

Cellufine™ Sulfate

可用于病毒、病毒来源的抗原蛋白质、血清蛋白质及肝素结合性蛋白质的精制。Cellufine Sulfate 能通过简单的操作，进行精制和浓缩，再现性良好。

现在病毒精制时所用的密度梯度超离心分离方式需要繁杂的操作，表现为花费时间、难以获得再现性，且不够安全，而使用 Cellufine Sulfate 就能解决这些问题。与将葡聚糖硫酸钠、硫酸软骨素类及肝素等加以固定化的介质相比，由于它成本低、配体的低溶出性以及再现性良好，能够发挥优异的精制性能。结合后的目的物只需通过阶梯方式或梯度来增加离子强度，即可方便地溶出。

Cellufine Sulfate 的特点如表 1 所示。

表 1 Cellufine Sulfate 的性能和特点

	特点
配体	硫酸酯基
基底介质	纤维素微球
粒径	40 - 130 μm (ca. 90mm)
排除界限分子量	3kD
硫磺含量	>700 mg/g dry
推荐操作压力	<0.3 MPa (约<300 cm/h)
蛋白质吸附量	> 3 mg /ml (卵白溶酶菌) 7 mg/mL (B 型肝炎病毒表面抗原)
推荐定置清洗液 (CIP)	0.1 M 氢氧化钠水溶液
pH 稳定性	3 - 12
保存方法	2-30 °C in 20 % ethanol

※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

- Cellufine Sulfate
- 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 Sulfate 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。

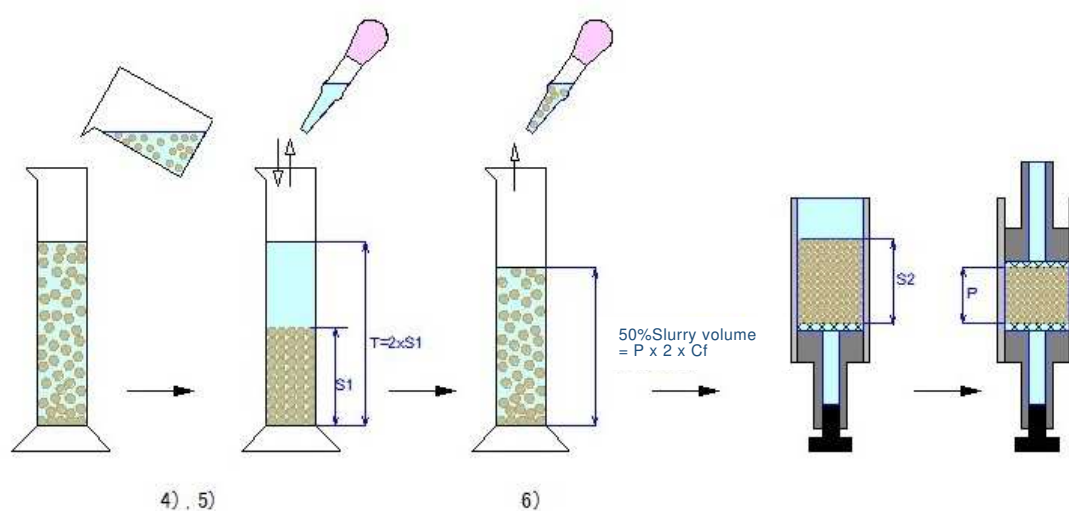


图 1 悬浊液调制

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

- 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：

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

C_f 为压缩因子，由下式导出：

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

※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 C_f 对充填效率而言是重要的因子。请使用可动栓层析柱，对 C_f 值加以调节。Cellufine Sulfate 的 C_f 举例如下：

层析柱尺寸举例 (直径×柱床高度)	推荐 C_f (用纯水充填时)
3.2 cm × 20 cm	1.15 ~ 1.20

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 0.3 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 0.3 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。

