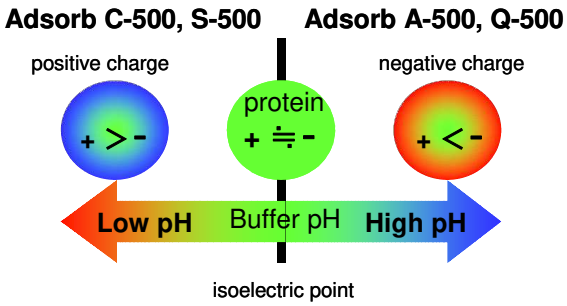
操作说明

# Cellufine™ C-500

## 简介

Cellufine C-500 由 JNC Corporation 生产，是用于碱性蛋白质和其他生物分子的阳离子交换色层析介质。该胶质由珠状球形纤维素组成，引入羟甲基（CM）。Cellufine A-500 介质适用于蛋白质分子量达 500kd 的色谱分析。该纤维素凝胶的优异刚性具有高流速特点，因此可加快处理时间，即使是大直径的生产规模柱。




## 理化性质

| | | C-500 |
|---|---|---|
| 配体 | | $^{-}O-CH_2COO^{-}Na^{+}$<br>羟甲基 |
| 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) | | 500 |
| 离子交换容量(meq/mL-gel) | | 0.07-0.14 |
| 推荐操作压力 | | ＜0.2 MPa |
| 蛋白质吸附量(mg/mL-gel) | 卵白溶酶菌 | 130 |
| | 人γ-球蛋白 | 58 |
| 推荐定置清洗液（CIP） | | 0.5M M 氢氧化钠水溶液 |
| pH 稳定性 | | 1 - 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。

## 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 A-200 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。

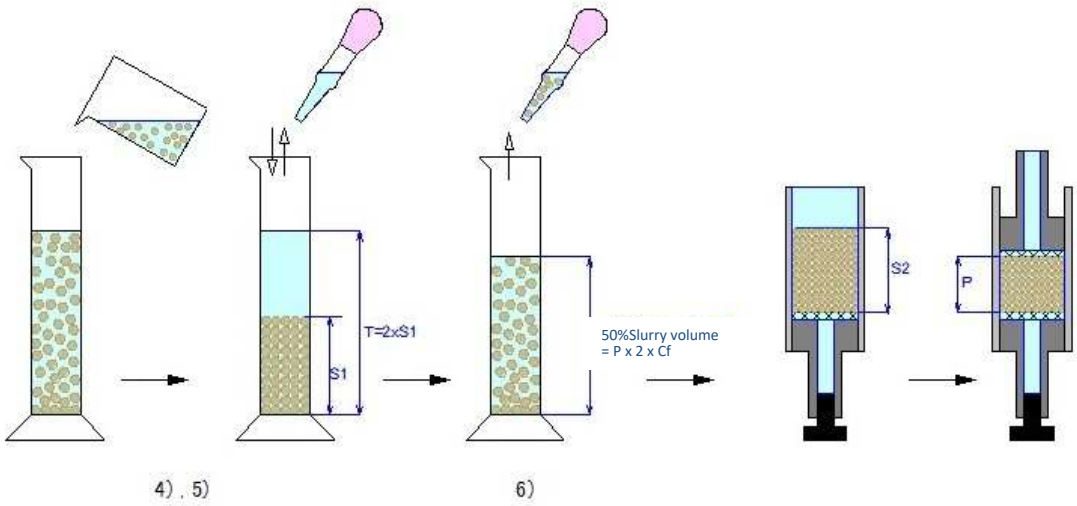



图 1　悬浊液调制

**悬浊液浓度(%)=自然沉降体积（S1）/总体积(T)×100**

5) 调节充填液量，使悬浊液浓度为 50%。在 T ＝ 2 x 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%悬浊液必要量=（填塞物体积（P） x 2）x Cf**

