

## 工艺二:大规模内毒素去除

工业大规模样品的内毒素去除,通常采用层析的方法,这种方法条件温和,对于样品活性影响小;可放大性好,介质可重复使用,便于进一步降低成本。

### 一、亲和层析法—Endotoxin Removal Beads

Endotoxin Removal Beads 对内毒素有非常高的特异性吸附,当样品中内毒素含量较高时,一次纯化能去除95% 以上的内毒素,同时蛋白的回收率能达到90% 以上。

#### 1.1重组胶原蛋白内毒素去除

使用 Endotoxin Removal Beads 作为前处理步骤,预先去除胶原蛋白粗品中的内毒素,采用的是内毒素结合,胶原蛋白流穿的模式,胶原蛋白主条带清晰明显,具体参见图4、图5。

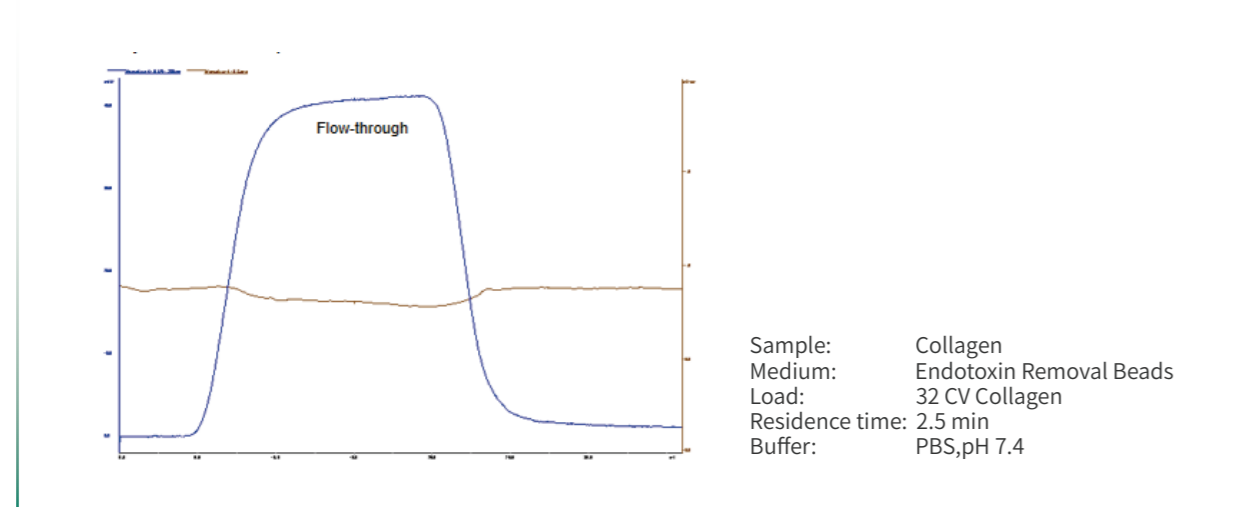


图4 胶原蛋白去除内毒素的色谱图

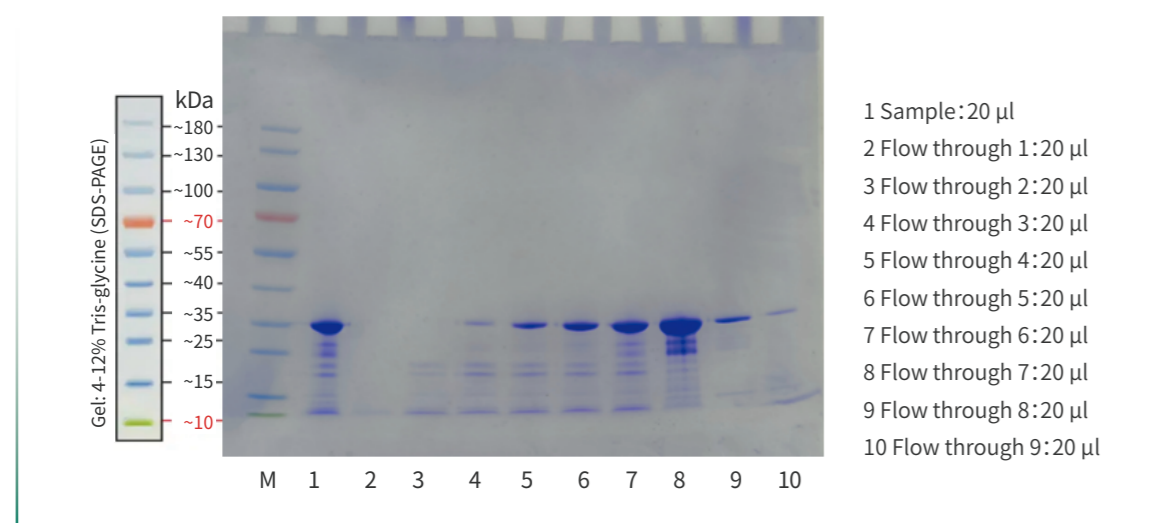


图5 胶原蛋白去除内毒素的电泳图

## 二、离子交换层析法

内毒素在 pH4-8 范围都带负电荷,因此通常选用阴离子交换介质,采用流穿模式,让目的蛋白穿过层析介质,内毒素吸附于离子交换介质上,达到去除的效果。使用高浓度氯化钠或者碱溶液对介质再生后,离子交换介质可以重复使用。推荐阴离子交换填料 Q Beads 6FF、Smac Q、Smac Q 40 等。

离子交换色谱法成本低,吸附容量大,重复使用性好,耐碱清洗,因此生物制品生产工艺过程中,离子交换层析被广泛用于内毒素的去除。

