



# HiPur At LX

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	1
3. 残留配体去除.....	2
4. 填料清洗.....	2
5. 问题及解决方案.....	2
6. 订购信息及相关产品.....	2

## 1. 产品介绍

**Protein At Beads LX** 是用于分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合蛋白的亲层析介质, 具体性能见表 1。Protein A 是一种分离自金黄色葡萄球菌的细胞壁蛋白, 主要通过 Fc 片段结合哺乳动物 IgG。**Protein At Beads LX** 的配体蛋白是在天然蛋白 A 的基础上进行生物工程突变得到的, 通过大肠杆菌表达的一种耐碱蛋白 A (Alkaline tolerate, 故缩写为 At)。该配体纯化过程中无动物源成分。配体经特殊设计增强了对碱和蛋白酶的稳定性。**Protein At Beads LX** 在延长保留时间后, 具有很高的动态结合载量, 专门为高滴度抗体纯化设计开发。耐碱性、高载量、低配体脱落以及高度交联的 4%琼脂糖凝胶刚性基质, 使得该填料特别适合工业化抗体或临床应用抗体的大规模纯化。**HiPur At LX** 是一种中压预装柱, 填装 20 ml 的 **Protein At Beads LX** 介质。柱管由生物相容性聚丙烯制成, 不与生物分子相互作用。柱管两头都有堵头, 防止保护液的泄露。柱体标签上的箭头表示推荐的流向。预装柱具有标准接口, 可以适配商品化的各类中压色谱系统, 如 ÄKTA 等, 方便客户操作。

表 1. HiPur At LX 产品信息

项目	内容
规格	4.7 ml
基质	高度交联琼脂糖微球
配体	耐碱性 Protein A
结合载量*	> 60 mg Rabbit IgG/ml 介质
平均粒径	~85 $\mu$ m
耐压	0.3 MPa, 3 bar
柱尺寸 (内径×高度)	1.6×10 cm
化学稳定性	可耐受抗体纯化过程中的常用试剂
工作 pH	3-12
在线清洗	0.1-0.5 M NaOH
线性流速	50-500 cm/h
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8 °C

\*注: 目标抗体的动态结合载量, 需要使用实际样品进行前端分析来确定。动态结合载量是一个样品保留时间的函数, 因此需要在样品的不同保留时间范围内来定义。

## 2. 纯化流程

### 2.1 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22  $\mu$ m 或 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤。

**平衡/洗杂液:** 0.15 M NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH7.0

**洗脱液:** 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0-3.6

**中和液:** 1 M Tris-HCl, pH 8.5

### 2.2 样品准备

上柱之前确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值, 可以用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释, 或者样品用平衡/洗杂液透析。

样品在上样前建议离心或用 0.22  $\mu$ m 或 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

### 2.3 样品纯化

**HiPur At LX** 是一种用于分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合蛋白的预装柱产品, 可以用各种常规的中低压色谱系统。





- 1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子, 将层析柱连接至色谱系统中, 打开下出口, 将预装柱接到色谱系统中, 并旋紧。
- 2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
- 4) 利用泵或样品环上样, 保证样品保留时间大于 6 分钟。**注:** 样品的粘度增加使得即使上样体积很少, 也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压, 使得进样器更难使用。
- 5) 用洗杂液冲洗柱子, 直到紫外吸收达到一个稳定的基线 (一般至少 10-15 个柱体积)。
- 6) 线性洗脱: 0-100% 洗脱液洗脱 10 个柱体, 收集洗脱液, 即目的蛋白组分。建议首次纯化使用线性洗脱, 从而选择最佳的洗脱 pH, 有利于保护易失活抗体的活性。

等度洗脱: 首次测试后, 后续放大纯化, 可使用 5-10 倍柱体积的选定 pH 洗脱液洗脱, 该方法有利抗体在一个比较集中的浓度洗脱, 从而减少洗脱液使用和循环纯化时间。

洗脱组分需要立即调成中性, 一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液进行中和。

**注:** 首次使用时, 可先按照 4 填料清洗中 CIP 清洗一遍, 避免脱落的配体残留。

- 7) 洗脱结束后, 先用平衡液冲洗 3 倍柱体积, 然后用纯水冲洗 5 倍柱体积, 再用含 20% 乙醇的 1×PBS 冲洗 2 个柱体积, 然后将预装柱置于 2-8°C 保存。

## 2.4 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品 (包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分) 以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

## 3. 残留配体去除

**Protein At Beads LX** 配体的脱落很低, 小于 10ng/mg 抗体。但是很多产品需要完全去除, 可采用阳离子交换、阴离子交换或凝胶过滤等方法去除, 具体参照阳离子交换介质、阴离子交换介质和凝胶过滤介质的使用。

## 4. 填料清洗

**HiPur At LX** 可以重复使用而无需再生, 但随着一些变性物质的沉淀和蛋白的聚集, 往往造成流速和结合载量都下降, 压力升高, 或者在后续纯化中脱落, 严重影响柱子的性能, 这时需要对介质进行清洗, 以保证填料的载量、流速和一般性能。

**Protein At Beads LX** 是一种耐碱亲和介质, 可以耐受 0.1 M-0.5 M NaOH 溶液的清洗, 成本低, 效果好, 具体操作:

- 3 倍柱体积的平衡液;
- 至少 2 倍柱体的 0.1-0.5 M NaOH, 接触时间为 15 minutes;
- 5 倍柱体积的平衡液冲洗。

**注:** 因 0.1-0.5 M NaOH 粘度大易造成压力增加, 可进行反向冲洗。

## 5. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	筛板被堵塞	清洗或更换筛板
	填料被堵塞	按照第4部分进行介质CIP清洗 裂解液中含有微小的固体颗粒, 建议上柱前使用滤膜 (0.22或0.45µm) 过滤, 或者离心去除。
样品纯化过程中曲线不稳	样品或缓冲液中有气泡	去除样品或柱子中的气泡 样品和缓冲液进行脱气
洗脱组分中没有目的蛋白	样品中抗体浓度太低	使用其抗原做配体的介质
	抗体被降解	适当的提高洗脱pH
回收率逐渐减低	上样量太多	减少上样量
	柱子太脏, 载量降低	按照第4部分进行介质CIP清洗

## 6. 订购信息及相关产品

产品名称	货号	规格
HiPur At LX	SA085C20	1×20 ml
HiSelect At LX	SA085C47	1×4.7 ml

