

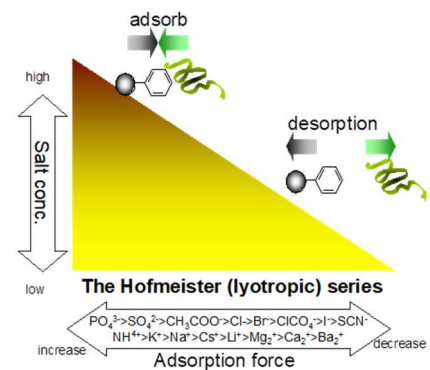


Phenyl/Phenyl LS

操作说明

简介

Cellufine MAX Phenyl 用于疏水蛋白质的色谱分析。许多蛋白质具有疏水氨基酸残基，可与 Phenyl 官能团相互作用。影响这种疏水性相互作用的因素包括盐浓度、温度、pH、有机溶剂和界面活性剂。蛋白质吸附通常发生在高离子浓度，而在低盐浓度洗脱。这与离子交换色谱分析法相反，具有互补的分离优势。

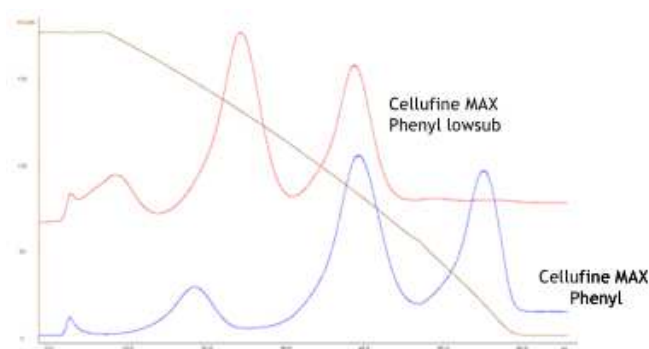


理化性质

	Cellufine MAX Phenyl	Cellufine MAX Phenyl LS
配体	 Phenyl	
基底介质	高交联纤维素	
粒径	40 - 130 μm (ca. 90 μm)	
排除界限分子量 (kD)	1000	
BSA 含量 (毫克/毫升)	11	4
BSA 洗脱效率 (%)	40	90
多克隆免疫球蛋白 G 10% DBC (毫克/毫升)	31	19
推荐操作压力	<0.3 MPa	
pH 稳定性	2-13	
保存方法	2-8 °C in 20 % 乙醇悬浮液	

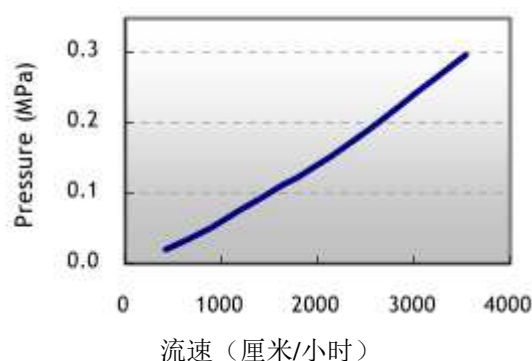
※表 1 所示数值并非规格值。

下图显示了 Cellufine MAX Phenyl 的分离特性。Cellufine MAX PhenylLS 与标准 MAX Phenyl 相比，配体密度更低。



层析柱: 6.6 厘米 直径×5cm L
 蛋白质: 核糖核酸酶 A、溶菌酶、
 α -Chymotrips inogen A
 洗脱: 10 mM PB (pH7.0) 1.5 → 0 M
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 梯度

Cellufine MAX Phenyl 产品具有优越的流压性能



层析柱: 2.2 厘米 直径×20cm L
 温度: $24 \pm 1^\circ\text{C}$
 流动相: 水

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）

悬浊液的调制

- 1) 将 Cellufine MAX Phenyl 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。

