



# 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-融合蛋白的亲亲和层析介质，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，填充 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 Human IgG/ml 介质 |
| 平均粒径        | ~85 µm                  |
| 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 µm 或 0.45 µm 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 µm 或 0.45 µm 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℃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<br>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 |

