

Technical literature is available at: www.mesgenbio.com. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com

MESGEN[™]
INNOVATION BIOTECHNOLOGY

产品规格: 5ml 10ml 25ml 100ml

工作原理

内毒素（即脂多糖）是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要组成部分，广泛存在我们的试剂耗材和样品之中，是生物医学试验和医药制品中的一大污染源，是蛋白、核酸、多糖等生物大分子纯化过程中最令人头疼的杂质之一。尤其是在利用革兰氏阴性菌生产的相关制品中，内毒素的含量可达到几百万单位每毫克样品，包括大肠杆菌重组表达蛋白。内毒素对哺乳动物的免疫系统具有极强的刺激性，极微量的内毒素即可引起动物机体发热甚至死亡，对动物细胞有很强的毒性，严重影响着各种体内外试验和药物的安全性。内毒素结构成分复杂，含有多糖、蛋白、脂质等成分，热稳定性和化学稳定性极强，常规方法很难除去。为了保证生物医学试验的成功率、可靠性，生物医药制品的安全性、有效性，彻底地去除样品和溶液中的内毒素一直是我们的纯化工艺上的重点内容。

本产品利用 Polymyxin B 亲和层析技术（Polymyxin B-Agarose）来实现这一工艺，达到有效地去除内毒素的目的。Polymyxin B-Agarose，即PMB 亲和层析介质，是将 Polymyxin B 通过共价偶联的方式固定在琼脂糖凝胶上，利用 Polymyxin B 能够特异性亲和内毒素的特性，除去溶液和生物制品中的内毒素。Polymyxin B（PMB）是从多粘芽孢杆菌中分离出来的一种强阳离子环抗生素，是目前发现的唯一一种能特异性亲和吸附内毒素（脂多糖）的抗生素。它对大部分的革兰氏阴性菌有效，主要是通过结合细菌膜上的脂多糖成分来发挥作用。由于它能够特异性高效亲和细菌细胞膜上的脂多糖，Polymyxin B-Agarose 用于除去溶液和生物制品中的内毒素，已经逐渐成为了纯化过程中去除内毒素的主流方法。

产品特性指标

外观	凝胶微球悬浮液，保存于20%乙醇溶液
颜色	白色或米白色
粒径mm	45-165
基质	4%交联琼脂糖
配基	Polymyxin B
靶分子	内毒素（脂多糖）
载量	2,000,000-5,000,000 EU内毒素/ml凝胶
pH稳定范围	5-10
可耐受试剂	20%DMSO, 20%乙醇, 20%甘油; 1M 尿素, 300mM 咪唑; 0.05% Tween 20, 10mM DTT 等
最大流速	0.1 MPa, 1 bar

操作方法

备注：所有用水和及耗材均需无热源产品，防止在使用过程中引入内毒素。

A 层析柱纯化步骤

- 1 装柱：将凝胶介质轻轻混悬起来，取适量的凝胶（如1 mL）装填于无内毒素层析柱或离心柱中。
- 2 洗涤介质：用3~5倍柱体积的无内毒素水或缓冲液洗涤凝胶，洗去凝胶保存液（20%乙醇）。凡是遇到凝胶第一次使用、长时间停用、更换层析柱的情况，必须要按步骤8对凝胶介质进行再生处理，流速控制在0.25ml / min，或每分钟小于10滴，温度控制在2-8℃。重复至少两次，确保柱子中无内毒素。
- 3 平衡介质：用5~10倍柱体积的样品缓冲液（可以使用0.9% NaCl或pH 7.2, 0.1 M PBS）平衡柱子，流速控制在0.5ml / min，温度控制在2-8℃。重复至少两次，流干。

