

---

**NMab<sup>®</sup>**

Protein A 亲和层析介质

## 产品使用说明书

文件编号：NM-W-DF-0601

版本号：A2



## 亲和层析介质

Protein A 亲和层析是利用 Protein A 配基与目标抗体具有专一结合力作用从而达到分离纯化抗体的目的。Protein A 亲和层析大大简化抗体下游分离纯化工艺，成为抗体分离纯化的标准。目前市场上的 Protein A 亲和层析介质主要分为以多糖（琼脂糖、葡聚糖、纤维素）为基质和以合成高分子（聚丙烯酸酯，丙烯酰胺）为基质两大类。琼脂糖基质在溶胀状态下具有网状结构，比表面积大，因而亲和载量比较高，但机械强度不高、耐压低。

纳微科技通过长期研发创新开发出世界领先的微球精准制造技术，对微球的材料组成、粒径大小、粒径均匀性、孔径大小及表面性能能达到非常精准的调控。纳微凭借这一技术平台最早开发出了单分散 Protein A 亲和层析介质 UniMab<sup>®</sup>。UniMab<sup>®</sup>是聚丙烯酸酯为基质的填料，具有机械强度高、耐压好、柱床稳定、传质快、非常皮实等特点，因此受到很多抗体客户的欢迎，尤其是在抗体连续流纯化领域。

随着上游发酵技术的进步，抗体表达量越来越高，下游亲和捕获成为抗体生产瓶颈，因此对下游 Protein A 亲和层析介质的载量要求越来越高。为了因应这一需求，纳微科技以琼脂糖为基球，利用特有的微球改性技术以增强其机械强度，并结合自主知识产权的 Protein A 配基技术，成功开发出比 UniMab<sup>®</sup>具有更高载量的 NMab<sup>®</sup> Protein A 亲和层析介质。除了高载量外，NMab<sup>®</sup> 还具有优良的结合特异性、耐碱性以及压力-流速特性，是抗体客户降低单抗纯化成本的良好选择。

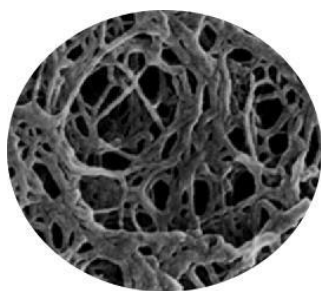


图 1. NMab<sup>®</sup> Protein A 亲和层析介质电镜图。

相较市场同类产品有如下独特优势：

- (a) 载量高：一般单抗项目平均动态载量约 55 mg/mL；
- (b) 耐碱性强：0.5 M NaOH 浸泡下 24 小时载量只下降 11%；
- (c) 配基脱落低：小于 10 ppm；
- (d) 宿主蛋白（HCP）残留低：一般在 1000 ppm 以内，表现不亚于 SuRe LX；
- (e) 回收率高：大于 90%；
- (f) 纯度高：亲和洗脱液纯度 98 %以上；
- (g) 压力流速好：明显强于传统 4FF/6FF 系列介质；

表 1. 纳微科技 NMab<sup>®</sup> Protein A 亲和层析介质技术参数。

产品型号	NMab <sup>®</sup>
分离原理	Protein A 亲和捕获
基质	琼脂糖
粒径	90 μm
配基键合方式	环氧键合
动态结合载量*	~ 55 mg·mL <sup>-1</sup> (人 IgG, 6 min 驻留时间)
最大耐压	0.3 MPa
CIP 在位清洗	0.1-0.5 M NaOH
推荐流速	100-500 cm/h
pH 稳定性	2-12
化学稳定性	所有常用缓冲液, 10 mM 盐酸, 0.1 M 柠檬酸 (pH3), 6M 尿素, 6M 盐酸胍, 30% 异丙醇、20% 乙醇。
使用温度	2-40 °C
存储	20% 乙醇或 2% 苯甲醇, 2-8 °C

