

抗体分离 离子交换方法包

Antibodix™ WCX NP5
Proteomix® SCX NP5



服务热线: **400-636-8880**

Sepax Technologies

目录

引言.....	1
Antibodix™ WCX NP5 和 Proteomix® SCX NP5 的技术参数.....	2
Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 的质量控制测试.....	3
Proteomix® SCX NP5 4.6 x 250 mm 的质量控制测试.....	4
Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 柱上的单克隆抗体及片段分离应用篇.....	5
Antibodix™ WCX NP5 柱上氯化锂盐溶液梯度洗脱分离 MAb.....	6
Antibodix™ WCX NP5 柱上氯化钠盐溶液、pH 梯度洗脱分离 MAb.....	6
Antibodix™ WCX NP5 柱上分离 MAb 的稳定性测试.....	7
Antibodix™ WCX NP5 柱上分离木瓜蛋白酶酶切 MAb.....	7
不同进样量 Fab/Fc 在 Antibodix™ WCX NP5 柱上的分离.....	8
Antibodix™ WCX NP5 柱上分离 Fab/Fc.....	8
Antibodix™ WCX NP5 柱上分离 F(ab') ₂	9
Proteomix® SCX NP5 4.6 x 250 mm 柱上的单克隆抗体分离应用篇.....	10
Proteomix® SCX NP5 柱上分析完整 MAb 321.....	11
完整 MAb 321 在 Proteomix® SCX NP5 柱上的载量测试.....	11
Proteomix® SCX NP5 柱上分析完整 MAb 202.....	12
Proteomix® SCX NP5 柱上分析完整 MAb 202 的梯度优化实验.....	12
Antibodix™ 和 Proteomix® 柱上的单克隆抗体分析比较篇.....	13
Antibodix™ 和 Proteomix® 柱上 pH 梯度洗脱分析完整 MAb 321.....	14
Antibodix™ 和 Proteomix® 柱上盐浓度及 pH 梯度洗脱分析完整 MAb 321.....	14
Antibodix™ WCX 和 Proteomix® SCX 柱上分析完整 MAb 321.....	15
Antibodix™ WCX 和 Proteomix® SCX 柱上分析完整 MAb 202.....	15
Antibodix™ WCX 和 Proteomix® SCX 的色谱柱安装及操作规程.....	16
Antibodix™ WCX NP5 和 Proteomix® SCX NP5 的故障排除.....	17
订购信息.....	19

引言

Antibodix™ WCX 和 Proteomix® SCX 色谱柱的固定相均由刚性、球形、高交联度的无孔聚苯乙烯-二乙烯基苯(PS/DVB)颗粒构成。PS/DVB树脂表面键合有一层高度亲水、纳米厚度的中性聚合物薄层。疏水的PS/DVB树脂表面被亲水层完全覆盖，从而消除了其对抗体蛋白的非特异性结合，保证了其具有高分离效率和高回收率。

Antibodix™ WCX 固定相

采用独有的化学键合技术，在亲水层表面键合有一层弱阳离子交换基团——羧酸基(-COOH)，具有高离子交换容量。

Proteomix® SCX 固定相

采用独有的化学键合技术，在亲水层表面键合有一层强阳离子交换基团——磺酸基(-SO₃H)，具有高离子交换容量。

固定相化学结构示意图

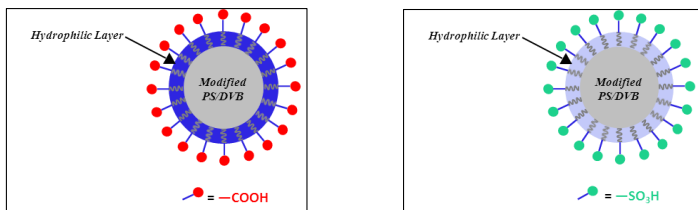


图 1. Antibodix™ WCX (左图) 和 Proteomix® SCX (右图) 的固定相表面结构

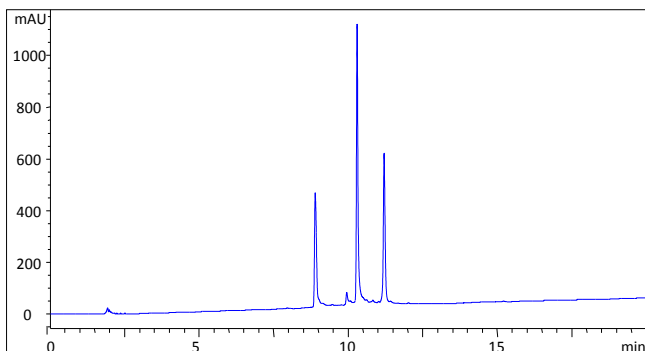
Antibodix™ 和 Proteomix® 固定相的主要特征

特征	Antibodix™	Proteomix®
粒径	5 μm	5 μm
孔径(Å)	无孔	无孔
表面结构	弱阳离子交换 (-COOH) 功能基团	强阳离子交换 (-SO ₃ H) 功能基团