Cf 为压缩因子，由下式导出：

**Cf = 自然沉降体积（S2） /填塞物体积（P）**
※填塞物体积是定为目标的层析柱的体积。

**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。**

| 推荐 Cf |
| --- |
| 1.10 ～1.20 |

## 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 0.2MPa 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。

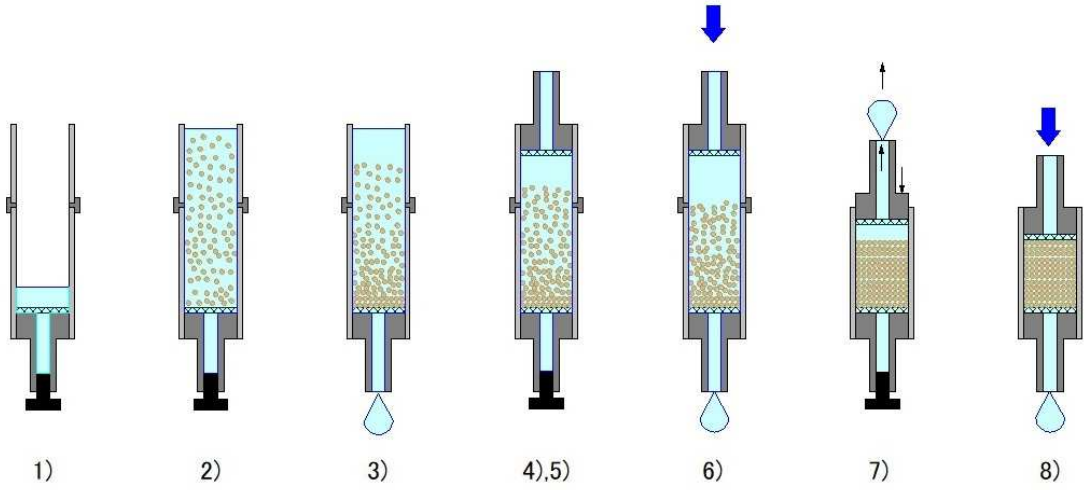



图 2　层析柱充填的步骤

### 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（As）的确认来进行评价。

## 操作指南

**一般操作**

1）用吸附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 和电动度的基线的稳定来进行确认。）
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。

*其他方法允许杂质被吸附而目标物质通过。

## 推荐缓冲溶液

通常来说，在 pH 为 5.0- 7.0 的范围内，吸附到阴阴离子交换介质中发生在相对较低的离子强度时（如 0.1 M NaCl 以下）。在这些条件下，大多数带有中性或净正电荷的蛋白质将被结合。然后用含有盐浓度逐渐升高的缓冲液或用线性盐梯度的洗脱液逐级洗脱结合组分。

吸附缓冲液：　0.02 - 0.05 M 乙酸钠(pH 5.0)

洗脱缓冲液：吸附缓冲液中含 0.1 - 2.0 M 氯化钠

## 样品制备与上样

在吸附缓冲液中或在离子强度和 pH 值相当的环境中制备浓度为 1-20 毫克/毫升的样品。通过离心法或微滤法制备样品，除去不可溶性物质。如有必要，使用渗析法、透滤法或脱盐色谱法交换样品缓冲液。

## 流速

针对 Cellufine C-500 的建议流线速度范围为 50 - 200 厘米/小时

## 再生和脱热源

用 5CV 的 1-3M 含 NaCl 的缓冲液进行再生。如果不够，用 3-10 CV 的 0.1M HCl 洗，然后用 1-3M 的含 NaCl 的缓冲液洗。 然后用吸附缓冲液进行平衡，准备下一步操作。如果需要无热原色谱柱，用 5 CV 0.2 M NaOH 溶液清洗色谱柱，放置 16 小时或过夜（0.2 M NaOH-20% EtOH 为 3-5 小时，0.2 M NaOH-90% EtOH 为 1 小时）。 用不含热原的洗脱缓冲液清洗后，检查内毒素浓度，并用待用的吸附缓冲液进行平衡。

## 定置清洗(CIP)

用与再生相同的操作来清洗离子吸附的材料，然后用 5CV 的 0.2M NaOH 流量（建议流速 30-60cm/h）。 如果污染严重，用 0.5M NaOH 流 5 CV。 然后用吸附缓冲液进行平衡。
要清洗强疏水性的材料，请用 70% EtOH 或 30% IPA 清洗。 在这种情况下，通过改变梯度中的溶剂浓度来避免柱中出现气泡。

*使用有机溶剂时，更容易在色谱柱中形成气泡。如果发生这种情况，必须注意，因为该栏需要重新填写。

## 稳定性

推荐使用的 pH 范围为 1～13，使用温度为 2～30℃。

## 推荐保存方法

请将未开封的产品在 2～8° C 下保存。请不要将其冻结。推荐在开封后的悬浊液及层析柱的状态下，置换成 20%乙醇，在 2～8℃下保存。保质期为自生产日期起五年。

## 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 A-200 | 19611 -51 | - | 676 980 327 | 19611 | 19612 | 676 980 335 |
| Cellufine A-500 | 19805-51 | 19805-55 | 675 980 327 | 19805 | 19806 | 675 980 335 |
| Cellufine A-800 | 19865-51 | 19865-55 | 673 980 327 | 19800 | 19801 | 673 980 335 |
| Cellufine Q-500 | 19907-51 | 19907-55 | 675 982 327 | 19907 | 19908 | 675 982 335 |
| Cellufine C-500 | 19800-51 | 19800-55 | 675 983 327 | 19865 | 19866 | 675 983 335 |
| Cellufine S-500 | 21200-51 | 21200-55 | 21200 | 21201 | 21202 | 201203 |


