

T/CASME

中国中小商业企业协会团体标准

T/CASME XXXX—2023

高流速琼脂糖金属螯合层析介质

High flow rate agarose metal chelate chromatography medium

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2023 - XX - XX 发布

2023 - XX - XX 实施

中国中小商业企业协会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布单位不承担识别专利的责任。

本文件由杭州纽龙生物科技有限公司提出。

本文件由中国中小商业企业协会归口。

本文件起草单位：杭州纽龙生物科技有限公司、XXX、XXX。

本文件主要起草人：XXX、XXX、XXX。

高流速琼脂糖金属螯合层析介质

1 范围

本文件规定了高流速琼脂糖金属螯合层析介质（下文简称“层析介质”）的术语和定义、分类、技术要求、试验方法、检验规则、标签、标志、包装、运输和贮存。

本文件适用于高流速琼脂糖金属螯合层析介质的生产与检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 191 包装储运图示标志

GB/T 5475 离子交换树脂取样方法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 38170—2019 琼脂糖分离介质

GB/T 38171—2019 金属螯合层析介质

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

琼脂糖分离介质 agarose-based chromatographic medium

以琼脂糖为主要原料制备的一类球形分离介质。

[来源：GB/T 38170—2019, 3.1]

3.2

金属螯合层析介质 metal chelating chromatographic medium

将亚氨基二乙酸、次氨基三乙酸或者三羧甲基乙二胺键合在琼脂糖分离介质上，再整合金属离子 Ni^{2+} (或其他金属离子) 而形成的一类层析介质。

[来源：GB/T 38171—2019, 3.1, 有修改]

4 分类

层析介质按螯合剂种类的不同可分为：

- a) 亚氨基二乙酸型金属螯合层析介质 (IDA)；
- b) 次氨基三乙酸型金属螯合层析介质 (NTA)；
- c) 三羧甲基乙二胺型金属螯合层析介质 (TED)。

5 技术要求

5.1 外观要求

应球形饱满、表面光滑，在光学显微镜下应具有透明性。

5.2 性能要求

应符合表 1 的规定。

表 1 层析介质的性能要求

项目		指标		
		IDA	NTA	TED
粒径	范围粒径比/%	≥90 ^a		
	平均粒径/μm	90.0±10.0		
压力/流速特征	最高流速 ^b /(cm/h)	≥1500		
	耐压/(MPa)	≥0.3		
	0.1 MPa柱压下的流速	≥300		
配基密度 ^c /(μmol/mL)		≥36.00	≥15.00	50.00~70.00
动态载量(Q _{10%}) ^d /(mg/mL)		≥40.00	≥40.00	≥20.00
菌落总数/(CFU/mL)		<50		
5-羟甲基糠醛脱落量 (μg/mL)	pH 3.0	≤0.16		
	pH 13.0	≤0.10		
耐受性	1 M NaOH/(处理时间, h)	—	—	24
	10 mM EDTA/(处理时间, h)	—	—	24
	100 mM EDTA/(处理时间, h)	—	—	2
	10 mM β-巯基乙醇/(处理时间, h)	—	—	24
循环使用次数		—	—	>100

6 试验方法

6.1 外观要求

6.1.1 样品处理

按照 GB/T 5475 直接从产品中抽取 5 mL 样品，置于 50 mL G3型号砂芯漏斗中抽干 5 min。用符合 GB/T 6682 的三级水清洗 5 次，每次 2 min，最后用真空泵在 0.1 MPa 压力下抽干 5 min。将洗净的层析介质置于烧杯中，向其中补加三级水，保证层析介质上应有 2 cm 的三级水。混匀后得到层析介质与水的混合体系。

6.1.2 样品观测

用塑料吸管吸取混合体系置于载玻片上，调整显微镜放大倍数。以视野里 80% 以上面积均为层析介质为标准，用塑料吸管增减载玻片上的层析介质，最后用盖玻片压上。调节光学显微镜焦距，使视野中的影像清晰。拍摄层析介质照片并保存。

