



BESTCHROM

博 格 隆

Bestarose 4FF
Bestarose 6FF
琼脂糖凝胶
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

Bestarose 4FF (Fast Flow) 和 Bestarose 6FF 分别为 4% 和 6% 的琼脂糖经过乳化、清洗、交联、分筛而成的凝胶过滤介质，由于其具有广泛的分离范围，用于多糖、核酸、病毒等生物大分子的分离纯化或者检测，该介质也经常作为亲和、疏水、离子交换层析的基架。Bestarose 4FF 和 Bestarose 6FF 是在 Bestarose 4B 和 Bestarose 6B 的凝胶基础上用双功能交联剂交联而成的，交联程度比 Bestarose CL-4B 和 Bestarose CL-6B 高，物理化学性能更稳定，该类介质可以耐受 121°C 高压灭菌，流速快，适合在大规模分离纯化中应用。

2、技术参数

产品名称		Bestarose 4FF	Bestarose 6FF
外观		白色浆状物，放置可分层	
琼脂糖浓度		4%	6%
分离范围	线性分子	30KD~5000KD	10KD~1000KD
	球状分子	60KD~20000KD	10KD~4000KD
颗粒大小 ⁺		45~165μm	
平均颗粒大小		90μm	
压力流速 ⁺⁺		200-300cm/h (0.1MPa B XK50/60, H=25cm, 20°C, 水中)	≥200cm/h (0.1MPa B XK50/60, H=25cm, 20°C, 水中)
耐压		0.3MPa (3bar)	
pH稳定性		2~14 (CIP), 2~12 (工作)	
化学稳定性		常见水相溶液: 0.5M NaOH ⁺⁺⁺ 、2M NaOH ⁺⁺⁺ 、6M 盐酸胍、8M 尿素、1M 乙酸、30% 乙腈	常见水相溶液: 0.5M NaOH ⁺⁺⁺ 、2M NaOH ⁺⁺⁺ 、1.0M 醋酸、30% 乙腈、8M 尿素、6M 盐酸胍
灭菌		耐受121°C, 20min灭菌	
储存 ⁺⁺⁺		2~30°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

++压力流速为特定压力下压力和流速的关系，所给出的压力不应被视为介质的最大耐受压力



+++0.5M NaOH 和 2M NaOH 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至室温。

- 用量计算：根据计划装填的层析柱的柱体积计算需要的 Bestarose 4FF 和 Bestarose 6FF 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(%)
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 BXK16/70 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 60cm 时，可将 Bestarose 4FF 、Bestarose 6FF 的装柱流速设定为 30cm/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（Bestarose 4FF 为 150cm/h，Bestarose 6FF 为 480cm/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 A_s 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 (A_s), 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

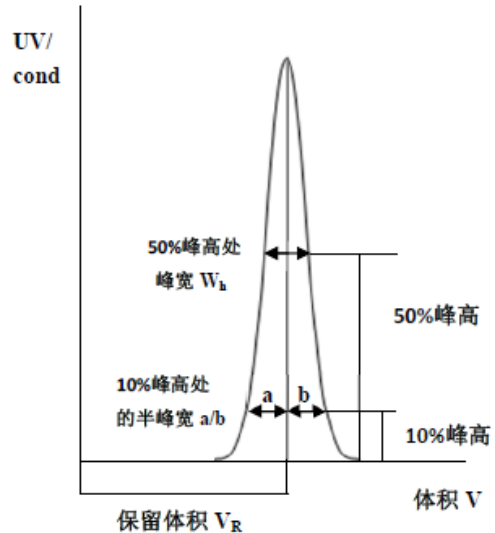
V_R 和 W_h 的单位应一致;

$$A_s=b/a$$

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 0.8~1.5 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 层析过程推荐

