

Cellufine Sulfate 装柱

Cellufine Sulfate 是一种亲和层析介质，用于病毒、病毒外壳、病毒样颗粒(VLP)、微生物抗原及特异性蛋白的浓缩、净化和除热原。这种树脂基于球状纤维素珠体，使用低浓度硫酸酯进行处理。这为凝胶提供了独特的色谱选择性，在某些情况下，这种色谱选择性类似于固定肝素。该类树脂具有良好的流动性能，并已完成装柱，规格可高达直径 2 米。

使用流量适配器的装柱流程（直径达 45 厘米的色谱柱）

- 1) 当柱体积<1 升时；将目标柱体积(CV)所需的足够悬浮液倒入过滤器漏斗(玻璃制)中，用至少 5 个柱体积的水洗涤 3 次，以除去存储液。如有必要，如果装柱缓冲液与水不同，则重复上述步骤。
- 2) 当柱体积>1 升时；将存储缓冲液从容器中沉淀的树脂上方倒出，用水替换。然后重新悬浮树脂，让其再次沉淀，冲洗掉存储缓冲液。重复 2-3 次或考虑在存储缓冲液中装柱并即时清洗色谱柱。
- 3) 最后清洗完后，加入足够的装柱缓冲液，将树脂悬浮在 50-60% (v/v) 的悬浮液中。
- 4) 将部分悬浮液倒入 50 毫升的量筒中，静置过夜或至少 4 小时。测量重力沉降床的床高(体积)，据此计算悬浮液率； $\% = \text{重力沉降床体积} / \text{总悬浮液体积}$
- 5) 调整到 50% (v/v) 树脂悬浮液浓度
- 6) 用下式计算填装色谱柱所需悬浮液的体积； $50\% \text{ 悬浮液体积} = (\text{目标柱体积} [\text{CV}] \times 2) \times (\text{压缩因子 Cf})$

压缩因子 Cf=重力沉降/填装床高
例如，若需要 100 毫升柱体积，需要 $(100 \times 2) \times 1.15 = 230$ 毫升 100 悬浮液，可得树脂压缩系数为 1.15。

注意：树脂压缩因子 Cf 会影响色谱柱的填装效率（详细信息详见附件），并且可能需要通过调整色谱柱上的轴压来调整。

- 7) 将底部流量适配器组装到色谱柱上。准备好底部筛板组件，用装柱缓冲液从大直径色谱柱的注射器或泵中去除空气。在色谱柱底部留大约 1 厘米。

- 8) 如有必要，在色谱柱的顶部添加一个床高的适配器，以适应全部体积的悬浮液。

注意：将全部悬浮液一次倒进色谱柱内，保证床装填均匀。

- 9) 关闭色谱柱的底部出口。
- 10) 将悬浮液一次倒入色谱柱内，避免空气滞留在树脂悬浮浆内。
- 11) 打开底部出口，让床开始沉降，直到树脂床上方出现 2-3 厘米的透明液体。
- 12) 停止出口流液，小心地用装柱缓冲液填满色谱柱，直到顶部，不要干扰沉降树脂床。
- 13) 启动上面步骤 6 中所述的流量适配器。
- 14) 将顶部流量适配器组装到色谱柱上，尽量减少色谱柱顶部的滞留气泡。
- 15) 用装柱缓冲液以 200cm/h 开始对树脂床进行流通 30-60 分钟。

注意：在这种流速下（为保证稳定填床，而高于色谱柱正常运行的流速），色谱柱背压力*应该在 0.15 到 0.25MPa 之间。

*此为在色谱柱中填充树脂时的压降。当同一尺寸的空缓冲填充柱处于同一直线位置时，应该设定系统的背压限额。最好在色谱柱的进口端用仪表测量背压。

这是一种比正常运行时更高的流速，以保证床层填料稳定。

- 16) 床高稳定，关闭出口，从塔顶开始流通（不要去掉流量适配器），然后慢慢地将顶部流量适配器向下移动，将装柱缓冲液从色谱柱的顶部换出。将顶部的适配器取下，以便与沉积的树脂床接触。

- 17) 重新连接上面的流量适配器，打开出口，以 200cm/h 流速重新开始。如果床沉积下来，并远离顶部适配器，就向下调整顶部适配器，以适应新的床高。
- 18) 在最终床高，计算色谱柱体积。如果床体体积高于预期，可以通过降低顶部适配器施加轴向压缩。最终色谱柱应该接近目标。如果体积低于预期，则由于树脂的压缩因子可能高于 1.15，原来的悬浮液体积可能更小，或者树脂在流动过程中压缩得更多。
- 19) 以 30 厘米/小时的流速注入少量(柱体积的 1%)未保留物质(1-2%丙酮或 2 M NaCL)，通过测量如附录 1 所示的 HETP 和峰对称因子(A_s)来检查和评估装柱状态。由在 280nm 的峰值监测结果或通过 NaCl 电导率计算对称因子、 N (#理论塔板数/ M 柱长度)。

