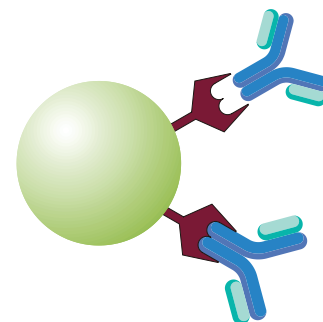


滴度测定

亲和色谱是一种利用特定蛋白之间（例如，抗原/抗体）高度特异性分子间相互作用的强大分离技术。安捷伦提供多种专门的亲和产品，适用于对 IgG 进行分离和定量的 Monolithic 重组 Protein A 和 Monolithic Protein G 色谱柱，以及用于去除生物样品中高丰度蛋白的一系列多重亲和和去除系统产品。



Bio-Monolith HPLC 色谱柱

- 针对所有 IgG（人和鼠）的分析型分离而设计
- 分离不受流速影响；无扩散、无微孔、无死体积，使流动相和固定相之间的传质非常迅速
- 极快的分离速度可加快方法开发，降低成本
- 锁定方法参数显著缩短了时间，节省了缓冲液

Bio-Monolith 重组 Protein A 和 Protein G HPLC 色谱柱是 Bio-Monolith 色谱柱系列产品的组成部分。重组 Protein A 和 Protein G Bio-Monolith 色谱柱与 HPLC 和制备型液相色谱系统兼容，包括 1100、1200 和 1260 生物惰性四元液相色谱系统。



Bio-Monolith rProtein A 色谱柱,
5190-6903

技巧和工具

有关 Bio-Monolith Protein A 色谱柱在 mAb 结合方面的耐盐性和在 mAb 洗脱方面的酸性缓冲盐兼容性的更多信息，请参见：
5991-2990CHCN。

色谱柱性能指标

尺寸	5.2 mm × 4.95 mm
色谱柱体积	100 µL
最大压力	150 bar (15 MPa, 2200 psi)
最低温度/最高温度	操作温度: 2–40 °C 储存: 2–8 °C
推荐 pH	操作范围: 2–13 原位清洗: 1–14
结构材料	硬件: 不锈钢 包装: 聚(环氧丙基甲基丙烯酸酯-co-乙二醇二甲基丙烯酸酯) 高孔隙率整体柱
彩带标识:	Bio-Monolith rProtein A: 白色 Bio-Monolith Protein G: 橙色
保质期/有效期	12 个月

Bio-Monolith rProtein A, Protein A 和 Protein G

说明	部件号
Bio-Monolith rProtein A, 4.95 x 5.2 mm	5190-6903
Bio-Monolith Protein A, 4.95 x 5.2 mm	5069-3639
Bio-Monolith Protein G, 4.95 x 5.2 mm	5190-6900

技巧和工具

有关详细信息，可参见：

mAb Titer Analysis with the Agilent Bio-Monolith Protein A Column (使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱进行的 mAb 滴度分析) (出版号 **5991-5135EN**)

采用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱监测细胞培养液中的单克隆抗体滴度 (出版号 **5991-2990CHCN**)

Cell Clone Selection Using the Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS (采用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行细胞克隆选择) (出版号 **5991-5124EN**)

Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS (采用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行细胞培养基优化) (出版号 **5991-5125EN**)



Bio-Monolith Protein A 和 G 对不同 IgG 亚类的的结合亲和性

抗体	Protein A	Protein G
人		
人 IgG1	++++	++++
人 IgG2	++++	++++
人 IgG3	-	++++
人 IgG4	++++	++++
人 IgA	++	-
人 IgD	++	-
人 IgE	++	-
人 IgM	++	-
小鼠		
小鼠 IgG1	+	++
小鼠 IgG2a	++++	++++
小鼠 IgG2b	++++	+++
小鼠 IgG3	+	+++
小鼠 IgM	+/-	-
抗体片段		
人 Fab	+	+
人 F(ab') ₂	+	+
人 scFv	+	+
人 Fc	+	+
人 κ	+	+
人 λ	+	+
++++ = 强亲和性		
+++ = 中等亲和性		
++ = 弱亲和性		
+ = 微弱亲和性		
- = 无亲和性		