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

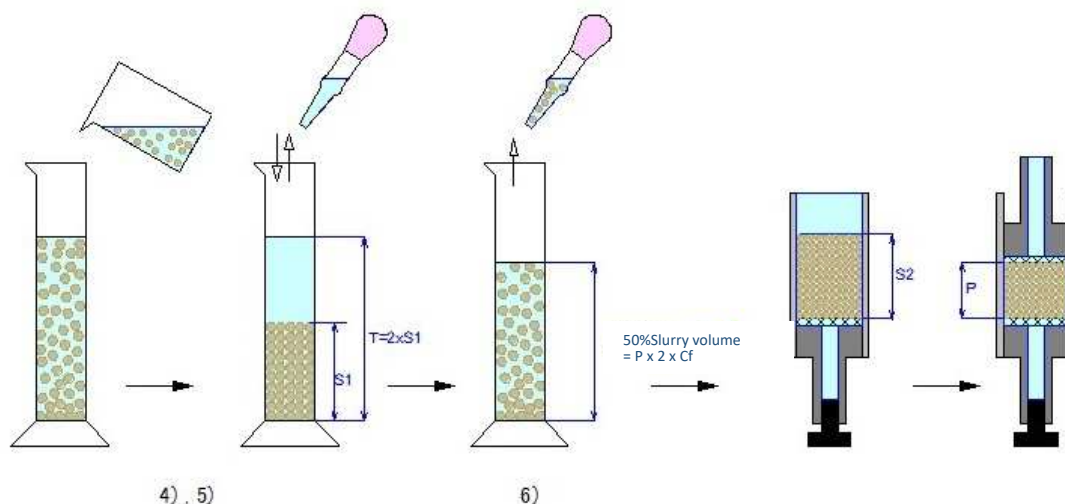


图 1 悬浊液调制

- 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：

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

Cf 为压缩因子，由下式导出：

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

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

层析柱尺寸举例（直径×柱床高度）	推荐 Cf (MAX Phenyl and MAX Phenyl LS)
10.0 cm× 20.0 cm	1.15~1.25

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

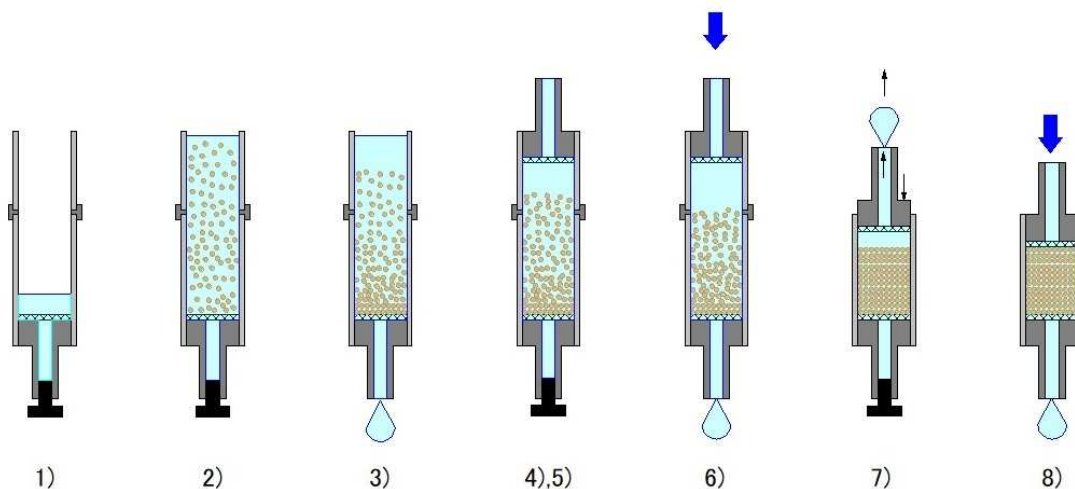


图 2 层析柱充填的步骤

需要抽出后再次充填。

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 (As) 的确认来进行评价。

操作指南

一般操作

- 1) 用 2-5 柱体积洗脱缓冲液（低盐度）平衡色谱柱，再用同样的上样缓冲液洗涤。
- 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

吸附缓冲液：传统的上样缓冲液为 50mM 磷酸钠，pH 7.0，含有 0.5 - 2.5 M Na_2SO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或 NaCl 。吸附强度与盐浓度、pH 值和温度呈函数关系。通常来说，浓度越高约有利于吸附。

