



# 层析柱和色谱峰的保护利器

专为 ÄKTA 系统设计的蛋白预过滤针头式滤器  
Protein Prep 可延长 ÄKTA 系统层析柱的使用寿命



在液相色谱 (LC) 上的最佳应用是在样品上柱子之前预过滤样品。样品的预过滤可以防止无用的颗粒物进入层析柱。这一步非常重要是因为颗粒物会降低层析柱的寿命，延长操作时间，破坏色谱峰的形状。此外，颗粒物也可能会堵塞层析柱进口而引起背压的增高，提早结束层析设备的运行。这些颗粒物相关的问题会导致实验延期，延长设备停机时间，最终会导致实验效率的降低。增加预过滤步骤可以延长层析柱的有效工作时间，降低层析柱更换频率，同时也能保证实验数据的质量。

虽然层析之前的预过滤是常规操作，但是滤器对测试结果的影响以及如何选择经常不在考虑之列，缺乏这一层的考虑常会导致不理想的测试结果。合适的滤器选择需要根据样品的处理方法，滤器的溶剂的耐受性和样品的物理化学性能来决定。

在这篇文章中呈现了三个分析结果，均是使用含有再生纤维素滤膜 GE Protein Prep 针头式滤器做蛋白样品的预过滤工作，这三个分析结果完全可以体现 Protein Prep 的适用性。第一、预过滤对层析柱清洁度的影响，第二、蛋白样品的回收率，第三、滤器质量与测试结果的保真度。GE 医疗生命科学的再生纤维素膜每个批次都会进行测试，确保再生纤维素膜具有化合物的低析出特点，不会影响测试分析。同时，再生纤维素膜的化学耐受性也表明其对于水系和有机相容剂具有广泛的耐受性。这些分析说明是在蛋白预过滤领域推荐 Protein Prep 针头式滤器的基础。

为了证明液相色谱 (LC) 之前进行蛋白样品预过滤的有效性，进入 HiTrap™ MabSelect™ Prisma 柱子的样品为经过预过滤 / 未过滤的 6ml 含有人单克隆抗体的细胞上清液。蛋白样品的过滤是使用直径为 30 mm，孔径为 0.45μm 针头式滤器。在层析操作 30 分钟后，使用 1M 氢氧化钠进行层析柱的清洗，原位清洗 (CIP) 的色谱峰如图 1 所示。

未过滤的纯化样品后的 CIP 谱峰 (27 mL 洗脱处) 明显比预过滤单抗样品的更大，说明有更多的有紫外吸收的杂质残留于层析柱中，并且需用氢氧化钠去除。为避免增加额外清洗层析柱流程，建议在上样前增加预过滤流程。预过滤可以去除颗粒物，保护层析柱，延长层析柱的使用寿命 (图 2)。

层析柱：	HiTrap MabSelect Prisma 1 mL
样品：	包含人单克隆抗体的 6 mL 细胞上清液，分别为未过滤和 0.45 μm, 30 mm 再生纤维素滤器预过滤的样品
结合缓冲液：	20 mM 磷酸盐, 150 mM NaCl, pH 7.4
洗脱缓冲液：	50 mM 磷酸醋酸盐, pH 3.5
流速：	0.5 mL/min
时间：	2 min
系统：	AKTA pure 25

