



BESTCHROM

博 格 隆

# Diamond Viru-S 亲和层析介质 使用说明书



# 目 录

1、产品简介 .....	1
2、技术参数 .....	1
3、使用方法 .....	1
4、在位清洗 .....	5
5、灭菌 .....	5
6、储存 .....	5
7、销毁及回收 .....	5
8、订货信息 .....	6

## 1、产品简介

Diamond Viru-S 是由 Diamond 高刚性基架结合右旋糖酐硫酸盐而成的亲和层析介质，其对不同类型的病毒具有相似的亲和力，能够在低反压条件下以高流速运行，可以缩短工艺周期并提高生产效率。适合于层析过程中的捕获阶段和中度纯化阶段，可满足生物制药规模化生产操作。

Diamond Viru-S 层析介质具有以下优点：

- 化学稳定性良好。
- 对各种病毒具有相近的亲和力。
- 刚性强流速快反压低。

## 2、技术参数

基架	高刚性琼脂糖
平均颗粒大小	~75 $\mu$ m
功能基团	硫酸葡聚糖
配基密度	70~130 $\mu$ mol 配基/mL 介质
动态载量	~60mg 溶菌酶/mL 填装介质
pH 稳定性	6~14 (CIP)，7~13 (工作)，避免低pH操作及储存
压力流速	$\geq$ 1200cm/h (0.5MPa BXK 100/500 H=20 cm 20 $^{\circ}$ C)
化学稳定性	常用水溶性溶液
温度耐受性	使用温度2~30 $^{\circ}$ C，不能冻结
储存 <sup>+</sup>	2~8 $^{\circ}$ C，含约0.2M NaAc的20%乙醇或含约0.2M NaAc的2%苯甲醇 (pH中性)

+2%苯甲醇仅用于国外运输或者客户指定

### 3、使用方法

#### 3.1 层析柱装填

**注：装柱前最好将介质悬液平衡到室温。**

- 用量计算：根据计划装填的层析柱的柱体积计算需要的 Diamond Viru-S 的量。

需要的沉降介质体积=柱体积×1.15（即压缩比约为 1.15）

根据需要的沉降介质体积计算需要量取的介质悬液体积，计算公式为：

需要的介质悬液<sup>1</sup>体积=沉降介质体积÷介质悬液<sup>1</sup>浓度。介质悬液<sup>1</sup>原始浓度见下表。

包装规格	介质悬液 <sup>1</sup> 浓度(%)
25mL、100mL、500mL、1L、5L、10L	80
20L、40L	75

**1：指博格隆销售的原包装介质悬液。**

**注：对于非原始浓度的介质悬液，客户可根据介质悬液的实际浓度计算所需体积。**

- 介质清洗：将介质悬液充分摇匀后量取上述方法计算所得的体积，倒入漏斗，抽去液体，用约 3mL 装柱液（20%乙醇+0.4M NaCl）/mL 介质洗涤，重复洗涤 3 次，每次加洗液时需用玻璃棒或者搅胶棒搅拌，以便更好地清洗掉原保存液。
- 装柱胶悬液准备：将清洗好的介质从漏斗转移到烧杯或其它适当的容器中，加入装柱液至胶悬液浓度为 50~75%，搅匀备用。
- 取清洗干净的 BXK 层析柱（BXK 系列层析柱的直径从 1 厘米到 30 厘米不等，不同规格可以满足不同规模大小的层析应用），以层析柱 BXK16/20 为例，利用装柱液通过层析柱排液口排净下筛网内气泡，在柱子底部保留 1cm 高左右的液体，拧紧下堵头，调整柱子使其垂直于地面。
- 将搅匀后的胶悬液一次性缓慢倒入层析柱内（必要时使用装柱器），注意不要带入气泡。