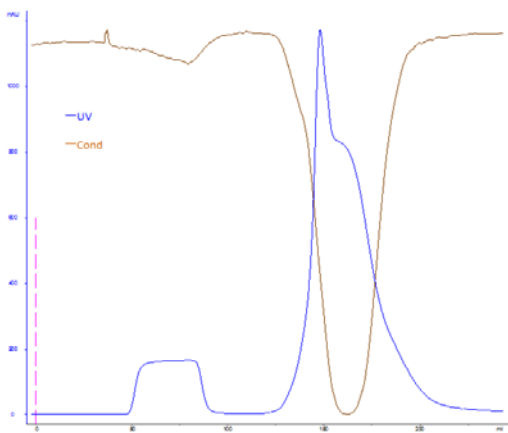
- 样品准备: 为防止样品堵塞柱子, 在上样前样品需要用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 并将样品的 pH 和电导率调整到与平衡缓冲液一致 (可以采用稀释、超滤以及用 Bestdex G-25 置换缓冲液的方式调整样品的 pH 和电导率)。
- 平衡: 采用推荐的流速用平衡缓冲液冲洗层析柱, 平衡缓冲液的选择取决于样品的稳定性, 缓冲液的种类及 pH 对凝胶过滤的效果影响不大, 但是琼脂糖中含有少量硫酸根和羧基, 为了减少对碱性蛋白样品的非特异性吸附, 建议在平衡缓冲液中加入至少 0.15M 的 NaCl。待出口的缓冲液的 pH 和电导与进入层析柱之前的缓冲液一致即表示层析柱平衡完成, 一般需要 2~5 个柱体积。
- 上样: 通过层析系统的上样环等装置将样品加载到层析柱上, 上样的体积根据目的物和杂质的差别大小会有所不同, 一般上样 0.5~5% 柱体积的样品量, 根据分离效果可以适当调整上样体积, 最大上样 30% 柱体积。



- 分离：继续用平衡缓冲液冲洗层析柱，收集流出的不同组分，至不再有生物分子流出，一般需要 1~1.5 个柱体积。
- 再生：用平衡缓冲液冲洗层析柱 2~3 个柱体积。
- 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

Bestarose 6FF 在DNA纯化中去除RNA



层析柱： BXK26/40
柱床高度： 28cm
缓冲液： 2.1 M (NH₄)₂SO₄
10 mM EDTA+100 mMTris pH7.50
上样量： 40mL
流速： 8mL/min

5、在位清洗

Bestarose 4FF 和 Bestarose 6FF 在某些工艺过程中，有变性蛋白、脂质、强疏水蛋白等在再生过程中不能洗脱，或者使用一段时间后有可能柱效下降、反压增加、分离效果变差、层析介质颜色变化等，可采用下面的流程进行在位清洗(CIP)。

- 结合比较紧密蛋白的去除：用1M NaCl 冲洗1个柱体积。
- 强疏水性蛋白、沉淀蛋白的去除：先用0.5M NaOH 清洗1个柱体积，然后立即用5~10个柱体积纯水冲洗。
- 脂蛋白和脂类物质的去除：先用2~3个柱体积的70%乙醇或30%异丙醇清洗，后用5~10个柱体积纯水冲洗。

注：70%乙醇或30%异丙醇使用前应进行脱气处理；堵塞严重的时候可以采用反向清洗。

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 Bestarose 4FF 和 Bestarose 6FF 介质在使用前及使用过程中，可以采用 0.5~1M NaOH 按推荐流速洗涤已装填好的层析柱以减少微生物污染风险，也可用 121℃，20min 高温灭菌。

7、储存

Bestarose 4FF 和 Bestarose 6FF 用 20%乙醇或 2%苯甲醇为保存液进行销售。使用后的 Bestarose 4FF 和 Bestarose 6FF 应储存于 20%乙醇中、2~30℃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

Bestarose 4FF 和 Bestarose 6FF 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
Bestarose 4FF	AG0052	100mL
	AG0053	500mL
	AG0054	1L
	AG0055	5L
	AG0056	10L
	AG2157	20L
	AG214316	40L
Bestarose 6FF	AG0062	100mL
	AG0063	500mL
	AG0064	1L
	AG0065	5L
	AG0066	10L
	AG2167	20L
	AG215316	40L



预装柱名称	货号	包装
EzLoad 16/60 Bestarose 4FF	EG214301	1 根
EzLoad 26/60 Bestarose 4FF	EG214302	1 根
EzLoad 16/90 Bestarose 4FF	EG027	1 根
EzLoad 26/90 Bestarose 4FF	EG00513	1 根
EzLoad 16/60 Bestarose 6FF	EG215301	1 根
EzLoad 26/60 Bestarose 6FF	EG215302	1 根
EzLoad 16/90 Bestarose 6FF	EG028	1 根
EzLoad 26/90 Bestarose 6FF	EG00613	1 根