

Cellufine MAX IEX 装柱

Cellufine MAX IEX 是一种新一代纤维素树脂，采用新型专利交联技术对球形纤维素颗粒进行交联。该工艺使球体结构具有刚性，可以在生产规模应用所需的高线速度流速下运行。JNC 提供一系列的 Cellufine MAX IEX 体以及一系列化学反应，如 Cellufine MAX S-h, Q-h, DEAE 和 CM，基于表面改性与右旋糖酐聚合物或 Cellufine MAX GS，化学反应是通过接枝同源聚合物改性。该 IEX 系列可用于一系列疏水相互作用的应用，如抗体精制的蛋白 A 捕获和去除 dsDNA，是基于一种高度稳定的纤维素颗粒结构，适用于小规模、中试和全生产规模的蛋白纯化工作流程。

使用流量适配器的装柱流程（直径达 30 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。
- 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。
- 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 0.25 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) 重新连接上面的流量适配器，打开出口，以 30-800cm/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(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(As)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)。在 0.8 到 1.4 的对称因子与 2-3 的 RPH 范围内，可以装柱。
- 20) 填料树脂床可调流量后柱填料。在 0.25- 0.3 MPa 的压力上行流动中运行 30 - 60min，然后在压力为 0.25- 0.3 MPa 的下行流动中运行 30 - 60min。这一过程可能导致树脂填料更均匀，或可用于柱清洗或基 CIP 消毒，以去除任何可能在柱头积聚的物料。对于新色谱柱，这是可选的，但是对于经过 5-10 次重用之后的填充柱，建议使用此选项。

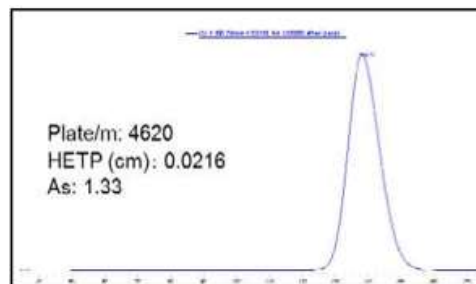
用 Cellufine MAX IEX- S-h 流动填装一支 3.2 厘米内径色谱柱例子

- 色谱柱：EMD Millipore Vantage 色谱柱，内径 3.2 厘米
- 装柱床高：19.8 厘米
- 装柱缓冲液：纯水
- 装柱条件：在 0.25 ~ 0.30 MPa 的背压下流动充填 50%悬浮液。
- 色谱柱操作：上流式 30 分钟，下流式 30 分钟，背压 0.3 MPa
- 压缩因子：1.20

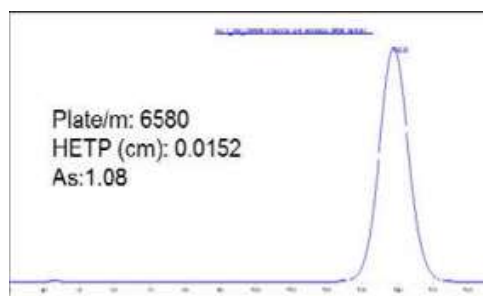
测量填料柱后流速调节的影响，得到洗脱峰如图 1 所示。

图 1. 填料柱后流速调节的影响

A 组：色谱柱调节前



B 组：色谱柱调节后



色谱柱调节后 3.2 内径色谱柱确实导致了理论板数 /m 的显著改善，并在压缩因子 1.08 达到了一个非常可观的峰值。

用 Cellufine MAX IEX- S-h 流动填装一支 30 厘米内径色谱柱例子

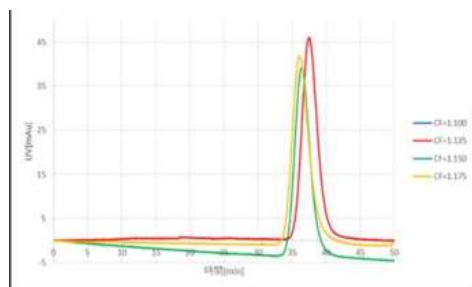
- 色谱柱：内径 30 厘米 (BPG 300)
- 装柱床高：20 厘米 (压缩因子=1.15)
- 装柱缓冲液：纯水 (25℃)
- 装柱条件：在 0.25 ~ 0.30 MPa 的背压下流动充填 50%悬浮液。
- 注入：2%丙酮 (30cm/hr)

