

TSKgel 液相色谱柱 在单克隆抗体分离中的应用

目录	
1. 简介	1
2. 分离模式与纯化方法	1
3. 应用	3
4. 总结	8



TOSOH BIOSCIENCE

TOSOH

1. 简介

近年来，随着生物技术的发展，单克隆抗体已成为治疗药物和诊断试剂的主要成分。由于商业应用不断增加，对单克隆抗体进行快速简单的纯化工作变得非常重要。关于使用高效液相色谱法（HPLC）及 FPLC（快速蛋白液相色谱法）对单克隆抗体进行纯化，已经有过很多研究报告；本分离报告的结尾纳入了一组选定的参考文献。本文通过几个应用实例介绍了 TSKgel 色谱柱在使用高效液相色谱法对单克隆抗体进行分析中的应用。

2. 分离模式与纯化方法

表 1 例举了单克隆抗体分离分析中所采用的高效液相色谱法分离模式及其主要特点。离子交换色谱法（IEC）、疏水作用色谱法（HIC）及亲和色谱法（AFC）具有较大的样品载量及较高的选择性；就其本身而论，他们通常用于单克隆抗体的纯化。几乎 75% 的单克隆抗体纯化使用到 IEC，通常继续使用硫酸铵的疏水模式（HIC）。尽管凝胶过滤色谱法（GFC）在分辨率和样品载量上稍显逊色，但其通常用作单克隆抗体制备的最终纯化方法及纯度检验的手段。该方法还可用来去除二聚物及分子量较大的多聚体。

表-1 用于单克隆抗体纯化的高效液相色谱法分离模式

分离模式	分离机制	TSK-GEL	特点
凝胶过滤（尺寸排阻）色谱法（GFC, SEC）	分子大小	TSKgel G2000SW _{XL} TSKgel G3000SW _{XL} TSKgel G4000SW _{XL}	尽管分辨率及样品载量劣于其他分离模式，但它易于去除二聚物及多聚体。二聚体及多聚体是单克隆抗体产生免疫原性的原因。也可用于最终产物的纯化或用作纯度检验。也适用于分离 Fab 与 IgM（TSKgel G4000SW _{XL} ）。
离子交换色谱法（IEC）	离子相互作用	TSKgel DEAE-5PW TSKgel SP-5PW TSKgel CM-5PW TSKgel DEAE-NPR TSKgel SP-NPR	分辨率高，样品载量大。 阴离子交换在单克隆抗体子类及杂质的分离与纯化中起着重要的作用。由于很多杂质不保留在色谱柱上，阳离子交换可通过步进式洗脱对其进行简单的纯化。 无孔型树脂（NPR）色谱柱可用于快速分析及分馏微量的单克隆抗体（ μg 到 ng ）；单克隆抗体片段的纯度检验可代替电泳法。
疏水作用色谱法（HIC）	疏水性	TSKgel Ether-5PW TSKgel Phenyl-5PW TSKgel Butyl-NPR	这种方法的特点是分辨率高、样品载量良好。尤其是 TSKgel Ether-5PW，其对疏水性单克隆抗体的回收率较高。HIC 可通过步进式洗脱对其进行简单的纯化。TSKgel Butyl-NPR 是微分馏的理想选择。
亲和色谱法（AFC）	生物亲和性	TSKgel Chelate-5PW TSKgel Tresyl-5PW	固定化的金属螯合亲和色谱法（IMAC）。对抗原等配体进行固定，从而结合并纯化单克隆抗体。

一般来说, 使用单一的 HPLC 模式 (除 GFC 外) 纯化得到的单克隆抗体的纯度可达到 95%。因此, 用于诊断的高纯度单克隆抗体可通过利用单个 HPLC 色谱柱获得。然而, 单克隆抗体用于药用目的时, 其纯度需达到 99% 及更高, 可通过单个蛋白质 A 亲和步骤获得。该方法基于抗体抗原的相互作用。当使用特异性较差的分离模式时, 至少需要两种不同的分离模式, 如 IEC-HIC 或 IEC-GFC。