经典的抗体三步法纯化工艺:亲和捕获+阳离子交换+阴离子交换(见图6),其中阴离子交换层析在第三步精纯中被用于痕量内毒素的去除。

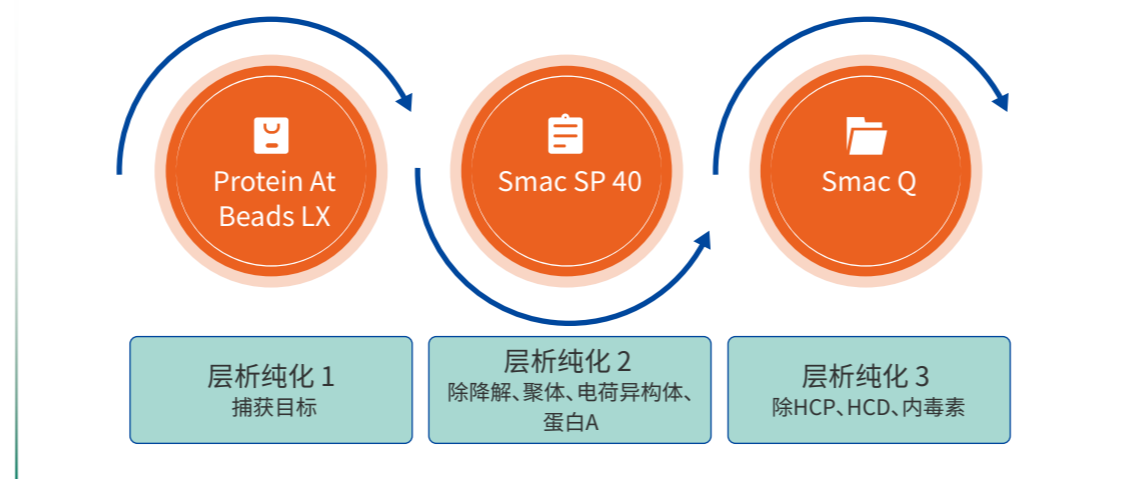


图6 抗体三步法纯化工艺中内毒素的去除

## 产品推荐

产品名称	货号	包装规格
Endotoxin Removal Kit	SA031K03	3次
Endotoxin Removal Beads	SA031	5 ml, 25 ml, 100 ml, 500 ml, 1 L
Smac Q	SI019	25 ml, 100 ml, 500 ml, 1 L, 10 L
Smac Q 40	SI035	25 ml, 100 ml, 500 ml, 1 L, 10 L
DEAE Beads 6FF	SI005	25 ml, 100 ml, 500 ml, 1 L, 10 L
Q Beads 6FF	SI001	25 ml, 100 ml, 500 ml, 1 L, 10 L

天地人和  
Smart-Lifesciences

# 去内毒素产品



## 产品介绍

### 01 内毒素

内毒素(ET),也称为脂多糖(LPS)或脂质A,是存在于革兰氏阴性菌细胞壁中(少数阳性菌也能产生),在细菌生长过程中和死亡裂解后释放到周围环境中的有毒物质。一个大肠杆菌细胞约含有200万个LPS分子。内毒素是一种相对分子质量较高的化合物,其化学结构主要由多糖(PS)和脂质A组成。脂质A是内毒素的活性中心,主要由葡萄糖胺,磷酸和10-18个碳的长链脂肪酸组成。多糖可分为O特异性多糖链(O-Antigen)和核心寡糖(Core oligosaccharide)两部分。