下方表 1 和图 2 总结了色谱柱功效数据，如理论板数(N)和 30 cm 内径色谱柱柱在不同压缩因子 (C_f)下填充时的不对称性(as)。

表 1.不同树脂*压缩因子 (A_s) 的色谱柱功效

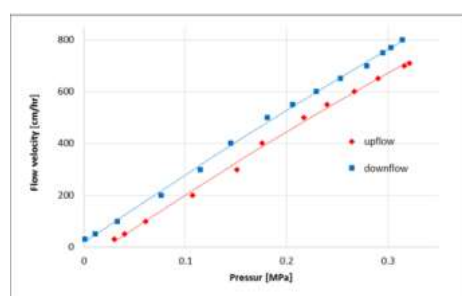
压缩因子	N (m^{-1})	A_s	RPH
1.10	6000	1.15	1.85
1.13	6000	1.17	1.87
1.15	6200	1.14	1.79
1.18	6000	1.13	1.87

图 2. 由表 1 中获得的色谱柱功效曲线叠加



在下图 3 中, 显示了 Cellufine MAX S-h 填充床上下流动的压力/流速特性

图 3. Cellufine MAXS-h 填充树脂的压力/流速曲线



用 Cellufine MAX S-r 流动填充一支 30 厘米内径色谱柱例子

- 色谱柱: 30 厘米内径 (BPG300)
- 装柱床高: 19.3 厘米 (压缩因子=1.13)
- 装柱缓冲液: 纯水 (25°C)
- 装柱条件: 在 0.25 ~ 0.30 MPa 的背压下流动充填 50% 悬浮液。
- 注入: 2% 丙酮 (30cm/hr)

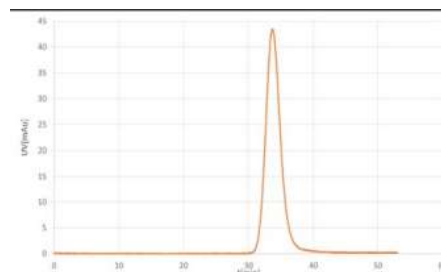
图 4 总结了色谱柱功效数据, 如理论板数 (N) 和 30 cm 内径色谱柱在压缩因子 (C_f) 为 1.13 时的不对称因子 (A_s)

图 4. 色谱柱功效数据

A 组, 数据概括

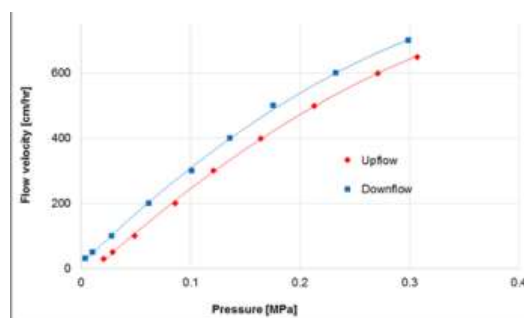
N (m^{-1})	A_s	RPH*
5700	1.13	1.95

B 组, 洗脱曲线数据



在下面的图 5 中, 总结了 Cellufine MAX S-r 填充床上下流动方向的压力/流动特性。

图 5. Cellufine MAX S-r 填充 30cm 内径色谱柱的压力/流速曲线



用 Cellufine MAX Q-h 流动填充一支 30 厘米内径色谱柱例子

- 色谱柱: 30 厘米内径 (BPG300)
- 装柱床高: 20.4 厘米 (压缩因子=1.13)
- 装柱缓冲液: 纯水 (25°C)
- 装柱条件: 在 0.25 ~ 0.30 MPa 的背压下流动充填 50% 悬浮液。
- 注入: 2% 丙酮 (30cm/hr)