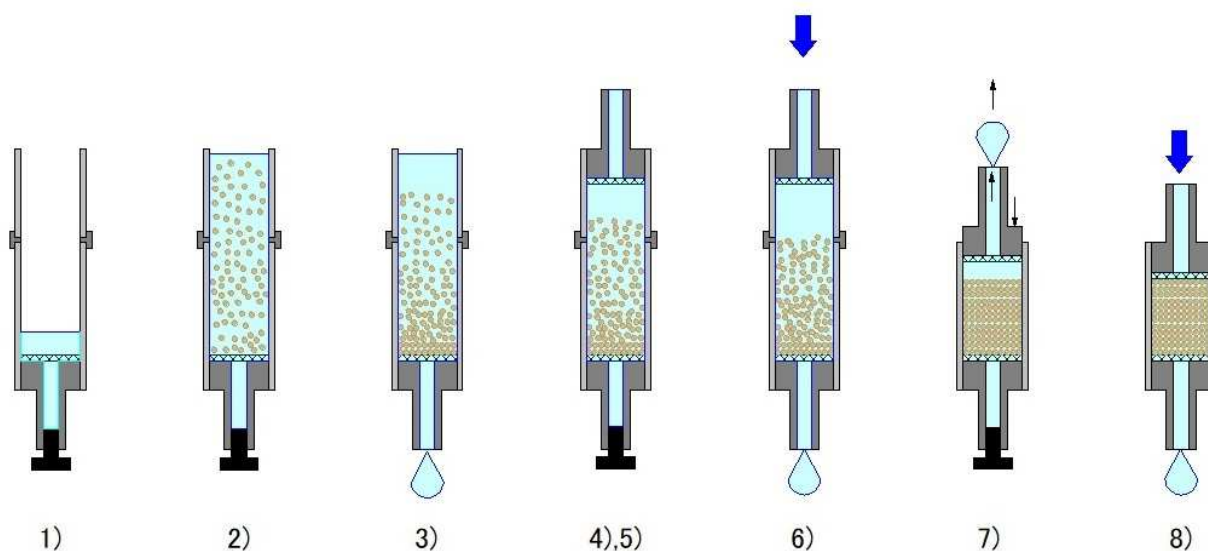


图2 层析柱充填的步骤

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。

操作指导

一般性的使用方法

- 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

吸附缓冲溶液: 使用 0.01 M 磷酸 Na + 0.1 M NaCl pH 7.5。根据用途的不同也可以使用其他缓冲溶液。一般来说, 蛋白质的吸附强度会随 pH 和离子的强度而变化。出于减弱杂质结合的目的, 也可以略微提高缓冲溶液的离子强度。非离子性的表面活性剂 (Tween®20, Triton® X 等) 也能提高杂质的溶出性。

溶出缓冲溶液: 在吸附缓冲溶液中加入 1~2 M 的 NaCl 或 KCl。最佳的氯浓度由梯度溶出的预备研讨来确定。在分取层析中, 以阶梯方式使其溶出是一般的方法。

试样的准备和试样载荷

将试样溶解到吸附缓冲溶液中, 浓度达到 1~20 mg/ml。
不溶物用离心分离方式或过滤器加以去除。如有必要, 也可以利用脱氯过滤器、透析以及 CellufineGH-25 等脱氯层析柱进行缓冲溶液交换。

推荐的操作流速

如以线速 300 cm/h 流过纯水, 压力在 0.3 MPa 以下即能操作。
(使用以直径 45 cm×23cm 柱床高度、Cf 值 1.20 进行充填的层析柱)

再生和脱热源

用 2~3 M 的高氯浓度 NaCl 含有缓冲溶液进行再生和脱热源。如仍不充分, 可用 3~10 层析柱体积 (CV) 的 0.05~0.15 N NaOH 进行清洗, 然后再用 2~3 M NaCl 含有缓冲溶液清洗到 pH 为 9。接着用吸附缓冲溶液进行清洗, 以备下次操作使用。

定置清洗(CIP)

操作与再生相同，先将以离子形态吸附的物质加以清洗，接着以层析柱体积的 5 倍左右的量流过 0.1mol/L 的 NaOH（推荐流速 30-60cm/h）。然后用吸附缓冲溶液加以平衡。

稳定性

推荐使用的 pH 范围为 3~12，使用温度为 2~30℃。可以在接近中性的缓冲液中进行 121℃、30 分钟的高压蒸汽灭菌。

推荐保存方法

请将未开封的产品在 2~30℃ 下保存。请不要将其冻结。推荐在开封后的悬浊液及层析柱的状态下，置换成 20%乙醇，在 2~30℃ 下保存。

应用事例

下面介绍用实验室规模层析柱进行流感病毒吸附测试的事例。将培养了流感病毒的鸡蛋来源浆尿液载荷到 70mL 的 Cellufine Sulfate 层析柱上，试验结果如表 2 和图 1, 2 所示。能够维持 86% 的病毒活性，直接加以回收，并浓缩到大约 40 倍。宿主来源的蛋白质和 DNA 得以降低至 10% 左右。