# 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

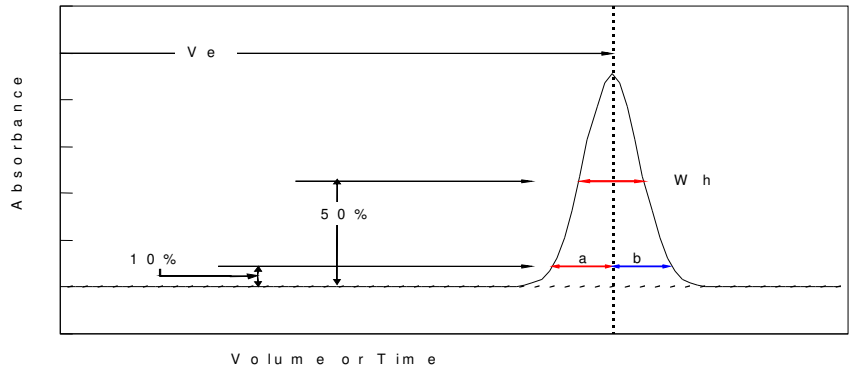
电子邮件：cellufine@jnc-corp.co.jp

https://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）<br>电气传导度（NaCl 时） |



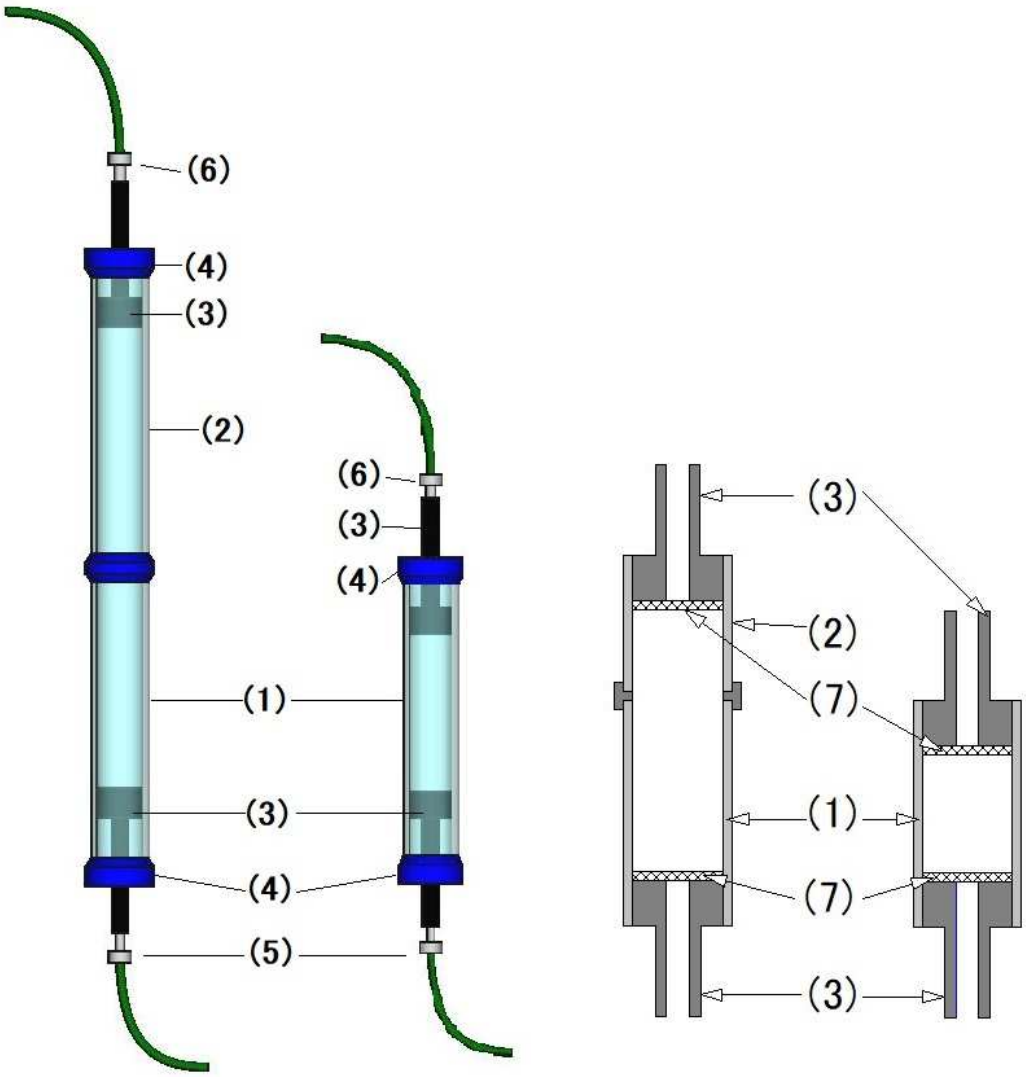

| | |
|---|---|
| L | 层析柱高度 [cm or m] |
| $V_e$ | 溶出时间（或溶出体积） |
| $W_h$ | 为峰值高度一半时的峰宽 |
| a, b | 高度为峰值高度的 10%时的：<br>(a) 偏离中心的前半部的峰值宽度<br>(b) 偏离中心的后半部的峰值宽度 |
| 注意 | 单位应合并计算。 |

**计算式**

$HETP = L/N$　　$N = 5.54 \times (Ve/Wh)^2$　　$As = b/a$

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） | | |