



**BESTCHROM**

博 格 隆

# IMAC Bestarose FF 金属螯合层析介质 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 .....	7
5、在位清洗 .....	7
6、灭菌 .....	7
7、储存 .....	7
8、销毁与回收 .....	8
9、订货信息 .....	8

## 1、产品简介

IMAC Bestarose FF (Fast Flow) 是一种金属螯合亲和层析介质，可广泛应用于分离提纯蛋白质和多肽。其原理是利用蛋白质的组氨酸、半胱氨酸和色氨酸的侧链与多种过渡金属离子如  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  的相互作用，从而达到分离纯化的目的。

IMAC Bestarose FF 是由交联琼脂糖和氨三乙酸 (NTA) 交联而成，可以螯合金属离子的四价位，使螯合的金属离子更稳定，能耐受较高的还原剂，物理和化学稳定性好并具备特异性好、流速快的优点。

## 2、技术参数

外观	白色浆状物，放置可分层
基架	6%高度交联的琼脂糖
颗粒大小 <sup>+</sup>	45~165 $\mu\text{m}$
螯合金属能力	$\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ : 15 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 介质, $\text{Cu}^{2+}$ : 25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 介质
动态载量	$\text{Ni}^{2+}$ : ~40mg His标签蛋白/ $\text{mL}$ 填装介质
化学稳定性 <sup>++</sup>	40 $^{\circ}\text{C}$ 1周: 10mM HCl, 0.1M NaOH, 8M尿素, 6M 盐 酸胍; 40 $^{\circ}\text{C}$ 12h: 1M NaOH, 70%乙酸;
pH稳定性 <sup>+++</sup>	2~14 (CIP), 3~12 (工作)
压力流速	~600cm/h (0.1MPa B XK16/20 H=5cm 25 $^{\circ}\text{C}$ )
耐压	0.3MPa
储存 <sup>++++</sup>	2~30 $^{\circ}\text{C}$ , 20%乙醇或2%苯甲醇
推荐流速范围	60~300cm/h

+颗粒大小呈正态分布，在该范围内的颗粒占总数的95%以上

++没有螯合金属离子

+++CIP 是指脱去金属离子时的 pH 稳定性

++++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 IMAC Bestarose FF 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），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。



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。

- 柱高为 10cm 时，可将装柱流速设定为 75cm/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，设定流速为 260cm/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

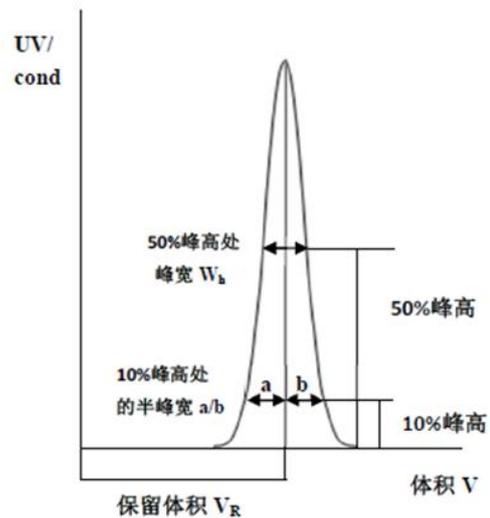
$V_R$ 和 $W_h$ 的单位应一致;

$$As=b/a$$

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

- 螯合金属离子:
  - 用纯化水冲洗 5 个柱体积;
  - 用平衡缓冲液冲洗 5 个柱体积;
  - 用纯化水冲洗 5 个柱体积;
  - 用 5 个柱体积 100mM 金属离子溶液过层析柱;
  - 用 10 个柱体积平衡缓冲液去除未结合金属离子;
  - 用纯化水冲洗 10 个柱体积;
  - 用 10 个柱体积洗脱缓冲液清洗层析柱;
  - 用平衡缓冲液平衡层析柱后待用。

