



TOSOH

TSK-GEL Application Data Sheet

TSK-GEL 色谱柱应用数据集 (5)

— 生物大分子（蛋白质·抗体·核酸）—



TSK-GEL 色谱柱应用数据集 (5)

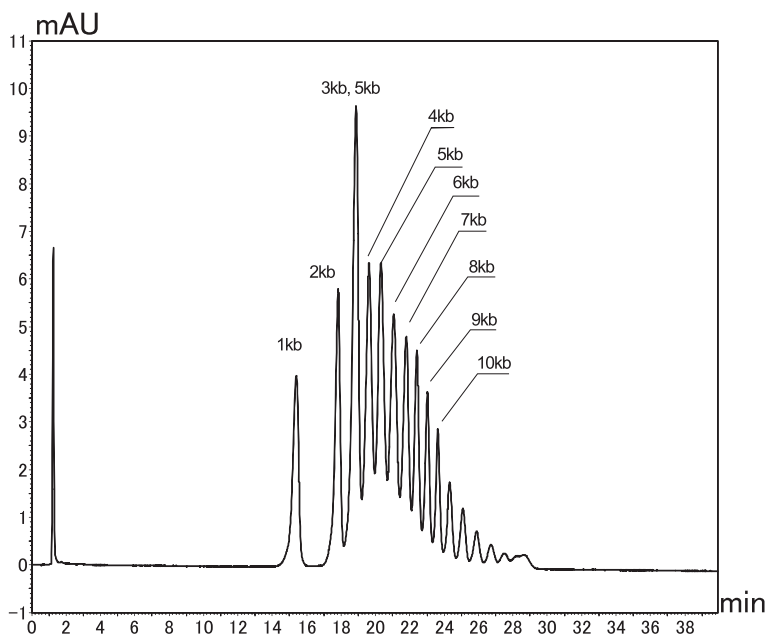
— 生物大分子 (蛋白质 · 抗体 · 核酸) —

目 录

应用数据

1	TSKgel DNA-STAT 色谱柱对 1kd DNA 分子量标准物的分析	1
2	TSKgel Q-STAT 色谱柱对卵白蛋白去磷酸化异构体的分析	2
3	TSKgel DNA-STAT 色谱柱对双链 RNA(dsRNA) 的分析	3
4	TSKgel Q-STAT 色谱柱对神经氨酸酶作用、去涎酸的转铁蛋白的分析	4
5	TSKgel DNA-STAT 色谱柱对 DNA 标准物的分析(1)	5
6	TSKgel DNA-STAT 色谱柱对 DNA 标准物的分析(2)	6
7	TSKgel CM-STAT 色谱柱对抗体药物异构体的分析(1)	8
8	TSKgel CM-STAT 色谱柱对抗体药物异构体的分析(2)	8
9	TSKgel CM-STAT 色谱柱对鼠腹水纯化而来的单抗异构体的分析	9
10	TSKgel SW _{XL} 系列色谱柱对标准蛋白混合样品的分析(1)	10
11	TSKgel SW _{XL} 系列色谱柱对标准蛋白混合样品的分析(2)	10
12	TSKgel SW _{XL} 系列色谱柱对标准蛋白混合样品的分析(3)	11
13	TSKgel SuperSW 系列色谱柱对标准蛋白混合样品的分析	11
14	TSKgel G3000SW _{XL} 色谱柱对抗体片段 Fab 的分析	12
15	TSKgel G3000SW _{XL} 色谱柱对抗体片段 (Fab') ₂ 的分析	13
16	TSKgel SW _{XL} 系列色谱柱对 PEG 化鼠单抗 (IgG1) 的分析	14
17	TSKgel G4000SW _{XL} 色谱柱对 PEG 化鼠单抗 (IgG1) 的分析	15
18	TSKgel G3000SW _{XL} 色谱柱对蛋白表面导入的半抗原数量的定量分析	16
19	TSKgel G3000SW _{XL} 色谱柱对人免疫球蛋白的分析	17
20	TSKgel G4000SW _{XL} 色谱柱对人免疫球蛋白的分析	17
21	TSKgel DNA-STAT 色谱柱对 1kd DNA 分子量标准物的分析	18
22	TSKgel DNA-STAT 色谱柱对双链 RNA(dsRNA) 的分析	19
23	TSKgel DNA-STAT 色谱柱对 DNA 标准物 (Phi X174-HaeIII 水解) 的分析	20
24	TSKgel DNA-STAT 色谱柱对 DNA 标准物 (pBR322-HaeIII 水解) 的分析	21
25	TSKgel DNA-STAT 色谱柱对核糖核酸酶 A 脱酸酰胺过程的分析	22

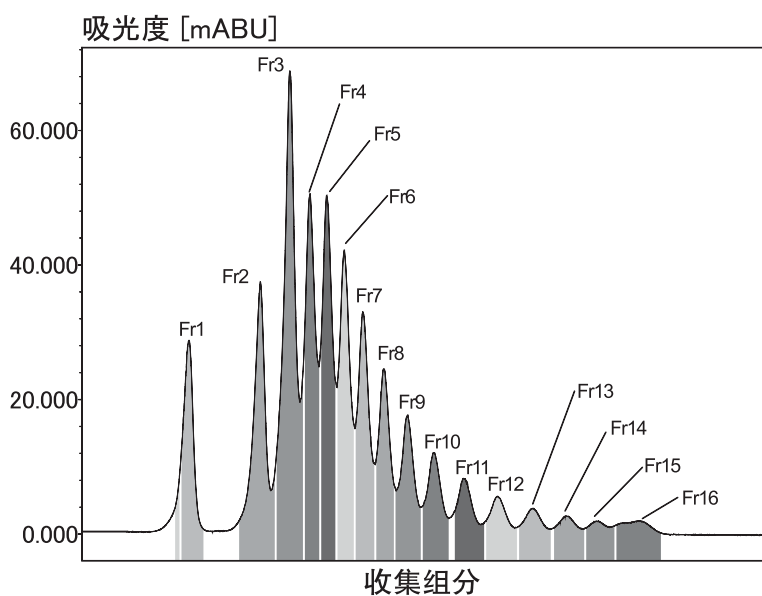
1 TSKgel DNA-STAT色谱柱对1kd DNA分子量标准物的分析



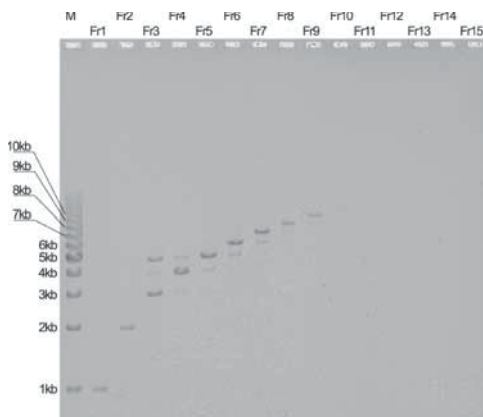
色 谱 柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 流 动 相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)
 B: 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5)
 梯 度: 0min 80% B
 60min 95% B
 60.1min 100% B
 65min 100% B
 65.1min 80% B
 70min 80% B
 流 速: 0.5mL/min
 检 测: UV (260nm)
 温 度: 25℃
 进样体积: 3 μ L
 样品浓度: 200mg/L
 样 品: 1kb Molecular Ruler (DNA ladder marker)
 液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)
 混合样品组成: 15 bands of DNA from 1kb to 15kb range in
 exact 1 kb increments

上述每一色谱峰均通过后续的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。具体过程如下:

1. 使用BioAssist eZ-Auto/C液相仪器将20 μ L的1kb 分子尺(DNA分子量标准物)的各组分有效分离并收集。(具体条件如下)
2. 每部分收集组分通过乙醇沉淀进行浓缩。
3. 0.6%的琼脂糖凝胶电泳(0.5 \times TBE; SeaKem GTG Agarose, Cat.50071, Lonza)。
4. 根据供应商提供的操作方法,使用Mupid蓝(宝生物公司,日本)染色。



色 谱 柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 流 动 相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)
 B: 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5)
 梯 度: 0min 80% B
 60min 95% B
 60.1min 100% B
 65min 100% B
 65.1min 80% B
 70min 80% B
 流 速: 0.5mL/min
 检 测: UV (260nm)
 温 度: 25℃
 进样体积: 20 μ L
 样品浓度: 200mg/L
 样 品: 1kb Molecular Ruler (DNA marker)
 液相色谱仪: BioAssist eZ-Auto/C (东曹公司产品)
 组分收集: 人工手动收集



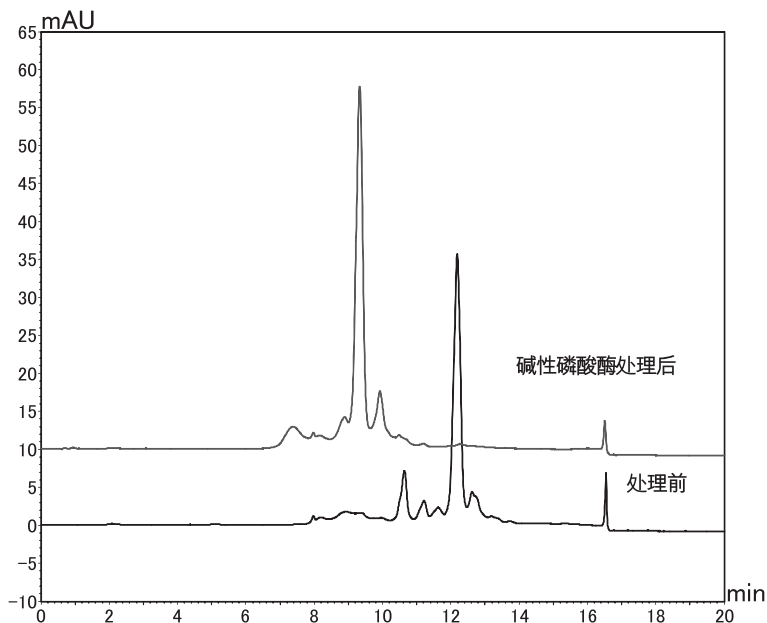
琼脂糖凝胶电泳

从组分1(Fr.1)至组分10(Fr.10)均通过琼脂糖凝胶电泳进行了鉴定。

组分3(Fr.3)在琼脂糖凝胶电泳中被观察到有3kb和5kb的两条带。这可能是因为5kb的DNA标准物中存在序列不同而分子量相同的DNA，并且其洗脱行为与3kb的DNA标准物相似而致。

2 TSKgel Q-STAT色谱柱对卵白蛋白去磷酸化异构体的分析

磷酸化异构体的分析在生物大分子表征中是非常重要的。高分辨率、非多孔型阴离子交换色谱柱TSKgel Q-STAT非常适合这样的异构体分析。本数据中介绍了TSKgel Q-STAT分析检测碱性磷酸酶处理后的卵白蛋白去磷酸化异构体的应用。



色谱柱: TSKgel Q-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.0)
 B: 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.0)
 梯度: 0min 0% B
 15min 25% B
 15.01min 100% B
 20min 100% B
 20.01min 0% B
 25min 0% B

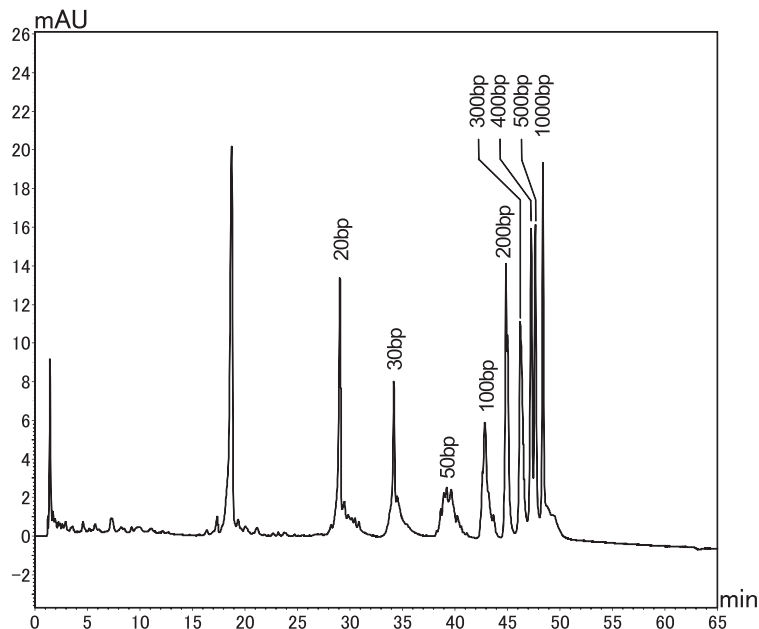
流速: 1.0mL/min
 检测: UV (280nm)
 温度: 25℃
 进样体积: 30 μL
 样品浓度: 1g/L
 样品: 卵白蛋白

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)
 操作程序: 在0.75mL的卵白蛋白样品(1g/L in 20mmol/L Tris-HCl pH8.0)中加入3uL的碱性磷酸酶(来自牛肠, 2500U/mg, 25.88g/L), 然后在37度下孵化1个小时。

