

Mab A Crysto

亲和层析介质

使用指南

1 产品简介

Mab A Crysto 是科诺赛生物自主研发生产的最新一代抗体纯化层析介质，此产品以经过改造的超高刚性琼脂糖凝胶为基质，偶联公司自有专利的高耐碱突变 Protein A，与上一代 Mab Chrom A 相比具有以下特点：

产品特点：

- 硬度增强、反压降低、流速更快，适合大规模生产；
- 更高的结合载量、更低的配基脱落，使用寿命更长；
- 更高耐碱性，可耐受 0.5M NaOH 在位清洗。

应用领域：大批量细胞培养液中的单克隆抗体或 Fc 融合蛋白捕获，以及腹水或血浆中的多克隆抗体的捕获。

2 技术参数

产品名称	Mab A Crysto
基质	高刚性琼脂糖
配基	高耐碱突变 Protein A
平均粒径	75 μ m
每毫升载量	>100mg Lys
推荐流速	\geq 500cm/h (根据柱子规格选择合适流速)
最大耐压	0.5 MPa
pH 稳定性	2~14 (CIP) 3~12 (工作)
化学稳定性	常见水相溶液：10mM HCl、0.1M 柠檬酸 (pH3)、6M 尿素、6M 盐酸胍、30%异丙醇、20%乙醇。
存储	2~30°C 20%乙醇

3 使用指南

3.1 填料装柱

Mab A Crysto 亲和层析介质可以在实验室被填装到 HiQumn[®] 中压层析柱中，以扩大产量。将填料填装到层析柱中，根据样品中蛋白含量和填料载量选择合适的层析柱和柱高。

3.1.1 填料准备

在装柱前，填料要平衡到室温，建议采用静置沉淀法，确定胶悬液浓度，我们原包装的填料以 50% 的浓度储存在 20% 的乙醇中。压缩比在 1.10~1.12。

通过真空抽滤，将填料中 20% 乙醇溶液更换为装柱所需的溶液（例如水），重复以上步骤 3 次，最后用装柱缓冲液重新悬浮填料，建议胶悬液浓度为 50%~60%。

所需悬浊液体积 (mL) = 装柱体积 (mL) * 填料压缩因子 / 胶悬浊液浓度

3.1.2 层析柱准备

HiQumn[®] 中压层析柱和装柱器在使用前，应用装柱液润洗，检查层析柱完好无损伤，确保所选筛网（筛板）的孔径和所选填料的粒径相匹配，确保底端部件和顶部适配器的管件连接牢固。

3.1.3 层析柱装柱

- 1) 取清洗干净的 HiQumn[®] 中压层析柱，借助蛋白纯化仪或注射器，用装柱液通过下端接头排空管线及筛板中的空气，也可用重力法排空筛板及管线中的空气，在柱子底部保留 1cm 高左右的液体，拧紧下堵头，调整柱子使其垂直于地面。
- 2) 再次混匀胶悬液，确保悬液均一，借助玻璃棒将胶悬液缓慢且一次性贴壁倒入柱管中，用装柱液冲洗柱管并加满。注意不要带入气泡。

注：当装柱体积大于柱体积的 50% 以上时建议借助配套装柱器装柱。

- 3) 使其自然沉降，胶面上有 1~2cm 澄清液时，将适配器管线连接设备，低流速运行，排出适配器管线中的气泡，打开底部管线堵头，将适配器以 45° 角放入玻璃管中，顺时针拧紧上端固定帽，调节适配器使其 O 型圈浸入澄清液中，之后顺时针拧紧上端调节帽。请确保整个操作在一条直线上完成，注意不要引入气泡。
- 4) 可以采用高流速或者恒压法压至胶面清晰稳定。读取刻度并记录，关闭流速。
- 5) 如用装柱器装柱，拆除装柱器，用快速锁将调节杆缓慢下移至胶面位置，将上端调节帽顺时针拧紧，继续运行上述流速，如果胶面发生改变，可以重新调节适配器高度。
- 6) 稍微拧松上端调节帽，按压缩比确定最终柱床高度，拧紧上端调节帽，采用先下后上的方式拧紧上下端堵头，装柱完毕。

3.2 柱效测定

- 1) 通过柱效测定和评价可以确认层析柱装填质量。装柱完成后、层析柱使用期间以及分离纯化效果不理想时都需要进行柱效测定和评价。柱效通常用理论塔板高度 (HETP) 和非对称因子 (As) 来评价。
- 2) 柱效测定可以采用丙酮或者 NaCl 作为样品进行测定，按照下表配制样品溶液和流动相。

	丙酮法测柱效	NaCl 法测柱效
样品	1.0%(v/v)丙酮水溶液	0.8M NaCl (溶于水)
样品体积	1.0%柱体积	1.0%柱体积
流动相	纯化水	0.4M NaCl 水溶液
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测器	UV 280 nm	电导率

