



# UniMab® 50 亲和层析介质

## 产品使用说明书

文件编号：NM-W-DF-0301

版本号：A2

# UniMab® 50 层析介质

## 使用说明

### 产品简介

在全球医药市场上，抗体药物已连续多年占据销售榜单前几位，其市场竞争也日趋白热化。降低抗体生产成本是增强市场竞争力的关键因素。而解决抗体的生产瓶颈关键主要在于改进第一步 Protein A 亲和捕获。为了满足抗体生产企业对亲和层析介质机械强度高、反压低、化学稳定性好和耐碱性强，以及在高流速下仍然保持较高动态吸附载量的需求我们开发了 UniMab® Protein A 亲和层析介质。

UniMab® 50 是纳微科技利用自主专利技术生产的高性能、耐碱型重组 Protein A 亲和层析介质，该填料以单分散多孔型聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）微球为基质，利用专有的表面修饰技术并环氧偶联键合 Protein A 制得，适用于单克隆抗体及含有 Fc 片段的重组蛋白类生物大分子的分离纯化。UniMab® 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，能满足从实验室制备到中试及工业化生产的各种需求。



图 1. UniMab® 50 亲和层析介质

全新一代的 UniMab® Protein A 亲和层析介质作为抗体纯化层析介质，在高流速下仍能保持较高动态吸附载量，是大规模单克隆抗体及含 Fc 片段重组蛋白亲和纯化的理想选择，有助于降低企业生产成本，相较市场同类产品有如下独特优势：

- (a) 耐受 0.1 到 0.5 M NaOH 清洗，寿命长、生产成本低；
- (b) 单分散均一粒径高强度亲水基质，允许更大操作压力和线性流速；
- (c) 采用耐碱 rProtein A 与独特固定键合技术，更低配基脱落、更强耐碱性；
- (d) 高流速下具有 50 mg/mL (human IgG) 高载量，显著优于同类产品，更高的全程载量和更低的非特异性吸附，可以提高生产效率；

(e) 最高流速 (~800 cm/h) 和耐受压力 (~0.8 MPa), 显著高于同类产品;

(f) 不同抗体洗脱条件均一, 抗体纯化工艺平台的理想选择。

表 1. 纳微科技 Protein A 亲和层析介质技术参数

产品名称	UniMab® 50
分离原理	Protein A 亲和捕获
基质	聚甲基丙烯酸酯 (PMMA)
配基	耐碱 rProteinA
粒径	50 μm
每毫升填料结合载量*	~ 40 mg/mL (4min 驻留时间)
纯化阶段	捕获
最大耐受压力	116 psi (8 bar, 0.8 MPa)
最高流速	800 cm/h
pH 稳定性	2-12
CIP	0.1-0.5 M NaOH
使用温度	4-40 °C
存储	20% 乙醇, 2-8 °C
典型应用	适合大规模抗体和免疫蛋白等纯化生产、比如单克隆抗体药物生产级制备

表 2. 纳微科技 Protein A 亲和层析预装柱技术参数

参数规格	UniMab® 预装柱
柱材质	Polypropylene (PP)
规格 (mm × mm)	7.7 × 22、16 × 25、7.7 × 100
动态载量*	~ 40 mg/mL Gel
推荐流速	0.25 - 1.0 mL/min 或
最大操作压力	72.5 psi (5 bar, 0.5 MPa)