此外, 制备高纯度的单克隆抗体溶液的近期要求, 需要三种不同的分离模式, 如 HIC-IEC-GFC 或 AFC-IEC-GFC。此外, 必须根据所需的纯度、允许的纯化时间及制备单克隆抗体的每个过程所需的成本来选择适当的洗脱法, 可以选择线性洗脱、梯度洗脱, 也可以选择步进式梯度洗脱。表 2 列出了各种 TSKgel 产品用于单克隆抗体纯化的一些文献及其概要。尽管文献中很多方法由 IEC 与 GFC 组成, 也包括一些使用 HIC 及 AFC 方法的文献。

表-2 TSKgel 色谱柱在分离单克隆抗体中的应用的相关文献。

文献编号	色谱柱	样品	抗体类型	概要
1	TSKgel G3000SW	腹水、培养上清液	IgG ₁ , F (ab) 2	对 I 类 MHC 抗原单克隆抗体的综述文章。
2	TSKgel G3000SW	腹水	IgG ₁ , F (ab') 2	IgG ₁ 与 F (ab') 2 的分离
3	TSKgel G3000SW	腹水	IgG ₁ , IgG _{2b} , IgG ₃	由 IEC 纯化的单克隆抗体的最终纯化回收率为 85% 及更高。
4	TSKgel DEAE-5PW TSKgel G3000SW	腹水, 培养上清液	IgG ₁ , IgG _{2a} 共 8 种	通过复杂的洗脱液对单克隆抗体进行单步 IEC 纯化, 其回收率为 95%
5	TSKgel G3000SW	腹水	IgG ₁ , IgG _{2a} , IgG _{2b}	由 IEC 纯化的单克隆抗体的纯度检验
6	TSKgel DEAE-5PW	腹水	IgG ₁ , IgG _{2a} , IgG _{2b}	通过复杂的洗脱液对单克隆抗体进行单步 IEC 纯化, 其回收率为 92% 及更高
7	TSKgel Phenyl-5PW	腹水、培养上清液	IgG	IEC 与 HIC 的分离 发现 IEC 与 HIC 能提供良好的分离
8	Toyopearl DEAE-650M Toyopearl CM-650M	培养上清液	IgG _{2b}	样品的快速分离; 酚红指示剂的简单去除。活性回收率为 90% 及更高
9	TSKgel SP-5PW TSKgel G4000SW	腹水	IgG ₁ , IgM	利用 IEC 进行的简单纯化, IEC-GFC 连接的自动控制。活性回收率为 80% 及更高
10	TSKgel SP-5PW	培养上清液	IgG	预处理样本 (100mL) 的步进式梯度洗脱 纯度 99%
11	TSKgel Chelate-5PW	腹水	IgG	应用 IMAC, 每步操作均可使纯度增加 10 倍
12	TSKgel DEAE-5PW TSKgel G3000SW	腹水	IgG ₁ , IgG _{2a} , IgG _{2b} , IgM	利用复杂的洗脱液在准备好的色谱柱上进行单克隆抗体的纯化。回收率为 89% 及更高。
13	TSKgel DEAE-5PW TSKgel G3000SW	腹水	IgG ₁	在准备好的色谱柱上利用 IEC 与 AFC 进行纯化的比较检验。 纯度 99.2% 活性回收率 72%
14	TSKgel DEAE-5PW	腹水	IgM (2 种)	利用盐与 pH 的等度梯度, 将 IgM 纯化至高纯度
15	TSKgel Ether-5PW TSKgel G3000SW _{XL} TSKgel DEAE-NPR	腹水	IgG ₁	通过 HIC 进行单克隆抗体分离条件的检验, 利用步进式洗脱进行简单纯化

3. 应用

3.1 凝胶过滤色谱法 (GFC, SEC)

GFC 法在单克隆抗体的分离中,分辨率及样品载量均劣于其他色谱分离模式。IgG 通常在含有大量白蛋白的小鼠腹水液中表达。向 GFC 色谱柱注入样品时,通常情况下,单克隆抗体 (IgG) 与白蛋白间不可能获得令人满意的分辨率。因此, GFC 更多地用于分离部分纯化的样品,而不适用于从原腹水样品中直接进行单克隆抗体的纯化。

图 1 为利用 GFC 从小鼠腹水液中分离单克隆抗体的实例。尽管发现可以通过改变洗脱液 pH 及盐类 (pH 5.0, 0.1mol/L Na₂SO₄) 来改善 IgG 与白蛋白的分离效果,但对大多数应用来说,分辨率仍不够。关于此类分离的详细介绍,可参考分离报告 No.62。

