



Smac SupA-ME

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	1
3. 填料储存.....	2
4. 问题及解决方案.....	2
5. 订购信息及相关产品.....	3

1. 产品介绍

Smac SupA-ME 是用于分离和纯化单克隆抗体的亲和层析介质，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 结构域结合哺乳动物 IgG。而 **Smac SupA-ME** 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，可以在较为温和的 pH 条件下洗脱含 Fc 的分子，洗脱体积小，且蛋白回收率和 HCP 清除率高。同时该配体经特殊设计增强了碱稳定性。该配体制备过程中无动物源成分引入。耐碱性、高载量、温和洗脱以及高刚性琼脂糖凝胶基质，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。

表 1. Smac SupA-ME 产品性能

项目	性能
介质	高刚性琼脂糖微球
平均粒径	~ 60 μm
配体	重组 Protein A
结合载量*	50-65 mg hlgG/ml 介质
pH 稳定范围	3-12 (工作), 2-13 (CIP)
在线清洗	0.1 M NaOH
推荐最大流速	300 cm/h
保存	20%乙醇 (2%苯甲醇可选用)
储存温度	2-8 °C
化学稳定性	可耐受抗体纯化过程中的常用试剂

*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：20 mM Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, pH7.0

洗脱液：0.1 M NaAc, pH3.0-5.0

中和液：1 M Tris-HCl, pH8.5

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 Smac SupA-ME 装填

Smac SupA-ME 被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中压色谱层析柱的填装，下面介绍使用 **Smac SupA-ME** 填装层析柱的方法。

层析柱的装填（使用储液器装填）

装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积，根据所需装柱高度计算所需介质体积，公式如下：

$$V = 1.15\pi r^2 h$$

V: 所需介质体积 ml

1.15: 压缩系数

r: 柱管半径 cm

h: 装填高度 cm





注意: 所取悬液体积应为介质体积的两倍, 因为介质体积只占悬液总体积的一半, 另一半为保护液。

- 1) 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头, 确保柱底筛板上无气泡, 关闭柱底出口, 并在柱底部留出 1-2 cm 的去离子水。
- 2) 将介质悬浮起来, 小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3) 如果使用储液器, 应立即在层析柱和储液器中加满水, 将进样分配器放置于浆液表面, 连接至泵上, 避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4) 打开层析柱底部出口, 开启泵, 使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱, 然后缓慢增加至最终流速, 这样可避免液压对所形成柱床的冲击, 也可避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速, 可以用你所使用泵的最大流速, 这样也可以得到一个很好的装填效果。(注意: 在随后的色谱程序中, 不要超过最大装柱流速的 75%) 当柱床高度稳定后, 在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
- 5) 关闭泵, 关闭层析柱出口。
- 6) 如果使用储液器, 去除储液器, 将分配器置于层析柱中。
- 7) 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器, 锁紧分配器接头。
- 8) 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中, 开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

2.4 样品纯化

条件必须通过筛选过程来确定目标抗体的能力, 并选择最佳工艺性能、经济性和设施匹配的适当条件。

- 1) **层析填料平衡:** 使用平衡缓冲液充分平衡层析填料, 通常平衡 3-5 倍柱体积。
- 2) **上样:** 流速根据装填层析柱的规格和柱高上样, 根据样品中目标物质的含量和 **Smac SupA-ME** 的结合载量确定上样体积, 进行上样。该过程保留时间建议大于 6 min。
- 3) **洗杂:** 上样完成后采用平衡液将紫外吸收降到合适的数值, 必要时可以增加高盐清洗, 将非特异性吸附的杂质尽可能多的洗下来, 洗杂液的 pH 需要在 7.0-9.0 之间选择。
- 4) **洗脱:** 洗杂结束后开始进行洗脱, 因为每个样品都具有特异性, 化学和物理性质也有所不同, 所以洗涤和洗脱条件需要根据实际情况进行优化。洗脱缓冲液可以选用柠檬酸、醋酸、甘氨酸, 建议浓度 0.01-0.1 M, 可以根据实际进行选择。洗脱 pH 可以根据样品进行优化。如果目的样品在酸性条件下不稳定, 洗脱液可以用中和液进行中和。
- 5) **在位清洗:** 随着层析介质使用次数的增加, 污染物在层析柱上的积累也在不断增加, 定期的在位清洗能有效防止污染物的累积, 保持层析介质稳定的工作状态。客户可根据使用过程中介质的污染程度确定在位清洗的频率, 可以采用 0.1 M NaOH 进行在位清洗, 与填料接触时间一般 15 min。在位清洗结束后应用平衡液洗至 pH 与平衡液一致, 然后保护液冲洗 3-5 倍柱体积。

下表是单克隆抗体纯化的建议流程:

步骤	缓冲液	柱体积
平衡	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 0.15 M NaCl, pH7.0	3-5
上样	/	/
洗杂 1	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 0.15 M NaCl, pH7.0	3
洗杂 2	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.0 M NaCl, pH8.0	3
洗杂 3	20 mM Na ₂ HPO ₄ , pH7.0	3
洗脱	0.1 M NaAc, pH4.5	3
再生	0.1 M HAc	3
CIP	0.1 M NaOH	3
平衡	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 0.15 M NaCl, pH7.0	3

3. 填料储存

Smac SupA-ME 以 20%乙醇或 2%苯甲醇作为保护液, 常规保护液为 20%乙醇, 2%苯甲醇作为选用保护液。

Smac SupA-ME 储存条件应为在保护液中 2-8℃密封保存。

4. 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	对介质进行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 μm或0.45 μm) 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





问题及解决方案（续）

问题	原因分析	推荐解决方案
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	对介质进行CIP清洗

5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Smac SupA-ME	SA137005	5 ml
	SA137025	25 ml
	SA137100	100 ml
	SA137500	500 ml
	SA13701L	1 L
	SA13710L	10 L
PreCap Smac SupA-ME	SA137C11	1×1 ml
	SA137C51	5×1 ml
	SA137C15	1×5 ml
	SA137C55	5×5 ml
HiSelect Smac SupA-ME	SA137C47	4.7ml
HiPur Smac SupA-ME	SA137C20	20ml

