



BESTCHROM

博 格 隆

GST Bestarose 4FF

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	2
4、应用举例	5
5、在位清洗	5
6、灭菌	6
7、储存	6
8、销毁及回收	6
9、订货信息	6

1、产品简介

GST Bestarose 4FF 是将谷胱甘肽偶联到高度交联的琼脂糖凝胶上而制成的，专门用于特异性纯化谷胱甘肽 S 转移酶（Glutathione S-Transferase, GST）及 GST 融合蛋白的分离纯化介质。GST 标签是现代基因工程表达融合蛋白时常用的标签，有利于蛋白质的可溶性表达和活性维持，对于不同来源的谷胱甘肽 S-转移酶及其融合蛋白均可采用该介质通过一步纯化即可得到高纯度的目标蛋白，该层析介质耐压高、流速快、操作条件温和，有利于蛋白活性的保持。

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 ⁺	45~165 μ m
功能基团	含有10个原子臂的谷胱甘肽
配基密度	120~320 μ mol谷胱甘肽 /mL介质
动态载量	~10mg GST/mL填装介质
耐压	0.3MPa
化学稳定性	常用水溶性缓冲液：1M HAc ⁺⁺ ，70%乙醇，6M盐酸胍（室温1小时）
pH稳定性	3~12
储存 ⁺⁺⁺	2~30 $^{\circ}$ C，20%乙醇或2%苯甲醇
压力流速	~450cm/h（BXK16/10 H=5cm 25 $^{\circ}$ C）
推荐流速范围	上样流速：<100cm/h 平衡、清洗、洗脱流速：100~300cm/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

++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 GST 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、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（PBS，pH7.3）/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 450cm/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

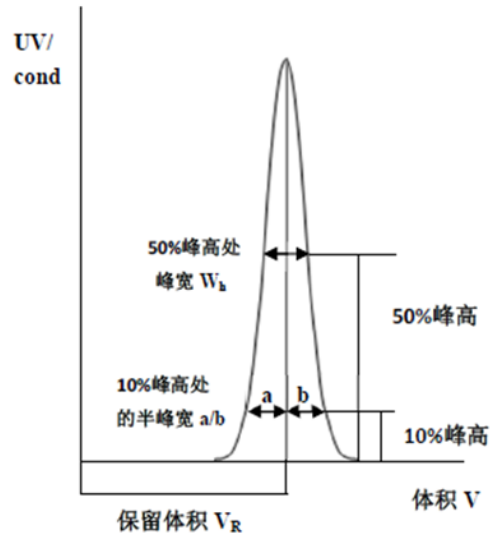
V_R和W_h的单位应一致；

$$As=b/a$$

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。

3.3 层析方法

● 样品溶液

- 为了避免堵塞层析柱样品溶液上样前需离心处理或用 0.45μm 的滤器进行过滤。
- 样品的黏度需要适当，高黏度的样品会造成层析过程中的流速不均匀，并影响传质平衡。

● 结合缓冲液：一般选用中性缓冲液，如 20mM PB、0.15 M NaCl，pH 7.3。

● 流速：根据柱子的高度一般选用 <100cm/h 的流速，低流速有利于蛋白质的结合。

● 样品准备：将样品的 pH 和电导调整到与平衡缓冲液一致，根据介质的结合载量和样品中的目的物含量确定上样体积。

● 平衡：用结合缓冲液清洗层析柱至紫外吸收值降到适当的值。

● 上样：将准备好的样品按照设定条件进行上样。

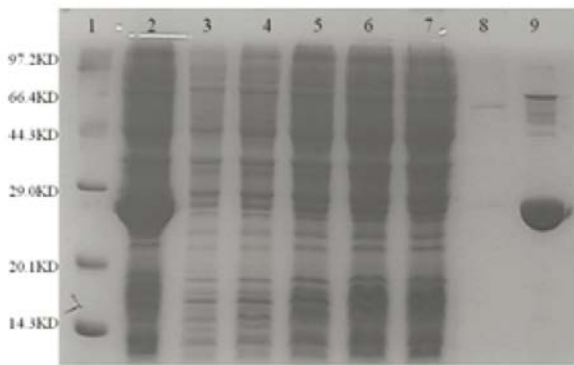
- 清洗：用平衡缓冲液清洗层析柱至紫外吸收接近基线。
- 洗脱：常用还原性谷胱甘肽进行洗脱，如：50mM Tris、10mM 还原性谷胱甘肽，pH8.0。

缓冲液中加入 1~10mM DTT 可以增加目的物的纯度。

- 再生：2 个柱体积高 pH 缓冲液(0.1MTris-HCl, 0.5MNaCl, pH8.5)和低 pH 缓冲液(0.1M 醋酸钠, 0.5M NaCl, pH4.5)交替洗涤三次；10 个柱体积结合缓冲液平衡层析柱。

4、应用举例

用 GST Bestarose 4FF 纯化重组 GST 标签蛋白表达液

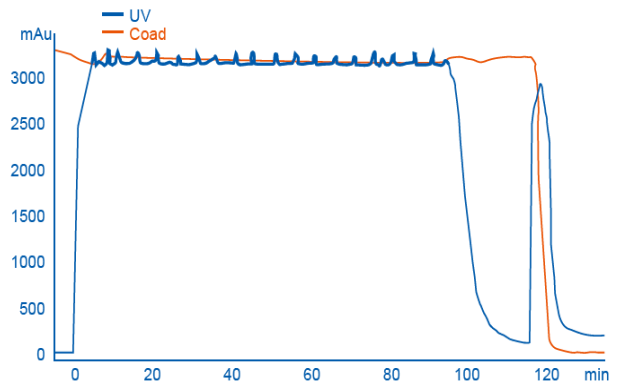


层析柱：EzFast 5mL GST 4FF

缓冲液 A：0.15M NaCl、20mM PB, pH7.4

缓冲液 B：15mM 还原性谷胱甘肽、50mM Tris, pH8.0

样品：重组 GST 标签蛋白表达液



点样顺序(DTT 还原电泳):

泳道 1: Marker 泳道 2: 原样

泳道 3-7: 流穿泳道 8: 清洗

泳道 9: 洗脱

5、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）。一般清洗方法如下：

➤ 沉淀或变性物质去除：

用 2 个柱体积的 6M 盐酸胍清洗，然后用 5 个柱体积的平衡缓冲液清洗。

➤ 疏水结合的物质去除：

用 2~4 个柱体积的 70%乙醇清洗，然后用 5 个柱体积的平衡缓冲液清洗。

6、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 GST Bestarose 4FF 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。

7、储存

GST Bestarose 4FF 介质以 20%乙醇或 2%苯甲醇为保存液进行销售。使用后的 GST Bestarose 4FF 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，建议每 3 个月更换一次新鲜的保存液。

8、销毁及回收

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

9、订货信息

产品名称	货号	包装
GST Bestarose 4FF	AA0071	25mL
	AA0072	100mL
	AA0073	500mL
	AA0074	1L
	AA0075	5L
	AA109314	10L



预装柱名称	货号	包装
EzFast GST 4FF	EA109301	1×1mL
	EA109303	1×5mL
	EA012	5×1mL
	EA013	5×5mL
EzScreen GST 4FF	EA00725	1×4.6mL
	EA00735	5×4.6mL
EzLoad 16/10 GST 4FF	EA109304	1 根
EzLoad 26/10 GST 4FF	EA109306	1 根