



**BESTCHROM**

博 格 隆

**CNBr-activated Bestarose 4B**  
**预活化琼脂糖凝胶**  
**使用说明书**





# 目 录

1、产品简介 .....	1
2、技术参数 .....	1
3、使用方法 .....	2
4、再生 .....	6
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

CNBr-activated Bestarose 4B为溴化氰预活化的琼脂糖凝胶。可以将带有伯氨基(-NH<sub>2</sub>)的生物分子共价偶联到该介质上，用于制作特定的亲和介质以及固定化酶。

该介质具有以下特点：

- 与蛋白等生物大分子的反应条件温和
- 可直接偶联生物大分子，不需偶联间隔臂
- 配基与基架可形成多位点偶联，配基不易脱落
- 应用于蛋白质、多肽、核酸等的偶联

## 2、技术参数

外观	白色浆状物，放置可分层/白色粉末状固体
基架	4%琼脂糖
颗粒大小 <sup>+</sup>	45~165μm
偶联官能团	伯氨基
偶联蛋白质的量	25-60mg α-胰凝乳蛋白酶原/mL介质
pH稳定性 <sup>++</sup>	2~11 (CIP)，3~11 (工作)
化学稳定性 <sup>+++</sup>	所有常用水溶性缓冲液中稳定：8M尿素，6M盐酸胍，70%乙醇
最大流速	≥15cm/h (BXK26/40, H=30cm, 20°C, 水中)
耐压	0.16bar
储存	2~8°C, 100%丙酮

+颗粒大小呈正态分布，在该范围内的颗粒占总数的95%以上

++没有偶联配基

+++是在偶联的配基同样稳定时的数据



### 3、使用方法

#### 3.1 偶联

- CNBr-activated Bestarose 4B 是保存在丙酮中供货，偶联配基之前需要将丙酮除去。
- 偶联溶液 A: 1mM HCl  
偶联溶液 B: 0.1M NaHCO<sub>3</sub>、0.5M NaCl, pH8.3 (高浓度盐可以防止聚体的形成)
- 取保存于丙酮中的介质放于砂芯漏斗中 (干粉可以先用 1mM 的 HCl 浸泡 10~15min), 用预冷的偶联溶液 A (0~4℃) 洗涤, 至少洗涤 30min, 1mL 介质用约 60mL 的偶联溶液 A 洗涤;  
**注意: CNBr 对应官能团在 pH 较高时会迅速水解。**
- 配基用偶联溶液 B, 或用 Bestdex G-25 层析柱置换于偶联溶液 B 中 (蛋白配基偶联浓度建议为 5~10mg/mL 填料)。  
**说明: 配基浓度太高会对亲和层析产生不利影响。首先, 被吸附物质的结合率可能因为活性位点间的空间位阻而降低; 其次, 目的物与配基间的结合力太强难以洗脱。**
- 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 2h 或 4℃ 搅拌过夜 (不能使用磁力搅拌器)。  
**说明: 在室温下 (20~25℃), 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凝胶进行封闭和清洗。
- 封闭: 抽去偶联上清并加入封闭液 (0.1M Tris-HCl, pH8.0), 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 5 倍介质体积的液体洗涤。
- 用 PBS 清洗后使用或保存于 20% 乙醇 (配基在 20% 乙醇中是稳定的前提下) 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。

**注：装柱前最好将介质悬液平衡到室温。**

- 用量计算：根据计划装填的层析柱的柱体积计算需要的 CNBr-activated Bestarose 4B 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	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，倒入漏斗，抽去液体，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，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。**

- 根据使用流速，设定装柱流速，装柱流速一般为使用流速的约 1.3 倍。
- 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，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。
- 去掉装柱器（如有），装上上柱头，待胶悬液沉降完成需要再保持 3 个柱体积以上，标记胶面的位置。
- 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  $A_s$  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 ( $A_s$ ), 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

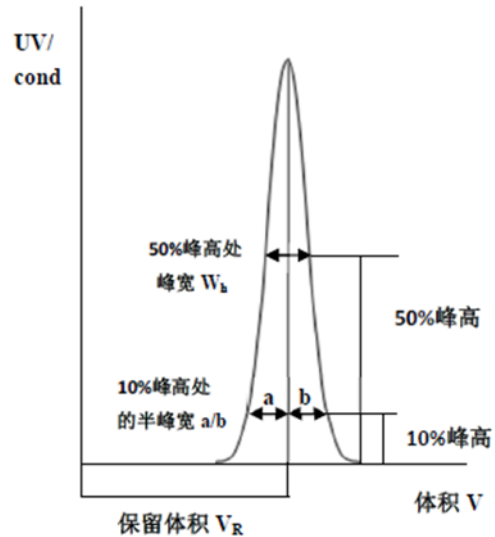
$V_R$ 和 $W_h$ 的单位应一致;

$$A_s=b/a$$

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 0.45 $\mu$ m 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 <50cm/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、再生

再生溶液主要取决于配基的稳定性，只有配基在相应的清洗试剂中是稳定的情况下方能使用，一般再生方法如下：

- 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。
- 蛋白变性剂：8M 尿素、6M 盐酸胍。
- 有机溶剂：70% 乙醇、30% 异丙醇。

## 5、灭菌

偶联配基后的 CNBr-activated Bestarose 4B 可以采用 70% 乙醇（配基在 70% 乙醇中稳定的情况下）处理 12~24h 以减少微生物污染的风险。

## 6、储存

未偶联配基的 CNBr-activated Bestarose 4B 应储存于 100% 丙酮中，2~8℃ 密封保存。偶联配基后的介质可以保存在 20% 乙醇中，为了防止乙醇挥发以及微生物滋生，建议每 3 个月更换一次新鲜的保存液。

## 7、销毁及回收

由于 CNBr-activated Bestarose 4B 在自然界很难降解，为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
CNBr-activated Bestarose 4B	AA017305	25mL
	AA017307	100mL
	AA0012	500mL