



# 高稳健蛋白 A 亲和填料

Robust protein A affinity resin

## 用户手册

# 目录

<b>1. 填料特性</b>	<b>04</b>
动态结合载量 DBC	05
耐碱稳定性	05
<hr/>	
<b>2. 建议操作条件</b>	<b>06</b>
缓冲液选择	06
筛选层析过程	06
优化建议	07
<hr/>	
<b>3. 层析柱装填</b>	<b>08</b>
3.1 装柱参数	08
3.2 装柱准备	09
所需材料	09
设备	09
匀浆制备	09
3.3 装柱	10
装柱参数	10
装柱步骤 Tricorn 5/100 层析柱	10
<hr/>	
<b>4. 层析柱评估</b>	<b>12</b>
层析柱评估	12
柱效测试	12
样品体积和线性流速	12
HETP 和 $A_s$ 测量方法	13

<b>5. 在位清洁 CIP</b>	<b>15</b>
CIP 方案	15
<hr/>	
<b>6. 消毒</b>	<b>16</b>
消毒方案	16
<hr/>	
<b>7. 储存</b>	<b>17</b>
<hr/>	
<b>8. 疑难排解</b>	<b>18</b>
<hr/>	
<b>9. 订购信息</b>	<b>19</b>
<hr/>	

# 1. 填料特性

高稳健蛋白 A 亲和填料是一种用于捕获抗体的亲和层析介质。  
该填料具备高动态结合载量 (DBC)，有助于提升工艺效率。

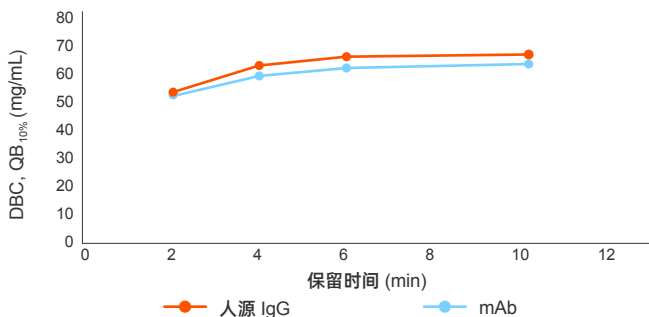
## 基本信息

基架	交联琼脂糖
中值粒径 $d_{50v}$	~ 60 $\mu\text{m}$
配基	重组耐碱蛋白 A (来自大肠杆菌)
偶联化学	环氧树脂
动态结合载量 <sup>1</sup> , $QB_{10\%}$	~ 65 mg IgG/mL 填料 (人源 IgG, 保留时间 6 分钟)
化学稳定性	在抗体亲和层析常用水性缓冲液中保持稳定
运行 pH 范围	3 – 12
CIP pH 范围	2 – 13.7
CIP 条件	0.2 – 0.5 M NaOH
最大运行流速 <sup>2</sup>	300 cm/h
温度稳定性	2 – 40°C
储存	20% 乙醇 (2 – 8 °C)
运输条件	20% 乙醇

- 1 使用 Tricorn 5/100 层析柱，柱床高度 10 cm，保留时间 6 分钟，抗体穿透率为 10% 进行载量测定。
- 2 在 Tricorn 5/100 层析柱中，柱床高度 10 cm，操作压力 < 2 bar，使用的缓冲液为温度 20°C 的水。

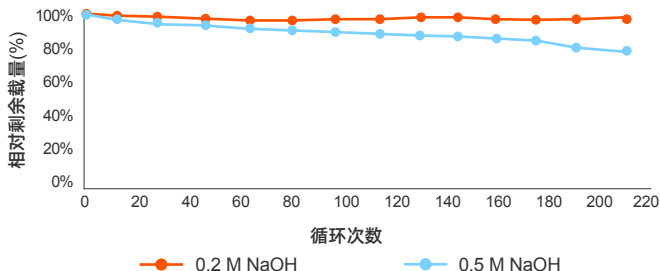
## 动态结合载量 DBC

目标抗体动态结合载量 (DBC) 的高低与其在柱床内的保留时间密切相关, 下图显示了高稳健蛋白 A 亲和填料的 DBC 与保留时间的关系。不同种类的抗体分子在填料载量的表现上存在差异, 实际载量应使用对应的料液进行测定。



