

操作说明

Cellufine™ GCL-2000HF

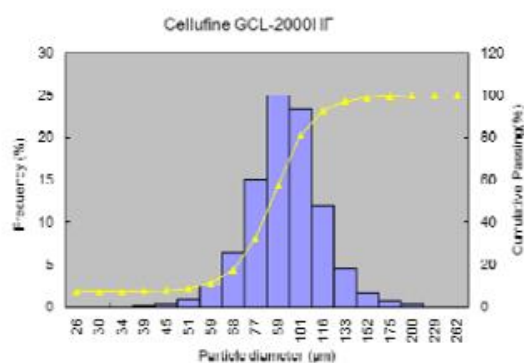
简介

JNC 生产的 Cellufine GCL-2000HF 属于高流速类型，并且具有与 Cellufine GCL-2000 一样的多孔特性。GCL-2000HF 在凝胶过滤层析中可以进行高流速操作，并具有良好的分辨能力。半刚性球形纤维素珠体具有良好的流速和较长的床长度，即使是大直径柱，而高孔体积有利于高容量。此外，GCL-2000HF 具有化学稳定性，可与许多缓冲液和溶液一起操作使用。

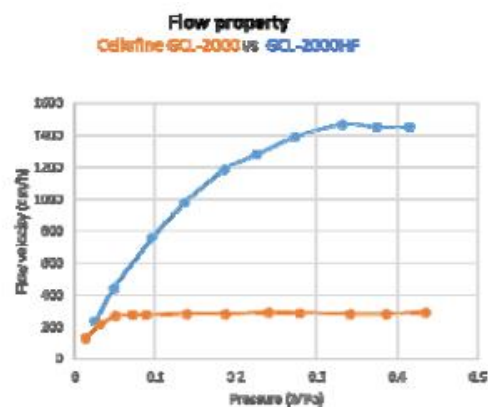
理化性质

	Cellufine GCL-2000HF
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)	200 (PEG) 3000 (球蛋白)
推荐操作压力	<0.2 MPa
pH 稳定性	1 - 14
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。



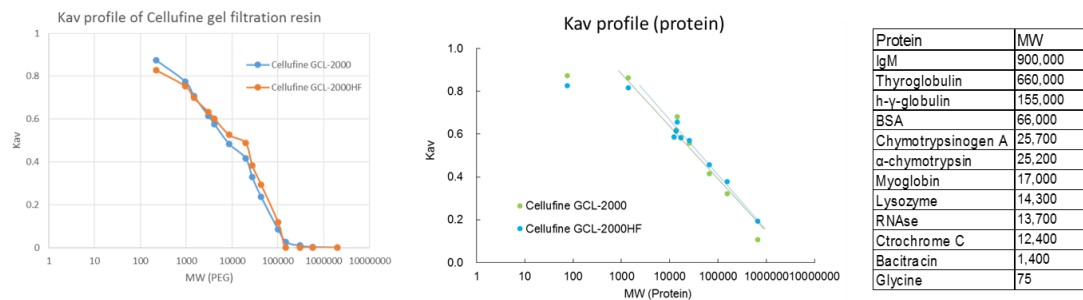
介质直径=85 微米



柱：2.2 厘米内径×20 厘米
流动相：纯水（24℃）

分子量排阻限制 (kD)

填料 PEG 多聚糖 球蛋白
GCL-2000HF 200 --- 3000



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 GCL-2000HF 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。

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

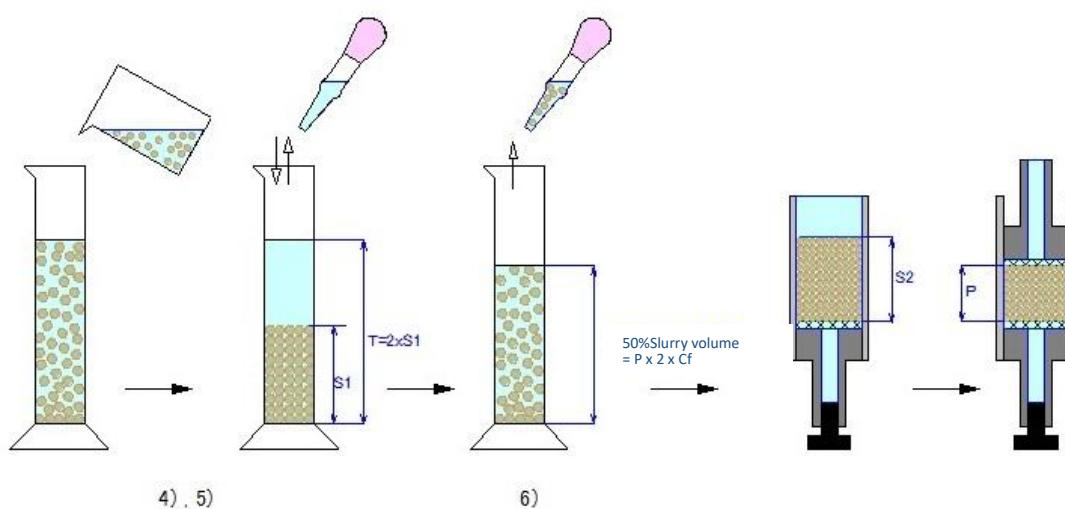


图1 悬浊液调制

- 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：

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

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 GCL2000HF 的 C_f 举例如下: *对于在床高 40-100 里面时手动装柱手动装柱时压缩因子=1.05.