\*每毫升结合载量为 human poly IgG, 4 min 驻留时间

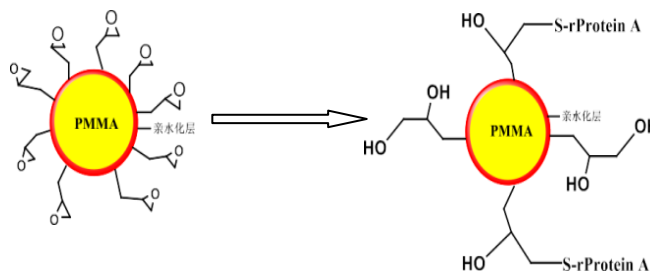


图 2. 纳微科技 UniMab®50 亲和介质的制备示意图

## UniMab® 溶剂兼容性测试

25 °C 条件下, 将填料浸泡在不同浓度和不同种类的试剂中 24 小时后, 比较浸泡前后填料对 IgG 的静态结合能力 (≥ 95% 以上为符合要求) 来评价填料与溶剂的兼容性, 相关兼容试剂种类和浓度结果详见下表:

表 4. 相关兼容试剂种类和浓度结果

名称	浓度	试剂名称	浓度
苯甲醇	2 %	异丙醇	30 %
乙酸钠	1 M	柠檬酸钠	1 M
氯化钠	4 M	聚乙二醇	5 %
乙二胺四乙酸二钠盐	100 mM	聚乙二醇 (分子量 1500)	1 %
乙酸	1 M	氢氧化钠	0.1 M
乙醇	100 %	吐温 80	1 %
丙酮	2.5 %	吐温 20	1 %
盐酸胍	6 M	蔗糖	1 M
甘氨酸	1 M	正丙醇	5 %
尿素	6 M	TritonX-100	1 %

## UniMab® 稳定性测试

### 化学稳定性测试

50 °C 环境温度下，将 UniMab® 50 填料浸泡在不同 pH 值 (pH=1~14) 的溶液中，储存达 24 小时后，

通过测试其浸泡液中 TOC 值来表征化学稳定性，详见下表：

表 5. pH 稳定性测试表

不同 pH 值浸泡溶剂	TOC (PPM)
pH=1: 100 mM HCl	197.2
pH=2: 10 mM HCl	96.5
pH=3: 1 mM HCl	41.7
pH=4: 0.1 mM HCl	37.6
pH=7: 超纯水	36.3
pH=10: 20 mM 硼酸 (NaOH 调)	96.3
pH=11: 20 mM 硼酸 (NaOH 调)	125.5
pH=12: 10 mM NaOH	154.8
pH=13: 100 mM NaOH	979.5
pH=14: 1 M NaOH	3069

### 温度稳定性测试

将 UniMab® 50 填料置于 40 °C 加热恒温箱中，分别以 20 % 乙醇和 2 % 苯甲醇两种浸泡方式储存达 4 周，每周测一次填料的 IgG 的动态载量来表征其稳定性，下表为三批填料在两种不同浸泡液储存下的动态载量变化情况 (动态载量单位: mg/mL Gel (5 min 驻留时间))。

表 6. 温度稳定性测试表

测试周期	IgG 动态载量 (20%乙醇浸泡储存)		
	NO.1	NO.2	NO.3
初始条件	39.8	39.6	39.4
第一周	40.1	39.6	39.6
第二周	39.9	39.2	39.4
第三周	39.5	39.6	39.0
第四周	39.6	39.0	39.2

## UniMab® 溶剂残留测试

采用适当溶剂对 UniMab® 50 填料在生产过程中所含残留溶剂进行提取和浓缩，并检测得到其溶剂残留数据如下表所示：

表 7. 溶剂残留测试表

溶剂	控制要求
DMF	≤ 5 PPM
乙醇	无限制

## 细胞培养液单克隆抗体(mAb)捕获应用

下面是纳微科技 UniMab®50 亲和介质在捕获细胞培养液中单克隆抗体的性能。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。

