



BESTCHROM

博 格 隆

Diamond Blue 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、在位清洗	5
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

Diamond Blue 是一种以细颗粒高刚性琼脂糖为基架的亲介质，配基是 Cibacron Blue 3GA，具有物理及化学稳定、配基不易脱落、使用寿命长、应用范围广泛的特点。这种介质不仅能通过特异的相互作用与蛋白质结合，也可以通过电荷等作用与蛋白质进行非特异性结合。Diamond Blue 已被广泛应用于各种蛋白质的分离纯化领域，如脱氢酶、激酶、转移酶、血清白蛋白、干扰素及血浆蛋白等。

与 Blue Bestarose FF 相比，Diamond Blue 压力流速性能更好、载量更高，有利于提高工艺效率和过程成本。

2、技术参数

外观	蓝色浆状物，放置可分层
基架	高度交联的刚性琼脂糖
平均颗粒大小 ⁺	75 μ m
功能基团	Cibacron Blue 3GA
配基密度	~13 μ mol 发色团/mL介质
动态载量 ⁺⁺	≥24mg HSA/mL填装介质
化学稳定性	40 $^{\circ}$ C 1周: 10mM HCl, 0.1M NaOH, 8M尿素, 6M 盐酸胍; 40 $^{\circ}$ C 12h: 1M NaOH, 70%乙酸
耐压	0.5MPa
压力流速	≥1200cm/h (0.5MPa BXK 100/500 H=20 cm 20 $^{\circ}$ C)
pH稳定性	2~13 (CIP), 2~13 (工作)
温度耐受性	使用温度2~40 $^{\circ}$ C, 不能冻结
储存 ⁺⁺⁺	2~8 $^{\circ}$ C, 20%乙醇或2%苯甲醇, 0.1M KH ₂ PO ₄ pH8.0

+平均颗粒大小是填料体积分布累计的中值粒径

++接触时间: 4min

+++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温度平衡到室温。

- 用量计算：根据计划装填的层析柱的柱体积计算需要的 Diamond Blue 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+0.4M NaCl）/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 750cm/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

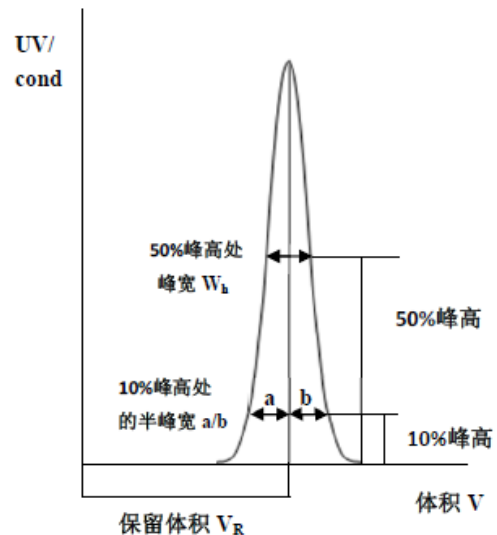
V_R 和 W_h 的单位应一致；

$$As=b/a$$

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

● 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 0.45μm 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

- 低 pH 的结合缓冲液能促进蛋白的结合，一般情况下 pH 范围在 5.5~8.5 之间为宜。
- 低离子强度的平衡缓冲液能促进蛋白的结合，结合缓冲液的浓度在 5~50mmol/L



之间为宜。

- 金属离子的存在也会使蛋白结合能力增强，将 0.1~10mmol/L 的金属离子（如 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Al^{3+} ）加入到缓冲液中能够增强蛋白质的结合。
- 流速：根据柱子的高度一般选用 90~500cm/h 的流速，柱高越大流速越慢。
- 样品准备：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 和电导率调整到与结合缓冲液一致，根据样品中的杂质含量、Diamond Blue 的结合载量、流速、温度等确定上样体积。
- 平衡：用平衡缓冲液清洗层析柱至紫外吸收值降到适当的值。
- 上样：将准备好的样品溶液按照设定程序进行上样。
- 清洗：用结合缓冲液清洗到紫外吸收值降到适当的值。
- 洗脱：可以采用以下一种或者几种方式配合来洗脱结合的蛋白质
 - 改变洗脱缓冲液的离子强度，通过提高缓冲液中盐（KCl 和 NaCl）的浓度。
 - 改变洗脱缓冲液的 pH。
 - 改变洗脱缓冲液的极性，如加入 50%乙二醇、10%二氧杂环乙烷或其他有机溶剂。
 - 加入合适浓度的特异配基如酶的底物、酶底物生成物、辅因子、抑制剂和活化剂。
- 再生：可以采用高 pH（0.1M Tris，0.5M NaCl，pH8.5）和低 pH（0.1M NaAc，0.5M NaCl，pH4.5）交替清洗方式来去除结合较强的蛋白质使层析柱再生。

4、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）。

- 变性蛋白去除：用 0.5M NaOH 清洗 3~4 个柱体积，然后用 70%乙醇或者 2M 硫氰酸钾清洗 3~4 个柱体积；或者用 6M 盐酸胍清洗 2~3 个柱体积；然后立即用至少 5 个柱体积的平衡缓冲液清洗。
- 强疏水性物质或者脂类去除：用 2~4 个柱体积 70%乙醇或 30%异丙醇洗涤柱子，

立即用至少 5 个柱体积的平衡缓冲液清洗。

5、灭菌

由于含有 0.1M KH_2PO_4 的 20% 乙醇或 2% 苯甲醇 (pH 8.0) 保存液不具有杀菌、除热原作用, 建议 Diamond Blue 介质在使用前及使用过程中, 可以用 70% 乙醇处理 12h 以减少微生物污染风险, 也可以用 121°C 在纯化水中灭菌 15min 来达到灭菌的目的。

6、储存

Diamond Blue 介质以含有 0.1M KH_2PO_4 的 20% 乙醇或 2% 苯甲醇 (pH 8.0) 为保存液进行销售。使用后的 Diamond Blue 应储存于含有 0.1M KH_2PO_4 的 20% 乙醇 (pH 8.0) 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。

7、销毁及回收

由于 Diamond Blue 在自然界很难降解, 为了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
Diamond Blue	AA310305	25mL
	AA310307	100mL
	AA310311	500mL
	AA310312	1L
	AA310313	5L
	AA310314	10L

预装柱名称	货号	包装
EzFast Diamond Blue	EA310301	1×1mL
	EA310303	1×5mL
	EA310351	5×1mL
	EA310353	5×5mL
EzScreen Diamond Blue	EA04025	1×4.6mL
	EA04035	5×4.6mL
EzLoad 16/10 Diamond Blue	EA310304	1 根
EzLoad 26/10 Diamond Blue	EA310306	1 根