

## 高性能亲和色谱柱 TSKgel<sup>®</sup> Protein A-5PW

— 目 录 —

|                                  | 页码    |
|----------------------------------|-------|
| 1. 前言                            | - 1 - |
| 2. TSKgel Protein A-5PW 色谱柱的基本特性 | - 1 - |
| 2-1. 柱填料的特点                      | - 1 - |
| 2-2. 标准分离条件                      | - 1 - |
| 2-3. 流动相中盐浓度和添加剂的影响              | - 2 - |
| 2-4. 流动相 pH 的影响                  | - 3 - |
| 2-5. 校准曲线                        | - 4 - |
| 2-6. 色谱柱的耐用性                     | - 5 - |
| 2-7. 碱性溶液清洗                      | - 5 - |
| 2-8. 填料的批间差异                     | - 6 - |
| 3. 分离实例                          | - 6 - |
| 3-1. 快速分析                        | - 6 - |
| 3-2. IgG 单克隆抗体的定量（加标回收试验）        | - 7 - |
| 4. 总结                            | - 7 - |

## 1. 前言

目前，人们对以免疫球蛋白（IgG）为主的抗体药物的需求日益高涨。在抗体药物的研发以及制备工艺建设中，由于 IgG 表达需进行筛选，所以必须快速及准确地定量细胞培养液中的 IgG。而且，即使在工业制备过程中，IgG 的定量也是重要的质量控制项目之一。为此，本研究采用了以 Protein A 为键合官能团的亲和层析法（AFC），主要介绍了旨在快速及准确分析 IgG 的 AFC 色谱柱 TSKgel Protein A-5PW 的基本性质、特点和分离实例等。

## 2. 色谱柱的基本特性

### 2-1. 填料的性质

TSKgel Protein A-5PW 是一款亲和（AFC）色谱柱，该色谱柱是在多孔亲水性聚合物基质的 TSKgel G5000PW 填料表面导入重组 Protein A 官能团，并充填到 PEEK 柱管内。由于 Protein A 可与 IgG 的 Fc 区域发生特异性结合，所以 Protein A 可以从含有 IgG 和杂质的细胞培养上清液等样品中特异性吸附分离 IgG。此外，通过已知浓度的 IgG 制作校准曲线，可以定量浓度未知样品中的 IgG。

TSKgel Protein A-5PW 色谱柱的基质、官能团和官能团键合方法与散装填料 TOYOPEARL® AF-rProtein A HC-650F 相同。因此，这款色谱柱与 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 具有相似的分离选择性能。

由于基质的粒径大、机械强度高，该色谱柱可在高流速条件下使用，也可以用于 IgG 的高通量分析。而且，由于溶剂变化引起的填料溶胀效应比较小，所以可以在流动相中添加有机溶剂。

此外，该色谱柱还采用了化学稳定性高、耐碱性的官能团，所以可使用 NaOH 水溶液进行清洗。使用 NaOH 水溶液清洗色谱柱时，请从进样阀注入 0.1 mol/L NaOH 水溶液 0.5~2 mL。

表 1 所示为 TSKgel Protein A-5PW 色谱柱的规格。

表 1 TSKgel Protein A-5PW 色谱柱的规格

|      |                      |                      |
|------|----------------------|----------------------|
| 品名   | TSKgel Protein A-5PW |                      |
| 产品货号 | 0023483              |                      |
| 填料   | 基质                   | 多孔亲水性聚合物             |
|      | 平均粒径                 | 20 μm                |
|      | 平均孔径                 | 100 nm               |
|      | 官能团                  | 重组 Protein A         |
| 色谱柱  | 尺寸                   | 4.6 mm I.D. x 3.5 cm |
|      | 材质                   | PEEK                 |
|      | 出货溶剂                 | 20 %乙醇水溶液            |

### 2-2. 标准分离条件

多数 IgG 在中性条件下（pH 7.0~7.5）被 Protein A 吸附，在酸性条件下（pH 2.5~3.5）洗脱，因此使用 TSKgel Protein A-5PW 分离抗体时，通常采用两种 pH 不同溶液的阶梯式梯度洗脱法。

