# Cellufine™ Formyl

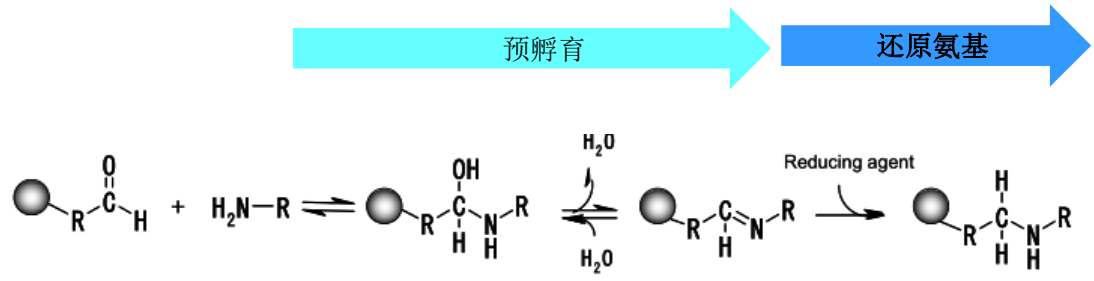
Cellufine Formyl 是一种醛类活性载体，用于带氨基蛋白质和配体的共价固定。与所有 Cellufine 产品一样，基质载体物由球形纤维素珠体构成，其相对于传统的琼脂糖凝胶，展现出优异的刚性和化学稳定性。这种机械强度有助于提高产量，既适用于实验室又适合工业生产。Cellufine Formyl 的排阻限与 4%的琼脂糖凝胶相似。此外，由于稳固的内部结构和化学键，固定配体没有明显的泄漏。通过使用缩合剂，配体（蛋白质等）可以很容易通过活性的醛部分进行偶联。

## 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 $NaCNBH_3$（SCBH），$(CH_3)_3NBH_3$（TMAB）和 $NaBH_4$（SBH）还原，如下所示：




Cellufine Formyl　　配体　　席夫碱　　偶联固定 Cellufine

## 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 Tirs-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) $NaCNBH_3$ | 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) $(CH_3)_3NBH3$ | 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) $Nabh_4$ | 不需要封端作用毒性很低 | 还原力很强，可还原甲酸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）。

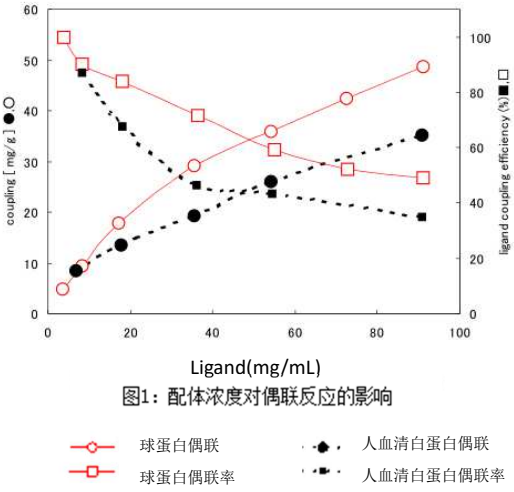


图1：配体浓度对偶联反应的影响

## 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）<br>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<br>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。<br>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 Cellfuine 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）

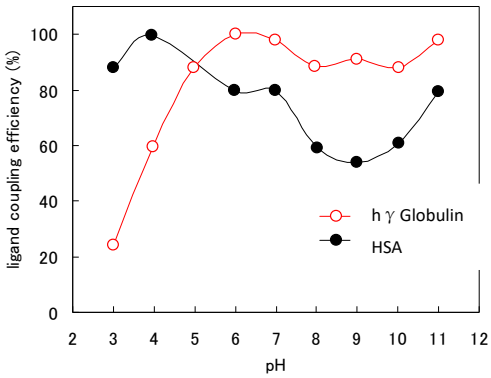



图 2：偶联缓冲液 pH 值对凝胶中偶联的配体数量的

### 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 pl 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 $BaBH_4$，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。