Antibodix™ WCX NP5 和 Proteomix® SCX NP5 的技术参数

固定相	Antibodix™ WCX NP5	Proteomix® SCX NP5
尺寸	4.6 x 250 mm	4.6 x 250 mm
材料	弱阳离子交换基团 (羧酸基) 键合在 PS/DVB 树脂亲水层表面	强阳离子交换基团 (磺酸基) 键合在 PS/DVB 树脂亲水层表面
粒径	5 μm	5 μm
孔径 (Å)	无孔	无孔
pH 稳定性	2-12	2-12
流速	0.80 mL/min	0.80 mL/min
反压	< 5,000 psi	< 3,500 psi
最大耐受反压	~6,000 psi	~ 6,000 psi
最高耐受温度 (°C)	~ 80	~ 80
流动相兼容性	与水溶液, 水与乙腈、丙酮或 甲醇的混合水与乙腈、丙酮或 甲醇的混合物等相容。	与水溶液, 水与乙腈、丙酮或 甲醇的混合水与乙腈、丙酮或 甲醇的混合物等相容。

Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 的质量控制测试



化合物名称	保留时间 (min)	峰面积	塔板数	拖尾因子	分离度
抑肽酶	8.91	1820	87584	1.30	-
溶菌酶	10.29	3811	234544	1.34	13.43
核糖核酸酶 A	11.20	2277	192966	1.12	9.72

图 2. Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 的标准质量控制测试

流动相 A: 10 mM 磷酸钠缓冲液, pH 6.0 B: A + 1.0 M 氯化钠

梯度条件: 10-100% B, 25 分钟

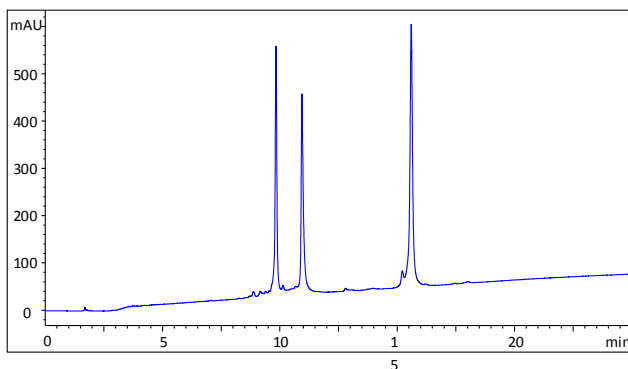
流速: 0.8 mL/min

检测波长: UV 214 nm

样品: 1) 抑肽酶; 2) 溶菌酶; 3) 核糖核酸酶 A

进样量: 5 μ L 样品(每种蛋白质 1 mg/mL)

Proteomix® SCX NP5 4.6 x 250 mm 的质量控制测试



化合物名称	保留时间 (min)	峰面积	塔板数	拖尾因子	分离度
核糖核酸酶 A	9.83	2926	101936	0.91	-
细胞色素 C	10.94	2825	85018	1.44	8.10
溶菌酶	15.60	4743	109745	0.93	27.47

图 3. Proteomix® SCX NP5 4.6 x 250 mm 的标准质量控制测试

流动相 A: 20 mM 磷酸钠缓冲液, pH 6.0 B: A + 1.0 M 氯化钠

梯度条件: 0-75%B, 25 分钟

流速: 1.0 mL/min

检测波长: UV 214 nm

样品: 1) 核糖核酸酶 A; 2) 细胞色素 C; 3) 溶菌酶

进样量: 5 μ L 样品(每种蛋白质 1 mg/mL)

Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm

单克隆抗体及片段分离应用篇

Antibodix™ WCX NP5 柱上氯化锂盐溶液梯度洗脱分离 MAb321

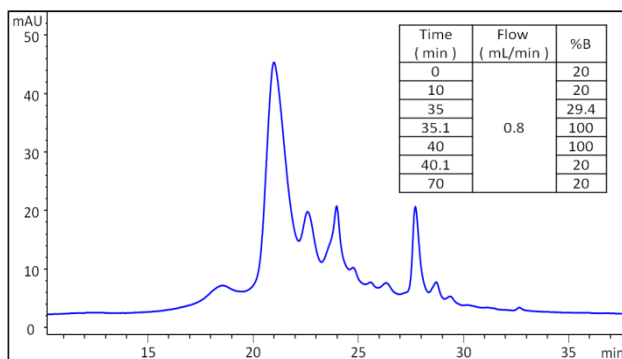


图 4. Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 柱上氯化锂盐溶液梯度洗脱分离单克隆抗体
 流动相 A: 20 mM 醋酸钠盐缓冲液, pH 5.15; B: A + 1M 氯化锂; 梯度条件: 0-75%B, 25 分钟
 柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: UV 280 nm
 样品: 5 mg/mL MAb; 进样量: 5 μ L

Antibodix™ WCX NP5 柱上氯化钠盐溶液、pH 梯度洗脱分离 MAb321

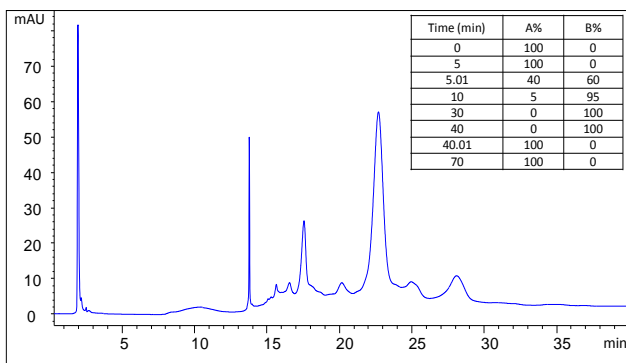


图 5. Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 柱上氯化钠盐溶液、pH 梯度洗脱分离单克隆抗体
 流动相 A: 20 mM 硫酸钠盐缓冲液, pH 5; B: A + 10m M 氯化钠, pH 7.5
 柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: UV 280 nm
 样品: 5 mg/mL MAb; 进样量: 20 μ L

Antibodix™ WCX NP5 柱上分离 MAb321 的稳定性测试

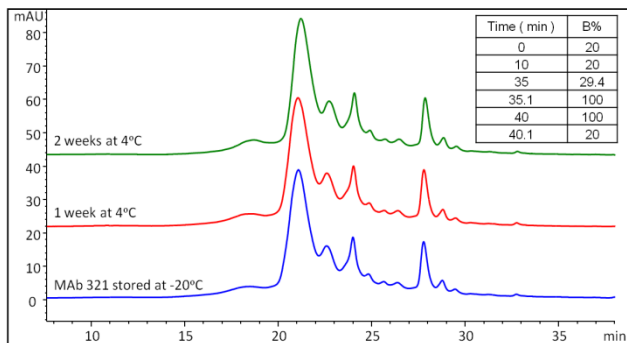


图 6. Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 色谱柱上分离单克隆抗体的稳定性测试

流动相 A: 20 mM 醋酸钠盐缓冲液, pH 5.15; B: A + 1 M 氯化锂; 梯度条件: 0-75%B, 25 分钟
 样品: 5.0 mg/mL MAb 溶于复合 Tris 缓冲液中 (样品从 -20 °C 新解冻, 分别已在 4 °C 条件下放置一周和两周)
 柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: UV 280 nm; 进样量: 20 μL

Antibodix™ WCX NP5 柱上分离木瓜蛋白酶酶切 MAb321

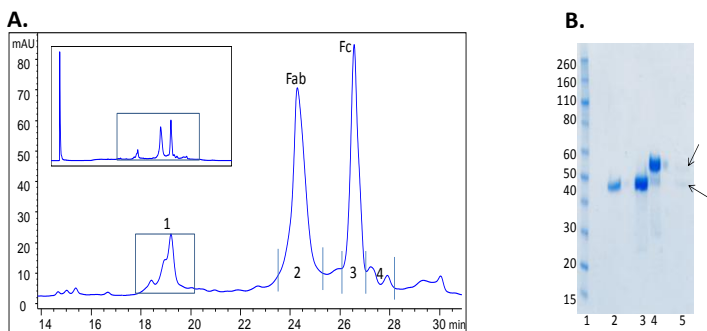


图 7. A 图是木瓜蛋白酶酶切后的 MAb 在 Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 上的分离图谱

