

使用说明书

疏水相互作用色谱填料
Cellufine Phenyl EX

概要

Cellufine Phenyl EX 用于疏水蛋白的色谱纯化。许多蛋白质具有疏水性氨基酸残基。这些氨基酸和填料的苯基疏水相互作用并吸附。受疏水相互作用影响的因素有盐浓度、温度、pH、有机溶剂和表面活性剂等。蛋白质吸附通常在高离子强度下进行。另一方面，它以低盐浓度洗脱蛋白质。这种条件与离子交换色谱填料具有相反的吸附机理。因此，具有分离行为与离子交换色谱不同的优点。

另外，Cellufine Phenyl EX 也适用于去除单克隆抗体聚集体。它具有约 6 mS/cm 的低电导率，在去除单克隆抗体生产中产生的聚集体方面能发挥优异的性能。

理化性质

	Cellufine Phenyl EX	(参考) Cellufine MAX Phenyl	(参考) Cellufine MAX Phenyl LS
基质	交联纤维素	高度交联纤维素	高度交联纤维素
颗粒形状	真球	真球	真球
粒径 (μm)	ca. 40 - 130	ca. 40 - 130	ca. 40 - 130
配基类型	苯基	苯基	苯基
BSA 吸附量 (mg/ml)	13	14	6
BSA 洗脱效率 (%)	30	40	90
pH 稳定性	2 - 13	2 - 13	2 - 13
操作压力	< 0.2 MPa	< 0.3 MPa	< 0.3 MPa
供给形态	20 % EtOH、浆液状	20 % EtOH、浆液状	20 % EtOH、浆液状

流速特性

Cellufine Phenyl EX 是交联结合的色谱填料，具有能够以高流速使用的特征。

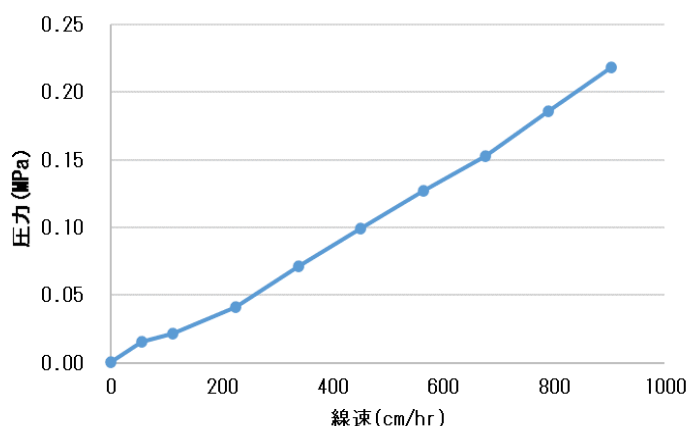


图1 Cellufine Phenyl EX的流速特性

层析柱：内径2.6 cm x 高19.3 cm

流动相：纯水、23~25 °C

压缩系数：1.35

这里所示的是除去系统压力后的树脂所承受的压力。

模型蛋白的分离行为

下图所示的是 Cellufine Phenyl EX 的模型蛋白的分离行为。Cellufine Phenyl EX 是配基浓度设计得较高的填料。因此，模型蛋白能够以低盐浓度被洗脱。

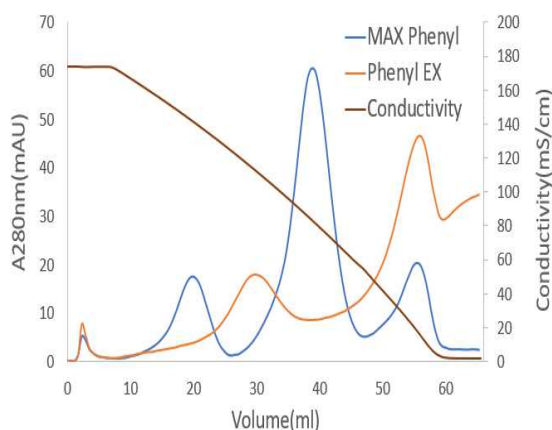


图2 模型蛋白的分离行为

层析柱：内径6.6 mm × 高50 mm

缓冲液A：10 mM磷酸缓冲液 (pH 7)