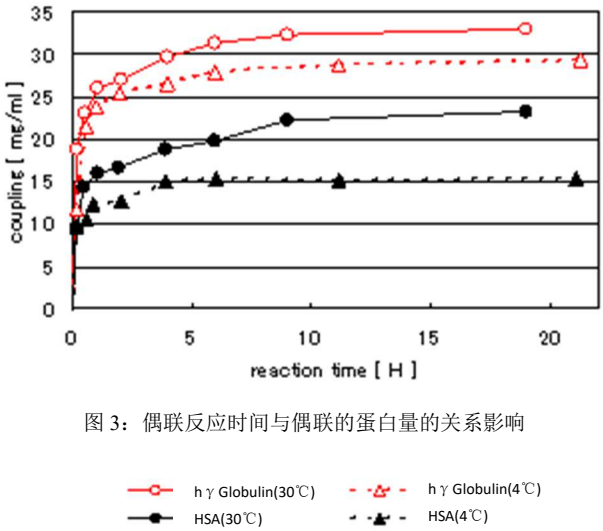



图 3：偶联反应时间与偶联的蛋白量的关系影响

### 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℃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 的建议流线速度范围为 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℃下高温高压杀菌 30 分钟。

## 再生

一般的清洗和再生程序如下。用大约 10 倍体积的 0.5M 醋酸缓冲液（pH3.0）洗涤后，用大约 10 倍体积的 0.5M 磷酸盐缓冲液（pH9.0）洗涤。 最后，用大约 10 倍体积的平衡（吸附）缓冲液进行平衡。

## 存储

对于存放敞开容器，建议将它们放在冷藏室（2-8℃）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 |

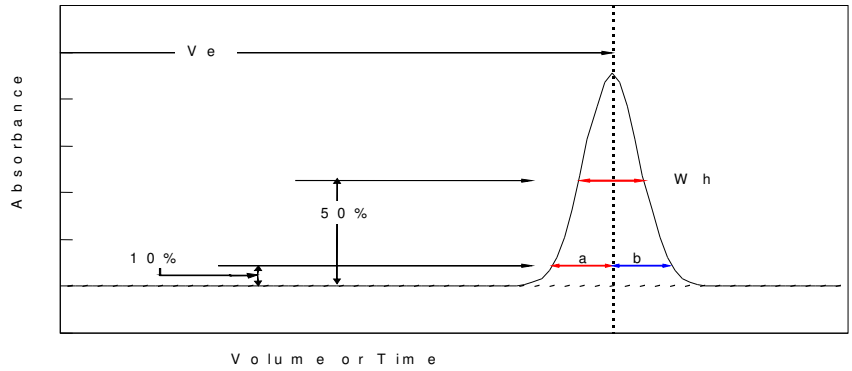
**JNC CORPORATION 公司**

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
https://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/

## 附录 1：Cellufine 充填后的层析柱评价方法

评价层析柱的充填状态，使用理论级搭板数(N)、相当于理论级数的高度(HETP)、非对称性（As）等指标。这些评价指标会受测定条件的影响。比如，会因层析柱的直径/高度的不同、配管、溶媒试样量、流速、温度等的变化而变化。因此，需要每次使用同样的测定条件来进行层析柱充填后的评价，对同等性加以确认。评价时的流速推荐采用 30cm/h，但可以加快该速度。只是速度越快，理论级搭板数(N)有降低的倾向。为了评价层析柱，需要每次以相同条件（流速、层析柱尺寸、流动相、试样）进行测定。

| 参数 | 条件 |
|---|---|
| 试样载荷量 | 层析柱体积的 1 -2.5%的液量 |
| 试样组成 | 1-2 %(v/v) 丙酮（流动相：水及吸附缓冲溶液） |
| | 1 M NaCl（流动相：0.1-0.4M NaCl 溶液） |
| 流速 (cm/h) | 30 cm/h |
| 检出器 | 吸光度 OD 280nm（丙酮时）<br>电气传导度（NaCl 时） |




| | |
|---|---|
| L | 层析柱高度［cm or m］ |
| $V_e$ | 溶出时间（或溶出体积） |
| $W_h$ | 为峰值高度一半时的峰宽 |
| a，b | 高度为峰值高度的 10%时的：<br>（a）偏离中心的前半部的峰值宽度<br>（b）偏离中心的后半部的峰值宽度 |
| 注意 | 单位应合并计算。 |

**计算式**

**HETP = L/N　　$N = 5.54 \times (Ve/Wh)^2$　　As = b/a**

一般来说，理论级数超过 3,000N/m即视为良好。另外，As 在 0.7～1.5 范围内，视为处于良好状态。