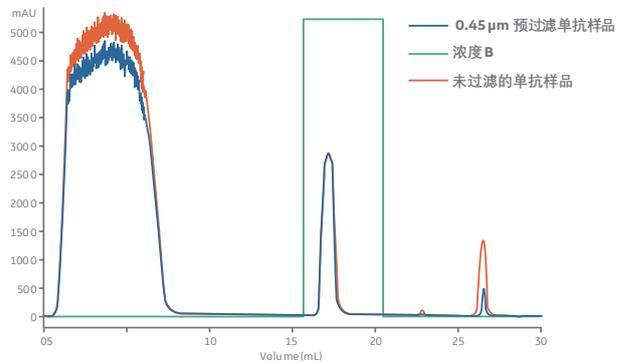


图 1. 在 ÄKTApure 25 层析系统 1 mL HiTrap MabSelect Prisma A 柱子进行的 mAb 的纯化结果：A280 nm。

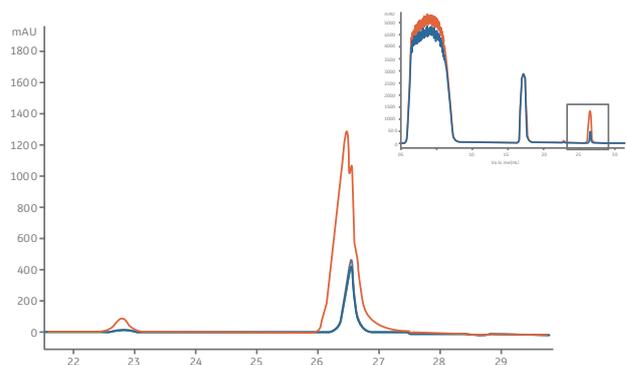


图 2. 纯化后 mAb 样品的 CIP 峰：橘色是未经过滤的样品，绿色和蓝色是经过预过滤的样品。

第二个测试重点在于蛋白的回收率。当使用两种浓度的蛋白模型（牛血清白蛋白（BSA）溶解在 PBS 中，pH 为 7.4，以制备 5mg/mL 储备液用于进一步稀释）进行测试的时候，再生纤维素显示了极低的非特异性蛋白吸附能力。测试结果如表 1 所示：使用再生纤维素膜的针头式滤器具有高于 95% 的蛋白回收（公认为较高的回收率）。

表 1. 使用再生纤维素膜过滤后 BSA 的样品回收率

孔径	1 mg/ mL (%)		0.5 mg/ mL (%)	
	回收率	SD	回收率	SD
0.2 $\mu\text{m}$	98	0.6	97	0.3
0.45 $\mu\text{m}$	99	0.7	99	0.9

SD = 标准差, N=3

在评估过滤本身所带来的样品损失率（如过滤后残留于滤器的样品量），测试数据表明再生纤维素膜具有非常低的样品损失量，这是由于再生纤维素膜本身具有非常低的滞留体积，特别是在气吹之后。这一评估说明，针头式滤器适用于不需要绝对定量分析或最大产率的应用（表 2）。

表 2. 再生纤维素膜针头式滤器的水滞留体积。气吹前和气吹后。

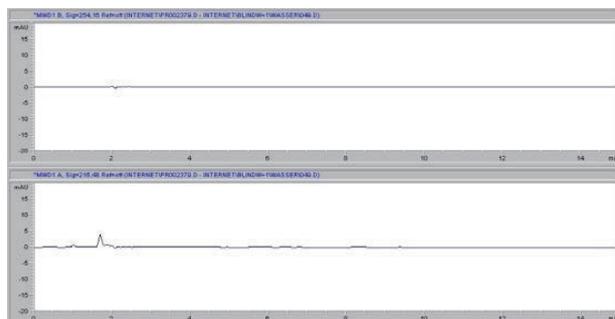
孔径	滞留体积 ( $\mu\text{mL}$ )		最终滞留体积 ( $\mu\text{mL}$ )	
	平均值	SD	平均值	SD
0.2 $\mu\text{m}$	135	36	9.3	0.9
0.45 $\mu\text{m}$	135	31	9.2	1.1

SD = 标准差, N= 10

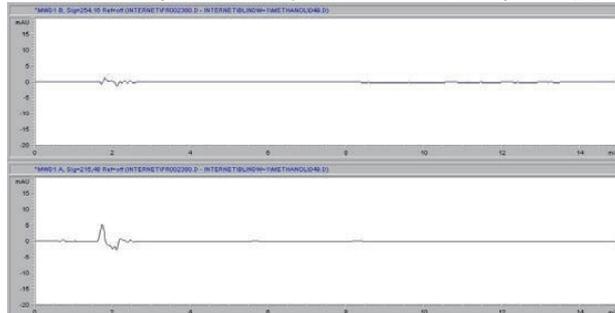
第三，测试滤器本身是否会影响样品。如果溶剂本身会导致滤器析出，则会影响到测试的结果。GE 的 Protein Prep 针头式滤器经过验证，确保在水中，甲醇以及乙腈中的 210 和 254nm 处没有紫外光吸收物质。且每个批次都有验证文件证明质量的稳定和持续性，确保实验结果的可重复性（图 3）。每个生产批次的测试验证文件都可在 GE 医疗生命科学的网站上都可以下载到。更重要的是，与其他滤膜相比再生纤维素膜有一个更重要的优点就是广泛的化学