吸附和洗脱的流动相一般使用磷酸缓冲液，但流动相也可以使用低 pH 值的柠檬酸盐缓冲液。采用吸附缓冲液预先平衡色谱柱后（使用 5 倍以上柱体积的缓冲液平衡），进样后，仅 IgG 被吸附在柱子上。之后，更换成洗脱用流动相，洗脱出 IgG。

可以在流动相内添加高浓度盐（比如 0.15 mol/L NaCl 等），不过疏水性高的 IgG 在色谱柱上容易发生非特异性吸附，对此需多加留意。此外，分析疏水性高的 IgG 时，在平衡液和洗脱液中添加乙醇等水溶性有机溶剂或精氨酸（0.2mol/L）可以有效抑制非特异性吸附。但是，上述情况可能会因更换流动相导致基线波动，因此在进样前，就请更换流动相，并进行确认。

表 2 为具有代表性的洗脱液示例，不同 IgG 其最佳条件也不同，建议对不同的样品进行条件优化。图 1 为 IgG 单克隆抗体的分离示例。

表 2 流动相示例

|     |  |
|-----|--|
| 例 1 | 流动相 A: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4<br>流动相 B: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 2.5                               |
| 例 2 | 流动相 A: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4/乙醇=90/10 (v/v)<br>流动相 B: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 2.5/乙醇=90/10 (v/v) |
| 例 3 | 流动相 A: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4<br>流动相 B: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液, pH 2.5                              |

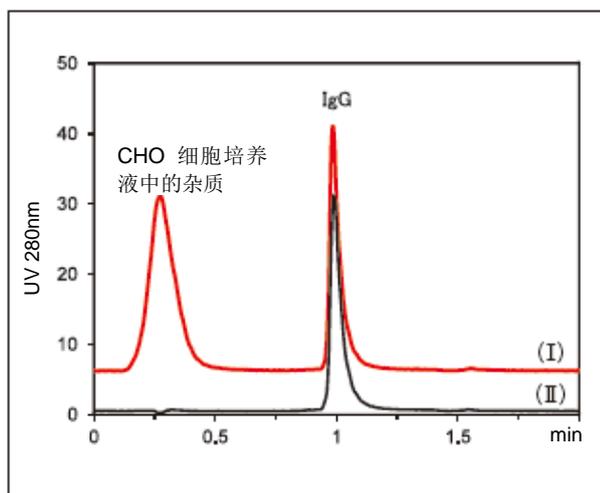


图 1 IgG 单克隆抗体的分离

〈分析条件〉

色 谱 柱: TSKgel Protein A-5PW  
(4.6 mm I.D. × 3.5 cm)

流动相 A: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4  
B: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 2.5

阶梯梯度: 0 → 0.5 分钟 流动相 A  
0.5 → 1.1 分钟 流动相 B  
1.1 → 2.0 分钟 流动相 A (再平衡)  
(在进样泵和注射器之间安装静态混合器(容量 10 μL))

流 速: 2.0 mL/min

检 测: UV 280nm

温 度: 25℃

进 样 量: 20 μL

样 品: (I)含 0.5g/L IgG 单克隆抗体的 CHO 细胞培养上清液  
(II) 0.5g/L IgG 单克隆抗体(溶于流动相 A)

2-3. 流动相中盐浓度和添加剂的影响

图 2 所示为采用各种流动相分离含有 IgG 单克隆抗体的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养上清液时的色谱图。已知任一流动相都可以洗脱出 IgG, 但其洗脱时间和峰的形状不同。本研究采用的 IgG 单克隆抗体, 在含 0.15 mol/L NaCl 的流动相(色谱图(3))中其色谱峰洗脱最慢, 且拖尾。另一方面, IgG 单克隆抗体在含 0.2 mol/L 精氨酸的流动相(色谱图(5))中洗脱最快, 不过其色谱峰与在 0.15 mol/L NaCl 中相同, 峰形拖尾。

但是, 该 IgG 单克隆抗体在吸附组分的相对峰面积上无显著差异, 表明精氨酸对结合能力及回收率的影响较小。

如上所述, 流动相成分不同, IgG 的出峰结果也不同, 但可以预计 IgG 的特性不同, 其出峰结果也不同。如前所述, 由于最佳洗脱条件因 IgG 而异, 所以建议对分析条件进行优化。