流动相 A: 20 mM 醋酸 + 50 mM 氯化钠, pH 3.5; B: 20 mM 琥珀酸钠 + 50 mM 氯化钠, pH 6.0
 梯度条件: 5 min 30% B, 0.8 mL/min; 25 min 85%-100% B, 0.65 mL/min
 柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: UV 280 nm; 进样量: 100 μg 酶切后的 MAb
 木瓜蛋白酶酶切反应: 1 mg/mL MAb (单抗和蛋白酶的比例为 100:1) 在 2 mM EDTA, 5 mM 半胱氨酸和 100 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6) 中, 37 °C 的条件下反应 3.5 小时。

B 图是 Fab 和 Fc 片段在 4-12% Bis-Tris 凝胶上的电泳图

第一列: 标记; 第二列: 峰 1/Fab; 第三列: 峰 2/Fab; 第四列: 峰 3/Fc; 第五列: 峰 4/Fc。

不同进样量 Fab/Fc 在 Antibodix™ WCX NP5 柱上的分离

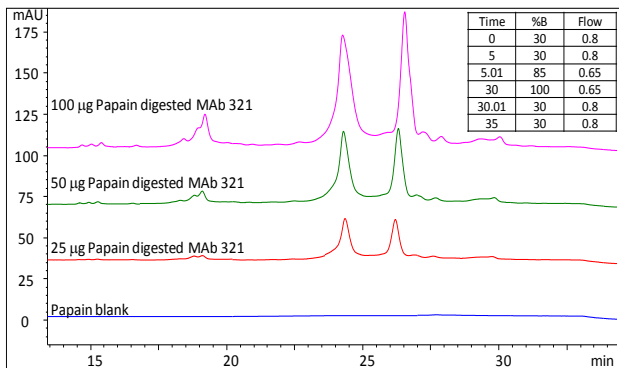


图 8. 木瓜蛋白酶酶切后的 MAb 在 Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 柱上的分离图谱

流动相 A: 20 mM 醋酸 + 50 mM 氯化钠, pH 3.5 ; B: 20 mM 琥珀酸钠 + 50 mM 氯化钠, pH 6.0

木瓜蛋白酶酶切反应: 1 mg/mL MAb (单抗和蛋白酶的比例为 100:1) 在 2 mM EDTA, 5 mM 半胱氨酸和 100 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6) 中, 37 °C 的条件下反应 3.5 小时。

检测波长: UV 280 nm

Antibodix™ WCX NP5 柱上分离 Fab/Fc

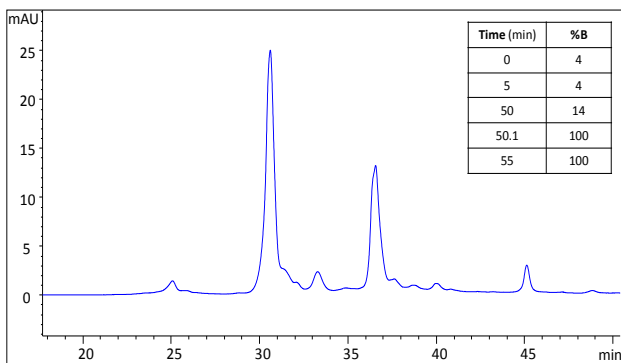


图 9. 木瓜蛋白酶酶切后的 MAb 在 Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 柱上的分离图谱

流动相 A: 20 mM 磷酸缓冲液, pH 5.5 ; B: A + 1 M 氯化钠

梯度条件: 5 min 30% B, 0.8 mL/min; 25 min 85%-100% B, 0.65 mL/min

流速: 0.8 mL/min ; 检测波长: UV 280 nm ; 进样量: 25µg 酶切后的 MAb

木瓜蛋白酶酶切反应: 1 mg/mL MAb (单抗和蛋白酶的比例为 100:1) 在 2 mM EDTA, 5 mM 半胱氨酸和 100 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6) 中, 37 °C 的条件下反应 3.5 小时。

