

Cellufine™ MAX Butyl HS

Cellufine MAX Butyl HS 是将丁基固定在表面的疏水相互作用层析填料。与以往的 MAX Butyl 相比，实现了丁基的高浓度固定。

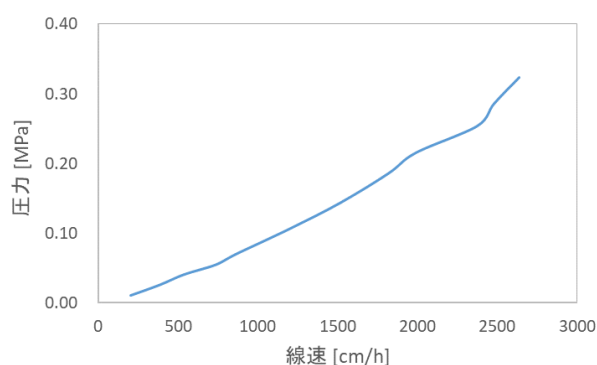
Cellufine MAX Butyl HS 被用于疏水性蛋白质的层析纯化。很多蛋白质都存在疏水性氨基酸残基。这些氨基酸与丁基填料发生疏水相互作用并吸附。影响疏水相互作用的因素有盐浓度、温度、pH 值、有机溶剂、表面活性剂等。蛋白质吸附通常在高离子强度下进行。另一方面，在低盐浓度下，蛋白质会溶出。此类条件与离子交换层析填料属于相反的吸附结构。因此，具有形成与离子交换层析法不同的分离过程的好处。将丁基固定的填料有 Cellufine MAX Butyl，Cellufine MAX Butyl HS 能够实现丁基的高浓度固定。采用这种设计，尤其对多糖疫苗的纯化会发挥卓越的效果。

表 1 Cellufine MAX Butyl HS 的特征

特征	
产品名称	Cellufine MAX Butyl HS
配体	丁基
底物载体	高度交联纤维素颗粒
粒径	40 – 130 μm (ca. 90 μm)
BSA 吸附量(mg/ml)	13
BSA 溶出效率 (%)	36
分子量渗透极限 (kDa)	1,000
pH 稳定性	2 – 13
操作压力	< 0.3 MPa
保存液	20 % EtOH、悬浮状

