
NMab[®] Pro

Protein A 亲和层析介质

产品使用说明书

文件编号：NM-W-DF-0603

版本号：A3



NMab[®] Pro

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。

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，在 NMab[®] Protein A 的基础上成功开发出比其具有更高载量的 NMab[®] Pro Protein A 亲和层析介质。除了高载量外，NMab[®] Pro 延续了其优良的结合特异性、耐碱性以及压力-流速特性，是抗体客户降低单抗纯化成本适合的选择。

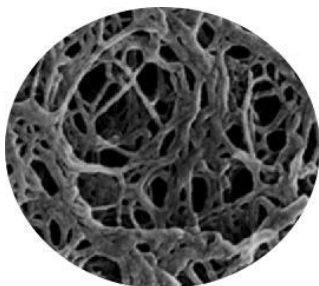


图 1. NMab[®] Pro Protein A 亲和层析介质电镜图。

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 60-80 mg/mL；
- (b) 耐碱性强：0.5 M NaOH 浸泡下 24 小时载量只下降 20%；
- (c) 配基脱落低：小于 20 ppm；
- (d) 宿主蛋白（HCP）残留低：一般在 1000 ppm 以内，表现不亚于 Prism A；
- (e) 回收率高：大于 90%；
- (f) 纯度高：亲和洗脱液纯度 99% 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[®] Pro Protein A 亲和层析介质技术参数

产品型号	NMab [®] Pro
分离原理	Protein A 亲和捕获
基质	琼脂糖
粒径	69 μm
配基键合方式	环氧键合
动态结合载量*	≥65 mg·mL ⁻¹ (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

不同流速下压力变化如下，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。

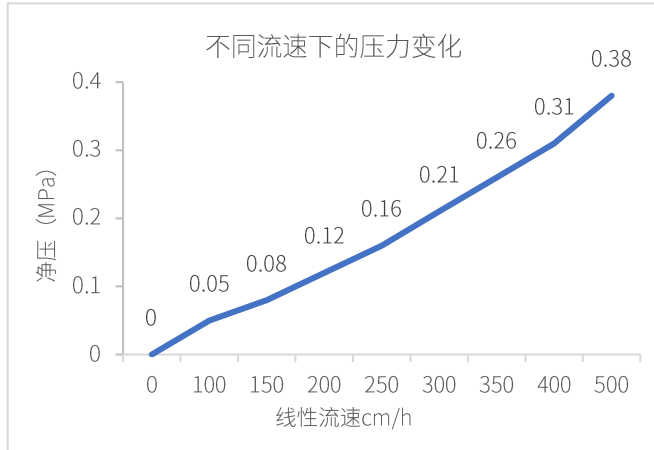
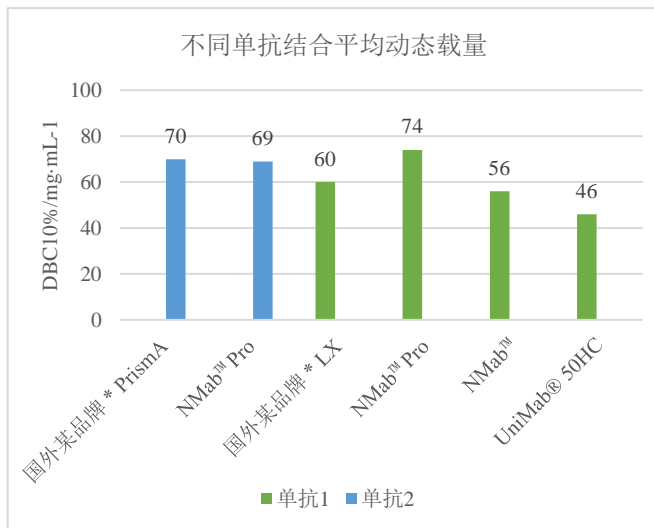


图 2. NAb® Pro 介质压力流速变化示意图。测试柱型：ID: 200 H: 18cm; 流动相：0.5M 氯化钠溶液。

单抗载量

对多款单抗料液上样测试显示，NAb® Pro 的动态载量（10%流穿，驻留时间 5 min）均值在 70mg/mL 左右，在单抗 1 上显示，NAb® Pro 比 UniMab 50HC、NAb® 载量高；与某国外某品牌* LX 载量高，性能表现优良。在单抗 2 上显示，NAb® Pro 与某国外某品牌 Prisma 相近。



双抗载量

在某双抗料液测试显示，NAb® Pro 的动态载量（10%流穿，驻留时间 5 min）在 41.52 mg/mL，高载量表现优良；与某国外品牌 Prisma 相近。

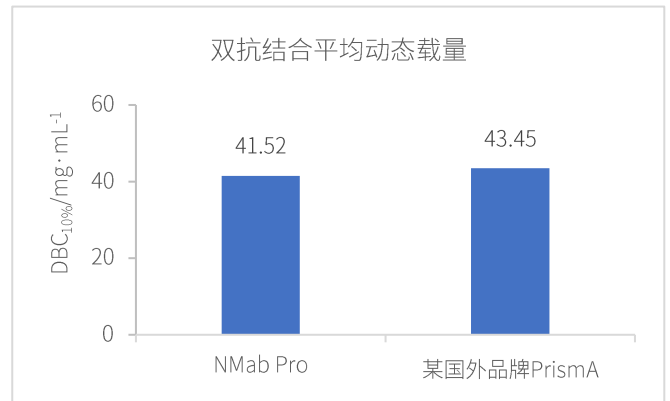


图 4. 纳微科技 NAb® Pro 介质动态载量对比示意图

静态耐碱性测试

25°C 条件下，测试 NAb® Pro 的载量，将填料浸泡在 0.5 M 的 NaOH 溶液中 24 小时，测试泡碱后 NAb® Pro 的载量，详见下表 2：