缓冲液B：10 mM磷酸缓冲液 (pH 7) + 1.5 M硫酸铵

蛋白质：核糖核酸酶 A、溶菌酶、糜蛋白酶原 A

层析柱的装填方法

1. 计算装填的体积，使其达到目标的层析柱体积。
 - (a) 装填层析柱体积 = 层析柱截面积 (cm²) x 层析柱高 (cm)
 - (b) 所需的层析柱沉降体积 = 装填层析柱体积 x (1.30~1.35)
2. 用纯水清洗填料（也可使用缓冲液）。
3. 用纯水、0.1M 氯化钠或适当的装填缓冲液制备 40 - 60 % (v/v) 浆液。
4. 缓慢地进行搅拌。必要时一边脱气一边进行搅拌（室温、1 小时）。
5. 层析柱准备

- (a) 请按照层析柱供应商的使用说明书准备层析柱。
- (b) 用装填缓冲液或 20%乙醇预先润湿层析柱过滤器，以去除空气。
- (c) 将装填缓冲液添加到层析柱内，确认层析柱出口应有缓冲液流出。待装填缓冲液流到距离柱底 0.5~1 cm 的高度时，关闭该出口。
6. 将浆液倒入层析柱中，同时应注意避免产生气泡。根据容量准备一个装填容器。
7. 安装柱顶过滤器。此时，注意不要让气泡进入。
8. 打开层析柱出口，以比使用流速高 20~30% 的流速泵入洗脱缓冲液 10 分钟。注意：切勿超过层析柱的压力极限。
9. 将通液时的层析柱高度做好标记。然后，关闭泵，关闭层析柱出口。
10. 拆下柱顶过滤器的配管。打开柱顶过滤器的入口后，将过滤器降低到标记位置以压缩凝胶。
如果柱高是预先设定好的，用 1.30-1.35 倍的沉降体积装填层析柱，压缩到预定的高度。
11. 将配管连接到柱顶过滤器，以防止气泡进入。在上样前先用 10 柱体积 (CV) 的吸附缓冲液进行通液，使层析柱平衡。

固定长度层析柱的装填方法

1. 计算装填的体积，使其达到目标的层析柱容量。
 - (a) 装填层析柱体积 = 层析柱截面积 (cm²) x 层析柱高 (cm)
 - (b) 所需的层析柱沉降体积 = 装填层析柱体积 x (1.30-1.35)注意：如使用装填容器，应准备充分的填料，以达到目标的层析柱体积
2. 用纯水清洗凝胶（也可使用缓冲液）。
3. 用纯水或装填缓冲液（高盐浓度）制备 40 - 60 % (v/v) 浆液。
4. 在室温条件下缓慢地进行搅拌。必要时一边脱气一边进行搅拌（室温、1 小时）。
5. 层析柱准备
 - (a) 请按照层析柱供应商的使用说明书准备层析柱。
 - (b) 用装填缓冲液或 20%乙醇预先润湿层析柱过滤器，以去除空气。
 - (c) 将装填缓冲液添加到层析柱内，确认层析柱出口应有缓冲液流出。待装填缓冲液流到距离柱底 0.5~1 cm 的高度时，关闭该出口。
6. 将浆液倒入层析柱中，同时应注意避免产生气泡。根据容量准备一个装填容器。
7. 安装装填容器用的柱顶过滤器。
8. 打开层析柱出口，以比使用流速高 20~30% 的流速泵入装填缓冲液 10 分钟。注意：切勿超过层析柱的压力极限。
9. 关闭泵，关闭柱出口。
10. 拆下柱顶过滤器的配管。拆下装填容器。必要时先从装填容器中取出过剩的填料。

11. 安装完柱顶过滤器后，将配管连接到柱顶过滤器，以防止气泡进入。在上样前先用 10 柱体积 (CV) 的吸附缓冲液进行通液，使层析柱平衡。

使用方法

1. 作为一般的疏水相互作用色谱使用时

操作流速

通液时建议在 0.2 Mpa 以下的压力下使用。一般情况下，吸附、洗脱工序以低流速使用，清洗和再生工序以高流速使用。

层析柱的准备

使用 2 ~5 CV 的洗脱缓冲液使层析柱平衡。然后用同量的吸附缓冲液清洗。一般的吸附缓冲液建议使用 50 mM 磷酸钠、pH 7.0 + 0.5-2.5 M 硫酸钠或硫酸铵或氯化钠。吸附强度会影响盐浓度、pH 值和温度。通常，当使用具有高盐浓度的盐时，能够实现较高的吸附量。通过降低盐浓度可实现洗脱。如果您想获得更多信息，请参阅文献等。。

