

## 操作说明

### 弱阳离子交换层析介质

#### Cellufine™ MAX CM

#### 简介

Cellufine MAX 是第二代新型 Cellufine 层析介质。Cellufine MAX CM 弱阳离子交换采用表面修饰技术，具有高动态载量和高流速下稳定的性能，是一种高交联度介质。该类介质经过优化，体现出高性能，提高了其下游纯化工程处理的能力。

#### 理化性质

基团类型	羧甲基 (CM)
离子交换类型	弱阳离子/-CH <sub>3</sub> COOH
支持基质	带右旋糖酐支架的高交联纤维素
粒径	大约 40-130 微米 (平均 90 微米)
离子交换容量	0.09~0.22 meq /毫升
流速	24°C 纯水, 600 厘米/小时(0.3M Pa) 内径 30 cm-L 20 cm
动态载量	>120 毫克 溶菌酶 / 毫升 胶
pH 稳定范围 (20°C, 一周)	2-13
化学稳定性	在所有常用的水性缓冲液、0.5 M 氢氧化钠中稳定
保存	20 % 乙醇悬浮液

#### 装柱

1. 计算需要的床体积。

- (a) 填料床体积=柱横截面积(cm<sup>2</sup>) ×床高(cm)
- (b) 所需沉降凝胶体积=填料床体积×1.2
- (c) Cellufine MAX CM 瓶中悬浮液浓度在 20%乙醇中约为 50%。

2. 用水或适当的缓冲液清洗凝胶。

3. 使用水、0.1M 氯化钠溶液或适当的缓冲剂制备 40 - 60 % (v/v) 悬浮液。将凝胶在室温下平衡一小时。

4. 轻轻搅拌。若需要，置于真空条件下脱气。

5. 层析柱

- (a) 根据层析柱供应商的说明准备层析柱。
- (b) 床架在使用前应在填料溶液或 20%乙醇中湿润，以去除空气。
- (c) 将填料溶液倒入柱管中，检查溶液是否从柱出口流出。当溶液保持在 0.5 - 1cm 高度时关闭出口阀。

6. 小心地将悬浮液倒入柱中，不要产生气泡。根据容量，可能需要填料管。

7. 将顶部调节器安装在柱顶部。(小心不要带入空气)

8. 打开色谱柱出口，以 1000 厘米/小时或 0.3M pa 的速度泵入吸附缓冲液 10 分钟。注意:不要超过所选柱的操作压力极限。

9. 标记凝胶层高度。关停泵，关闭层析柱出口。

10. 从泵上断开顶部调节器线。松开调节器密封，将顶部调节器向下移动，在填料处标记凝胶层。

11. 床稳定后，锁定调节器，重新将线连接到泵上。在上样前用 10 个柱体积的吸附缓冲液平衡。

### 固定长度层析柱装填

1. 计算需要的床体积。

(a) 填料床体积=柱横截面积( $\text{cm}^2$ ) $\times$ 床高(cm)

(b) 所需沉降凝胶体积=填料床体积 $\times$ 1.15

(c) 注:当使用填料连接器时，过量的凝胶量对应于所需的沉降凝胶体积。

(d) Cellufine MAX CM 瓶中悬浮液浓度在 20%乙醇中约为 50%。

2. 用水、0.1M 氯化钠溶液或适当的缓冲剂清洗凝胶。

3. 使用水、0.1M 氯化钠溶液或适当的缓冲剂制备 40 - 60 % (v/v) 悬浮液。将凝胶在室温下平衡一小时。

4. 轻轻搅拌。若需要，置于真空条件下脱气。

5. 层析柱

(a) 根据层析柱供应商的说明准备层析柱。

(b) 床架在使用前应在填料溶液或 20%乙醇中湿润，以去除空气。

(c) 将填料溶液倒入柱管中，检查溶液是否从柱出口流出。当溶液保持在 0.5 - 1cm 高度时关闭出口阀。

6. 小心地将悬浮液倒入柱中，不要产生气泡。根据容量，可能需要填料管。

7. 将顶部调节器安装在柱顶部。

8. 打开色谱柱出口，以 1000 厘米/小时或 0.3M pa 的速度泵入吸附缓冲液 10 分钟。注意:不要超过所选柱的操作压力极限。

9. 关停泵，关闭层析柱出口

10. 从泵上断开顶部调节器线。取掉填料连接器。如有必要，在从填料连接器上移除多余的介质之前进行。

11. 安装顶部调节器，锁定调节器，重新将线连接到泵上。在上样前用 10 个柱体积的吸附缓冲液平衡。

### 装柱评估

参见附件 1

## 操作指南

### 一般操作

通常，吸附到 Cellufine MAX 阳离子交换介质发生在相对较低的离子强度（例如低于 0.1M NaCl），pH 在靶蛋白 *pI* 以下 4.0 - 9.0 之间。

介质的结合能力受 pH 和电导率的影响较大。在这些条件下，带中性或净负电荷的蛋白质会结合。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

