

亲和层析介质

Cellufine[®] Formyl

技术数据表



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/>

说明

活化载体，用于固定抗体、抗原、亲和配体和酶。

亲和层析技术的发展，需要新一代适合工业环境的载体基质和偶联物。由于众多原因，传统的琼脂糖载体在大规模应用中表现不佳。它们在大型色谱柱中的流特性较差。广泛应用溴化氰偶联化学物具有良好的键合稳定性和非特异性吸附性能。此外，即使使用更为现代的化学方法，琼脂糖也能脱去多糖链，在温和的操作条件下导致配体大量渗出。

Cellufine 活化载体轻而易举地带来了具有生产规模的实验室性能。该产品是基于刚性球形纤维素珠体，具备经过特别优化的亲和层析性能，提供非常大的孔径和高配体容量，并在大型色谱柱中可高流速操作。纤维素主链具有非常低的非特异性吸附，没有琼脂糖的配体渗出问题。

特征

- 实验室和工艺柱的高流速，以实现高通量
- 由于极稳定的偶联化学和载体基质，低配体渗出
- 优异的机械、化学和环保性能
- 配体载量高
- 由于与 4%交联琼脂糖介质的孔隙大小相当，因此与高分子量配体和靶蛋白相容
- 未反应的 Formyl 基团在还原过程中很容易转化为中性羟基，从而实现低非特异性吸附
- 内置亲水隔离臂，最大限度地降低配体可及性和非特异性吸附
- 使用简单的偶联装置，不会造成介质损坏或产生颗粒
- 配体偶联发生在温和条件下，反应时间短
- 介质的热稳定性允许高温反应
- 未反应介质保质期长

特性	
基质	交联纤维素
排阻限（分子量）	4,000kD
标准粒径	125 – 210 微米
颗粒形状	球形
密度	0.7g/ml 湿
收缩/膨胀	在 pH 或离子强度变化时，不会大幅收缩或膨胀
耐化学性	适用于所有盐类、非离子洗涤剂、有机溶剂。耐 0.1M HCl 和 0.5M NaOH。（注：偶联配体在这些条件下可能不稳定）
机械阻力	耐蠕动泵送和长时间搅拌
高温高压	121°C, pH 7, 30 分钟
饱和容量	可高达 40mg 蛋白/ml，具体视蛋白和条件而定
操作压力	< 0.1 MPa

载体	活性基	间隔子长度(原子)	密度 (微摩尔/毫升)
Formyl	醛	8	15 - 20

压力/流速特征

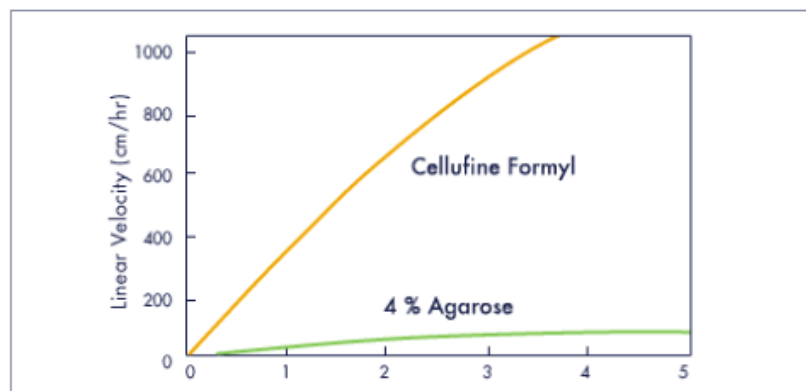


Figure 1
Pressure/flow characteristic of Cellufine Formyl
versus 4 % cross-linked agarose gel