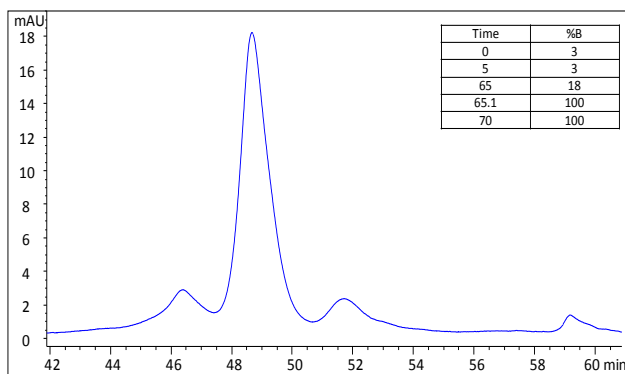
Antibodix™ WCX NP5 柱上分离 F(ab')₂

图 10. 胃蛋白酶酶切后的 MAb 在 Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 柱上的分离图谱

流动相 A: 20 mM 磷酸缓冲液, pH 5.5 ; B: A + 1 M 氯化钠

梯度条件 : 5 min 30% B, 0.8 mL/min; 25 min 85%-100% B, 0.65 mL/min

流速 : 0.8 mL/min ; 检测波长 : UV 280 nm ; 进样量 : 50 µg 酶切后的 MAb

胃蛋白酶酶切反应: 1 mg/mL MAb (单抗和蛋白酶的比例为 40:1) 在 2 mM 醋酸钠 (pH 4.0) , 37 °C 的条件下反应 15.5 小时, 以 25µL 2 M Tris 终止反应。

Proteomix® SCX NP5 4.6 x 250 mm

单克隆抗体分析应用篇

Proteomix® SCX NP5 柱上分析完整 MAb 321

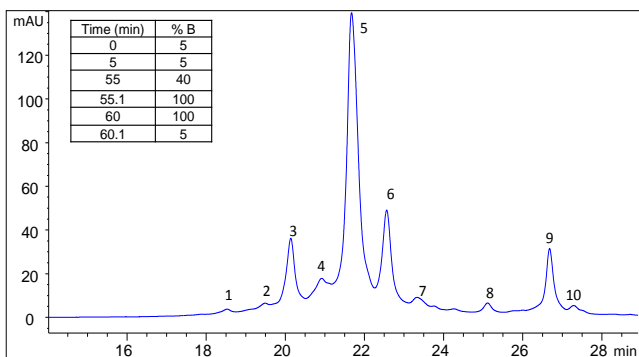


图 11. 完整 MAb 321 在 Proteomix® SCX NP5 4.6 x 250 mm 色谱柱上的分析
 流动相 A: 2.4 mM Tris, 1.5 mM 咪唑, 11.6 mM 哌嗪, pH 6.0; B: A + 0.5 M 氯化钠, pH 10.5
 柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: UV 280 nm; 进样量: 100 µg 完整 MAb 321

完整 MAb 321 在 Proteomix® SCX NP5 柱上的载量测试

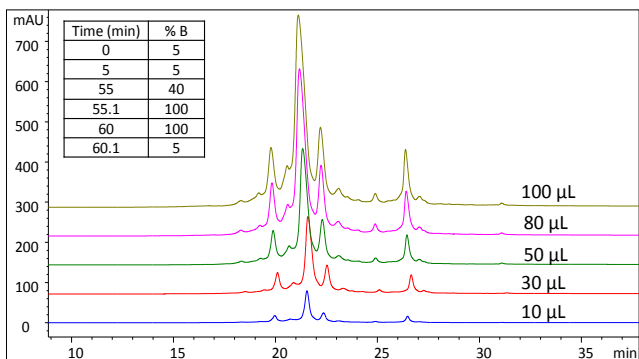


图 12. 完整 MAb 321 在 Proteomix® SCX NP5 4.6 x 250 mm 色谱柱上的分析
 流动相 A: 2.4 mM Tris, 1.5 mM 咪唑, 11.6 mM 哌嗪, pH 6.0; B: A + 0.5 M 氯化钠, pH 10.5
 柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: UV 280 nm; 样品: 5 mg/mL 完整 MAb 321

