



BESTCHROM

博 格 隆

Diamond Phenyl Mustang

高流速高分辨率疏水层析介质

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	6
6、灭菌	7
7、储存	7
8、销毁及回收	7
9、订货信息	7

1、产品简介

疏水作用层析（hydrophobic interaction chromatography, HIC）是利用生物分子所带有的疏水基团和固定相上的疏水配基之间的相互作用来分离物质的一种层析方法，盐离子可以破坏生物分子表面的水化膜，促进疏水基团和配基之间的结合。
Diamond Phenyl Mustang 是以细颗粒高刚性琼脂糖为基架配合疏水性较强的苯基基团，分辨率高、反压低适合于蛋白下游纯化的中度纯化阶段和精细纯化阶段。

2、技术参数

外观	白色浆状物，放置可分层
基架	高度交联的刚性琼脂糖
功能基团	苯基
平均颗粒大小	36~44 μ m
疏水性	Lysozyme保留时间45~50min
动态载量	~19mg BSA/mL填装介质
耐压	0.5MPa
压力流速	\geq 450cm/h（0.5MPa BXK 100/500 H=20cm 20 $^{\circ}$ C）
化学稳定性	常见水相溶液：2M NaOH ⁺ 、0.5M NaOH ⁺ 、1M HAc ⁺ 、6M 盐酸胍、8M 尿素、30% 异丙醇、30% 乙腈、2% SDS、3M (NH ₄) ₂ SO ₄ + 0.1M KH ₂ PO ₄ （pH7.0）
pH稳定性	2~14（CIP），3~13（工作）
温度耐受性	使用温度2~40 $^{\circ}$ C，不能冻结，耐受121 $^{\circ}$ C、20min灭菌
储存 ⁺⁺	2~30 $^{\circ}$ C, 20% 乙醇或2% 苯甲醇
推荐流速范围	90~180cm/h

+NaOH 和 1M HAc 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 Phenyl Mustang 的量。

需要的的沉降介质体积=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。

说明：疏水作用介质纯化生物大分子是一种典型的高选择性技术，在任何特定的离子强度下，待分离物质的滞留情况差异都可能很大。因此，如果想最优化的使用疏水介质的选择性，可以使用相对较短的柱。典型的柱床高度范围从 3cm 到 15cm，这样既可以保证高流速，也可以避免反压过大。



- 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，可设定装柱流速为 600cm/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，然后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，按照压缩比 1.15 下压胶面，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

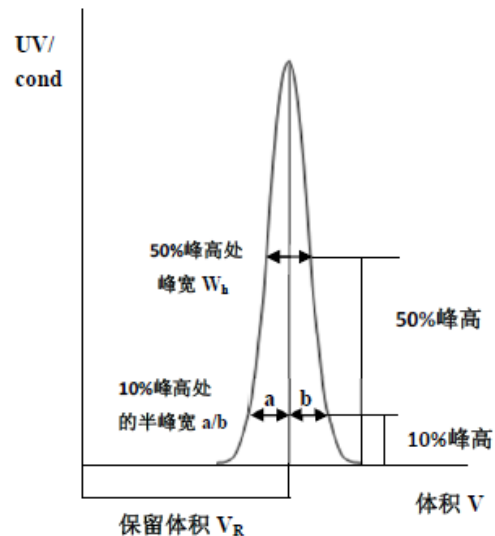
V_R 和 W_h 的单位应一致；

$$As=b/a$$

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

注意：温度对疏水层析的影响比较大，低温条件下疏水性较弱，因此在实验过程中应保持环境、缓冲液以及样品的温度一致才能保证疏水层析的重复性。一般控制在 22~24°C。



- 缓冲液选择：结合缓冲液通常选用含有高浓度盐的磷酸盐缓冲液，如 20mM PB，1.5M (NH₄)₂SO₄，pH7.0。洗脱缓冲液通常选用不含其他盐类的磷酸盐缓冲液，如 50mM PB pH7.0，需要根据后续的实验结果（目的物是否有沉淀、目的物的结合强弱、回收率、分离度等）对结合缓冲液中的盐的浓度和类型进行调整。对于较难洗脱的物质可以采用纯水，或者在纯水中加入低浓度乙醇作为洗脱液。
- 样品准备：需要将样品的 pH 和电导率调整到与结合缓冲液一致，并且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，根据样品中的物质含量、Diamond Phenyl Mustang 的配基密度以及所选缓冲液情况等确定上样体积。

