



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：A2

NMab™ Pro 层析介 质

使用说明

产品简介

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的最佳选择。

下表 1 是 NMab™ Pro Protein A 层析介质的基本性质参数。

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；

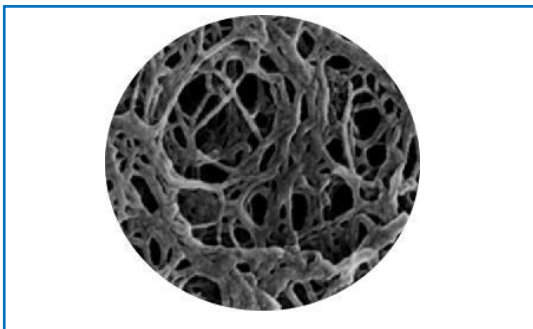


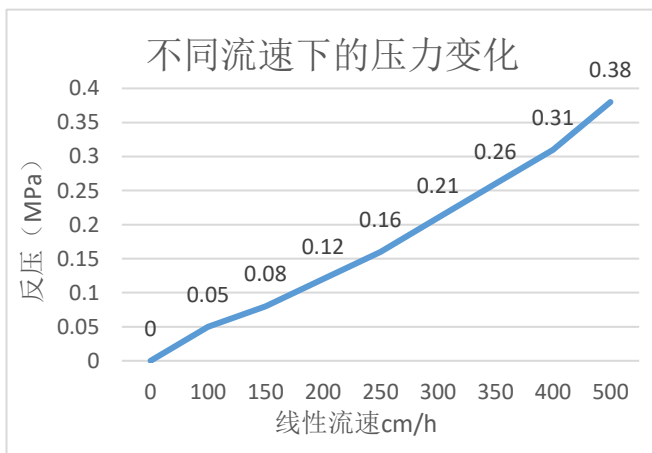
图 1. NMab™ Pro Protein A 亲和层析介质电镜图

表1. 纳微科技NMaTM Pro Protein A亲和层析介质技术参数

产品名称	NMa TM Pro Protein A
分离原理	Protein A 亲和捕获
基质	琼脂糖
配基	重组蛋白 A
配基键合化学方式	环氧键合
粒径	69 μm
动态载量 (4 min 驻留时间)	≥65 mg/mL
配基脱落	~ 20 ng/mL
耐受压力	≤ 0.3 MPa
CIP 在位清洗条件	0.1-0.5 M 氢氧化钠

压力流速曲线测试

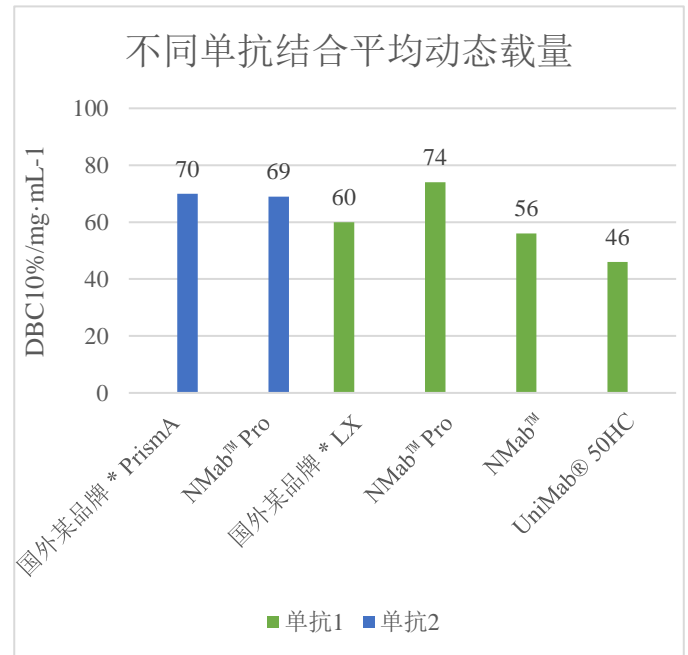
不同流速下压力变化如下，此压力-流速特性可满足工业生产上对填料流速要求，优于传统 4FF/6FF 软胶系列填料。