3) HETP 和 As 计算方法

根据 UV 或者电导率曲线计算理论塔板高度 (HETP)、理论塔板数 (N) 和非对称因子 (As)，公式如下：

$$HETP=L/N$$

$$N=5.54(V_R/W_h)^2$$

其中：

V_R =保留体积 W_h =半高峰宽

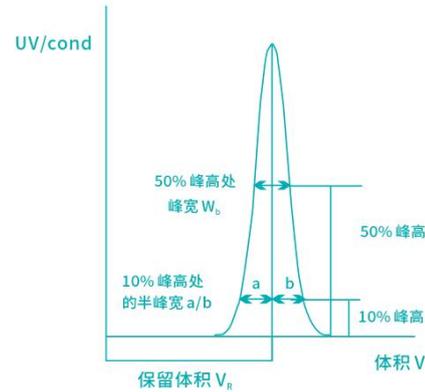
L =柱高 N =理论塔板数 V_R 和 W_h 的单位应一致；

$$As=b/a$$

其中：

a = 在 10%峰高处的第一个半峰宽

b = 在 10%峰高处的第二个半峰宽



4) 结果评价

一般来说，HETP 的数值若小于三倍介质平均颗粒大小且非对称因子在 0.8~1.8 之间，说明柱效良好。对于不理想的柱效结果需要分析原因并重新装柱。

3.3 层析方法

3.3.1 缓冲液准备

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

平衡缓冲液：20 mM PBS, 150 mM NaCl, pH=7.0

洗脱缓冲液：采用柠檬酸、醋酸或甘氨酸作为洗脱液，如(100mM Gly, pH=3)

针对不同的抗体，可以通过改变缓冲液的盐的类型、浓度还有 pH 来进行结合条件和清洗条件的优化。

3.3.2 样品准备

为防止样品堵塞柱子，在上样前样品需要用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤，并将样品的 pH 和电导率调整到与平衡缓冲液一致。

3.3.3 样品纯化

- 1) 平衡：使用之前用平衡缓冲液替换层析柱中 20%乙醇保存液；依次用洗脱液和平衡液冲洗并平衡层析柱；
- 2) 进样：样品为抗体发酵液，按照 10%流穿下 DBC 的 0.8 倍进样；样品停留时间大于 5min；
- 3) 淋洗：采用平衡液清洗 5CV，必要时可加入高盐或稍低的 pH 清洗，将非特异性吸附的杂质尽可能多地清洗下来；
- 4) 洗脱：洗脱液清洗 5CV 至基线平衡；
- 5) 清洗：1M 醋酸清洗 5 CV；
- 6) CIP：0.1~0.5 M NaOH 溶液，清洗 5 CV 至基线平衡；
- 7) 再平衡：立刻用平衡液清洗 5 CV 至基线平衡；
- 8) 保存：使用结束后，先用纯水替换分析柱中缓冲盐，然后用 20%乙醇保存。为了防止乙醇挥发以及微生物滋生，建

议每 3 个月更换一次新鲜的保存液。

4 在位清洗及储存

4.1 在位清洗

介质使用数次（具体次数与原料的种类和来源及实验要求有关）后，需要对介质进行在位清洗。

- 1) 对于通过离子键强结合的蛋白，可用 3CV 2M NaCl 清洗，并用 3 CV 以上的去离子水清洗；
- 2) 对沉淀蛋白、疏水性结合的蛋白，可用 0.2M~0.5 M NaOH 清洗（与层析介质接触时间 1~2 小时），并用 5 CV 以上平衡液和 3 CV 以上的去离子水清洗。
- 3) 对强疏水性结合的蛋白、脂蛋白和脂类物质，可用 5 CV 以上的 50%乙醇或 30%异丙醇清洗，并用 5 CV-10 CV 以上的去离子水清洗。

4.2 储存

2~8°C 下 20%乙醇中密闭保存。

注：防止乙醇挥发以及微生物生长，建议 3 个月更换一次 20 %乙醇溶液；在装柱、使用和保存柱子的时候，要避免柱子流干或密封不严，防止气泡进入。

5 订货信息

预装柱

货号	产品名称	规格
30-0191-01	Xtrap Mab A	1mL
30-0191-05		5mL
30-0191-01		8x100mm

层析介质

货号	产品名称	规格
20-0191-02	Mab A Crysto	30mL
20-0191-03		100mL
20-0191-04		500mL
20-0191-05		1L
20-0191-07		10L

1. Mab A Crysto 层析介质可提供试用装
2. 如需更大规格或型号定制可联系我公司销售人员



非常感谢您订购科诺赛生物的产品！
如需了解最新产品信息，请拨打服务热线 0532-55679191
或发邮件至 marketing@chromsep.cn
或者登陆官方网站 www.chromsep.cn