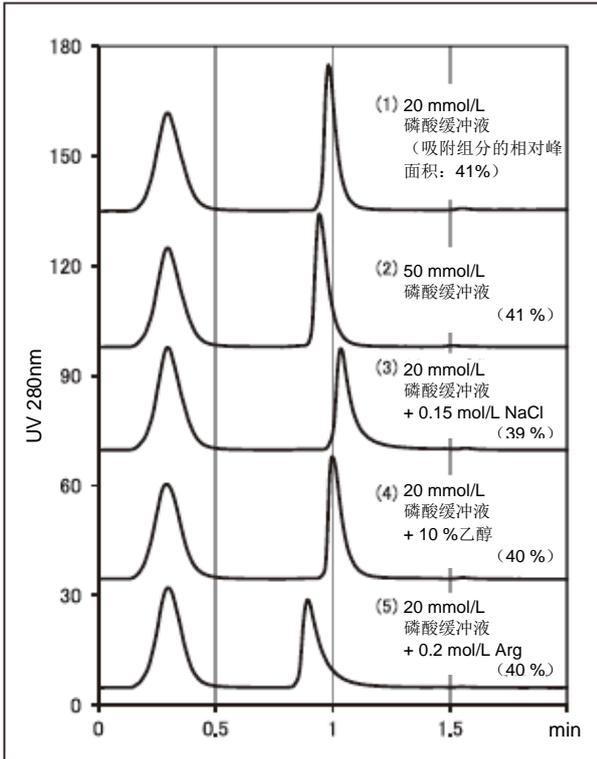


图2 流动相盐浓度及添加剂对 IgG 单克隆抗体分离的影响

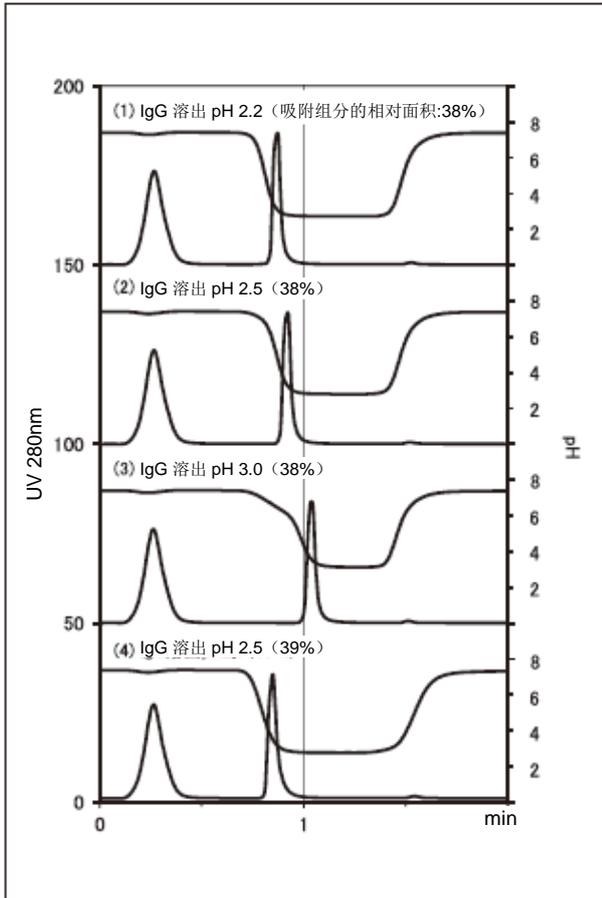


图3 流动相 pH 对 IgG 单克隆抗体分离的影响

#### 〈分析条件〉

除了流动相和样品外，其他条件与图 1 相同。

流动相

- (1) A: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4  
B: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 2.5
- (2) A: 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4  
B: 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 2.5
- (3) A: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液  
+0.15 mol/L NaCl, pH 7.4  
B: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液  
+0.15 mol/L NaCl, pH 2.5
- (4) A: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4  
/ 乙醇 = 90/10 (v/v)  
B: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 2.5  
/ 乙醇 = 90/10 (v/v)
- (5) A: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液  
+0.2 mol/L 精氨酸, pH 7.4  
B: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液  
+0.2 mol/L 精氨酸, pH 2.5