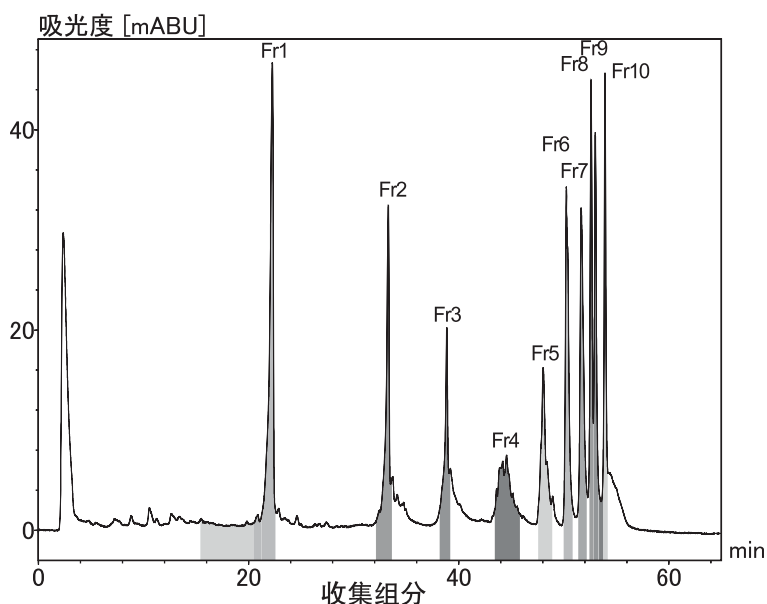
3 TSKgel DNA-STAT 色谱柱对双链RNA(dsRNA)的分析

一些小的双链RNA(dsRNA)可以高效特异地阻断体内特定基因的表达，促使mRNA降解，诱使细胞表现出特定基因缺失的表型。这种RNA干扰法已经被广泛应用于分子生物学中。

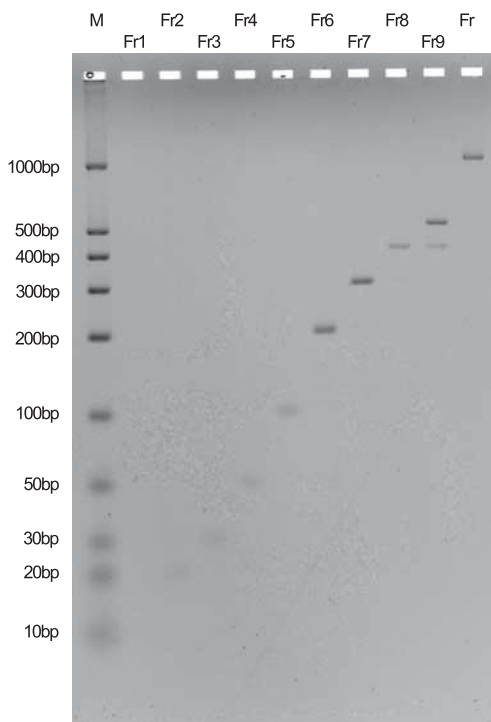
高分辨率、阴离子交换色谱柱TSKgel DNA-STAT特别适合于DNA和RNA的分析。本数据中介绍了该色谱柱在双链RNA分析中的应用。



色 谱 柱： TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 流 动 相： A; 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)
 B; 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5)
 梯 度： 0min 30% B
 60min 90% B
 60.1min 100% B
 65min 100% B
 65.1min 30% B
 70min 30% B
 流 速： 0.5mL/min
 检 测： UV (260nm)
 温 度： 25℃
 进样体积： 5 μ L
 样品浓度： 25mg/L
 样 品： 双链RNAs (RNA marker)
 液相色谱仪： Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)
 混合样品组成： double-stranded RNAs of
 10,20,30,50,100,200,300,400,500 and 1000 base pairs



色 谱 柱： TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 流 动 相： A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)
 B: 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5)
 梯 度： 0min 30% B
 60min 90% B
 60.1min 100% B
 65min 100% B
 65.1min 30% B
 70min 30% B
 流 速： 0.5mL/min
 检 测： UV (260nm)
 温 度： 25℃
 进样体积： 20 μ L
 样品浓度： 25mg/L
 样 品： 双链RNAs(RNA marker), 25ng/uL
 液相色谱仪： BioAssist eZ-Auto/C (东曹公司产品)
 组 分 收 集： 人工手动收集



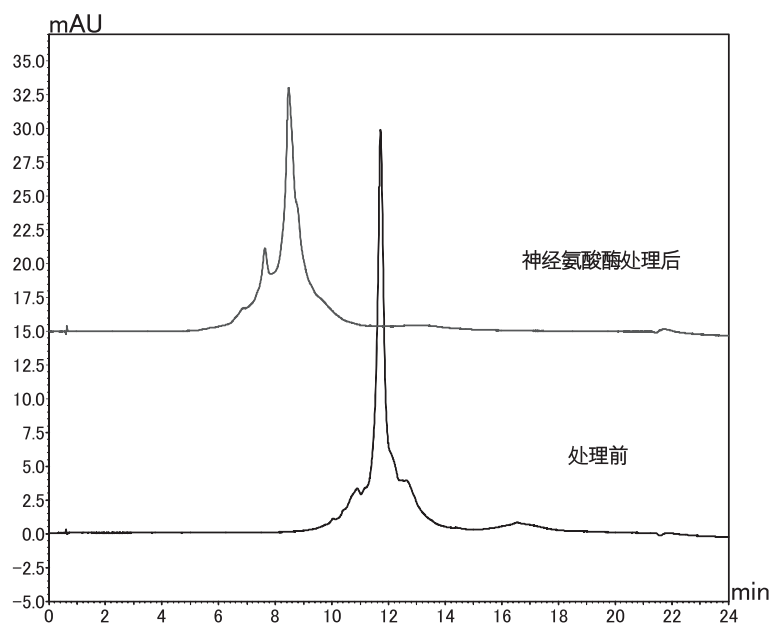
琼脂糖凝胶电泳

上述每一色谱峰均通过后续的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。具体过程如下：

1. 使用BioAssist eZ-Auto/C液相仪器将20uL的双链RNAs(RNA标准物)的各组分有效分离并收集。(具体条件如下)
2. 每部分收集组分通过乙醇沉淀进行浓缩。
3. 3%的琼脂糖凝胶电泳(1 × TBE; NuSieve 3:1 Agarose, Cat.50091, Lonza)。
4. 根据供应商提供的操作方法, 使用Mupid蓝(宝生物公司, 日本)染色。

4 TSKgel Q-STAT色谱柱对经神经氨酸酶作用、去涎酸的转铁蛋白的分析

TSKgel Q-STAT是一款高分辨率、非多孔型、尤其适合于蛋白及其异构体分析的阴离子交换色谱柱。在本数据中, 介绍了TSKgel Q-STAT色谱柱对使用神经氨酸酶作用后、去涎酸化的(desialylation)转铁蛋白的分析。



色谱柱: TSKgel Q-STAT (4.6mm I.D. x 10cm)

流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)

B: 20mmol/L Tris-HCl + 0.5mol/L NaCl (pH8.5)

梯度: 0min 5% B

20min 35% B

20.01min 100% B

23min 100% B

23.01min 5% B

28min 5% B

流速: 1.0mL/min

检测: UV (280nm)

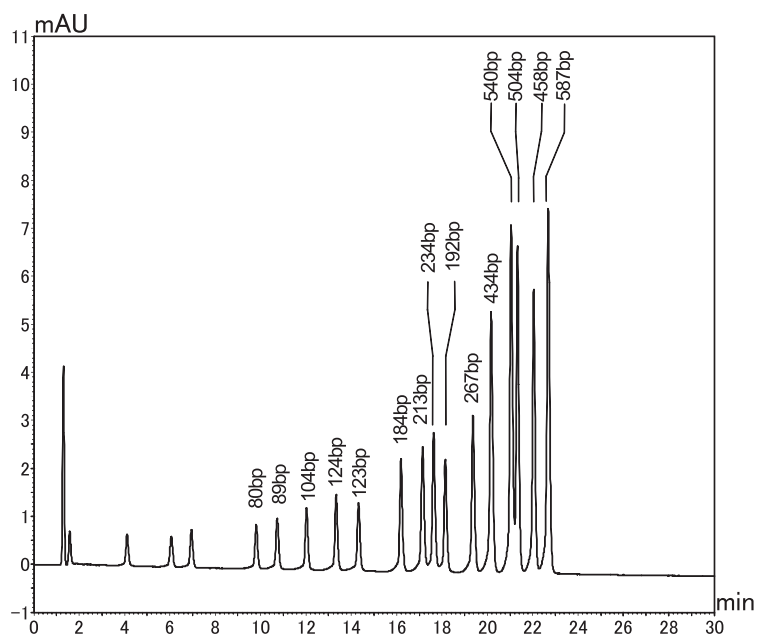
温度: 25°C

进样体积: 12 μL (1.7g/L)

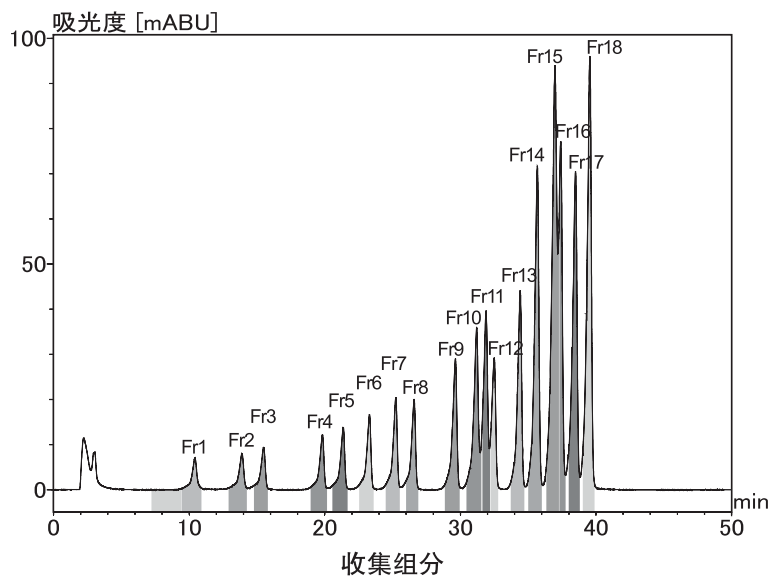
液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

处理程序: 神经氨酸酶购买自Sigma(N3786)。消化酶切方法参照了产品供应商的指导手册。在100uL的转铁蛋白溶液(2g/L; 将反应缓冲液加入套装后溶解)中加入4uL的神经氨酸酶溶液后, 37度下孵化3个小时。

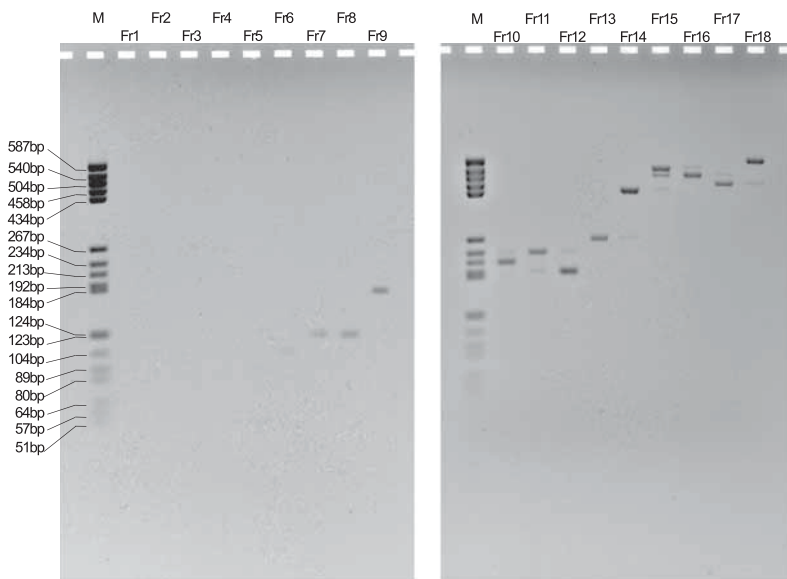
5 TSKgel DNA-STAT 色谱柱对DNA标准物的分析(1)



色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)
 B: 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5)
 梯度: 0min 75% B
 60min 95% B
 65min 95% B
 65.01min 75% B
 70min 75% B
 流速: 0.5mL/min
 检测: UV (260nm)
 温度: 35℃
 进样体积: 5 μL
 样品浓度: 44.6mg/L
 样品: pBR322-HaeIII digest
 液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)



色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)
 B: 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5)
 梯度: 0min 70% B
 60min 95% B
 65min 95% B
 65.1min 70% B
 75min 70% B
 流速: 0.5mL/min
 检测: UV (260nm)
 温度: 25℃
 进样体积: 20 μL
 样品浓度: 446mg/L
 样品: pBR322-HaeIII digest
 液相色谱仪: BioAssist eZ-Auto/C
 组分收集: 人工手动收集