下方表 2 总结了 30 cm 内径的色谱柱在压缩因子 (C_f) 为 1.13 时的色谱柱效能数据。

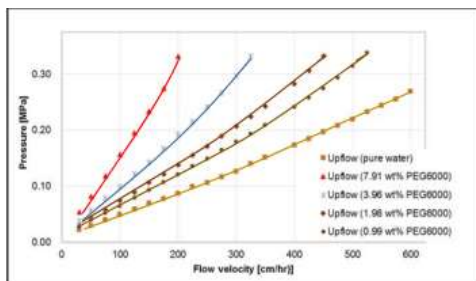
表 2. 色谱柱效能数据

N (m^{-1})	A_s	RPH*
5200	1.07	2.14

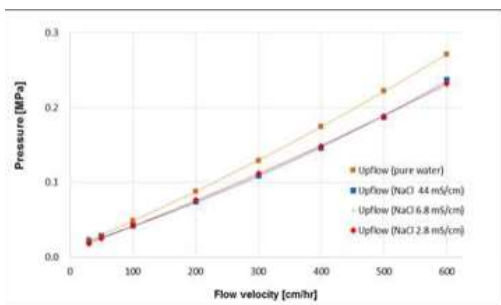
在图 6 中, 是 Cellufine MAX Q-h 的一系列压力-流动速度曲线, 不同粘度溶液在 30cm 内径流动填充柱中, 其压力-流动速度曲线如表 2 所示。

图 6. 30 厘米内径色谱柱, 样品粘度对压力/流量曲线的影响

A 组, PEG6000, 范围从 0.99 增加到 7.91%



B 组, NaCl 电导率在 2.8 到 44 mS/cm 之间



上述数据显示,30 厘米内径色谱柱在 1.07 对称因子的符合条件峰值。当含盐量达到 44 mS/cm ($\sim 0.5\text{M NaCl}$)时, 当含盐量达到 600 cm/h 时, 回流压力 < 0.3 MPa。如所料, 通过添加 PEG 6000 增加缓冲粘度, 导致压力/流量曲线斜率增加。在测试的最高粘度下, 仍然可以在低于 0.3 MPa 的背压下以 175 cm/h 的流速装柱。

用 Cellufine MAX Q-r 流动填充一支 30 厘米内径色谱柱例子

- 色谱柱: 30 厘米内径 (BPG300)

- 装柱床高: 20 厘米 (压缩因子=1.15)
- 装柱缓冲液: 纯水 (25°C)
- 装柱条件: 在 0.25 ~ 0.30 MPa 的背压下流动充填 50%悬浮液。轴向压缩到 $C_f = 1.15$
- 注入: 2%丙酮 (30cm/hr)

下面的图 7 和表 3 总结了色谱柱效能数据, 如理论板数(N)和 30 cm 内径色谱柱在压缩因子(C_f)为 1.13 时的不对称因子(A_s)。

图 7. 洗脱峰数据

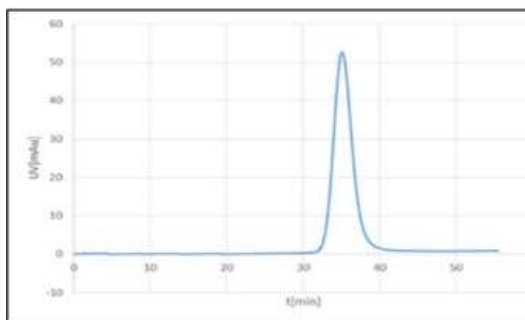
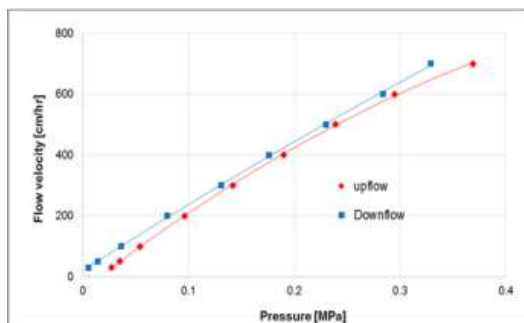


表 3 装柱功效数据

装柱压力[MPa]	压缩因子	N (m^{-1})	A_s	RPH
0.25	1.12	4,000	1.09	2.76
0.30	1.14	4,900	1.12	2.26
0.35	1.14	4,100	1.14	2.73

在图 8 中, 下面是 Cellufine MAX Q-r 在 30 厘米内径色谱柱的一系列压力-流速曲线, 在 0.35 MPa 的压力下填充 60 分钟, 最终压缩因子 C_f 为 1.15。

