



# TOYOPEARL® 层析填料： 抗体纯化工艺中的理想选择

- TOYOPEARL® AF-rProtein A HC-650F
- TOYOPEARL AF-rProtein L-650F
- TOYOPEARL Sulfate-650F
- TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F

色谱层析专家

TOSOH BIOSCIENCE

## TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F

### 一款兼具高吸附载量与工艺经济性的 Protein A 填料

Protein A 层析法是目前应用最为广泛的亲和层析法。它对抗体 Fc 区域具有高亲和力，是其成为抗体纯化工艺中首选的主要原因。

随着近年来用于慢性病治疗的生物药越来越多地使用到单克隆抗体 (mAb)，这加大了 Protein A 层析填料的市场需求。

由于 Protein A 是单抗纯化工艺中最昂贵的填料，一款高吸附载量的 Protein A 填料可以显著降低总的纯化工艺成本。为此，科学家们一直致力研发在不同流速下仍然具有高回收率、高载量的 Protein A 填料。

TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 是一款用于单克隆抗体纯化、聚甲基丙烯酸酯基质的高载量型 Protein A 填料。表 1 中列出了该填料的基本参数和动态吸附载量等数据。

#### TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 的优势：

- 高吸附载量：最高吸附载量可达 70 g/L。
- 降低操作成本：可装填成更短的柱子减少填料使用量。
- 优秀的回收率：在 65 g/L 载样量下回收率可达 90%。
- 耐碱性高：使用寿命长，提高工艺经济性。
- 良好的压力-流速特性：低压降使操作更具灵活性。
- 配基脱落率低：保证了填料的有效载量和使用寿命。
- 对多个单克隆抗体亚型有高亲和性：能与更多的单克隆抗体亚型结合，包括山羊和大鼠的 IgG。

表 1. TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 的产品基本参数

粒径：	45µm
孔径：	100 nm
动态吸附载量 DBC (5 min)：	70 g/L
DBC (2 min)：	50 g/L
耐碱性：	> 200 CIP 循环 (0.1 mol/L NaOH)
最大耐压：	0.3 MPa

#### 高动态吸附载量

我们将 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 与另外一款市售其他品牌的 Protein A 填料就动态吸附载量 (DBC) 方面做了对比研究，结果详见表 2。结果表明，TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 具有更高的 DBC。在柱留时间 2 分钟时该款填料的 DBC 为 50g IgG/L、柱留时间为 5 分钟时 DBC 可达 70 g/L。比市售其他品牌填料的动态吸附载量高出了将近 20%。

表 2. TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 与其他市售品牌 Protein A 填料的 DBC 比较

填料	厂家	粒径	DBC-2 min (g/L)	DBC-5 min (g/L)
TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F	Tosoh Bioscience	45 µm	50	70
TOYOPEARL AF-rProtein A-650F	Tosoh Bioscience	45 µm	30	40
市售其他品牌	G公司	85 µm	30	58



## 降低工艺成本

TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料具有高动态吸附载量，因此无需在 20cm 的典型柱床高度范围内进行装填。降低装柱高度，则可以减少填料使用量。从表3中的比较数据可以看出，在纯化工艺中使用高载量型 Protein A 填料可以显著降低生产成本。

表3. 使用 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 与其他品牌填料的生产成本比较

填料	柱床高度 (cm)	柱直径 (cm)	柱体积 (L)	压缩比	装柱所需填料体积	每升填料成本*	成品柱价格	DBC at residence time (g/L)	柱容量 80% DBC (g)	柱留时间 (min)
TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F	15	36	15	1.25	20	\$12,000	\$240,000	60	732	3
Resin X	21	40	26	1.16	31	\$12,000	\$372,000	35	739	3

\*实际价格请咨询我公司在您所在国家或地区的经销机构。

## 优良的回收率

TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 对单克隆抗体具有优良的回收率，在接近填料载量的进样水平下具有出色的回收率，且不会增加抗体聚集的风险（表4）。使用人员能够充分利用该填料来增加载量，不仅不会影响质量，还可以提高抗体捕获步骤的捕获率。

表4. TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F的载量和回收率

载量	% 单体	% 回收率
35 g/L	96.1	87.2
50 g/L	96.8	86.5
65 g/L	96.1	89.5

## 高耐碱性

TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 能够耐受300次在线清洗（CIP）循环。每一个循环使用 0.2 mol/L NaOH 溶液进行清洗，接触时间为 15 分钟。从图1中可以看到，在第一个 CIP 循环之前 DBC 设置为 100%，在 200 次 CIP 循环后 DBC 无明显降低。该数据表明，TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 在 NaOH 溶液中稳定性高，保证了较长的使用寿命，提高了工艺的经济性。

## 优秀的压力—流速稳定性

TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 是以亲水性树脂 TOYOPEARL HW-65 系列为骨架，具有优秀的压力-流速特性（图2）。TOYOPEARL 亲和填料的孔径为 100nm，最大可容纳分子量为  $5 \times 10^6$  的球状蛋白。此外，半刚性的 TOYOPEARL 亲和填料最大耐压可达 0.3 MPa。

图1. TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 的耐碱性

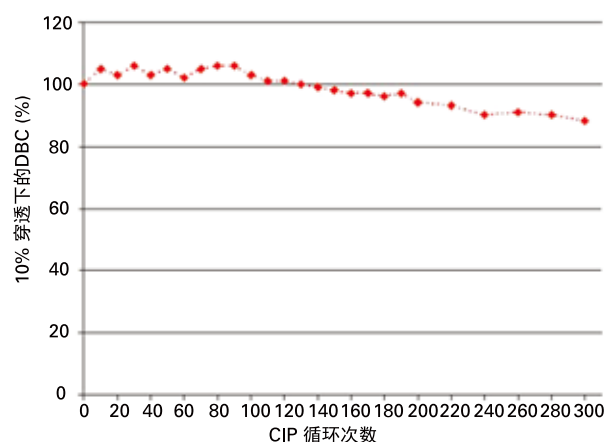
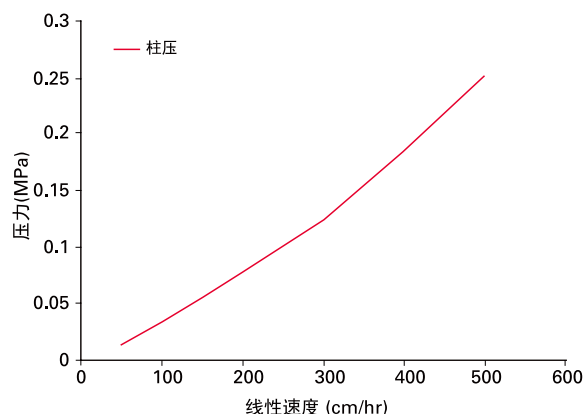


