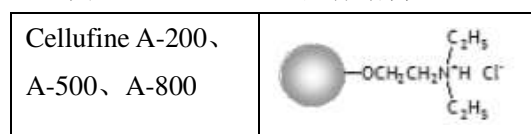


Cellufine A-500 离子交换层析树脂装柱

Cellufine A-500 是一种传统的弱阴离子交换树脂，使用方便，性能稳定。IEX 化学组成如图 1 所示。该球形交联珠体由纤维素制成，排阻限可达 500 kDa，具有独特的晶体分子结构，具有化学稳定性和机械强度。因此，Cellufine A-500 具有良好的装柱特性，可以在低背压的高流速下操作。Cellufine A-500 介质可与传统介质相差无几，如交联琼脂糖。这种 Cellufine 树脂具有良好的流动性能，并有多重装柱尺寸，可高达 2 米直径。

图 1. Cellufine IEX 配体结构



可用 Cellufine IEX 以如下装柱方式装填直径高达 30 厘米的色谱柱。

以比操作流速快 50% 的流速，色谱柱口不超过最后填料压力 0.3MPa 装柱。对于带有悬浮液入口适配器的大型色谱柱，将顶部流速适配器置于能够适应悬浮液体积的高度。用合适的填料缓冲液填充柱，然后用悬浮液管口适配器将悬浮液泵入色谱柱内。使用填料缓冲液将剩余的树脂从泵和悬浮液管口中挤出。避免将空气引入管道。以色谱柱最大上限流速/压力泵入装柱管口。将顶部适配器下移，以便与填充层接触。

注意:顶部适配器只能进入 0.5 cm 的填充床。

轴向压缩后的流动填装——如上所述填装，然后轴向压缩，以进一步巩固填料床。以 50% 的高流速，在大约 2 柱体积后，降低顶部适配器接触填充床如上所

述。然后施加更多的轴向压缩，以达到所需的最终柱体积，同时在柱进口不超过最终压力 0.3MPa。

轴向压缩，在柱进口处，流量/压力不得超过 0.3 MPa。通过降低顶部适配器直接进行轴向压缩，将树脂床压缩到色谱柱的流动压力极限。

在流量/压力达到柱的极限时进行装柱。将顶部适配器锁定在所需的床层高度，并将树脂泵入柱中，直到色谱柱填满或泵停止。悬浮液的输送速度应等于 500-1000 cm/h，最终填料压力不得超过 0.3MPa。如果悬浮液池的压力可以达到 0.3MPa，也可以采用恒压充填。

注意:如果色谱柱没有以足够高的流速或压力进行充填，则以相同的流速在柱上流动更粘稠的溶液(如清洗液)可导致进一步压实床层。

使用流速适配器的详细装柱流程

- 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；% = 重力沉降床体积 / 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。
- 7) 若手动装柱：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：在手动装柱时，将悬浮液全部倒入柱内，一步到位，保证填料层均匀。
- 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。
注：将悬浮液沿壁或玻璃吸管倒入色谱柱中，避免空气进入悬浮液床。
- 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) 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。
注意：在顶部适配器上使用三通阀将有助于启动操作，并将确保在此阶段没有将空气进入色谱柱内。
- 14) 将顶部流量适配器安装到柱上，使用三通阀将柱头内的气泡降至最小。
- 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 0.25 到 0.30MPa 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) 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比计算中使用的要高，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) 自动填装或装填大型色谱柱：安装好顶部和底部流量适配器。启动底部筛板总成，用装柱缓冲器从泵中抽出空气。
- 20) 将顶部适配器降低到所采用的填料方式所需的床层高度（见上）。
- 21) 用装柱缓冲液填充色谱柱，并排出顶部适配器中的所有空气。
- 22) 关闭底部出气阀。
- 23) 准备好所需的树脂悬浮液体积(见步骤 6)，重新悬浮在悬浮液罐中。
- 24) 准备悬浮液泵及装柱管口。
注意：在计算时考虑到悬浮液的体积。
- 25) 将填料管口连接到色谱柱上，打开顶部进气阀，开始将悬浮液流入色谱柱内。
- 26) 以色谱柱最大压力及流速泵入装柱缓冲液
- 27) 将顶部适配器降下接触填充床。
A) 对于流动填料，按照上面步骤 15

所述继续流填，当床层高度稳定后，固定顶部适配器的位置。B) 对于轴向压缩，将顶部适配器降低到目标层高度。(根据步骤 6 计算得到树脂压缩因子 C_f) C) 对于失速填装，将顶部适配器设置为目标层高度，并将树脂泵入柱内，直到达到高背压，悬浮液泵停止工作。

- 28) 打开出口阀门，重新通过顶部进口阀门的开始填装缓冲液。继续流填，直

到床高稳定。(如果床高没有达到预期的目标，请参阅步骤 18 进行故障排除)