## 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。

## 建议缓冲剂

吸附缓冲液：0.01 - 0.05 M 乙酸钠(pH4-6)或 0.01 - 0.05 磷酸盐或 Tris-HCl (pH6-9)。

洗脱缓冲液：吸附缓冲液中含 0.1 - 2.0 M 氯化钠

还可以使用其他常见的缓冲方法。有关蛋白质纯化色谱方法的更多信息，请参阅参考文献。

## 再生与平衡

分离后，用 5 个床体积以上的高离子强度溶液（1-2M NaCl）洗涤结合物。洗涤完层析柱后，泵入另外 5 个床体积吸附缓冲液，或直至层析柱洗出液的 pH 值和电导率值稳定。

## 除热

用 5 个床体积的 0.2 M NaOH 溶液洗涤层析柱，静置 16 小时，然后用无内毒素水或平衡缓冲液洗涤。

• 0.2 M NaOH-20% EtOH 可有效去除内毒素。此外，0.2 M NaOH-90% EtOH 可快速降低脂多糖（LPS），接触时间至少 2 小时。

## 化学和物理稳定性

稳定条件：

大多数盐（NaCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 等）、酒精(30% (v/v) IPA, 70% (v/v) EtOH)，尿素(6M)和盐酸胍(6M)

在 20°C、pH2-13, 一周

## 在位清洗（CIP）

Cellufine MAX CM 性能在使用 0.5 M NaOH 和 10 床体积洗涤剂，至少 100 个 CIP 操作周期中保持不变。

## 流速

Cellufine MAX CM 是基于高度交联的纤维素凝胶，在高流速下依然稳定。

床高 20 厘米，< 0.3 M Pa，在 2.2 厘米直径的层析柱中为 1000 厘米/小时；床高 20 厘米，< 0.3 M Pa，在 30 厘米直径的层析柱中超过 500 厘米/小时

## 存储

密封在容器中，置于室温下保存。切勿冷冻。

短期存储（不超过或 2 周），溶液主体与色谱柱可以在室温、pH2-12 范围内存储，建议在低于 20°C 的碱性条件下储存。

0.5M NaOH；20°C，少于 2 周。

长期存储，应在 2-25°C 条件下，存放在含 20%乙醇的中性缓冲液中。切勿冷冻。

#### 贮存期：

自生产之日起 5 年期

#### 参考

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 CM	20900-51	20900-55	20900	20901	20902	20903

MC=微型柱

## 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

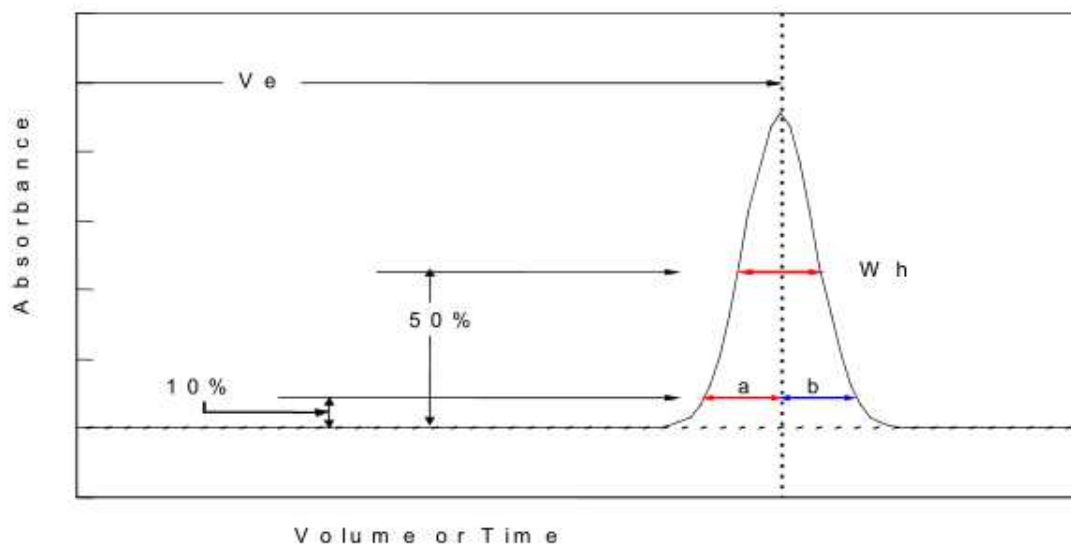
<http://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/>

### 附件 1 Cellufine 装柱评估

可以采用指标法作为层析柱填料状态的评估方法，例如(理论)塔板数(N)、与理论板当量高度 (HETP)和对称因子(As)。

这些可选择的评估指标受测量条件的影响。例如，这些指标会随着层析柱的直径/高度、管道、溶剂样品体积、流速、温度等的差值变化而变化。因此，每次评估时有必要采用相同的测量条件。

条件	
样品体积	柱床体积的 1% (最大 2.5%)
样品浓度	1-2%(V/V)丙酮或 1M NaCl
流速	~30 厘米/小时 (X 毫升/小时/柱截面 )
探测器	紫外线、电导性



公式	L	柱长【厘米或米】
HETP=L/N	Ve	洗脱时间或体积
$N=5.54 \times (Ve/Wh)^2$	Wh	半峰宽
$As=b/a$	A,b	峰高 10%的峰宽 (a) 前、(b) 后
	注意	Ve,Wh and a, b 的单位一致

(注意)

通常来说，N 值越大越好。(同样，HETP 值越小越好)

不对称因子值(As)应接近于 1。通常而言，可接受的对称因子范围为 0.8-1.6。