流速特性

Cellufine MAX Butyl HS 的产品特性是具有卓越的流速特性。



色谱柱: 内径 2.2cm x 高度 20 cm

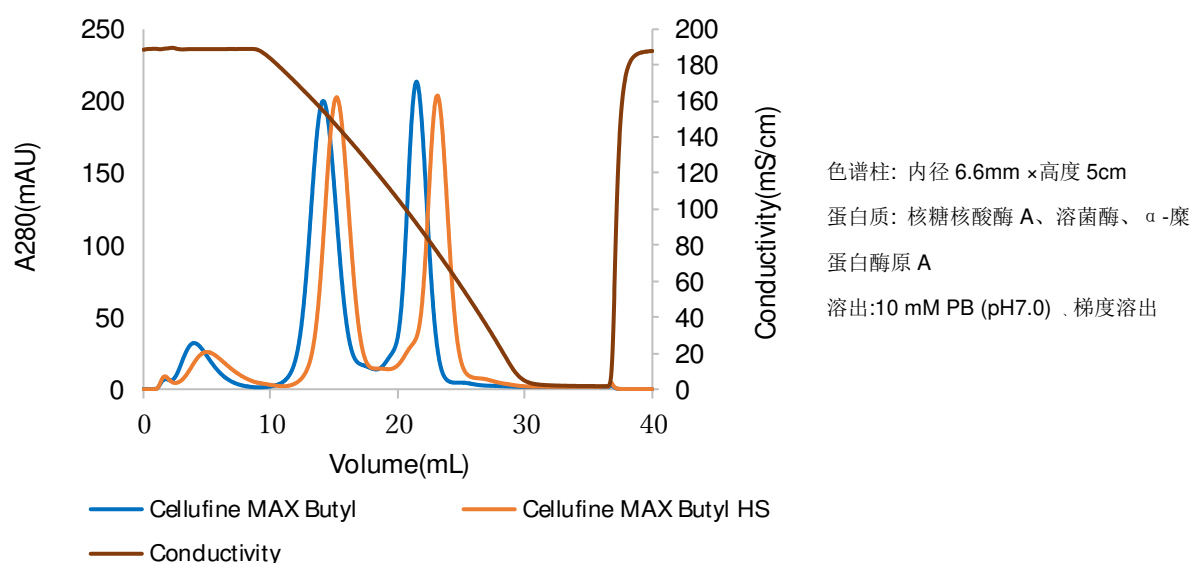
温度: 24 ± 1 °C

流动相: 纯化水

模型蛋白质的分离过程

疏水性的强度

下图显示了 Cellufine MAX Butyl HS 的模型蛋白质的分离特性。根据此结果, 疏水性强度的排序为 MAX Butyl HS > MAX Butyl。



色谱柱: 内径 6.6mm x 高度 5cm

蛋白质: 核糖核酸酶 A、溶菌酶、 α -糜

蛋白酶原 A

溶出: 10 mM PB (pH7.0) 梯度溶出

色谱柱的填充方法

1. 计算必要的体积, 确保能达到目标色谱柱容积。
2. 用 50 mM 磷酸钠填充缓冲液、1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0 制备 40~60 % (v/v) 悬浮液。
3. 轻轻搅拌或置于真空条件下脱气。
4. 在关闭色谱柱出口的状态下, 将悬浮液小心地倒入色谱柱内。根据不同的色谱柱填充体积,

可能需要储液装置。

5. 打开顶部过滤器，排出空气的同时，将移动栓插入到悬浮液表面并将其固定。
6. 打开色谱柱出口，按照比操作流速还要快 20~30% 的速度开始实施溶出缓冲液的供液。
7. 等柱床稳定后，关闭色谱柱出口。然后，在开放顶部过滤器的状态下，将移动栓降低至柱床表面。在进行上样之前，使用 10 CV（色谱柱体积）的吸附缓冲液平衡色谱柱。

操作指引

常规使用方法

1. 使用吸附缓冲液平衡色谱柱。常规的吸附缓冲液使用 50 mM 磷酸钠, pH 7.0 + 0.5~2.5 M 硫酸钠或硫酸铵或氯化钠。
2. 实施上样。
3. 为了清除未吸附的杂质，使用吸附缓冲液，按 5 CV 洗脱。
4. 使用溶出缓冲液溶出已吸附的靶向分子。

常规操作流程的概要如下列表 2 所示。能够根据目的对 pH 值、缓冲液、盐、流速等各项条件实现最优化。

表 2 Cellufine MAX Butyl HS 的常规使用流程

工序		CV	各工序的解说
1	平衡	3 - 10	确认色谱柱内缓冲液的 pH 值与需要具备导电率的上样缓冲液的 pH 值相同。 50 mM 磷酸钠, pH 7.0 + 0.5~2.5 M 硫酸钠
2	上样	随意	向色谱柱上样时应结合 a) 流穿或 b) 层析法，并在溶出模式下使用。
3	洗脱	5	使用吸附缓冲液。
4	溶出	3 - 7	10 mM 磷酸钠缓冲液, pH 值 7.0
5	定置洗脱	3 - 10	0.5 M NaOH

推荐缓冲液

吸附/上样缓冲液: 常规的吸附缓冲液是 50 mM 磷酸钠、pH 值为 7.0 + 0.5~2.5 M 的硫酸钠或硫酸铵或氯化钠。吸附强度受盐浓度、pH 值、温度的影响。通常情况下，如果使用高盐浓度的盐，就会获得高吸附量。

溶出缓冲液: 溶出可降低盐浓度。使用低盐浓度缓冲液（0.5 M 浓度以下），采用逐步溶出或梯度溶出实施。离液序列高的试剂（KSCN）、表面活性剂（Octyl glucoside、CHAPS、Triton X、Chaps、Tween）、蛋白质变性剂（盐酸胍、尿素、乙醇）有可能提高牢固吸附的蛋白质的回收率。

试样制备与上样

预先用吸附缓冲液置换试样。根据需要，用过滤器等清除不溶物。如有必要，用脱盐过滤器、脱盐色谱柱等对试样实施脱盐，配制成目标离子强度。用吸附缓冲液平衡色谱柱后，再实施上样。上样后，用 5 CV 的吸附缓冲液洗脱，以清除未吸附物质。