图 2. 纳微科技 NMaTMPro 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。

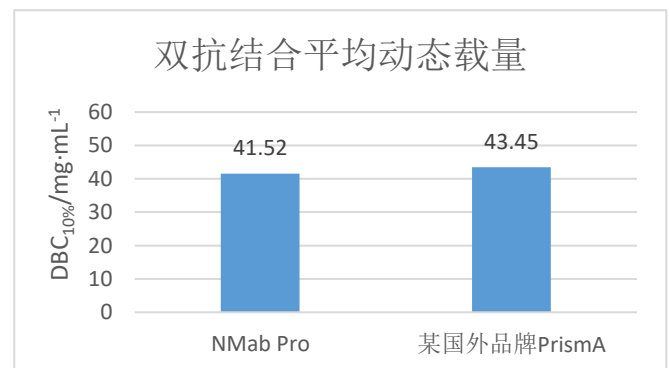
单抗载量

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


图 3. 纳微科技 NMaTM Pro 介质动态载量对比示意图

双抗载量

在某双抗料液测试显示，NMaTMPro 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 NMaTM Pro 介质动态载量对比示意图

静态耐碱性测试

25℃条件下，测试 NMab™ 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 NMab™ Pro 的载量，详见下表：

表2. 24h 耐碱性测试表

产品名称	泡碱前载量 (mg/mL)	泡碱后载量 (mg/mL)	载量下降百分比 (%)
NMab™ Pro	66.04	52.61	20.33

动态载量验证数据

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

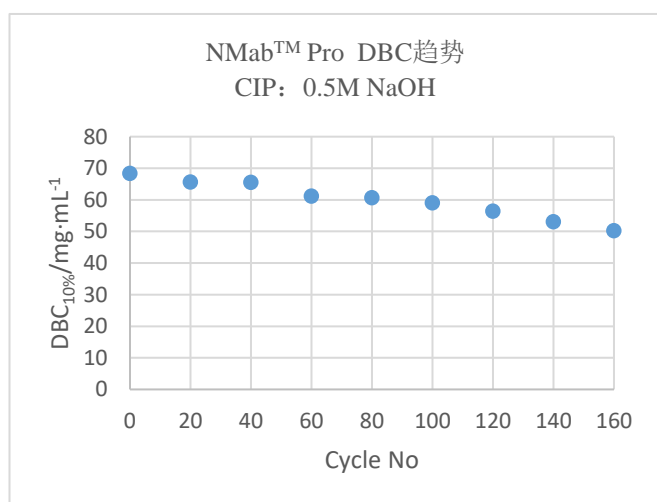


图 5. 某单抗 HCCF 的耐碱 DBC 数据

细胞培养液单克隆抗体(mAb)捕获应用对比

下面是纳微科技 NMab™ 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 PrismaA 作为对照。实验表明，纳微科技 NMab™ 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 PrismaA 接近。

实验条件：

仪器：AKTA Avant150

层析柱：1.1mL MILLIPORE 柱

样品：单克隆抗体上清培养液

平衡：20 mM PBS pH7.4

洗脱液：20 mM NaAc-HAc pH3.6

驻留时间：5 min

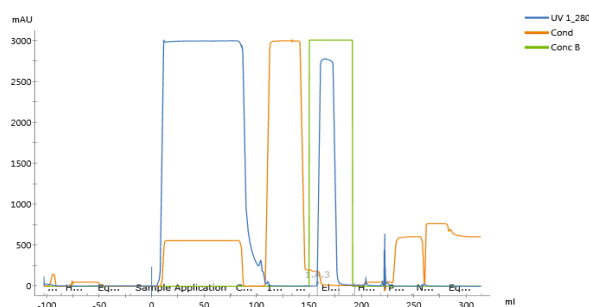


图 6. PrismaA 在细胞培养液中单克隆抗体纯化分离性能

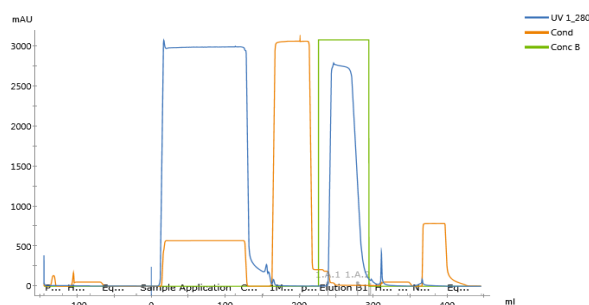


图 7. NMab™ Pro 在细胞培养液中单克隆抗体纯化分离性能

表3. 纳微科技NMab™ Pro介质结果对比表

填料	洗脱体 积 (mL)	回收 率(%)	HCP (ppm)	ProA (ppm)
NMab™ Pro	3.1	99.2%	354.8	13.0
PrismA	2.5	98.8%	500.2	6.0