- 29) 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)。

Cellufine IEX 介质特征

Cellufine 阴离子 IEX 介质的基本特性如表 1 所示。所有 Cellufine IEX 介质是基于 90 微米(平均)交联纤维素珠体。图 2 显示了标准 Cellufine A-500 阴离子交换树脂的典型粒度分布。

表 1. Cellufine IEX 介质特征

特性	A-200	A-500	A-800
基质	交联纤维素		
粒径 (pM)	40-130		
IEX 化学结构	弱阴离子 - DEAE		
排阻限(kDa)	> 30	> 500	>1000
操作压力	高达 0.3 MPa		
离子交换容量 (meq/mL 树脂)	0.13 - 0.18	0.13 - 0.17	0.05-0.08
牛血清白蛋白结合载量 (mg/mL 树脂)	45	58	82
免疫球蛋白 G 结合载量 (mg/mL resin)	38	40	68

*用 1mg /mL 牛血清白蛋白在 50mM Tris-HCl、50mM NaCl (pH 8.5) 中测定阴离子 IEX

**和 1mg/mL 免疫球蛋白 G 在 Tris HCL, 50mm NaCl pH 9.5。

色谱柱: 5 mm 内径×5 cm 长, 流速为 150cm/h。计在流穿曲线上的 10% 点位估算动态结合载量。

图 2. Cellufine A-500 粒径分布

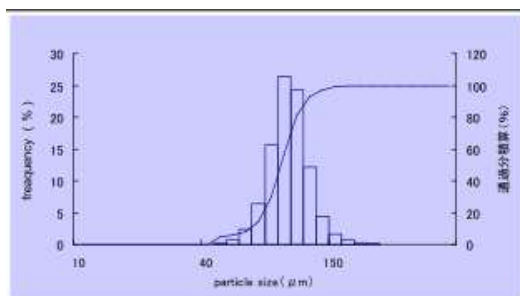
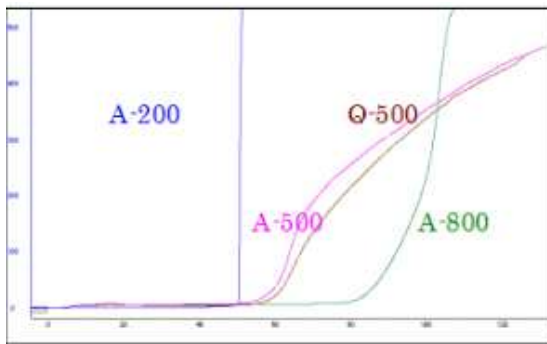


图 3. Cellufine 离子 IEX 树脂流穿 DBS 曲线



色谱柱: 5 mm 内径×5 cm 长

流速: 150cm/h

样品: 1mg/ml

缓冲液: A-200、A-500 及 A-800 用 50 mM Tris-HCl(pH 8.5)

Q-500 用 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)+50 mM NaCl

在 Cellufine IEX 树脂中, Cellufine A-200 的孔径最小。由于蛋白质的吸附和解吸发生在其表面, 图 2 展示了一条非常典型的穿透曲线。Cellufine A-200 可以用于流穿精制模式。Cellufine A-500 型树脂具有良好的流动性能, 可用于商业生产。这些树脂具有更大的孔隙, 使得它们的 IEX 表面化学结构可适用于更大的分子, 如分子量为 150 kDa 的抗体。纤维素 A-800 具有非常大的孔, 适合非常大的蛋白质的纯化, 如分子量为 660kDa 的甲状腺球蛋白。

填装 3.2cm 内径色谱柱的离子

- 色谱柱: 3.2cm 内径×25cm 长 (Millipore Vantage Column)
- 装柱缓冲液: 纯水 (25℃)
- 装柱条件: 50% (v/v) 悬浮液, 以 54 ml/min (403cm/hr) 流速填料, 直至床高稳定。
- 轴向压缩: 人工装柱, 至床高 20 cm (目标床体积=161 mL)。

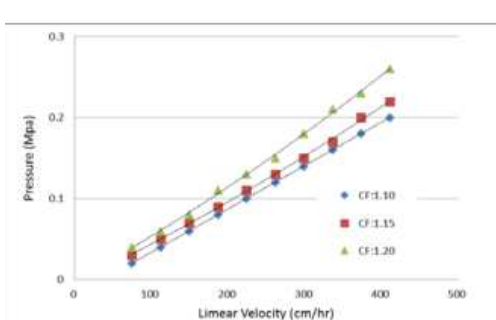
表 2 和图 3 概括了采用不同 C_f 及装柱流程, 用 Cellufine A-500 填装直径 3.2 cm 的色谱柱时的填料和压力/流速特性。