- 层析柱：ID22 mm×185 mm ⇒70mL
- 使用缓冲溶液
平衡化：0.01M 磷酸缓冲溶液, pH7.4
清洗 1、2：0.01M 磷酸缓冲溶液, pH7.2
溶出：0.01M 磷酸缓冲溶液, 3 M NaCl, pH7.0
- 流速：1 mL/min
- 病毒株：Vac-2
- 浆尿液量：940mL

表 2 流感病毒的精制结果

	Volume ml	Total HA-Titer HA (recovery %)	Total Protein μg (recovery %)	DNA ng (recovery %)
Load	940	9,625,600 (100)	184,494 (100)	611,560 (100)
Pass	1213	194,000 (2)	157,259 (85)	490,340 (80)
Elute	25	8,257,536 (86)	14,855 (8)	62,800 (10)

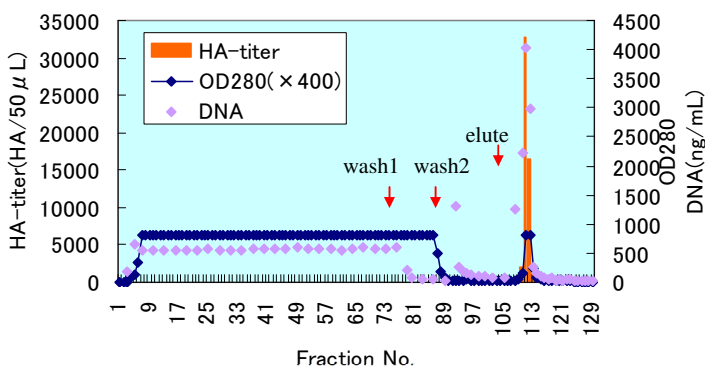


图 3 层析谱

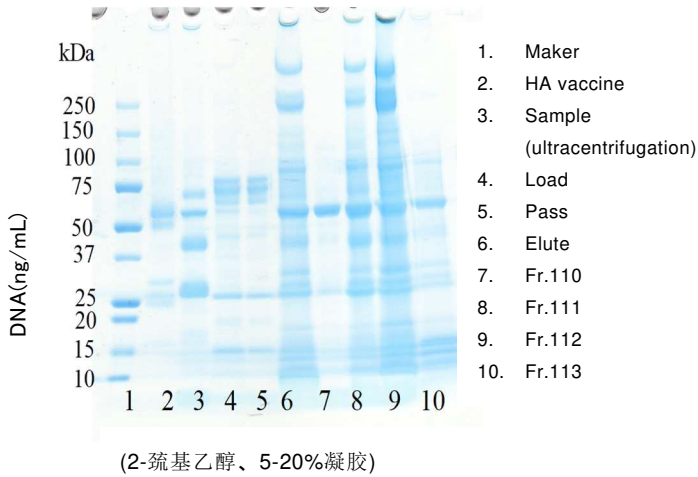


图 4 通过 SDS-PAGE 评价精制度

订货信息

产品名	容量	产品目录 No.
Cellufine Sulfate	5 x 1 mL (微型柱)	19845-51
	1 x 5 mL (微型柱)	19845-15
	10 mL	676 943 324
	50 mL	19845
	500 mL	19846
	5 L	19847
	10 L	19849

购买/技术支持

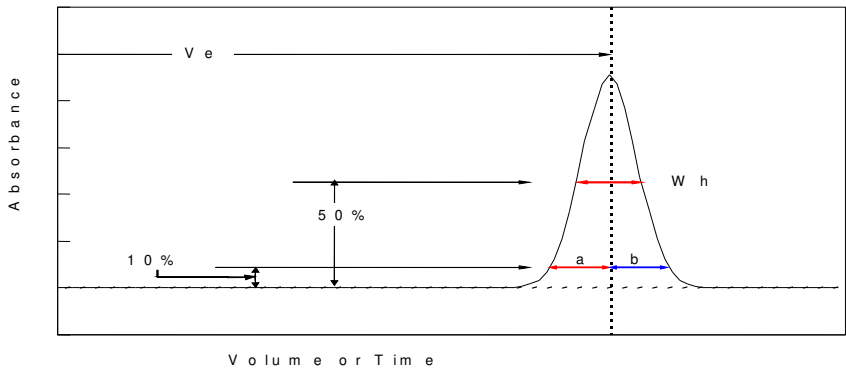
(北美)
JNC America Incorporated
555 Theodore Fremd Avenue, Suite C-206
Rye, NY 10580 USA
TEL: 914-921-5400
FAX: 914-921-8822
E-mail: cellufine@jncamericany.com

