

HpyerChrom Resilient ARPA Agarose

产品描述

HpyerChrom Resilient ARPA Agarose 是一款用于抗体纯化的亲和层析介质，通过抗原与抗体之间特异性的相互作用进行分离。该层析介质用于处理高浓度单克隆抗体。

HpyerChrom Resilient ARPA Agarose 拥有高载量、高流速、耐碱的特性：(1)高流速、高动态结合载量缩短了处理时间。(2)修饰的耐碱 rProtein A 配基可耐受 0.5 M NaOH 进行 CIP。

组分和储存条件

Components	PC2004-25 mL	PC2004-100 mL
HpyerChrom Resilient ARPA Agarose	25 mL	100 mL

Store the components at 4°C for 5 years.

产品参数

HpyerChrom Resilient ARPA Agarose层析介质参数

名称	描述
层析介质类型	亲和层析介质
配基	耐碱Protein A
基架	高度交联琼脂糖
平均粒径	85 μm
动态载量	≥ 60 mg人IgG/mL层析介质*
推荐使用流速	90-500 cm/h
最大流速	700 cm/h
耐压	0.3 MPa
使用温度	2-40°C
pH稳定性**	2-14
化学耐受性	Protein A层析中常用的水溶性缓冲液

*动态载量的测量条件：装柱高度：10 cm，保留时间6 min，测试缓冲液：0.02 M NaH_2PO_4 溶液，0.15 M NaCl, pH 7.4，当IgG穿透量达到10%时，单位介质体积 (mL) 的IgG上样量 (mg)。

**层析介质在40°C，pH 2-14环境下放置7天后，其理化性质和功能没有明显变化。

实验操作

1. 缓冲液的准备

缓冲液类型	缓冲液组分
Balance/Bind/Wash Buffer	20 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl, pH7.2
Elution Buffer	0.1 M 柠檬酸钠, pH 3.0-3.6

2. 样品准备

准备要纯化的样本。

3. 层析条件

- 流速选择：根据柱床的高度一般选用 90-500 cm/h 的线性流速。
- 样品前处理：为防止样品堵塞柱子，在上样前样品需要用 0.2/0.45 μm （包涵体破碎后）的微孔滤膜过滤，推荐样品的 pH 和电导率调整到与平衡缓冲液一致（可以采用稀释、超滤以及脱盐的方式调整样品的 pH 和电导率）。

4. 装柱

以下装柱方法适用于实验室规模层析柱的装填：

4.1 装柱所需用品

- (1) 层析介质：HpyerChrom Resilient ARPA Agarose
- (2) 层析空柱：实验室规模层析空柱及装柱器
- (3) 所需溶液：
 - a) 装柱溶液：20%乙醇，0.4 M NaCl 溶液
 - b) 排气溶液：20%乙醇，0.4 M NaCl 溶液
- (4) 装柱工具：砂芯漏斗、搅拌棒、量筒等

4.2 装柱前的准备

- (1) 计算装柱所需层析介质体积 V_m （充分沉降后层析介质部分的体积），计算公式：

$V_m = \text{层析柱横截面积} \times \text{计划装柱的柱床高度} \times \text{层析介质的压缩比。}$

（【注】：*Protein G Agarose Resin 4FF* 的压缩比为 1.15）

- (2) 将层析介质转移至砂芯漏斗中，用约 3 倍层析介质体积的装柱溶液清洗、抽滤，将待装柱层析介质置换到装柱溶液中。
- (3) 制备待装柱层析介质的胶悬液，Protein G Agarose Resin 4FF 层析介质适宜的装柱胶悬液比例

为 45%-55%。为了获得准确的层析介质体积，可以将层析介质置于量筒中沉降过夜或采用低速离心(3000 rpm, 5 min)的方式模拟层析介质自然沉降效果，再进行量取。

