



BESTCHROM

博 格 隆

Diamond Layer 400、Layer 700
多模式层析介质
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	6
6、灭菌	6
7、储存	6
8、销毁及回收	6
9、订货信息	7

1、产品简介

Diamond Layer 400和Diamond Layer 700是新型的多模式纯化层析介质，专为病毒和其它生物大分子的中间纯化和精细纯化而设计的。介质具有双层结构，核心微球和薄层外壳，核心微球是辛胺配基交联到高刚性琼脂糖上制备而成，具有阴离子和疏水作用；薄层外壳是一层不带配基的琼脂糖结构，具有分子筛作用。纯化过程中，病毒等大分子不能通过外壳进入微球内部，因此直接流穿，大部分杂质可以进入微球内部通过离子和疏水作用结合在介质上。这些特点使得Diamond Layer 400和Diamond Layer 700介质成为疫苗生产中病毒纯化介质的极佳选择。分子量排阻分别为400KD和700KD，小于对应分子量的生物分子能够进入微球内部与配基基团结合，大于对应分子量的生物分子会被阻隔在微球外流穿通过层析柱。

Diamond Layer 400 和 Diamond Layer 700 介质的主要特性包括：

- 微球的双层结构，使介质可以有效的吸附杂质，而目的蛋白流穿，以此达到纯化的效果。
- 由于目的物的流穿，杂质以疏水和离子模式结合，操作条件比较广泛。
- 与常规分子筛介质相比，样品上样量高以及高流速使得生产效率显著提高。

2、技术参数

产品	Diamond Layer 400	Diamond Layer 700
基架	高刚性琼脂糖	
功能基团	辛胺	
平均颗粒大小 ⁺	90μm	85μm
动态载量	~22mg卵清蛋白/mL填装介质	~13mg卵清蛋白/mL填装介质
平均分子量排阻	$M_r \approx 400\ 000$	$M_r \approx 700\ 000$
压力流速	$\geq 700\text{cm/h}$, <2bar, BXK300, H=20cm	$\geq 500\text{cm/h}$, <2bar, BXK300, H=20cm
化学稳定性	常见水相溶液：1M NaOH ⁺⁺ 、1M HAc ⁺⁺ 、70%乙醇、20%乙醇、30%异丙醇、6M盐酸胍、0.5%吐温80、1MNaOH+30%异丙醇	
pH稳定性	2~14（CIP），3~13（工作）	



储存+++	2~30℃，20%乙醇或2%苯甲醇
注意事项	避免与氧化剂、柠檬酸缓冲液接触

+平均颗粒大小是填料体积分布累计的中值粒径

++1M 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介质的量。

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 Diamond Layer 400 装柱流速设为 450cm/h、Diamond Layer 700 装柱流速设为 300cm/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NaCl作为样品进行测定，按照下表配制样品溶液和流动相。

NaCl法测柱效	
样品	0.8M NaCl（溶于水）
样品体积	1.0%柱体积
流动相	0.4M NaCl水溶液
流速	30cm/h
检测器	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