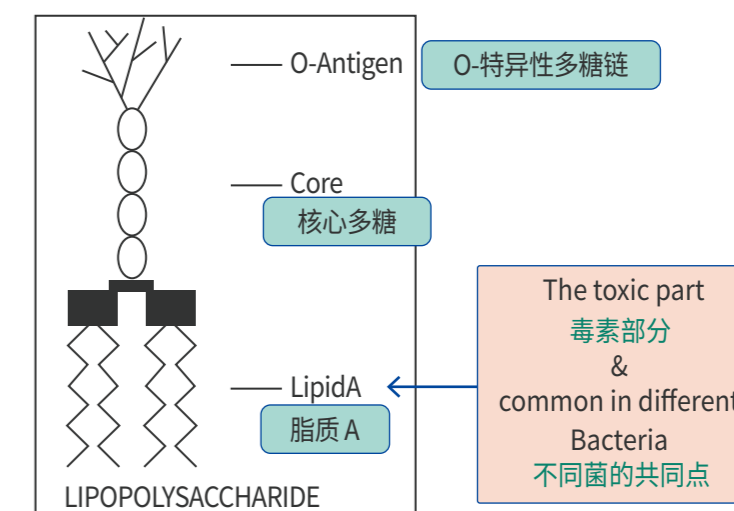


图1 内毒素结构示意图

常州天地人和生物科技有限公司 Smart-lifesciences Biotechnology Co., Ltd.  
网址:www.smart-lifesciences.com 销售/0519-83820182 售后/0519-83736881



官方公众号



Bilibili



小红书

## 02 内毒素的来源

- 1) 菌毒种来源:对于生物制品,菌毒种来源的内毒素主要来自于革兰氏阴性菌(如:大肠杆菌等)。
- 2) 生产环境来源:需要建立洁净(最好是符合 GMP 要求)的生产环境,按规定进行清洁消毒,并定期进行沉降菌和尘埃粒子检测。
- 3) 设备及器械来源:生产过程任何和样品直接接触的物品,都需要使用合适的方法预先去除内毒素。
- 4) 原辅材料:对原辅料的生产过程进行要求,严格检验样品,确保内毒素含量符合要求。
- 5) 不规范操作:操作者需要按照 SOP 操作。

## 03 内毒素的危害

内毒素本身具有极强的致热性,内毒素进入人体,作用于下丘脑体温调节中枢系统,进而引起体温调节中枢功能紊乱,引发发热反应。当内毒素浓度阈值  $>0.005\text{ng/ml}$  时,能刺激白细胞释放热源物质,引起更严重的问题,例如:内毒素血症,  $38^{\circ}\text{C}$  以上的高热,脑部缺氧,出现神经系统症状:躁动、神情淡漠、嗜睡,甚至出现昏迷。

内毒素对细胞也是有毒性的。现有的研究表明,内毒素可能会对细胞培养产生众多影响,如改变细胞外形、活化细胞、产生讯息传递物质、影响蛋白表达调控、抑制酶活性、抑制人工受精的成功率等。内毒素含量过高,容易导致细胞状态不良、老化、甚至死亡。