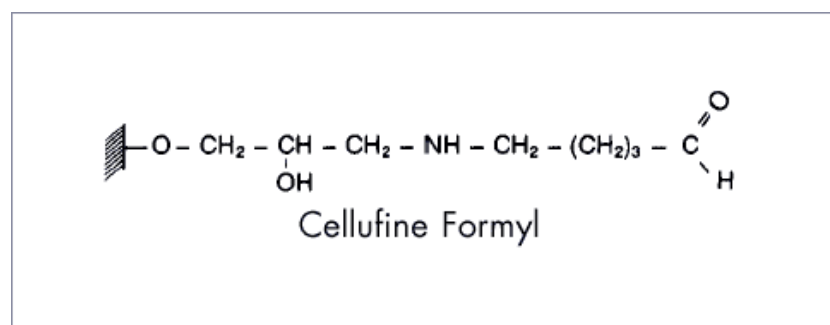


Figure 2
Partial structures of Cellufine activated supports

应用

活化载体	固定化分子	靶分子
Cellufine Formyl	抗体 抗原 蛋白 A、G 凝集素 细胞因子 酶	抗原 抗体 抗体 碳水化合物糖蛋白 受体 底物/产品

抗原纯化

图 3 说明了 Cellufine Formyl 结合抗体用于大规模抗原纯化的方法。在这一应用中，Cellufine 亲和柱表现出显著的高浓度和高产量的抗原纯化性能。该实验柱已用于处理超过 3000 升的启动等离子体超过 30 个月，性能没有显著下降。

制备凝胶时，先用硫酸铵沉淀纯化 45 升含 anti-HBs Ag 抗体的马血清，用 0.1 M NaCl 透析成 0.2M 磷酸盐(pH 7)。所得抗体血清加入 12 升 Cellufine Formyl，与 80 克 NaCNBH₃ 在 4 ~ 8℃ 条件下反应 24 小时。然后用缓冲液冲洗抗体凝胶，并将其装入柱中。该工艺流程由人血浆 HBs Ag 阳性组成，经冻融、离心、硫酸铵沉淀和凝胶过滤层析纯化。

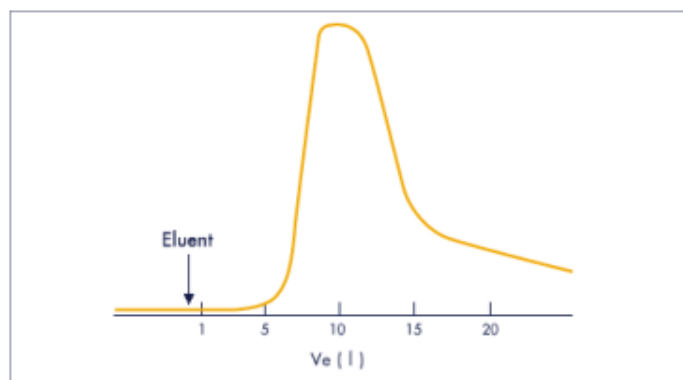
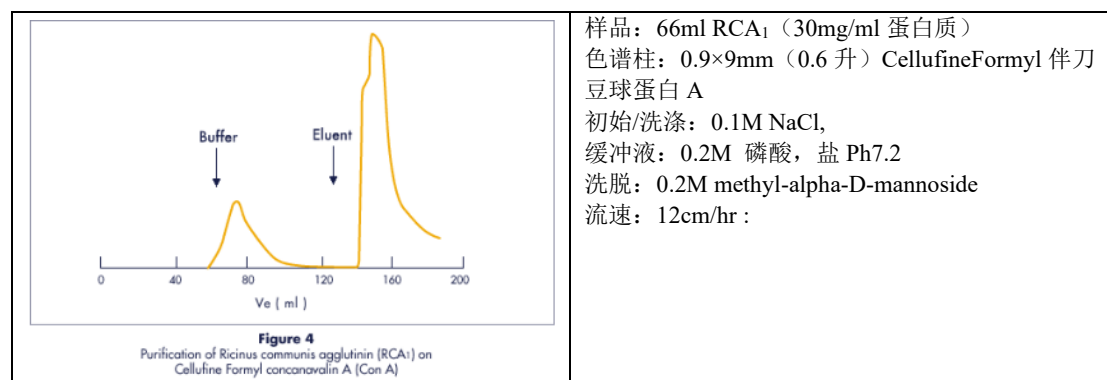