样品: 含 0.5g/L IgG 单克隆抗体的 CHO 细胞培养上清液

#### 2-4. 流动相 pH 的影响

图3所示为在各种 pH 值的流动相 B 条件下,含有 0.5 g/L IgG 单克隆抗体的 CHO 细胞培养上清液的色谱图。随着 pH 值升高,出峰会变慢(色谱图(1)~(3)),但对 IgG 单克隆抗体的峰形状和吸附组分相对峰面积基本没有影响。而且,在使用柠檬酸钠缓冲液时(色谱图(4))其出峰结果也相同。此外,pH 2.5 的柠檬酸钠缓冲液与 pH 2.2 的磷酸钠缓冲液的出峰时间几乎相同,这是因为本研究使用的柠檬酸钠缓冲液浓度高于磷酸钠缓冲液浓度,所以 pH 更易快速发生变化。

#### 〈分析条件〉

除流动相以外,其他条件与图 2 相同。

流动相

- A: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4
- B: (1) 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 2.2  
(2) 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 2.5  
(3) 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 3.0  
(4) 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液, pH 2.5

## 2-5. 校准曲线

取用 TSKgel Protein A-5PW 色谱柱与其他公司的 Protein A 色谱柱, 在不同载量下对市售 IgG 单克隆抗体样品进行分离, 绘制吸附成分峰面积-IgG 载量线性关系图, 并计算近似直线(校准曲线)和判定系数, 计算结果如图 4 所示。其他公司的 Protein A 色谱柱在高浓度范围下呈线性下降, 而 TSKgel Protein A-5PW 色谱柱在宽范围的载量下与峰面积

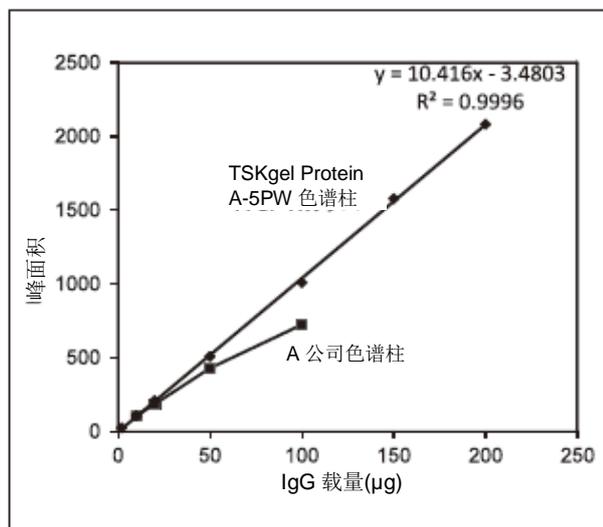


图 4 IgG 的校准曲线

〈分析条件〉

(1) TSKgel Protein A-5PW (4.6 mm I.D. × 3.5 cm)

除样品以外, 其他条件与图 1 相同。

样品: 0.1~10 g/L IgG 多克隆抗体(溶于洗脱液 A)

(2) 其他色谱柱(4.0 mm I.D. × 3.5 cm, PEEK)

除流动相和流动相更换条件, 其他条件与(1)相同。

流动相 A: 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液  
+ 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4

B: 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液  
+ 0.15 mol/L NaCl, pH 2.5

流动相更换: 0→0.2 分钟 流动相 A

0.2→1.2 分钟 流动相 B

1.2→2.0 分钟 流动相 A (再平衡)

之间呈良好线性关系(0.1~10 g/L (2~200 μg),  $R^2=0.9996$ ), 这表明 IgG 的定量范围很广, 可以用来测定培养初期的低浓度样品至高浓度样品。此时的色谱图如图 5 所示。低载量到高载量组分均可制得良好的色谱图。如图 6 所示, 即使采用含 10%乙醇的流动相, 校准曲线的线性关系也很良好。