一般金属离子环境是中性 (pH7~8)。锌离子选择 pH≤5.5, 避免高 pH 盐的溶解性; 铁离子选择 pH≈3, 避免形成不溶性物。

- 缓冲液: 首选磷酸盐缓冲液, pH 范围在中性 (7~8 之间), 避免适用 EDTA 及柠檬酸盐等, Tris-HCl 也可以使用, 但在金属离子与蛋白质亲和力很弱的情况

下应避免使用。表 1 和表 2 分别列出了不影响和影响金属螯合层析的常见添加试剂及浓度。

为了减少宿主蛋白同介质的非特异结合，平衡缓冲液和样品中通常加入低浓度的咪唑（20~40mM）。

缓冲液中必须加入 0.15~0.5M 的 NaCl 以消除离子吸附作用。

表 1 不影响蛋白质结合到固定化金属离子亲和介质的添加物

添加物	常用浓度	添加物	常用浓度
磷酸盐、Tris、硼酸盐、HEPES	20-100mmol/L	非离子型去污剂	2%
NaCl	2mol/L	Triton X-100	2%
KCl	1mol/L	Tween-20	2%
盐酸胍	6mol/L	辛基葡糖苷	2%
尿素	8mol/L	十二烷基麦芽糖苷	2%
甘油	50%	C12E8 ,C10E6	2%
异丙醇	60%	PMSF(蛋白酶抑制剂)	1mmol/L
乙醇	30%	胃蛋白酶抑制剂(蛋白酶抑制剂)	1 $\mu$ mol/L
两性去污剂(CHAPS)	1%	亮抑酶肽(蛋白酶抑制剂)	0.5 $\mu$ g/mL
1%苯甲脒(蛋白酶抑制剂)	1mmol/L	/	/

表 2 有可能破坏蛋白质结合到固定化金属离子亲和介质的添加物

添加物	常用浓度	添加物	常用浓度
2-巯基乙醇	20mmol/L	组氨酸	可用于替代咪唑
强还原剂(DTT 和 DTE)	0.1mmol/L	甘氨酸	—
螯合剂(EDTA 和 EGTA)	0.1mmol/L, 从介质中竞争 Ni <sup>2+</sup>	谷氨酰胺	—
离子去污剂(胆酸盐、SDS)	—	精氨酸	—
叠氮化钠	3mmol/L	氯化铵	—
柠檬酸盐	可耐受低浓度	—	—

- 样品准备: 为防止样品堵塞柱子, 在上样前样品需要用 0.45 $\mu$ 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。平衡液、咪唑浓度及螯合金