图2. TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 的压力-流速曲线

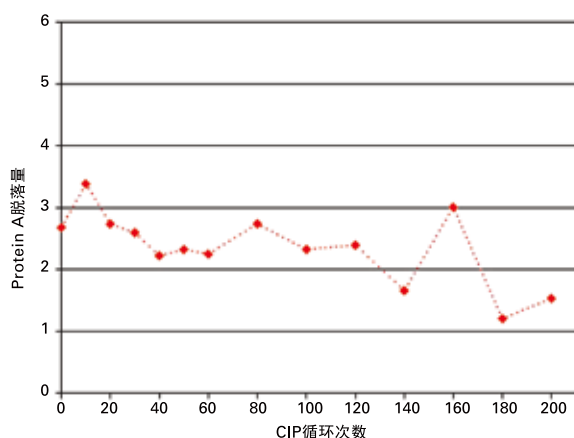


## 低配基脱落率

图 3 中显示了 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 在使用 0.2 mol/L NaOH 进行 200 次 CIP 清洗过程中，每次循环间的配基脱落量。

随着 CIP 循环次数的增加，洗脱物中的配基量也在减少。这表明 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料具有非常稳定的配基结合，能够满足生物制药工业对配基脱落性能要求。这也证明了此款填料的有效使用寿命较长。

图 3. TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 的低配基脱落率



## 对更多 mAb 亚型具有高亲和力

TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 的重组 Protein A 配基是对 C 结构域进行改造后的六量体，所以该填料对绝大多数抗体都具有亲和力，而天然 Protein A 和其他重组 Protein A 配基则没有这种能力。例如，TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 对大鼠和山羊的不同抗体亚型具有高亲和力，而天然 Protein A 对其则没有任何亲和力，详见表 5。

表 5. TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 配基对 mAb 亚型具有广泛的亲和力

物种	类别	重组 Protein A 配基	天然 Protein A
Human	IgG <sub>1</sub>	+++++	++++
	IgG <sub>2</sub>	+++++	++++
	IgG <sub>3</sub>	-	-
	IgG <sub>4</sub>	+++++	++++
Mouse	IgG <sub>1</sub>	++++	+
	IgG <sub>2a</sub>	+++++	++++
	IgG <sub>2b</sub>	+++++	+++
	IgG <sub>3</sub>	++++	++
Rat	IgG <sub>1</sub>	++++	-
	IgG <sub>2a</sub>	-	-
	IgG <sub>2b</sub>	+++	-
	IgG <sub>2c</sub>	++++	-
Goat	IgG <sub>s</sub>	++++	-
Chicken	IgY	-	-
Rabbit	IgG	+++++	++++

## 订购信息

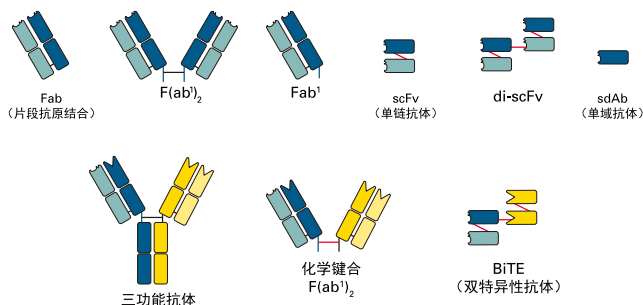
货号	产品名称
23425	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F, 10 mL, 45 μm
23426	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F, 25 mL, 45 μm
23427	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F, 100 mL, 45 μm
23428	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F, 1 L, 45 μm
23429	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F, 5 L, 45 μm
45161	MiniChrom AF-rProtein A HC-650M, 5 mL
23430	ToyoScreen AF-rProtein A HC-650F, 1 mL × 5
23431	ToyoScreen AF-rProtein A HC-650F, 5 mL × 1
23432	ToyoScreen AF-rProtein A HC-650F, 5 mL × 5
OC41MDAFPA-650F	HC Protein A 20 μL 96-well Plate Kit
45063	ToyoScreen RoboColumn AF-rProtein A HC-650F, 8 × 200 μL
45064	ToyoScreen RoboColumn AF-rProtein A HC-650F, 8 × 600 μL

## TOYOPEARL AF-rProtein L-650F

### 对不含有Fc区域的mAb片段具有高吸附载量的耐碱型Protein L填料

像单域抗体 (dAbs)、抗原结合片段 (Fabs) 和单链抗体 (scFv) 这些抗体片段，在某些治疗方案中比完整的抗体更加合适。科学家们可以结合这些片段创造更强大的抗体，如双特异性 (双功能) 单克隆抗体 (BsMAb或BsAb)，如图4所示。此类抗体不仅可以有效靶向结合目标分子，而且能够靶向结合多种抗原，目前正被广泛应用于癌症免疫治疗法和靶向药物输送领域。

图4. 双特异性抗体的类型：三功能抗体、化学键合的Fab和双特异性T细胞衔接器。(蓝色和黄色部分来自单独的单克隆抗体)



然而，纯化这些片段存在一些挑战。Protein A亲和层析填料对Fc区域有高亲和力，是纯化含有Fc区域完整抗体的黄金标准。Protein A无法用来纯化dAb、Fab和scFv这些不含有Fc区域的抗体片段，而Protein L填料可以与含有dAb、Fab和scFv的轻链特异性结合抗体，所以通常采用Protein L填料来纯化这些片段。由于重链中没有任何部分 (如Fc) 可以与Protein L相结合，所以Protein L填料相比Protein A、Protein G可以结合的抗体种类范围更广。Protein L填料能够与几乎所有抗体类别，包括IgG、IgM、IgA、IgE和IgD，发生亲合作用并且结合到kappa轻链的可变区域而不干扰抗原结合位点。

TOYOPEARL AF-rProtein L-650F填料是将重组的Protein L配基键合到刚性的TOYOPEARL聚合物基质的填料上。其主要特征如表6所示。

表6. TOYOPEARL AF-rProtein L-650F填料的产品基本参数

孔径:	100 nm
粒径:	45 μm (F级)
最大耐压:	0.3 MPa
出货状态:	20 %乙醇
pH范围:	2-13

TOYOPEARL AF-rProtein L-650F克服了其他市售Protein L填料存在的种种缺陷，如配基对碱性溶液的不稳定和低载量、填料成本占整体生产成本的很大一部分等。TOYOPEARL AF-rProtein L-650F填料的高载量、优异的重现性和强耐碱性，可显著提高抗体类产品的生产工艺经济性。