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

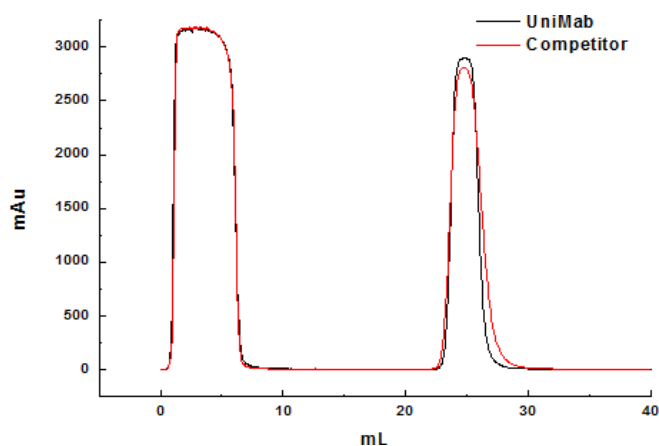


图 3. UniMab® 在细胞培养液中单克隆抗体纯化分离性能

表 8. UniMab®50 介质捕获 mAb 的回收率情况

驻留时间 (min)	上样体积 (mL)	上样量 (mL)	回收量 (mg/mL)	回收率 (%)
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

## 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至恒定体积时的体积与匀浆的总体积的比值。为了得到最佳的 Protein A 亲和层析介质的装柱效果，我们推荐 0.5 M NaCl 浸泡层析介质，再用 0.5 M NaCl 溶液进行匀浆，匀浆浓度为 50~70%。具体装柱方法如下：

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

$V_c$ : 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 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，推荐量取介质的体积过量一些，一般为柱体积的 1.1 倍左右。

3) 置换介质中 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 50~70%；将匀浆一次性倒入层析柱。

5) 压柱采用恒流加恒压模式，恒流为 60 cm/h, 30 min 以上；恒压采用 0.3 Mpa 左右，30 min，待胶面稳定后，将柱头下降至胶面刻度线处 2-3 mm 处即可；

6) 按照 SOP 进行柱效和对称性的测定，(As: 0.8-1.5, Plates: >2500) 须达到预定标准。

### 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 3. 柱效评价参数表

样品	2 M NaCl 溶液
上样量	1~5 % 柱体积
流动相	0.5 M NaCl 溶液
线性流速	100 cm/h
检测	2 M NaCl 上样：电导检测仪

### 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 UniMab® 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 PB, pH 7.3 的溶液洗 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。

## 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  $^{\circ}\text{C}$ 。

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。*

## 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我们。

### 1、柱压升高

原因分析	建议措施
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
柱前堵塞	使用 20 BV 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
柱床被压缩	重新填装柱子
色谱柱使用过久	更换色谱柱或更换层析介
泵和收集器之间的阀门未	打开出口

## 2、样品吸附不够充分

原因分析	建议措施
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 增加结合强度

## 3、样品在洗脱过程中不被洗脱

原因分析	建议措施
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）

## 4、分辨率降低

原因分析	建议措施
------	------

柱子顶端或柱后有大部分死体积	加高填料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
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

## 5、进样若干次后对样品的吸附能力降低

原因分析	建议措施
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）

## 6、使用中柱床出现裂痕

原因分析	建议措施
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

## 7、基线漂移

原因分析	建议措施
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空白梯度
洗脱液不纯	使用高纯度的色谱纯级试剂

## 8. 出现不明杂峰

原因分析	建议措施
前一个样品的不完全洗脱	再生
洗脱液不纯	运行空白梯度对照或使用高纯度的色谱纯级试剂
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

## 订货信息

### UniMab® 50 亲和层析介质

产品型号	包装	货号
UniMab® 50	30 mL	17010-050100-2030
	100 mL	17010-050100-2100
	500 mL	17010-050100-2500
	1 L	17010-050100-1001

5L	17010-050100-1005
10 L	17010-050100-1010
50L	17010-050100-1050
100L	17010-050100-1100

注: UniMab® 50 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。

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](http://www.nanomicrotech.com)

英文网站: [www.nanomicro-technology.com](http://www.nanomicro-technology.com)

邮箱: [ifo@nanomicrotech.com](mailto:ifo@nanomicrotech.com)

总部地址: 苏州工业园区百川街 2 号 215123



2021 版