



**BESTCHROM**

博 格 隆

**Benzamidine Bestarose 4FF (LS)**  
**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、应用实例 .....	5
5、在位清洗 .....	5
6、灭菌 .....	5
7、储存 .....	6
8、销毁及回收 .....	6
9、订货信息 .....	6

## 1、产品简介

Benzamidine Bestarose 4FF(LS)是将对氨基苯甲脒偶联到琼脂糖凝胶 Bestarose 4FF上而制成一种亲和层析介质，常用于丝氨酸蛋白酶的分离纯化或者从生物样品中去除丝氨酸蛋白酶。苯甲脒类物质是丝氨酸蛋白酶（如胰蛋白酶、凝血酶、尿激酶、激肽释放酶、前激肽释放酶等）的广谱抑制剂，可以作为纯化这类物质的配基。

## 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
平均颗粒大小	90 $\mu$ m
功能基团	对氨基苯甲脒
动态载量	20~26mg胰蛋白酶/mL填装介质
耐压	0.3 MPa
压力流速	>150cm/h（0.1MPa BXK50/30 H=25cm）
化学稳定性	所有常用水溶性缓冲液中稳定
pH稳定性	1~9（CIP），2~8（工作）
储存 <sup>+</sup>	2~8 $^{\circ}$ C，20%乙醇或2%苯甲醇，50mM NaAc pH 4.0
推荐流速范围	30~300cm/h

+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 Benzamidine Bestarose 4FF(LS)的量。

需要的沉降介质体积=柱体积 $\times$ 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 $\div$ 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 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 (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。
- ◇ 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, 可设定装柱压力为 0.1MPa, 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



上述装柱压力，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<sub>R</sub>=保留体积

W<sub>h</sub>=半高峰宽

L=柱高

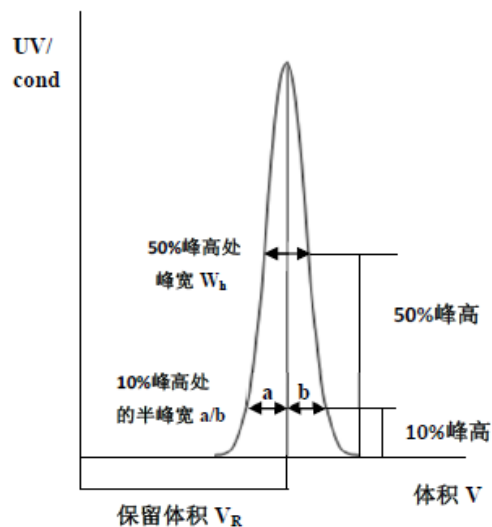
N=理论塔板数

V<sub>R</sub>和W<sub>h</sub>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

- 为了避免堵塞层析柱，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。

- 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，并影响结合效率。

- 结合缓冲液：一般选用中性缓冲液，如 50mM Tris、0.5M NaCl，pH 7.4。

- 流速：推荐使用 30~300cm/h 流速。

- 样品准备：将样品的 pH 和电导调整到与平衡缓冲液一致，根据样品中的杂质含量、流速等确定上样体积。

- 用结合缓冲液清洗到紫外吸收值降到适当的值。

- 洗脱方式 1：常用降低 pH 进行洗脱，如：50mM 甘氨酸，pH3.0。

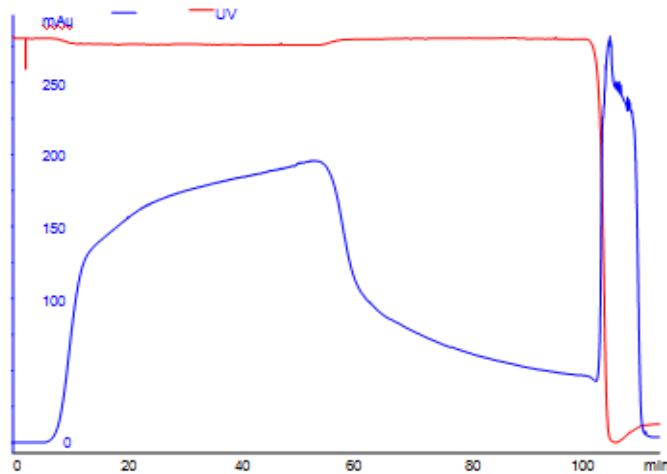
**收集的洗脱立即用 1M Tris，pH9 中和，1mL 洗脱需 60~200 $\mu$ l 1M Tris。**

- 洗脱方式 2：也可以选择用加入对氨基苯甲脒进行竞争性洗脱，如 50mM Tris、0.5M NaCl、20mM 对氨基苯甲脒，pH7.4。

- 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，0.5MNaCl，pH3)交替洗涤三次；10 个柱体积结合缓冲液平衡层析柱。

## 4、应用实例

### Benzamidine Bestarose 4FF(LS)纯化胰蛋白酶的应用



层析柱: EzFast 5mL

样品: 胰糜蛋白酶混合物

平衡液: 50mM PB、500mM NaCl, pH 7.0

洗脱缓冲液: 0.1M Gly, pH 2.7

**注:** 收集洗脱液后立即向每毫升洗脱液  
中加入 60~200 $\mu$ l 1M Tris-HCl, pH9.0。

## 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:

➤ 沉淀或变性物质清洗:

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。

➤ 疏水结合物质的清洗:

用 2 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

由于含有 50mM 醋酸钠的 20% 乙醇或 2% 苯甲醇 (pH 4.0) 保存液不具有杀菌、除热原作用, 建议 Benzamidine Bestarose 4FF(LS) 在使用前及使用过程中, 可以采用含有 0.1M 醋酸的 20% 乙醇处理 12h 以上, 以减少微生物污染风险。

## 7、储存

Benzamidine Bestarose 4FF(LS)用含有 50mM 醋酸钠的 20%乙醇或 2%苯甲醇 (pH 4.0) 为保存液进行销售。使用后的 Benzamidine Bestarose 4FF(LS) 应储存于含有 50mM 醋酸钠的 20%乙醇 (pH 4.0) 溶液中, 2~8℃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 Benzamidine Bestarose 4FF(LS)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
Benzamidine Bestarose 4FF(LS)	AA0341	25mL
	AA0342	100mL
	AA0343	500mL
	AA0344	1L
	AA0345	5L
	AA0346	10L

预装柱名称	货号	包装
EzFast Benzamidine 4FF(LS)	EA03421	1×1mL
	EA03423	1×5mL
	EA03431	5×1mL
	EA03433	5×5mL
EzScreen Benzamidine 4FF(LS)	EA03425	1×4.6mL
	EA03435	5×4.6mL
EzLoad 16/10 Benzamidine 4FF(LS)	EA03401	1 根
EzLoad 26/10 Benzamidine 4FF(LS)	EA03411	1 根