操作流速

通液时推荐在 0.3 MPa 以下的条件使用。通常情况下，采取低流速来实施吸附、溶出工序，在洗脱和再生工序则使用高流速。

理化稳定性

室温下能够在 pH 2~13 的条件下稳定使用。对很多盐类(NaCl、(NH₄)₂SO₄ 等)、表面活性剂(SDS, Tween 等)、其他化学品(70 %乙醇、30 %异丙醇、6 M 盐酸胍及尿素)表现稳定。能够使用 0.5 M NaOH 实施定置洗脱。如果采取高压灭菌，在中性 pH 值的缓冲液中悬浮后，以 121℃温度下高压灭菌 20 分钟的条件进行处理。

再生与除热

用 2~5 CV 的 0.5 M NaOH 洗脱。有些情况需要用 2 - 5 CV 的 70 % EtOH/30 %纯化水/0.1 M 醋酸来洗脱，然后再通过纯化水洗脱，清除吸附的脂质。

应用事例：多糖疫苗的纯化

1. 培养

将肺炎链球菌 *Streptococcus pneumonia* 血清型 19F (ATCC49619) 接种到羊血琼脂培养基内，在厌氧条件下培养 16 小时后，再接种到 2000 mL 的 Brain Heart Infusion 培养基内，并在 37 °C 下培养 20 小时。

2. 溶菌、回收

在培养液中添加 10%脱氧胆酸钠，在 37 °C 下培养 16 小时并溶菌。实施离心分离 (12,000 rpm, 15 分钟, 4 °C)，回收上清液。然后再用 0.45 μm 的醋酸纤维素膜(Cellulose Acetate Membranes)过滤器过滤该上清液。通过超滤 (Vivaflow 200, MilliQ, MWCO 100k)浓缩滤液。

3. 硫酸铵沉淀

在供试品中添加相当于 50%饱和溶解度的硫酸铵，并在 4 °C 下培养 16 小时。通过离心分离(12,000 rpm, 15 分钟, 4 °C) 清除结晶颗粒 (pellet)，将采用 0.2 μm 滤膜过滤器过滤上清液后的溶液作为层析用上样。

4. 采用 Cellufine MAX Butyl HS 的疏水相互作用层析

采用以下手法实施了层析。

工序	溶液	容量
平衡	缓冲液 B	5 CV
上样	试样溶液	40 CV
溶出 1	缓冲液 A	10 CV
溶出 2	超纯水	20 CV
洗脱	缓冲液 A	5 CV
定置洗脱	0.5M NaOH 溶液	5 CV
平衡	超纯水	20 CV

色谱柱: 6.7 mmID × 30 mm (1.06 mL)

流速: 0.212 mL/min (RT 5 min, 36cm/hr), 仅平衡 1 mL/min

缓冲液 A: 10 mM 磷酸钠, pH7.0

缓冲液 B: 10 mM 磷酸钠, pH7.0, 2.0 M 硫酸铵

5. 纯化结果

使用蒽酮-硫酸法对多糖 (Ps) 实施定量。通过采用蛋白质检测试剂盒 Protein assay kit (Bio-Rad) 的 Bradford 法对蛋白质 (Pr) 实施定量。使用 BioSpec nano (Shimazu) 测量 260 nm 的吸光度, 按照 1 AU=50 μg/mL 计算核酸 (NA) 量。

	Ps μg/mL	Ps Recovery%	Ps Purity%	Pr μg/mL	NA μg/mL	Pr/Ps %	NA/Ps%
上样液	726	-	46	73	772	10	106
纯化后	518	89	54	N.D.	436	0	84

保存方法

如果是 2 周以内的短期保存, 在层析纯化收集液及色谱柱的状态下, 能够使用 2 M (NH₄)₂SO₄ 或 0.05 N NaOH 实现常温保存。如果是长期保存, 应采用含 20 % 乙醇的中性缓冲液, 在 2~25℃ 的环境下保存。切勿冻结。

使用期限

自生产日期起 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

订购说明

产品名称	包装尺寸	目录编号
Cellufine MAX Butyl HS	5 x 1 mL 迷你色谱柱	22200-51
	5 x 5 mL 迷你色谱柱	22200-55
	100 mL	22200
	500 mL	22201
	5 L	22202
	10 L	22203

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

电子邮箱: cellufine@jnc-corp.co.jp<http://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/>