Figure 3
Purification of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) with
Cellufine Formyl immobilized antibody

样品: 1200 升半纯化 HBs ag 阳性人血浆
色谱柱: 140×780mm (12 升) Cellufine Formyl 马 Anti-HBs Ag
初始/洗涤: 0.1M NaCl, 0.2M 磷酸盐
缓冲液: pH7, 洗涤体积 200 升
洗脱: 0.2M Amino 乙酸/HCl (pH3)
流速 20cm/hr 上样/洗涤 26cm/hr 洗脱
产品体积: 14 升 (85×浓缩)
收益率: 87%
纯化: 149×

RCA、纯化

Cellufine Formyl 用于固定凝集素进行糖蛋白纯化, 如图 4 所示。通过在含有 1mM MgCl₂、1mM MnCl₂ 和 1mM CaCl₂ 的 1ml 的 0.1M 醋酸盐(pH 6.4), 加入 methyl-alpha-D-mannoside 和 NaCNBH₃ 在 4℃ 下过夜反应, 将伴刀豆球蛋白 A (50mg)固定在 0.5g(湿) Cellufine Formyl 上。用水冲洗后, 凝胶于 4℃ 下, 用 NaCNBH₃ 在 1%戊二醛 2ml 中悬浮过夜。在第二次用水洗涤后, 将凝胶在室温下 1mtris /HCl (pH7.4)的 2ml 溶液中悬浮一小时, 然后再洗涤。



活化载体的功能选择

Cellufine 活化载体介质是 Cellufine Formyl。每一种装填都经过优化, 使应用基团具有高稳定性、功能性。使得反应化学和配体密度的控制很为简易。

一种普通蛋白质载体

Cellufine Formyl

Cellufine Formyl 填料上的醛类活性基团与配体上的伯 Amino 发生反应，形成一种席夫碱络合物（参见图 5.）。用一种温和的还原剂将席夫碱转化为高度稳定的键。表 2 介绍了一个通用的配体偶联方案。

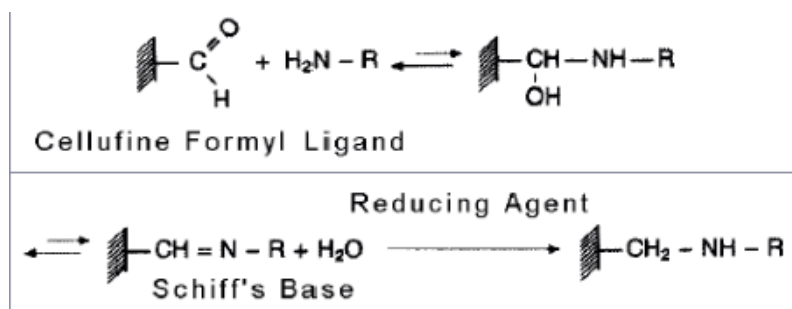


Figure 5
Cellufine Formyl Reaction Mechanism

还原剂

Cellufine Formyl 需要还原剂才能形成高度稳定的键。许多还原剂在实际应用中都能取得良好的效果。应选择能产生恰当反应速率的试剂，但又不能强到破坏蛋白质配体(如还原二硫键)或还原醛基的程度。硼氢化钠(NaBH_4)、氰化钠(NaCNBH_3)和一种新型无毒还原剂，三甲胺硼烷($(\text{CH}_3)_3\text{NBH}_3$)是符合条件的还原剂，具体哪一个取决于具体的要求。对于任何一种，其用量通常低于每克湿凝胶 10 毫克。

