

ProAqa Excel 亲和色谱柱

概述

ProAqa Excel 亲和色谱柱专门适用于快速准确的单克隆抗体定量。填料是由高度交联的多孔聚苯乙烯/二乙烯基苯 (PS/DVB) 组成，平均粒径 20 μm ，D90/D10<1.3 的窄粒径分布，孔径 1000-2000 \AA 。在多孔填料表面键合一层亲水涂层，涂层上化学键合重组蛋白 A，该配体能与除 IgG3 以外的免疫球蛋白以及含 Fc 的融合蛋白结合。

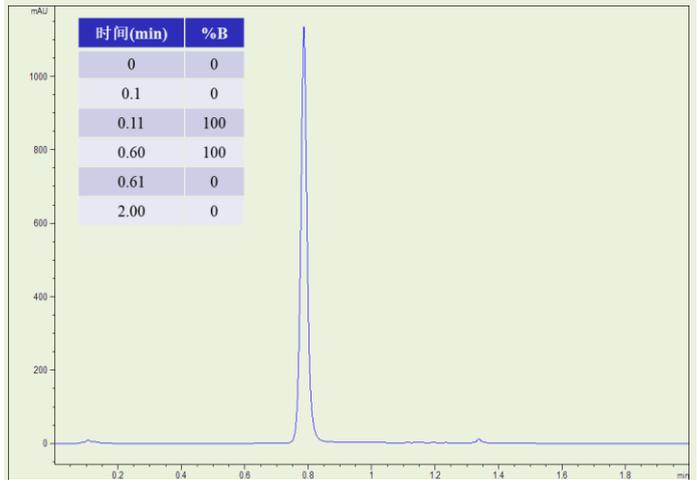
填料具有机械强度，可以承受高流速和高压操作，可以以较高的流速应用到 UPLC、HPLC 和 FPLC 系统中。低于 2 min 的常规检测使其可以在短时间内对大量样品进行可靠的高通量筛选。只要压力没有超过最大限制，就能获得比 2 min 更短的分析时间，如 0.5 min。

技术参数

ProAqa Excel	参数
基质	均一的 PS/DVB
粒径, 孔径	20 μm , 1000-2000 \AA
固定配体	重组蛋白 A
结合载量	>5 mg/mL 填料
运输溶液	0.1 M 磷酸钠, pH 7.0, 150 mM NaCl, 2-8 $^{\circ}\text{C}$
最大压力	200 bar
pH 范围	1.2-13.0
最大操作流速	8600 cm/h
离子强度	0-5 M, 所有常见盐
流动相	常见缓冲液, 包括磷酸盐、乙酸盐、4 M 尿素、3 M 盐酸胍、乙二醇和去污剂
储存溶剂	20%的有机溶液 (有机溶剂采用乙醇、异丙醇或甲醇) 注: 不能含有降解和破坏蛋白质 A 的成分
操作温度	10-35 $^{\circ}\text{C}$, 不要冷冻
色谱柱寿命	适宜的操作条件下可进样 2000 针
CIP	2-6 M 盐酸胍、1 M 乙酸、20% 乙醇、 异丙醇、0.1 M NaOH

图 1 是一张常见图谱，色谱柱可以被用来定量分析抗体和能与 Protein A 结合的融合蛋白。如图 2 和图 3 所示，280 nm 和 300 nm 波长下的检测上限分别是 7.5 mg/mL 和 40 mg/mL。

图 1. ProAqa Excel 色谱柱 (2.1 mm \times 30 mm) 分析 hIgG



流动相: A: 50 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl (pH 7.0)

B: 100 mM 甘氨酸 (pH 2.5)

柱温: 室温

流速: 1 mL/min

检测波长: 280 nm

样品: 1.875 mg/mL hIgG 溶液

进样量: 10 μL

色谱柱安装与操作

色谱柱在运输过程中或在没有使用时，它的两端总是用堵头进行密封。当将色谱柱接入色谱仪器系统时，首先移去两端的堵头。请注意将流动相流动的方向与柱上标记的方向保持一致。除非出于特殊考虑，例如为了清除堵在色谱柱入口端的脏污等而需要将色谱柱反接以进行冲洗时，建议用户在接上色谱柱时一定要遵循柱上标记的方向。由于色谱柱的连接是整个色谱操作过程的一部分，如果密封卡套过紧，或安装不合适，或者密封卡套与色谱柱端口不匹配，都有可能造成溶液的泄漏。请按照下面步骤将色谱柱与密封卡套相连接，从而将色谱柱接入 HPLC 系统：