## 耐碱稳定性

下图显示了高稳健蛋白 A 亲和填料在 200 次在位清洁 (CIP) 循环中的 DBC 的衰减趋势。每轮 CIP 填料均与 NaOH 接触 15 分钟。



## 2. 建议操作条件

### 缓冲液选择

层析步骤	缓冲液组分
平衡	20 mM 磷酸盐缓冲液, 150 mM NaCl, pH 7.4
淋洗 1	20 mM 磷酸盐缓冲液, 500 mM NaCl, pH 7.0
淋洗 2	50 mM 醋酸钠缓冲液, pH 6.0
洗脱	50 mM 醋酸钠缓冲液, pH 3.5
再生	100 mM 醋酸, pH 2.9
CIP	0.2 – 0.5 M NaOH

### 筛选层析过程

- 1 使用 5 CV 平衡缓冲液对层析柱进行平衡。
- 2 以保留时间  $\geq 6$  分钟的条件上样。
- 3 使用 5 CV 的平衡缓冲液冲洗层析柱。
- 4 使用 10 CV 线性梯度从 0% 到 100% 的洗脱缓冲液进行洗脱。
- 5 将组分收集到 pH 调节液中（例如，1.0 M Tris-HCl, pH 8.0, 调节液体积为预设收集体积的 5%）。
- 6 使用 5 – 10 CV 的 100% 洗脱缓冲液对层析柱进行再生。
- 7 使用 3 CV 的平衡缓冲液冲洗层析柱。
- 8 使用 5 CV 浓度为 0.2 – 0.5 M 的 NaOH 进行在位清洁（CIP）。
- 9 使用平衡缓冲液重新平衡层析柱。

## 优化建议

### 淋洗：

在清洗过程中可优化以下因素

- 保留时间
- pH
- 体积
- 电导率

### 洗脱：

- 确定能够从填料中有效解离目标分子的最高 pH，以避免敏感分子因暴露于低 pH 环境下而发生变性。
- 对于大规模生产应用，明确了合适的洗脱条件后，可建立相应的步级洗脱方案，使目标分子能够以更高浓度被洗脱，从而减少缓冲液消耗并缩短层析时间。当洗脱液中蛋白浓度较高时，可能需适当降低流速。

## 3. 层析柱装填

### 3.1 装柱参数

由于重力沉降的柱床高度与在特定流速下沉降的柱床高度不同，因此压缩因子(CF)必须与装柱因子(PF)区分开来。

在 20% 乙醇中进行匀浆制备时，高稳健蛋白 A 亲和填料的重力沉降压缩因子(CF)为 1.10。

CF 用于计算实现特定柱床高度所需的填料匀浆体积(V)。公式如下：

$$V = \frac{A_c \times L_{\text{packed}} \times CF}{C_{\text{slurry}}}$$

参数	定义
$L_{\text{settled}}$	重力沉降后测得的柱床高度
$L_{\text{cons}}$	设定流速下稳定后测得的柱床高度
$L_{\text{packed}}$	最终装填的柱床高度
CF	压缩因子 $CF = L_{\text{settled}} / L_{\text{packed}}$
PF	装柱因子 $PF = L_{\text{cons}} / L_{\text{packed}}$
$A_c$	层析柱底面积
$V_c$	层析柱体积 $V_c = L_{\text{packed}} \times A_c$
$C_{\text{slurry}}$	匀浆浓度

## 3.2 装柱准备

### 所需材料：

- 高稳健蛋白 A 亲和填料
- 塑料勺和刮刀
- G3 玻璃滤器漏斗
- 真空抽吸设备
- 过滤瓶
- 量筒

### Tricorn 层析柱：

- Tricorn 5/100 层析柱
- Tricorn 5 装柱管
- Tricorn 5 中型过滤组件
- 装柱溶液：20% (v/v) 乙醇加 0.2 M NaCl