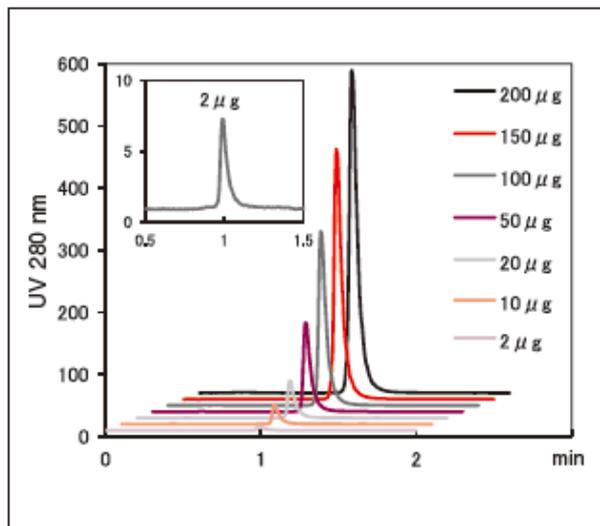


图 5 样品载量不同 IgG 的色谱图

〈分析条件〉

与图 4 (1) 相同。

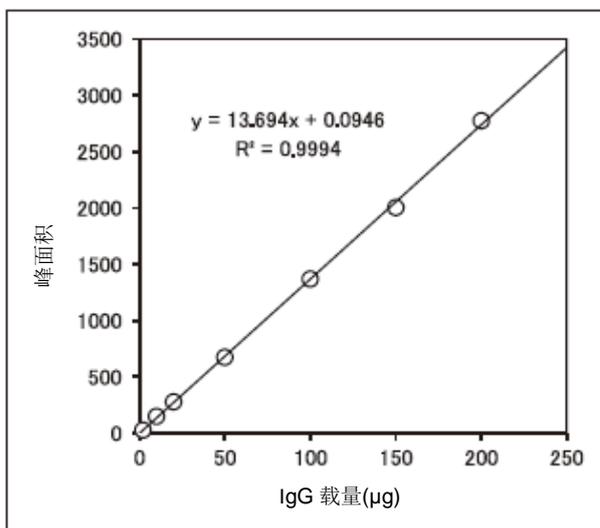


图 6 IgG 的校准曲线(含 10%乙醇的洗脱液)

〈分析条件〉

除流动相外, 其他条件与图 4 (1) 相同。

流动相 A: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4/ 乙醇=90/10 (v/v)

B: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 2.5/ 乙醇=90/10 (v/v)

## 2-6. 色谱柱的耐用性

取用含 IgG 单克隆抗体的 CHO 细胞培养上清液作为样品，连续进样 2000 针以上进行稳定性测试。每进样约 400 针时的色谱图如图 7 所示，峰形未见显著变化。而且，在第 2009 次进样后，采用市售 IgG 单克隆抗体制作校准曲线时，如图 8 所示，测试前后未见线性有差异。

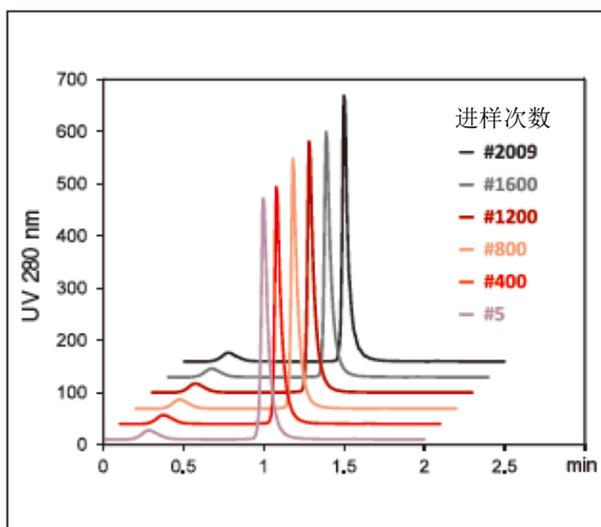


图 7 连续进样测试时的色谱图

〈分析条件〉

与图 1 相同。

样品：含 10 g/L IgG 多克隆抗体的 CHO 细胞培养上清液

## 2-7. 碱性溶液清洗

一般情况下，为了去除被强烈吸附在色谱柱上的成分时，选用 NaOH 溶液进行清洗是非常有效的，但也可能对色谱柱造成损伤。因此，我们对碱性溶液清洗前后的色谱柱性能进行了确认。使用进样阀进样 0.1 mol/L NaOH 溶液 500  $\mu$ L 后，再进行清洗。反复该操作 5 次后，进样 IgG 单克隆抗体，测定吸附组分的峰面积。然后，再进样 5 次（合计进样 10 次）后测定 IgG 吸附组分的峰面积。碱性溶液清洗前后的峰面积（相对值）如图 9 所示。进样 5 次后、10 次后的峰面积与清洗前的峰面积几乎相同，色谱柱的吸附性能未见变化。