**装柱器：与 BXK 柱相同直径的空柱管。**

- 用装柱液将装柱器加满，将装柱器与层析系统连接，开启流速，排空软管中气泡，关闭流速，再拧紧装柱器上盖。



- ✧ 倒入后用搅胶棒再次搅匀，然后用装柱液沿内壁从上而下冲洗柱子上的介质颗粒，让介质自然沉降，直至悬液上有大约 1cm 澄清液。安装上柱头，将上柱头与层析系统或者蠕动泵连接。调节适配器使其下降到与澄清液接触，待密封圈全部浸入澄清液后拧紧密封圈。确保层析柱顶部阀门打开情况下，慢慢下移适配器至所有气泡排净。

**注：此操作仅用于 BXK 100 及以上层析柱。冲洗内壁可减少介质颗粒粘在密封圈和柱壁之间，避免泄漏风险。**

- 柱高为 10cm 时，可设定装柱流速为 750cm/h，打开层析柱底阀/堵头，开启流速，使用设定流速压至胶面清晰稳定，标记胶面稳定时的位置。
- 去掉装柱器（如有），装上上柱头，将柱头下降至胶面上约 0.5cm 的位置，按照上述流速继续压柱至胶面清晰稳定，然后标记胶面稳定时的柱高。
- 停泵，打开柱头上的阀门/堵头，关闭柱底的阀门/堵头，稍微放松柱头密封圈，按照压缩比 1.15 下压胶面，旋紧柱头密封圈，关闭柱头阀门/堵头，装柱完成。

### 3.2 柱效测定和评价

- 通过柱效测定和评价可以确认层析柱装填质量。装柱完成后、层析柱使用期间以及分离纯化效果不理想时都需要进行柱效测定和评价。柱效通常用理论塔板高度（HETP）和非对称因子（As）来评价。
- 柱效测定可以采用丙酮或者NaCl作为样品进行测定，按照下表配制样品溶液和流动相。

	丙酮法测柱效	NaCl法测柱效
样品	1.0% (v/v) 丙酮水溶液	0.8M NaCl (溶于水)
样品体积	1.0% 柱体积	1.0% 柱体积
流动相	纯化水	0.4M NaCl水溶液
流速	30 cm/h	30cm/h
检测器	UV 280 nm	电导率