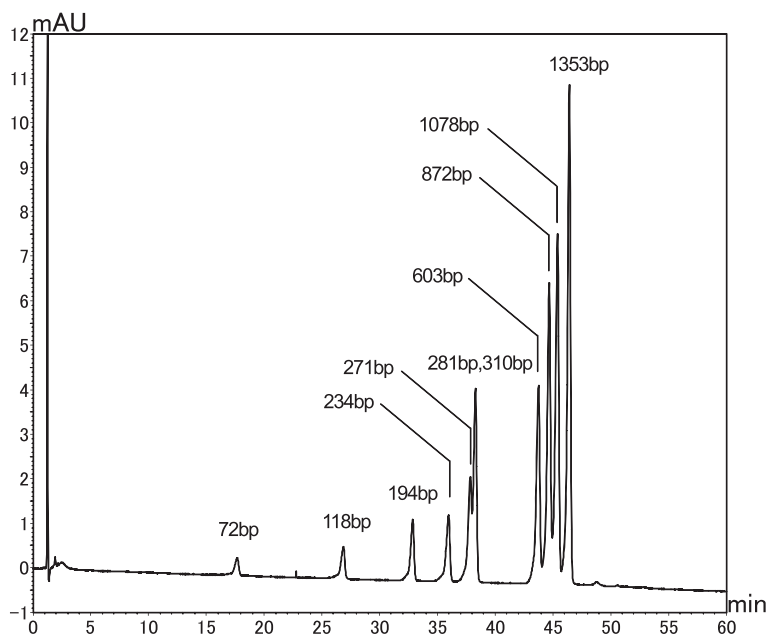


琼脂糖凝胶电泳

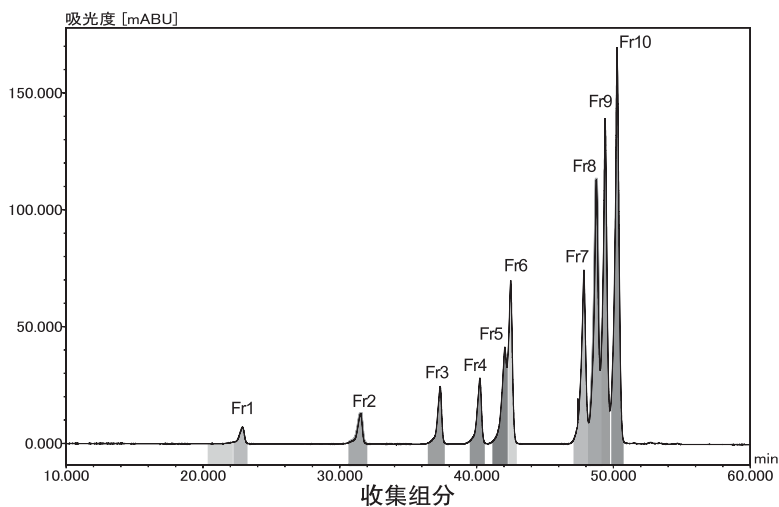
上述每一色谱峰均通过后续的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。具体过程如下。

1. 使用BioAssist eZ-Auto/C液相仪器将pBR322-HaeIII 水解物的各组分有效分离并收集。(具体条件如下)
2. 每部分收集组分通过乙醇沉淀进行浓缩。
3. 3%的琼脂糖凝胶电泳(1 × TBE; NuSieve 3:1 Agarose, cat50091, Lonza)。
4. 根据供应商提供的操作方法, 使用Mupid蓝(宝生物公司, 日本)染色。

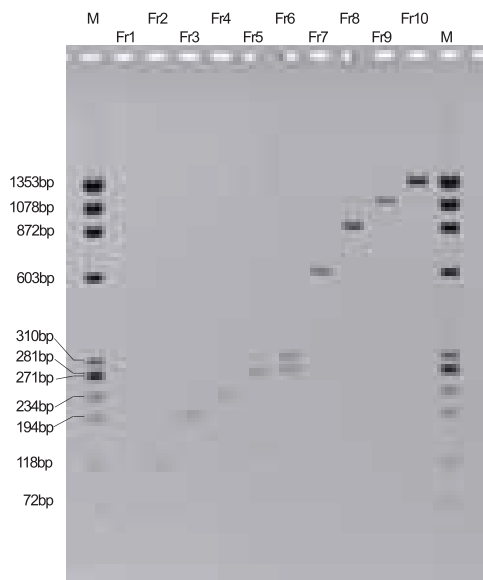
6 TSKgel DNA-STAT色谱柱对DNA标准物的分析(2)



色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 流动相: A;20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)
 B;20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5)
 梯度: 0min 70% B
 60min 90% B
 65min 90% B
 65.01min 70% B
 75min 70% B
 流速: 0.5mL/min
 检测: UV (260nm)
 温度: 25℃
 进样体积: 10 μL
 样品浓度: 38.1mg/L
 样品: Phi X174-HaeIII digest
 液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)



色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)
 B: 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5)
 梯度: 0min 70% B
 60min 90% B
 65min 90% B
 65.01min 70% B
 75min 70% B
 流速: 0.5mL/min
 检测: UV (260nm)
 温度: 25℃
 进样体积: 50 μL
 样品浓度: 152mg/L
 样品: Phi X174-HaeIII digest, 152ug/mL
 液相色谱仪: BioAssist eZ-Auto/C
 组分收集: 人工手动收集



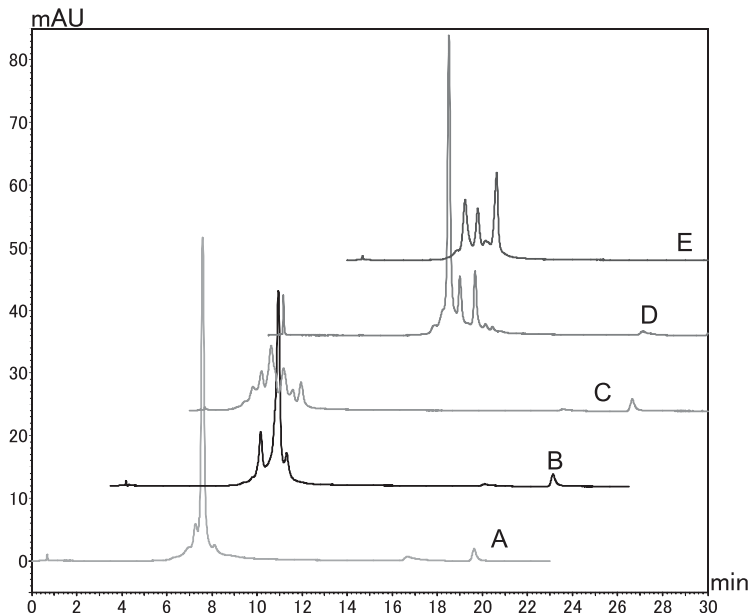
琼脂糖凝胶电泳

上述每一色谱峰均通过后续的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。具体过程如下:

1. 使用BioAssist eZ-Auto/C液相仪器将7.62ug的Phi X174-HaeIII水解物的各组分有效分离并收集。(具体条件如下)
2. 每部分收集组分通过乙醇沉淀进行浓缩。
3. 2%的琼脂糖凝胶电泳(1 × TBE; NuSieve 3:1 Agarose, cat50091, Lonza)。
4. 根据供应商提供的操作方法, 使用Mupid蓝(宝生物公司, 日本)染色。

7 TSKgel CM-STAT色谱柱对抗体药物异构体的分析(1)

许多治疗性基因重组抗体正被应用于药物治疗，并且逐年呈增加趋势。这些治疗性抗体药物的质量控制及异构体的分析显然是非常重要的。TSKgel CM-STAT色谱柱便是这样一款高分辨率、非多孔、非常适合于抗体异构体分析的弱阳离子交换色谱柱。本数据中便介绍了TSKgel CM-STAT色谱柱分析5种市售的治疗性抗体药物的应用。



色谱柱: TSKgel CM-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)

流动相: A: 20mmol/L MES (pH6.0)

B: 20mmol/L MES + 500mmol/L NaCl (pH6.0)

梯度: 0min 10% B

15min 30% B

15.1min 100% B

18min 100% B

18.1min 10% B

23min 10% B

流速: 1.0mL/min

检测: UV (280nm)

温度: 25℃

进样体积: 20 μL

样品浓度: 0.5g/L

样品: A: humanized, IgG1 B: humanized, IgG1

C: chimera, IgG1 D: chimera, IgG1

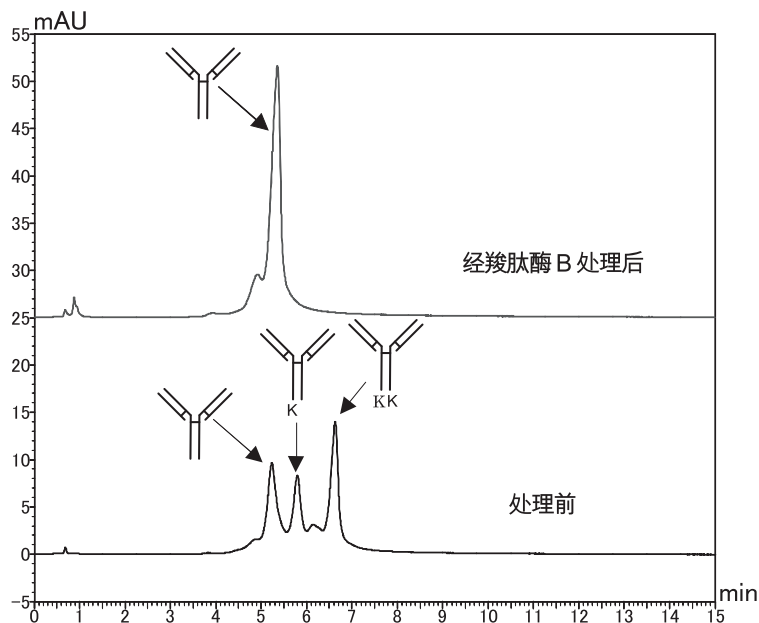
E: chimera, IgG1

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

8 TSKgel CM-STAT色谱柱对抗体药物异构体的分析(2)

在人IgG1的C末端通常具有精氨酸或赖氨酸的结构，某些时候会因为精氨酸或赖氨酸的缺失而出现异构体。

使用羧肽酶B处理抗体样品，C末端的赖氨酸结构可以被去除。在本数据中，介绍了一款高分辨率、非多孔、适合于抗体异构体分析的弱阳离子交换色谱柱TSKgel CM-STAT分析一种市售治疗性抗体药物(已知含有C末端赖氨酸缺失型异构体)的应用。从分析谱图中可以看出，未经羧肽酶B处理的抗体样品出现了3个主要色谱峰。经过羧肽酶B处理后，由于C末端赖氨酸被除去，3个色谱峰变成了1个主要色谱峰。



色谱柱: TSKgel CM-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)

流动相: A:20mmol/L MES (pH6.0)

B:20mmol/L MES + 500mmol/L NaCl (pH6.0)

梯度: 0min 10% B

15min 30% B

15.1min 100% B

18min 100% B

18.1min 10% B

23min 10% B

流速: 1.0mL/min

检测: UV (280nm)

温度: 25℃

进样体积: 20 μL

样品浓度: 0.5g/L

样品: 经羧肽酶B处理和未经羧肽酶处理的治疗性抗体药物

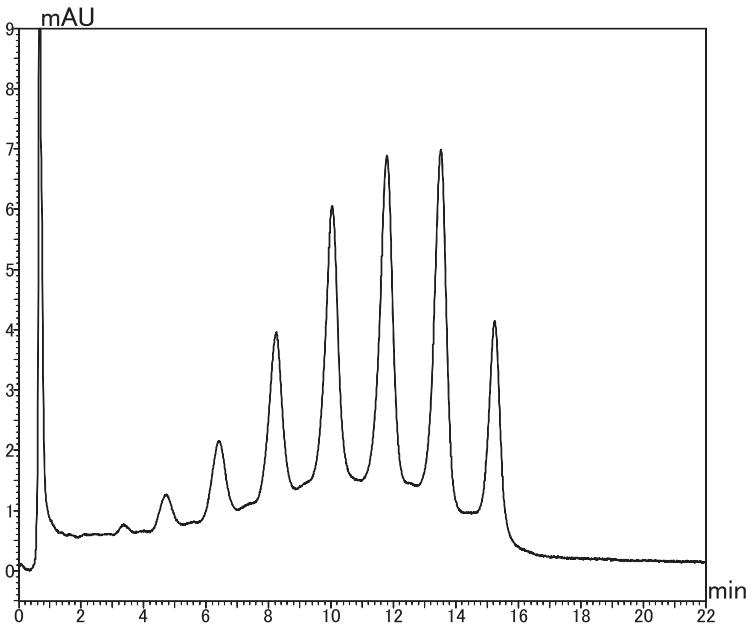
液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