由于较大的孔径能分离较大的蛋白质,因此,最适合分离 IgM 的色谱柱为 TSKgel G4000SW_{XL}。

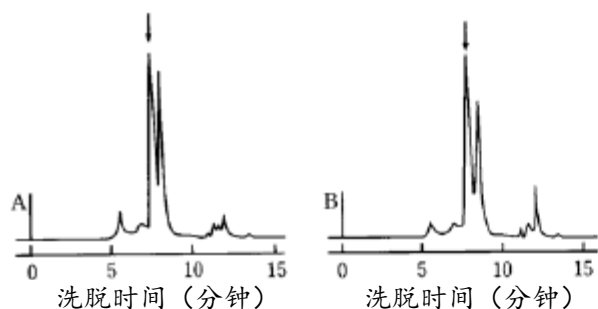


图 1 GFC 进行单克隆抗体的分离

色谱柱: TSKgel G3000SW_{XL}, 7.8mm ID x 30cm
洗脱液: A: 50mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.7)
+ 0.3mol/L NaCl

B: 50mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 5.0) +
0.1mol/L Na₂SO₄

流速: 1.0mL/min

温度: 25°C

检测器: UV@280nm

样品: 鼠抗人脯氨酸羟化酶 (IgG₁), 小鼠腹水的
稀释液 (50μl)

3.2 离子交换色谱法 (IEC)

离子交换色谱法可由带 DEAE (二乙氨基) 官能团的阴离子交换填料组成,也可由带 SP (磺酸基) 或 CM (羧甲基) 官能团的阳离子交换填料组成。通常, DEAE 阴离子交换用于单克隆抗体纯化的最后一步。DEAE 也非常适合于 IgG 片段的分离。两种情况均适用线性梯度法。pH 为 8 或更高时可获得最佳分离效果。图 2 及图 3 表示的是在 TSKgel DEAE-5PW 上从鼠腹水和细胞培养上清液中分离单克隆抗体 (IgG₁)。以鼠腹水为例,如图 2 所示, IgG₁ 洗脱约 15 分钟后,可将其从转铁蛋白 (约 11 分钟) 与白蛋白 (约 22 分钟) 等杂质中很好地分离出来,这些杂质在 IgG₁ 洗脱之前或之后进行洗脱。然而,在注入细胞培养上清液时,如图 3 所示,因单克隆抗体极其微量,所以无法检测到。

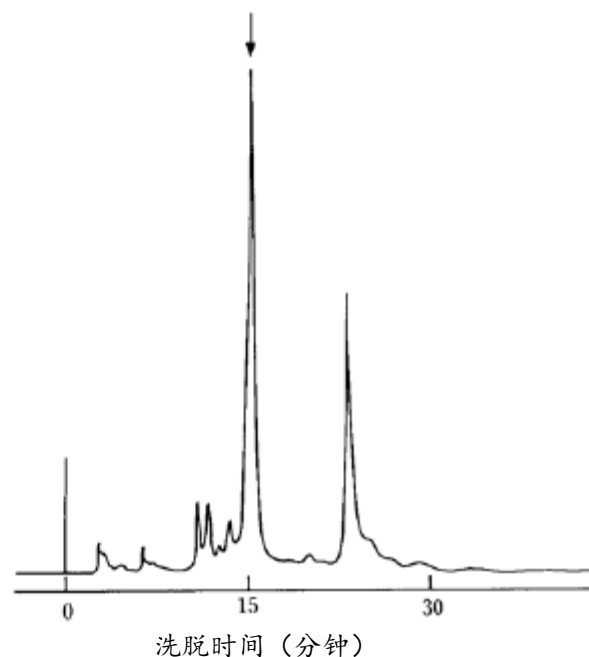


图 2 IEC 进行单克隆抗体的分离

色谱柱: TSKgel DEAE-5PW, 7.5mm ID x 7.5cm
洗脱液: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.5)

B: A + 0.5mol/L NaCl

A → B 线性梯度 (60 分钟)

