



Protein A 亲和层析介质

使用说明书

UniMab[®]

NanoMab

使用之前请认真阅读产品使用手册

苏州纳微科技有限公司

Suzhou Nano-Micro Tech, Co., Ltd

通用缩略术语：

AC：亲和层析，文献中也有被记为 AC

280 nm：在指定波长的紫外吸收

M：物质的量的浓度单位，mol/l 的简写

mM：物质的量的浓度单位，mmol/l 的简写

BV：柱体积，bed volume 的简写

Mr：相对分子量

MPa：兆帕斯卡

Bar：压强单位，工程上“公斤力”的单位

psi：压强单位，磅每平方英寸

压强单位之间换算：1 MPa = 10 bar \approx 145 psi

索引目录

1. Protein A 亲和层析产品简介	4
2. Protein A 亲和纯化操作步骤	4
2.1 层析柱装填	5
2.2 柱效评价	5
2.3 预装柱使用方法	6
3. 产品基本特性	6
3.1 单分散高度均匀的粒径	6
3.2 更快的流速、更高的效率	7
3.3 超高的结合载量	7
3.4 更卓越的耐碱性和化学稳定性	8
3.5 更低的配基脱落风险	9
4. 细胞培养液中单克隆抗体(mAb)捕获应用	9
5. 储存	10
6. 故障排除	11
7. 订购信息	12

1. Protein A 亲和层析介质简介

纳微科技提供全球领先的 Protein A 亲和层析介质和预装柱产品，该产品以单分散均匀多孔型聚甲基丙烯酸酯 (PMMA) 或聚苯乙烯/二乙烯苯 (PS/DVB) 微球为基质，采用领先的基因工程优化的耐碱性重组 rProtein A，通过独特的表面键合技术制成，专门用于单克隆抗体以和含有 Fc 片段的重组蛋白类生物大分子的分离纯化。

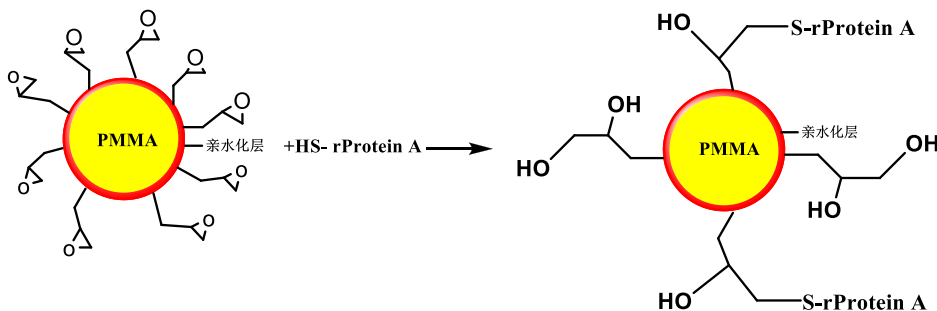


图 1.1 纳微科技 Protein A 亲和介质的制备示意图

表 1.1 纳微科技 Protein A 亲和层析介质

产品系列	UniMab®介质	NanoMab 介质
分离原理	Protein A 亲和捕获	Protein A 亲和捕获
基质	聚甲基丙烯酸酯(PMMA)	聚苯乙烯/二乙烯苯(PS/DVB)
配基	耐碱性 rProtein A	耐碱性 rProtein A
粒径 (μm)	50 μm	15 μm
结合载量 (人 IgG)	> 35 mg / mL (4 min 驻留时间)	>30 mg / mL (4 min 驻留时间)
纯化阶段	捕获、中度纯化	捕获、精细纯化或样品制备
基本特点	高载量、高耐压、高分离效率、耐清洗	中高载量、极高耐压、高分辨率、耐清洗
最大耐受压力	116 psi (8 bar, 0.8MPa)	870 psi (60bar, 6MPa)
pH 稳定性	3 - 12	3 - 12
CIP 在位清洗	0.1 - 0.5 M NaOH	0.1 - 0.5 M NaOH
使用温度	4 ~ 40 摄氏度	4 ~ 40 摄氏度
存储	20%乙醇, 2-8 摄氏度	20%乙醇, 2-8 摄氏度
典型应用	适合于大规模抗体和免疫球蛋白等纯化生产, 比如当克隆抗体等。	适合于中高压或超高压抗体类或免疫球蛋白等的制备和纯化