Formyl 偶联

Cellufine Formyl 的反应足够快，够实用，但又慢到对大多数蛋白质都非常温和。它还提供了很好的控制措施。该速率可随温度有效控制，以达到最佳的蛋白质稳定性。有效偶联的 pH 范围在 3 ~ 10 之间。

通过改变偶联配体浓度、pH 值和温度，可以很容易地改变并优化偶联效率(偶联量与提供量之比)和总配体密度。在大多数情况下，标准组都可以很好地运行，但是可以使用更广泛的优化操作来改进特定应用的工艺经济。

1	用水和过滤器清洗介质。悬浮液介质与含配体的缓冲液偶联。
2	搅拌或摇两小时。
3	添加还原剂
4	搅拌或摇 6 至 10 小时。
5	用 0.2M Tris/HCl (pH 7)或 1M 乙醇胺缓冲液洗涤，用还原剂淬灭残余醛。搅拌或摇动 3 至 5 小时。
6	用色谱洗脱缓冲液清洗，然后用初始缓冲液洗涤。
7	装柱

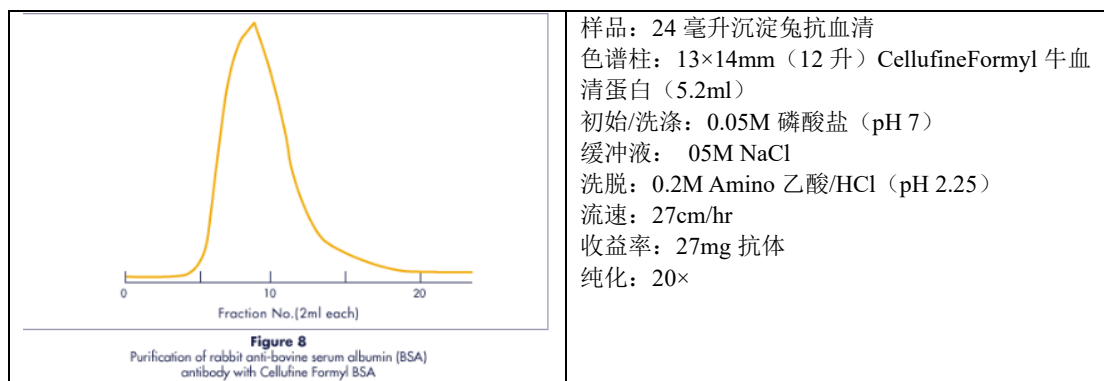
表 2.用于配体与 Cellufine Formyl 偶联的传统通用方案

抗体纯化

优化配体偶联到活化凝胶的过程总是需要在吸收效率(在实际偶联的反应中提供的配体的比例)和最终的配体上样(每毫升凝胶偶联配体量毫克)之间进行权衡。当纯化配体很容易得到

时，可以以低偶联效率为代价生产高填充凝胶。然而，在更常见的情况下，纯化配体是相当珍贵的，良好的偶联效率是非常有必要的，即使以低装填为代价。低配体密度也可能在某些情况下提高结合特异性。

Cellufine Formyl 的醛化学反应中缺乏竞争性水解反应，使得对装填和效率的精细控制十分直接。本案例，以高纯牛血清白蛋白为抗原，纯化兔抗牛血清白蛋白抗体。偶联反应设计的效率很高(98%)，配体密度相对较低。



用 0.1M 磷酸盐(pH 7.1)洗涤 5g(湿)介质，加入 5ml 的 4mg/ml 牛血清蛋白，并在 25℃下搅拌 12 小时，制得 Cellufine Formyl 牛血清蛋白。用缓冲液洗涤后，将介质悬浮于含有 0.4M 乙醇胺的 5ml 缓冲液中。在 25℃搅拌 4 小时后，用缓冲液洗涤介质。牛血清蛋白偶联约为 3.0 mg/ml 介质。

订购信息

Cellufine Formyl	
规格	产品编号
10 ml	676 944 324
50 ml	19853
500 ml	19854
5 Liters	19855
10 Liters	676 944 335