表 2. 24h 耐碱性测试表。

泡碱前载量 (mg/mL)	泡碱后载量 (mg/mL)	载量下降百分比 (%)
66.04	52.61	20.33

动态载量验证数据

如图 5 所示，用 0.5M NaOH 在位清洗，每个循环中 CIP 碱接触时间 15min，测试 NAb® Pro 的载量；经 160 循环清洗后 NAb® Pro 动态载量下降 26.57%。

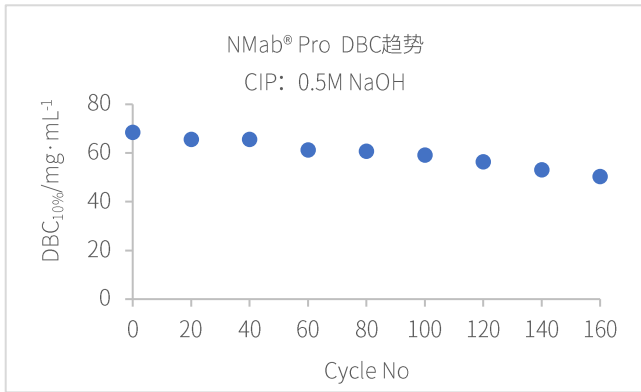


图 5. 单抗 HCCF 的耐碱 DBC 数据。

细胞培养液单克隆抗体(mAb)捕获应用对比

下面是纳微科技 NAb® Pro 亲和介质在捕获细胞培养液中单克隆抗体的洗脱体积、回收率、HCP 及 PorA 的性能评价，以 PrismA 作为对照。实验表明，纳微科技 NAb® Pro 具有卓越的单克隆抗体的亲和捕获能力，与某国际知名蛋白 A 层析介质 PrismA 接近。

表 3. 实验条件表。

设备	Avant (NM-BD-003)
柱子	1.1mL MILLIPORE 柱
样品	单克隆抗体上清培养液
平衡液	20 mM PB+150 mM NaCl, pH7.4
洗脱液	20 mM NaAc-HAc pH3.6
驻留时间	5 min

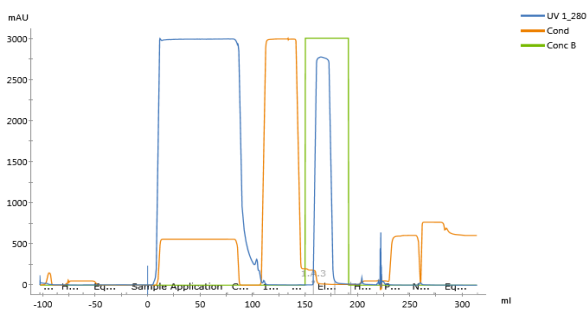


图 6. PrismA 在细胞培养液中单克隆抗体纯化分离性能。

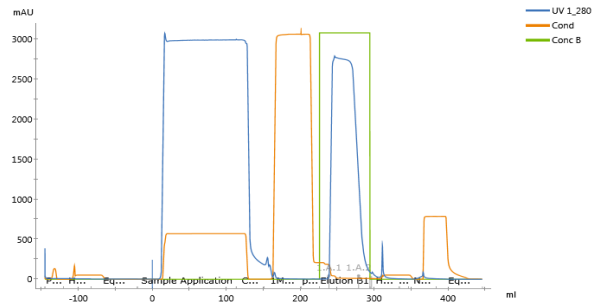


图 7. NAb® Pro 在细胞培养液中单克隆抗体纯化分离性能

表 4. 纳微科技 NAb® Pro 介质结果对比表。

层析介质	洗脱体积 (mL)	回收率 (%)	HCP (ppm)	ProA (ppm)
NAb® Pro	3.1	99.2%	354.8	13.0
PrismA	2.5	98.8%	500.2	6.0

操作指南

匀浆浓度测定

NAb® Pro 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 10mL 匀浆到量筒里静置过夜，读出沉降体积 Vr，计算匀浆浓度：

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

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) :

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

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。

$$\text{Eq. 3 } Vs = 100 \times (Vc \times CF)/Cs$$

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 V_s 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)。

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

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. NAb®Pro 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

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 NAb® Pro 柱；

进样：

样品的上样量不超过介质 $DBC_{10\%}$ 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 N Mab® Pro 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
	仪器的在线过滤器堵塞	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	打开出口
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 ₃ PO ₄ ，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® Pro	30 mL	17013-070100-2030
	50 mL	17013-070100-2050
	100 mL	17013-070100-2100
	300 mL	17013-070100-2300
	500 mL	17013-070100-2500
	1 L	17013-070100-1001
	5 L	17013-070100-1005
	10 L	17013-070100-1010
	50 L	17013-070100-1050
	100 L	17013-070100-1100

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