#### TOYOPEARL AF-rProtein L-650F的优势:

- 高耐碱性：最高可耐受0.1 mol/L NaOH
- 高动态吸附载量：最高可吸附50 g/L的Fab
- 对多种mAb具有广泛的亲和力：结合所有含有κ (Kappa) 轻链的抗体片段 (Fab、scFv、dAb)，包括IgM和IgA
- 优秀的压力-流速稳定性：低压降使操作更具灵活性
- 一步纯化后的样品纯度高：scFv和Fab的纯度 > 98 %

## 高耐碱性

TOYOPEARL AF-rProtein L-650F填料的配基结构如图5所示，Protein L配基是多位点结合于填料骨架上，因此具有良好的化学稳定性。图6中比较了TOYOPEARL AF-rProtein L-650F与市售其他品牌Protein L填料分别在0.1 mol/L NaOH碱性溶液中的稳定性。

图5. TOYOPEARL AF-rProtein L-650F填料的结构

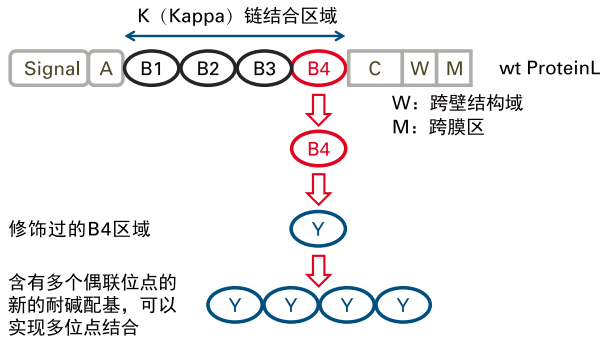
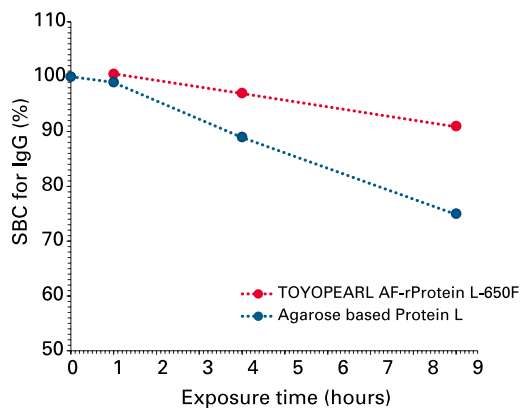


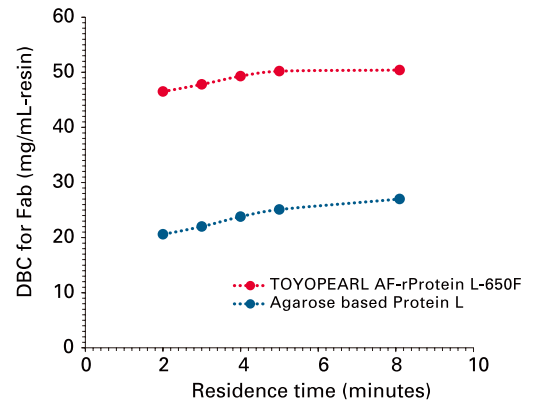
图6. TOYOPEARL AF-rProtein L-650F的耐碱性



## 高动态吸附载量

图7中可以看到，相比琼脂糖类Protein L填料，TOYOPEARL AF-rProtein L-650F在不同驻留时间对Fab片段均具有优异的吸附能力。对一个分子量为55kDa的Fab的动态吸附载量约为50 mg/mL，从分子结合能力可以推断出，该填料对150 kDa的IgG的动态吸附载量甚至可达到130 mg/L以上。

图7. 对Fab的动态吸附载量



## 对各种mAb具有广泛的亲和力

如表7中所示，TOYOPEARL AF-rProtein L-650填料的重组Protein L配基还对多种抗体亚型具有亲和力。

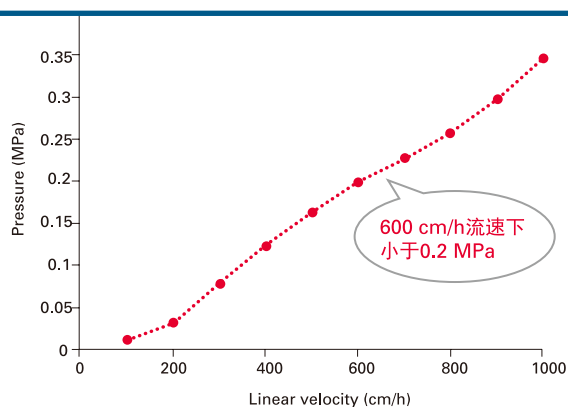
表7. TOYOPEARL AF-rProtein L-650F配基对多种mAb亚型具有亲和力

物种	类别	亲和力
通用	Kappa轻链	++
	Fab	++
	ScFv	++
	Dab	++
人	IgG <sub>(1-4)</sub>	+
	IgA	+
	IgD	+
	IgE	+
	IgM	+
小鼠	IgG <sub>1</sub>	+
	IgG <sub>2a</sub>	+
	IgG <sub>2b</sub>	+
	IgA	+
	IgM	+
大鼠	IgG	+
	IgG <sub>2a,b,c</sub>	+
	IgA	+
母鸡	IgM	+
	IgY	+

## 优秀的压力-流速稳定性

TOYOPEARL AF-rProtein L-650F填料基质为刚性较强的聚甲基丙烯酸酯。图8显示了在4.4 cm内径，柱床高度为28 cm的层析柱上的压力-流速曲线。数据表明此款填料线性流速可高达600 cm/h。