图 8. Cellufine MAX Q-r 填充 30cm 内径色谱柱的压力/流速曲线



用 Cellufine MAX DEAE 流动填充一支 30 厘米内径色谱柱例子

- 色谱柱：30 厘米内径（BPG300）
- 装柱床高：20 厘米（压缩因子=1.15）
- 装柱缓冲液：纯水（25℃）
- 装柱条件：在 0.25 ~ 0.30 MPa 的背压下流动填充 50% 悬浮液。轴向压缩到 $C_f = 1.10$ 、1.13、1.15 与 1.18
- 注入：2% 丙酮（30cm/hr）

下方图 9. 与表 4 概括了在压缩因子 1.10、1.13、1.15 与 1.18 时填充 30cm 内径色谱柱的效能数据

图 9. 一定装柱压力范围内的洗脱峰数据

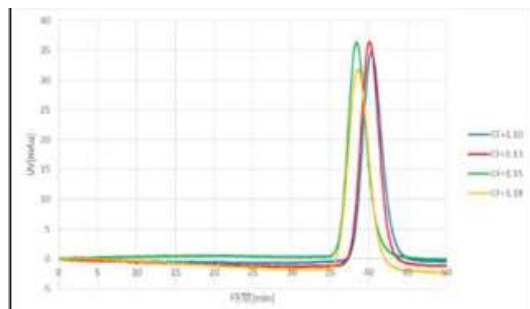


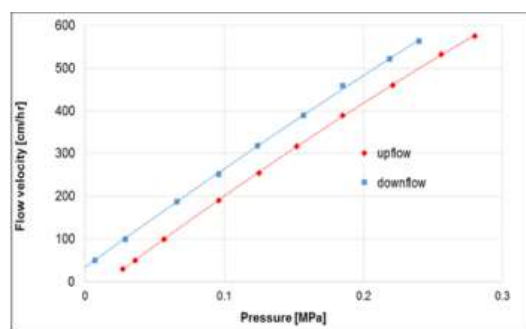
表 4. 一定装柱压力范围内的装柱效能数据

装柱压力 [MPa]	时间 [min]	压缩因子	N (m ⁻¹)	A _s	RPH
0.15	30	1.10	5566.2	1.15	2.00
0.15	30	1.13	6135.8	1.09	1.81
0.15	30	1.15	5890.2	1.18	1.89
0.15	30	1.18	4727.2	1.08	2.35

粒径：90 微米

图 10 所示为 Cellufine MAX DEAE 在 0.35 MPa 压力下填充 30cm 内径色谱柱 60min，压缩因子 C_f 为 1.15 时的一系列压力-流速曲线。

图 10. Cellufine MAX DEAE 填充 30cm 内径色谱柱的压力/流速曲线



上述数据表明，Cellufine MAX DEAE 的 30cm 内径色谱柱可以在压缩因子 1.10 ~ 1.18 范围内成功地流动填充，从而获得一个限定峰，其窄压缩因子范围 1.09 ~ 1.18。

总结

本技术说明描述了一种最优的方法，可以成功地将 Cellufine MAX IEX 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 C_f 在 1.09 ~ 1.15 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 1.03 ~ 1.18 范围内）。压力/流体曲线显示，在高达直径 45 cm 的 Cellufine MAX IEX 树脂柱中，当流速为 600 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。新设计的纤维素基质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	说明	数量	产品编号
Cellufine MAX S-r	1 mL x 5*	20300-51	Cellufine MAX Q-r	1 mL x 5*	20500-51
	5 mL x 1*	20300-55		5 mL x 1*	20500-66
	100 mL	20300		100 mL	20500
	500 mL	20301		500 mL	20501
	5 L	20302		5 L	20502
	10 L	20303		10 L	20503
Cellufine MAX S-h	1 mL x 5*	20400-51	Cellufine MAX Q-h	1 mL x 5*	20600-51
	5 mL x 1*	20400-55		5 mL x 1*	20600-55
	100 mL	20400		100 mL	20600
	500 mL	20401		500 mL	20601
	5 L	20402		5 L	20602
	10 L	20403		10 L	20603
Cellufine MAX CM	1 mL x 5*	20900-51	Cellufine MAX DEAE	1 mL x 5*	21000-51
	5 mL x 1*	20900-55		5 mL x 1*	21000-55
	100 mL	20900		100 mL	21000
	500 mL	20901		500 mL	21001
	5 L	20902		5 L	21002
	10 L	20903		10 L	21003

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/>