

## 操作说明

### 亲和层析介质（配体偶联）

## Cellufine Formyl

### 简介

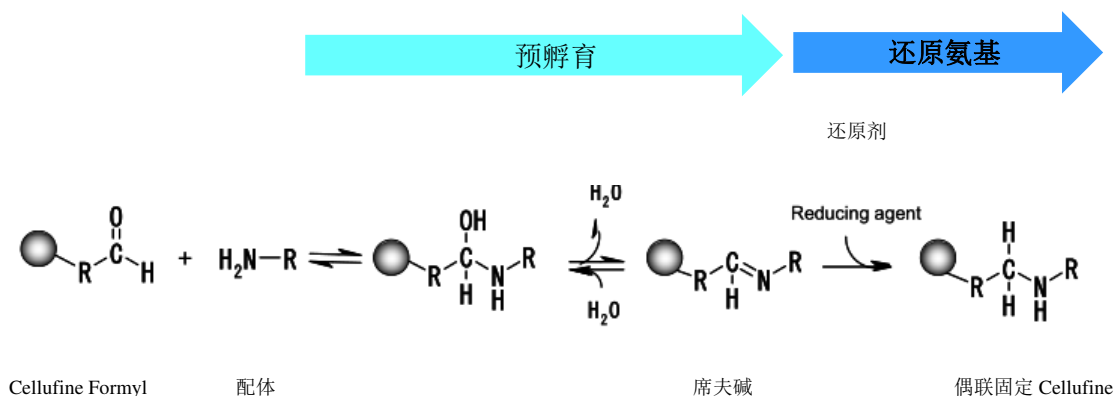
Cellufine Formyl 是一种醛类活性载体，用于带氨基蛋白质和配体的共价固定。与所有 Cellufine 产品一样，基质载体物由球形纤维素珠体构成，其相对于传统的琼脂糖凝胶，展现出优异的刚性和化学稳定性。这种机械强度有助于提高产量，既适用于实验室又适合工业生产。Cellufine Formyl 的排阻限与 4% 的琼脂糖凝胶相似。此外，由于稳固的内部结构和化学键，固定配体没有明显的泄漏。通过使用缩合剂，配体（蛋白质等）可以很容易通过活性的醛部分进行偶联。

### 理化性质

基础介质	多孔纤维素珠体
颗粒尺寸	大约 120-210 微米
活化基团	Formyl（醛）
醛基浓度	10 微摩尔/毫升-凝胶
输送状态	0.2M 醋酸盐缓冲液，pH3.0 含 0.01% 2,2-dithio-bis（吡啶）

### 偶联（还原氨基化）

具有伯氨基的蛋白质配体与 Cellufine Formyl 的偶联通过席夫碱中间体进行，然后用还原剂 NaCNBH<sub>3</sub>（SCBH），(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>NBH<sub>3</sub>（TMAB）和 NaBH<sub>4</sub>（SBH）还原，如下所示：



### 物料

■ 偶联缓冲液：不含伯胺的缓冲溶液，pH 范围 4~11，浓度约为 0.2M，可以使用磷酸盐缓冲液，醋酸盐缓冲液，HEPES 缓冲液等。

■ 封闭缓冲液：在偶联缓冲液中使用 0.2M 至 1M 的伯胺化合物，例如乙醇胺，甘氨酸和甘氨酸乙酯等，或使用 0.2M 至 1M 的 pH7 至 8 的 Tris-HCl 缓冲液。

■还原剂：最常见的还原剂是氰基硼氢化钠（SCBH）、Trimethylamjneborane（TMAB）和硼氢化钠（SBH）

	优势	缺点	注意	pH
SCBH (CAS 25895-60-7) (SodjumCyanoborohydride) NaCNBH <sub>3</sub>	不还原蛋白质和醛类化合物，而是选择性还原席夫碱	有毒物质	于通风室使用 废物处理	≥pH4
TMAB (CAS 75-22-9) (Trimethylamjneborane) (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> NBH <sub>3</sub>	还原力弱，对蛋白质几乎没有损害	溶解度很低。 (水溶解性度为 1.3%)	需要预孵育 1 至 2 小时	≥pH5
SBH (CAS 16940-66-2) (Sodium Borohydride) Nabh <sub>4</sub>	不需要封端作用 毒性很低	还原力很强，可还原甲酰基 不可在特殊蛋白质中使用 (SS 键可被还原)	需要预孵育 1 至 2 小时	≥pH7