(日本、亚洲、其他)
J N C 株式会社
生命化学事业部
邮编 100-8105
东京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号
新大手町大厦 9 楼
Tel: +81-3-3243-6150
Fax: +81-3-3243-6219
E-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

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：0.1-0.3M 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

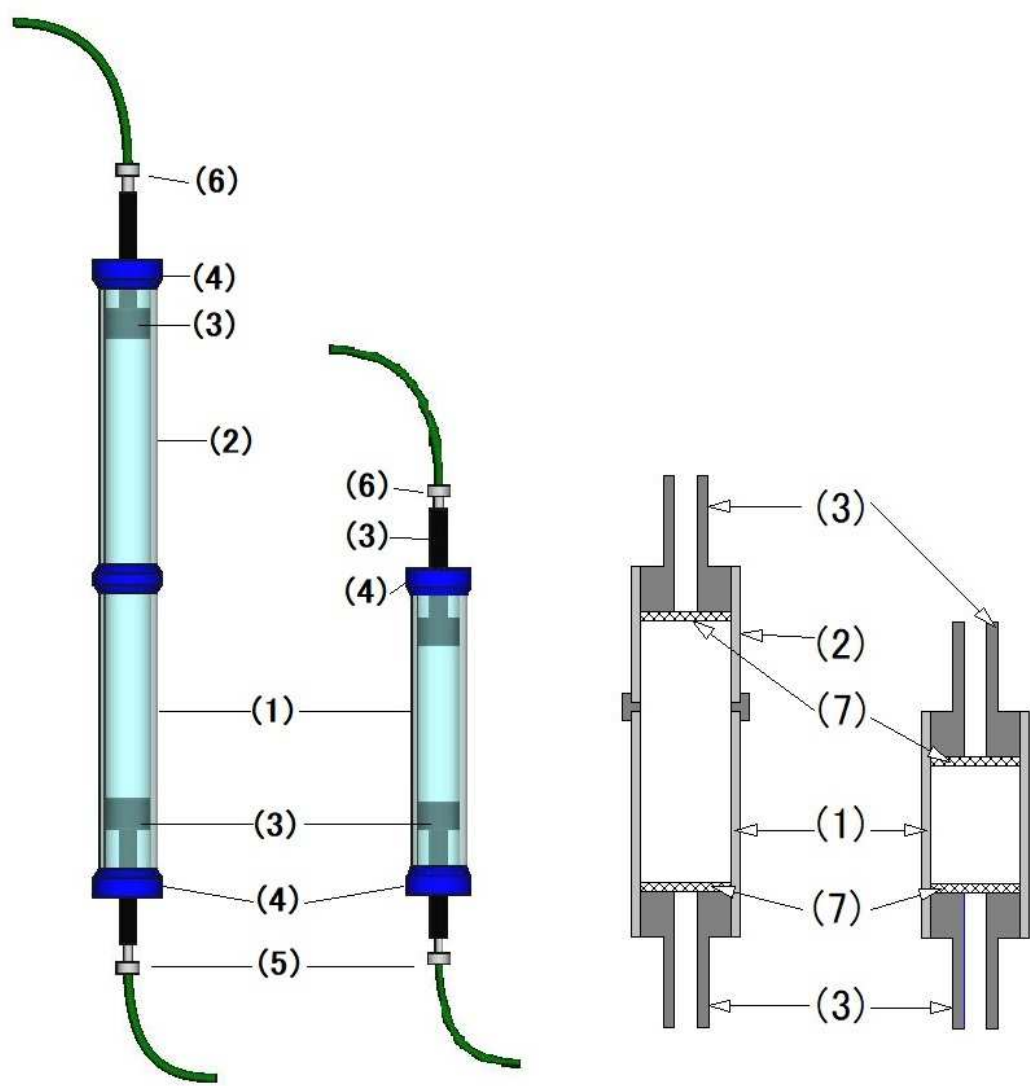
$$\text{HETP} = L/N$$

$$N = 5.54 \times (V_e/W_h)^2$$

$$A_s = b/a$$

一般来说，理论级数超过 3,000N/m即视为良好。另外， A_s 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)		