程序: 在35uL的治疗性抗体(10mg/mL)中加入1uL的羧肽酶B(Sigma C9584, 140U/mg protein, 5g/L in PBS), 37度下孵化3个小时。然后加入664uL的20mmol/L的MES(pH6.0)以将抗体样品浓度稀释至0.5g/L。最后取20uL的稀释样品进样。

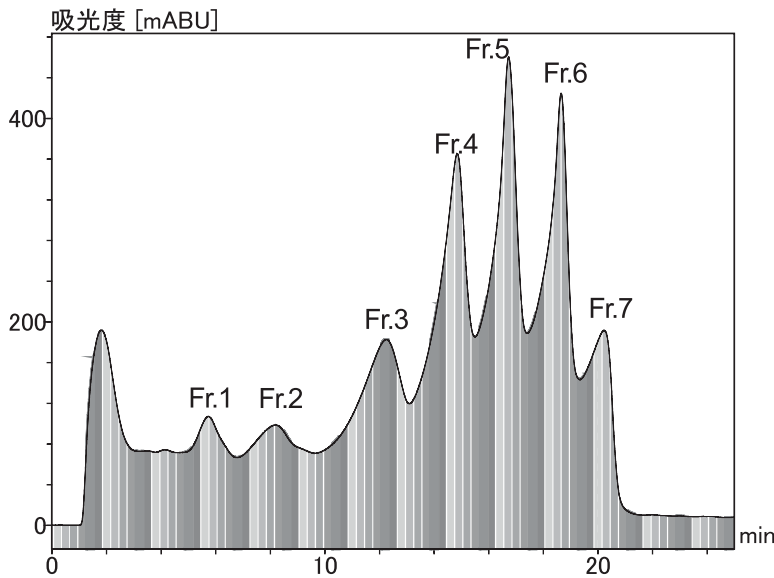
9 TSKgel CM-STAT色谱柱对鼠腹水纯化而来的单抗异构体的分析

从老鼠腹水中纯化而来的单克隆抗体往往含有一些异构体。即使在SDS-PAGE电泳分析中只显示一条带，但当使用等电聚焦电泳时却可以观察到多条带的存在。

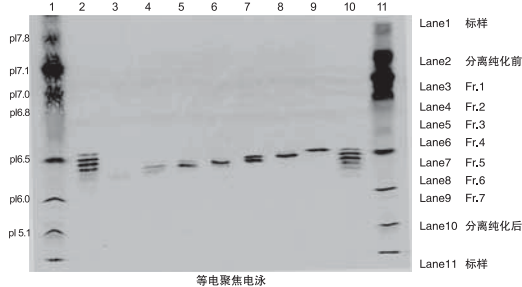
TSKgel CM-STAT 是一款适合于分析抗体异构体的高分辨率、非多孔、弱阳离子交换色谱柱。在本数据中介绍了使用 TSKgel CM-STAT 色谱柱进行鼠腹水由来的单克隆抗体异构体分析的应用。同时，我们将通过TSKgel CM-STAT 色谱柱分离获得的不同组分进一步使用等电聚焦电泳进行了鉴定。结果表明，TSKgel CM-STAT 色谱柱确实适合于异构体的分析，并且可以适用于毫克级别的微量、高分离度的样品制备。



色 谱 柱 : TSKgel CM-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 流 动 相 : A: 20mmol/L MES (pH6.0)
 B: 20mmol/L MES + 0.1mol/L NaCl (pH6.0)
 梯 度 : 0min 20% B
 30min 50% B
 30.1min 100% B
 35min 100% B
 35.1min 20% B
 40min 20% B
 流 速 : 1.0mL/min
 检 测 : UV (280nm)
 温 度 : 25°C
 进 样 体 积 : 20 μ L
 样 品 浓 度 : 1g/L
 样 品 : Mouse monoclonal antibody (from mouse acites,IgG1)
 液 相 色 谱 仪 : Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

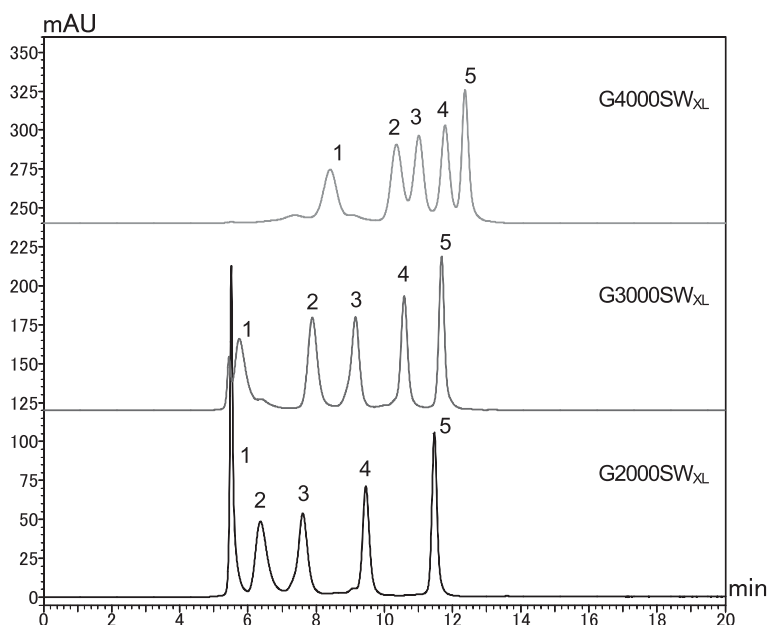


色 谱 柱 : TSKgel CM-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 流 动 相 : A: 20mmol/L MES (pH6.0)
 B: 20mmol/L MES + 0.1mol/L NaCl (pH6.0)
 梯 度 : 0min 20% B
 30min 50% B
 30.1min 100% B
 35min 100% B
 35.1min 20% B
 45min 20% B
 流 速 : 1.0mL/min
 检 测 : UV (280nm)
 温 度 : 25°C
 进 样 体 积 : 20 μ L
 样 品 浓 度 : 2.32g/L
 样 品 : Mouse monoclonal antibody (from mouse acites,IgG1)
 液 相 色 谱 仪 : BioAssist eZ-Auto/C
 组 分 收 集 : 人工手动收集



等电聚焦电泳

10 TSKgel SW_{XL}系列色谱柱对标准蛋白混合样品的分析(1)



色谱柱：TSKgel SW_{XL}系列

流动相：20mmol/L phosphate buffer + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)

流速：1.0mL/min

检测：UV (280nm)

温度：25℃

进样体积：10 μL

样品：Standard sample

液相色谱仪：Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

样品组成：

1. Thyroglobulin (M.W.:640KDa, bovine thyroid, Sigma T1001, 3g/L)

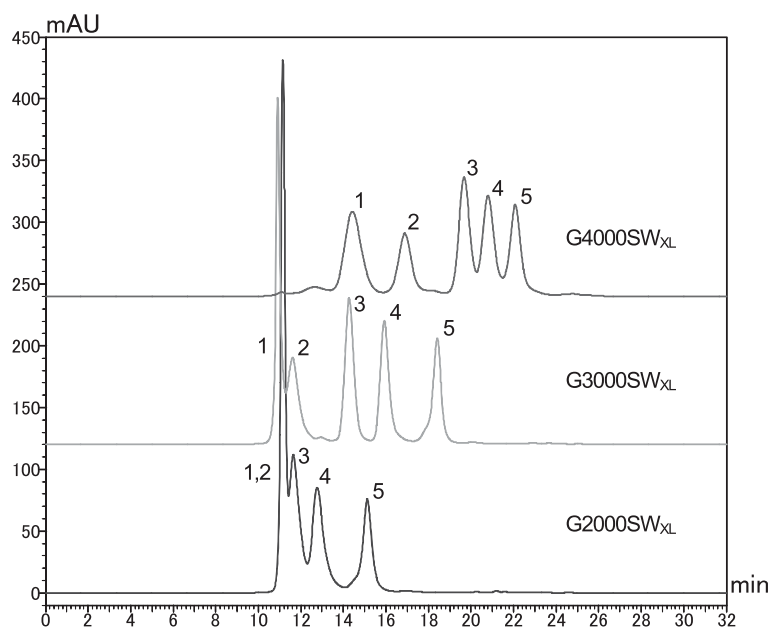
2. Mouse monoclonal antibody (M.W.:150KDa, in house, IgG1,2g/L)

3. Conalbumin (M.W.:47KDa, Wako pure chemicals, Japan, 016-17073, 4g/L)

4. Ribonuclease A (M.W.:13.7KDa, Sigma R4875, 4g/L)

5. Vitamin B12 (M.W.:1355, Wako pure chemicals, Japan, 224-00344, 0.2g/L)

11 TSKgel SW_{XL}系列色谱柱对标准蛋白混合样品的分析(2)



色谱柱：TSKgel SW_{XL}系列

流动相：20mmol/L Phosphate buffer + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)

流速：0.5mL/min

检测：UV (280nm)

温度：25℃

进样体积：10 μL

样品：standard protein (high molecular weight)

液相色谱仪：Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

样品组成：

1. Mouse monoclonal antibody, IgM (M.W.:900KDa, in house, 3g/L)

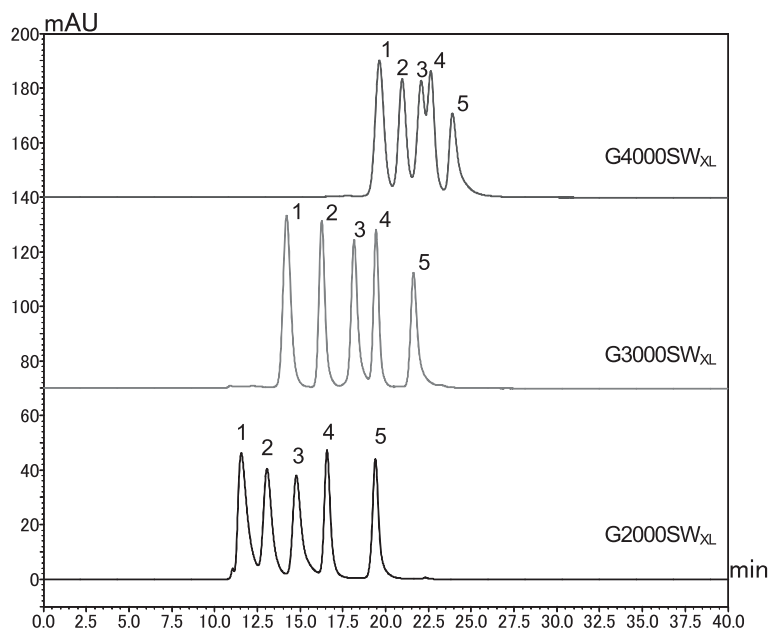
2. Thyroglobulin (M.W.:667KDa, bovine thyroid, Sigma T1001, 3g/L)

3. Glutamate dehydrogenase (M.W.:280KDa, Wako pure chemicals, Japan, 306-50844, 4g/L)

4. Mouse monoclonal antibody, IgG1 (M.W.:150KDa, in house, 2g/L)

5. Conalbumin (M.W.:47KDa, Wako pure chemicals, Japan, 016-17073, 4g/L)

12 TSKgel SW_{XL}系列色谱柱对标准蛋白混合样品的分析(3)



色 谱 柱: TSKgel SW_{XL}系列

流 动 相: 20mmol/L Phosphate buffer + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)

样 品: MW-MARKER PROTEINS (HPLC用; Cat:46804000, ORIENTAL YEAST CO.,LTD, 日本)

流 速: 0.5mL/min

检 测: UV (280nm)

温 度: 25℃

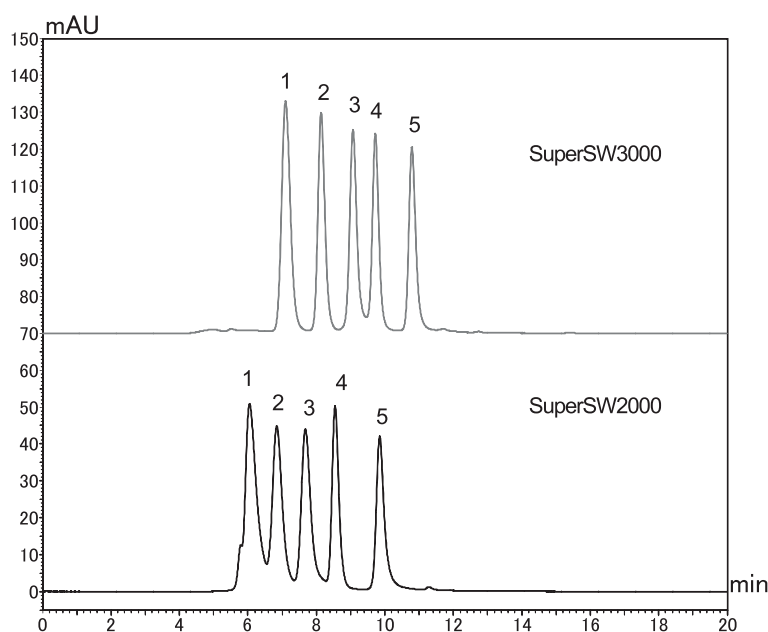
进样体积: 5 μ L

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

样品组成:

1. Glutamate dehydrogenase (yeast, M.W.:290KDa, 1.83g/L)
2. Lactate dehydrogenase (pig heart, M.W.:142KDa, 1.58g/L)
3. Enolase (yeast, M.W.:67KDa, 1.35g/L)
4. Myokinase (yeast, M.W.:32KDa, 1.31g/L)
5. Cytochrome C (horse heart, M.W.:12.4KDa, 1.25g/L)

13 TSKgel SuperSW系列色谱柱对标准蛋白混合样品的分析



色 谱 柱: TSKgel SuperSW系列

流 动 相: 20mmol/L Phosphate buffer + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)

样 品: MW-MARKER PROTEINS (HPLC用, Cat:46804000, ORIENTAL YEAST CO.,LTD, 日本)

流 速: 0.35mL/min

检 测: UV (280nm)

温 度: 25℃

进样体积: 2 μ L

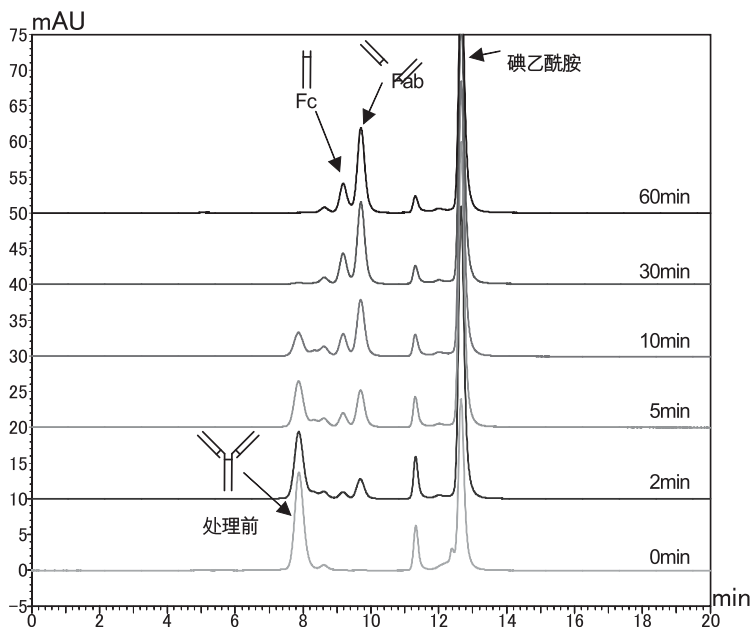
液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

样品组成:

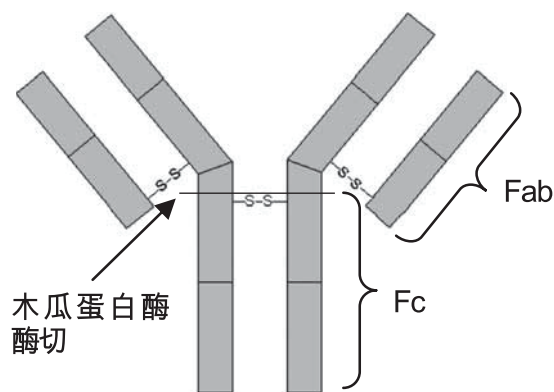
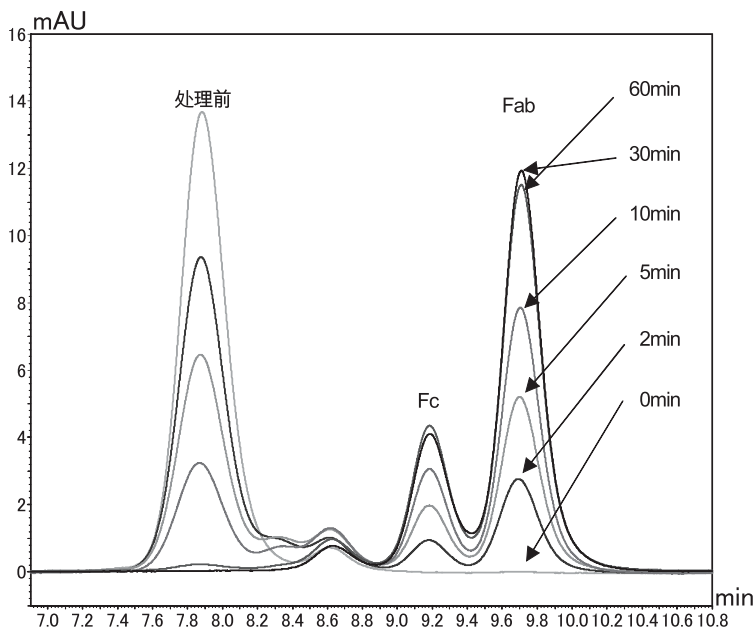
1. Glutamate dehydrogenase (yeast, M.W.:290KDa, 1.83g/L)
2. Lactate dehydrogenase (pig heart, M.W.:142KDa, 1.58g/L)
3. Enolase (yeast, M.W.:67KDa, 1.35g/L)
4. Myokinase (yeast, M.W.:32KDa, 1.31g/L)
5. Cytochrome C (horse heart, M.W.:12.4KDa, 1.25g/L)

14 TSKgel G3000SW_{XL} 色谱柱对抗体片段Fab的分析

抗体的Fab片段化是一种提高抗体穿透性、减少对ELISA的非特异性吸附以及获得其他多种目的而被广泛采用的方法。对于Fab片段的制备，木瓜蛋白酶的使用非常普遍。本数据中介绍了一款特别适合于蛋白分析的TSKgel G3000SW_{XL}分子尺寸排阻色谱柱，对使用木瓜蛋白酶进行老鼠单克隆抗体IgG1酶切/消化时，单抗随时间变化情况的分析应用。

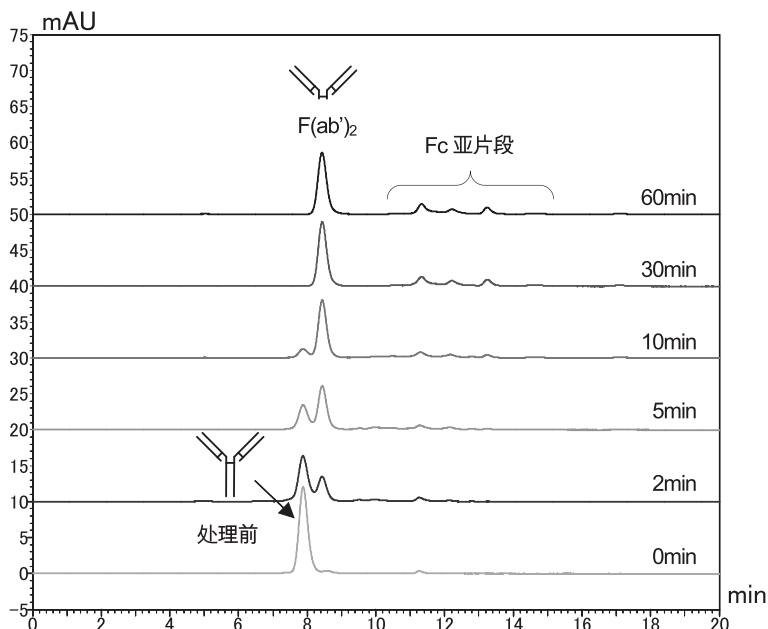


色 谱 柱: TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm)
 流 动 相: 20mmol/L Phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流 速: 1.0mL/min
 检 测: UV (280nm)
 温 度: 25°C
 进样体积: 20 μL
 样品浓度: 0.22g/L
 液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)
 程 序: 木瓜蛋白酶酶切/消化反应是在含有0.15mol/L NaCl、1mmol/L EDTA、25mmol/L 巯基乙醇的10mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.3)中, 37度的温度下进行的。在5g/L的抗体溶液中加入10%(体积比)的木瓜蛋白酶(Sigma P4762,1g/L)并孵化。
 当酶切/消化反应分别进行到2, 5, 10, 30和60分钟时, 取48.5uL的反应溶液并立刻加入1.5uL的1mol/L的碘乙酰胺以阻止酶切/消化反应继续进行。
 上述50uL停止反应的溶液中, 加入950uL的20mmol/L 磷酸缓冲液 +0.3mol/L NaCl(pH7.0)稀释后, 进样分析。

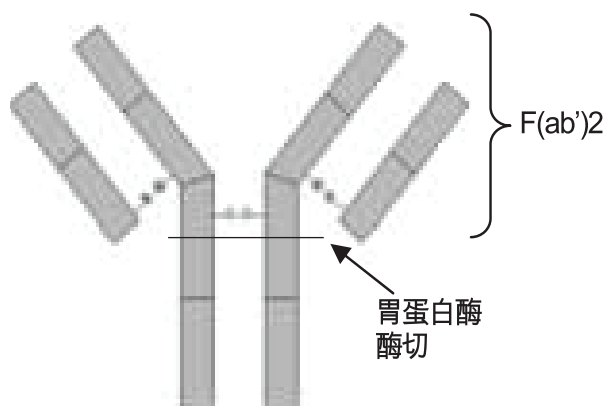
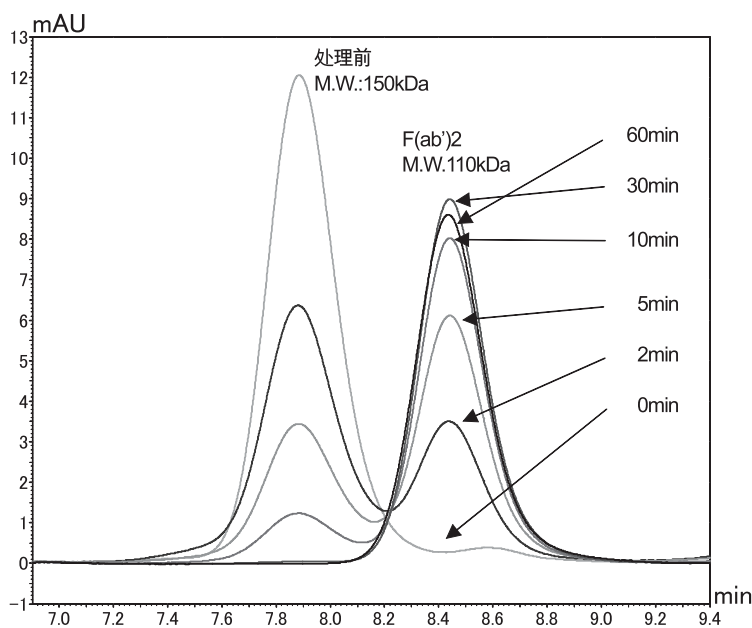


15 TSKgel G3000SW_{XL} 色谱柱对抗体片段(Fab')₂的分析

抗体的F(ab')₂片段化是一种提高抗体穿透性、减少对ELISA的非特异性吸附以及获得其他多种目的而被广泛采用的方法。对于F(ab')₂片段的制备，胃蛋白酶的使用非常普遍。但不同种类或亚种类的抗体，对胃蛋白酶的敏感程度是不同的。因此，在酶切/消化反应的初期，对反应条件(如pH或反应时间等)进行优化是需要的。本数据中介绍了一款特别适合于蛋白分析的TSKgel G3000SW_{XL}分子尺寸排阻色谱柱，对使用胃蛋白酶进行老鼠单克隆抗体IgG1酶切/消化时，单抗随时间变化情况的分析应用。

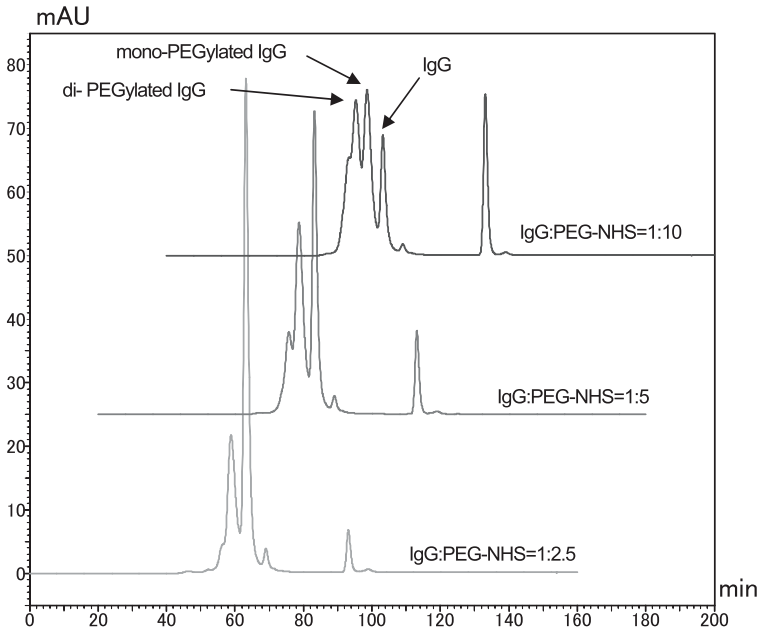


色 谱 柱: TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm)
 流 动 相: 20mmol/L Phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流 速: 1.0mL/min
 检 测: UV (280nm)
 温 度: 25℃
 进样体积: 20 μ L
 样品浓度: 0.192g/L
 液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)
 程 序: 胃蛋白酶酶切/消化反应是在0.1mol/L的柠檬酸盐缓冲液(pH3.7)中, 37度的温度下进行的。在5g/L的抗体溶液中, 加入40单位的胃蛋白酶 (Sigma P7012,1g/L)/mg并孵化。
 当酶切/消化反应分别进行到2, 5, 10, 30和60分钟时, 取40uL的反应溶液并立刻加入10uL的3mol/L的Tris(羟甲基)-氨基甲烷以阻止酶切/消化反应继续进行。
 上述50uL停止反应的溶液中, 加入990uL的20mmol/L 磷酸缓冲液 +0.3mol/L NaCl(pH7.0)稀释后, 进样分析。