### 设备：

根据所需的流速，可以选择适合的层析系统或独立泵进行装柱，所有材料使用前平衡至室温。

### 匀浆制备：

- 1 测量匀浆浓度。  
*提示：将填料倒入量筒中，并让填料在 20% 乙醇中静置过夜。*
- 2 计算装填层析柱所需的填料量。
- 3 将玻璃滤器漏斗连接到过滤瓶上。
- 4 摇动量筒使填料悬浮，并将匀浆倒入玻璃过滤漏斗中。
- 5 使用 2 倍柱体积的装柱溶液洗涤填料 5 次。每一轮之间需使用塑料勺/刮刀轻轻搅拌。
- 6 将清洗后的填料从玻璃滤器漏斗倒入烧杯中。
- 7 添加装柱溶液，直到匀浆浓度达到 50%。

## 3.3 装柱

主要层析柱参数如下表所示:

### 装柱参数

Tricorn 5/100

柱床高度	10cm
匀浆/填充溶液	20% 乙醇含 0.2 M NaCl
匀浆浓度	50%
装柱系数	N/A
装柱流速 (mL/min)	3.5
调整流速 (mL/min)	3.5

### 装柱步骤 – Tricorn 5/100 层析柱:

- 1 用装柱溶液润湿一对白色滤片（顶端滤片直径稍大，底端滤片直径略小），并根据柱生产商提供的 Tricorn 空柱使用说明（Tricorn Empty High Performance Columns Instructions）组装层析柱。
- 2 在层析柱顶部连接一个装柱接头和柱管，并将层析柱竖直地固定在支架上。
- 3 向柱体中加入填料匀浆，并补充装柱液至柱体充满。
- 4 将润湿过的滤片与底部组件安装到柱管顶部（如果没有额外的底端黑色组件，可直接使用红色的顶端适配器），并确保没有气泡残留。
- 5 将层析柱顶部与泵连接，装柱溶液的流动方向沿层析柱竖直向下。装柱流速详见装柱参数。

- 6 以 3.5 mL/min 的装柱流速持续运行 10 分钟。
- 7 停止流速并在层析柱底部安装堵头。
- 8 拆下上方的装柱接头和柱管，并移除残留在柱管连接处的多余填料。
- 9 用装柱溶液将层析柱加满。
- 10 安装顶部适配器和滤片。确保滤片下方没有气泡残留。
- 11 缓慢旋紧适配器，使其距离填料柱床面 1-2mm，以排出适配器管路中的空气。
- 12 移除层析柱下端堵头，并将顶部适配器连接到泵上（进行液滴对液滴连接，避免空气进入柱体）。
- 13 使用装柱参数表中的装柱流速，装柱溶液的流动方向沿层析柱向下。持续运行 5 分钟。
- 14 标出此时的柱床高度并暂停泵。
- 15 将红色适配器向下调节至标记处，并额外再旋转适配器 1/3 圈，最后按下红色适配器顶端黑色圆形锁片，锁定层析柱。
- 16 按照装柱参数所提示的调整流速，继续冲洗层析柱，持续 10 分钟。  
*提示：如果在调节过程中柱床与适配器之间形成间隙，请在不中止液体流动的情况下将适配器向下调节至柱床处。*