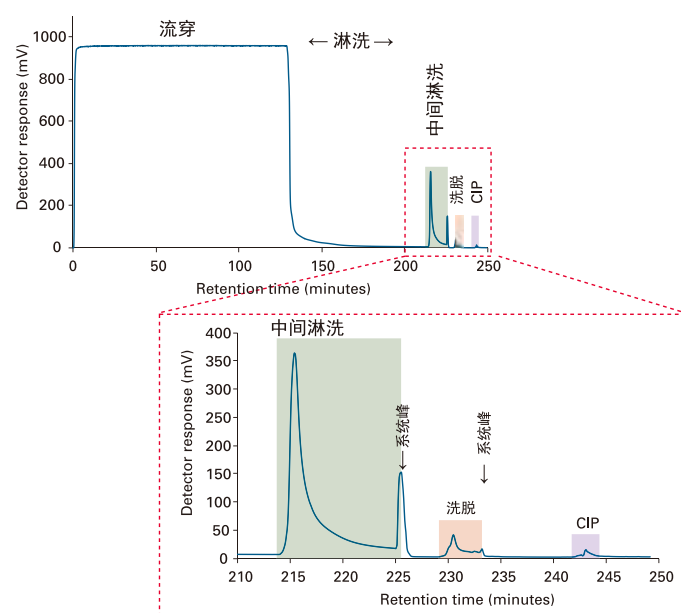
图8. TOYOPEARL AF-rProtein L-650F 的压力-流速曲线



## 样品纯度高

由哺乳动物细胞表达的scFv 过滤后，将样品进样到TOYOPEARL AF-rProtein L-650F层析柱中。驻留时间约为1.4分钟，梯度洗脱。收集中间淋洗峰、系统峰、洗脱峰和CIP峰后，用于进一步分析，如图9所示。

图9. TOYOPEARL AF-rProtein L-650F捕获scFv片段

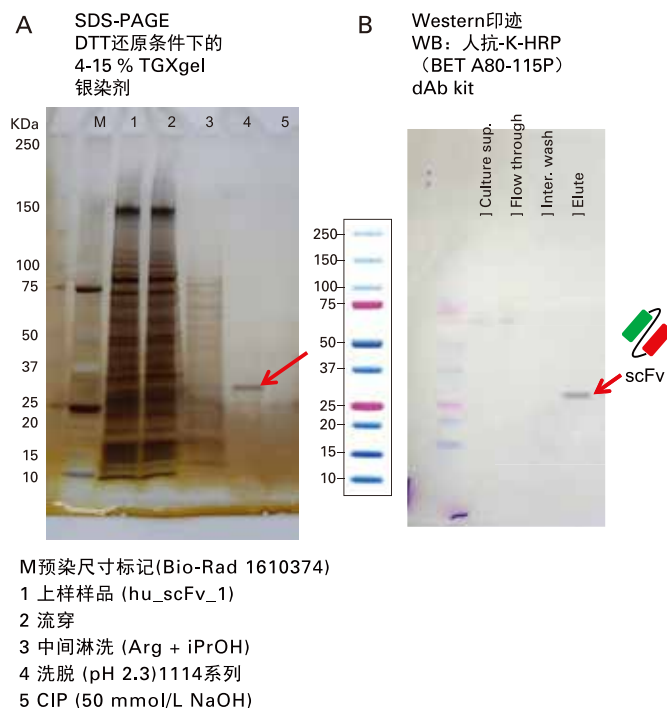


填料:	TOYOPEARL AF-rProtein L-650F
层析柱尺寸:	5 mm ID × 2.5 cm (0.5 mL)
平衡和淋洗:	0.1 mol/L Na-citrate, pH 6.5
中间淋洗:	0.1 mol/L Na-citrate, pH 6.5 + 1 mol/L Arg-HCl, 10% iPrOH
洗脱:	0.1 mol/L Citrate, pH 2.3
CIP:	0.05 mol/L NaOH
流速:	0.35 mL/min (residence time = 1.4 min)
检测:	UV @ 280 nm
样品:	hu-scFv1 CHO culture sup. 40 mL

将收集到的组分通过DTT还原后进样到4-15% TGXgel上。使用银染色试剂盒对其进行染色。数据显示，洗脱峰（图10，A组，第4道）仅有一条带，分子量约为26 kDa。这表明只有含约26 kDa分子的样品会被填料捕获。数据表明这是scFv。

图10中B组显示的是Western免疫印迹数据，使用人抗-K-HRP Kit通过dAB染色来确定该26 kDa洗脱峰是否属于scFv。Western印迹分析结果再次验证了人抗-K-HRP与该26 kDa单带之间的相互作用（参见图10，B组）。根据来自银染色后的SDS-PAGE和Western的印迹数据，证实了该26 kDa分子是scFv融合蛋白。scFv融合蛋白的产率预计达到98%以上。

图10. TOYOPEARL AF-rProtein L-650F 鉴定scFv片段的分子量和纯度



## 订购信息

货号	产品名称
23486	TOYOPEARL AF-rProtein L-650F, 10 mL, 45 μm
23487	TOYOPEARL AF-rProtein L-650F, 25 mL, 45 μm
23488	TOYOPEARL AF-rProtein L-650F, 100 mL, 45 μm
23489	TOYOPEARL AF-rProtein L-650F, 1 L, 45 μm
23490	TOYOPEARL AF-rProtein L-650F, 5 L, 45 μm
45162	MiniChrom AF-rProtein L-650M, 5 mL
23494	ToyoScreen AF-rProtein L-650F, 1 mL × 5
23495	ToyoScreen AF-rProtein L-650F, 5 mL × 1
23496	ToyoScreen AF-rProtein L-650F, 5 mL × 5
OC41MDAFPL-650F	Protein L Plate 20 μL 96-well Kit
45065	ToyoScreen RoboColumn AF-rProtein L-650F, 8 × 200μL
45066	ToyoScreen RoboColumn AF-rProtein L-650F, 8 × 600μL

## TOYOPEARL Sulfate-650F

### 高效捕获和去除mAb多聚体的阳离子交换层析填料

离子交换色谱常被用作单克隆抗体纯化的中间步骤，用于去除蛋白多聚体、宿主细胞蛋白（HCP）和脱落的Protein A配基。目前生物制药的行业趋势专注于开发可持续的下游工艺。该领域的科学家们通常会在Protein A纯化步骤之后，依次使用阳离子交换（CEX）和阴离子交换（AEX）层析来进一步精纯mAb。

TOYOPEARL Sulfate-650F是一款新型的强阳离子交换层析填料，具有高捕获mAb多聚体、高耐盐性、较宽的pH范围以及高载量等优势。TOYOPEARL Sulfate-650F填料的孔径为100 nm，其独特的键合技术，使该填料特别适合在Protein A纯化步骤之后一步去除多聚体。表8中显示了该填料的产品特性。