## 压力流速曲线测试

压力对比测试结果如下，300 cm/h 条件下 NAb® 压力只有 0.05 MPa，与某国际知名蛋白 A 层析介质 SuRe LX 近似。此压力-流速特性可满足工业生产上对填料流速要求，优于传统 4FF/6FF 软胶系列填料。测试柱型号: XK16, H14.5 cm; 流动相: 0.5M 氯化钠溶液; 蓝色为纳微科技 NAb® Protein A 介质，红色为国外某品牌介质。

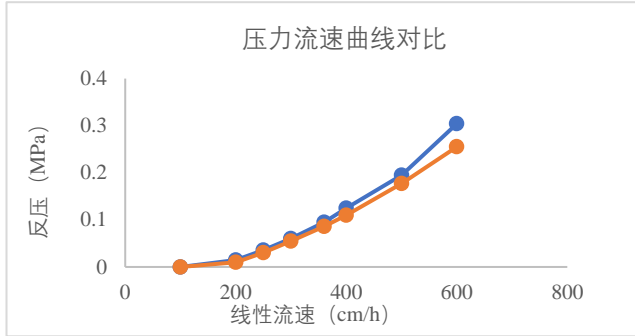


图 2. 纳微科技 NAb® 介质压力流速曲线对比示意图。

## 更高载

对多款单抗料液上样测试显示，NAb® 的动态载量 (10% 流穿，驻留时间 5 min) 均值在 55 mg/mL 左右，与某国际知名蛋白 A 层析介质 SuRe LX 接近，高载量表现优良。

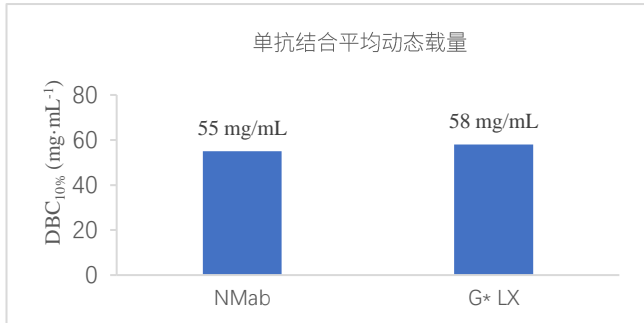


图 3. 纳微科技 NAbTM 介质动态载量对比示意图。

## 配基脱落低

在多个单抗项目上 NAb® Protein A 配基脱落均小于 10 ppm。

单抗项目	配基脱落 (ppm)
mAb1	5.06
mAb2	0.68

## 宿主蛋白残留低

在多个单抗纯化项目上，NAb® Protein A 介质的 HCP 残留在 1000 ppm 以内，表现和某国际知名蛋白 A 层析介质 SuRe LX、UniMab 相当。

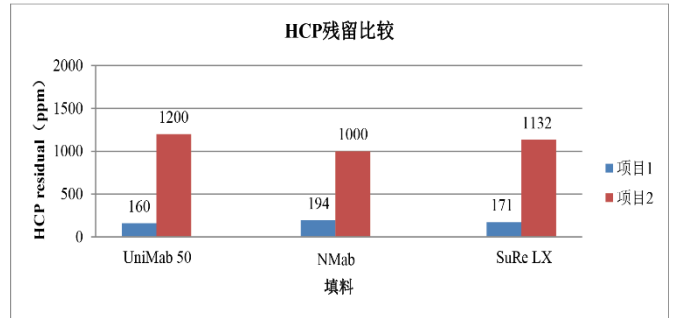


图 4. 纳微科技 NAb® 介质宿主蛋白残留对比示意图。

## 耐碱性测试

在 25°C，将填料用 0.5M 氢氧化钠浸泡 24 小时。使用某抗体 B 对亲和填料在强碱浸泡前和浸泡后进行动态结合载量 (DBC) 测定，以浸泡后 DBC 相对浸泡前的下降比率作为其耐碱性能的评价。DBC 下降比率越小，表明耐碱性越好。