流速: 1.0mL/min

温度: 25°C

检测器: UV@280nm

样品: 鼠抗人白蛋白 (IgG₁), 小鼠腹水的稀释液
(40μl 内 168μg)

不同于阴离子交换，阳离子交换剂如 SP 或 CM，其样品处理量较高，这是因为白蛋白及其他大量的蛋白质直接穿透色谱柱，而没有在通常的洗脱 pH 值下被吸附。还可通过步进式梯度洗脱法进行单克隆抗体的简单分离。图 4 的色谱图中，单克隆抗体 (IgG₁) 从 TSKgel SP-5PW 色谱柱上的细胞培养上清液中分离出来。很明显，洗脱液中的缓冲液，洗脱类型及分离度各不相同。在这种情况下，可通过醋酸盐缓冲液获得的较好的分离效果，而柠檬酸盐缓冲液则不能。

高性能的 NPR 色谱柱可快速分离微量样品。尽管无孔型填料不适合用于纯化大量单克隆抗体，但它们仍是进行单克隆抗体快速纯度检验的理想色谱柱选择。

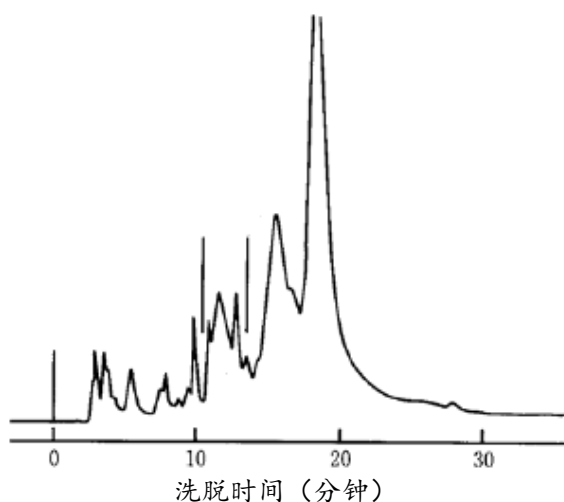


图 3 IEC 进行单克隆抗体的分离

色谱柱：TSKgel DEAE-5PW，7.5mm 内径 x 7.5cm

洗脱液：A: 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)

B: A + 0.5mol/L NaCl

A → B 线性梯度 (30 分钟)

流速：1.0mL/min

温度：25℃

检测器：UV@280nm

样品：抗 HLA-A, B, C (IgG₁)，NS-1 培养上清液

图 5 说明，小鼠腹水样品可在 TSKgel DEAE-NPR 色谱柱上分离，其分辨率相似于从 TSKgel DEAE-5PW 色谱柱上获得的分辨率 (见图 2)。由于无孔型填料的色谱柱如 TSKgel DEAE-NPR 可在非常短的时间内分析样品，它们尤其适用于检验样本纯度或监测表达水平。并且在样品量很有限的情况下，无孔型填料的色谱柱可用于分离样品中纳克重量的单克隆抗体 (详细可参考分离报告 No.65)

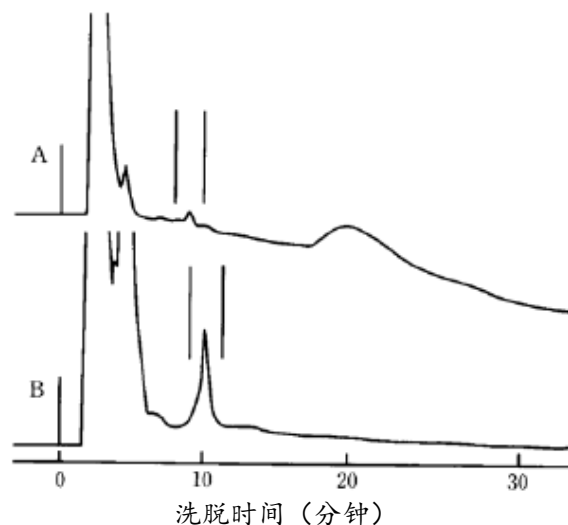


图 4 IEC 法分离单克隆抗体

色谱柱：TSKgel SP-5PW，7.5mm ID x 7.5cm

洗脱液：A: a: 20mmol/L 柠檬酸盐缓冲液，pH 5.7

b: a + 0.5mol/L NaCl

a → b 线性梯度 (30 分钟)