以 2% 丙酮检测, 对填装(流速为 4ml/min)进行评估。

表 2. 概述了在一定范围内树脂压缩因子的峰值性能

C_f	$N (m^{-1})$	A_s
1.10	2600	1.27
1.15	3200	1.17
1.20	2900	1.29

图 2. 在 3.2cm 内径色谱柱的压力/流速曲线



在该柱型中, 纤维素 A-500 在保持背压 < 0.3MPa 的情况下, 在 1.10 ~ 1.20 的填料压缩因子 (C_f) 范围内均表现出良好的流动性能。

填装 4.4cm 内径色谱柱的离子

- 色谱柱：4.4cm 内径×25cm 长（Millipore Vantage Column）
- 装柱缓冲液：纯水（25℃）
- 装柱条件：手动装柱，50% (v/v) 悬浮液，对应的压缩床高的 $C_f = 1.15$ (24.7 cm - 21.5 cm)（打开出口阀门，将顶部流量适配器降低到 21.5 cm 的床层高度）
- 以 2% 丙酮检测，对填装(流速为 4ml/min)进行评估。

表 3. 在 4.4cm 内径色谱柱内 Cellufine A-500 的装柱测试

C_f	N (m^{-1})	A_s
1.15	6100	0.86

填装 30cm 内径色谱柱的离子

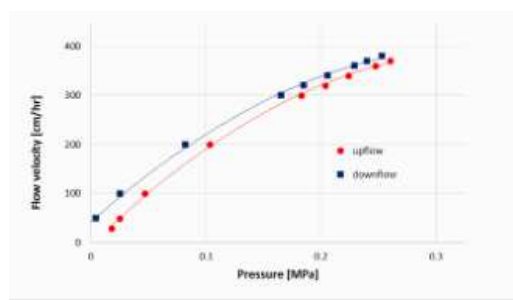
- 色谱柱：30cm 内径×50cm 长（Easy Column300）
- 装柱缓冲液：纯水（25℃）
- 装柱条件：50% (v/v) 悬浮液，以 0.15、0.20 及 0.25 MPa 填装，30 分钟（打开柱式出口阀后）
- 装柱评估：
 1. 用 1 柱体积以 75cm/hr（0.83L/min）平衡色谱柱
 2. 以 30cm/h 流速注入 150mL 的 2% 丙酮（流动相：纯水）
 3. 以同样的流速洗脱 1.3 柱体积

表 4 和图 4 概括了采用不同压力及装柱流程，用 Cellufine A-500 填装直径 30 cm 的色谱柱时的填料和压力/流速特性。

表 4. 30cm 内径色谱柱装柱特性

压力 (MPa)	C_f	N (m^{-1})	A_s
0.15	1.10	2600	1.27
0.20	1.15	3200	1.17
0.25	1.20	2900	1.29

图 4. 在 30cm 内径色谱柱的压力/流速曲线



*理论塔板高降低

这一数据表明，在 30 cm 内径的色谱柱中填充 Cellufine A-500 的最佳压缩因子范围是 1.125 到 1.175。在上面的图 4 中，在 30cm 内径的色谱柱中填充的 Cellufine A-500 的压力-流速曲线显示了双向流动性。

总结

纤维素是一种天然产物，具有独特的晶体分子结构，赋予球形色谱珠体以化学稳定性和机械强度。在流动、轴向和失速的装柱方式下，Cellufine IEX 树脂可以很容易地装填成一系列的大体积柱。Cellufine A-500 树脂的压缩因子(C_f)在 1.125 到 1.200 之间，同时具备高达 400cm/h 的线速度的高体积流速，同时保持背压< 0.3MPa。

订购信息

说明	数量	产品编号
Cellufine A-200	5 x 1 ml 筒	19611-51
	100 mL	676980327
	500 mL	19611
	5 L	19612
	10 L	676980335
Cellufine A-500	5 x 1 ml 筒	19805-51
	1 x 5 mL 筒	19805-15
	100 mL	675980327
	500 mL	19805
	5 L	19806
	10 L	675980335
Cellufine A-800	5 x 1 ml 筒	19865-51
	1 x 5 mL 筒	19865-55
	100 mL	673980327
	500 mL	19800
	5 L	19801
	10 L	673980335
Cellufine Q-500	5 x 1 ml 筒	19907-51
	1 x 5 mL 筒	19907-55
	100 mL	675982327
	500 mL	19907
	5 L	19908
	10 L	675982335
Cellufine C-500	5 x 1 ml 筒	19800-51
	1 x 5 mL 筒	19800-55
	100 mL	675983327
	500 mL	19865
	5 L	19866
	10 L	675983335
Cellufine S-500	5 x 1 ml 筒	21200-55
	1 x 5 mL 筒	21200-15
	100 mL	21200
	500 mL	21201
	5 L	21202
	10 L	21203

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/>