Proteomix® SCX NP5 柱上分析完整 MAb 202

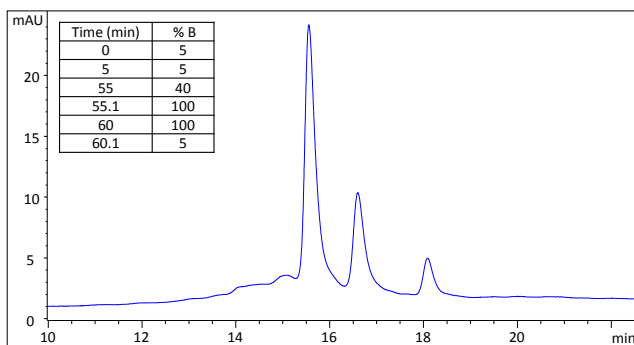


图 13. Proteomix® SCX NP5 色谱柱上分析完整 MAb 202

流动相 A: 2.4 mM Tris, 1.5 mM 咪唑, 11.6 mM 胍嗪, pH 6.0; B: A + 0.5 M 氯化钠, pH 10.5
柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: UV 280 nm; 进样量: 10 µg 完整 MAb 202

Proteomix® SCX NP5 柱上分析完整 MAb 202 的梯度优化实验

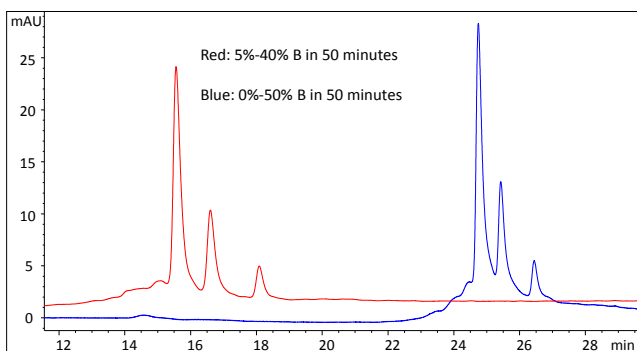


图 14. 完整 MAb 202 在 Proteomix® SCX NP5 4.6 x 250 mm 和 Antibodix™ WCX NP5

4.6 x 250 mm 色谱柱上的分析

流动相 A: 2.4 mM Tris, 1.5 mM 咪唑, 11.6 mM 胍嗪, pH 6.0; B: A + 0.5 M 氯化钠, pH 10.5
柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: UV 280 nm; 进样量: 10 µg 完整 MAb 202

Antibodix™ WCX NP5 与 Proteomix® SCX NP5
单克隆抗体分析比较篇

Antibodix™ WCX NP5 和 Proteomix® SCX NP5 pH 柱上梯度洗脱分析完整 MAb 321

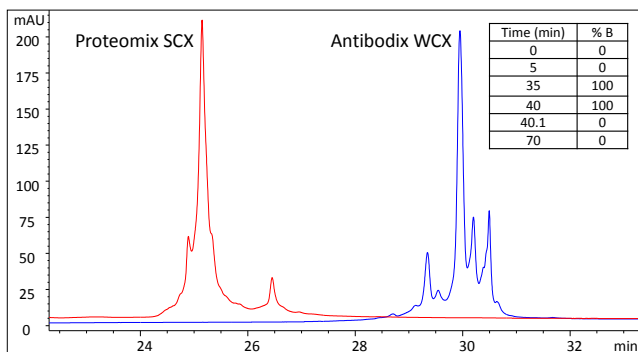


图 15. 采用 Proteomix® SCX NP5 4.6 x 250 mm 和 Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 分析完整 MAb 321

流动相 A: 2.4 mM Tris, 1.5 mM 咪唑, 11.6 mM 哌嗪, pH 6.0; B: A, pH 10.5

柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: UV 280 nm; 进样量: 50 µg 完整 MAb 321

Antibodix™ WCX NP5 和 Proteomix® SCX NP5 柱上盐浓度及 pH 梯度洗脱分析完整 MAb 321

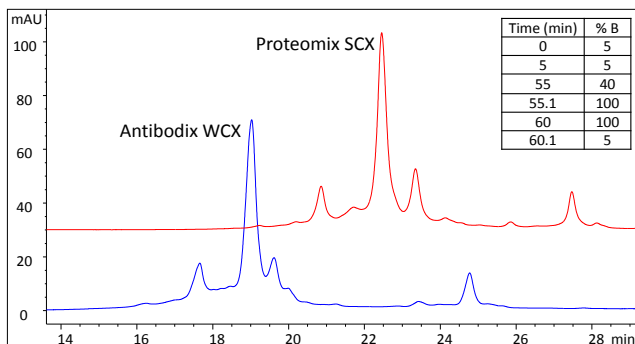


图 16. 采用 Proteomix® SCX NP5 4.6 x 250 mm 和 Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 分析完整 MAb 321