表 2 纳微科技 Protein A 亲和层析预装柱

参数规格	UniMab® 预装柱	NanoMab 分析柱
预装柱尺寸规格 (直径*高)	7 mm * 25 mm 16 mm * 25 mm	2.1 mm * 50 mm 4.6 mm * 50 mm
柱材质	Polypropylene (PP)	不锈钢 ss
人 IgG 动态载量 (4min 驻留时间)	> 35 mg / mL	> 30 mg / mL
推荐流速	0.25 - 1.0 mL/min	0.25 - 3.0 ml/min
最大操作压力	72.5 psi (5 bar, 0.5 MPa)	870 psi (60 bar, 6 MPa)

2. Protein A 亲和纯化操作步骤

2.1 层析柱装填

匀浆液的浓度是指层析介质沉降至恒定体积时的体积与匀浆液的总体积的比值。为了获取最佳的 Protein A 亲和层析介质的装柱效果，我们推荐 0.5 M NaCl 平衡过夜，再用 0.5 M NaCl 溶液进行匀浆，匀浆液浓度为 65~70%。具体装柱方法如下：

1) 首先计算所装色谱柱的柱体积 V_c ， $V_c = A_c \times L$ ， $A_c = \pi \times r^2$ 。

* V_c ：色谱柱柱体积； A_c ：色谱柱横截面积； L ：色谱柱高度； r ：色谱柱半径。

2) 在原容器中轻轻搅动 Protein A 亲和层析介质，使其完全分散在液体中形成匀浆液。量取所需原液的质量或体积*。

* 一般情况下，Protein A 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，推荐介质的体积过量一些，一般为柱体积的 1.2 倍左右。

3) 倾出介质中 20%乙醇保存液，用 0.5 M NaCl 溶液置换 20%乙醇，平衡过夜。

4) 装柱之前，用 0.5 M NaCl 溶液调整匀浆浓度为 65 ~ 70%；将匀浆一次性倒入层析柱，沉降平衡后标注高度。

5) 将分配器装入，调节高度使得压缩系数为 1.05 ~ 1.10；然后启动输液泵，用 1.5~2 倍工作流速使柱床稳定（-2 柱体积）。

6) 按照 SOP 进行柱效和对称性的测定，须达到预定标准。

2.2 柱效评价

装好的色谱柱应使用 2 BV 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，具体测试参数详见下表：

表 2.2 Protein A 装填亲和柱的柱效测试方法

样品：	2 M NaCl 溶液
上样量：	1~5 % 柱体积
洗脱液：	0.5 M NaCl 溶液
线性流速：	100 cm/h
检测：	UV @ 280 nm 2 M NaCl 上样：电导检测仪

2.3 预装柱使用方法

- ①使用之前用平衡缓冲液替换层析柱中 20%乙醇保存液；
- ②依次用洗脱液（如 100 mM Gly, pH 3.0）和平衡液（如 20 mM PBS, 150 mM NaCl, pH 7.0）冲洗并平衡 UniMab 柱；
- ③进样，用 10 CV 平衡液清洗至基线平衡；
- ④洗脱，用 15 CV 洗脱液清洗至基线平衡；
- ⑤再平衡，用 15 CV 平衡液清洗至基线平衡；
- ⑥使用结束后，先用纯水替换分析柱中缓冲盐，然后用 20%乙醇保存。

注意：分析过程中，所用样品及流动相均必须用孔径为 0.45 μm 滤膜膜过滤。

3. 产品优势特性

UniMab[®] Protein A 亲和层析介质的机械强度高，反压低，化学稳定性好，耐碱性强，即使在高流速下仍然能保持较高动态吸附载量，可以满足从实验室制备、中试及工业化生产的需求。

