

操作说明

Cellufine™ Phosphate

简介

Cellufine Phosphate 是一种亲和层析介质，用于浓缩、纯化蛋白激酶，相关核酸蛋白，如限制性内切酶、核酸酶、聚合酶。该介质基于球状纤维素珠体，采用磷酸酯苯基硼酸基团进行功能化处理。

与传统产品相比，Cellufine Phosphate 具有耐压性，并且可以在高流速的大尺寸色谱柱中使用。这是由于与传统的纤维类产品相比，Cellufine Phosphate 采用的是一种球形颗粒状。

理化性质

	Cellufine phosphate
配体	磷酸酯基
基底介质	纤维素微球
粒径	40 - 130 μm (ca. 90 μm)
排除界限分子量(kD)	100 (PEG-聚乙二醇)
离子交换容量(meq/mL-gel)	0.3-0.8
蛋白质吸附量(卵白溶酶菌) mg /ml	> 20
推荐操作压力	<0.2 MPa
pH 稳定性	5 - 12
保存方法	2-8 °C in 20 % 乙醇悬浮液

※表 1 所示数值并非规格值。

向层析柱进行充填的步骤

材料及必需器具

- 填充物
 - 层析柱、适配器、容器
 - 泵
 - 过滤装置（玻纤过滤器、布氏漏斗、吸引瓶）
 - 刻度量筒
 - 充填液（纯水或盐溶液、缓冲溶液）
 - 充填评价时使用的流动相（纯水或盐溶液、缓冲溶液）
 - 充填评价时使用的标记（1-2 % (v/v) 丙酮或 1M NaCl 溶液）
- ※ 盐溶液请使用 0.1M NaCl 溶液等低盐浓度溶液；缓冲溶液请使用吸附缓冲溶液等。

悬浊液的调制

- 1) 将 Cellufine Phoshate 的瓶子在室温下晃动数次，使瓶内的悬浊液变均匀。
- 2) 用玻纤过滤器吸引过滤，并用 5 倍容量的充填液清洗 3 遍。去除保存剂的 20%乙醇。清洗时也可以根据需要进行沉淀分取。
- 3) 最后一次清洗完成后将其移至烧杯，加入充填液进行悬浊，使其成为 50~60%悬浊液，并在减压下进行 30~40 分钟的脱气。这时如能用磁力搅拌器加以缓慢搅拌，则脱气效果更好。
- 4) 将悬浊液注入刻度量筒，静置 4 小时以上。通过该操作来测定自然沉降体积，确认正确的悬浊液浓度。

$$\text{悬浊液浓度 (\%)} = \text{自然沉降体积 (S1)} / \text{总体积 (T)} \times 100$$

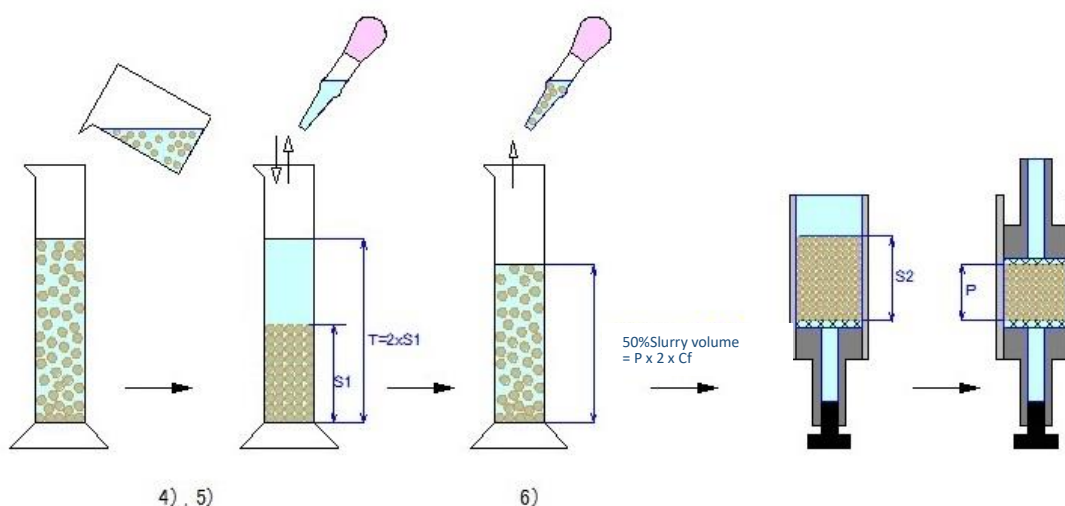


图 1 悬浊液调制

- 5) 调节充填液量，使悬浊液浓度为 50%。在 $T = 2 \times S$ 时悬浊液浓度会达到 50%。
- 6) 充填到层析柱内的悬浊液量可由以下计算式求得：

