



BESTCHROM

博 格 隆

# BestPoly 30RPC 反相层析介质 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 .....	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

BestPoly 30RPC 是由聚苯乙烯和二乙烯基苯聚合而成的，依靠自身带有的高密度苯环而形成的反相层析介质，与传统的硅胶基架的反相介质相比，BestPoly 反相介质能耐受更高的 pH，颗粒更均匀，具有良好的可放大性，多用于精细纯化阶段。

该介质具有以下特点：

- 粒径分布均一
- 高分辨率
- 耐高 pH、反压低
- 流速快
- 物理及化学性质稳定

## 2、技术参数

外观	白色至微黄色浆状物，放置可分层
基架	聚苯乙烯/二乙烯基苯聚合物
颗粒大小	30 $\mu$ m
动态载量	~23mg杆菌肽/mL填装介质 ~14mgBSA/mL填装介质 ~72mg胰岛素/mL填装介质
化学稳定性	常见水相溶液：1 M NaOH <sup>+</sup> 、1.0 M HCl、1.0 M HCl/90% 甲醇、90% 醋酸、6M 盐酸胍、100% 正丙醇、100% 乙醇、100% 甲醇、100% 丙酮、0.1% TFA(水中)、0.1% TFA (乙腈中)、100% 异丙醇、100% 四氢呋喃
耐压	10MPa
pH稳定性	2~12 (工作)，1~14 (CIP)
温度耐受性	使用温度2~40 $^{\circ}$ C，不能冻结，可在pH7条件下121 $^{\circ}$ C、20min高压灭菌1次
储存 <sup>++</sup>	2~30 $^{\circ}$ C，20% 乙醇或2% 苯甲醇

+1M 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

BestPoly 30RPC 保存在 20%乙醇中，层析柱装填前需要将乙醇溶液替换为装柱液并将介质温度平衡到室温。

由于该介质粒径较小，需要选择带有 5 $\mu$ m 以下筛网且耐压比较高的层析柱（实验室工艺开发阶段可以选择 BXR10 系列层析柱）。

- BestPoly 30RPC 装柱高度根据层析柱类型及尺寸不同，一般在 0-300mm，不宜太高。
- 根据层析柱的体积计算需要的 BestPoly 30RPC 的量  
需要的 BestPoly 30RPC 的沉降介质体积=柱体积 $\times$ 1.1（即压缩比为 1.1）  
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 装柱溶液（25-100%乙醇）/mL 介质中洗涤，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，加入装柱溶液至抽干胶中制成浓度为 25-45%的装柱介质悬液，装柱介质悬液浓度不能太高，否则达不到理想的柱效及对称性。搅匀备用。
- 取清洗干净的层析柱，利用装柱溶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，关掉底部排液阀/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 BXR 柱相同直径的空柱管。**

- ◇ 用装柱液将装柱器加满，确认下堵头已拧紧。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。

**注：此操作仅用于 BXK 50 及以下层析柱。**

- ◇ 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。**

- 对于 BXR10/17 层析柱，用 1.2-1.5MPa 压力装柱，或设置合适的流速，使装柱  
反压为 1.2-1.5MPa。胶面平稳后，将柱头下降至胶面上约 0.2cm 的位置，按照  
上面的流速或压力继续压胶 5min，标记胶面位置。
- 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 0.2cm，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

- 柱效测定可以采用 NaCl 作为指示剂，按照下表配制指示剂溶液和流动相，对于  
柱体积很小的层析柱需特别注意减小系统死体积以得到良好的柱效检测结果。

NaCl法测柱效	
样品	0.8 NaCl（溶于水）
样品体积	1.0%柱体积
流动相	0.4M NaCl水溶液
流速	60cm/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<sub>R</sub>=保留体积

W<sub>h</sub>=半高峰宽

L=柱高

N=理论塔板数

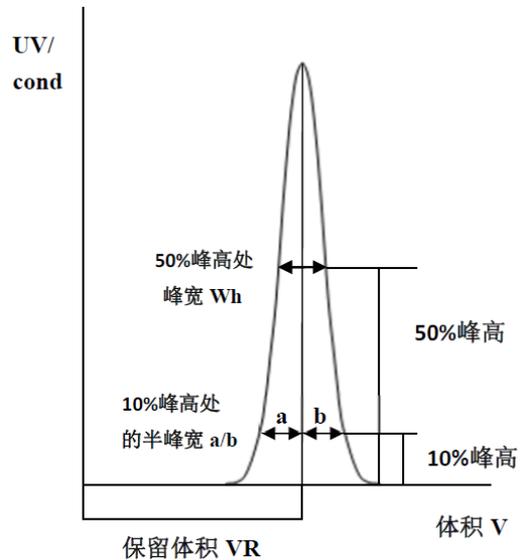
V<sub>R</sub>和W<sub>h</sub>的单位应一致；

$$As=b/a$$

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

由以上公式计算出的非对称因子在 0.8~1.8 则判定为合格。对于不理想的柱效需要分析原因并重新装柱。

**3.3 层析方法**

为了达到良好的纯化效果、收率以及操作简单，需要首先在实验室进行工艺条件优化，优化的主要内容有：

- 有机溶剂的类型和浓度：乙腈通常可以等到较好的分辨率，还具有粘度低和紫外吸收低的优点，但是，由于乙腈具有毒性，所以其使用具有局限性。工艺规模经常将低醇类作为首选，它们价格相对更低，但粘度更高，因此操作时的反压比乙腈更高。