但是，如果样品中含有难溶物质，则容易在色谱柱入口积蓄，可能导致色谱柱性能下降。因此在进样前，需过滤样品，或在注射器和色谱柱之间安装管路过滤器（品名：管路过滤器 PEEK、产品编号：0018014），通过适当更换该过滤器，可以防止分析柱老化以便长时间稳定地进行测定。

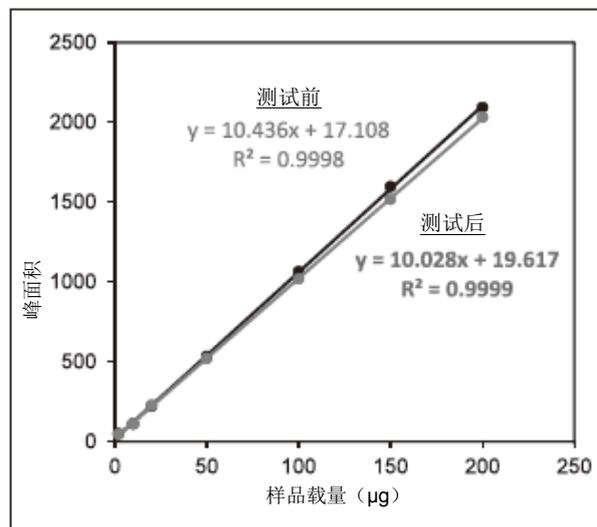


图 8 连续进样测试前后的 IgG 校准曲线

〈分析条件〉

与图 1 相同。

样品：0.1~10 g/L IgG 多克隆抗体（溶于流动相 A）

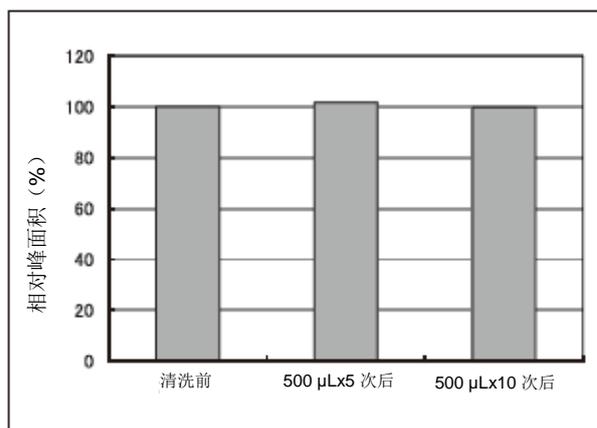


图 9 碱性溶液清洗前后的相对峰面积

〈分析条件〉

除样品以外，其他条件与图 1 相同。

样品：10 g/L IgG 多克隆抗体（溶于洗脱液 A）

（采用进样阀注入 0.1 mol/L NaOH 溶液 500  $\mu$ L。每进样 5 次需分离 IgG 单克隆抗体。）

## 2-8. 填料的批间差异

图 10 所示为采用 3 个批次的填料分离 IgG 单克隆抗体的色谱图。

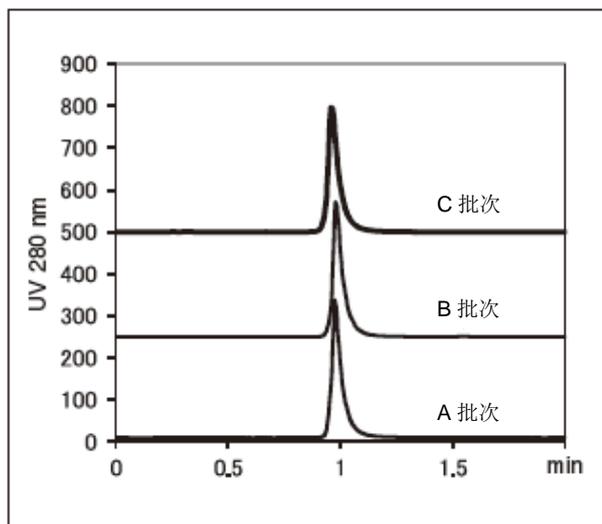


图 10 3 个批次填料测得的 IgG 色谱图

〈分析条件〉

除样品以外，其他条件与图 1 相同。

样品：5 g/L IgG 多克隆抗体（溶于流动相 A）

## 3. 分离实例

### 3-1. 快速分析

图 12 所示为不同流速下分离含有 IgG 单克隆抗体的 CHO 细胞培养上清液时的色谱图。

