Cellufine™ MAX Q-hv

Cellufine MAX Q-hv 是一种强阴离子交换色谱填料。采用了适合核酸、多糖和病毒颗粒等生物大分子的配体设计。

Cellufine MAX Q 产品系列包括具有优异溶出性能的 Cellufine MAX Q-r 和具有卓越高吸附性能的 Cellufine MAX Q-h。**Cellufine MAX Q-hv** 在保持吸附性能的同时，采用了旨在改善诸如多糖、病毒颗粒这些大尺寸目标物质的溶出性能的配体设计。因此，可以期望与以往的 MAX Q-r、MAX Q-h 有不同的分离行为。

表 1 Cellufine MAX Q-hv的特征

产品名称	Cellufine MAX Q-r	Cellufine MAX Q-h	Cellufine MAX Q-hv
离子交换基团	强阴离子/ $-N^{+}(CH_3)_3$		
底物载体	葡聚糖（dextran）修饰的高度交联纤维素颗粒		
粒径	ca. 40 - 130 um（平均 90um）		
离子交换容量	0.10～0.20 meq /ml	0.13～0.22 meq /ml	0.04～0.07 meq /ml
操作流速	600 cm/h(0.3 MPa) I.D.30 cm-L20 cm、流动相：纯化水 24 °C		
动态吸附载量	> 110 mg BSA/ml	> 180 mg BSA/ml	> 120 mg BSA/ml
能够使用的 pH	2－12	2－12	2－12
pH 稳定性 (40°C, 1 周)	2－12	2－12	2－12
化学稳定性	对常规使用的缓冲液表现稳定		
定置洗脱	1 M NaOH		0.5 M NaOH
保存液	20 %乙醇水溶液		

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. 用纯化水或缓冲液洗脱悬浮液。
3. 用纯化水、0.1M NaCl 水溶液或填充缓冲液制备 40～60 % (v/v) 悬浮液。
4. 在室温条件下缓慢搅拌。必要时边脱气边进行搅拌（室温、1 小时）。

Cellufine™是 JNC 株式会社的注册商标。

5. 在关闭色谱柱出口的状态下，将悬浮液小心地注入色谱柱内。根据不同的色谱柱填充体积，可能需要储液装置。
6. 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。
7. 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。
8. 待柱床稳定后，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。在进行试样上样之前，使用 10 CV（色谱柱体积）的吸附缓冲液平衡色谱柱。

填充后的评估方法

参见附件 1 。

操作指引

常规使用方法

阴离子交换层析填料通常用较低离子强度（例如，0.1M NaCl 或更低）的缓冲液吸附。另外，pH 条件在 6～9 的范围内操作。吸附量对吸附缓冲液的 pH 和电导率有很强的影响。蛋白质带负电荷或在等电点附近的情况下吸附在填料上。吸附的蛋白质和其他成分用高盐浓度的缓冲液逐步溶出或线性梯度溶出。

1. 使用吸附缓冲液平衡色谱柱。
2. 实施试样上样。
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。

常规使用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 CellufineMAX Q-hv 的常规使用流程

工程	CV	各工序的解说
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。
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。
洗脱	5	使用吸附缓冲液。
溶出	3 - 7	使用溶出缓冲液。
定置洗脱	3 - 10	0.5 M NaOH

Cellufine™是 JNC 株式会社的注册商标。

推荐缓冲液

吸附缓冲液：10～50 mM 磷酸钠（pH 6～8）或 Tris-HCl（pH 6～9）
上样：制备用吸附缓冲液置换的试样
溶出缓冲液：含 0.1 - 2.0 M 氯化钠的吸附缓冲液

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

Cellufine MAX Q-hv 以高度交联纤维素颗粒为基质。因此，即使在高流速下也能稳定使用。在内径 2.2cm×高 20cm 的色谱柱中，在 0.3MPa 以下的操作压力下，可通液流速 1000cm/h。在内径 30cm 以上、x 高 20cm 的色谱柱中，在 0.3MPa 以下的操作压力下，可通液流速 500cm/h 以上。

化学稳定性

室温下能够在 pH 2～13 的条件下稳定使用。对很多盐类（NaCl、$(NH_4)_2SO_4$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 0.2 M NaOH 实施定置洗脱。

定置洗脱（CIP）

从 0.5M NaOH 暴露 15 分钟的稳定性来看，至少反复暴露 100 次后，也未发现性能劣化。

除热

用 5 CV 的 0.2 M NaOH 水溶液洗脱色谱柱，静置 16 小时后，用无内毒素水或平衡溶液洗脱。

0.2 M NaOH-20% EtOH 可有效去除内毒素。 此外，0.2 M NaOH-90% EtOH 可在 2 小时内使内毒素减少。

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 ℃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 ℃下培养 16 小时并溶菌。实施离心分离 (12,000 rpm, 15 分钟, 4 ℃)，回收上清液。然后再用 0.45 μm 的醋酸纤维素膜

