



**BESTCHROM**

博 格 隆

# **IgM Capture Bestarose HP**

## **亲和层析介质**

## **使用说明书**



## 目 录

|               |   |
|---------------|---|
| 1、产品简介 .....  | 1 |
| 2、技术参数 .....  | 1 |
| 3、使用方法 .....  | 1 |
| 4、在位清洗 .....  | 5 |
| 5、灭菌 .....    | 5 |
| 6、储存 .....    | 5 |
| 7、销毁及回收 ..... | 5 |
| 8、订货信息 .....  | 6 |

## 1、产品简介

IgM Capture Bestarose HP 是将含硫化合物 2-巯基吡啶固定在细颗粒高刚性琼脂糖上而制成的一种嗜硫亲和介质，其优化的配基密度和 IgM 具有合适的亲和力，细颗粒微球可以提高分子量较大的 IgM 的载量。嗜硫亲和的原理是利用电子供体和电子受体之间的相互作用来分离纯化生物分子，这种作用力在高盐环境下得以加强，在低盐环境下减弱。

## 2、技术参数

|                  |                                                    |
|------------------|----------------------------------------------------|
| 外观               | 白色浆状物，放置可分层                                        |
| 基架               | 6%高度交联的琼脂糖                                         |
| 颗粒大小             | 24~44 $\mu\text{m}$ （平均颗粒大小34 $\mu\text{m}$ ）      |
| 功能基团             | 2-巯基吡啶                                             |
| 配基密度             | ~2mg 2-巯基吡啶/mL介质                                   |
| 动态载量             | ~5mg人IgM/mL介质                                      |
| 化学稳定性            | 常见水相溶液：70%乙醇，30%异丙醇，1M HAc <sup>+</sup> 、0.1M NaOH |
| 耐压               | 0.3MPa                                             |
| pH稳定性            | 2~13(CIP)，3~11(工作)                                 |
| 储存 <sup>++</sup> | 2~30℃，20%乙醇或2%苯甲醇                                  |

+1M HAc 仅用于清洗

++2%苯甲醇仅用于国外运输或者客户指定

## 3、使用方法

### 3.1 层析柱装填

**注：装柱前最好将介质悬液温度平衡到室温。**

由于该介质颗粒较细，需选择带有 10 微米及以下孔径筛网的层析柱。

- 用量计算：根据计划装填的层析柱的柱体积计算需要的 IgM Capture Bestarose HP 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<sup>1</sup>体积=沉降介质体积÷介质悬液<sup>1</sup>浓度。介质悬液<sup>1</sup>原始浓度见下表。

| 包装规格                       | 介质悬液 <sup>1</sup> 浓度(%) |
|----------------------------|-------------------------|
| 25mL、100mL、500mL、1L、5L、10L | 80                      |
| 20L、40L                    | 75                      |

### 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，倒入漏斗，抽去液体，用约 3mL 装柱液（0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+1.2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0）/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。
- 装柱胶悬液准备：将清洗好的介质从漏斗转移到烧杯或其它适当的容器中，加入装柱液至胶悬液浓度为 50~75%，搅匀备用。
- 取清洗干净的 BXK 层析柱（BXK 系列层析柱的直径从 1 厘米到 30 厘米不等，不同规格可以满足不同规模大小的层析应用），以层析柱 BXK16/20 为例，利用装柱液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。
- ✧ 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。

- 柱高为 10cm 时，可将装柱流速设定为 250cm/h，打开层析柱底阀/堵头，开启流速，使用设定流速压至胶面清晰稳定，标记胶面稳定时的位置。
- 去掉装柱器（如有），装上上柱头，将柱头下降至胶面上约 0.5cm 的位置，按照上述流速继续压柱至胶面清晰稳定，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。