B: c: 20mmol/L 醋酸盐缓冲液，pH 5.7

d: c + 0.5mol/L NaCl

c → d 线性梯度 (30 分钟)

流速：1.0mL/min

温度：25℃

检测器：UV@280nm

样品：抗 HLA-A, B, C (IgG₁)，NS-1 培养上清液 (500µg/500µl)

3.3 疏水作用色谱法 (HIC)

HIC 是一种广泛使用的蛋白质纯化方法，如今也是单克隆抗体纯化的一个常用步骤。TSKgel Phenyl-5PW 是传统的用于分离蛋白质的疏水色谱柱，而 TSKgel Ether-5PW 则更适合用于疏水性蛋白质的分离及回收，如膜蛋白以及分子量为 100,000Da 或更高的蛋白质。

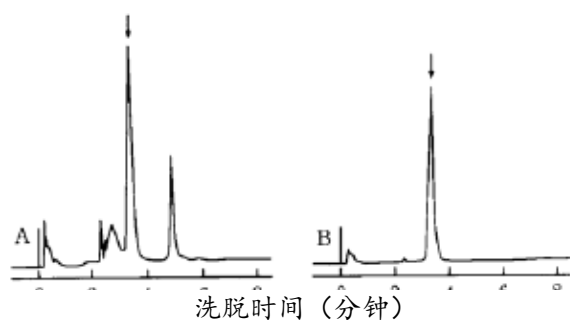


图 5 IEC 法检验单克隆抗体片段纯度

色谱柱: TSKgel DEAE-NPR, 4.6mm ID x 3.5cm

洗脱液: a: 50mmol/L Tris-HCl (pH 8.5)

b: a + 0.5mol/L NaCl

a → b 线性梯度 (10 分钟)

流速: 1.5mL/min

温度: 25°C

检测器: UV@280nm

样品: 抗禽类 14K 外源凝集素 (IgG₁)

A: 鼠腹水 (x 4, 5μl)

B: TSKgel HA-1000, 单克隆抗体片段 (100μl)

图 6 为 TSKgel Phenyl-5PW 与 Ether-5PW 色谱柱对于鼠腹水的分离色谱图。在 TSKgel Phenyl-5PW 色谱柱上, 大约 47 分钟时, 单克隆抗体 (IgG₁) 峰与白蛋白峰重叠。相比之下, 在 TSKgel Ether-5PW 色谱柱上, 单克隆抗体峰与白蛋白峰很好地被分离开来, 并在约 13 分钟时被洗脱。此外, 在相同的分离条件下, 由于填充材料的疏水性各不相同, TSKgel Ether-5PW 色谱柱内的单克隆抗体比在 TSKgel Phenyl-5PW 色谱柱中更快地被洗脱出来。如图 6 所示, 在本研究中 TSKgel Ether-5PW 显然是 HIC 法分离单克隆抗体中较理想的选择。

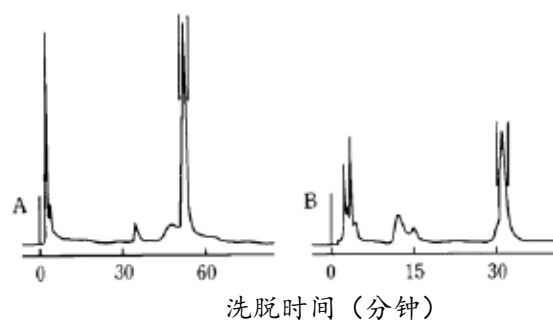


图 6 HIC 法分离单克隆抗体

色谱柱: A: TSKgel Phenyl-5PW, 7.5mm ID x 7.5cm

B: TSKgel Ether-5PW, 7.5mm ID x 7.5cm

洗脱液: a: 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) + 1.5mol/L 硫酸铵

b: 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.0

a → b 线性梯度 (60 分钟)

流速: 1.0mL/min

温度: 25°C

检测器: UV@280nm

样品: 抗禽类 14K 外源凝集素 (IgG₁) 鼠腹水 (1.5mg/100μl)