Cellufine™是 JNC 株式会社的注册商标。

(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 ℃下培养 16 小时。通过离心分离(12,000 rpm, 15 分钟, 4 ℃) 清除结晶颗粒（pellet），将采用 0.2 μm 滤膜过滤器过滤后的溶液作为层析用上样。

4. 采用 Cellufine MAX Butyl(S)的疏水相互作用层析

操作方法参见 Cellufine MAX Butyl(S)的使用说明书。

5. 采用 CellufineMAX Q-hv 的阴离子交换层析

采用以下手法实施了层析。

工序	溶液	容量
平衡	缓冲液 A	5 CV
上样	试样溶液	-
洗脱	缓冲液 A	15 CV
溶出	缓冲液 B	10 CV
洗脱	缓冲液 A	10 CV
定置洗脱	0.5M NaOH 溶液	10 CV
平衡	超纯水	20 CV

色谱柱：6.7 mmID×30 mmH (1.06 mL)

流速：0.424 mL/min (RT 2.5 min, 72 cm/hr)

缓冲液 A：50 mM 磷酸钠, pH 6.0

缓冲液 B：50 mM 磷酸钠, 1.0 M 氯化钠, pH 6.0

6. 纯化结果

使用蒽酮-硫酸法对多糖 (Ps)进行定量。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)进行定量。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。

	10% DBC mg/mL-resin	Ps Recovery%	Ps Purity%	Pr μg/mL	NA μg/mL	Pr/Ps %	NA/Ps %
上样液	-	-	75.6	5.1	161.7	1	31
纯化后	6.4	97.8	98.7	Not detected	4.3	0	1

Cellufine™是 JNC 株式会社的注册商标。

保存方法

如果是 2 周以内的短期保存，在 pH2 - 12 的条件下可常温保存。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 Q-hv	5 x 1 mL 迷你色谱柱	22100-51
	1 x 5 mL 迷你色谱柱	22100-15
	100 mL	22100
	500 mL	22101
	5 L	22102
	10 L	22103

JNC 株式会社

生命化学事业部

东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

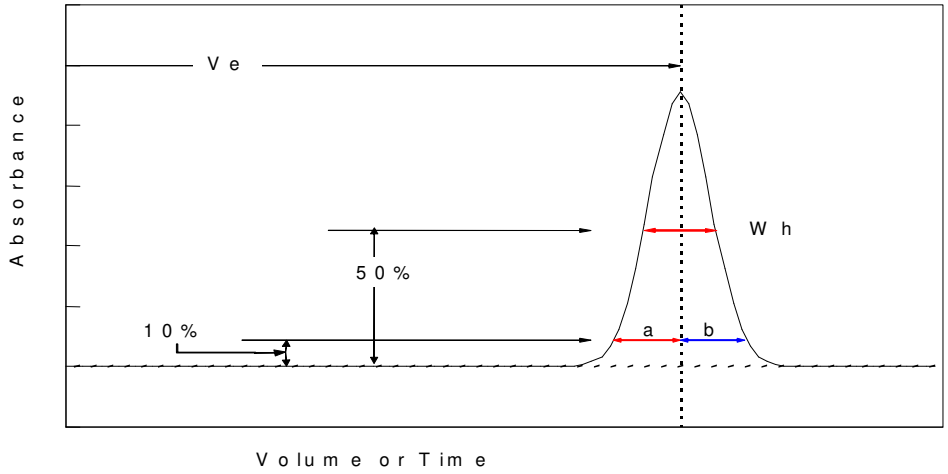
http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/

Cellufine™是 JNC 株式会社的注册商标。

附件 1：Cellufine 填充后的色谱柱评估方法

色谱柱的填充状态使用理论塔板数（N）、理论板当量高（HETP）、不对称性（As）等指标进行评估。这些评估指标会受到测量条件的影响。例如：其会因色谱柱直径/高度的差异、配管、溶剂试样量、流速、温度等的变化而变化。因此，每次必须使用相同的测量条件来评估进样后的色谱柱，并要确认等效性。

参数	条件
上样量	色谱柱体积 1 %（最大 2.5%）的液量
试样组分	1-2 %(v/v) 丙酮 （流动相：水）
	1 M NaCl（流动相：0.1 - 0.4M NaCl 溶液）
流速	~30 cm/h (X mL/hr/column cross section)
检测器	吸光度 OD 280nm（如为丙酮） 电导率（如为 NaCl）



计算公式

HETP = L/N

$N = 5.54 \times (Ve/Wh)^2$

As = b/a

L	色谱柱高度［cm or m］
V_e	溶出时间（或溶出体积）
W_h	半峰宽
a, b	10%峰高处的 (a)前半峰宽 (b) 后半峰宽
注意	单位要统一计算。

一般而言，认为理论层数超过 3，000 N / m 为良好状态。 另外，认为不对称性（As）在 0.7~1.5 的范围内为理想状态。

Cellufine™是 JNC 株式会社的注册商标。