### 3.2 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<sub>R</sub>=保留体积

W<sub>h</sub>=半高峰宽

L=柱高

N=理论塔板数

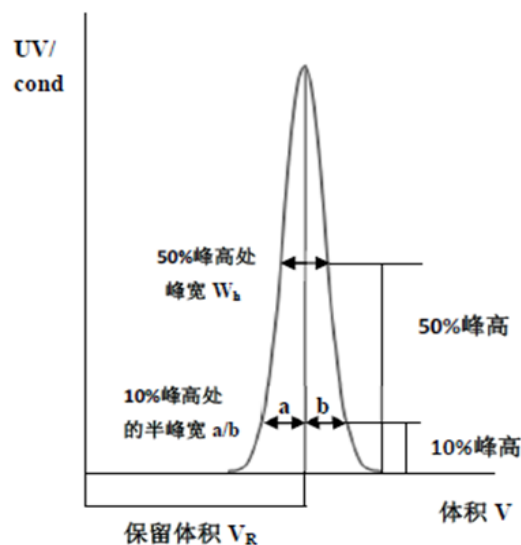
$V_R$ 和 $W_h$ 的单位应一致；

$$As=b/a$$

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。

## 3.3 层析方法

### ● 推荐

结合缓冲液：20mM PB, 0.8M  $(NH_4)_2SO_4$ , pH7.5 (有些单克隆的 IgM 可能在 0.8M 的 $(NH_4)_2SO_4$ 中并不结合到柱子上，此时可以提高 $(NH_4)_2SO_4$  的浓度到 1M 以提高结合能力)。

洗脱缓冲液：20mM PB, pH7.5

清洗缓冲液：20mM PB, 30%异丙醇, pH7.5

在某些情况下，0.8M 的硫酸铵可以被 0.5M 的硫酸钾所替代，大多数单克隆的 IgM, 都能够在 0.5M 的硫酸钾条件下结合到柱子上，并且 0.8M 的硫酸铵和 0.5M 的硫酸钾中纯化的单克隆的 IgM 的纯度是相当的。

- 流速：根据柱子的高度一般选用<150cm/h 的流速，柱高越大流速越慢。
- 样品准备：为防止样品堵塞柱子，在上样前样品需要用 0.45 $\mu$ m 的微孔滤膜过滤，并将样品的 pH 和电导率调整到与平衡缓冲液一致，硫酸铵浓度等影响结合载量。
- 平衡：用结合缓冲液充分平衡层析柱，通常需要 3~5 个柱体积。
- 上样：根据样品中的物质含量和 IgM Capture Bestarose HP 的结合载量确定上样体积，进行上样。
- 清洗：用结合缓冲液清洗层析柱至紫外吸收接近基线。

- 洗脱：可以采用推荐的洗脱缓冲液洗脱，如果目的蛋白洗脱不完全，可采用含有低浓度（如 5~10%）异丙醇的 20mM PB pH7.5 的缓冲液洗脱，注意不可用高浓度的异丙醇洗脱。
- 再生：用清洗缓冲液对层析柱进行清洗再生。
- 再平衡：用结合缓冲液平衡层析柱，待 pH 和电导率与结合缓冲液基本一致，就可以进行第二次上样，如此重复。

## 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）。

- 变性蛋白去除：采用 0.1M NaOH 清洗 4 个柱体积，立即用至少 5 个柱体积的平衡缓冲液清洗。
- 强疏水性物质或者脂类去除：采用 2~4 个柱体积 20mM PB、30%异丙醇、pH7.5 的缓冲液清洗柱子，立即用至少 5 个柱体积的平衡缓冲液清洗。

## 5、灭菌

由于 20%乙醇或 2%苯甲醇保存液不具有杀菌、除热原作用，建议 IgM Capture Bestarose HP 介质在使用前及使用过程中，可以采用 70%乙醇处理 12h 以上达到灭菌和去除热原的目的。

## 6、储存

IgM Capture Bestarose HP 介质以 20%乙醇或 2%苯甲醇为保存液进行销售。使用后的 IgM Capture Bestarose HP 储存于 20%乙醇中、2~30°C 密闭保存，为了防止乙醇挥发以及微生物滋生，建议定期更换新鲜的保存液。

## 7、销毁及回收

由于 IgM Capture Bestarose HP 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    |
|--------------------------|--------|-------|
| IgM Capture Bestarose HP | AA0152 | 25mL  |
|                          | AA0153 | 100mL |
|                          | AA0154 | 500mL |
|                          | AA0155 | 1L    |
|                          | AA0156 | 5L    |
|                          | AA0157 | 10L   |

| 预装柱名称               | 货号      | 包装      |
|---------------------|---------|---------|
| EzFast IgM HP       | EA01521 | 1×1mL   |
|                     | EA01531 | 5×1mL   |
|                     | EA01523 | 1×5mL   |
|                     | EA01533 | 5×5mL   |
| EzScreen IgM HP     | EA01525 | 1×4.9mL |
|                     | EA01535 | 5×4.9mL |
| EzLoad 16/10 IgM HP | EA01501 | 1 根     |
| EzLoad 26/10 IgM HP | EA01511 | 1 根     |