表8. TOYOPEARL Sulfate-650F的产品基本参数

孔径:	100 nm
粒径:	45 $\mu\text{m}$ (F级)
最大耐压:	0.3 MPa
出货状态:	20 % 乙醇
pH范围:	2-13

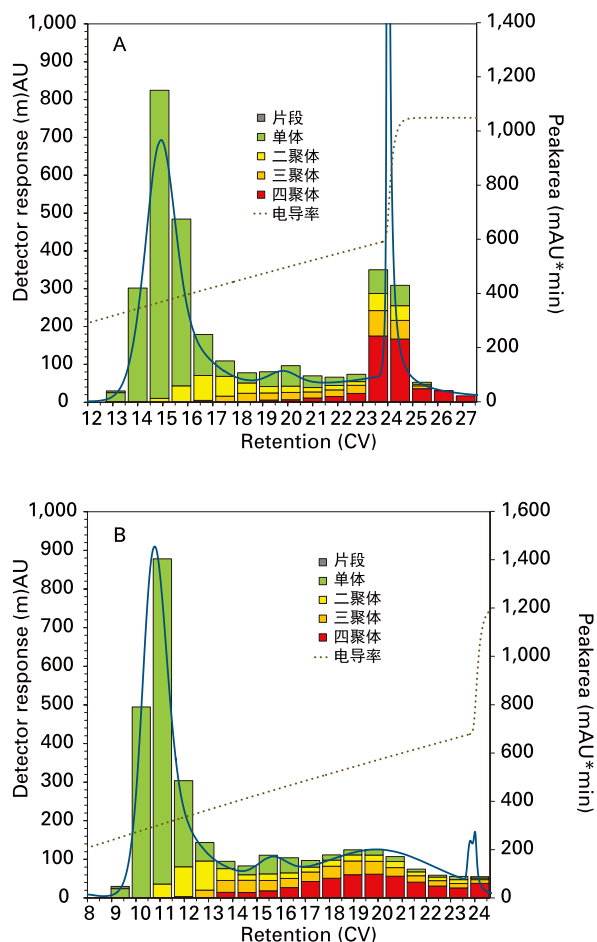
### TOYOPEARL Sulfate-650F的优势:

- 有效去除IgG多聚体：可达到10倍以上的去除率
- 具有较宽的pH范围：在pH 5.0~6.0下对IgG的吸附效果良好
- 高动态吸附载量：> 120 g/L的IgG
- 高耐盐性：在 $\geq 150$  mmol/L的盐浓度下可以直接上样
- 优秀的压力-流速稳定性：流速>600 cm/hr时，压力仅为0.2 MPa
- 高pH下的耐久性：可在0.5 mol/L NaOH浸泡长达60天而不影响填料的吸附载量

### 有效去除IgG中的多聚体

TOYOPEARL Sulfate-650F填料可有效去除IgG中的多聚体(图11)。经Protein A纯化后的IgG样品进样到TOYOPEARL Sulfate-650F的层析柱上，使用ÄKTA系统纯化后收集组分并使用TSKgel G3000SW<sub>XL</sub>色谱柱进一步分析。实验结果表明，TOYOPEARL Sulfate-650F比市售其他品牌的SO<sub>3</sub><sup>-</sup>类填料对mAb多聚体有更强的吸附力，更加适合于mAb单体和多聚体的分离纯化。

图11. IgG单体和多聚体的高分辨率分离



填料: A: TOYOPEARL Sulfate-650F B: 市售其他品牌SO<sub>3</sub><sup>-</sup>填料  
 层析柱尺寸: 6.6 mm × 20 cm (6.8 mL)  
 流动相: A: 0.1mol/L醋酸钠, pH 5.0 B: 流动相A + 1 mol/L NaCl  
 梯度: 0-50 % B, 20 CV 100 % B, 5 CV  
 流速: 300 cm/hr (4 min柱留时间)  
 检测: UV (280 nm), 电导率 (mS/cm)  
 温度: 室温  
 进样量: 6.8 mL (10 mg/mL-resin load ratio)  
 样品: Protein A纯化后的IgG, 10 g/L  
 仪器: ÄKTA avant 25

使用260 mmol/L NaCl，洗脱9个柱体积后对单体峰进行SEC分析。我们用SEC分析柱对高分子量杂质、HCP和Protein A脱落量的变化情况进行了分析。表9中显示了使用TOYOPEARL Sulfate-650F纯化后，收集到的IgG中的HMW、HCP和Protein A配基含量有显著减少。这一结果表明TOYOPEARL Sulfate-650F填料可以有效去除和减少IgG中的杂质。

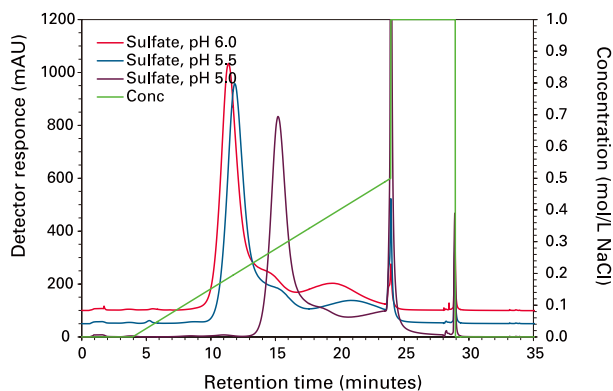
表9. TOYOPEARL Sulfate-650F纯化后IgG样品中杂质含量有所减少

杂质	ProA 纯化后	Sulfate纯化后
二聚体 (%)	3.9	2.4
HMW (%)	0.54	0.07
HCP (ppm)	1260	134
ProA (ppm)	1.2	0.040

## pH耐受范围广

TOYOPEARL Sulfate-650F专有的键合技术加上硫酸根基团的强阳离子特性，使该填料在较宽的pH范围内依然能够保持对IgG的吸附-洗脱曲线。如图12所示，驻留时间发生了偏移，但分离选择性保持不变。这也为客户提供了更多的优化空间来选择适合自己样品的pH值。