工艺优化阶段需要设定溶剂梯度试验，进行线性梯度洗脱实现所需的分辨率。推荐起始浓度至少 5%的有机溶剂，最终浓度不超过 95%的有机溶剂，因为使用 0%和 100%的有机溶剂需要很长的平衡时间，需要注意的是高有机溶剂浓度下目的蛋白样品有变性和沉淀风险。



- 离子配对剂和溶液的类型和浓度： TFA 是应用最广泛的离子配对剂。它使肽和蛋白质分离效果更好，它具有挥发性，相对容易去除。也可以选用磷酸三乙铵或乙酸乙酯(TEAP, TEAA)代替，不同的离子配对剂具有不同的选择性。

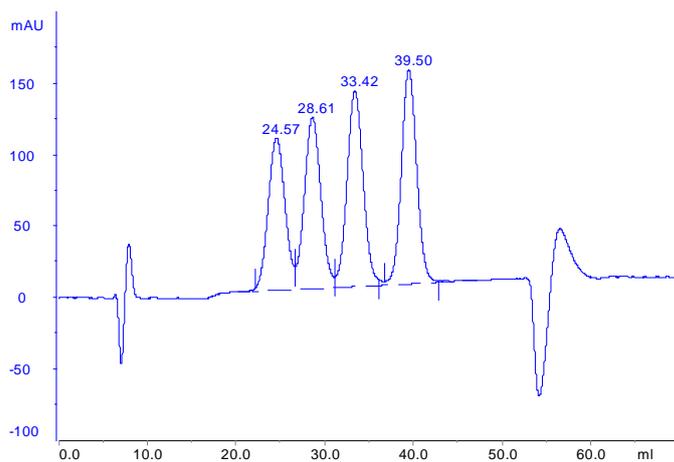
溶液中可加入缓冲成分，如磷酸、乙酸和硫酸铵等。

- pH: 不同的 pH 值可得到不同的分辨率, BestPoly 30RPC 具有良好的 pH 稳定性, 可在 2-12 范围进行 pH 优化。

在实验室规模上对 RPC 步骤进行优化后, 可以对该方法进行放大。放大是通过增加层析柱的直径来实现的, 保持柱床高度、线性流量、样品浓度和体积等参数一致, 按照梯度体积/柱床体积的比例不变, 使层析柱的直径和体积流量增加。

## 4、应用实例

### BestPoly 30RPC分离血管紧张素和分离蛋白



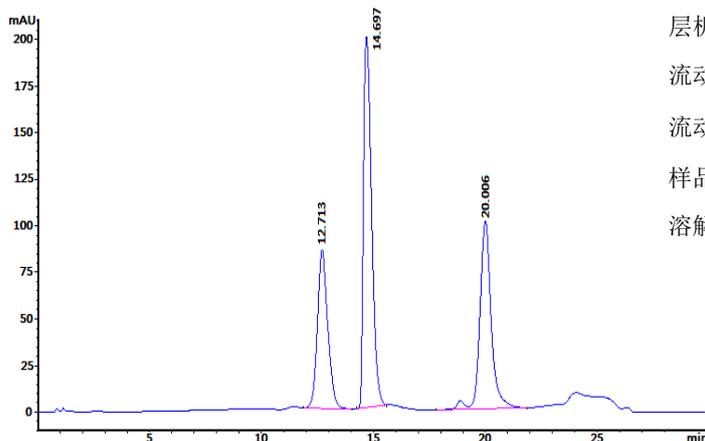
层析柱: BXR10/17

流动相 A: 0.1% 三氟乙酸+水

流动相 B: 60.0% 乙腈, 0.1% 三氟乙酸+水

样品: 血管紧张素 I、血管紧张素 III、(Val<sup>4</sup>)

血管紧张素 III、(Ile<sup>7</sup>)血管紧张素 III



层析柱: BXR10/10

流动相 A: 0.1% 三氟乙酸+水

流动相 B: 60.0% 乙腈, 0.1% 三氟乙酸+水

样品: 牛胰岛素、BSA、RNA 酶三种蛋白  
溶解在 20% 流动相 B 中, 浓度为 5mg/mL

## 5、在位清洗

定期的在位清洗能防止污染物的累积，保持稳定的工作状态，延长介质的使用寿命。

对于不同类型的杂质和污染物建议清洗条件如下：

- 脂蛋白和脂类物质的去除：乙腈或异丙醇清洗。
- 强疏水性蛋白、沉淀蛋白的去除：1M 的氢氧化钠清洗。
- 酸溶性物质去除：90%乙酸或者 1M 盐酸或 3%三氟乙酸清洗。

## 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 BestPoly 30RPC 介质在使用前及使用过程中，可以用 0.5~1M NaOH 洗涤已装填好的层析柱以减少微生物污染风险。

## 7、储存

BestPoly 30RPC 用 20%乙醇或 2%苯甲醇为保存液进行销售。使用后的 BestPoly 30RPC 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 BestPoly 30RPC 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
BestPoly 30RPC	AR400105	25mL
	AR400107	100mL
	AR400111	500mL
	AR400112	1L
	AR400113	5L
	AR400114	10L

预装柱名称	货号	包装
10/15 BestPoly 30RPC	ER00261	1 根
10/10 BestPoly 30RPC	ER00262	1 根
10/20 BestPoly 30RPC	ER00263	1 根
10/25 BestPoly 30RPC	ER00264	1 根
4.6/10 BestPoly 30RPC	ER00265	1 根
4.6/20 BestPoly 30RPC	ER00266	1 根
4.6/25 BestPoly 30RPC	ER00267	1 根