(a) 第一次使用的管线，请依次将管线接头和密封卡套装在外径 1/16" 的管线上。密封卡套的宽口端应朝向管线接头。

(b) 将管线紧紧插入色谱柱的接口，向前滑动螺母和密封垫圈，啮合螺纹，然后用手拧紧螺母。色谱柱的接头是 10-32 母螺纹。请勿使用任何需要用扳手扭紧的配件。过度扭紧会损坏色谱柱的螺

纹。

(c) 对色谱柱的另一端采用上述方法进行操作。

首次使用色谱柱前，用 5-10 倍柱体积的洗脱缓冲液洗掉柱内储存溶剂。用 10-15 倍柱体积的起始/清洗缓冲液平衡。为了避免色谱柱堵塞，建议使用柱前过滤器（0.5 μm）。

空白对照

要使用高纯度的缓冲液，缓冲液使用前需要排气和过滤（0.22 μm）。进样前，请务必做空白对照，并仔细检查峰积分结果中是否存在噪音或基线绘制不正确。为了降低结合缓冲液和洗脱缓冲液转变时引起的基线波动，建议使用：

(a) 50 mM 磷酸盐（pH 7.0），0.15 M NaCl 作为起始/冲洗溶液。

(b) 100 mM 磷酸钠，0.15 M NaCl（pH 2.5）或 100 mM 甘氨酸，0.15 M NaCl（pH 2.5）作为洗脱缓冲液。

这些是对信号噪音最小化最有效的洗涤/洗脱液。盐酸（HCl）能使抗体变性，所以洗脱产品如果需要生物活性的话，不建议添加 HCl。

起始/冲洗溶液

(a) 大多数情况下，可以使用简单的缓冲液，例如 10-100 mM 的磷酸盐或 Tris。

(b) 结合/洗脱缓冲液的 pH 范围为 6.0-7.5，但是请注意，在较高的 pH 范围下结合力最强。

(c) 添加一些盐（0.1-0.2 M NaCl 或 KCl）抑制蛋白间相互作用的非特异性吸附。

*该色谱柱出厂保存溶剂为 20 mM 磷酸盐缓冲液

洗脱条件

对于分析应用，使用 25-100 mM 磷酸盐（pH 2.0-3.5），含或不高达 150 mM 的 NaCl。可以使用的其他洗脱缓冲液成分包括磷酸钠、盐酸、甘氨酸、柠檬酸盐、醋酸盐以及其他含低 pH 成分的缓冲液。

由于抗体的结合/洗脱行为因种类和亚类而异，因此应凭经验确定最佳洗脱条件。

样品准备和上样

为了保证高效结合和避免柱子滤片堵塞，样品一般按以下方式准备：

(a) 溶解或交换样品到起始/洗涤缓冲液，这对于大份样品（大于 25% 柱体积）尤其重要。

(b) 进样前离心或用 0.22 μm 滤膜过滤样品。

(c) 热处理血清样品（56°C 加热 30 min）去除残留的纤维蛋白原，它们会在多次运行中阻塞色谱柱。

(d) 尽可能对样品脱脂，因为脂质会引起不可逆的结垢。

为保证高效结合及避免填料和色谱柱污染，需要确认上样量：

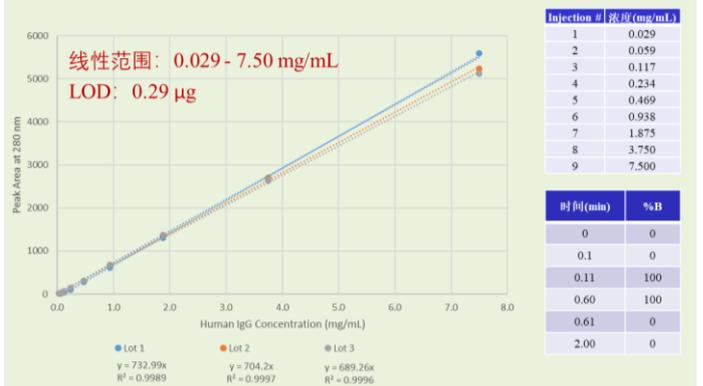
(a) 图 2 和图 3 显示了 ProAqa Excel 色谱柱的动态测试范围。