图 7 表明,较大剂量的样本可注入 TSKgel Ether-5PW 色谱柱。3mL 鼠腹水 (2 倍稀释, 1.0mol/L 硫酸铵) 直接注入色谱柱, 并通过线性梯度或步进式梯度洗脱进行洗脱。通过线性梯度洗脱获得的色谱图几乎与图 6 一致 (不显示数据)。通过步进式梯度洗脱, 大多数杂质可流穿, 仅单克隆抗体在起初的硫酸铵浓度为 1.0mol/L 时被吸附。被吸附的单克隆抗体由 0.5mol/L 的硫酸铵进行洗脱。很明显, 步进式梯度洗脱可用来分离这种量比较大的样本。

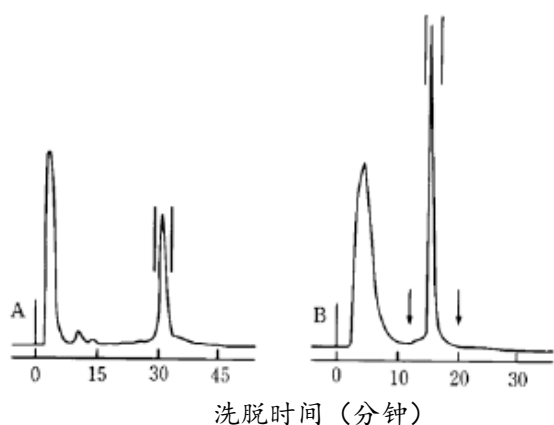


图 7 HIC 法分离单克隆抗体

色谱柱: TSKgel Ether-5PW, 7.5mm ID x 7.5cm

洗脱液: A: 同图 6

B: a: 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) + 1.0mol/L 硫酸铵

b: 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.0

a → a/b (50/50) (12 分钟) → b (20 min.) 步进式梯度

流速: 1.0mL/min

温度: 25°C

检测器: UV@280nm

样品: 抗禽类 14K 外源凝集素 (IgG₁)

鼠腹水 (90mg/3.0mL)

此外, 如果想要纯化大量的单克隆抗体, 也可采用低压液相色谱法层析填料 (Toyopearl 产品) 来代替 HPLC 色谱柱。

尽管分离选择性相似于 TSKgel Ether-5PW, 但 Toyopearl Ether-650M 的粒径 (~65μm) 大于 TSKgel Ether-5PW (10μm) 的粒径, 因此, 其分辨率较低。关于 TSKgel 色谱柱与 Toyopearl 层析填料的更多信息, 请访问我们的网站。

与 IEC 相似, 在 TSKgel 系列色谱柱产品线中已经开发出一款无孔型填料的 HIC 色谱柱。如果使用 TSKgel Butyl-NPR, 单克隆抗体的纯度检验或微纯化工作可迅速完成。图 8 为 TSKgel Butyl-NPR 色谱柱上鼠腹水的分离色谱图。该分离可在大约 3 分钟内完成, 可看出, 单克隆抗体可很好的从杂质中被分离出来。

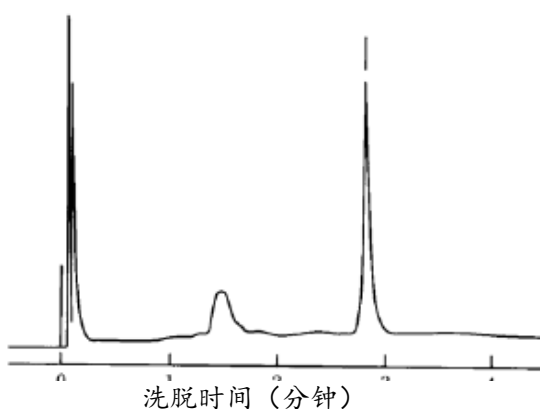


图 8 HIC 法分离单克隆抗体

色谱柱: TSKgel Butyl-NPR, 4.6mm ID x 3.5cm

洗脱液: A: 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) + 1.5mol/L 硫酸铵

B: 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.0

A → B 线性梯度 (10 分钟)

流速: 1.0mL/min

温度: 25°C

检测器: UV@280nm

样品: 抗禽类 14K 外源凝集素 (IgG₁)

鼠腹水 (38μg/2.5μl)

3.4 亲和色谱法 (AFC)