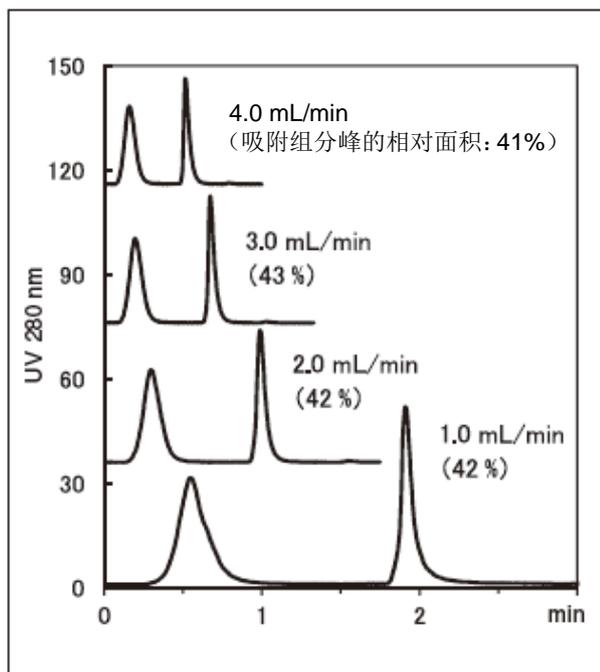


图 12 流速对分离效果的影响

已知 IgG 的峰形未见显著性差异，填料批间差异较小。此外，如图 11 所示，批间未见校准曲线的线性有显著性差异。

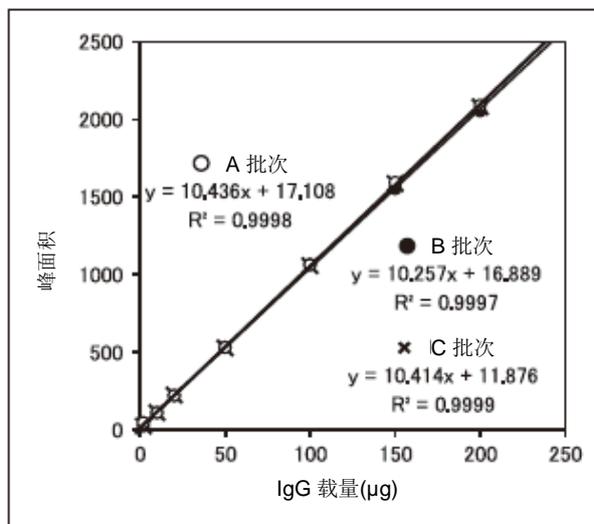


图 11 3 个批次填料的 IgG 校准曲线

〈分析条件〉

与图 1 相同。

样品：0.1~10 g/L IgG 多克隆抗体（溶于流动相 A）

流速在 1.0 mL/min 至 4.0 mL/min 范围内，吸附组分的相对峰面积几乎无差异。此外，采用 IgG 单克隆抗体，在流速 1.0 mL/min 及 4.0 mL/min 条件下制成的校准曲线如图 13 所示。在任一流速下均得到良好线性。

〈分析条件〉

流速和流动相更换条件

| 流速         | 流动相 A     | 流动相 B        | 流动相 A        |
|------------|-----------|--------------|--------------|
| 1.0 mL/min | 0→1.00 分钟 | 1.00→2.20 分钟 | 2.20→4.00 分钟 |
| 2.0 mL/min | 0→0.50 分钟 | 0.50→1.10 分钟 | 1.10→2.00 分钟 |
| 3.0 mL/min | 0→0.33 分钟 | 0.33→0.73 分钟 | 0.73→1.33 分钟 |
| 4.0 mL/min | 0→0.25 分钟 | 0.25→0.55 分钟 | 0.55→1.00 分钟 |