推荐 C_f (用纯水充填时)
大约 1.10~1.15

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。

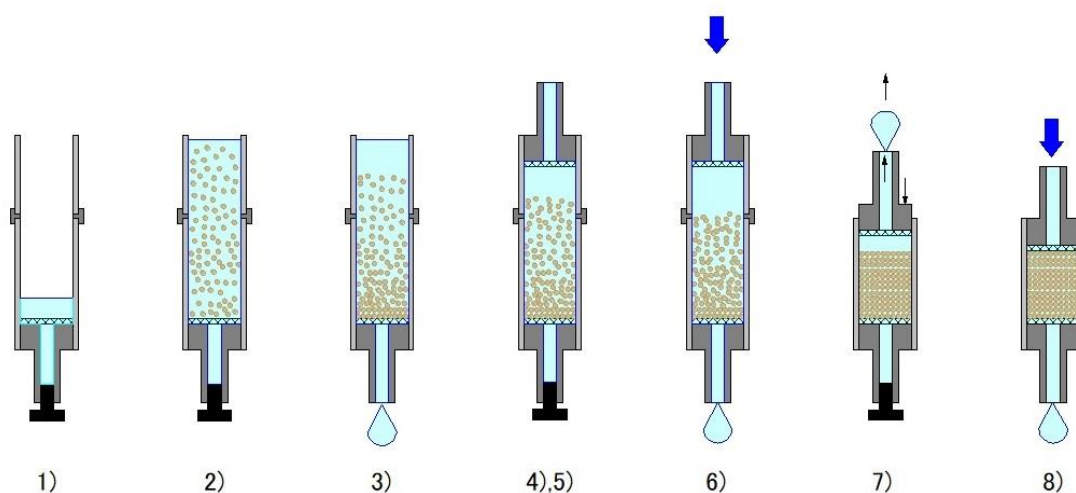


图 2 层析柱充填的步骤

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) 用平衡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 和电导度的基线的稳定来进行确认。)
- 2) 将溶解在平衡缓冲溶液中的试样载荷。
- 3) 为了去除未吸附的杂质, 要用平衡缓冲溶液进行数 CV 的清洗。
- 4) 将由平衡缓冲溶液吸附了的目的物质进行溶出。

样品制备与上样

样品最好在流动缓冲液中制备。如果需要缓冲液更换, 也可以从不同的缓冲液中制备样品。可能需要过滤以除去不溶物质。凝胶过滤中的上样量因柱体积变化。总柱体积的 0.1% 至 1.0% 的上样量, 用于高分辨率应用, 而对于通用的制备分离, 可以使用高达 5% 总柱体积的上样量。对于缓冲液更换或脱盐, 总柱体积的 15-25% 的上样量适合于防止样品稀释。样品蛋白质浓度应在 1-20 毫克/毫升之间。

流速

5-50 厘米/小时。(<0.2MPa)

洗脱

在等度条件下进行洗脱。如果需要缓冲液更换, 请确保在上样前用所需的缓冲液平衡色谱柱。

再生

用 5 个床体积的 0.1M NaOH 以 5-50 厘米/小时的线速度洗涤层析柱。用数个床体积的 DIW 或缓冲液冲洗去除腐蚀剂。测量柱洗出液的 pH 值, 以确保系统已恢复平衡。

稳定性

pH 1 - 14
乙醇、甲醇、丙酮等
6 M 尿素
6 M 胍/HCl
0.1 M HCl
0.5 M NaOH

大多数盐 (NaCl, (NH₄)₂SO₄, etc.)

大部分洗涤剂 (SDS, Tween®, Chap, etc.)

高温高压蒸煮: 1 巴、121℃, 20 分钟。

推荐保存方法

容器未开封, 置于室温下保存。切勿冷冻。短期存储 (不超过或 2 周), 溶液主体和色谱柱可以存储在含 0.02%叠氮化钠、20%乙醇或 0.1 M 氢氧化钠的 DIW 中。长期存储, 应在 2-8℃下, 以相同的条件进行。切勿冷冻。自生产之日起 5 年期。

产品订购信息 (商品目录号)

介质类型	包装尺寸			
	100 毫升	500 毫升	5 公升	10 公升
Cellufine GCL-2000HF	21400	21401	21402	21403