当上述步骤完成后，层析柱即可进行柱效测试。

*提示：由于装柱过程中涉及对填料的开放式操作，建议在装柱完成后进行 CIP 处理。*

## 4. 层析柱评估

### 层析柱评估

为评估装柱质量，根据以下情况进行柱效测试：

- 完成装柱流程后
- 在层析柱使用寿命期限内定期进行
- 当观察到分离性能下降时

### 柱效测试

装柱的柱效通常通过理论塔板高度（HETP）和不对称因子（ $A_s$ ）来表征。这些值是通过向层析柱上样测试样品（如 1% 丙酮或氯化钠溶液）来确定的。

*提示：如果选择氯化钠溶液，建议使用 0.8 M 氯化钠的水溶液作为样品，0.4 M 氯化钠的水溶液作为平衡液。*

计算出的塔板数取决于测试条件，仅可用作参考值。重要的是，测试条件和使用的设备必须保持一致，使结果具有可比性。

测试结果可能受到以下因素的影响：

- 溶质
- 溶剂
- 洗脱液
- 样品体积
- 线性流速
- 液体流路
- 温度
- 层析系统

### 样品体积和流速

为了获得最佳的柱效测试结果，进样体积应约为柱体积的 1%，线性流速应为 30 cm/h。若针对层析柱性能设定可接受标准，则理论塔板数可作为层析柱是否符合使用标准的判定指标之一。

## HETP 和 $A_s$ 计算方法

根据以下公式，从 UV 或电导率曲线中计算 HETP 和  $A_s$ ：

$$\text{HETP} = \frac{L}{N}$$

$L$  = 柱床高度 (cm)

$$N = 5.54 \times \left( \frac{V_R}{W_h} \right)^2$$

$N$  = 理论塔板数  
 $V_R$  = 从样品上样开始到峰值位置的保留体积  
 $W_h$  = 半峰高处的宽度  
 $V_R$  和  $W_h$  的单位相同

归一化塔板高度的概念常用于比较层析柱性能。

归一化塔板高度 ( $h$ ) 的计算如下所示：

$$h = \frac{\text{HETP}}{d_{50v}}$$

$d_{50v}$  = 体积分布的中值粒径 (cm)

作为指导原则， $h < 3$  是优异的柱效标准。

峰必须是对称的，且不对称因子 ( $A_s$ ) 应尽可能接近 1。典型的可接受范围是  $0.8 < A_s < 1.8$ 。

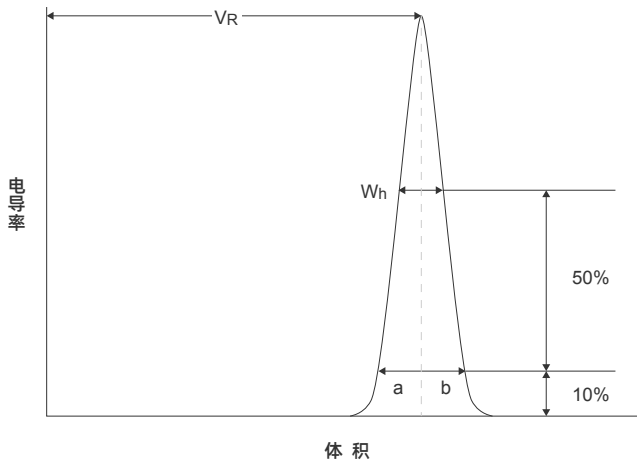
峰形改变通常是柱床性能变差的第一个迹象。

不对称因子按以下方式计算：

$$A_s = \frac{b}{a}$$

$b$  = 峰高 10% 处，峰宽的下降部分  
 $a$  = 峰高 10% 处，峰宽的上升部分

下图展示了典型丙酮测试的 UV 峰，据此可计算出 HETP 和  $A_s$  的值。



## 5. 在位清洁 CIP

定期进行 CIP 有助于维持填料的载量、流速特性和整体性能。

应根据工艺所存在的杂质或污染物类型，为每一条工艺设计相应的 CIP 方案。NaOH 浓度、接触时间和清洁频率通常是优化 CIP 的主要参数。最终采用的 CIP 清洁方案取决于料液的特性。

高稳健蛋白 A 亲和填料可使用 NaOH 兼容作为 CIP 溶剂。根据杂质或污染物的性质，可能需要结合多种 CIP 方案，例如每次循环使用 0.2 M NaOH 并且每 10 次循环使用 0.5 M NaOH。