样品：含 IgG 单克隆抗体（0.5g/L）的 CHO 细胞培养上清液（其他分析条件与图 1 相同。）

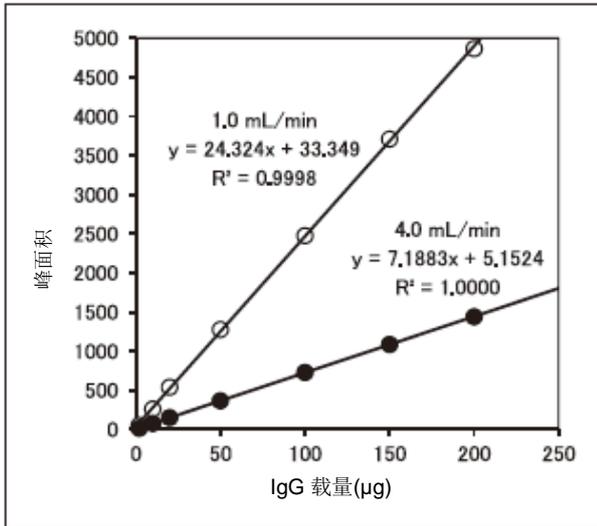


图 13 流速对校准曲线的影响

〈分析条件〉

除样品以外，其他条件与图 12 相同。

样品：0.1~10 g/L IgG 多克隆抗体（溶于流动相 A）

### 3-2. IgG 单克隆抗体的定量（加标回收试验）

采用已知浓度的 IgG 单克隆抗体制成校准曲线。然后，对添加了相同 IgG 单克隆抗体的 CHO 细胞培养上清液进行分离，并计算 IgG 单克隆抗体的回收率。色谱图和校准曲线如图 14 所示，加标回收率如表 3 所示。在任一浓度下均制得 100~105% 的回收率，在很宽的浓度范围下可以定量 IgG。

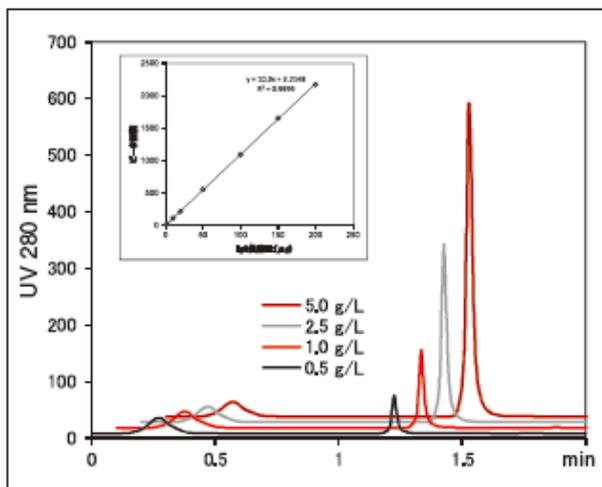


图 14 IgG 单克隆抗体的分离

〈检测条件〉

除样品以外，其他条件与图 1 相同。

样品：0.1~10 g/L IgG 单克隆抗体（20 mmol/L 磷酸钠缓冲液+0.15 mol/L NaCl, pH 7.4 下溶解）  
含 0.5~5.0 g/L IgG 单克隆抗体的 CHO 细胞培养上清液

表 3 加标回收率

| IgG(g/L) |      | 回收率 (%) |
|----------|------|---------|
| 添加浓度     | 定量结果 |         |
| 0.5      | 0.50 | 100     |
| 1.0      | 1.05 | 105     |
| 2.5      | 2.60 | 104     |
| 5.0      | 5.13 | 103     |

（分离条件参照图 14）

## 4. 总结

上述报告内容对高性能亲和色谱柱 TSKgel Protein A-5PW 进行了详细介绍。这款色谱柱耐用性良好，可使用碱性溶液来清洗，适用于对含有较多杂质的细胞培养液中的 IgG 进行快速和高精度定量。此外，IgG 的定量范围广，可用于分析培养初期的低浓度样品至高浓度样品。

※“TSKgel”、“TOYOPEARL”系东曹株式会社的注册商标。



---

## TOSOH BIOSCIENCE

**东曹（上海）生物科技有限公司**

地址：上海市徐汇区虹梅路1801号A区凯科国际大厦1001室

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

电子邮箱：[info@tosoh.com.cn](mailto:info@tosoh.com.cn)

网址：[www.separations.asia.tosohbioscience.com](http://www.separations.asia.tosohbioscience.com)