产品特点或属性	能够带给客户的益处
单分散高度均匀的粒径	批次重现性更好、装柱更容易
高机械强度	耐压更高，可装填更大尺寸规模的制备柱
高流速	分离效率更高
高载量	性价比更高
高耐碱性	化学稳定性更好、清洗更便捷

3.1 单分散高度均匀的粒径

UniMab[®]和NanoMab亲和层析介质采用全球领先的单分散高度均一粒径和精确的孔径的微球为基质，批次重现性好，装柱容易。

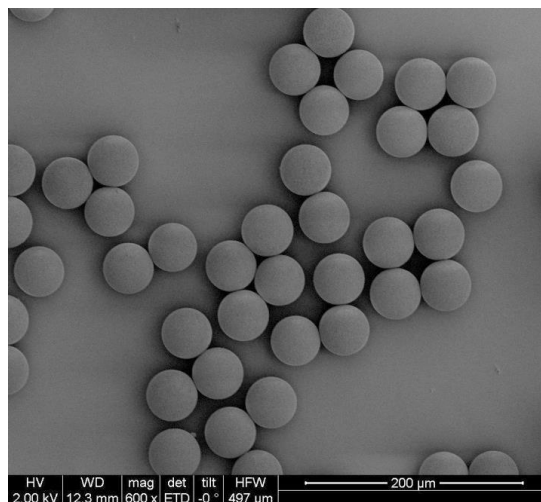


图 3.1 UniMab®扫描电镜图显示其单分散均匀的粒径

3.2 更快的流速、更高的效率

采用聚甲基丙烯酸酯微球为基质，相比传统的琼脂糖基质，其耐反压的性能更强，可承受>0.5 MPa压力，可实现更快的流速，帮助生产节省宝贵时间，大幅提高生产效率，同时降低抗体的生产成本。

