



HiSelect Smac VH3

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

Smac VH3 Affinity Beads 是一种亲和层析介质，用于高效分离双特异性抗体 (bsAbs) 和含有 VH3 家族序列的抗体片段 (Fabs, scFvs 和 VHHs)，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 片段与大多数哺乳动物 IgG 产生特异性结合。**Smac VH3 Affinity Beads** 的配体蛋白是在天然 Protein A 的基础上进行基因工程突变得到的，使用大肠杆菌表达的一种耐碱蛋白 A。该配体的制备过程中未使用任何动物源组分。配体经特殊设计，仅与人抗体 VH3 家族序列的可变重链 (VH) 相互作用。**Smac VH3 Affinity Beads** 对双特异性抗体和含有 VH3 家族序列的抗体片段具有高动态结合载量，且能够提供更好的产品纯度。耐碱性、高载量、高分辨率以及高刚性琼脂糖基质，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。

HiSelect Smac VH3 是一种中压预装柱，填充 4.7 ml 的 **Smac VH3 Affinity Beads** 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. Smac VH3 Affinity Beads 产品性能

项目	性能
基质	高刚性琼脂糖微球
平均粒径	55-65 μm
配体	重组耐碱蛋白 A
载量	12-18 mg VHH3/ml 介质
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
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
保存	20% 乙醇, 2-8 $^{\circ}\text{C}$
柱尺寸 (内径×高度)	0.77×10 cm

2. 纯化流程

2.1 Buffer 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_2HPO_4 , pH 7.0

洗脱液: 0.1 M 醋酸钠, pH 3.5

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

HiSelect Smac VH3 是预装柱产品，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 个柱体积，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，可先按照第 4 部分 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 2%苯甲醇冲洗 2 个柱体积，然后将介质置于 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

Smac VH3 Affinity Beads 配体的脱落很低。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、多模式色谱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、多模式介质和凝胶过滤介质的使用。

4. 填料清洗

Smac VH3 Affinity Beads 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容量都下降，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。

CIP 清洗

Smac VH3 Affinity Beads 是一种耐碱亲和介质，可以耐受 0.1-0.5 M NaOH 溶液的清洗，成本低，效果好，具体操作：

- 1) 3 倍柱体积的平衡液；
- 2) 至少 2 倍柱体的 0.1-0.5 M NaOH，接触时间为 15 minutes；
- 3) 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

名称	货号	规格
HiSelect Smac VH3	SA122C47	4.7ml
HiPur Smac VH3	SA122C20	20ml