流动相 A: 2.4 mM Tris, 1.5 mM 咪唑, 11.6 mM 哌嗪, pH 6.0; B: A + 0.5 M 氯化钠, pH 10.5

柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: UV 280 nm; 进样量: 50 µg 完整 MAb 321

Antibodix™ WCX NP5 和 Proteomix® SCX NP5 柱上分析完整 MAb 321

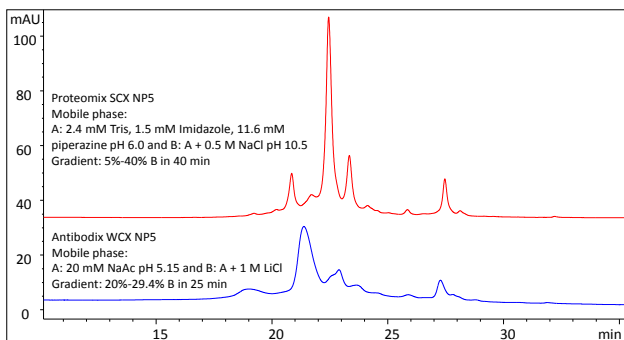


图 17. 采用 Proteomix® SCX NP5 4.6 x 250 mm 和 Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 分析完整 MAb 321

流动相条件如上图所示； 柱温：30 °C； 流速：0.8 mL/min； 检测波长：UV 280 nm
进样量：50 µg 完整 MAb 321

Antibodix™ WCX NP5 和 Proteomix® SCX NP5 柱上分析完整 MAb 202

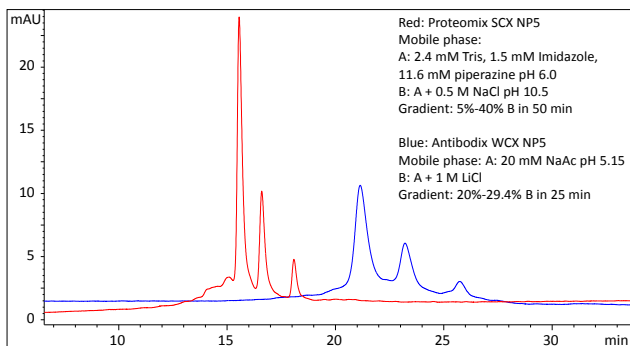


图 18. 采用 Proteomix® SCX NP5 4.6 x 250 mm 和 Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 分析完整 MAb 202

流动相条件如上图所示； 柱温：30 °C； 流速：0.8 mL/min； 检测波长：UV 280 nm
进样量：10 µg 完整 MAb 202

Antibodix™ WCX NP5 4.6 x 250 mm 和 Proteomix® SCX

NP5 4.6 x 250 mm 的色谱柱安装及操作规程

1. 所有样品和流动相都必须在使用前用 0.45 μm 或 0.2 μm 滤膜过滤。
2. 请按照柱上的标记方向将色谱柱接入到 HPLC 系统中。
3. 新色谱柱的运输溶剂是 20 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0)，使用前推荐用 10-20 倍柱体积的 20 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 进行冲洗以活化色谱柱。然后用合适的流动相平衡色谱柱直至检测器基线稳定为止。
4. 在合适的流速及合适的进样量下运行色谱柱。当色谱柱长时间不用时，请将其保存在 20 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中。

注意:流动相兼容性

Antibodix™ 和 Proteomix® 色谱柱与水溶液、水与乙腈或甲醇等有机溶剂的混合物相容。典型的流动相中含有磷酸、盐酸、醋酸或 Tris 的钠盐或钾盐。流动相需采用在线脱气机或在使用前进行预脱气，一个简单的脱气方法是将流动相在由水泵形成的真空下超声 5 分钟。Antibodix™ 和 Proteomix® 色谱柱均与非离子及两性离子洗涤剂相容，但是与阳离子洗涤剂不相容。