快速分离方案

Agilent Bio-Monolith rProtein A (重组蛋白 A) 分析柱是 Bio-Monolith 和亲和色谱家族的新成员。该色谱柱可用于高速分析单克隆抗体 (mAb) 滴度和小规模纯化, 并可轻松集成到二维液相色谱等其他分析工作流程中。本研究以最大流速测试了重组蛋白 A 色谱柱, 并对天然 Protein A 色谱柱进行了桥接研究。证明了一种色谱结合/洗脱法可用于测定 mAb 滴度, 该方法具有非常短的运行时间 (1 分钟), 适用于克隆筛选、工艺开发及优化等高通量应用。

高通量 mAb 滴度分析

实验部分

化学品与试剂

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别, 且均购自 Sigma-Aldrich (现属于 Merck) 或 VWR Scientific。水经由 Milli-Q A10 (Millipore) 纯化。

样品

样品是从含有 1 mg/mL 重组 IgG 单克隆抗体的生物反应器中收集的粗制中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养上清液。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪包括:

- 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A), 配备样品冷却装置 (选件 100)
- 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A), 配备生物惰性热交换器 (选件 019)
- 1260 Infinity II 可变波长检测器 (G7114A)

HPLC 方法条件

参数	值	
色谱柱:	Agilent Bio-Monolith rProtein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5190-6903)	
结合缓冲液 (洗脱液 A):	50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4	
结合缓冲液 (洗脱液 B):	100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.6	
梯度曲线:	时间 (min)	%B
	0.0–0.2	0 (结合)
	0.3–0.65	100 (洗脱)
	0.66–0.90	0 (再平衡)
	(0.1 min 后运行)	
流速:	3 mL/min	
柱温:	25 °C	
检测:	UV, 280 nm	
进样量:	4 µL (上样 10 µg)	

结果与讨论

高通量 mAb 滴度分析

证明使用高通量方法, 在 1 分钟的色谱运行时间内即可实现 mAb 的高速滴度分析 (图 1)。纯化的 (结合/洗脱) mAb 的保留时间约为 0.61 分钟, 与 CHO 细胞培养上清液中包含的宿主细胞蛋白的杂质峰 (保留时间约为 0.05 分钟) 分离良好。在图 1 中, 重复进样添加了 mAb 的粗制上清液, 在 125 bar 的反压水平下, 通量为 60 个样品/小时, 显示出了一致且可靠的性能。

在整个研究过程中, 峰形、保留时间和反压没有明显变化。图 2 显示了不同上样量生成的色谱图。然后通过绘制峰面积与进样量之间的关系来生成校准曲线 (图 3)。结果表明, 如校准曲线所示, 该方法的线性响应出色 ($R^2 = 0.9993$), 并能准确测量两组不同样品中 mAb 的含量。

这些数据证明了使用这种快速分析方法准确测定 mAb 滴度的可行性。

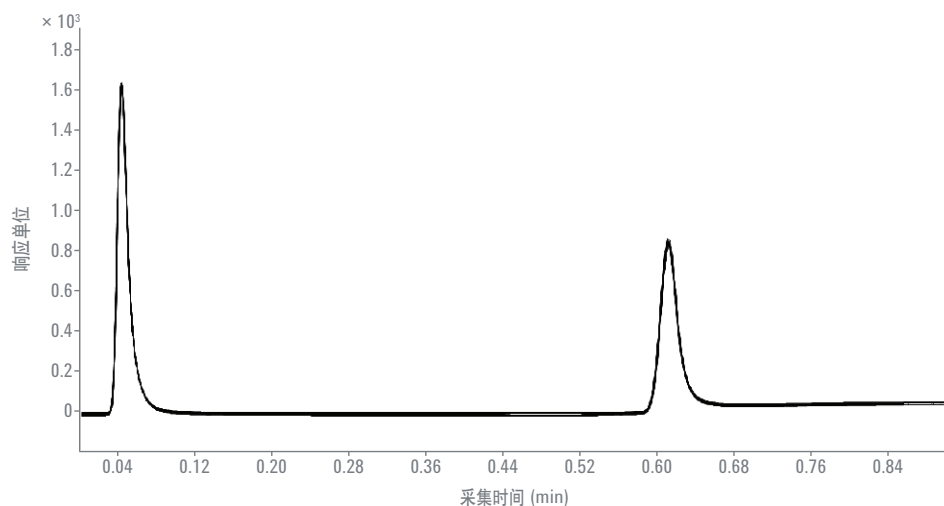


图 1. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱: 60 次连续进样的叠加色谱图。第一个峰为细胞培养上清液中宿主细胞蛋白杂质; 第二个峰为纯化的 mAb