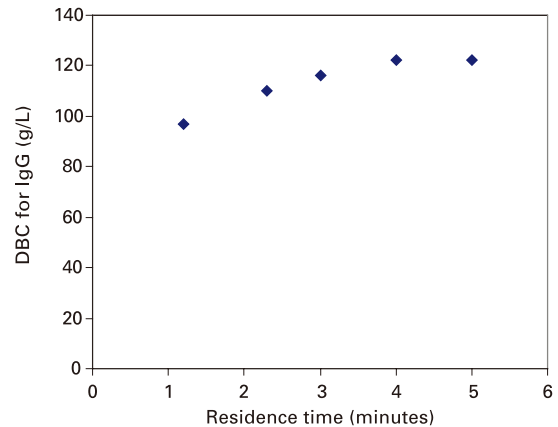
图12. 在较宽的pH范围下纯化



## 高动态吸附载量

图13中可以看出，即使在高流速下，TOYOPEARL Sulfate-650F对IgG依然有着非常高的动态吸附载量。

图13. 在不同流速下的动态吸附载量

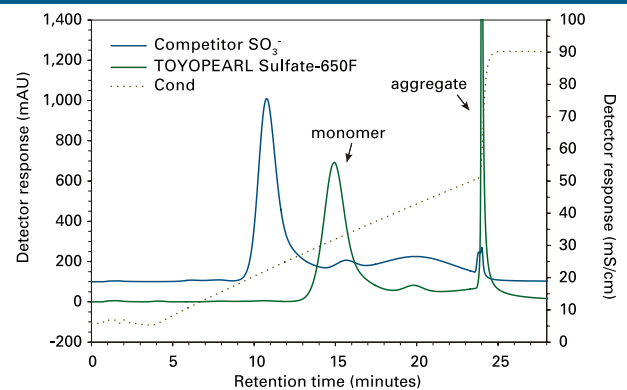


填料: TOYOPEARL Sulfate-650F  
 层析柱尺寸: 6.0 mm I.D.X 4 cm  
 流动相: 0.15 mol/L NaCl + 0.054 mol/L 醋酸盐缓冲液, pH 4.7  
 样品: 多克隆人IgG, 1.0 g/L

## 高耐盐

图14中显示了TOYOPEARL Sulfate-650F与另外一种阳离子交换填料的耐盐性对比情况。在TOYOPEARL Sulfate-650F的层析柱中，mAb单体在0.3 mol/L NaCl浓度下开始出峰，而另一种阳离子交换填料的出峰浓度为0.15 mol/L，这表明Sulfate-650F更具有耐盐性。

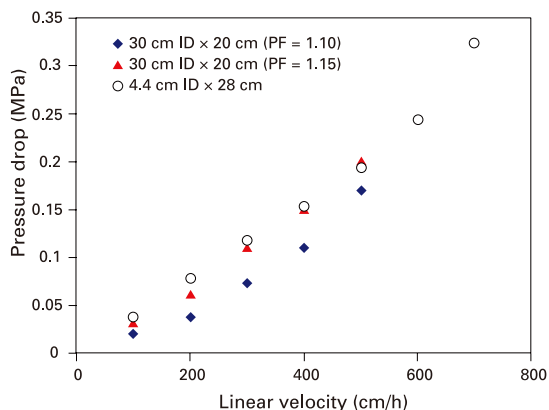
图14. 耐盐性比较



## 优秀的压力-流速稳定性

图15显示了TOYOPEARL Sulfate-650F填料优秀的压力-流速曲线。在大型制备层析柱上，流速为600 cm/hr时，压力仅为0.2 MPa。

图15. 大型层析柱的压力-流速曲线

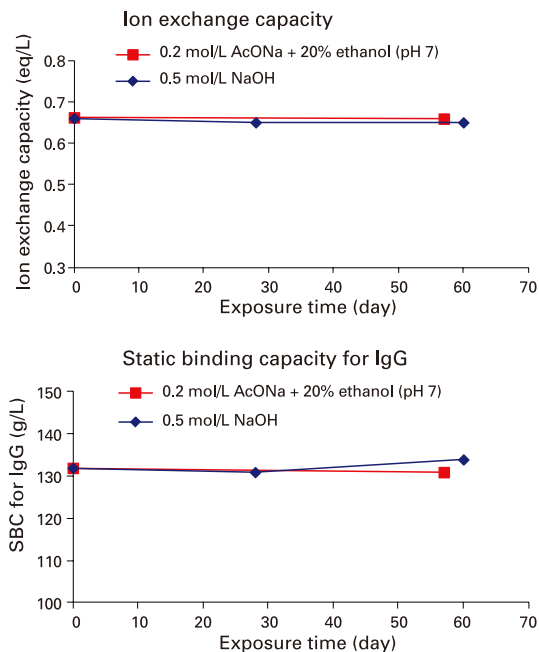


层析柱: AxiChrom 30 cm ID x 20 cm QuickScale 4.4 cm ID x 28 cm  
 填料装填压缩比 (PF): 1.10 或 1.15  
 装填缓冲液: 含0.2 mol/L NaCl; 均浆浓度为50%

## 高pH下的耐久性

TOYOPEARL Sulfate-650F在0.5 mol/L NaOH条件下存储长达8周而不影响填料的吸附载量 (图16)。

图16. TOYOPEARL Sulfate-650F的耐碱稳定性



## 订购信息

货号	产品名称
23467	TOYOPEARL Sulfate-650F, 100 mL, 45 μm
23468	TOYOPEARL Sulfate-650F, 250 mL, 45 μm
23469	TOYOPEARL Sulfate-650F, 1 L, 45 μm
23470	TOYOPEARL Sulfate-650F, 5 L, 45 μm
23471	TOYOPEARL Sulfate-650F, 50L, 45 μm
45117	MiniChrom TOYOPEARL Sulfate-650F, 5 mL
23472	ToyoScreen Sulfate-650F, 1 mL x 6
23473	ToyoScreen Sulfate-650F, 5 mL x 6
OC41MDSLFT-650F	Sulfate-650F 20 μL 96-well Plate Kit
45027	ToyoScreen RoboColumn Sulfate-650F, 8 x 200 μL
45028	ToyoScreen RoboColumn Sulfate-650F, 8 x 600 μL

## TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F

### 高效清除内毒素和病毒的耐盐型阴离子交换层析填料

通常来说，带有季胺基团或DEAE官能团的阴离子交换填料会被用于去除mAb中的杂质，但这些填料的缺点是在相对较高盐浓度下会降低样品的吸附载量，例如在Protein A纯化后单克隆抗体或未经稀释的生物样品直接上样时会遇到这样的问题。如要在这些工艺阶段中使用DEAE或季胺基的填料，必须对样品进行稀释，将其电导率调整至约5 mS/cm 左右甚至更低。

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F是一种可用于生产规模的耐盐型阴离子交换层析填料。该填料非常适合于mAb和其他蛋白的中间纯化，可从目标产物中一步去除多聚体和其他带负电荷的杂质（如DNA、内毒素和病毒），无需在上样前进行稀释步骤。该款填料是以TOYOPEARL HW-75F尺寸排阻填料为骨架，键合了伯胺基官能团。该款填料能够在电导率高达15 mS/cm条件下保有吸附能力。表10中显示了该填料的产品特性。