16 TSKgel SW_{XL}系列色谱柱对PEG化鼠单抗(IgG1)的分析

治疗性蛋白的PEG化是一种延长蛋白药物体内半衰期的策略。本数据中，介绍了通过混合N-羟基琥珀酰亚胺酯衍生物(IgG:PEG-NHS = 1:2.5 到 1:10)将PEG导入抗体，并使用一款分子尺寸排阻、适合蛋白分析的TSKgel G3000SW_{XL}色谱柱进行PEG化分析的应用。



色谱柱: TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm), 2 columns

流动相: 20mmol/L Phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)

流速: 0.25mL/min

检测: UV (280nm)

温度: 25℃

进样体积: 20 μL

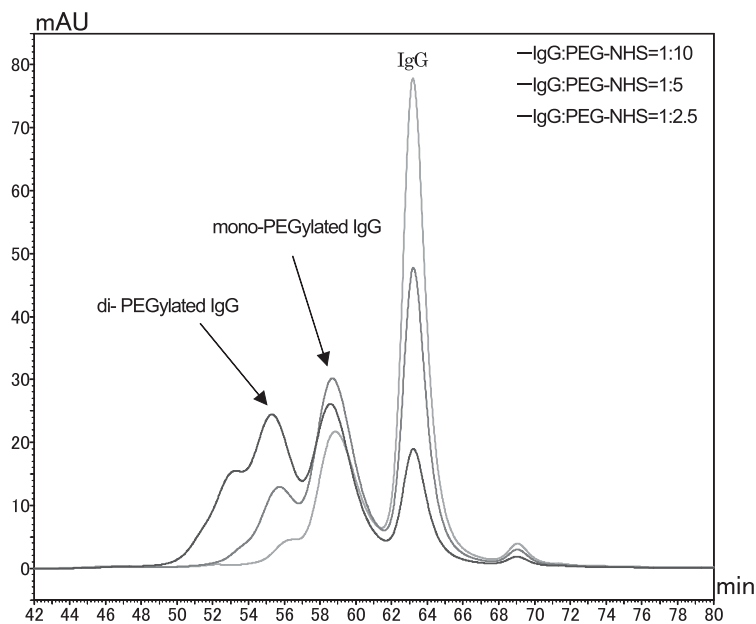
样品浓度: 0.5g/L

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

PEG化程序: PEG化反应是在20mmol/L 磷酸盐缓冲液 + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)溶液中、4度下进行的。

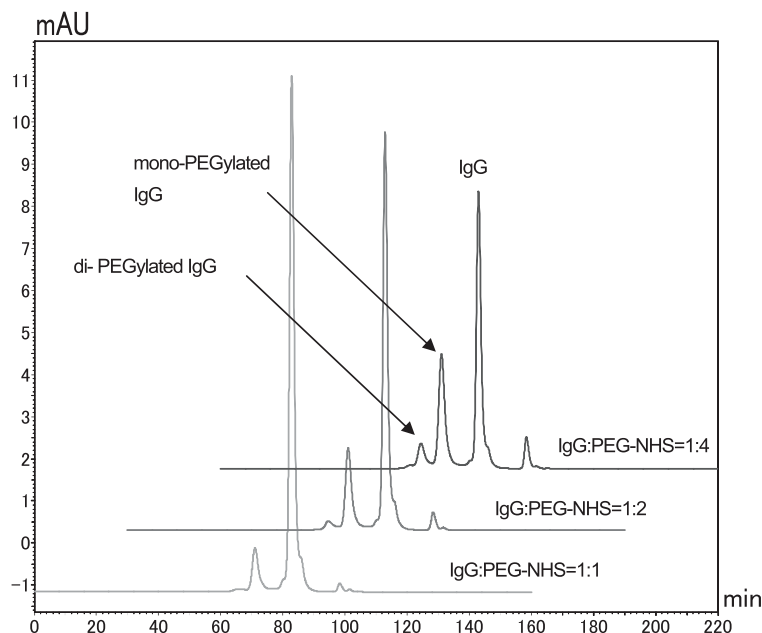
将PEG-NHS酯 (SUNBRIGHT ME-050CS, 分子量:5000, NOF公司, 日本) /DMF的摩尔比分别为2.5、5、10 的混合物加入浓度为5g/L的抗体溶液，孵化反应17个小时。

取上述100uL的反应溶液，加入900uL的20mmol/L磷酸盐缓冲液+ 0.3mol/L NaCl (pH7.0)后进样分析测定。

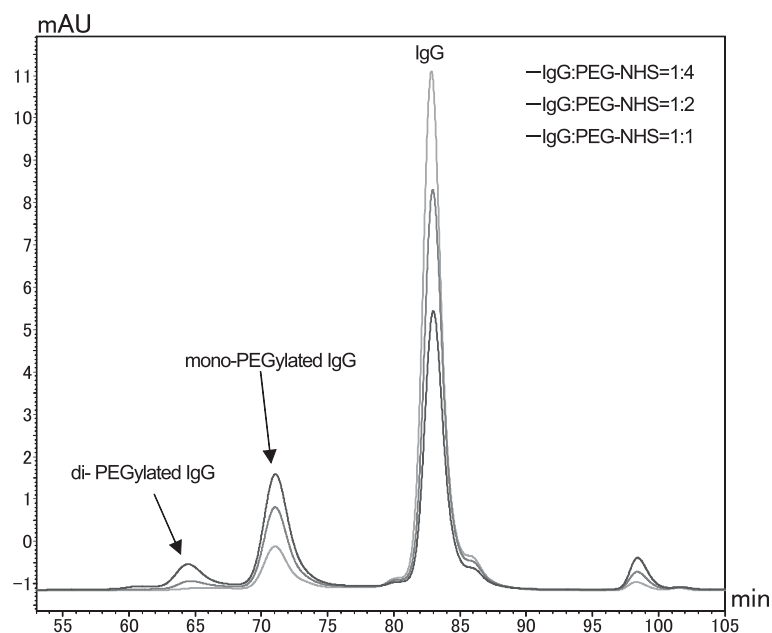


17 TSKgel G4000SW_{XL} 色谱柱对PEG化鼠单抗(IgG1)的分析

治疗性蛋白的PEG化是一种延长蛋白药物体内半衰期的策略。本数据中，介绍了通过混合N-羟基琥珀酰亚胺衍生物 (IgG:PEG-NHS = 1:1 到 1:4)将PEG导入抗体，并使用一款分子尺寸排阻、适合蛋白分析的TSKgel G4000SW_{XL}色谱柱进行PEG化分析的应用。

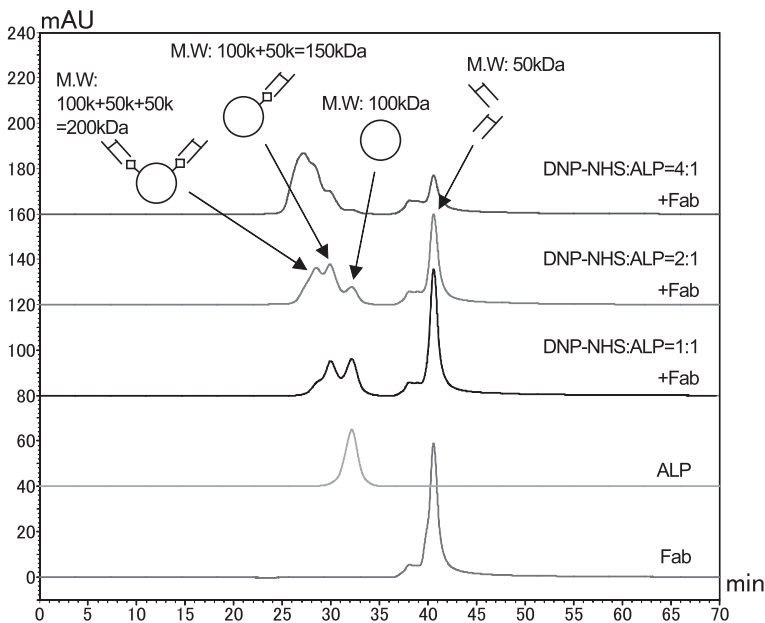


色 谱 柱: TSKgel G4000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm), 2 columns
 流 动 相: 20mmol/L Phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流 速: 0.25mL/min
 检 测: UV (280nm)
 温 度: 25℃
 进样体积: 20 μ L
 样品浓度: 0.5g/L
 液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)
 PEG化程序: PEG化反应是在20mmol/L 磷酸盐缓冲液 + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)溶液中、4度下进行的。
 将PEG-NHS酯 (SUNBRIGHT ME-200CS, 分子量:20000, NOF公司, 日本) / 甲醇的摩尔比分别为1、2、4的混合物加入浓度为5g/L的抗体溶液，孵化反应17个小时。
 取上述100uL的反应溶液，加入900uL的20mmol/L磷酸盐缓冲液+ 0.3mol/L NaCl (pH7.0)后进样分析测定。



18 TSKgel G3000SW_{XL} 色谱柱对蛋白表面导入的半抗原数量的定量分析

免疫染色和酶联免疫吸附测定(ELISA)法中,在蛋白表面上结合小分子(如染料或半抗原)是普遍采用的一种方法。在本数据中,使用分子尺寸排阻色谱法并通过抗半抗原单克隆抗体(anti-DNP抗体, Fab)对蛋白(碱性磷酸酶: ALP)表面导入的半抗原(二硝基酚: DNP)的分布进行评价分析。



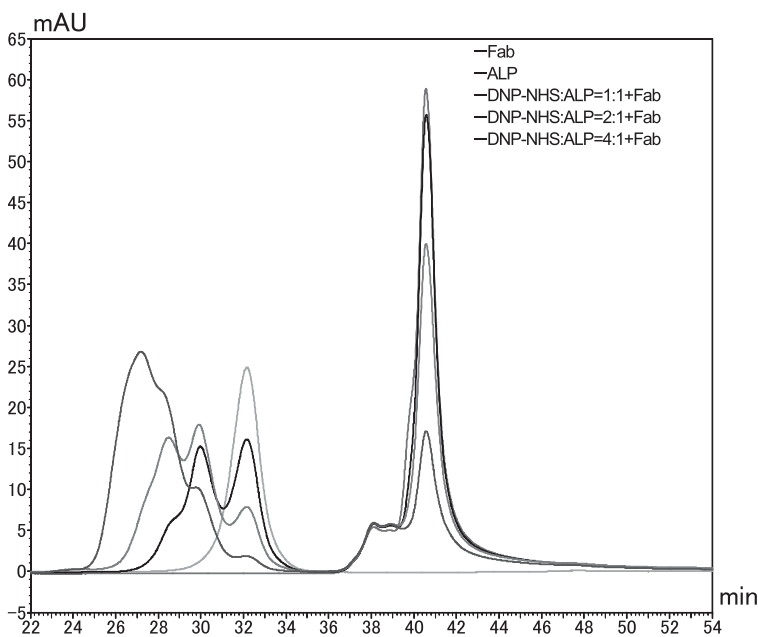
色谱柱: TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm)
 流动相: 20mmol/L phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流速: 0.25mL/min
 检测: UV (280nm)
 温度: 25℃

进样体积: 20 μL

样品浓度: DNP-ALP; 0.67g/L, anti DNP Fab; 1g/L

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

程序: 在碱性磷酸酶(ALP)溶液(5g/L)中,加入摩尔比分别为1, 2, 4的DNP-X-NHS酯(AnaSpec, Cat#81228)/DMF后,在4度下保持17个小时。然后使用分子尺寸排阻色谱法(SEC)分离纯化DNP-ALP。使用木瓜蛋白酶酶切/消化抗DNP鼠单抗(Cosmo Bio, Cat#LO-DNP-61)至Fab,并通过分子尺寸排阻色谱法(SEC)分离纯化。将过量的抗DNP的Fab片段(anti-DNPFab)加入DNP-ALP后并进行分析。抗DNP的Fab片段(anti-DNPFab; 50kDa)将会结合到DNP-ALP(100kDa)的表面。DNP-ALP的表征分子量大小增加程度将取决于DNP的导入程度。利用这种方法,可以定量分析蛋白表面导入的半抗原的平均数量及其分布情况。