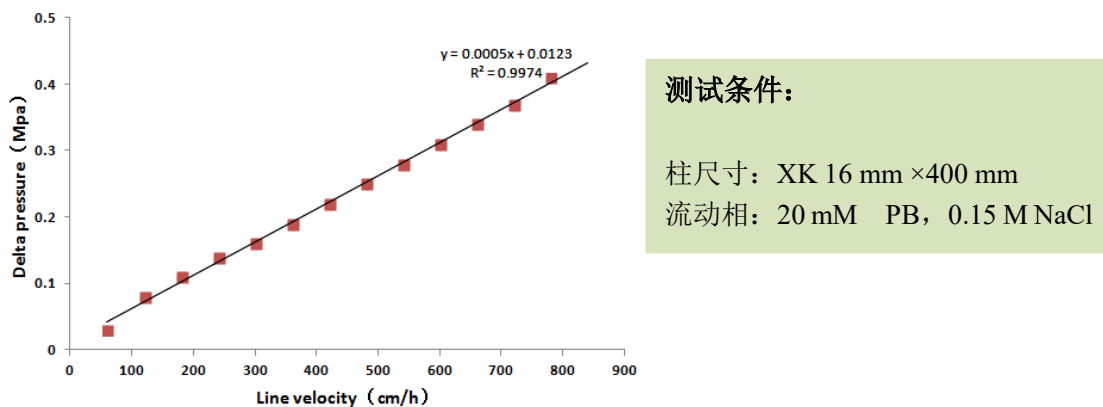


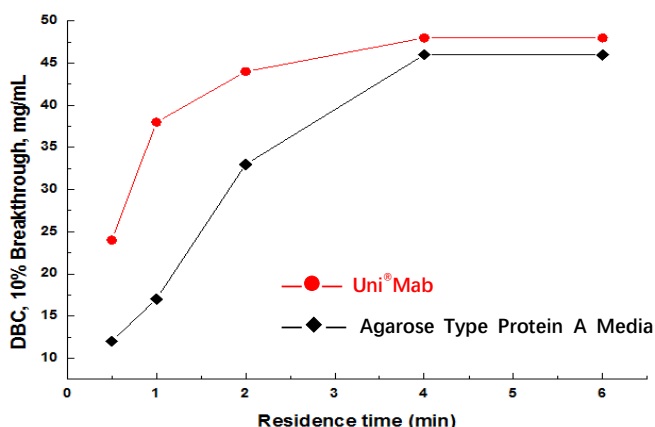
图3.2 UniMab®压力相对流速曲线

注：UniMab 匀浆装柱和柱压检测使用的缓冲液均为 20 mM PB，0.15 M NaCl，压缩系数为 1.1，柱床高度为 250 mm。

3.3 超高的结合载量

在高流速情况下，纳微科技 Protein A 层析介质的结合载量显著高于传统琼脂糖基质，

在 4-6 min 驻留时间下，动态结合载量也超过了琼脂糖类介质。



测试条件:

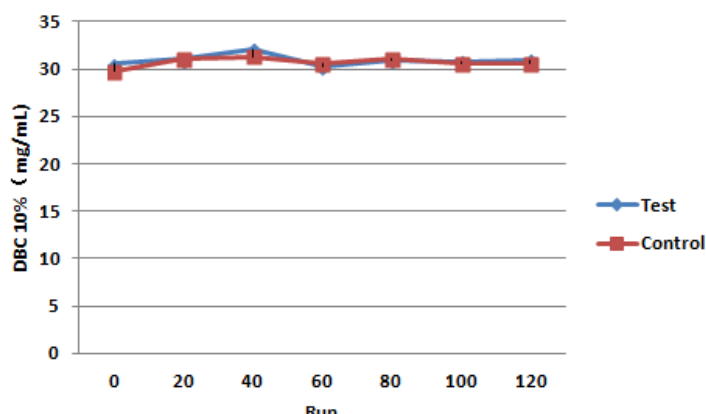
柱尺寸: 7 mm × 25 mm
 样品: Human IgG, 2 mg/mL
 平衡: 20 mM PBS, pH 7.0, 0.15 M NaCl
 洗脱: 0.1 M Glycine, pH 3.0

图 3.3 UniMab®与国际知名厂商 Protein A 亲和介质载量对比

3.4 更卓越的耐碱性和化学稳定性

纳微科技Protein A亲和层析介质在pH 3-12范围内均可正常使用，在位清洗可用0.1 M-0.5 M NaOH，用0.5 M NaOH 120次CIP（Clean-In-Place）循环清洗实验之后，IgG动态吸附载量仍然保持不变。

测试组为UniMab柱每次处理走20个上述循环，Control为不做任何处理的UniMab柱。实验条件：Binding Buffer: 20 mM PB + 150 mM NaCl pH7.0；Elution Buffer: 20 mM Citric Acid pH3.0；CIP: 0.5M NaOH；Size:1 mL PP。



淋洗: 10 CV Binding Buffer
 洗脱: 6 CV Elution Buffer
 平衡: 3 CV Binding Buffer
 CIP: 0.5 M NaOH, 15 min
 再平衡: 6 CV Binding Buffer
 流速: 1 mL/min (150cm/h)
 柱尺寸: 1mL PP Column (7*25 mm)