6.2 性能要求

6.2.1 粒径

按 GB/T 38171—2019 的规定执行。

6.2.2 压力/流速特征

6.2.2.1 测试仪器

测试仪器包括：

- a) 蛋白层析系统；
- b) 层析柱：TRICORN 10/100 COLUMN。

6.2.2.2 样品装柱

称取 8.0 g 经处理的样品置于 50 mL 离心管，加纯化水至 16.0 g；下端用堵头堵住，用塑料滴管将填料加入空柱中。装上适配器，连接管路，取下下端堵头，用 0.65 mL/min 流速装柱，至高度、压力稳定。卸下装柱器，重新安装适配器，用 6.5 mL/min 流速压柱子 5 min，至高度、压力再次稳定，与 0.65 mL/min 装柱后高度比，压缩比在 5%~10%。流速为 0，下端用堵头堵住，上端管路断开连接，将适配器下拧 2 mm 左右；上端管路在一段时间后再连接柱子，以免引入气泡。

6.2.2.3 样品测定

将层析柱连入蛋白层析系统。测定时，从 0.5 mL/min 开始设定一定流速 v (mL/min)，保持该流速 5 min 后，记录此时柱压 p_x (MPa)。每 5 min 增加流速，直到系统压力急剧升高至 3 MPa，流速的升高顺序依次为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、12.0、14.0、16.0、18.0.....66.0 mL/min。测定压力达到 0.1 MPa 的对应流速，记录为 $v_{0.1}$ ；测定压力达到稳定时的柱压，记录为 p_{max} ，压力稳定时对应的流速，记录为 v_{max} 。

6.2.2.4 计算结果

最高流速按式 (1) 计算：

$$F_{max} = \frac{60v_{max}}{S} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- F_{max} ——最高流速，单位为厘米每小时 (cm/h)；
 v_{max} ——在压力稳定下的体积流速，单位为毫升每分 (mL/min)；
 S ——层析柱截面积，单位为平方厘米 (cm²)；
 60 ——分钟转化为小时的换算系数。

6.2.3 配基密度

按 GB/T 38171—2019 的规定执行。

6.2.4 动态载量

6.2.4.1 测试仪器

测试仪器包括：

- a) 蛋白纯化系统；
- b) 层析柱：TRICORN 5/100 COLUMN。

6.2.4.2 溶液配置

溶液包括：

- a) 缓冲液 A，pH 7.4：50 mM PB，500 mM NaCl；
- b) 缓冲液 B，pH 7.4：50 mM PB，500 mM NaCl，500 mM 咪唑；
- c) 缓冲液 C，1M NaOH。

6.2.4.3 样品处理

重组金黄色葡萄球菌蛋白 A 冻干粉，用缓冲液 A 溶解并透析至缓冲液 A，测定浓度后稀释至 2 mg/mL，作为 C_0 。

6.2.4.4 读取 $A_{100\%}$

层析通路在缓冲液 A 0.2 mL/min 下、 $A_{280\text{nm}}$ 检测基线稳定，并至零。样品走旁路（不经过层析柱），至 $A_{280\text{nm}}$ 升高并且稳定，读取 $A_{280\text{nm}}$ 数值 $A_{100\%}$ 。

6.2.4.5 样品装柱

用重力柱量取 2 mL 分离介质，用超纯水清洗 5 CV，堵住下口，加入 2 mL 超纯水混匀；将柱体与装柱器相连，将上述填料匀浆沿柱壁加入到柱体中，在柱口放上上筛板，拧上适配器，接入系统。用 1 mL/min 流速运行 5 min 或介质面不再变化；断开与蛋白纯化系统的连接，将装柱器取下，放上上筛板，拧上适配器，旋转适配器直至刚刚接触填料界面，继续旋转适配器，使填料界面向下移动 2 mm；准确读取柱体积。

6.2.4.6 样品测定

层析柱用缓冲液 A 平衡 5 CV，然后开始上样，0.2 mL/min，上样至 $A_{280\text{nm}}$ 吸收为 $A_{100\%}$ 的 10% 时，即为 $A_{10\%}$ ，此时对应的体积为 $V_{10\%}$ 。停止上样，用于缓冲液 B 洗脱目的蛋白并收集，用缓冲液 C 再生。