警告：因为溶解后会产生少量有毒气体，SCBH 溶液应在通风良好的区域制备。

■配体溶液：通常在偶联缓冲液中为 1-20 毫克/毫升。大于 20 毫克/毫升时，偶联效率降低。

注意：偶联后总质量与浓度直接相关（见图 1）。

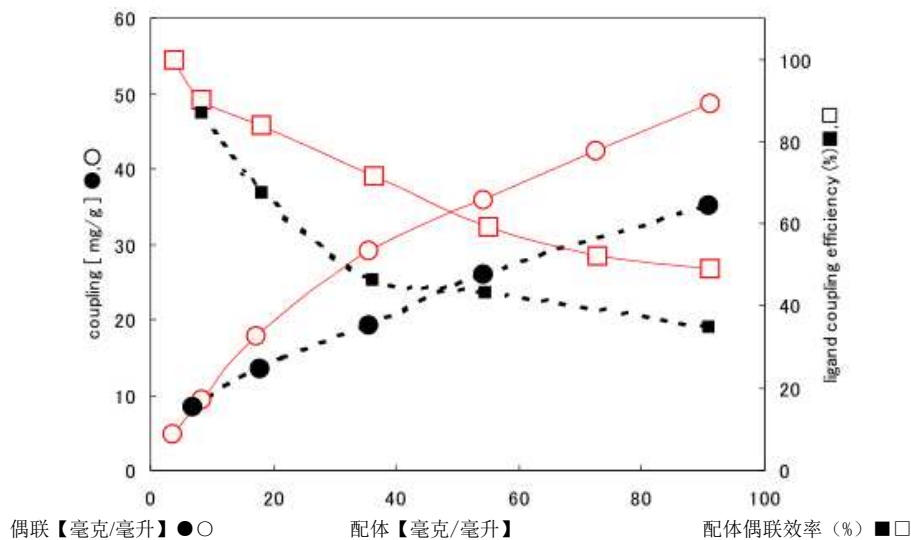


图 1: 配体浓度对偶联反应的影响

—○— hγ 球蛋白偶联	—●— 人血清白蛋白偶联
—□— hγ 球蛋白偶联率	—■— 人血清白蛋白偶联率

## 常规偶联流程

表 1. 操作概要（每 1mL 凝胶所需数量）

1	Cellufine Formyl	洗涤除去保存液。1 毫升（0.7 克至 0.8 克-湿-g）
2	偶联缓冲剂	含有配体的偶联缓冲溶液（1 至 2 毫升） 有关配体浓度，请参阅“偶联注意事项”
3	预孵育	轻轻搅拌 1 至 2 小时（使用 SCBH 时不需要预孵育。）
4	还原剂	还原剂添加 5-10 毫克。（可以添加 50 至 100 毫克/毫升的 1 毫升还原剂替代粉末）
5	偶联反应	轻轻搅拌 2-8 小时 反应的适宜温度取决于配体的稳定性。
6	洗涤	通过过滤或倾析除去反应溶液。用偶联缓冲液 20 毫升洗涤数次。可以通过测量反应溶液和洗涤溶液中所含的配体浓度来计算偶联量。
7	封端反应	向洗涤后的凝胶中加入 1-2ml 封闭溶液，并用与（4）中相同量的还原剂。 轻轻搅拌约 2 小时
8	洗涤	通过过滤或倾析除去反应溶液。用 20ml 第 2 条中的偶联缓冲液或水洗涤数次。

在合适的混合容器中进行以下操作。

1. 估算所需的培养基体积。对于产品的瓶子，含有约 50% 的 Cellufine 悬浮液。
2. 通过过滤或倾析除去保存溶液。使用偶联缓冲液 10 至 20 毫升洗涤数次。（直到醋酸气味消失。）
3. 以 1 至 2 倍的凝胶量添加配体溶液。所形成的总悬浮液量约为原始培养基量的 2 至 3 倍。
4. 如果使用 SCBH，则不一定需要预孵育。
5. 如果使用 SBH，则不需要封端反应。因为，SBH 用于还原醛（Formyl）并将其转化为羟基。

### 注意

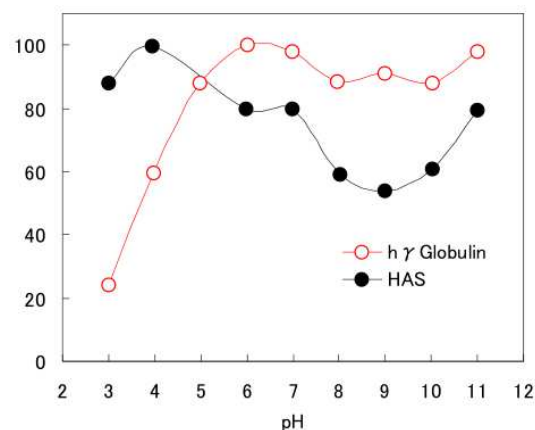
SCBH 废液的处理方式应符合联邦、州和地方法规要求，并请参考 SCBH 制造公司的化学品安全说明书（MSDS）。