(4) 检查待用层析空柱，确保干净、无漏液。

4.3 装柱

(1) 用 20%乙醇，0.4 M NaCl 溶液为柱底滤膜（筛网）排气。

(2) 充分排气后，在柱底接口处拧上堵头或关闭柱底阀，并继续注入少量 20%乙醇，0.4 M NaCl 溶液，至覆盖柱底即可。

(3) 调整层析柱至垂直。

(4) 将柱头连接至层析系统上，通过层析系统提供 5 mL/min 的低流速，用 20%乙醇为柱头滤膜（筛网）排气。

(5) 用搅拌棒充分搅匀制备好的层析介质胶悬液，然后一次性缓慢倒入准备好的层析空柱中。

【注】：如果胶悬液体积超过空柱容积，应使用装柱器或用连接头连接另一根空柱管进行延长。

(6) 将排好气的柱头放入层析柱中，充分贴合胶悬液液面，排除所有气泡。然后拧紧柱头密封圈。

(7) 启动系统泵，调整流速至 600 cm/h，使用液流压紧柱床。期间要控制压力不能超过 0.3 MPa。如超压，需要降低流速（流速换算见下表）。

层析内径 体积流速 线性流速	10 mm	16 mm	26 mm	50 mm
	60 cm/h	0.8 mL/min	2.0 mL/min	5.3 mL/min
100 cm/h	1.3 mL/min	3.3 mL/min	8.8 mL/min	32.7 mL/min
150 cm/h	2.0 mL/min	5.0 mL/min	13.3 mL/min	49.1 mL/min
200 cm/h	2.6 mL/min	6.7 mL/min	17.7 mL/min	65.4 mL/min
300 cm/h	3.9 mL/min	10.0 mL/min	26.5 mL/min	98.1 mL/min
600 cm/h	7.9 mL/min	20.1 mL/min	53.1 mL/min	196.3 mL/min

Table 1 不同规格层析柱流速换算表

(8) 待柱床稳定后(胶面不再下降)，标记此时胶面位置。停泵，将柱头下压至标记位置以下 3-5 mm 即可。

(9) 重新给予 600 cm/h 的流速，如胶面不再下降，即完成装柱。若胶面下降，则重复步骤 8-9。

【注】：推荐工作流速不超过装柱流速的 75%。

5. 柱效测定（可选项）

选择下表所示的两种测试方法中的一种进行柱效测试。使用流动相平衡层析柱至基线平稳，将样品加载到层析柱中，继续使用流动相进行冲洗，待色谱峰出完至回到基线后，结束运行，对色谱峰进行积分，评价装柱效果。

Table2 两种柱效测定方法统计表

	丙酮法	NaCl 法
样品	1% (v/v)丙酮水溶液	2 M NaCl 水溶液
样品体积	1%柱体积	1%柱体积
流动相	水	0.2 M NaCl 水溶液
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测器	UV 280 nm	电导率

装柱效果的主要评价标准是 N/m (每米塔板数)和 A_s (对称因子), 其计算方法如下:

$$\frac{N}{m} = 5.54x\left(\frac{V_R}{W_h}\right)^2 \times \frac{1}{L}$$

$$A_s = b/a$$

柱效合格标准: $N/m > 3000$ 、 $0.8 < A_s < 1.5$

*参数注释:

L = 柱高、 V_R = 保留体积、 W_h = 半高峰宽、 a = 在 10%峰高处的左侧半峰宽、 b = 在 10%峰高处的右侧半峰宽

6. 层析步骤

- (1) 平衡: 使用 Balance/Bind/Wash Buffer 充分平衡层析柱至 pH 和电导率稳定, 并与平衡缓冲液基本一致, 该步骤通常需要 3-5 倍柱体积。
- (2) 上样: 根据小试实验测得的结合载量, 确定样品在 HpyerChrom Resilient ARPA Agarose 上的上样体积和上样量。
- (3) 洗杂: 用 Balance/Bind/Wash Buffer 或其它适宜的缓冲液, 冲洗层析柱至 UV 稳定并回归基线。
- (4) 洗脱: 采用降低 Elution Buffer 的 pH 进行洗。
- (5) 再平衡: Balance/Bind/Wash Buffer 再次平衡层析柱。

7. 清洗与再生

随着层析介质的使用次数增加, 污染物(如: 脂质、内毒素、蛋白质等)在层析柱上不断累积。定期的在位清洗对保持层析柱稳定的工作状态至关重要。根据层析介质的污染程度确定在位清洗的频率(如果污染严重, 建议每次使用之后都应该进行在位清洗, 以保证结果重复性和延长层析介质工作寿命)。

建议清洗条件如下:

- 用 3 个柱体积的 Balance/Bind/Wash Buffer 冲洗层析柱。
- 用至少 2 个柱体积 0.5 M NaOH 冲洗层析柱 10-15min。
- 立即用至少 5 个柱体积的无菌 Balance/Bind/Wash Buffer 冲洗层析柱, pH 7-8。

8. 灭菌

为了降低微生物负荷，采用 0.5 M NaOH，对层析介质进行处理，处理时间 15~30 min，以达到灭菌的目的。

9. 储存

未开封的层析介质，请保存在原容器中；已经装填好的层析柱，先用 20%乙醇溶液浸泡，再关闭上下柱头。保存环境为 2~8℃。

10. 销毁与回收

- 由于 HpyerChrom Resilient ARPA Agarose 层析介质在自然界很难降解，为了保护环境建议对废弃的层析介质采用焚烧处理。
- 对于接触了病毒、血液等生物活性样本的层析介质，请先遵循当地生物安全性要求处理后，再进行销毁或处理。

■ 注意事项

1. 建议纯化所用缓冲液和蛋白溶液经 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤后上柱使用。
2. 本产品仅限科研用途使用。

APExBIO Technology

www.apexbt.com

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: info@apexbt.com