洗脱缓冲液：然后通过降低盐浓度来实现解吸（洗脱）。用低浓度盐（例如低于 0.5M）进行分步或梯度洗脱可实现对结合物解吸。使用离液剂（例如 KSCN ）、表面活性剂（如辛基糖苷、CHAPS、Triton®X、CHAPS 或 Tween®）（如乙醇）可提高紧密吸附蛋白质的回收率。

样品制备与上样

在吸附缓冲液中制备浓度为 1-20 毫克/毫升的样品。可能需要过滤以去除不溶性物质。如有必要，缓冲液交换可采用渗滤或脱盐色谱法进行。蛋白质吸附与回收会随着装柱不同而出现差异。通常，就结合力而言，Cellufine MAX Phenyl>MAX PhenylLS>MAX Butyl。样品(在上样缓冲液中制备)在上样缓冲液洗涤后应用。上样后，用 5 柱体积的上样缓冲液冲洗以除去未结合物。随后，洗脱结合产物即可。

流速

MAX Phenyl $\leq 800\text{cm/h}$ ($<0.3\text{MPa}$)

MAX Phenyl LS $\leq 1200\text{cm/h}$ ($<0.3\text{MPa}$)

一般来说，在此范围内以低流速操作最适合结合与洗脱，而较高的流速适合洗涤与再生。

再生和脱热源

用 2-5 个床体积 0.5 M NaOH 冲洗层析柱。在某些情况下，可能额外需要 2 - 5 个床体积的 70% EtOH/ 30% DIW /0.1 M AcOH 进行冲洗，然后用蒸馏水去除吸附的脂。

稳定性

在 2 - 30℃ 的温度下操作时，pH 值为 2 - 13。在大多数盐 (NaCl, (NH₄)₂SO₄ 等) 和大多数洗涤剂 (SDS, Tween 等) 以及其他化学物质 (70% 乙醇、30% 异丙醇、6M 盐酸胍和尿素) 中稳定。该产品可用 0.5 M 氢氧化钠清洗。悬浮在水中后，可在 121° C 下 20 分钟内进行高压灭菌处理。

推荐保存方法

将未开封的产品保存在 2-8℃。短期存储 (不超过 2 周)，溶液主体与色谱柱可以在室温下贮存在 2M 的 (NH₄)₂SO₄ 或 0.05N NaOH 中。长期存储，应在 25℃ 或更低温度，存放在含有 0.02% 叠氮化钠或 20% EtOH 的中性缓冲液中。切勿冷冻。保质期为自生产日期起五年。

参考文献

1. Harris, E.L.V. and Angal, S., 《蛋白质纯化方法：一种实用的方法》(*Protein Purification Methods: A practical Approach*)。纽约：牛津大学出版社 (Oxford University Press)，1989 年。
2. Janson, J.C. 和 Ryden, L. 《蛋白质纯化：原理、高分辨率方法与应用》(*Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*) 第 2 版。纽约：约翰威立出版有限公司 (John Wiley & Sons, Inc.) 1998 年。

产品订购信息 (商品目录号)

介质类型	包装尺寸					
	微型柱 1 毫升×5	微型柱 5 毫升×5	100 毫升	500 毫升	5 公升	10 公升
Cellufine MAX Phenyl	20700-51	20700-55	20700	20701	20702	21103
Cellufine MAX Phenyl LS	20800-51	20800-55	20800	20801	20802	20803

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

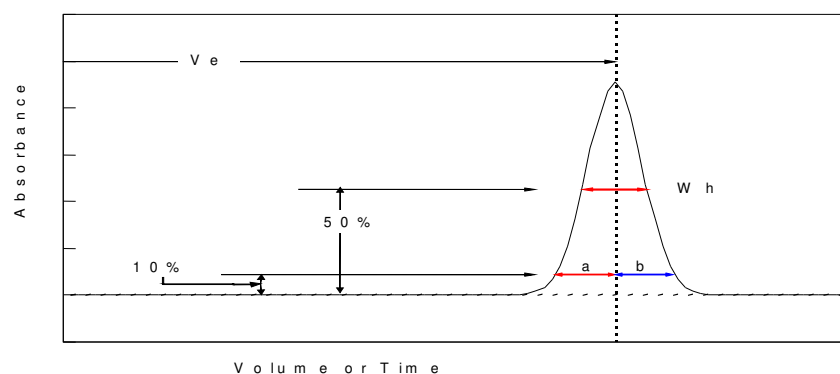
电子邮件：cellufine@jnc-corp.co.jp

<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)

