



BESTCHROM

博 格 隆

Protein G 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、应用实例	6
5、在位清洗	7
6、灭菌	7
7、储存	7
8、销毁及回收	7
9、订货信息	8

1、产品简介

Protein G Bestarose 4FF 是通过溴化氰活化的方式将 Protein G 固定到 Bestarose 4FF 基架上而制成的一种亲和介质。Protein G 与 Protein A 相比有着更为宽广的结合谱，同时 Protein G 不仅与抗体的 Fc 片段有着强有力的结合，也和抗体的 Fab 片段有着弱的相互作用，所以 Protein G Bestarose 4FF 常用于分离纯化来自细胞培养物中的抗体或者抗体片段，以及从各种种属的血清中纯化抗体。

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	Protein G (E.coli)
配基密度	~2mg Protein G /mL介质
交联方式	溴化氰活化
动态载量 ⁺⁺	~20mg 人IgG/mL填装介质
化学稳定性	40 $^{\circ}$ C 1周: 1M HAc (pH2.0)、20mM磷酸钠、1%SDS、6M盐酸胍、70%乙醇; 室温 2h: 0.1 M HCl (pH1.0)、8 M 尿素 (pH10.5)
物理稳定性	由于pH值或离子强度的变化引起的体积变化可忽略
耐压	0.3MPa
压力流速	150~250cm/h (0.1MPa BXK50 H=25cm)
pH稳定性	2~10 (CIP), 3~9 (工作)
储存 ⁺⁺⁺	2~8 $^{\circ}$ C, 20%乙醇或2%苯甲醇

⁺颗粒大小呈正态分布，在该范围内的颗粒占总数的95%以上

⁺⁺线性流速 200cm/h，柱高 10cm，缓冲液条件: 20mM PB、0.15M NaCl, pH7.4

⁺⁺⁺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 Protein G 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（20%乙醇）/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 45cm/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，设定流速为 160cm/h，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_R =保留体积

W_h =半高峰宽

L=柱高

N=理论塔板数

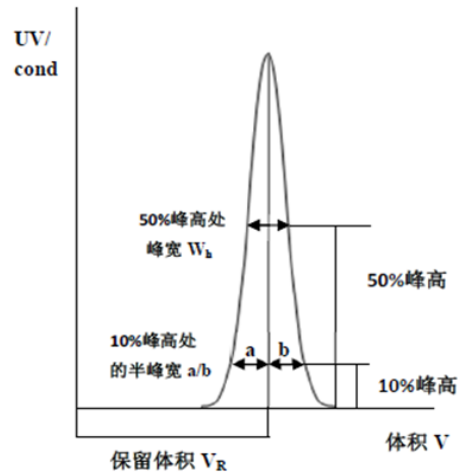
V_R 和 W_h 的单位应一致；

$$As=b/a$$

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

- 缓冲液：Protein G 与不同类型的 IgG 在中性环境中结合，建议使用 20mM PB, pH7.0 作为结合缓冲液。
- Protein A 和 Protein G 和不同属免疫性球蛋白的结合能力对比（表 1）。

表 1. Protein A 和 Protein G 与不同种类的免疫性球蛋白结合强度对比

种类	亚类	与 Protein G 结合强度	与 Protein A 结合强度
	IgA	-*	可变的
	IgD	-	-
	IgE	-	-
人	IgG ₁	++++	++++
	IgG ₂	++++	++++
	IgG ₃	++++	-
	IgG ₄	++++	++++
	IgM	-	可变的
鸟蛋黄	IgY	-	-
牛		++++	++
狗		+	++
羊		++	-
几内亚猪	IgG ₁	++	++++
大类的鼠类		++	+
马		++++	++
树袋鼠		+	-
骆驼		+	-
恒河猴		++++	++++
	IgG ₁	++++	+
	IgG _{2a}	++++	++++
小鼠	IgG _{2b}	+++	+++
	IgG ₃	+++	++
	IgM	-	可变的
猪		+++	+++
兔		+++	++++
	IgG ₁	+	-
	IgG _{2a}	++++	-
大鼠	IgG _{2b}	++	-
	IgG ₃	++	+
绵羊		++	+/-