$$\text{50\%悬浊液必要量} = (\text{填塞物体积 (P)} \times 2) \times \text{Cf}$$

Cf 为压缩因子，由下式导出：

$$\text{Cf} = \text{自然沉降体积 (S2)} / \text{填塞物体积 (P)}$$

※填塞物体积是定为目标层析柱的体积。

Note: 充填剂的压缩因子 Cf 对充填效率而言是重要的因子。请使用可动栓层析柱，对 Cf 值加以调节。Cellufine Phosphate 的 Cf 举例如下：

层析柱尺寸举例（直径×柱床高度）	推荐 Cf（用纯水充填时）
5.0 cm× 21.7 cm	大约 1.30

层析柱的充填

- 1) 组装层析柱。打开层析柱出口后，一边加进充填液，一边去除下部过滤器内残留着的空气。充填液要留存部分，大致高度为离层析柱底部 1cm 左右，以免空气进入。
- 2) 关闭层析柱出口，将悬浊液一次性注入层析柱内，这时要注意，不能让空气进入充填剂之间。
- 3) 打开层析柱出口，使充填剂沉降。充填剂沉降后，由于充填剂的沉降速度快，液面会变得透明。待离液面 2~3cm 的充填液都变透明后，关闭流出口。
- 4) 将充填液加满到层析柱上部，这时操作要十分小心，不能让已沉降的充填剂浮上来。
- 5) 在层析柱上设置上部适配器，这时要避免空气进入上部适配器和层析柱液面之间。闭合上部适配器的 O 型密封圈，降下上部适配器，排出上部适配器内的空气。
- 6) 将层析柱与泵连接，最初以 0.2 MPa 以下的压力进行 30~60 分钟的充填液通液，使充填剂沉降。

Note: 充填操作的线速要能保证充填时的层析柱内的压力>充填后的操作压。

- 7) 待充填剂的高度稳定后，停止通液。接着关闭层析柱出口。然后拆下层析柱上部流入口的配管。慢慢将上部适配器降下到充填剂的表面。这时层析柱内的充填液会从层析柱入口倒流出来。
- 8) 在配管内充满液体的状态下在上部适配器上连接配管，这时要保证空气不进入，然后打开下部适配器的层析柱出口，在 0.2 MPa 以下的压力下进行通液。如果通过该操作，充填剂被压缩，在上部适配器之间似乎出现间隙，就需要进行调节，降下上部适配器，使其与充填剂密切接触。

- 9) 从最终的层析柱高度来计算层析柱体积。如层析柱体积大于原来的计划数，要降下上部适配器来加以调节。而层析柱体积小于原来的计划数时，则有可能是注入层析柱之前的悬浊液浓度较低，或者是凝胶被过分压缩，因此需要抽出后再次充填。