- 4 上样：上样速度宜缓慢（如大肠杆菌表达重组蛋白10mg/mL, 50,000 EU, 1 mL），建议流速小于0.25 ml / min。
- 5 收样：收集样品流穿液，用1倍柱体积的无内毒素缓冲液（pH 7.2-7.8, 盐离子浓度50mM~500mM）洗涤凝胶，建议流速为0.25 ml / min，收集洗脱液与流穿液合并，即为去内毒素的纯化样品。
- 6 样品保存：建议纯化好的高纯的蛋白样品立即冻干或是加50% Glycerol 保存于-20℃以下，否则样品很容易聚集沉淀或是降解。
- 7 样品检测：纯化好的样品进行内毒素检测试验，内毒素应小于0.1 EU/mg 蛋白。如果内毒素残留量过高，请将样品再上样1-2 次，以去除更多的内毒素。
- 8 再生介质：用5-10倍柱体积的1% Triton X-114或者1% DOC（脱氧胆酸钠）洗涤凝胶介质，温度控制在2-8℃。重复至少两次，确保柱子中无内毒素。然后用10倍柱体积无内毒素水洗涤凝胶介质。
- 9 保存介质：用3-5倍柱体积20%乙醇洗涤凝胶，将凝胶保存于20%乙醇中。如果使用方法恰当，本介质至少可以再生使用10 次。

B 重力流纯化步骤

- 1 移除保存液：将凝胶介质轻轻混悬起来，取适量的凝胶（如1mL）于离心管中，静置至完全沉淀或置于离心机中以6000 rpm的转速离心5min或以0.45μm的滤膜真空抽滤，去除上清液或滤液。
- 2 清洗凝胶介质：用3-5倍凝胶体积的无内毒素水或缓冲液混悬凝胶，静置至完全沉淀或置于离心机中以6000 rpm的转速离心5min或以0.45μm的滤膜真空抽滤，去除上清液或滤液，洗涤3-5次。凡是遇到凝胶第一次使用、长时间停用等情况，必须要按步骤5对凝胶介质进行再生处理。
- 3 平衡凝胶介质：用3-5倍凝胶体积的样品缓冲液混悬凝胶，静置至完全沉淀或置于离心机中以6000 rpm的转速离心5min或以0.45μm的滤膜真空抽滤，去除上清液或滤液。可根据实际需要再平衡1~2次。
- 4 去除内毒素：根据样品的内毒素含量及性质将适量样品（如50-5000 mL）加入清洗平衡好的凝胶中，混悬，每隔5min混悬1次，静置结合15-30min，静置至完全沉淀或置于离心机中以6000 rpm的转速离心5min或以0.45μm的滤膜真空抽滤，回收上清液或滤液，即为去内毒素的纯化样品。
- 5 再生介质：用3-5倍凝胶体积的1%Triton X-114或者1% DOC（脱氧胆酸钠）洗涤凝胶介质，温度控制在2-8℃。重复至少两次，确保柱子中无内毒素。然后用3-5倍凝胶体积无内毒素水洗涤凝胶介质。
- 6 保存介质：用3-5倍凝胶体积20%乙醇洗涤凝胶，将凝胶保存于20%乙醇中。如果使用方法恰当，本介质至少可以再生使用10 次。

注意事项

- 1 使用本公司产品前请仔细阅读本产品说明书及相关文献报道，或咨询我公司技术服务人员。
- 2 本产品系Polymyxin B-Agarose 即PMB 亲和介质，吸附的物质是内毒素即脂多糖。若您的纯化产物不是内毒素，而是想去除样品中的内毒素，请务必一定要收集好流穿液，即您纯化好的样品。
- 3 本产品所涉及到的参数均是在本公司模式蛋白的质控中获得。请您在使用本产品前充分了解自己样品的特性。我们不能保证您的样品和操作方案一定可达到本说明中所陈述的纯化效果。请务必坚持一个蛋白一个纯化工艺的原则。
- 4 由于内毒素本身结构含有脂链、蛋白、多糖，是十分复杂的生物大分子，它能够在缓冲液中通过疏水作用等方式与您的目的分子结合在一起。因此在样品纯化过程中，去除内毒素的同时有可能造成您样品的损失，损失率与您目的分子和内毒素的结合强度相关，您目的分子和内毒素的结合强度与样品缓冲液的盐离子浓度、pH 等相关。
- 5 为了获得更高的样品回收率和内毒素去除率，建议您将待处理的样品保存在pH 7-8、盐离子浓度50mM-500mM 缓冲液中，所含内毒素总量不大于介质最高载量的1/10，并根据自己的样品特性摸索最适合的纯化工艺。

储存条件

2-8℃，严禁冻结。有效期12个月

仅供科学研究，不得用于临床治疗