蛋白质与疏水介质的结合强度受配基结构、配基浓度、缓冲液的离子强度、盐析效应（见以下霍夫迈斯特序列）、温度等影响。

霍夫迈斯特序列：

← 盐析效应递增

阴离子：PO₄³⁻、SO₄²⁻、CH₃COO⁻、Cl⁻、Br⁻、NO₃⁻、ClO₄⁻、I⁻、SCN⁻

阳离子：NH₄⁺、Rb⁺、K⁺、Na⁺、Cs⁺、Li⁺、Mg²⁺、Ba²⁺

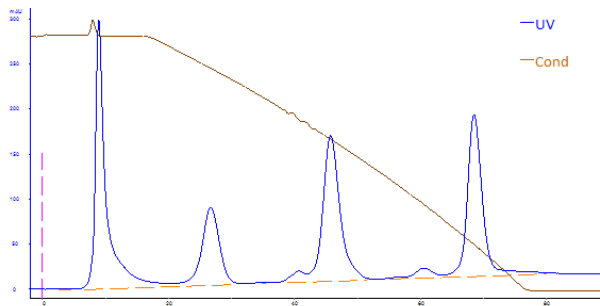
→ 盐溶效应递增

增加盐析效应疏水作用增强，增加盐溶效应疏水作用减弱。

- 平衡：用平衡缓冲液清洗层析柱至出口处缓冲液的 pH 和电导率与平衡缓冲液基本一致，通常需要 3~5 个柱床体积。
- 上样：将准备好的样品按照设定条件进行上样。
- 清洗：用平衡缓冲液清洗层析柱至紫外吸收接近基线。
- 洗脱：可以采用线性梯度或者步级梯度增加或降低洗脱液中的盐离子强度、在缓冲液中加入洗涤剂的方法，将不同结合强度的物质从层析柱中洗脱下来，收集不同的组分，检测目的物所在的位置。
- 再生：用纯化水或者 30% 异丙醇（70% 乙醇）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

用 Diamond Phenyl Mustang 分离细胞色素 C、RNA 酶、溶菌酶、 α -胰凝乳蛋白酶原



层析柱: BHR 10/17

缓冲液 A: 0.1M KH_2PO_4 + 1.7M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

pH 7.0

缓冲液 B: 0.1M KH_2PO_4 pH 7.0

样品: 细胞色素 C 1mg/mL

RNA 酶 3mg/mL

溶菌酶 1mg/mL

α -胰凝乳蛋白酶原 1mg/mL

流速: 1mL/min

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:

- 结合比较紧密蛋白的去除: 用 2~3 个柱体积的纯化水清洗。
- 强疏水性蛋白、沉淀蛋白的去除: 先用 2~3 个柱体积 1M NaOH 清洗, 然后立即用 5~10 个柱体积纯化水清洗。
- 脂蛋白和脂类物质的去除: 先用 5~10 个柱体积的 70% 乙醇或 30% 异丙醇清洗, 然后用 5~10 个柱体积纯化水清洗。
- 也可将上述两种清洗条件结合进行清洗, 如用含有 1M NaOH 的 30% 异丙醇溶液清洗。

注: 70%乙醇或 30%异丙醇使用前应进行脱气处理; 在位清洗过程中流速可选择 30~60cm/h; 堵塞严重的时候可以采用反向清洗。

实验室型 BXK 小柱子的塑料外壳不耐受 70%乙醇等有机溶剂, 在使用过程中注意不要使有机溶剂洒到外壳上。

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 Diamond Phenyl Mustang 介质在使用前及使用过程中，可以采用 1M NaOH 处理 0.5~1h 以减少微生物污染风险，也可用 121℃、20min 高温灭菌。

7、储存

Diamond Phenyl Mustang 用 20%乙醇或 2%苯甲醇为保存液进行销售。使用后的 Diamond Phenyl Mustang 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

由于 Diamond Phenyl Mustang 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
Diamond Phenyl Mustang	AH301205	25mL
	AH301207	100mL
	AH301211	500mL
	AH301212	1L
	AH301213	5L
	AH301214	10L
	AH301215	20L
	AH301216	40L



预装柱名称	货号	包装
EzFast Phenyl Mustang	EH01421	1×1mL
	EH321251	5×1mL
	EH321203	1×5mL
	EH321253	5×5mL
EzScreen Phenyl Mustang	EH01425	1×4.6mL
	EH01435	5×4.6mL
EzLoad 16/10 Phenyl Mustang	EH301204	1 根
EzLoad 26/10 Phenyl Mustang	EH301206	1 根