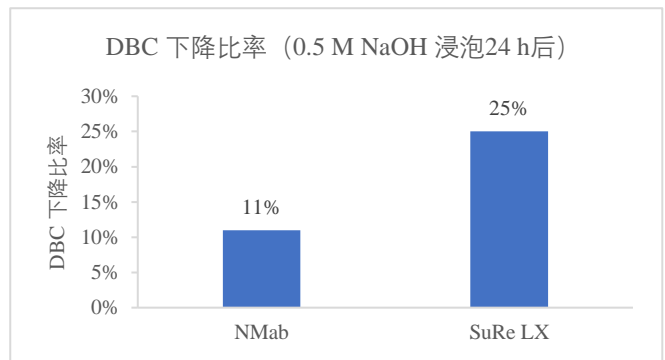


图 5. 纳微科技 NAb® 耐碱性对比示意图。

## 寿命周期

测试 N Mab 填料在单抗是上 150 个 cycle 的动态载量 (dynamic binding capacity, DBC)、纯度、压力, 以及在一定使用次数内填料性能的变化情况。每个循环包括 mAb 细胞培养液装载、洗涤、洗脱、CIP 和重新平衡步骤。图 6、图 7、图 8 和图 9 分别显示了不同使用周期下色谱图 UV280、DBC、纯度和压力的变化, 以确定填料的使用寿命。