图 3.4 UniMab®键合耐碱性 rProtein A 耐受 0.5 M NaOH 清洗

3.5 更低的配基脱落风险

实验采用 0.5 M NaOH 进行 120 个循环的碱处理，并未造成层析介质 Protein A 配基脱落的增加，未造成动态载量明显下降。

表 3.5 Protein A 碱洗脱落情况测定结果

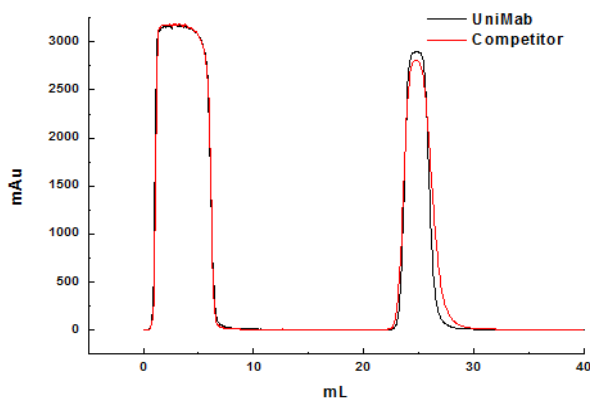
循环次数	Control (ppm)	Test (ppm)
60 循环	0.45	0.41
80 循环	0.35	0.36
100 循环	0.33	0.415
120 循环	0.385	0.445

注：Control 柱与 Test 柱脱落 Protein A 配对 t 检验， $p=0.62$ ，无统计学差异。

4. 细胞培养液单克隆抗体(mAb)捕获应用

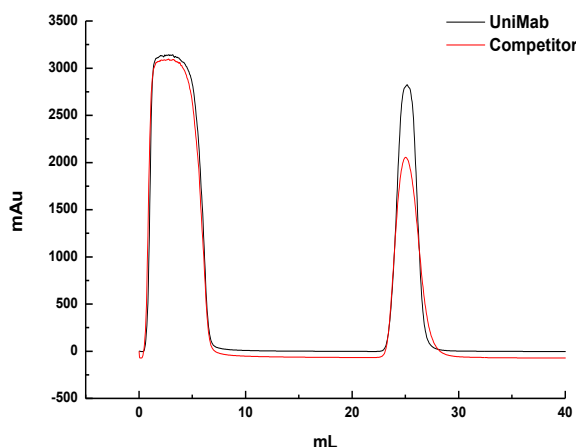
下面是纳微科技UniMab® Protein A亲和介质在捕获细胞培养液中单克隆抗体与国际某知名品牌的MabSelect SuRe介质的性能对比。实验表明，纳微科技UniMab®具有卓越的单克隆抗体的亲和捕获能力，性能可以跟该国际品牌媲美。

实验条件：Binding Buffer: 10 mM PB, pH 6.0; Elution Buffer: 20 mM CB, pH 3.4.



测试条件:

仪器: AKTA purifier
 柱尺寸: 7 mm × 25 mm
 样品: 单克隆抗体细胞培养液上清, 5 mL
 淋洗: 15 CV Binding Buffer
 洗脱: 10 CV Elution Buffer
 再平衡: 15 CV Binding Buffer
 驻留时间: 4 min


测试条件:

仪器: AKTA purifier
 柱尺寸: 7 mm × 25 mm
 样品: 单克隆抗体细胞培养液上清, 5 mL
 淋洗: 15 CV Binding Buffer
 洗脱: 10 CV Elution Buffer
 再平衡: 15 CV Binding Buffer
 驻留时间: 0.5 min

图 4.1 UniMab®与 MabSelect SuRe 对细胞培养液中单克隆抗体纯化分离性能对比

表4.1 UniMab®与MabSelect SuRe介质捕获mAb的回收率情况

名称	驻留时间 (min)	上样体积 (mL)	上样量 (mg)	回收量 (mg/mL)	回收率 (%)
UniMab	0.5	5	33.5	23.2	69.3
	2	5	33.5	26.8	79.9
	4	5	33.5	31.8	94.9
MabSelect Sure	0.5	5	33.5	19.8	59.0
	2	5	33.5	26.6	79.3
	4	5	33.5	31.8	94.9

在高流速条件下(驻留时间<2 min), UniMab 的捕获效率高于 MabSelect SuRe; 在低流速条件下(驻留时间>2 min), UniMab 捕获效率与 MabSelect SuRe 相当。

