



**BESTCHROM**

博 格 隆

# Diamond Protein L 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、储存 .....	5
6、销毁及回收 .....	5
7、订货信息 .....	6

## 1、产品简介

Diamond Protein L 是将 Protein L 配基同高刚性琼脂糖基架通过环氧活化方式偶联后制成的一种新型亲和层析介质，相较于常规介质，高刚性琼脂糖基架流速更快，反压更低。Protein L 配基与抗体 kappa 轻链的可变区有很强的亲和性，所以 Diamond Protein L 适用于从大批量细胞培养液中捕获各种不同大小的抗体片段，如 Fab、单链可变片段（scFv）和区域抗体（dAbs）。

该介质具有以下特点：

- 高刚性琼脂糖基架，使其流速快，可提高生产效率。
- 高特异性的 kappa 轻链，可高效捕获广泛选择的抗体和抗体片段。
- 载量高，能减少工艺时间和介质使用量，从而降低生产成本，提高生产效率。

## 2、技术参数

外观	白色浆状物，放置可分层
基架	高刚性琼脂糖
平均颗粒大小 <sup>+</sup>	~80μm
功能基团	重组Protein L(from E.coli)
交联方式	环氧化学
动态载量 <sup>++</sup>	~40 mg 人IgG/mL填装介质（接触时间6min）
化学稳定性	常见水相溶液：10mM HCl、0.1M柠檬酸（pH3）、6M尿素、6M盐酸胍、30%异丙醇、20%乙醇
耐压	0.5MPa
压力流速	≥300cm/h（BXK300/500 H=20cm，<2bar）
pH稳定性	15mM NaOH（CIP），2~10（工作）
储存 <sup>+++</sup>	2~8℃，20%乙醇或2%苯甲醇

+颗粒大小呈正态分布，平均颗粒大小是填料体积分布累计的中值粒径。

++线性流速 100cm/h，柱高 10cm，缓冲液条件：20mM PB、0.15M NaCl，pH7.2

+++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：**由于使用初期会有少量蛋白配基泄露，故建议在正式上样使用前，可先做 2~3 和空白 Cycle。

**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 Protein L 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<sup>1</sup>体积=沉降介质体积÷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，倒入砂芯漏斗（G3），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 45~55%，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。

- ✧ 对于 **BXK 100** 及以上层析柱，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：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 50cm/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

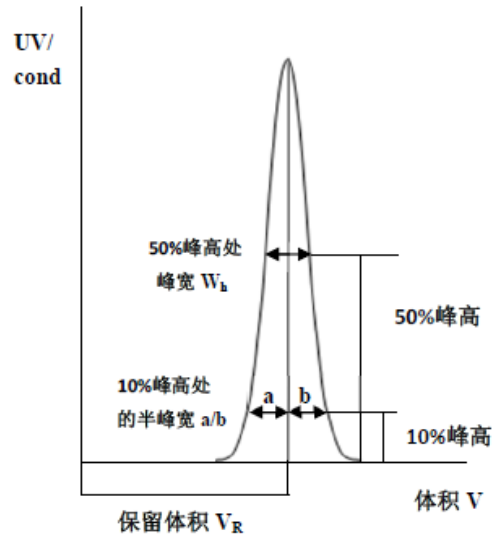
$V_R$ 和 $W_h$ 的单位应一致;

$$As=b/a$$

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**

- 缓冲液: 通常采用中性缓冲液作为结合缓冲液(如: 20mM PB 0.15M NaCl pH7.2), 采用低 pH 缓冲液作为洗脱液(如: 0.1M 柠檬酸钠 pH2.0-3.5), 优化洗脱条件时, 需要摸索有效解吸的最高 pH, 避免在过低 pH 时, 引起不稳定性抗体的变性。
- 流速: 根据柱子的高度一般选用 60~300cm/h 的线性流速, 柱高越高流速越慢。
- 平衡: 用结合缓冲液充分平衡层析柱, 通常需要 4~6 CV。
- 样品准备: 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, 并将样品的 pH 和电导率调整到与平衡缓冲液一致。
- 上样: 根据样品中的物质含量和 Diamond Protein L 的结合载量确定上样体积。
- 清洗: 上样完成后采用结合缓冲液清洗~5CV, 使紫外吸收下降到合适数值, 必要时可以加入高盐或者稍低的 pH 清洗, 将非特异性吸附的杂质尽可能多的清洗下来。
- 洗脱: 可以先采用 10CV 线性梯度从结合液到洗脱缓冲液(例如: 0.1M 柠檬酸-



柠檬酸钠缓冲液, pH3.0), 根据抗体出峰位置确定洗脱的最佳 pH 值。如果抗体在酸性条件下不稳定, 洗脱液可以用中和液 (如: 1.0M Tris) 中和。

- 再生: 用 5~10CV 洗脱缓冲液清洗层析柱。

## 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)。

- 先用结合缓冲液清洗 2~3CV;
- 然后用 15mM NaOH 清洗~3CV, 接触时间 10~15min;
- 立即用结合缓冲液 (pH7~8) 清洗至少 5CV。

**注:** 如果结合在介质上的抗体未完全洗脱, 在 CIP 之前应先进行再生。在用 NaOH 进行 CIP 之前, 建议先用中性 pH 溶液平衡层析柱, 避免低 pH 缓冲液与高 pH NaOH 溶液直接接触可能导致柱内温度升高。

## 5、储存

Diamond Protein L 以 20% 乙醇或 2% 苯甲醇为保存液进行销售。开始使用需先将保存液清洗干净, 使用后的 Diamond Protein L 储存于 20% 乙醇中、2~8℃ 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。

## 6、销毁及回收

由于 Diamond Protein L 的基架在自然界很难降解, 为了保护环境建议采用焚烧处理。

## 7、订货信息

产品名称	货号	包装
Diamond Protein L	AA05101	25mL
	AA05102	100mL
	AA05103	500mL
	AA05104	1L
	AA05105	5L
	AA05106	10L

预装柱名称	货号	包装
EzFast Diamond Protein L	EA05121	1×1mL
	EA05123	1×5mL
	EA05131	5×1mL
	EA05133	5×5mL
EzScreen Diamond Protein L	EA05125	1×4.6mL
	EA05135	5×4.6mL
EzSelect Diamond Protein L	EA05126	8×600μL
EzLoad 16/10 Diamond Protein L	EA05101	1 根
EzLoad 26/10 Diamond Protein L	EA05111	1 根