6.2.4.7 结果计算

动态载量的计算按式（2）计算：

$$DBC_{10\%} = \frac{(V_{10\%} - V_0) \times C_0}{V_c} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$DBC_{10\%}$ —— 穿透量为 10% 时的动态载量，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

$V_{10\%}$ —— 穿透量为 10% 时的体积，单位为毫升（mL）；

V_0 —— 空体积，相同层析柱和系统，柱效检测时的出峰体积可作为此处的空体积，单位为毫升（mL）；

C_0 —— 样品浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V_c —— 柱体积，单位为毫升（mL）。

6.2.5 菌落总数

按 GB/T 38171—2019 的规定执行。

6.2.6 5-羟甲基糠醛脱落量

按 GB/T 38171—2019 的规定执行。

6.2.7 耐受性

6.2.7.1 试验方法

在完成 6.2.4 测试后，用表 2 中的试剂平衡 7 CV，室温下保持相应的处理时间，用缓冲液 A 平衡 5 CV。按 6.2.4.6、6.2.4.7 的方法检测并计算动态结合载量。

表 2 耐受性测试条件

试剂	用量	室温下处理时间/h
NaOH	1 M	24
EDTA	10 mM	24
	100 mM	2
β -巯基乙醇	10 mM	24

6.2.7.2 判定规则

若动态结合载量保持在初始值的 90% 以上，则认为对该试剂耐受。

6.2.8 循环使用次数

在完成 6.2.4 测试后,用缓冲液 C 循环处理,处理 100 次后动态结合载量应保持在初始值的 90% 以上。

7 检验规则

7.1 组批

同一工艺周期生产,质量均一的产品为一批。

7.2 抽样

按 GB/T 5475 的规定执行。

7.3 出厂检验

7.3.1 每批产品出厂前应进行检验,检验合格的产品方可出厂。

7.3.2 出厂检验项目包括粒径、压力/流速特征、配基密度、动态载量和菌落总数。

7.4 型式检验

7.4.1 正常生产时,每半年应进行一次型式检验,有下列情况之一时应进行型式检验:

- a) 新产品试制鉴定时;
- b) 正常生产后,如原料、工艺、设备有较大变化,可能影响产品性能时;
- c) 产品停产半年以上恢复生产时;
- d) 出厂检验结果与上次型式检验有较大差异时。

7.4.2 型式检验项目为技术要求中规定的所有项目。

7.5 判定规则

7.5.1 出厂检验

7.5.1.1 出厂检验项目符合本文件要求时,判定本批为合格品。

7.5.1.2 出厂检验项目 1~2 项不符合要求,应复检,复检后如仍有 1 项不符合要求,则判定该批为不合格品。

7.5.1.3 出厂检验项目超过 2 项不符合要求,判定该批产品为不合格品。

7.5.2 型式检验

7.5.2.1 型式检验项目符合本文件要求时，判定本批为合格品。

7.5.2.2 型式检验项目 1~3 项（含 3 项）不符合要求，应复检，复检后如仍有 1 项不符合要求，则判定该批为不合格品。

7.5.2.3 型式检验项目超过 3 项不符合要求，判定该批产品为不合格品。

8 标签、标志、包装、运输和贮存

8.1 标签

应至少包括以下内容：

- a) 产品名称；
- b) 型号；
- c) 体积；
- d) 生产批号；
- e) 生产组织；
- f) 生产日期；
- g) 有效期；
- h) 注意事项。

8.2 标志

包装储运标识应符合 GB/T 191 的规定。

8.3 包装

宜选用塑料瓶包装，包装材料应确保产品在运输、贮存时不被污染和泄漏。

8.4 运输

应在常温环境下运输，避免过冷或过热，且采取措施防止产品失水。

8.5 贮存

应在 4℃~8℃ 环境下贮存，有效期为五年，超过有效期可按本标准规定进行复验，若复验结果符合标准要求，仍可使用。