



# NMab™ 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：A1

# NMab™ 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。

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®。UniMab®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

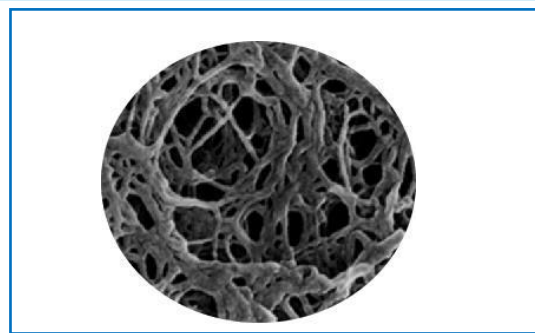


图 1. NMab™ Protein A 亲和层析介质电镜图

配基技术，成功开发出比 UniMab®具有更高载量的 NMab™ Protein A 亲和层析介质。除了高载量外，NMab™ 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。

下表 1 是 NMab™ 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 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™ Protein A亲和层析介质技术参数

产品名称	NMab™ 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	90 μm

续上表。

动态载量 (5 min 驻留时间)	≥55 mg/mL (4min 驻留时间)
配基脱落	< 10 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

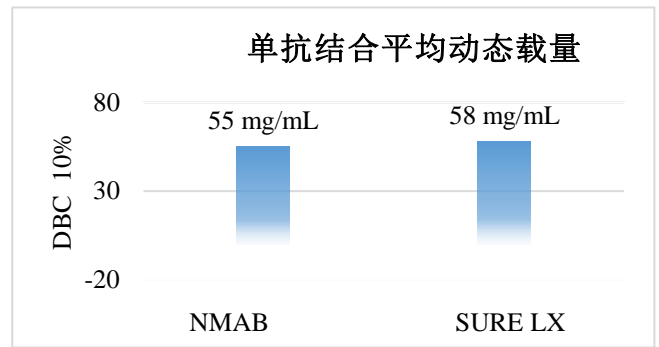


图 3. 纳微科技 NMab™ 介质动态载量对比示意图

## 配基脱落

在多个单抗项目上纳微科技的 NMab™ Protein A 配基脱落均小于 10 ppm。

单抗项目	配基脱落 (ppm)
A	5.06
B	0.68

## 压力流速曲线测试

压力对比测试结果如下, 300 cm/h 条件下 NMab™ 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。