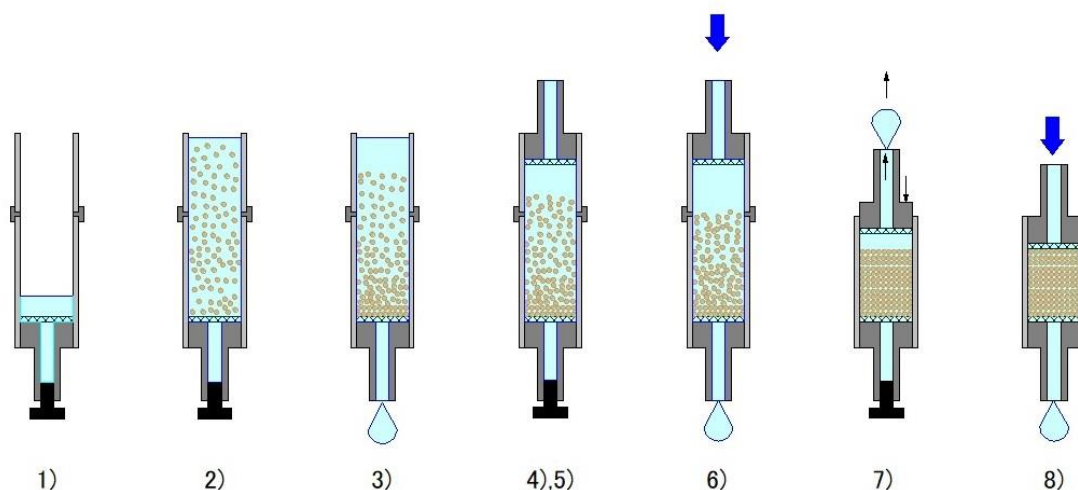


图 2 层析柱充填的步骤

充填状态的评价

层析柱充填效率如附录 1 所示，通过对 HETP、非对称性 (A_s) 的确认来进行评价。

操作指南

一般操作

- 1) 用吸附缓冲溶液对层析柱加以平衡。(通常，需要时层析柱体积 (CV) 的 3 ~ 5 倍的量，请通过 UV 和电动度的基线的稳定来进行确认。)
- 2) 将溶解在吸附缓冲溶液中的试样载荷。
- 3) 为了去除未吸附的杂质，要用吸附缓冲溶液进行数 CV 的清洗。
- 4) 将由溶出缓冲溶液吸附了的目的物质进行溶出。

推荐缓冲溶液

吸附缓冲液：10mM ~ 50mM 磷酸钠，中性 pH 值。根据应用情况，还可以使用其他缓冲离子，如三羟甲基氨基甲烷、醋酸盐。通常而言，吸附强度与 pH 值及离子强度成反比变化。稍微增加离子强度有助于除去附合松弛的杂物。另外，还可加入非离子型洗涤剂 (Tween®20、Triton® X 等) 以改善溶解性。

洗脱缓冲液：通常来说，采用由含有 1-2M 氯化钠或氯化钾的吸附缓冲液组成的流动相。可采用梯度洗脱法来测定准确的浓度。不连续梯度洗脱法是制备应用中最常用的方法。

样品制备与上样

在吸附缓冲液中制备浓度为 1-20 毫克/毫升的样品。通过离心法或微滤法除去不可溶性物质。如有必要,使用渗析法、透滤法或脱盐色谱法置换样品缓冲液。

流速

针对 Cellufine Phosphate 的建议流速范围 50 - 250 厘米/小时。

再生和脱热源

通常用高离子强度(2.0-3.0 M)氯化钠对 Cellufine Phosphate 进行再生并除热。如果这还不够,用 3-10 柱体积的 0.2M 氢氧化钠在 2-10℃ 条件下加强再生作用,然后用 2.0-3.0M 氯化钠进行洗涤,直至 pH 值降至 9 以下。再次用开头使用的缓冲液洗涤凝胶直至达到平衡。

稳定性

在 2 - 30℃ 的温度下操作时, pH 值为 5 - 12。

推荐保存方法

短期存储(不超过 2 周),溶液主体和色谱柱可以在 2 - 4℃ 的中性缓冲液中贮存在 1M 的氯化钠中。长期存储,则可在相同条件下进行;但是,应在缓冲液中加入防腐剂(如 0.1% 福尔马林,0.05% 氯丁醇或 0.02% 叠氮化钠)。于 2 - 8℃ 储存。切勿冷冻。保质期为自生产日期起五年。

参考文献

Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 00, No. 00 1-8

Rachel Macmaster, Svetlana Sedelnikova, Patrick J. Baker, Edward L. Bolt1, Robert G. Lloyd1 and John B. Rafferty

RusA Holliday junction resolvase: DNA complex structure—insights into selectivity and specificity

产品订购信息(商品目录号)

介质类型	包装尺寸						
	微型柱		10 毫升	50 毫升	500 毫升	5 公升	10 公升
	1 毫升×5	5 毫升×1					
Cellufine Phosphate	19551	19515	19524	19545	19546	684 987 330	684 987 335

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

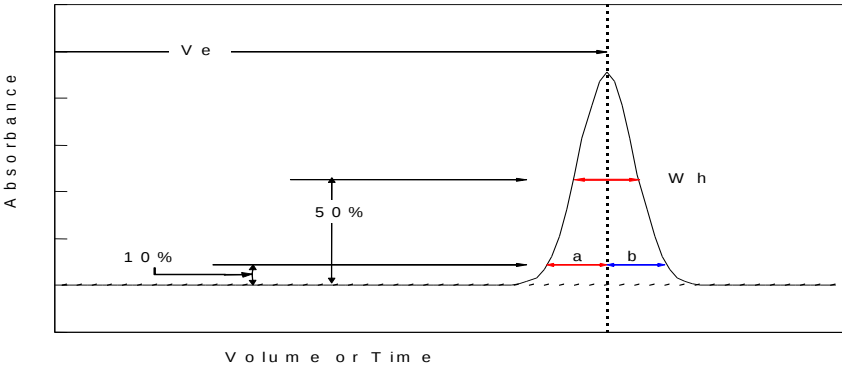
电子邮件: cellufine@jnc-corp.co.jp

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

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) 电气传导度 (NaCl 时)