在使用离子交换色谱时需要考虑：每一种蛋白质的表面净电荷与流动相 pH 值都有着特定的关系。当流动相 pH 值与蛋白质等电点 pI 相等时，蛋白质表面净电荷为零，与带电固定相之间不发生相互作用；当流动相 pH 低于 pI 时，蛋白质会吸附到带负电的固定相（阳离子交换相）上。当使用阳离子交换相时，推荐采用低于蛋白质等电点 0.5-1 个单位的缓冲液作为起始缓冲液，并以较高 pH 或低盐浓度的缓冲液作为洗脱溶剂。

Proteomix®和 Antibodix™ 的故障排查

建议选择最优的进样量和运行条件以达到 Antibodix™ WCX NP5 和 Proteomix® SCX NP5 色谱柱的最佳使用效果。下面信息为您的实验故障排查提供的参考。

高反压

反压突然增加预示着色谱柱入口端筛板有可能发生了堵塞，在这种情况下我们建议用适宜的流动相反冲柱子。为了预防这种堵塞，可通过过滤去除样品和流动相中残留的颗粒。

低分辨率

1. 色谱柱过载，减少进样量。
2. 依次尝试不同的流动相来优化运行条件，改变缓冲液，浓度，pH 值等。

峰拖尾

产生本状况说明应改变起始流动相，尝试不同的 pH 值和盐浓度来改变起始状态以达到提高蛋白结合色谱柱的能力。

无蛋白结合

色谱柱平衡不充分，尝试延长色谱柱平衡时间。流动相 pH 值和离子强度可能不正确。配制新的流动相或者改变起始盐浓度。如果蛋白质仍没有结合上去，则降低起始缓冲液 pH 值。

梯度洗脱过程中蛋白质出峰晚

蛋白结合过强。增加梯度中的离子强度，也可以调高 pH 值。

色谱柱清洗及再生

当 Antibodix™ WCX 和 Proteomix® SCX 色谱柱被强吸附性样品污染后，会导致色谱柱性能下降。通常表现为柱压升高及峰变宽，此时需要按照下面的步骤清洗色

谱柱:

1. 将色谱柱与检测器断开;
2. 反方向冲洗色谱柱;
3. 在小于推荐最大流速的 50% 下冲洗色谱柱, 并监测柱压变化;
4. 通常清洗 10-15 倍柱体积即足够, 在切换溶剂时用 3-5 倍柱体积的纯水过渡。

推荐的清洗溶液通常为含 1.0 M 氯化钠 的 50 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 10)。

注意: 离子交换色谱柱上的分离对流动相的 pH 变化非常敏感。为了保证分离的高度重现性, 必须确保不同批次的相同缓冲液 pH 值一致, 每次配制缓冲液时都必须正确校准 pH 计。

色谱柱的保护

除了需要过滤样品和流动相外, 保护色谱柱的最佳方法是在色谱柱前连接保护柱或过滤预柱。大多数情况下过滤预柱可以去除样品或流动相中的残留颗粒, 或者从 HPLC 系统, 如泵或进样器垫圈上脱离下来的颗粒。不过还是强烈建议使用保护柱, 因为它可更有效地去除样品、流动相或来自 HPLC 系统的强吸附性样品组分和残留颗粒。

订购信息

离子交换方法包(P/N MABIECHKIT-0000)包括:

Antibodix™ WCX NP5

型号	内径 x 长度 (mm)	柱材料
602NP5-4625	4.6 x 250	不锈钢

Proteomix® SCX NP5

型号	内径 x 长度(mm)	柱材料
401NP5-4625	4.6 x 250	不锈钢

其它可提供的规格:

Antibodix™ WCX NP5

型号	内径 x 长度(mm)	柱材料
602NP5-4605	4.6 x 50 (保护柱)	不锈钢
602NP5P-4605	4.6 x 50 (保护柱)	PEEK
602NP5P-4625	4.6 x 250	PEEK

Proteomix® SCX NP5

型号	内径 x 长度(mm)	孔径(Å)
401NP5-4605	4.6 x 50 (保护柱)	不锈钢
401NP5P-4605	4.6 x 50 (保护柱)	PEEK
401NP5P-4625	4.6 x 250	PEEK

苏州赛分科技有限公司

苏州工业园区星湖街218号生物纳米科技园C11楼401室

电话：0512-69369056

传真：0512-69369025

邮政编码：215123

www.sepax-tech.com.cn

Sepax Technologies, Inc.

5 Innovation Way

Newark, Delaware, USA

Tel: (302) 366-1101

Fax: (302) 366-1151

Toll free: 1-877-SEPAX-US

www.sepax-tech.com