试样的准备和上样

最好先用吸附缓冲液代替试样。必要时，用过滤器等除去不溶物。如有必要，使用脱盐过滤器、脱盐柱等将试样脱盐，以将试样制备成所需的离子强度。蛋白质的吸附量和回收率因填料而异。用吸附缓冲液平衡层析柱后，进行上样。上样后，用 5CV 吸附缓冲液清洗以去除未吸附的物质。然后，洗脱填料上所吸附的物质。

目标物质的洗脱

使用低盐浓度缓冲液（浓度为 0.5M 以下）的缓冲液，通过逐步洗脱或梯度洗脱来进行目标物质的洗脱。离液剂（KSCN）、表面活性剂（辛基葡糖苷、CHAPS、Triton X、Chaps、Tween）和变性剂（盐酸胍、尿素、乙醇）有时可提高对强吸附蛋白的回收率。

2. 用于去除抗体聚集体时

操作流速

通液时建议在 0.2 Mpa 以下的压力下使用。一般情况下，吸附、洗脱工序以低流速使用，清洗和再生工序以高流速使用。

层析柱的准备

用 2-5 CV 的吸附缓冲液平衡。可以使用磷酸盐和 Tris 等常用的吸附缓冲液，但建议探索盐浓度和 pH 的最佳条件。

试样的准备和上样

通过缓冲液交换、稀释、添加酸/盐基等操作后将经过 Protein A 层析柱后的洗脱试样调节至所需的 pH 和电导率，并通过 0.2 μm 过滤器过滤。用吸附缓冲液使层析柱平衡后，进行上样。由于上样液的流穿部分是存在单克隆抗体的部分，因此要将其予以回收。上样后，用 5-10 CV 吸附缓冲液清洗。由于清洗液的流穿部分中也存在单克隆抗体，因此要将其予以回收。

杂质的洗脱

使用 10 CV 纯水洗脱吸附在层析柱上的抗体聚集体和夹杂物等杂质。定置清洗，使用 10 CV 的 0.5 M NaOH 和 30% 异丙醇进行通液清洗。可以使用 0.5 M NaOH 和 30% 异丙醇的混合物。

化学稳定性及物理稳定性

在室温 pH 2-13 的条件下较为稳定。对多种盐类 (NaCl、(NH₄)₂SO₄ 等)、表面活性剂 (SDS, Tween 等)、其他化学品 (70%乙醇、30%异丙醇、6M 盐酸胍及尿素) 较为稳定。定置清洗可使用 0.5 N NaOH。高压灭菌时，将其悬浮于中性 pH 的缓冲液后以 121°C 的温度处理 20 分钟。

填料的再生

用 5-10 CV 的 0.5 N NaOH、30% 异丙醇清洗。在某些情况下，可能需要先用 2-5 CV 的 70% EtOH / 30% 纯水 / 0.1 M 醋酸清洗，然后再用纯水清洗，以去除所吸附的脂质。强吸附的杂质也可以用离液剂 (KSCN)、表面活性剂 (辛基葡糖苷、CHAPS、Triton X、Chaps、Tween) 和变性剂 (盐酸胍、尿素、乙醇) 清洗。

保存方法

使用含有 20%乙醇的中性缓冲液在 2~25°C 温度条件下保存。要避免冻结。长期保存时最好是采用 4°C 左右的冷藏保存。

保证期限

自生产之日起 5 年。

参考文献

1. Harris, E. L. V. and Angal, S., *Protein Purification Methods: A practical Approach*. New York: Oxford University Press, 1989.
2. Janson, J.-C. and Ryden, L., *Protein Purification: Principles, High*

Resolution Methods, and Applications. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998

3. Sanchayita G., Yinying T., Lynn C. and Douglas C., *mAbs* 5:5, 795-800; September/October 2013

订购说明 (目录编号)

产品名	容量					
	Mini-Column 1 ml x 5	Mini-Column 5 ml x 5	100ml	500ml	5 lt	10 lt
Cellufine PhenyIEX	22000-51	22000-55	22000	22001	22002	22003

JNC 株式会社
生命化学事业部

東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号

TEL : 03-3243-6150 Fax : 3-3243-6219

e-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

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