表10. TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F的产品基本参数

粒径:	30-60 μm
孔径:	> 100 nm
离子交换容量 (eq/L resin):	0.07- 0.13
SBC (g/L resin):	≥70

#### TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F的优势:

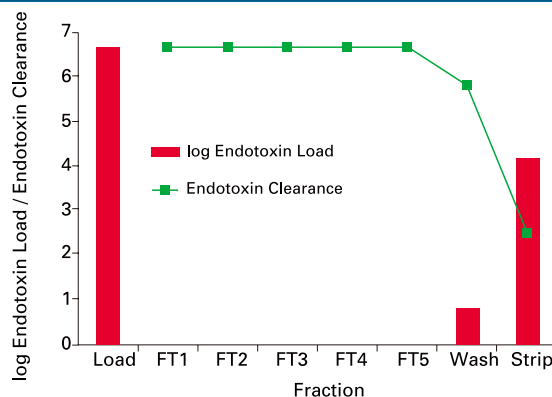
- 有效去除内毒素和病毒：流穿模式下可以清除4个数量级以上
- 去除mAb多聚体：吸附-洗脱和流穿模式均可
- 高耐盐性：含有≥150 mmol/L NaCl的缓冲液中直接上样
- 优秀的压力-流速稳定性：最大流速可达600 cm/hr
- 耐碱性：可在0.5-1.0 mol/L NaOH中浸泡

#### 有效去除内毒素

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F在流穿模式下可以非常有效地去除内毒素。为了证明这点，我们在水中制备了大肠杆菌脂多糖溶液，使其起始内毒素浓度为89,000 EU/mL，总载入量为4,450,000 EU (89,000 EU/mL×50mL)。然后向层析柱中注入该溶液，并收集2CV (10mL) 的流穿组分。同时还收集了淋洗和清洗步骤中的组分。

该过程各步骤中内毒素去除率的Log数如图17所示，流穿组分的内毒素浓度小于LAL分析的检测限值 (0.1 EU/mL)；因此，各流穿组分的最小Log值为6.7。尽管在淋洗步骤中内毒素有一些流穿（该部分降低的Log值为5.82），但这表示原始样品流穿的内毒素水平已经小于0.0002%。

图17. 使用TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F去除内毒素



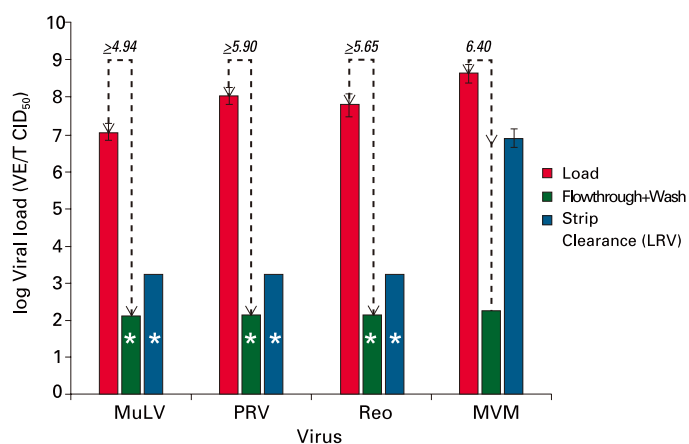
填料: TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F  
 层析柱: MiniChrom, 8.0 mm ID × 10 cm (5.0 mL)  
 流动相: A: 20 mmol/L Tris base, pH 7.4  
 B: 20 mmol/L Tris base + 1 mol/L NaCl, pH 7.4  
 流速: 150 cm/hr (1.25 mL/min, 4 min柱留时间)  
 检测: LAL内毒素检测  
 温度: 室温  
 进样量: 5×2 CV(10 mL)进样量 10 CV(50 mL)总量  
 样品: 平衡溶液中89,000EU/mL LPS  
 仪器: ÄKTA Explorer 100

## 有效去除病毒

我们使用了两个层析步骤来验证单克隆抗体纯化中，对四种模型病毒的去除效果。我们对样品进行了加标/追踪实验研究，即将已知量的病毒加入到未纯化的样品中，然后在纯化后对剩余的病毒进行定量。

向经过Protein A纯化后的mAb中加入1% (Reo, MVM) 或5% (MuLV, PRV) (v/v)，然后进样。如图18所示，TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F填料有效去除了所有的病毒，去除率>4 Log。

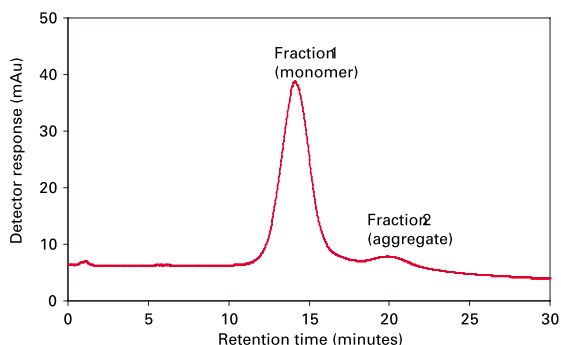
图18. TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F在流穿模式下的病毒清除率



## 去除mAb多聚体

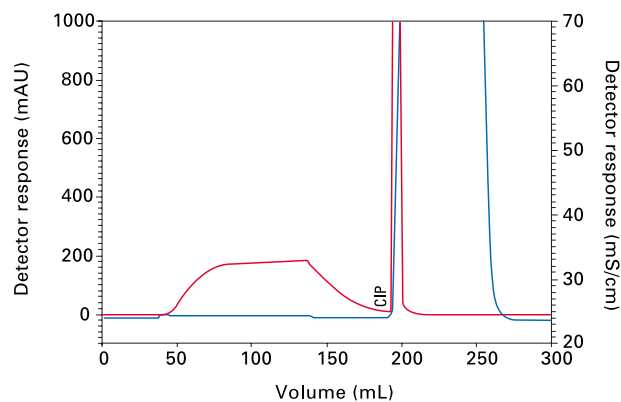
如图19a和图19b所示，TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F在吸附、洗脱模式以及流穿模式下均能有效去除mAb中的多聚体。对组分峰的SEC分析结果显示 (数据未显示)，已完全将多聚体从mAb主峰中去除。

图19a. TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F去除IgG1单体中的多聚体



填料: TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F  
 层析柱尺寸: 5 mm ID × 5 cm  
 流动相: A:20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; B:流动相 A + 1.0 mol/L NaCl  
 梯度: 0 - 100% B (60 min)  
 流速: 300 cm/hr (1.0 mL/min)  
 检测: UV @ 280 nm  
 温度: 室温  
 样品: mAb (IgG1), 0.5 g/L