● HETP和As计算方法

根据UV或者电导率曲线计算理论塔板高度（HETP）、理论塔板数（N）和非对称因子（As），公式如下：

$$HETP=L/N$$

$$N=5.54(V_R/W_h)^2$$

其中：V<sub>R</sub>=保留体积

W<sub>h</sub>=半高峰宽

L=柱高

N=理论塔板数

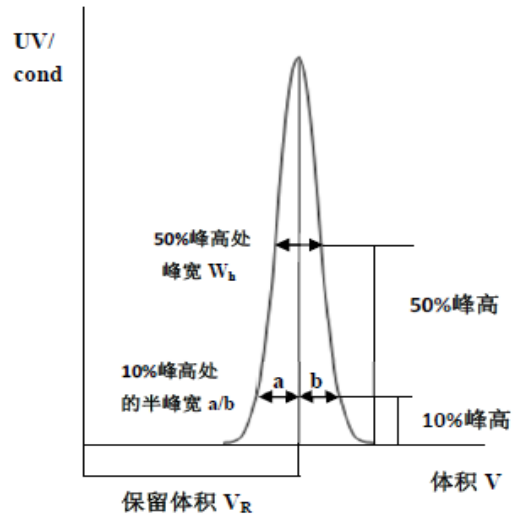
V<sub>R</sub>和W<sub>h</sub>的单位应一致；

$$As=b/a$$

其中：

a= 在10%峰高处的第一个半峰宽

b= 在10%峰高处的第二个半峰宽



● 结果评价

一般来说，HETP 的数值若小于三倍介质平均颗粒大小且非对称因子在 0.8~1.8 之间，说明柱效良好。对于不理想的柱效结果需要分析原因并重新装柱。

**3.3 层析方法**

Diamond Viru-S 不允许在高电导率下结合。当处理流感病毒时，建议电导率小于 5 mS/cm，pH 值建议在 6.8~7.8 之间。

装柱完成后，在进行纯化操作前建议先进行空白运行，包括在位清洗(CIP)。用 5CV 的平衡缓冲液平衡柱子，直到柱流出物显示稳定的电导率和 pH 值。

- 缓冲液：首选磷酸盐缓冲液，pH 范围在中性 6.8~7.8 之间，如 20mM 磷酸钠 pH 6.8。
- 流速：根据柱子的高度一般选用 90~500cm/h 的流速，柱高越大流速越慢。
- 样品准备：为防止样品堵塞柱子，在上样前样品需要用 0.45μm 的微孔滤膜过滤，并将样品的 pH 和电导率调整到与平衡缓冲液一致，（可以采用稀释、超滤以及用 Bestdex G-25 置换缓冲液的方式调整样品的 pH 和电导率）。



- 平衡:用平衡缓冲液清洗层析柱至出口处的缓冲液的 pH 和电导率与平衡缓冲液基本一致, 通常需要 3 到 5 倍柱床体积。
- 上样: 根据样品中的物质含量和 Diamond Viru-S 的结合载量确定上样体积, 进行上样。
- 清洗: 用平衡缓冲液清洗掉未结合的样品至紫外吸收接近基线。
- 洗脱: 可以采用线性梯度或者步级梯度增加洗脱液中的洗脱强度, 用洗脱缓冲液 (如含有 1.5 M NaCl 的 20mM 磷酸钠, pH 7.4) 洗脱病毒。

#### 4、在位清洗

随着层析介质使用次数的增加, 污染物在层析柱上的积累也在不断增加, 定期的在位清洗能有效防止污染物的累积, 保持层析介质稳定的工作状态。客户可根据使用过程中介质的污染程度确定在位清洗的频率 (如果污染较严重, 建议每次使用之后都进行在位清洗, 以保证结果的可重复性)。

针对不同的工艺过程, 应根据污染物的类型设计特定的 CIP 流程。CIP 的频率取决于原液的性质和层析条件, 但如 Diamond Viru-S 用于捕获步骤, 建议每次循环后都进行 CIP。推荐的 CIP 为: 用 1M NaOH 反向清洗至少 30min。

#### 5、灭菌

由于含约 0.2M NaAc 的 20%乙醇或含约 0.2M NaAc 的 2%苯甲醇保存液不具有杀菌、除热原作用, 建议 Diamond Viru-S 介质在使用前及使用过程中, 可以采用 1M NaOH 处理 0.5~1h 以减少微生物污染风险。

当使用醋酸钠或磷酸钠缓冲液时, 可以对 Diamond Viru-S 进行 121°C, 30min 高压灭菌来达到灭菌的效果。

#### 6、储存

Diamond Viru-S 用含约 0.2M NaAc 的 20%乙醇或含约 0.2M NaAc 的 2%苯甲醇为保存液进行销售。使用后的 Diamond Viru-S 应储存于 20%乙醇中 (pH 中性)、2~8°C 密闭保存, 为了防止乙醇挥发以及微生物滋生, 建议每 3 个月更换一次新鲜的保存液。

#### 7、销毁及回收

由于 Diamond Viru-S 在自然界很难降解, 为了保护环境建议采用焚烧处理。

## 8、订货信息

产品名称	货号	包装
Diamond Viru-S	AA0441	25mL
	AA0442	100mL
	AA0443	500mL
	AA0444	1L
	AA0445	5L
	AA0446	10L

预装柱名称	货号	包装
EzFast Diamond Viru-S	EA04421	1×1mL
	EA04423	1×5mL
	EA04431	5×1mL
	EA04433	5×5mL
EzScreen Diamond Viru-S	EA04425	1×4.6mL
	EA04435	5×4.6mL
EzLoad 16/10 Diamond Viru-S	EA04401	1 根
EzLoad 26/10 Diamond Viru-S	EA04411	1 根