DNP-NHS 和 ALP 的混合比	比例(%)			
	DNP 的导入(数目)			
例	0	1	2	≥3
1:1	61%	32%	7%	0%
2:1	30%	40%	22%	8%
4:1	7%	19%	30%	44%

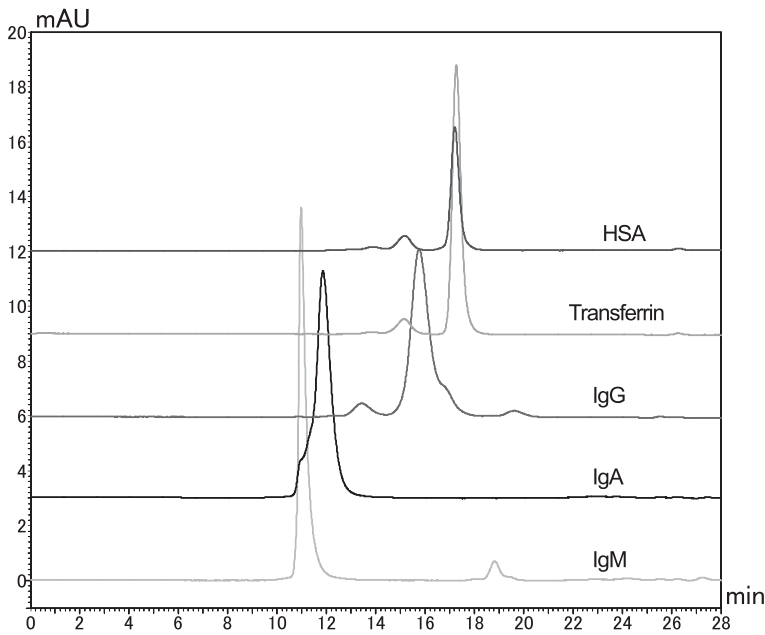
说明:

碱性磷酸酶(ALPase)的分子量为100kDa。根据产品供应商的出厂检验数据表,我们使用了1%(A280)相当于10这样的关系来评价DNP的导入比例。

比例的评估

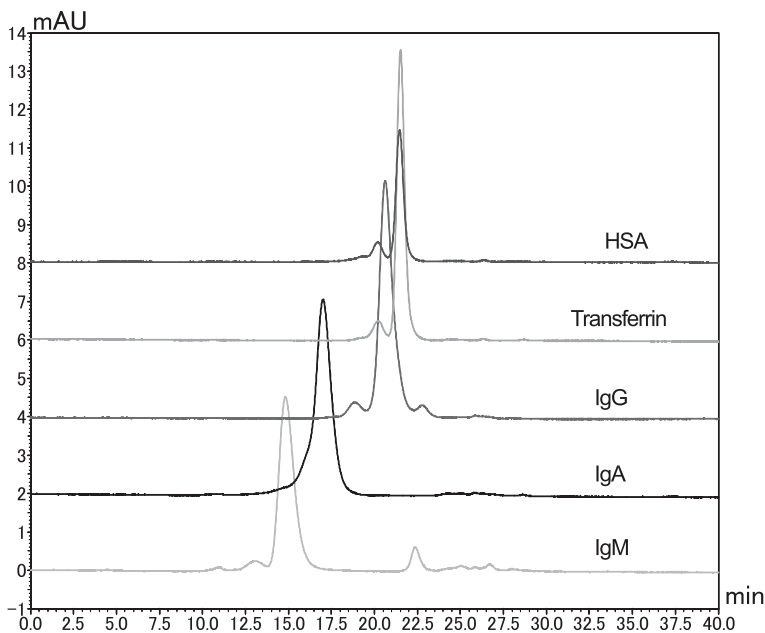
Fab片段的分子量为50kDa。我们使用了1%(A280)相当于14这样的关系来评价DNP的导入比例。

19 TSKgel G3000SW_{XL} 色谱柱对人免疫球蛋白的分析



色 谱 柱: TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm)
 流 动 相: 20mmol/L Phosphate buffer + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流 速: 0.5mL/min
 检 测: UV (280nm)
 温 度: 25℃
 进样体积: 15 μ L
 进样浓度: 0.17g/L
 样 品:
 1. Human IgM (from myeloma, M.W.:970KDa)
 2. Human IgA (colostrum,,M.W.:390KDa)
 3. Human IgG (M.W.:150KDa)
 4. Transferrin (M.W.:80KDa)
 5. Human serum albumin (M.W.:66KDa)
 液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

20 TSKgel G4000SW_{XL} 色谱柱对人免疫球蛋白的分析

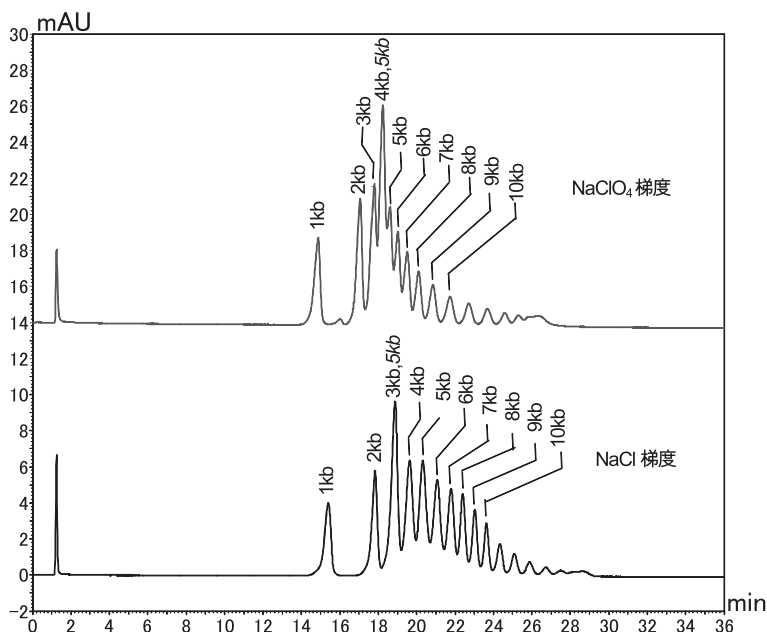


色 谱 柱: TSKgel G4000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm)
 流 动 相: 20mmol/L Phosphate buffer + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流 速: 0.5mL/min
 检 测: UV (280nm)
 温 度: 25℃
 进样体积: 15 μ L
 进样浓度: 0.17g/L
 样 品:
 1. Human IgM (from myeloma, M.W.:970KDa)
 2. Human IgA (colostrum,,M.W.:390KDa)
 3. Human IgG (M.W.:150KDa)
 4. Transferrin (M.W.:80KDa)
 5. Human serum albumin (M.W.:66KDa)
 液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

21 TSKgel DNA-STAT色谱柱对1kd DNA分子量标准物的分析

对于离子交换色谱法，改变盐的种类尽管不会对结果产生显著影响，但还是可以在一定程度上提高分离的选择性和分辨率。在这篇应用中，对TSKgel DNA-STAT(一款高分辨率离子交换色谱柱；尤其适合DNA和RNA的分析)就DNA分析中，当使用不同的NaCl和NaClO₄梯度洗脱时，进行了结果的比较。

从下列色谱图中可以看出，采用不同的NaCl和NaClO₄梯度，分离选择性方面确实略有不同。当使用NaCl梯度洗脱时，3kb和一种5kb(下图中斜体标记处)的DNA在同一保留时间处被洗脱出来。另一方面，当使用NaClO₄梯度洗脱时，4kb和这种5kb(上图中斜体标记处)的DNA在另一相同的保留时间处被洗脱出来。这可能是由于这种被建议添加、以用于增强琼脂糖凝胶电泳显带强度的5kb(图中斜体标记处)的DNA，具有与其他5kd DNA不同的序列，并且其保留时间也会随着梯度洗脱用盐的种类变化而变化。



NaClO₄梯度 (上图)

色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)

流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)

B: 20mmol/L Tris-HCl + 0.5mol/L NaClO₄ (pH8.5)

梯度: 0min	65% B
60min	80% B
60.1min	100% B
65min	100% B
65.1min	65% B
70min	65% B

流速: 0.5mL/min

检测: UV (260nm)

温度: 25°C

进样体积: 3 μL

样品浓度: 200mg/L

样品: 1kb Molecular Ruler (DNA marker)

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

混合物组成: 15 bands of DNA from 1kb to 15kb range in exact 1 kb increments

NaCl梯度 (下图)

色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)

流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)

B: 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5)

梯度: 0min	80% B
60min	95% B
60.1min	100% B
65min	100% B
65.1min	80% B
70min	80% B

流速: 0.5mL/min

检测: UV (260nm)

温度: 25°C

进样体积: 3 μL

样品浓度: 200mg/L

样品: 1kb Molecular Ruler (DNA marker)

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

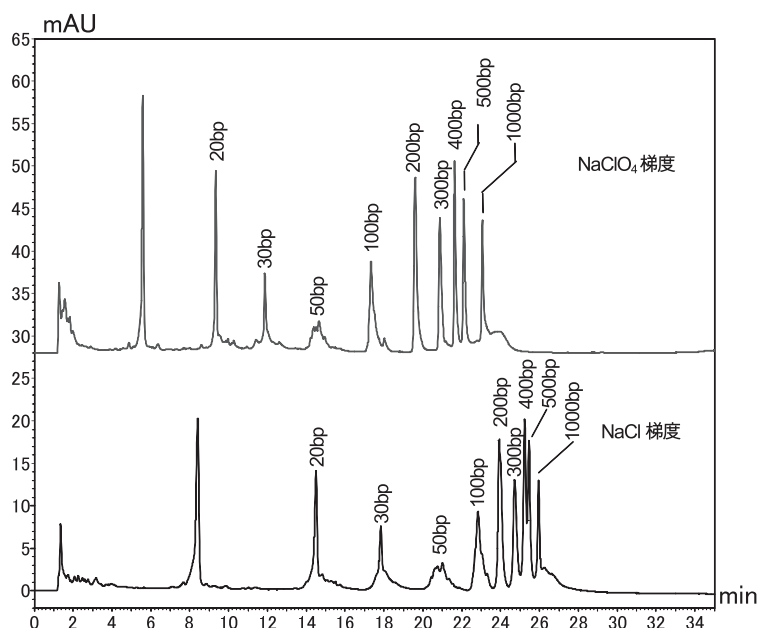
混合物组成: 15 bands of DNA from 1kb to 15kb range in exact 1 kb increments

22 TSKgel DNA-STAT 色谱柱对双链RNA(dsRNA)的分析

一些小的双链RNA(dsRNA)可以高效特异地阻断体内特定基因的表达，促使mRNA降解，诱使细胞表现出特定基因缺失的表型。这种RNA干扰法(RNAi)已经被广泛应用于分子生物学中。

在这篇应用中，对TSKgel DNA-STAT(一款高分辨率离子交换色谱柱；尤其适合DNA和RNA的分析)就DNA分析中，当使用不同的NaCl和NaClO₄梯度洗脱时，进行了结果的比较。

从下列色谱图中可以看出，1)采用不同的NaCl和NaClO₄梯度，分离选择性方面确实略有不同；2)与NaCl相比，NaClO₄可以在更低的浓度梯度下洗脱双链RNA(dsRNA)；3)当RNA长度小于50bp时，保留差异性在NaCl梯度下表现得更为显著，但当RNA长度大于50bp时，NaClO₄梯度表现出更高的分辨率。



NaClO₄ 梯度 (上图)

色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)

流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)

B: 20mmol/L Tris-HCl + 0.5mol/L NaClO₄ (pH8.5)

梯度:	0min	40% B
	30min	80% B
	30.1min	100% B
	35min	100% B
	35.1min	30% B
	40min	30% B

流速: 0.5mL/min

检测: UV (260nm)

温度: 25℃

进样体积: 5 μL

样品浓度: 25mg/L

样品: 双链RNAs (RNA marker)

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

混合物组成: double-stranded RNAs of 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500 and 1000 base pairs

NaCl 梯度 (下图)

色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)

流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)

B: 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5)

梯度:	0min	40% B
	60min	90% B
	60.1min	100% B
	65min	100% B
	65.1min	40% B
	70min	40% B

流速: 0.5mL/min

检测: UV (260nm)

温度: 25℃

进样体积: 5 μL

样品浓度: 25mg/L

样品: 双链RNAs (RNA marker)