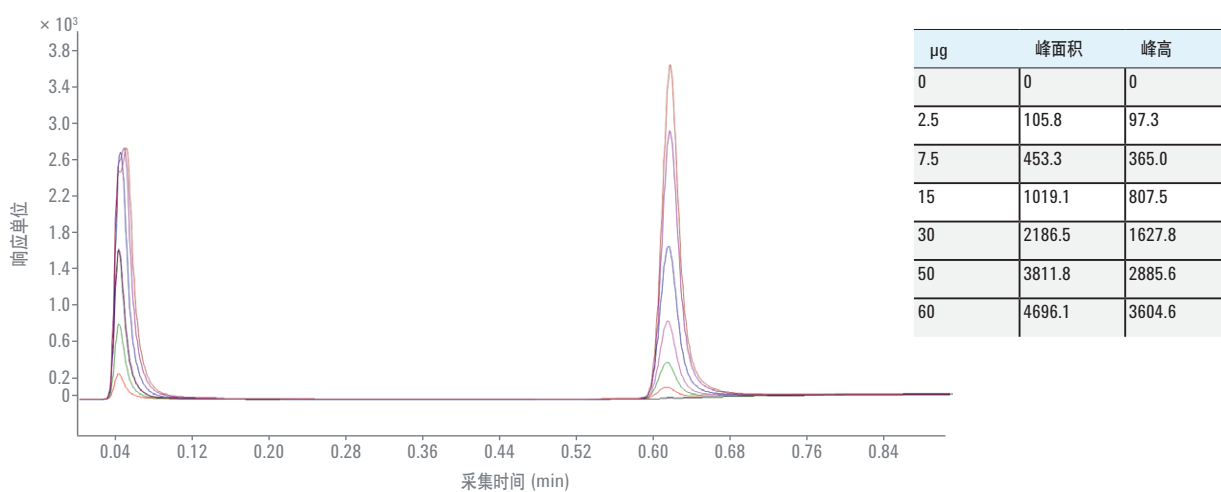


图 2. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱: 校准曲线。上样量递增的样品的叠加色谱图, 用于生成校准曲线

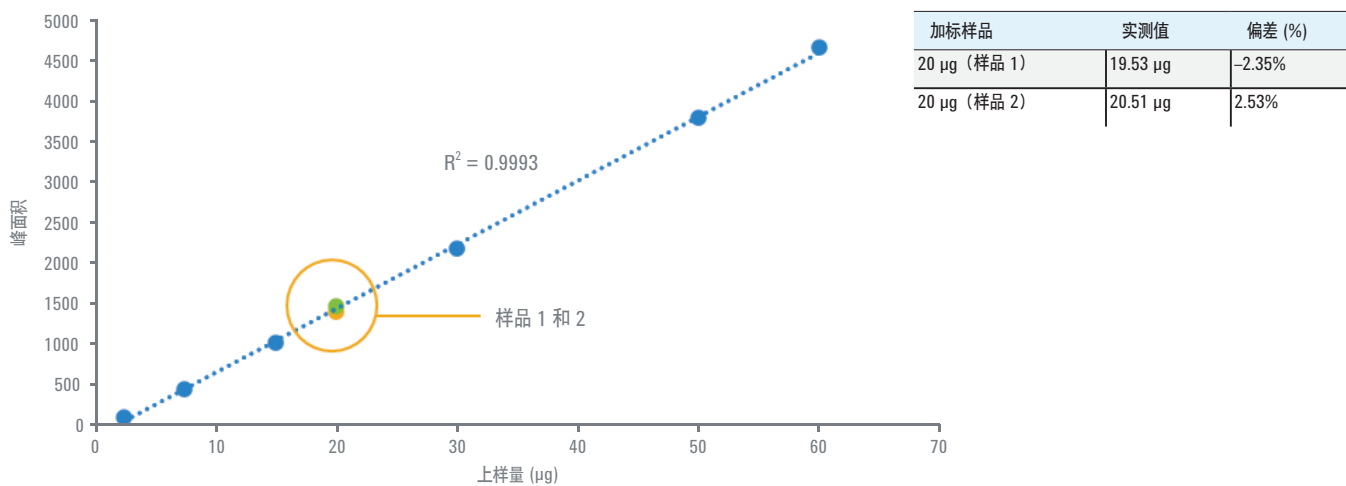


图 3. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱: 标准曲线线性响应和偏差 (%)