5. 储存

暂时不使用的层析介质需保存在 4 ~ 35°C 的 20%乙醇中, 并盖紧瓶盖, 已经装好层析柱应保存在含 20%乙醇的缓冲液(pH 7.0)中。

6. 故障排除

如果您在使用 Protein A 亲和层析产品遇到任何问题，请参考下表进行解决或联系苏州纳微科技有限公司。

表 6 Protein A 亲和柱的常见问题及故障排除

可能遇到的情况	原因分析	建议措施
柱压升高	流速过高	降低流速
	泵和收集器之间的阀门未打开	打开出口
	仪器的滤膜堵塞	去除杂质并清洗，或者替换，在使用前对样品和洗脱液用 0.45 μ m 或 0.2 μ m 进行过滤
	柱前堵塞	使用 20BV 流动相反冲色谱柱
	样品在柱子上发生沉淀	遵循清洗步骤，调节洗脱液来维持样品溶剂度
	样品较脏，或一些吸附作用较强的物质留在介质上	执行在位清洗操作（参考再生条件）
	柱床被压缩	重新填充柱子
	色谱柱使用时间过长	更换色谱柱或更换层析介质
样品吸附不够充分	样品溶液中离子强度太高	降低样品溶液中的离子强度，如可采用稀释或脱盐等手段
	样品的 pH 不合适	调节 pH 增加结合
样品在洗脱过程中不被洗脱	洗脱液的离子强度过低	增加洗脱液的浓度
	洗脱液的洗脱能力过低	更换洗脱能力更强的洗脱液
	洗脱液的 pH 不合适	调整洗脱液的 pH
	色谱柱有残留疏水性较强的杂质	执行在位清洗操作（参考“再生条件”）
分辨率降低	不合适的洗脱条件，如梯度过陡或流速过高	改变洗脱条件，采用较缓的梯度洗脱或等度洗脱，降低流速
	柱子未装填好	重新装柱
	在柱子顶端或柱后有大部分的混合空间	加高介质的上表面或减少柱子后体积
	柱子过载	清洗并重新平衡色谱柱，降低上样量
	粒径较大	更换同种类型粒径更小的介质
	选择性差	更换其他类型介质
进样若干次后对样品的吸附能力降低	样品中的杂质结合在介质上，干扰了正常的结合	执行在位清洗操作（参考“再生条件”）
使用中柱床出现裂痕	溶胀未充分消除	用 0.5 M NaCl 混合均匀，充分平衡
	溶液中有气泡	减压过滤除气
	外部空气进入系统	加入更多缓冲液，将气体充分赶出
基线漂移	色谱柱未平衡好	增加平衡时间
	洗脱液 A, B 在同一紫外波长下吸收系数不同	使用不同的波长或走没有样品的空白梯度
	洗脱液不纯	使用高纯度的 HPLC 级试剂

可能遇到的情况	原因分析	建议措施
出现不明杂峰	前一个样品的不完全洗脱	洗脱色谱柱
	洗脱液不纯	运行没有样品的空白梯度对照, 或使用高纯度的 HPLC 级别试剂
	痕量离子性杂质结合在色谱柱上, 在平衡和上样过程中被浓缩, 洗脱时出峰	清洗色谱柱 (参考“再生条件”) 或采取适当方法将结合在色谱柱上的杂质洗脱下来
	不稳定的非重现性的不明杂峰	与仪器的稳定性有关

7. 订购信息

Protein A 亲和层析介质

规格型号	包装体积/货号信息				
	25mL	200mL	1L	5L	10L
UniMab-50um	UMB5025	UMB50200	UMB501L	UMB505L	UMB5010L
NanoMab-15um	UMB1525	UMB15200	UMB151L	UMB155L	UMB1510L

Protein A 亲和层析预装柱

规格型号	预装制备柱		分析柱	
	7*25mm	16*25mm	2.1*50mm	4.6*50mm
UniMab-50um	UMB5019	UMB5020		
NanoMab-15um			NMB151	NMB152

全国服务热线 : 400-828-1622

苏州纳微科技有限公司 (Suzhou Nanomicro Technology, Co., Ltd)

地址 : 苏州工业园区百川街 2 号 · 江苏 · 中国

售后邮箱 : info@nanomicrotech.com

中文官网 : www.nanomicrotech.com

English Website : www.nanomicro-technology.com