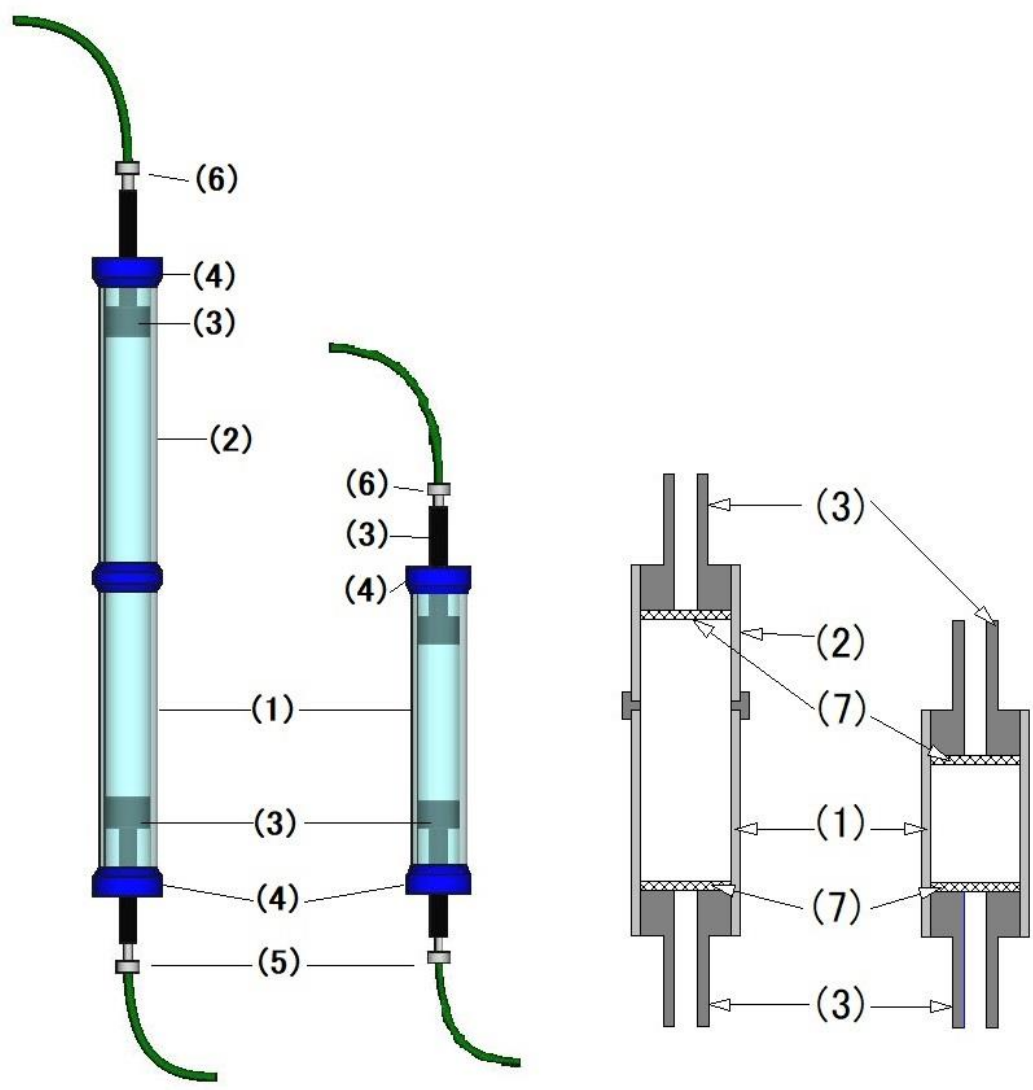
L	层析柱高度 [cm or m]
V_e	溶出时间 (或溶出体积)
W_h	为峰值高度一半时的峰宽
a, b	高度为峰值高度的 10%时的: (a) 偏离中心的前半部的峰值宽度 (b) 偏离中心的后半部的峰值宽度
注意	单位应合并计算。

计算式

$HETP = L/N$ $N = 5.54 \times (V_e/W_h)^2$ $As = b/a$

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。

附录 2：普通的层析柱的图纸



本使用说明书用右示简单的层析柱截面图作了说明。

(1)	层析柱软管	(4)	层析柱端头
(2)	容器	(5)	层析柱出口
(3)	适配器	(6)	层析柱入口
(7)	过滤器 (FLITZ)		