*推荐：在首次使用抗体料液上样之前，进行一次空白运行，包括 CIP 清洁。*

建议在以下情况执行 CIP：

- 首次使用前（尤其是在装柱完成后）
- 长期储存后
- 各运行循环之间
- 出现柱压升高或层析柱性能下降时
- 同一根层析柱用于纯化不同蛋白或不同蛋白批次时 (以避免交叉污染或残留风险)

*提示：如果抗体未完全洗脱，建议在进行 CIP 前先进行酸性再生 (pH 3)。*

在利用碱性 NaOH 溶液进行 CIP 之前，建议先用中性 pH 溶液对层析柱进行平衡，以避免低 pH 洗脱缓冲液与高 pH NaOH 溶液直接接触。酸性和碱性溶液的混合可能会导致层析柱温度升高。

### CIP 方案

以下所有步骤均在反向流 (reversed flow) 条件下进行：

- 1 使用 3 CV 结合缓冲液清洗层析柱。
- 2 使用至少 3 CV 的 0.2–0.5 M NaOH 进行清洗。接触时间至少为 15 分钟。
- 3 立即使用至少 5 CV 的 pH 7–8 的结合缓冲液进行清洗。

*提示：如果抗体未完全洗脱，建议在进行 CIP 前先进行酸性再生 (pH 3)。*

## 6. 消毒

消毒有助于最大化减少层析柱及填料的微生物污染。高稳健蛋白 A 亲和填料具有良好的耐碱性，允许使用 NaOH 作为消毒剂。

*提示：通过使用较高浓度的 NaOH 和更长的接触时间，微生物的灭活效果更佳。*

*然而，这些条件也可能导致动态结合载量（DBC）下降。因此，消毒条件需要经过评估，以确保最大化微生物杀灭效率与最小化减少动态结合载量的损失。*

### 消毒步骤：

- 1 使用 3 CV 结合缓冲液清洗层析柱。
- 2 使用至少 3 CV 的 0.1 – 0.5 M NaOH 进行清洗层析柱。
- 3 无论采用 0.1 或 0.5 M NaOH，接触时间至少为 1 小时。另请参阅上文提示。
- 4 立即用至少 5 CV 的、经过滤的 pH 7 – 8 的结合缓冲液进行清洗。

## 7. 储存

将未使用的高稳健蛋白 A 亲和填料保存在温度为 2°C 至 8°C 的容器中，并确保瓶盖完全拧紧。

已装填的层析柱储存在 20% 的乙醇中，以防止微生物生长。

储存后再次使用前，应先用结合缓冲液对柱子进行平衡，并进行空白运行，其中需包含 CIP 步骤。

## 8. 疑难排解

下表总结了从监测曲线中观察到的故障，以及其可能的相关原因及对应的修正措施。

故障	可能的原因/修正措施
运行过程中的背压升高	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 更换在线滤器。</li> <li>● 层析柱发生堵塞。执行 CIP。</li> <li>● 适配器滤网 / 过滤片堵塞。清洁或更换适配器滤网 / 过滤片。</li> </ul>
上样过程中压力曲线不稳定	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 去除样品泵内可能残留的气泡。</li> <li>● 使用真空脱气装置对样品进行脱气处理。</li> </ul>
洗脱峰逐渐变宽	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 洗脱或 CIP 不充分，导致杂质或污染物在层析柱中的逐渐积累。优化洗脱条件、CIP 方案和 / 或增加 CIP 频率。</li> </ul>
收率逐渐下降	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 上样量太高。减少上样量。</li> <li>● 洗脱过程中出现沉淀。优化洗脱条件。</li> <li>● 洗脱或 CIP 不充分。优化洗脱条件、CIP 方案和 / 或增加 CIP 频率。</li> </ul>
CIP 峰逐渐升高	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 洗脱或 CIP 不充分。优化洗脱条件、CIP 方案和 / 或增加 CIP 频率。</li> </ul>

## 9. 订购信息

更多信息请参阅品牌官网或微信公众号。

产品	规格	货号
高稳健蛋白 A 亲和填料	25 mL	29944912
	200 mL	29944924