图19b. TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F去除mAb单体中的多聚体

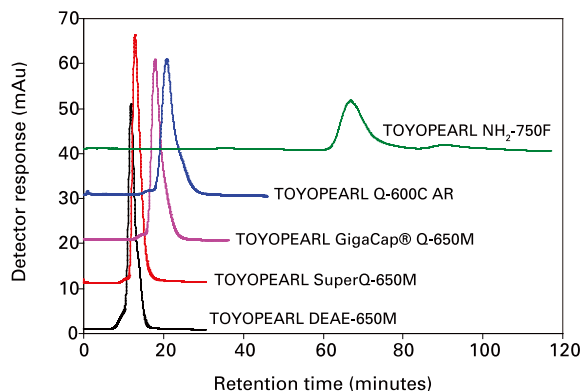


填料: TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F  
 层析柱尺寸: 6.6 mm ID × 6 cm  
 流动相: A:10 mmol/L Tris-HCl, 250 mmol/L NaCl, pH 7.0; B:1.0 mol/L NaOH (CIP)  
 梯度: 等度  
 流速: 300 cm/hr (1.71 mL/min)  
 检测: UV@280 nm, 电导率  
 温度: 室温  
 样品: mAb (IgG1), 1.0 g/L

## 高耐盐性

与其他普通的TOYOPEARL阴离子交换填料相比，TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F的耐盐性更强，如图20所示。BSA在TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F层析柱中的洗脱缓冲液浓度为1.0 mol/L NaCl，而其他阴离子交换填料的洗脱缓冲液浓度为0.14 - 0.40 mol/L。

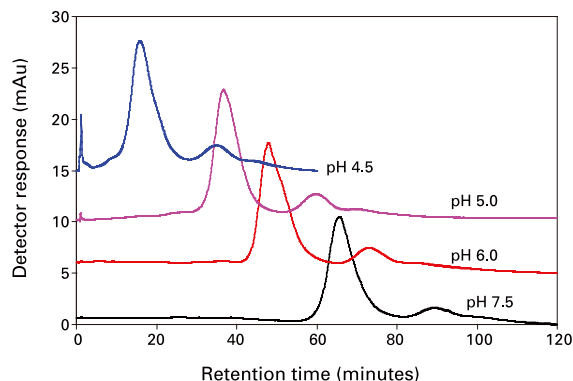
图20. 阴离子交换填料耐盐性的比较



填料: 多种  
 层析柱尺寸: 5 mm ID × 5 cm  
 流动相: A:20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; B:流动相 A+2.0 mol/L NaCl  
 梯度: 0 -100% B (120 min)  
 流速: 300 cm/hr (1.0 mL/min)  
 检测: UV@280 nm  
 温度: 室温  
 样品: BSA (pI 4.7-4.9), 1.0 g/L

如图21所示，pH值的变化不会对TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F填料的选择性有太大的影响。因此这款填料为工艺设计提供了更大的优化或操作空间。

图21. pH值对TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F分离选择性的影响

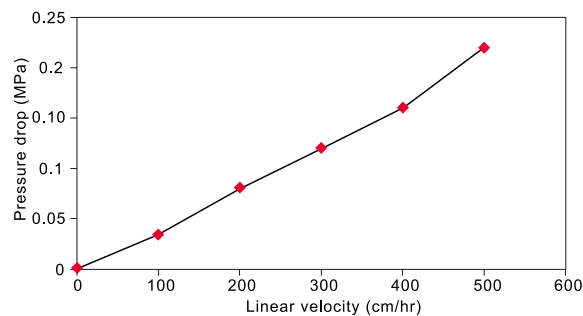


填料: TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F  
 层析柱尺寸: 5 mm ID × 5 cm  
 流动相: A: 20 mmol/L N-甲基哌嗪(pH 4.5和pH 5.0)  
 20 mmol/L Bis-Tris(pH 6.0)  
 20 mmol/L Tris(pH 7.5)  
 B: 流动相A+2.0 mol/L NaCl  
 梯度: 0-100% B (120 min)  
 流速: 300 cm/hr (1.0 mL/min)  
 检测: UV @ 280 nm  
 温度: 室温  
 样品: BSA(pl 4.7-4.9), 1.0 g/L

## 优秀的压力-流速稳定性

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F填料基质为刚性较强的聚甲基丙烯酸酯。图22显示了在4.4 cm内径，柱床高度为29 cm的层析柱上的压力-流速曲线。此款填料线性流速可高达600 cm/h。

图22. TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F的流速与压力曲线

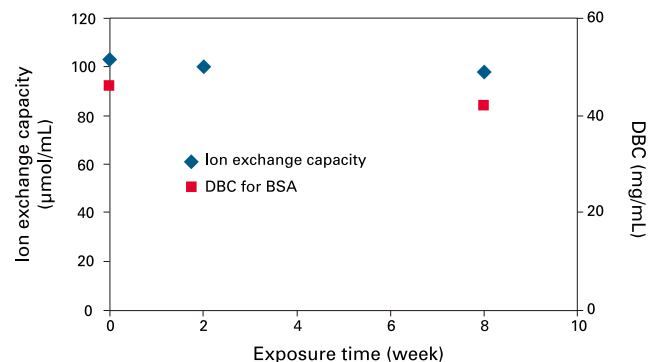


填料: TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F  
 层析柱尺寸: 4.4 cm ID × 29 cm  
 流动相: 0.1 mol/L NaCl  
 流速: 多种

## 耐碱性

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F可耐受0.5 mol/L NaOH溶液。可以在该条件下储存长达8周而不影响填料的吸附载量 (图23)。

图23. TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F的耐碱性数据



## 订购信息

货号	产品名称
23438	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F, 100 mL, 45 μm
23439	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F, 250 mL, 45 μm
23440	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F, 1 L, 45 μm
23441	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F, 5 L, 45 μm
23442	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F, 50 L, 45 μm
45108	MiniChrom TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F, 5 mL
23443	ToyoScreen NH <sub>2</sub> -750F, 1mL × 6
23444	ToyoScreen NH <sub>2</sub> -750F, 5mL × 6
OC41MDNH <sub>2</sub> -750F	NH <sub>2</sub> -750F 20 μL 96-well Plate Kit
45021	ToyoScreen RoboColumn NH <sub>2</sub> -750F, 8 × 200 μL
45022	ToyoScreen RoboColumn NH <sub>2</sub> -750F, 8 × 600 μL