试剂耐受性。化学兼容性（表 3）确保了最小量的物质析出以及接触溶剂后的膜降解的风险。

(A) Protein Prep for ÄKTA systems 30 mm, 0.2  $\mu\text{m}$  – 水



(B) Protein Prep for ÄKTA systems 30 mm, 0.2  $\mu\text{m}$  – 甲醇



(C) Protein Prep for ÄKTA systems 30 mm, 0.2  $\mu\text{m}$  – 乙腈



图 3. 经过 RC 膜针头式滤器预过滤的具有代表性 HPLC 图谱：上层图为 254nm 处的吸收峰，下层图为 215nm 处的吸收峰。

虽然大多数的蛋白类工作是使用水系溶剂，大部分的膜都可以用于此类工作，但是在少数情况下特别是必须使用非水系溶剂时，这时有一款合适的滤器可以大大减少实验工作的延期。

综上所述,再生纤维素非常适用于蛋白分析工作,延长了层析柱的使用寿命,保证了高质量的测试数据。当使用两种蛋白浓度模型进行测试时,再生纤维素膜表现了极低的非特异蛋白吸附能力,同时 Protein Prep 针头式过滤器也体现了非常低的样品滞留体积。同时测试结果也表明再生纤维素膜具有极低的化合物析出,确保了测试结果的可重复性。

因此,在使用 ÄKTA 层析系统上样前,GE 推荐使用 Protein Prep 针头式过滤器做预过滤以确保稳定,精确和可重复性的测试结果。Protein Prep 针头式过滤器具有聚丙烯材质的外壳和再生纤维素膜组成。与其他材质的滤膜相比,再生纤维素膜具有更广泛的化学试剂兼容性。同时 Protein Prep 针头式过滤器是经过验证,为保证分析测试的可靠性而特别设计的产品。使用 Protein Prep 针头式过滤器可延长层析柱的使用寿命和运行时间,同时也能保护层析柱,避免被杂质颗粒堵塞和过早的更换层析柱。

表 3. 再生纤维素膜的化学耐受性

溶剂	兼容性	溶剂	兼容性	溶剂	兼容性
醋酸, 5%	R	环己烷 *	R	丁酮	R
冰醋酸	NR	二乙乙酰胺	R	二氯甲烷 *	R
丙酮	R	二甲基甲酰胺	LR	浓硝酸 *	NR
乙腈	R	二恶烷	R	硝酸, 6N*	LR
氨水, 6N	LR	二甲基亚砷	LR	硝基苯 *	R
乙酸戊酯	R	乙醇	R	戊烷 *	R
戊醇	R	醚 *	R	乙烯 *	R
苯 *	R	乙酸乙酯	R	苯酚 0.5%	R
苯甲醇 *	R	乙二醇	R	吡啶	R
硼酸	R	甲醛	LR	氢氧化钠, 6N	NR
丁醇	R	蚁酸	LR	浓硫酸 *	NR
四氯化碳 *	R	正己烷	R	四氢呋喃 *	R
三氯甲烷 *	R	浓盐酸 *	NR	甲苯 *	R
氯苯 *	R	氢氟酸 *	NR	三氯乙烷 *	R
柠檬酸	R	异丁醇	R	三氯乙烯 *	R
甲酚 *	R	异丙醇	R	水	R
环己酮	R	甲醇	R	二甲苯 *	R

R = 耐受

LR = 有限耐受

NR = 不建议