



**BESTCHROM**

博 格 隆

# Heparin Bestarose FF 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 .....	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

Heparin Bestarose FF是将肝素共价偶联到高交联度琼脂糖上而制成的一种族特异性亲和层析介质，广泛应用于各种生物分子特别是各种酶类的分离纯化，包括抗凝血酶III、类凝血酶、人凝血因子IX、XI、VIII、脂蛋白脂肪酶、胶原酶、DNA聚合酶等；也能和人白介素、人前列腺生长因子、重组人血管内皮生长因子、软骨生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、重组人酸性成纤维细胞生长因子、重组肝细胞生长因子、重组鼠肝素辅因子II、重组人血小板第四因子、重组人内皮抑素、重组人角质细胞生长因子等生物大分子结合。该介质具有物理及化学稳定、配基不易脱落、使用寿命长、应用范围广泛，容易放大等特点。

## 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 <sup>+</sup>	45~165 $\mu$ m（平均颗粒大小90 $\mu$ m）
功能基团	肝素
配基密度	~4mg Heparin 配基/mL介质
动态载量	$\geq 2.0$ mg bovine AT III/ mL填装介质
化学稳定性	常见水相溶液：8M尿素、6M盐酸胍、0.1M NaOH、4M NaCl、0.05M NaAc（pH4.0）、0.05M NaAc（pH5.0）、0.05M NaAc+20%乙醇（pH7.0）、0.1M NaOH
压力流速	250~400cm/h（0.1MPa BXK50/30 H=25cm 20 $^{\circ}$ C）
pH稳定性	4~13(CIP)，4~12(工作)
温度耐受性	使用温度2~30 $^{\circ}$ C，不能冻结
耐压	0.3MPa
储存 <sup>++</sup>	2~30 $^{\circ}$ C，20%乙醇或2%苯甲醇、含50mM NaAc
推荐流速范围	60~300cm/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

++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 Heparin Bestarose FF 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（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，可将装柱压力设定为 0.15MPa，打开层析柱底阀/堵头，启动泵，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，按照上述压力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

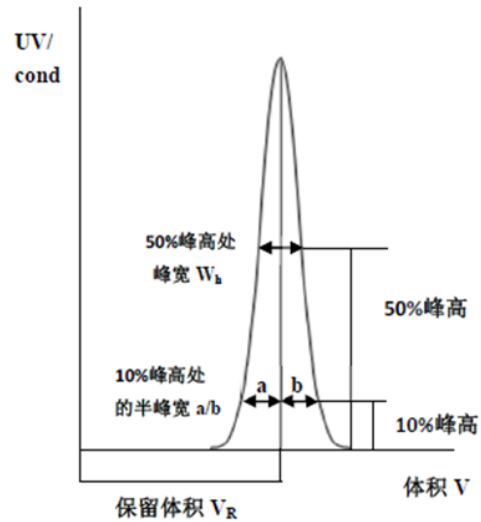
$V_R$ 和 $W_h$ 的单位应一致;

$$As=b/a$$

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:

➤ 结合缓冲液: 20~50mM PB 或 Tris, pH7.4~8.0, 可以加入 0.15M NaCl 抑制非特异吸附。

➤ 洗脱缓冲液: 20~50mM PB 或 Tris, 1~2M NaCl, pH7.4~8.0, NaCl 浓度需要根据目标蛋白的结合力进行适当调整。

● 流速: 根据柱子的高度一般选用 60~300cm/h 的流速, 柱高越大流速越慢。

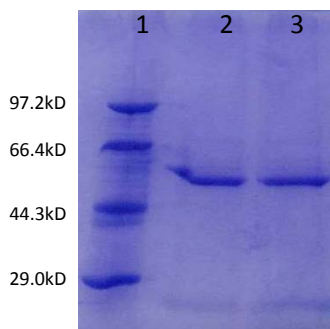
● 样品准备: 为防止样品堵塞柱子, 在上样前样品需要用 0.45μm 的微孔滤膜过滤, 并将样品的 pH 和电导调整到与平衡缓冲液一致, 根据样品中的杂质含量和 Heparin Bestarose FF 的结合载量确定上样体积进行上样。

● 清洗: 用平衡缓冲液清洗层析柱至出口处紫外吸收接近基线。

- 洗脱：可以采用线性梯度或者步级梯度增加洗脱液中的洗脱强度，将不同结合强度的物质从层析柱中洗脱下来。
- 再生：用含有高浓度的盐（如 2M NaCl）平衡缓冲液清洗层析柱。
- 再平衡：用平衡缓冲液清洗，待 pH 和电导率与平衡缓冲液基本一致，就可以进行第二次上样，如此重复。

## 4、应用实例

### Heparin Bestarose FF 纯化某动物源抗凝血酶 III



层析柱及介质：EzFast 1mL, Heparin Bestarose FF

样品：某动物血浆

结合缓冲液：0.1M Tris, 0.15M NaCl, pH7.4

清洗缓冲液：0.1M Tris, 0.33M NaCl, pH7.4

洗脱缓冲液：0.1M Tris, 2.0M NaCl, pH7.4

点样顺序：

泳道 1：小分子蛋白 Marker

泳道 2/3：洗脱缓冲液洗脱样品

## 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）。

对于不同类型的杂质和污染物建议清洗条件如下：

- 离子键结合蛋白的去除：先用 3~5 个柱体积 2M NaCl 清洗，后用 3~5 个柱体积纯水清洗。
- 沉淀或变性蛋白的去除：先用 2 个柱体积 0.1M NaOH 清洗，后用 5~10 个柱体积纯水清洗，也可用 6M 盐酸胍或 8M 尿素清洗。
- 疏水性结合的蛋白的去除：0.1~0.5%的非离子去污剂清洗，后用 3~5 个柱体积纯水清洗。

**注：在位清洗过程中流速可选择 30~60cm/h，建议采用反向清洗。**

清洗后如立即使用，用平衡缓冲液清洗 3~5 个柱体积后使用；如短期内不使用则用 20%乙醇溶液清洗 3~5 个柱体积将其保存。

## 6、灭菌

由于含有 50mM 醋酸钠的 20%乙醇或 2%苯甲醇保存液不具有杀菌、除热原作用，建议 Heparin Bestarose FF 介质在使用前及使用过程中，可以采用 70%乙醇处理 12h 以上，以减少微生物污染风险。

## 7、储存

Heparin Bestarose FF 介质以含有 50mM 醋酸钠的 20%乙醇或 2%苯甲醇为保存液进行销售。使用后的 Heparin Bestarose FF 应储存于含有 50mM 醋酸钠的 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 Heparin Bestarose FF 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
Heparin Bestarose FF	AA212305	25mL
	AA212307	100mL
	AA212311	500mL
	AA0253	1L
	AA0254	5L
	AA212314	10L

预装柱名称	货号	包装
EzFast Heparin FF	EA212301	1×1mL
	EA212303	1×5mL
	EA212351	5×1mL
	EA212353	5×5mL
EzScreen Heparin FF	EA02525	1×4.6mL
	EA02535	5×4.6mL
EzLoad 16/10 Heparin FF	EA212304	1 根
EzLoad 26/10 Heparin FF	EA212306	1 根