3.2 厘米内径色谱柱装柱例子

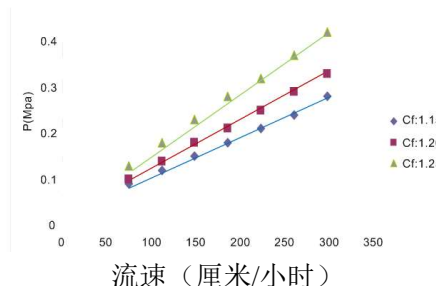
- 色谱柱：3.2 厘米内径×25 厘米长
(EMD Millipore Vantage)
- 装填缓冲液：纯水 (25℃)
- 装柱条件：50%悬浮液，以 40 ml/min (298 cm/h)流装。
- 轴向挤压；手动装柱至床高 20 厘米
(目标床高=160mL)

不同压缩因子下直径 3.2 cm 的 Cellufine Sulfate 装柱及压力/流体特性如下表 1 和图 1 所述。

表 1.在树脂压缩因子范围内的峰性能摘要

压缩因子	N (m^{-1})	A_s
1.15	5900	1.13
1.20	6400	0.96
1.25	5600	1.04

图 1.3.2 厘米内径层析柱压力/流体



在此类柱型中，Cellufine Sulfate 在 1.015 ~ 1.025 的装柱压缩因子范围内，在保持 0.3 MPa 背压的情况下，表现出良好的流动和峰性能，最大流速可达 250cm/h。

30 厘米内径色谱柱装柱例子

- 色谱柱：30 厘米内径×22.9 厘米长
(BPG 色谱柱)
- 装柱流程：
 1. 用装柱缓冲液准备好底部出口，消除滞留的气泡。在柱中保留 5 厘米的缓冲区。
 2. 将再悬浮的树脂悬浮液倒入柱内，打开底部出口。
 - 3.重力沉降 (22.9 厘米床高) 后，在 0.15 -0.25 MPa 的压力范围内，用纯水流通 30 分钟。
 4. 最后，使用表 2 中列出的每个压缩因子(Cf)，通过顶部流量适配器对树脂进行轴向压缩。
- 装柱评估：
 1. 用 1 柱体积以 75 厘米/小时 (0.83 L/min) 流速平衡色谱柱
 2. 以 30 厘米/小时 (0.35 L/min) 流速注入 16mL (柱体积的 1%) 2%丙酮 (流动相：纯水)
 3. 用 1.3 柱体积以同样的流速洗脱。本研究结果见下表 2。

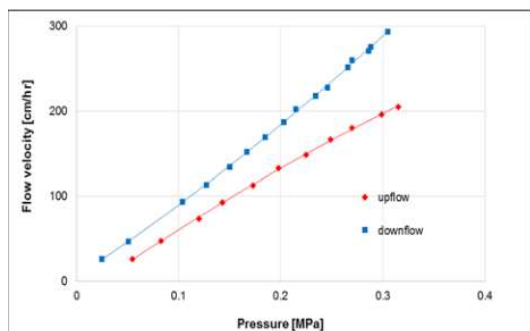
表 2. 30 厘米直径色谱柱装柱特性

压力 (MPa)	压缩 因子	N (m ⁻¹)	A _s	RPH*
0.25	1.20	3200	1.15	4.47
0.20	1.20	3600	1.29	3.93
0.15	1.20	4000	1.16	3.57
0.15	1.18	4300	1.15	3.31
0.15	1.15	2100	1.07	6.91

*理论塔板高缩减

这一数据表明，在 30cm 内径的层析柱中填充 Cellufine Sulfate 的最佳压缩因子为 1.18 到 1.20。在下面的图 2 中，在一个 30cm 的内径的层析柱中填充 Cellufine Sulfate，其压力-流速曲线随着流通显示出双向。

图 2.30 厘米内径色谱柱流装柱压力/流体特性



45 厘米内径色谱柱装柱例子

实验条件

- 色谱柱：45 厘米内径×23 厘米沉降床高（36.6L 体积色谱柱）
- 装柱方式：从 50%的悬浮液重力沉降
- 流程：
 1. 用装柱缓冲液准备好底部出口，消除滞留的气泡。
 2. 将再悬浮的树脂悬浮液倒入柱内，打开底部出口。
 - 3.重力沉降（23 厘米床高）后，在 0.10 -0.20 MPa 的压力范围内，用纯水流通 30 分钟。