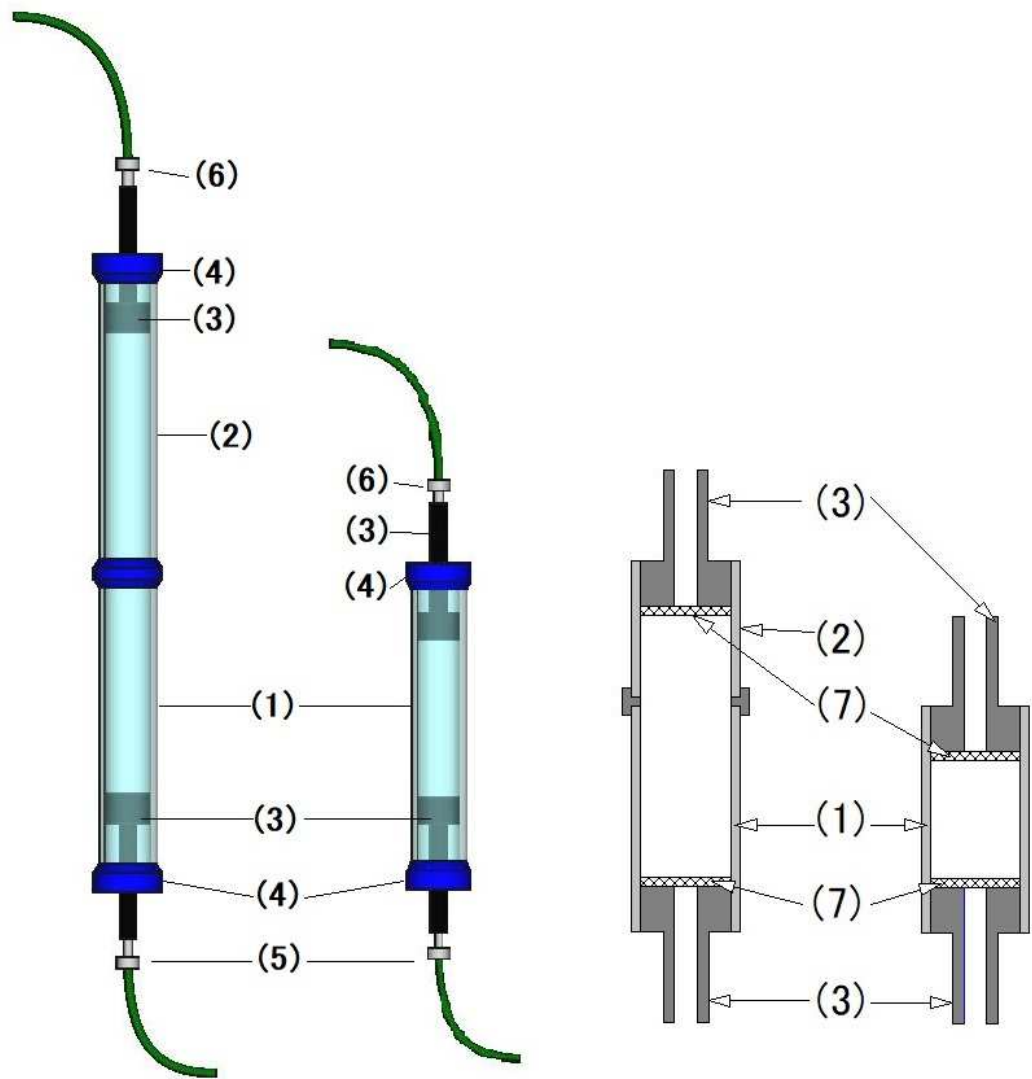


L	层析柱高度 [cm or m]
V_e	溶出时间 (或溶出体积)
W_h	为峰值高度一半时的峰宽
a, b	高度为峰值高度的 10%时的: (a) 偏离中心的前半部的峰值宽度 (b) 偏离中心的后半部的峰值宽度
注意	单位应合并计算。

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)		