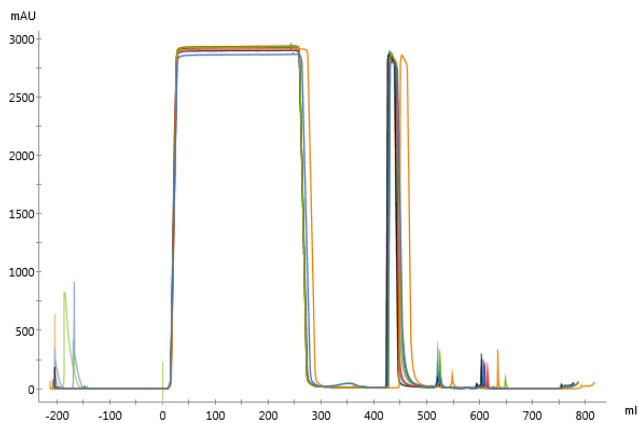


图 6. N Mab® 寿命每 10 次数据叠加图 UV280。

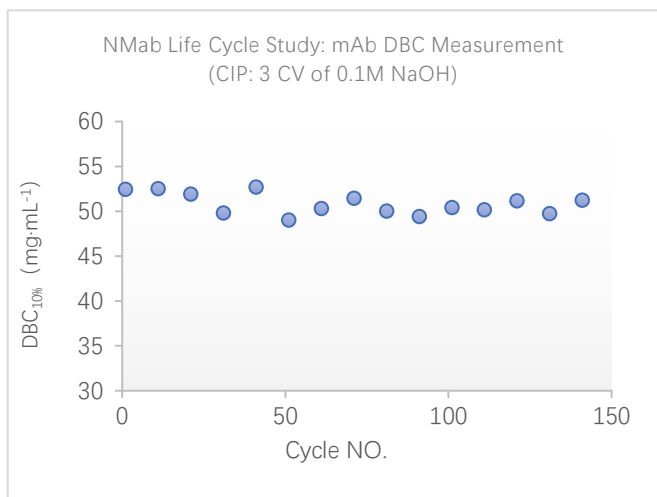


图 7. N Mab® 寿命测试 DBC<sub>10%</sub> 趋势。

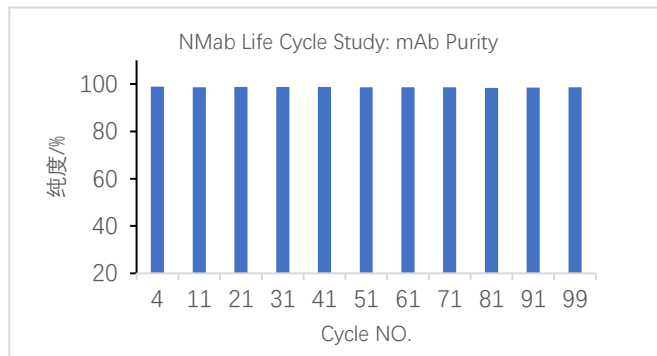


图 8. N Mab® 寿命测试洗脱样品纯度检测数据。

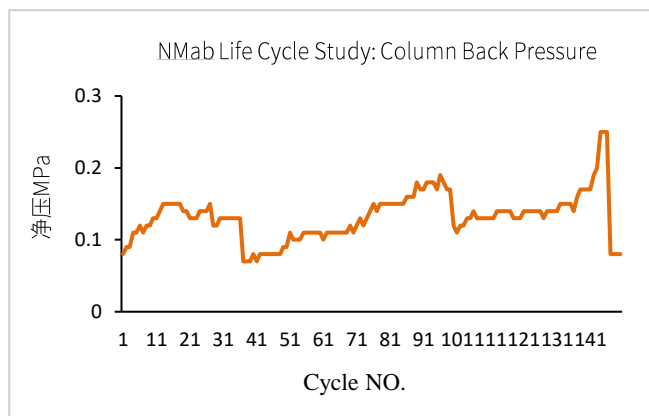


图 9. N Mab® 寿命测试柱压数据。

### 结论

经过 150 次寿命试验过程中填料载量皆大于 90% 的初始载量, 且载量衰减较为缓慢。分离性能和压力-流速性能稳定, 可重复使用 100 次以上, 寿命周期较好。

### 操作指南

#### 匀浆浓度测定

N Mab® 亲和层析介质保存在 20 % 乙醇溶液装瓶出售, 匀浆浓度 (Cs) 大约 65% (v/v)。匀浆液浓度是指层析介质恒定沉降体积与匀浆液的总体积的比值。如需准确测定 Cs, 可以将原容器内介质摇匀, 然后转移 10 mL 匀浆到量筒里静置过夜, 读出沉降体积 Vr, 计算匀浆浓度:

$$\text{Eq. 1 } C_s (\%) = 100 \times (V_r/10) = 10 V_r$$

为了获取最佳的装柱效果, 推荐使用 0.5 M NaCl 溶液配制 50~70 % 的介质匀浆液。

## 介质前处理

计算所装色谱柱的柱体积 (Vc) :

$$\text{Eq. 2} \quad V_c = h \times \pi r^2$$

h: 色谱层析柱高度; r: 色谱层析柱半径

计算所需匀浆体积 (Vs): 一般情况下, 层析介质在压力作用下都会被压紧导致体积收缩, 为了获得紧密的柱床, 推荐填料的体积过量一些, 压缩比 (Compression factor, CF) 一般为 1.15-1.2。

$$\text{Eq. 3} \quad V_s = 100 \times (V_c \times CF) / C_s$$

制备装柱介质匀浆: 将原容器中层析介质摇匀, 量取所需原液体积 Vs 至适当容器中, 静置让介质颗粒自然沉降后, 倾斜倒去上清液; 用 5 倍柱体积以上的装柱溶液, 如 0.5 M NaCl, 清洗介质以去除原保存液, 再用装柱溶液调整匀浆浓度到 50-70% (v/v)。

## 层析柱装填方法: (以 NmXK 16/20 层析空柱为例)

使用装柱溶液快速冲洗柱子末端的接头以除去气泡, 然后关闭柱子出口, 并在柱子底部保留 1-2 cm 装柱液。

用装柱溶液排除上柱头管路中的气泡。

重悬介质, 用玻璃棒紧靠柱内壁引流, 将胶悬液连续倒入层析柱中, 用装柱溶液清洗柱壁并填满柱管, 然后安装上柱头。注意操作过程中避免混入气泡。

打开柱子底部的出口, 开动层析系统泵, 在建议压力范围内用恒流或恒压方法进行压柱。待柱床稳定后, 在胶液界面作标记。

关闭泵和柱子出口, 旋松上柱头入口管线, 用上柱头推压柱床至标记线下 2-3 mm, 然后旋紧上柱头入口管线。

## 柱效评价

装好的层析柱先使用 2 CV 0.5 M NaCl 溶液平衡, 再用 2.0 M NaCl 以 100 cm/h 流速进行柱效测试; 亦可使用去离子水平衡层析柱并用丙酮溶液做测试。具体测试参数详见表 3:

**表 7. N Mab® 层析色谱柱的柱效测试条件。**

样品	5% (v/v) 丙酮的水溶液或 2 M NaCl
----	---------------------------

上样量	1 ~ 5 %柱体积
流动相	去离子水或 0.5 M NaCl
线性流速	50 ~ 200 cm/h
检测	5 %丙酮上样: UV @ 280 nm 2 M NaCl 上样: 电导检测仪
合格标准	As: 0.8-1.5; Plates (N/m) : >2500

## 使用方法

冲洗并平衡:

使用之前依次用洗脱液 (如 100 mM 甘氨酸, pH 3.0) 和平衡液 (如 20 mM PB + 150 mM NaCl, pH 7.4) 冲洗并平衡 N Mab 柱;

进样:

样品的上样量不超过介质 DBC<sub>10%</sub> 的 0.8 倍;

清洗:

5 CV 平衡液 (如 20 mM PB + 150 mM NaCl, pH 7.4);

洗脱:

5 CV 柠檬酸、醋酸或甘氨酸, pH 3-4;

清洗:

5 CV 1 M 醋酸;

再生 (Cleaning-in-place, CIP):

3-5 CV 0.1-0.5 M NaOH 溶液清洗, 如有需要可以适当延长浸泡时间;

再平衡:

5 CV 平衡液 (如 20 mM PB + 150 mM NaCl, pH 7.4) 清洗至基线;

保存:

使用结束后, 先用纯水替换层析柱中缓冲盐, 然后用 20%乙醇保存。

## 长期储存

介质密封保存在 20%乙醇或 2%苯甲醇中, 建议保存温度为 2~8 °C。注意防止乙醇挥发以及微生物生长, 建议 3 个月更换一次 20%乙醇。

注意: 使用过程中, 所用样品及流动相必须用孔径为 0.45 μm 滤膜过滤。

## 故障排除

如果您在使用 NMab® 产品遇到任何问题，请参考下表进行解决或联系我们。

现象	原因分析	建议措施
柱压升高	流速过高	降低流速
	仪器的在线滤器堵塞	去除杂质并清洗，或者替换，在使用前对样品和缓冲液进行过滤
	柱床被压缩	重新填充柱子
	层析柱使用过久	更换层析柱或更换层析介质
	泵和收集器之间的阀门未打开	打出口
出现柱上沉淀	疏水性蛋白、脂蛋白或者脂类累积	用非离子型表面活性剂冲洗（如 0.1% Tergitol 15-S-9 或 Triton X-100 reduced/还原态），或者 0.5 M NaOH，或者 1 M 盐酸胍；然后使用至少 5 倍柱体积经过消毒过滤的结合缓冲液（pH 7-8）冲洗
	蛋白质变性沉淀	使用 2 倍柱体积的 50 mM NaOH，或者 50 mM NaOH 和 1.0 M NaCl，或者 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ，或者 6 M 盐酸胍和 10 mM NaOH 冲洗柱子，至少冲洗 10 分钟以上；然后使用至少 5 倍柱体积经过消毒过滤的结合缓冲液（pH 7-8）冲洗

## 订货信息

产品型号	包装	货号
NMab®	30 mL	17013-090100-2030
	50 mL	17013-090100-2050
	100 mL	17013-090100-2100
	300 mL	17013-090100-2300
	500 mL	17013-090100-2500
	1 L	17013-090100-1001
	5 L	17013-090100-1005
	10 L	17013-090100-1010
	50 L	17013-090100-1050
	100 L	17013-090100-1100

注：可以提供 7.7 mm × 22 mm 、 16 mm × 25 mm 、 7.7 mm × 100 mm 的层析预装柱。更多规格型号或定制需求，请联系我们。

### 苏州纳微科技股份有限公司

全国咨询热线：400-828-1622

邮箱：info@nanomicrotech.com

(本公司产品仅限科研或工业使用)

中文网站：www.nanomicrotech.com

英文网站：en.nanomicrotech.com

2023-苏州纳微科技股份有限公司版权所有

总部地址：苏州工业园区百川街2号 215123

2023年10月第一版