蛋白 A 亲和色谱法 (AFC) 通常应用于单克隆抗体的纯化, 同时也可通过固相金属离子亲和色谱法 (IMAC) 来分离单克隆抗体。图 10 与 11 表示了载有 Zn^{2+} 离子的 TSKgel Chelate-5PW 色谱柱上从两种基质中进行单克隆抗体的纯化, 这两种样品的来源分别为鼠腹水及培养上清液。从图 11 可看出, 单克隆抗体 (IgG_1) 在大约 32 分钟内通过 pH 梯度洗脱被洗脱, 并能很好地从其他介质中分离出来。

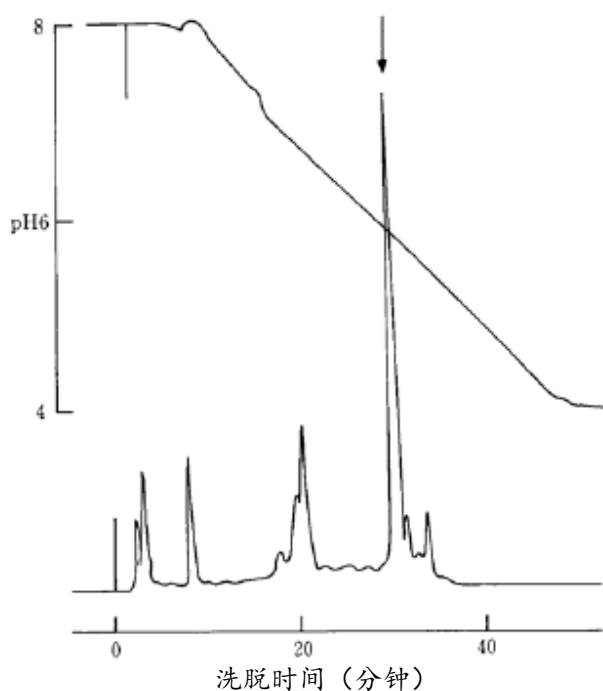


图 10 AFC 法分离单克隆抗体

色谱柱: TSKgel Chelate-5PW Glass (Zn^{2+})
8mm ID \times 7.5cm

洗脱液: A: 20mmol/L HEPES-MES-醋酸盐缓冲液 (pH 8.0) + 0.5mol/L NaCl

B: 20mmol/L HEPES-MES-醋酸盐缓冲液 (pH 4.0) + 0.5mol/L NaCl

A \rightarrow B 线性梯度 (40 分钟)

流速: 1.0mL/min

温度: 25 $^{\circ}$ C

检测器: UV@280nm

样品: 抗禽类 14K 外源凝集素 (IgG_1)
鼠腹水 (50 μ l)

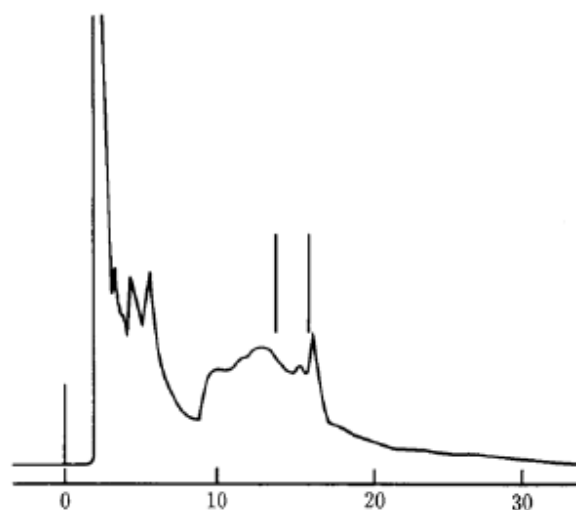


图 11 AFC 法分离单克隆抗体

色谱柱: TSKgel Chelate-5PW (Zn^{2+})
7.5mmID \times 7.5cm

洗脱液: A: 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) +
0.5mol/L NaCl

B: A + 200mmol/L 甘氨酸

A \rightarrow B 线性梯度 (30 分钟)