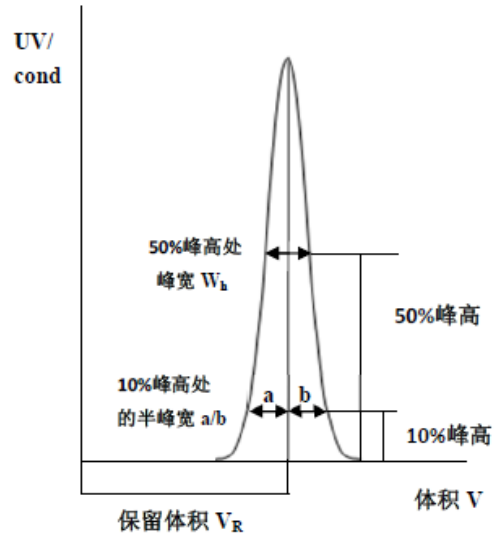
V_R和W_h的单位应一致；

$$As=b/a$$

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。

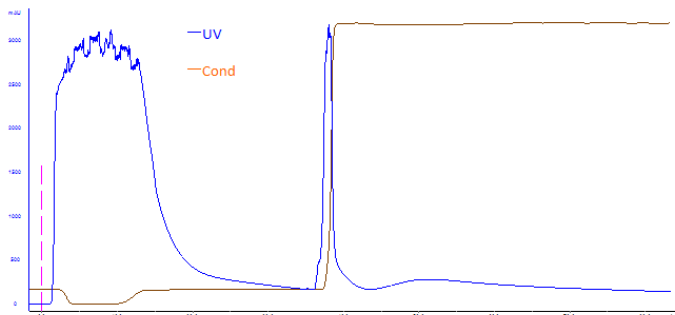
3.3 层析方法

- 缓冲液选择：应选择缓冲基团不与介质作用的缓冲盐，上样 pH 推荐使用 7~9 以结合样品中杂蛋白、核酸等，缓冲物质使用 Tris、PB 等，不推荐使用柠檬酸缓冲液。介质属于阴离子和疏水复合型，因此上样盐浓度可以从 0~1M。具体上样 pH 和盐浓度需要进行优化。
- 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：在某些情况下，DNA 和 RNA 含量太高会影响介质的性能。因此，建议在利用 Diamond Layer 400 或 Diamond Layer 700 进行样品纯化之前，可通过离子交换等操作降低 DNA/RNA 含量或者通过广谱核酸酶将核酸切成小分子。广谱核酸酶可以降解 DNA 或 RNA 使其能进入微球内部与介质结合，同时广谱核酸酶也可以进入微球内部与介质结合。

- 平衡: 用平衡缓冲液清洗层析柱至出口处的缓冲液的 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: 由于 Diamond Layer 400 和 Diamond Layer 700 介质的工作原理是通过将杂质截留在介质内核微孔内, 目的物流穿, 为了确定在保持目标纯度的前提下的最大上样体积, 建议在工艺开发过程中对不同上样量时的流穿进行分析检测, 进而确定上样量, 以提高目的物的回收率、纯度以及纯化效率。
- 清洗: 用平衡缓冲液清洗层析柱将滞留在介质上的杂质洗脱下来至紫外吸收接近基线。
- 再生: 介质上结合的杂质需要用较强的洗脱条件洗脱, 因此每次上样结束后的洗脱条件和 CIP 条件相同, 可参考“5、在位清洗”部分。
- 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。

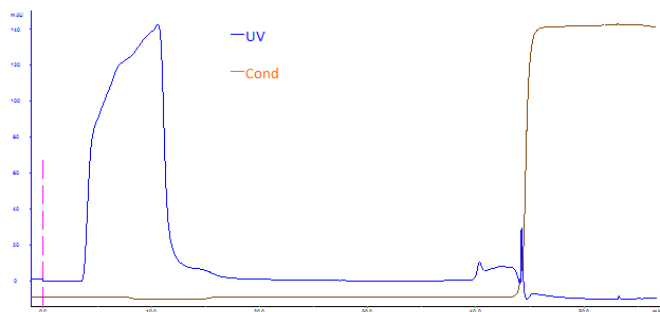
4、应用实例

用 Diamond Layer 400 分离慢病毒



层析柱: EzScreen4.4mL
 缓冲液 A: PBS pH7.5
 缓冲液 B: 1M NaOH+1M NaCl
 样品: 慢病毒
 流速: 0.6mL/min

用 Diamond Layer 700 分离某病毒



层析柱: EzScreen4.4mL
 缓冲液 A: PBS pH7.5
 缓冲液 B: 1M NaOH+1M NaCl
 样品: 病毒
 流速: 0.6mL/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）。

Diamond Layer 400 和 Diamond Layer 700 建议清洗条件如下：

- 用含有 1M NaOH 的 30% 异丙醇或 27% 正丙醇溶液反向清洗约 5 个柱体积。具体浓度以及处理时间需根据样品实际情况进行优化选择。

注：清洗溶液的选择需考虑层析柱材质是否可耐受，以免损坏柱体。

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 Layer 400 和 Diamond Layer 700 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。

7、储存

Diamond Layer 400 和 Diamond Layer 700 用 20% 乙醇或 2% 苯甲醇为保存液进行销售。使用后的 Diamond Layer 400 和 Diamond Layer 700 应储存于 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 Diamond Layer 400 和 Diamond Layer 700 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 Layer 400	AI0471	25mL
	AI0472	100mL
	AI0473	500mL
	AI0474	1L
	AI0475	5L
	AI0476	10L
	AI0477	20L
	AI0478	40L
Diamond Layer 700	AI0461	25mL
	AI0462	100mL
	AI0463	500mL
	AI0464	1L
	AI0465	5L
	AI0466	10L
	AI0467	20L
	AI0468	40L



预装柱名称	货号	包装
EzFast Diamond Layer 400	EI04721	1×1mL
	EI04723	5×1mL
	EI04731	1×5mL
	EI04733	5×5mL
EzScreen Diamond Layer 400	EI04725	1×4.6mL
	EI04735	5×4.6mL
EzLoad 16/10 Diamond Layer 400	EI04701	1 根
EzLoad 26/10 Diamond Layer 400	EI04711	1 根
EzFast Diamond Layer 700	EI04621	1×1mL
	EI04623	5×1mL
	EI04631	1×5mL
	EI04633	5×5mL
EzScreen Diamond Layer 700	EI04625	1×4.6mL
	EI04635	5×4.6mL
EzLoad 16/10 Diamond Layer 700	EI04601	1 根
EzLoad 26/10 Diamond Layer 700	EI04611	1 根