



内毒素去除亲和层析介质

本产品是一款应用于内毒素去除的琼脂糖凝胶填料，配基为多粘菌素 B(Polymyxin B)，能保持较高的分辨率和重力流速。

多粘菌素 B 能够特异性地结合革兰氏阴性菌的脂多糖(LPS)，在温和条件下可高效结合内毒素，去除率高且样品回收率高。经内毒素去除介质纯化后，蛋白溶液中的内毒素含量可降低至 0.1~0.25 EU/mL。填料可耐受不同 pH、离子强度的缓冲体系，可应用于生物制药、蛋白纯化以及其他生物制品的内毒素去除工艺。

源叶内毒素去除介质储存在 20%乙醇中，凝胶和保护液的体积比为 1:1，我司产品规格为实际凝胶的体积。

参数	指标
基质	4%高度交联琼脂糖
配基	多粘菌素 B, ~2mg/mL
粒径范围①	30~70 μ m
平均粒径	~50 μ m
内毒素结合能力④	~2000000EU/mL
推荐工作流速②	30~150cm/h
最大流速与压力③	300cm/h, 0.3MPa
使用 pH	3~10(推荐的工作 pH), 3~12(短期稳定)
化学稳定性	在以下溶液中稳定：常用的水相缓冲液、300mM 咪唑、10mM DTT。
储存	20%乙醇, 2~8 $^{\circ}$ C
保质期	3 年

注：①90%体积以上的微球在此粒径范围；

②推荐流速是指该流速充分的接触时间；

③10cm 柱高下的最大测试流速。

④ 内毒素结合能力 (~2000000 EU/mL) 的测定需满足：原始样本内毒素浓度达到一定的检测阈值；且结合效率与内毒素含量呈正相关，相关参考数据见下表。

产品	样品编号	初始内毒素浓度 EU/mL	处理后内毒素浓度 EU/mL	有料产品处理能力 EU/mL 填料
R43465	样品 1	1250000-2500000	12500-25000	≥ 12375000
	样品 2	125000-250000	< 1250	≥ 1237500



内毒素去除 亲和层析介 质	样品 3	25000-50000	82.5-125	≥249375
	样品 4	125-250	< 0125	≥1248

稳定性和储存

在 2-8℃下长期储存(36 个月)。禁止冷冻。

使用说明

1. 色谱柱装填

以下阐述与层析系统连接时，填料的色谱柱装填方法。

(1) 所有需要用到的材料的温度要与色谱操作的温度一样，液体最好做脱气处理。

(2) 填料用量计算：通过沉降定量填料体积，需要的沉降填料体积=柱体积×压缩比(也称压缩因子)。沉降体积是指填料在 20%乙醇保存液中自然沉降完全读取的稳定体积。内毒素去除介质的压缩比为 1.20。为使达到装柱比，可通过柱头下压的方法，也可以通过高流速压柱。

(3) 填料清洗：将填料悬液充分摇匀后量取相应体积，抽滤除去液体，并用约3 倍填料体积的纯化水洗涤，重复 3 次，以除去保存液。

(4) 装柱填料悬液准备：将填料转移到适当的容器中，加入适量的装柱液，制成 50~75 v%的装柱填料悬液，使用前搅匀。

(5) 装填前准备：在清洗干净的层析柱下端加入装柱液，以除去下垫片及层析柱下端的空气，在柱内保留少量的蒸馏水，拧紧下堵头，调整柱子使其垂直于地面。

(6) 装填：将搅匀后的填料悬液一次性缓慢倒入层析柱内(必要时使用装柱器)，为避免引入气泡，应使之沿层析柱内壁自然流下。将所有填料加入后，用装柱液将装柱器加满，拧紧装柱器上盖，将柱子与层析系统连接。

(7) 压柱：使柱内填料自然沉降(或 50~ 150 cm/h 的低流速下沉降)，待填料沉降完全后(填料与液体的界面清晰)，去除装柱器，装上上柱头，并将柱头下降至界面处；通过高流速(推荐流速见下表，注意柱压不超过 0.3 MPa)，继续压柱至界面清晰稳定，标记界面稳定时的柱高。停泵，打开柱头上的阀门/堵头，关闭柱底的



阀门/堵头，下压柱头至标记位置下方与压缩比对应的位置，旋紧柱头，装柱完成。
装柱完成后，需用高流速平衡柱内的填料。

装柱条件	内毒素去除介质
压缩比	1.20
装柱流速	~150cm/h

2. 柱效测定和评价

完成装柱后、使用前可通过柱效测定和评价可以确认层析柱装填质量。柱效通常用理论塔板高度(HETP)和非对称因子(As)来评价。

柱效测定可以采用丙酮或者 NaCl 作为样品进行，按照下表配制样品溶液和流动相。

样品	1.0%丙酮	0.8~1.0 M NaCl
样品体积	1.0%柱体积	1.0%柱体积
样品	1.0%丙酮	0.8~1.0 M NaCl
流动相	纯水	0.4 M NaCl
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测器	UV-280 nm	电导

根据 UV 或者电导率曲线计算理论塔板高度(HETP)、理论塔板数(N)和非对称因子(As)，公式如下：

(1) $HETP=L/N$

(2) $N=5.54 \times (VR / Wh)^2$

(3) $As=a/b$

其中：L 为柱高； VR 为保留体积； Wh 为半高峰宽； a 为在 10%峰高处的第一个半峰宽； b 为在 10%峰高处的第二个半峰宽。

一般来说， HETP 的数值应小于填料平均粒径的三倍(即 $HETP/D50<3$ ， D50 为填料的平均粒径)， As 应在 0.8~ 1.5 之间。

3. 再生

通常在使用首次使用前和每次使用后对填料进行再生，以确保填料的内毒素含量尽可能低。



常用的再生溶液为 1% Triton X-114(使用温度：2~8℃)或者 1% DOC(脱氧胆酸钠)。可用 5~10 个柱体积的溶液对色谱柱进行再生，再生后用 5~10 个柱体积无热源的缓冲液再平衡色谱柱。

4. 平衡与上样

实验中使用的水、缓冲液和耗材均需经过无热原处理，以防止在操作过程中引入内毒素。

缓冲液与产物体系尽可能保持一致，例如 20 mM PB，150 mM NaCl，pH 7.0~7.4 是较为常用的缓冲体系。建议 pH 的范围为 7~8，NaCl 的浓度范围为 150 mM~500 mM，以降低非特异性吸附和蛋白与内毒素之间的静电作用。

在上样前，需用缓冲液在操作流速下平衡层析柱，该过程通常需要 5~10 个柱体积的缓冲液，以电导、pH 等检测信号参数不变且与缓冲液 A 对应为准。

在足够的接触时间条件下，上样体积与填料体积比通常在 1~100，更大的上样体积有利于提高回收率。上样后收集流穿中的目标蛋白。

可根据实际需求再上样 1~3 次。

5. 填料保存

填料的初始保存液为 20%乙醇，使用过后可继续用 20%乙醇保存。保存温度在 2~8℃为宜，不可冻存。