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

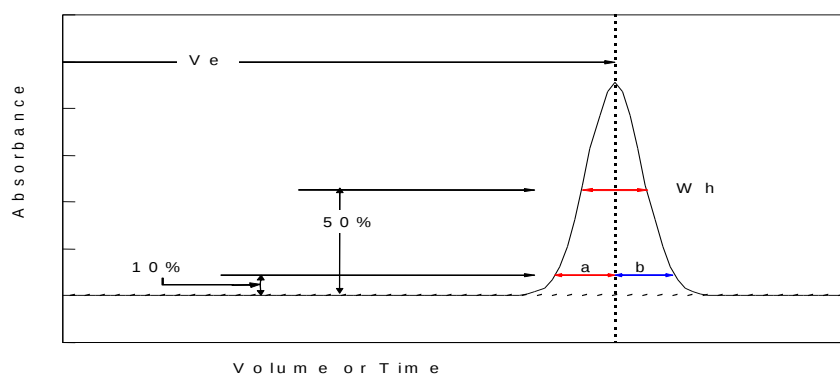
电子邮件: cellufine@jnc-corp.co.jp

<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)

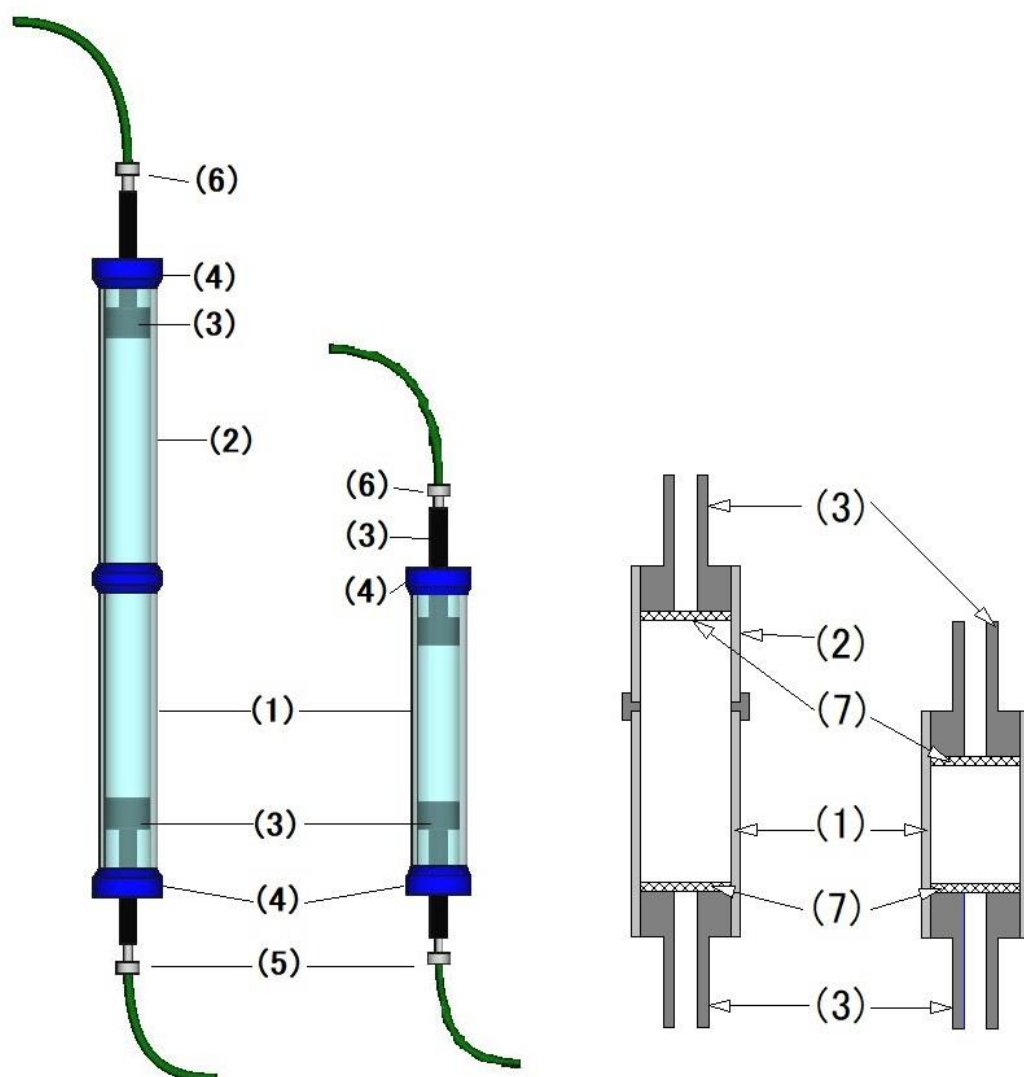


L	层析柱高度 [cm or m]
V_e	溶出时间 (或溶出体积)
W_h	为峰值高度一半时的峰宽
a, b	高度为峰值高度的 10%时的: (a) 偏离中心的前半部的峰值宽度 (b) 偏离中心的后半部的峰值宽度
注意	单位应合并计算。

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)		