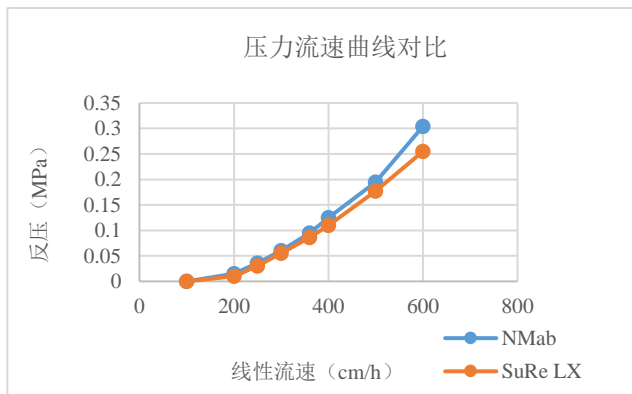


图 2. 纳微科技 NMab™ 介质压力流速曲线对比示意图

测试柱型: XK16, H14.5 cm; 流动相: 0.5M 氯化钠溶液。

蓝色为纳微科技 NMab™ Protein A 介质, 红色为知名品牌 SuRe LX 填料。

## 载量

对多款单抗料液上样测试显示, NMab™ 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。

## 宿主蛋白残留

在多个单抗纯化项目上, NMab™ 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。

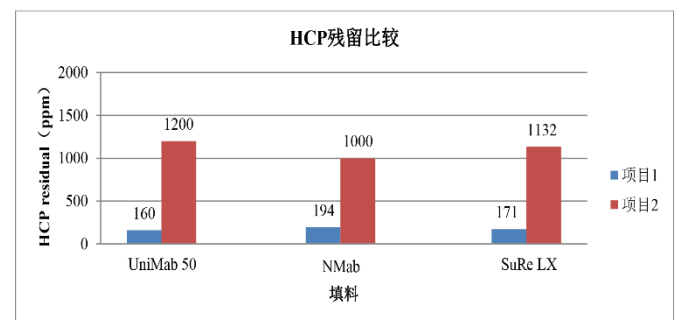


图 4. 纳微科技 NMab™ 介质宿主蛋白残留对比示意图

## 耐碱性考察

在恒 25 摄氏度下, 将填料用 0.5 M 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。

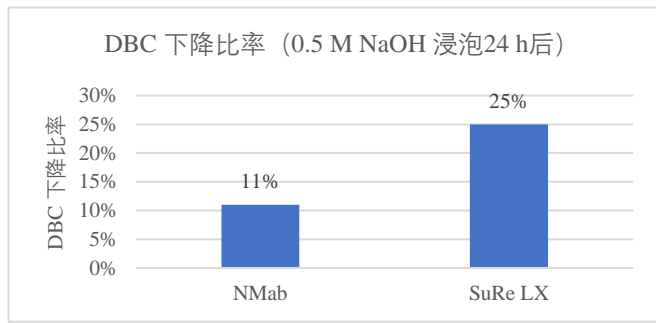


图 5. 纳微科技 NMab™ 耐碱性对比示意图

## 寿命周期

测试 NMab 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。

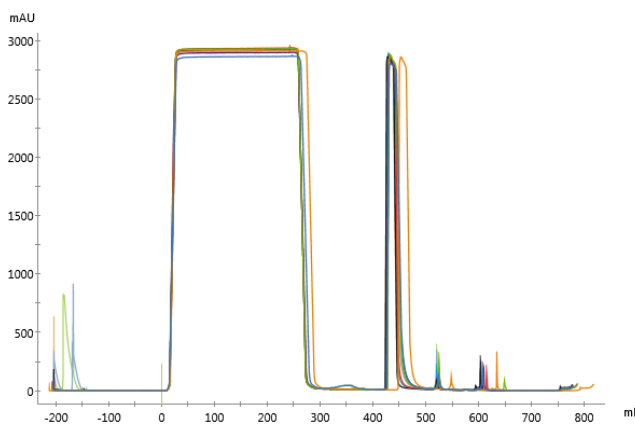


图 6. NMab™ 寿命每 10 次数据叠加图 UV280

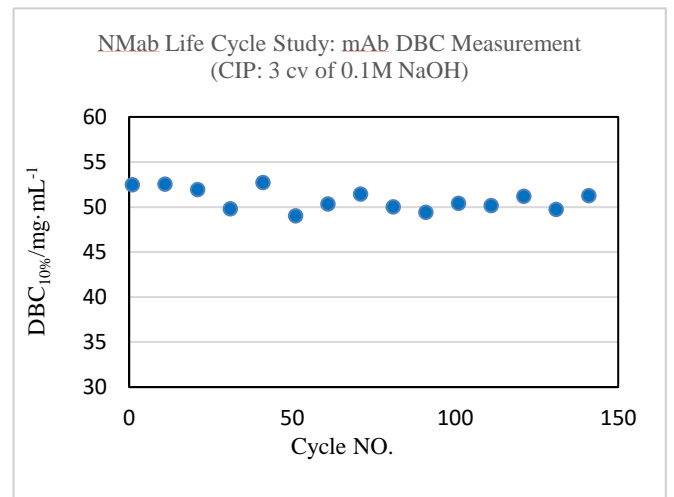


图 7. NMab™ 寿命测试 DBC<sub>10%</sub>趋势

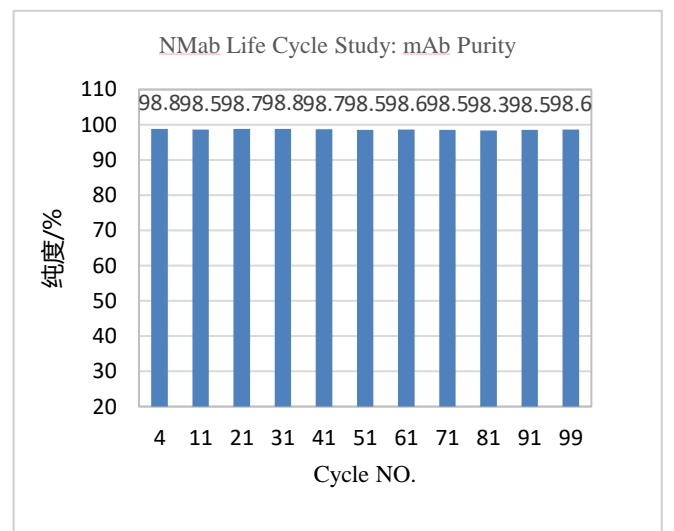


图 8. NMab™ 寿命测试洗脱样品纯度检测数据

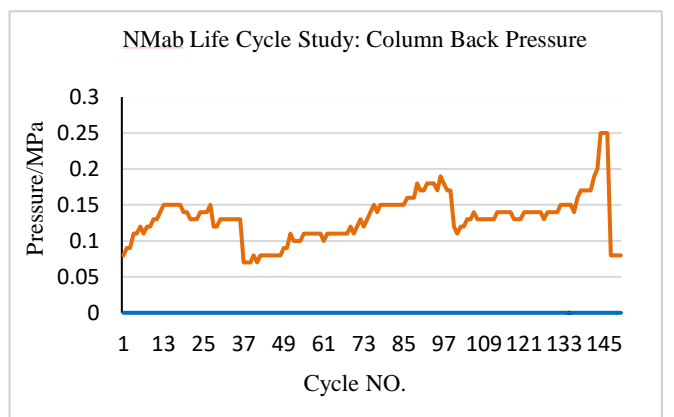


图 9. NMab™ 寿命测试柱压数据

## 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。

## 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 2 NMab™ 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 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；

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  $\mu\text{m}$  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 0.5 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。



2021 年版

## 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。

## 订购信息

### NMab™ 亲和层析介质

产品型号	包装	货号
NMab™	30 mL	17013-090100-2030
	100 mL	17013-090100-2100
	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

### 苏州纳微科技股份有限公司

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