(b) 其他抗体的结合能力取决于抗体来源和亚类。

(c) 需要优化结合和洗脱条件并用样品确认，以确保达到足够的结合平衡和完全洗脱。

(d) 在分析应用中，最小和最大载量应该通过标准曲线的线性确定（如图 2 所示，对于样品浓度在 0.029-7.500 mg/mL 的常用定量分析，可以将检测波长设置为 280 nm。如图 3 所示，如果样品浓度较高（高达 40 mg/mL），波长可设置为 300 nm。在该分析应用中，建议使用双波长检测（280 nm 和 300 nm）。

图 2. ProAqa Excel (2.1 mm × 30 mm) 色谱柱在 280 nm 下的线性范围和重复性



流动相: A: 50 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl (pH 7.0)

B: 100 mM 甘氨酸 (pH 2.5)

流动相切换如图中表格所示

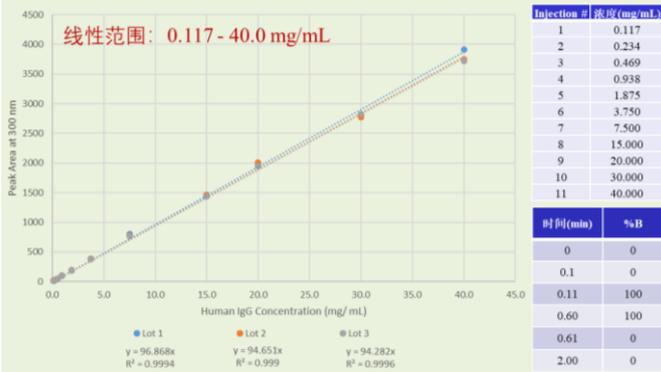
柱温: 室温

流速: 1.0 mL/min

检测波长: 280 nm

样品: hIgG 溶液, 浓度如图中表格所示

进样量: 10 μL

图 3. ProAqa Excel (2.1 mm×30 mm) 色谱柱在 300 nm 下的线性范围和重复性


流动相: A: 50 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl (pH 7.0)

B: 100 mM 甘氨酸 (pH 2.5)

流动相切换如图中表格所示

柱温: 室温

流速: 1.0 mL/min

检测波长: 300 nm

样品: hIgG 溶液, 浓度如图中表格所示

进样量: 10 μ L

色谱柱保护

除了过滤流动相和样品, 在色谱柱前安装一个柱前过滤器。大多数情况下, 柱前过滤器有助于去除样品或流动相中的残留颗粒, 或从 HPLC 或 FPLC 系统中滤出的残留物, 例如泵和进样器密封件。

订购信息

规格 内径×长度 (mm×mm)	材质	柱体积 (mL)	订货号
标准规格			
2.1×30	不锈钢	0.1	271120980-2103S
定制规格			
2.1×50	不锈钢	0.17	271120980-2105S
4.6×35	不锈钢	0.58	271120980-4603S
4.6×50	不锈钢	0.83	271120980-4605S
4.6×100	不锈钢	1.66	271120980-4610S

注: 以上为部分订货信息, 其它规格或特殊定制产品, 请来电咨询。

色谱柱清洗和再生

色谱柱通常比较耐用。如果再次使用色谱柱, 监测色谱柱压力, 并且进样分析对照样品。如果压力增大或对照样品回收率变化, 清洗色谱柱以去除滤片和填料中的残留物质。常用的清洗溶液包括 2-6 M 盐酸胍, 1 M 醋酸, 20% 乙醇, 异丙醇, 添加了 1-2 M 氯化钠和 0.1 M NaOH 的洗脱溶液。

平衡溶液清洗后用 15 倍柱体积的清洗溶液清洗色谱柱, 流速 0.1-0.2 mL/min。您可以反接色谱柱以冲洗顶端滤片, 然后正接回归到正常的清洗顺序。

储存

长时间不用时, 按以下条件储存 ProAqa Excel 色谱柱:

- 储存在含有抑菌剂 (如 0.02% 叠氮化钠) 的中性 pH 溶液中。
- 储存在冰箱 2-8°C 中, 切记: 柱子不能冷冻!
- 仔细密封两端堵头后防止干燥, 干燥会导致色谱柱效能下降。

安全注意事项

ProAqa Excel 色谱柱通常在高压下运行。如果管路连接不紧, 将会导致有机溶剂和注入样品的泄漏, 从而对操作人员的健康产生影响。一旦发生泄漏, 应佩戴适当的手套进行处理。另外当打开色谱柱时还应采取适当的保护措施, 以防止微小的硅胶颗粒进入呼吸道。