4. 最后，使用表 3 中列出的每个压缩因子(Cf)，通过顶部流量适配器对树脂进行轴向压缩。

➤ 装柱评估：

1. 用 1 柱体积以 75 厘米/小时（1.9 L/min）流速平衡色谱柱
2. 以 30 厘米/小时（1.03 L/min）流速注入 37mL（柱体积的 1%）2%丙酮（流动相：纯水）
3. 用 1.3 柱体积以同样的流速洗脱。

本研究结果见下表 3，色谱柱鉴定色谱图叠加图如图 3 所示。

表 3. 45 厘米内径色谱柱装柱特性

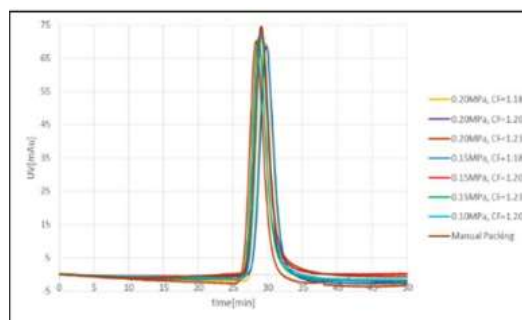
压力 (MPa)	压缩 因子	N (m ⁻¹)	A _s	RPH*
0.20	1.18	4900	1.19	2.91
0.20	1.20	5000	1.18	2.85
0.20	1.23	5000	1.21	2.88
0.15	1.18	5200	1.16	2.75
0.15	1.20	5300	1.25	2.67
0.15	1.23	5100	1.30	2.82
0.10	1.20	5300	1.25	2.69
手动*	1.20	5000	1.24	2.88

*无轴向压缩手动装柱

**理论塔板高缩减

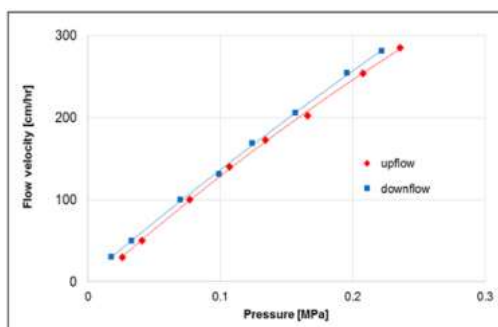
对于这个 45 厘米直径的色谱柱，最佳的装柱条件是流通填料的压力为 0.15 MPa，压缩因子为 1.02，得出最高的理论塔板数#

图 3. 叠加的色谱柱效率曲线数据



在下面的图 4 中，在一个 45 厘米内径的色谱柱中，Cellufine Sulfate 的压力-流速曲线显示了双向流动。

图 4.流填充 30cm 内径×19.1 cm 床层高度柱
的压力/流量特性



从 0.15 MPa 的 50%水悬浮液中填装 30 min，最终层高 19.2 cm，压缩因子 (Cf)为 1.20。上述数据表明，45 cm 内径的色谱柱可以在最佳压缩因子为 1.02 的情况下填充 Cellufine Sulfate (粒径:70 微米)，并在 0.3MPa 的背压下以 300 cm/h (7.9 L/min 的流速)的速度在两个流动方向上运行。

总结

本技术说明描述了一种最优的方法，可以成功地将 Cellufine Sulfate 亲和树脂填充到直径 45 厘米、床层高度 20 厘米的色谱柱。采用树脂压缩因子 Cf 在 1.15 ~ 1.25 范围内，对填充床进行轴向压缩，得到的柱具有良好的峰值对称性（对称因子在 0.96 ~ 1.29 范围内）。压力/流体曲线显示，在高达直径 45 cm 的 Cellufine Sulfate 树脂柱中，当流速为 300 cm/h 时，背压力 < 0.3 MPa。在本技术说明里描述的所有例子中，均使用水作为填料溶液，简化了高效色谱床的注入过程。新设计的基于纤维素的 Cellufine 微球体具有优越的机械稳定性，可以很容易地流装各直径大小的 Vantage 或 BPG 生物生产色谱柱。本技术说明中描述的填装过程是可称量的，并表明 Cellufine 树脂系列产品能够在具有可移动流量适配器的硬件中进行手动流动填装和轴向压缩。

订购信息

说明	数量	产品编号
Cellufine Sulfate	5 x 1 mL (微型柱)	19845-51
	1 x 5 mL (微型柱)	19845-15
	10 mL (样品)	676 943 324
	50 mL	19845
	500 mL	19846
	5 L	19847
	10 L	19849

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/>