### 偶联注意事项

配体上样和生化活性受溶质浓度、pH、反应时间和温度的影响。上述偶联条件适用于大多数应用。

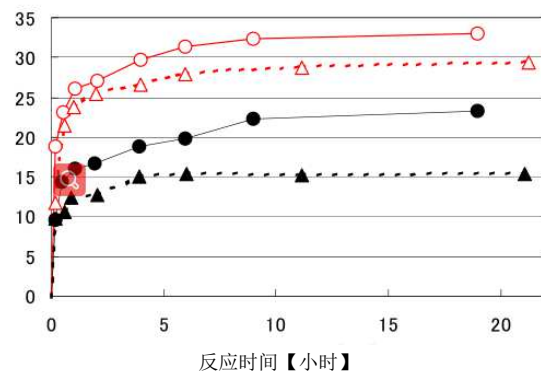
### 配体注意事项

配体上样与配体浓度直接相关。（参见图 1）使用 50% 悬浮液（每 1ml 配体溶液 1ml 凝胶）及约 10 毫克/毫升配体浓度，在室温下大约 4 小时内可实现 60% 偶联。反应时间越长，效率越高。（见图 3）



配体偶联效率 (%)  
图 2: 偶联缓冲液 pH 值对凝胶中偶联的配体数量的影响

—○— h $\gamma$  球蛋白  
—●— 人血清白蛋白



偶联【毫克/毫升】  
图 3: 偶联反应时间与偶联的蛋白量的关系

—○— h $\gamma$  球蛋白 (30°C)    - - $\Delta$ - - h $\gamma$  球蛋白 (4°C)  
—●— 人血清白蛋白 (30°C)    - - $\blacktriangle$ - - 人血清白蛋白 (4°C)

### 偶联缓冲剂 pH 值

最佳 pH 值随蛋白类型而变化。

考虑配体的 pH 稳定性和反应效率。

一般情况下，pH 值高于 pI 时反应效率升高(见图 2)。

## 席夫碱的形成和还原

在氨基配体和醛凝胶之间容易形成席夫碱。氰基硼氢化钠可专门将其还原为 C-N 键，对配体的影响最小。鉴于这种特异性，可以在零时加入氰基硼氢化钠。相反，如果使用  $\text{BaBH}_4$ ，则应该有一段预孵育期，以便形成席夫碱。否则，醛部分会过早地还原。

## 反应温度

较低的温度导致反应速率变的较低，并且在一些情况下，偶联效率也会较低。因此，如果需要在  $4^\circ\text{C}$  冷藏，建议反应时间应增加到 16 小时。

## 装柱

1. 计算需要的床体积，记住在装柱期间会发生床层压缩。
2. 使用适当的吸附缓冲剂制备 40 - 60 % (v/v) 悬浮液。
3. 关闭柱出口，小心地将悬浮液倒入柱中。根据容量，可能需要填料管。
4. 打开柱入口，释放空气，将顶部调节组件插入并固定在悬浮液界面处。
5. 打开色谱柱出口，开始以比操作流速快至少 20% 的速率泵入吸附缓冲液。
6. 床稳定后，关闭色谱柱出口。然后打开入口，重新定位床顶部的端部单元。

## 操作指南

### 一般操作

1. 用 5 个柱床体积的洗脱缓冲液洗涤层析柱。
2. 用 5 个柱床体积的吸附缓冲液平衡。
3. 上样
4. 用 5 个床体积的吸附缓冲液洗涤。
5. 用 5 个床体积的洗脱缓冲液洗脱样品

### 建议缓冲剂

这些条件取决于所用的配体。然而，以下通常可用于免疫亲和层析。

吸附缓冲液：20nM 磷酸盐，0.1M 氯化钠 (pH7.2)。根据应用情况，还可以使用其他缓冲离子。

洗脱缓冲液：0.1M 甘氨酸，pH 3.5。

### 样品制备与上样

在吸附缓冲液中制备浓度为 1-10 毫克/毫升的样品。通过离心法或微滤法除去不可溶性物质。

### 流速

针对 Cellufine Formyl 的建议流速范围为 20 - 150 厘米/小时

## 化学和物理稳定性

偶联凝胶的稳定性将受配体限制。然而，基础凝胶对大多数盐、洗涤剂、离液剂、0.1N NaOH、0.1N HCl 是稳定的，并且可以在 pH7.0、121°C 下高温高压杀菌 30 分钟。

## 再生

再生流程将取决于配体稳定性。在某些情况下，用含有 0.1% Tween®20 或 Triton®X-100 的数个床体积洗脱缓冲液洗涤就足够了。用 6M 尿素进行类似的洗涤也是有效的。

## 存储

对于存放敞开容器，建议将它们放在冷藏室（2-8°C）中。切勿冷冻。

## 贮存期：

自生产之日起 3 年期

## 产品订购信息（商品目录号）

介质类型	包装尺寸				
	10 毫升	50 毫升	500 毫升	5 公升	10 公升
Cellufine Formyl	676 944 324	19853	19854	19855	676 944 335

## JNC CORPORATION 公司

生命化学事业部

日本东京都千代田区大手町 2 丁目 2-1，邮政编码 100-8105

电话+ 81-3-3243-6150，传真+ 81-3-3234-6219

电子邮件：cellufine@jnc-corp.co.jp

<http://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/>