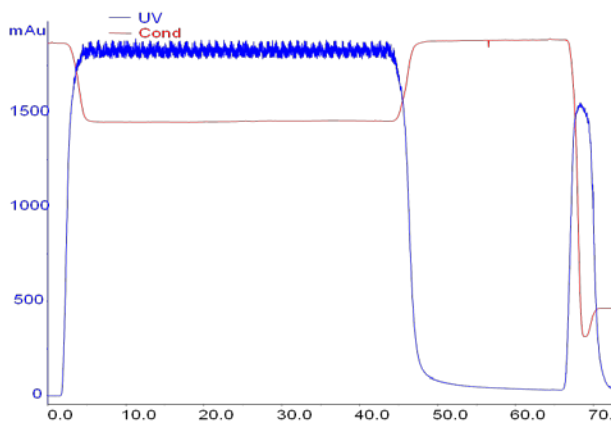
* 加号越多表示结合强度越强，减号表示结合强度极弱甚至不结合



- 流速：根据柱子的高度一般选用 50~300cm/h 的流速，柱高越大流速越慢，降低流速增加样品和介质的接触时间可以提高结合载量。
- 样品准备：为防止样品堵塞柱子，在上样前样品需要用 0.45 μ 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。
- 平衡：用平衡缓冲液清洗层析柱至紫外吸收降到适当的值。
- 上样：将准备好的样品溶液按照设定条件进行上样。
- 清洗：用结合缓冲液清洗到紫外吸收值降到适当的值。
- 洗脱：通常采用改变缓冲液 pH 进行洗脱，建议使用 0.1M 的甘氨酸 pH2.5~3.0 作为洗脱缓冲液。为了保持某些酸敏感 IgG 的活性，洗脱收集管中可预加入收集体积 1/10 的 1M Tris-HCl, pH9.0 进行中和。
- 再生：洗脱结束后，应立即用 2~3 柱体积的洗脱缓冲液清洗介质，然后用 2~3 柱体积的结合缓冲液平衡。如工艺过程中的变性蛋白或脂质等物质，在再生过程中无法洗脱，可以通过在位清洗操作去除。

4、应用实例

Protein G Bestarose 4FF纯化鼠源IgG



层析柱：Ezload 16/10 Protein G 4FF

缓冲液 A：PBS

缓冲液 A：0.1M Gly,pH2.7

样品：鼠源腹水样品

点样顺序(DTT 还原电泳)：

泳道 1：Marker

泳道 2：小鼠腹水

泳道 3-7：流穿

泳道 8：洗脱

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）。

- 脂蛋白和脂类物质的去除：用 70% 乙醇浸泡 12h，然后用至少 5 个柱体积的结合缓冲液清洗。
- 强疏水性蛋白、沉淀蛋白的去除：可用非离子型去污剂，如 0.1% Triton X-100 37°C 条件下接触 1min，然后迅速用至少 5 个柱体积的结合缓冲液清洗。

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 Protein G Bestarose 4FF 介质在使用前及使用过程中，可以采用 70% 乙醇处理 12h 以减少微生物污染风险。

7、储存

Protein G Bestarose 4FF 以 20% 乙醇或 2% 苯甲醇为保存液进行销售。使用后的 Protein G Bestarose 4FF 储存于 20% 乙醇中、2~8°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 Protein G 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
Protein G Bestarose 4FF	AA0142	25mL
	AA104307	100mL
	AA104311	500mL
	AA0144	1L
	AA0145	5L
	AA104314	10L

预装柱名称	货号	包装
EzFast Protein G 4FF	EA104301	1×1mL
	EA031	1×5mL
	EA032	5×1mL
	EA033	5×5mL
EzScreen Protein G 4FF	EA01425	1×4.6mL
	EA01435	5×4.6mL
EzLoad 16/10 Protein G 4FF	EA104304	1 根
EzLoad 26/10 Protein G 4FF	EA104306	1 根