纯化操作步骤

层析柱装填

匀浆液的浓度是指层析介质沉降于恒定体积时的体积与匀浆液的总体积的比值。为了获取最佳的装柱效果，我们推荐纯水匀浆，匀浆液浓度为 50~70%。具体装柱方法如下：

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

* V_c : 色谱柱柱体积; h : 色谱柱高度; r : 色谱柱半径。

2) 在原容器中轻轻搅动层析介质，使其完全分散在液体中形成匀浆液。量取所需原液体积*；

*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，一般为柱体积的 1.15-1.2 倍左右。

3) 将所需的层析介质转移至适当容器，自然沉降后，倾斜倒去上清液。

4) 装柱前，并用 3 倍柱体积纯水置换溶剂或在柱内置换溶剂*。

*纳微科技的层析介质保存在 20% 乙醇溶液。

5) 调整匀浆液浓度 50-70% (体积比)。

6) 在建议的压力范围内使用泵装柱，推荐先低流速恒流装柱再高流速恒压装柱。然后记录下胶面位置，停泵后将活塞移动到该位置，再向下压 5 mm。

柱效评价

色谱柱装填好后，用去离子水或 0.5 M NaCl 以

50~200 cm/h 流速平衡并进行柱效测试。具体测试参数详见下表：

表 4. NMab™ Pro 层析色谱柱的柱效测试

样品	5% (v/v) 丙酮的水溶液/2 M NaCl
上样量	1%~5% 柱体积
流动相	去离子水/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 11

预装柱使用方法*

1) **冲洗并平衡**: 使用之前用平衡缓冲液替换层析柱中 20% 乙醇保存液；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 NMab™ Pro 柱；

2) **进样**: 样品为抗体发酵液，按照 DBC 流穿 10% 的 0.8 倍以下载量；

3) **清洗**: 采用平衡液 (如 20 mM PBS, 150 mM NaCl, pH=7.0) 清洗 5 CVs；

4) **洗脱**: 采用柠檬酸、醋酸或甘氨酸 (如 100 mM Gly, pH=3.0) 等作为洗脱液清洗 5 CVs 至基线平衡；

5) **Strip**: 1 M 醋酸清洗 5 CVs；

6) **SIP/CIP**: 0.1 - 0.5 M NaOH 溶液清洗 3 - 5 CVs；pH=7.0) 清洗 5 CVs 至基线平衡；

7) **再平衡**: 采用平衡液 (如 20 mM PBS, 150 mM NaCl, pH=7.0) 清洗 5 CVs 至基线平衡；

8) **保存**: 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: 使用过程中，所用样品及流动相均必须用孔径为 0.45 μ m 滤膜过滤。

再生方法

先用 20 mM 的 pH 为 7.3 的 PB 溶液洗 3-5 个 CV，再用 0.1 M - 0.5 M NaOH 溶液在位清洗 3-5 CV，再用缓冲液洗掉碱液后，用缓冲液平衡柱子即可。

全国咨询热线：400-828-1622

中文网站：www.nanomicrotech.com

英文网站：www.nanomicro-technology.com

邮箱：info@nanomicrotech.com

总部地址：苏州工业园区百川街 2 号 215123

储存

使用后的层析介质或预装柱再生完全后，密封保存在 20 % 乙醇或 2% 苯甲醇中，建议保存温度为 2~8 °C。

未使用的层析介质或预装柱，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：介质有效保质期为 2 年。



2021 版

订购信息

NMab™ Pro 亲和层析介质

产品型号	包装	货号
NMab™ Pro	30 mL	17013-070100-2030
	100 mL	17013-070100-2100
	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：NMab™ Pro 还可以提供 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。