下面约 0.3cm，旋紧柱头密封圈，关闭柱头阀门/堵头，装柱完成。

3.3 柱效测定和评价

- 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。
- 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	30cm/h
检测器	UV 280 nm	电导率

- 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

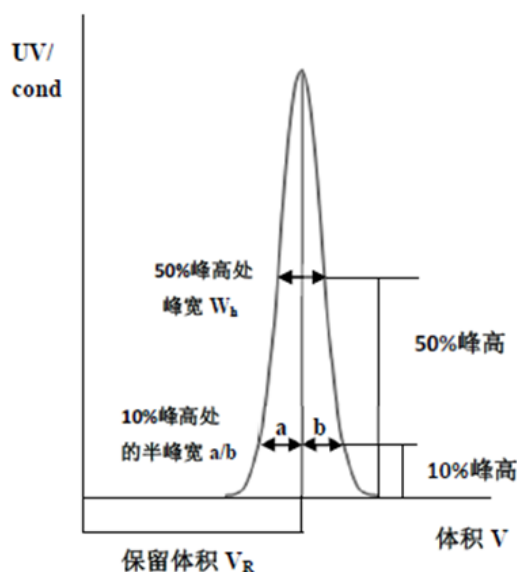
L=柱高

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

- 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。

3.4 介质的使用

- 样品

- 对于复杂的蛋白混合样品，样品的浓度不宜过低，越低其结合能力越弱；但对于和介质配基特异性结合的样品则不需要过多考虑样品浓度。
- 样品浓度也不宜过大，高浓度(大于 30mg/ml)可能引起 pH 和离子强度的波动，影响结合，浓度高时可以用结合缓冲液稀释样品。
- 注意样品的黏度，高黏度的样品会造成在层析过程中的流速不均匀。
- 样品溶液上样前需离心处理或用 0.45μm 的滤器进行过滤，以避免堵塞层析柱或者降低层析柱的分辨效率和使用寿命。

- 结合缓冲液：结合缓冲液的 pH、盐浓度及温度等主要取决于配基和目的物的结合条件。

- 流速：根据配基和目的物的结合强弱一般选用 150~300cm/h 的流速，结合力越弱的情况下使用的流速应该越慢。

- 上样量：取决于配基和目的物的种类。

- 清洗：用结合缓冲液清洗到紫外吸收值降到适当的值。

- 洗脱：需要根据目的物和配基的结合原理选择合适的洗脱缓冲液，通常采用以下方式洗脱。

- 改变洗脱缓冲液的 pH，基于抗原抗体结合的原理通常采用这种洗脱方式。
- 用竞争性物质进行洗脱，基于酶和底物结合的原理通常采用这种洗脱方式。

4、在位清洗

随着层析介质使用次数的增加，污染物在层析柱上的积累也在不断增加，定期的在位清洗能有效防止污染物的累积，保持层析介质稳定的工作状态。客户可根据使用过程中介质的污染程度确定在位清洗的频率（如果污染较严重，建议每次使用之后都进行在位清洗，以保证结果的可重复性）。一般再生方法如下：

对于不同类型的杂质和污染物建议再生条件如下：

- 50mM Tris-HCl, pH8~9 与 0.2M 醋酸溶液, pH3~6 交替洗涤 3 次以上, 每次用 3 个柱体积洗涤。
- 脂蛋白和脂类物质的去除：先用 5~10 个柱体积的 70%乙醇或 30%异丙醇清洗, 后用 5~10 个柱体积纯水清洗。
- 对于强疏水性蛋白、沉淀蛋白的去除：先用 2~3 个柱体积 6M 盐酸胍清洗, 然后立即用 5~10 个柱体积纯水清洗；或者用 0.1M NaOH（配基稳定）清洗 2 个柱体积, 然后立即用 5~10 个柱体积纯水清洗。

5、灭菌

偶联配基后的 NHS-activated Bestarose 4FF 可以采用 70%乙醇（配基在 70%乙醇中稳定）处理 12~24h 以减少微生物污染风险。或者如果配基稳定性允许, 装柱后可以用含 0.1M NaOH 的 20%乙醇溶液静置一小时, 然后用至少 5 柱体积的结合缓冲液清洗。

6、储存

没有偶联配基的 NHS-activated Bestarose 4FF 应储存于 100%异丙醇中, 2~8℃密封保存。

7、销毁及回收

由于 NHS-activated Bestarose 4FF 在自然界很难降解, 为了保护环境建议采用焚烧处理。

8、订货信息

产品名称	货号	包装
NHS-activated Bestarose 4FF	AA0031	25ml
	AA118307	100ml
	AA0032	500ml