流速: 1.0mL/min

温度: 25 $^{\circ}$ C

检测器: UV@280nm

样品: 抗 HLA-A, B, C (IgG_1), NS-1 培养上清液

4. 总结

正如本文中所讨论的一样, 单克隆抗体的纯化方法有多种不同的分离方式, 且每种方式都具备其各自的优点。因此, 在单克隆抗体的纯化中, 重要的是根据分辨率、样品载量、可操作性、实验成本及最终纯度等各种因素来选择最合适的分离方式及色谱柱。(注: 本报告著成时间较长, 更多最新的单抗分离色谱产品及相关应用文献请访问我们的网站)。

参考文献

- 1 Monoclonal antibodies: Purification, fragmentation and application to structural and functional studies of class I MHC antigens, P.Parham, M.J. Androlewicz, F.M.Brodsky, N.J.Holmes and J.P. Ways, *J.Immunol. Methods*, 53(1982)133
- 2 On the fragmentation of monoclonal IgG₁, IgG₂ and IgG_{2b} from BALB/c mice P.Parham, *J.Immunol.*, 131(1983)2895
- 3 Rapid and efficient purification of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid using high performance liquid chromatography S.W.Burchiel, J.R. Billman and T.R.Alber, *J.Immunol. Methods*, 69(1984)33
- 4 Single step purification of monoclonal antibody from murine ascites and tissue culture fluids by anion exchange high performance liquid chromatography M.J.Gemski, B.P. Doctor, M.K.Gentry, M.G.Pluskat and M.P.Strickler, *BioTechniques*, 3(1985)378
- 5 One-step procedure for the rapid isolation of mouse monoclonal antibodies and their antigen binding fragments by fast protein liquid chromatography on a Mono Q anion-exchange column, P.Clezardin, J.L. McGregor, M.Manach, H.Boukerche and M.De-chavanne, *J.Chromatogr.*, 319(1985)67
- 6 A High-performance liquid chromatographic procedure for the purification of mouse monoclonal antibodies, J.R.Deschamps, J.E.K.Hildreth, D.Derr and J.T.August, *Anal. Biochem.*, 147(1985)451
- 7 Rapid purification of monoclonal antibodies by high-performance liquid chromatography, B.Pavlu, U. Johansson, C.Nyhlen and A.Wichman, *J. Chromatogr.*, 359(1986)449
- 8 Use of new HPLC resins to solve old problems, D.G. Klapper, S.Osgood, R.Esch and Olson, *J. Liquid Chromatogr.*, 9(1986)1613
- 9 Purification and analysis of monoclonal antibodies from mouse ascites fluid R. Ehrnstrom and B. Gustavsson, *Internat. Lab.*, Sept/Oct(1987)26
- 10 Combination of zeta prep mass ion-exchange media and high-performance cation-exchange chromatography for the purification of high-purity monoclonal antibodies, A. Jungbauer, F.Unterluggauer, F.Steindl, F.Ruker and H.Kattinger, *J.Chromatogr.*, 397(1987)313
- 11 High-performance analytical applications of immobilized metal ion affinity chromatography, M. Belew, T.T. Yip, L.Andersson and R. Ehrnstrom, *Anal. Biochem.*, 164(1987)457
- 12 Purification of ascitic fluid-derived murine monoclonal antibodies by anion-exchange and size-exclusion high-performance liquid chromatography, H. H.Hwang, M.C.Healey and A.V.Johnston, *J. Chromatogr.*, 430(1988)329
- 13 Protein A, hydroxyapatite and diethylaminoethyl: Evaluation of three procedures for the preparative purification of monoclonal antibodies by high-performance liquid chromatography, C.Poiesi, A. Tamanini, S.Ghielmi and A.Albertini, *J. Chromatogr.*, 465(1989)101
- 14 Purification of mouse monoclonal immunoglobulin M by ion-exchange liquid chromatography, S.W.Rothman, M.K.Gentry, R.D.Gawne, A.S.Dobek, R.Ogert, M.J.Stone and M.P.Strickler, *J.Liquid Chromatogr.*, 12(1989)1935
- 15 Separation of monoclonal antibody from ascites fluid by high-performance hydroxyapatite and hydrophobic interaction chromatography, Y. Yamasaki, T.Kitamura and Y.Kato, *The 9th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*, (1989), poster #420



TOSOH

TOSOH BIOSCIENCE

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：+86-21-34610856 传真：+86-21-34610858
电子邮件：info@tosoh.com.cn
网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com