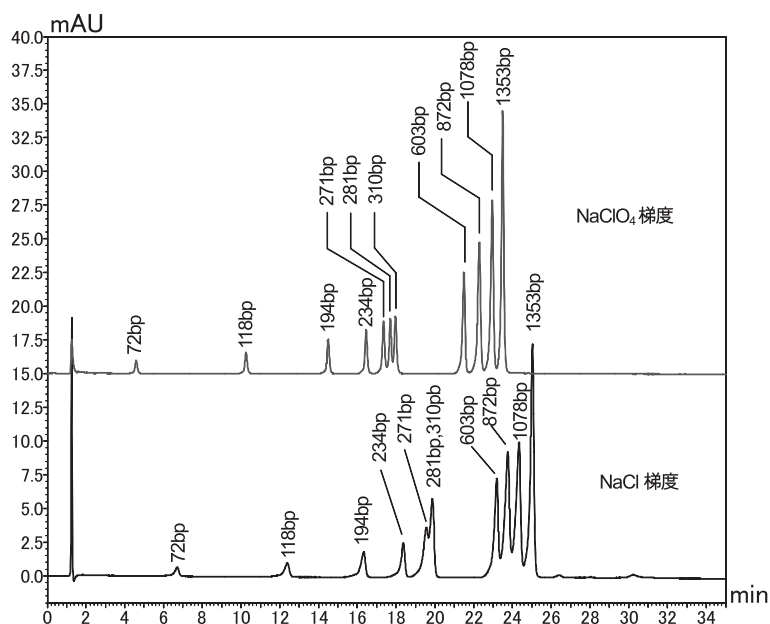
液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

混合物组成: double-stranded RNAs of 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500 and 1000 base pairs

23 TSKgel DNA-STAT色谱柱对DNA标准物(Phi X174-HaeIII水解)的分析

对于离子交换色谱法, 改变盐的种类尽管不会对结果产生显著影响, 但还是可以在一定程度上提高分离的选择性和分辨率。在这篇应用中, 对TSKgel DNA-STAT(一款高分辨率离子交换色谱柱; 尤其适合DNA和RNA的分析)就DNA分析中, 当使用不同的NaCl和NaClO₄梯度洗脱时, 进行了结果的比较。

从下列色谱图中可以看出, 1)采用不同的NaCl和NaClO₄梯度, 分离选择性方面确实略有不同; 2)与NaCl相比, NaClO₄可以在更低的浓度梯度下洗脱双链RNA(dsRNA); 3)对这些RNA标准物(Phi X174-HaeIII水解)分析时, NaClO₄梯度比NaCl梯度表现出更高的分辨率。



NaClO₄梯度 (上图)

色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)

流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)

B: 20mmol/L Tris-HCl + 0.5mol/L NaClO₄ (pH8.5)

梯度: 0min 60% B
30min 75% B
35min 75% B
35.1min 60% B
40min 60% B

流速: 0.5mL/min

检测: UV (260nm)

温度: 25°C

进样体积: 10 μL

样品浓度: 38.1mg/L

样品: Phi X174-HaeIII digest

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

NaCl梯度 (下图)

色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)

流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)

B: 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5)

梯度: 0min 75% B
30min 90% B
35min 90% B
35.1min 75% B
40min 75% B

流速: 0.5mL/min

检测: UV (260nm)

温度: 25°C

进样体积: 10 μL

样品浓度: 38.1mg/L

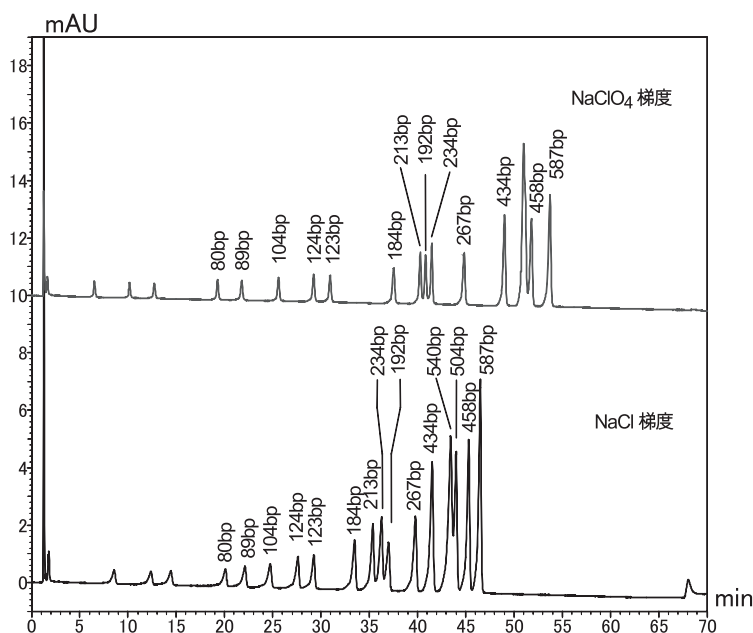
样品: Phi X174-HaeIII digest

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

24 TSKgel DNA-STAT 色谱柱对 DNA 标准物(pBR322-HaeIII 水解)的分析

对于离子交换色谱法, 改变盐的种类尽管不会对结果产生显著影响, 但还是可以在一定程度上提高分离的选择性和分辨率。在这篇应用中, 对 TSKgel DNA-STAT (一款高分辨率离子交换色谱柱; 尤其适合 DNA 和 RNA 的分析) 就 DNA 分析中, 当使用不同的 NaCl 和 NaClO₄ 梯度洗脱时, 进行了结果的比较。

从下列色谱图中可以看出, 1) 采用不同的 NaCl 和 NaClO₄ 梯度, 分离选择性方面确实略有不同; 2) 与 NaCl 相比, NaClO₄ 可以在更低的浓度梯度下洗脱双链 RNA (dsRNA); 3) 对这些 RNA 标准物 (pBR322-HaeIII 水解) 分析时, NaClO₄ 梯度比 NaCl 梯度表现出更高的分辨率。



NaClO₄ 梯度 (上图)

色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)

流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)

B: 20mmol/L Tris-HCl + 0.5mol/L NaClO₄ (pH8.5)

梯度: 0min 55% B
 60min 70% B
 60.1min 100% B
 65min 100% B
 65.1min 55% B
 70min 55% B

流速: 0.5mL/min

检测: UV (260nm)

温度: 25°C

进样体积: 5 μL

样品浓度: 44.6mg/L

样品: pBR322-HaeIII digest

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

NaCl 梯度 (下图)

色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)

流动相: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)

B: 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5)

梯度: 0min 70% B
 60min 90% B
 60.1min 100% B
 65min 100% B
 65.1min 70% B
 70min 70% B

流速: 0.5mL/min

检测: UV (260nm)

温度: 25°C

进样体积: 5 μL

样品浓度: 44.6mg/L

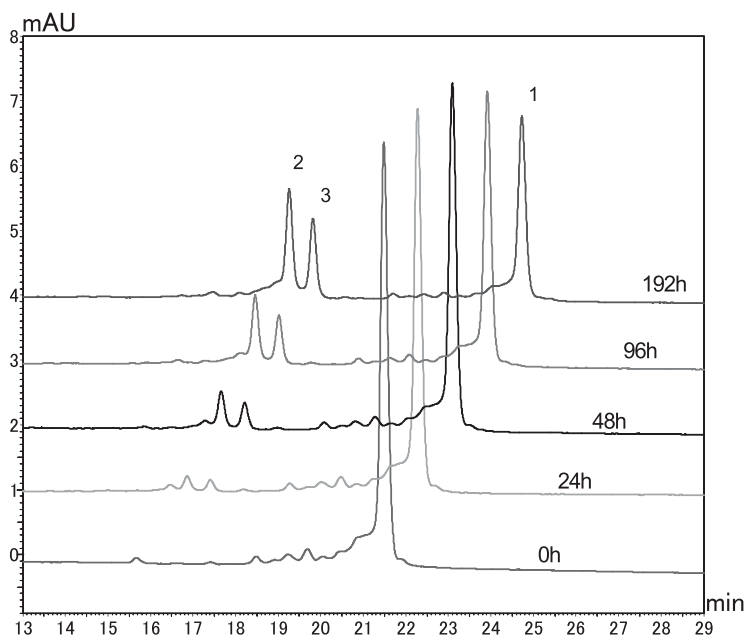
样品: pBR322-HaeIII digest

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)

25 TSKgel DNA-STAT色谱柱对核糖核酸酶A脱酰胺过程的分析

在碱性溶液中，蛋白的天冬酰胺(Asn)残基容易发生脱酰胺作用转化成天冬氨酸(Asp)或异天冬氨酸(iso-Asp)。这也是在蛋白纯化和保存中产生异构体的一个原因。因此在治疗性蛋白药物纯化、保存等过程中进行质量控制是非常重要的工作。

在弱碱性条件下，核糖核酸酶A(RNaseA)的Asn67脱酰胺作用后会产生两种异构体(Asp67和iso-Asp67)。在本数据中，介绍了使用一款高分辨率、非多孔、弱阳离子交换色谱柱TSKgel CM-STAT进行核糖核酸酶A脱酰胺过程的跟踪分析的应用。



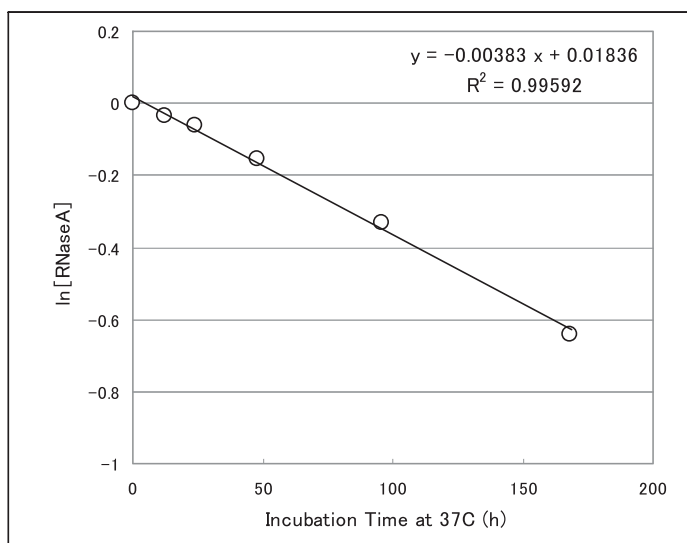
色谱柱: TSKgel CM-STAT (4.6mm I.D. x 10cm)
流动相: A: 20mmol/L MES pH6.0
 B: 20mmol/L MES 1mol/L NaCl pH6.0
梯度: B%: 5%(0min)–25%(30min)–100%(30min) 100%
 (34min)–5%(34min)–5%(40min)

流速: 1.0mL/min
检测: UV (280nm)
温度: 25℃

进样体积: 20 μL
样品浓度: 0.25g/L

液相色谱仪: Agilent 1120 Compact LC (gradient auto system)
程序: 核糖核酸酶A在1%的碳酸铵缓冲液(pH8.2)中溶解配制成5g/L浓度的溶液，然后在37度下孵化0–192个小时。孵化完成后，使用20mmol/L的MES(pH6.0)稀释至0.25g/L的浓度并进行HPLC分析。核糖核酸酶A及其两种异构体被完全分离。根据孵化时间与核糖核酸酶A峰面积作图，并推断出在1%的碳酸铵缓冲液(pH8.2)条件下，核糖核酸酶A的半衰期大约为180个小时。

1:核糖核酸酶A(RNaseA)
2,3:脱酰胺后的异构体





TOSOH

TOSOH CORPORATION BIOSCIENCE DIVISION

Address: Shiba-Koen First Bldg. 3-8-2 Shiba,
Minato-Ku, Tokyo 105-8623, Japan

TEL: +81-3-5427-5180 FAX: +81-3-5427-5220

E-mail: hlc@tosoh.co.jp

Website: www.separations.asia.tosohbioscience.com

HLC database: www2.tosoh.co.jp/hlc/hlcdb.nsf/StartE?OpenForm

TOSOH BIOSCIENCE LLC

Address: 3604 Horizon Drive, Suite 100 King of Prussia, PA 19406, USA

TEL: +1-484-805-1219 FAX: +1-610-272-3028

E-mail: info.tbl@tosoh.com

Website: www.tosohbioscience.com

TOSOH BIOSCIENCE GmbH

Address: Zettachring 6, 70567 Stuttgart, Germany

TEL: +49-711-13257-0 FAX: +49-711-13257-89

E-mail: Info.sep.eu@tosohbioscience.com

Website: www.tosohbioscience.com

TOSOH ASIA PTE. LTD

Address: 63 Market Street #10-03 Singapore 048942

TEL: +65-6226-5106 FAX: +65-6226-5215

E-mail: Info.tsas@tosoh.com

Website: www.separations.asia.tosohbioscience.com

东曹（上海）生物科技有限公司

地址：上海市徐汇区宜山路1289号B座3F, 301室

电话：+86-21-3461-0856 传真：+86-21-3461-0858

电邮：info@tosoh.com.cn

网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com

HLC、TSK-GEL、TSKgel、BioAssist、EcoSEC、Enantio、Enviropak、TOYOPEARL、TOYOPEARL MegaCap、ToyoScreen、TOYOPEARLPAK 和 TOYOPAK 均是 TOSOH 公司的注册商标。

未经 TOSOH 公司书面同意，本产品目录中的内容不得全部或部分使用或复制。

产品目录的内容可能会随时发生更改，恕不另行通知。

TOSOH 公司版权所有