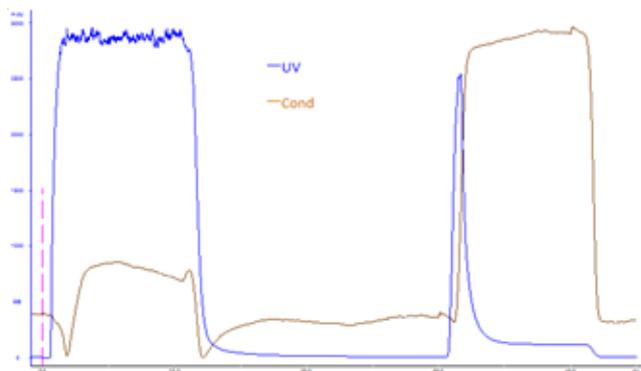


属离子种类等因素影响 IMAC Bestarose FF 的上样量。

- 平衡：用平衡缓冲液清洗层析柱至流出液的 pH、电导和 UV 与平衡液相同。  
为了减少金属离子的脱落对层析的影响，建议在平衡前先用 1 个柱体积的 0.5M 咪唑清洗，然后再用纯化水清洗 5 个柱体积，最后用平衡缓冲液平衡层析柱后再上样。
- 上样：将准备好的样品按照设定条件上样。
- 清洗：用结合缓冲液清洗到紫外吸收值降到适当的值。
- 洗脱：
  - 竞争性洗脱：线性增加或一步增加与金属离子有亲和力的物质，如 0~0.5M 咪唑，0~2M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 。梯度洗脱最好在平衡缓冲液的恒定 pH 下进行。  
也可降低缓冲液的 pH 进行洗过，当缓冲液 pH 降低至 4 以下时，金属离子会同介质解离从而达到洗脱目的。（如果目的蛋白对低 pH 敏感，建议洗脱收集液中加入 1/10 体积的 1M Tris-HCl，pH9.0 进行中和）  
螯合剂 EGTA 和 EDTA 可将金属离子同介质解离而达到洗脱目的，洗脱产物中的金属离子可用脱盐柱去除。
  - 为了减少金属离子的脱落对层析的影响，建议在平衡前先用 1 个柱体积的 0.5M 咪唑清洗然后再用纯化水清洗 5 个柱体积，最后用平衡缓冲液平衡层析柱后再上样。
- 再生：杂质残留和金属离子的脱落将会影响柱子的层析性能及载量。根据生产需要，建议在每隔 1~5 个循环后进行重新螯合金属离子。
  - 用 2~5 个柱体积剥落金属离子缓冲液（50mM PB，0.5M NaCl，0.1~0.2M EDTA，pH 7.0）脱金属离子； $\text{Fe}^{3+}$ 在中性溶液中容易形成不溶物，所以建议用 50mM EDTA 过夜脱去金属离子；
  - 用 2~3 个柱体积 0.5M NaCl 过柱，去除残留的 EDTA；
  - 用 0.5 个柱体积 0.2M 金属离子溶液过层析柱；
  - 用 5 个柱体积纯化水去除未结合金属离子；
  - 用 5 倍洗脱缓冲液清洗层析柱；
  - 用平衡缓冲液平衡层析柱后待用。

## 4、应用实例

IMAC Bestarose FF 螯合镍离子在His-GST标签重组蛋白纯化中的应用



层析柱: EzFast 1mL  
 柱床高度: 2.5cm  
 缓冲液: A: 25mM 咪唑+0.15M NaCl pH: 7.00  
 B: 500mM 咪唑 pH: 7.00  
 样品: 大肠杆菌表达带有 His-GST 标签重组蛋白裂解液上清  
 上样量: 10mL  
 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）。

- 首先脱去金属离子。
- 因离子交换作用吸附的蛋白去除：用 2~3 个柱体积的 2M NaCl 溶液清洗柱子，再用 3 个柱床体积纯化水清洗柱子。
- 沉淀或变性物质去除：用 1M NaOH 处理 0.5~1h。
- 疏水结合物质去除：2 个柱体积 70%乙醇或 30%异丙醇洗涤柱子，立即用至少 5 个柱体积的无菌平衡缓冲液反向清洗。

## 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 IMAC Bestarose FF 介质在使用前及使用过程中，可以用 70%乙醇处理 12h 以上，或者脱去金属离子后的介质可以用 1M NaOH 处理 0.5~1h 以减少微生物污染风险。

## 7、储存

IMAC Bestarose FF 以 20%乙醇或 2%苯甲醇为保存液进行销售。使用后的 IMAC Bestarose FF 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、销毁与回收

由于 IMAC Bestarose FF 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
IMAC Bestarose FF	AA0061	25mL
	AA0062	100mL
	AA207311	500mL
	AA0063	1L
	AA0064	5L
	AA0065	10L
	AA207315	20L

预装柱名称	货号	包装
EzFast IMAC FF	EA207301	1×1mL
	EA207303	1×5mL
	EA009	5×1mL
	EA010	5×5mL
EzScreen IMAC FF	EA00625	1×4.6mL
	EA00635	5×4.6mL
EzLoad 16/10 IMAC FF	EA207304	1 根
EzLoad 26/10 IMAC FF	EA207306	1 根