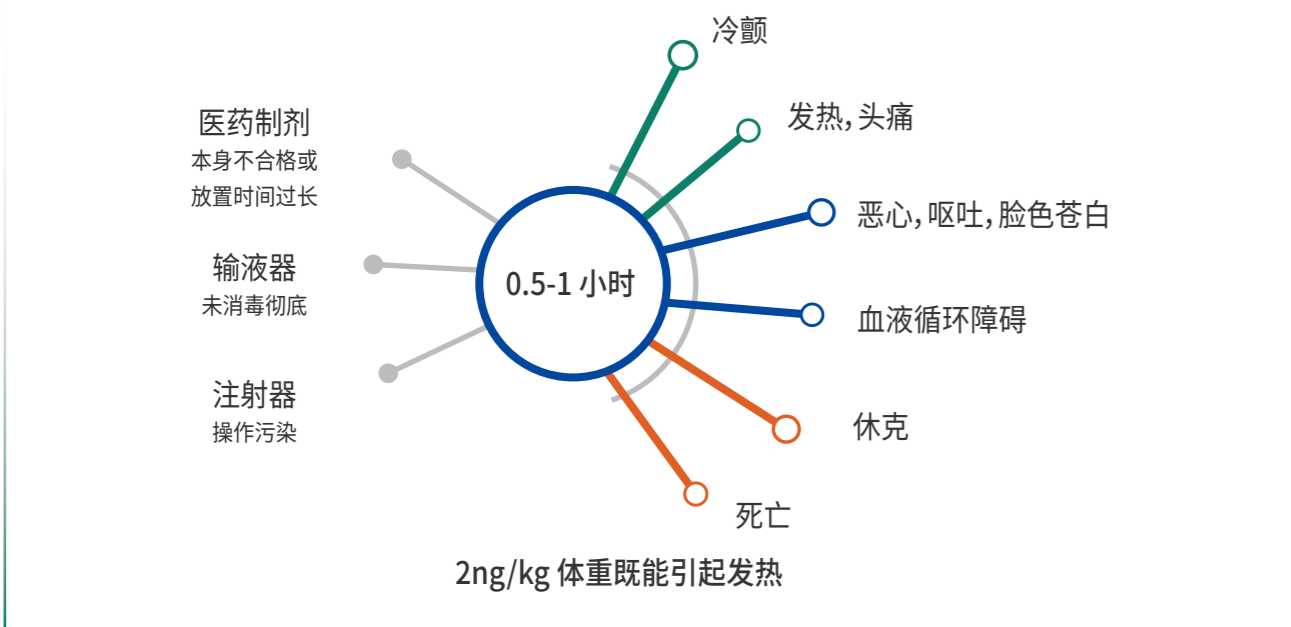


图2 生物制品中内毒素对人体的危害

## 04 内毒素的去除方法

内毒素的去除有多种方法,其原理和优缺点见下表 1,各种去内毒素的方法不是孤立的,可以相互结合使用。

表 1 内毒素的去除方法及其原理和优缺点

去除方法	原理	优点	不足
干热法	$250^{\circ}\text{C}$ 的温度以上加热至少 30min,破坏内毒素的生物活性	制药行业公认方法,操作简单	只适用于耐受高温的容器等,不适用于生物活性物质
化学降解法	使用双氧水、重铬酸钾-硫酸、 $0.1\text{M HCl}$ 、 $0.1\text{M NaOH}$ 等溶液,破坏内毒素生物活性	用于塑料和其他高分子材料等不耐高温的材质	试剂具有强氧化还原型,或强酸碱性,不适用于生物活性物质
超滤法	原液及保护剂的分子量与内毒素分子量差别较大,选择合适的超滤膜	适用于目标产物分子量小的溶液	活性损失大
液相分离法	利用内毒素和生物活性成分在水相和去污剂中的溶解性不同,使用曲拉通、脱氧胆酸钠等萃取内毒素,然后将水相样品分离出来	去除效果好,条件温和,对生物活性成分影响小	不利于放大,去污剂容易有残留
吸附法	热原在水溶液中可被活性炭、石棉、白陶土等吸附而除去	适合于组分较为简单的小分子的溶液中去除	易吸附有效成分,残余活性炭不易去除
亲和层析法	将与内毒素有特异性结合的配体(如多粘菌素 B, PMB),固定于琼脂糖介质上,然后使用层析手段,将内毒素从样品中去除	简单快速,特异性好,分离效率高,保留活性	成本较高
离子交换层析法	内毒素在 $\text{pH}>2$ 时带负电荷,与阴离子交换介质 Q 或 DEAE 基团有较强结合,目的蛋白通过流穿的方式收集,使得样品中内毒素被去除	适于从碱性蛋白质中去除,成本低,吸附容量大	不适用于溶液中存在其他带负电荷物质的情况
疏水层析法	内毒素的脂肪 A 部份有很强的疏水性,在高盐下会凝集,无法挂上疏水层析柱	可选择能结合目标蛋白的疏水介质而去除内毒素	适用对象受限
分子筛层析法	内毒素多为多聚体,根据分子大小可以有效分离	简单有效	处理量小,耗时长

## 05 内毒素的去除工艺

### 工艺一:小规模内毒素去除

#### 一、ENDOCLING® 内毒素去除试剂盒原理

ENDOCLING® 是一款高效内毒素去除试剂盒,以内毒素结合蛋白做为配体通过化学键固定在聚合物磁性微球上,由于其带有磁性,进行特异性的内毒素清除后很容易进行分离和去除,经 ENDOCLING® 内毒素去除试剂盒纯化的样品,最低内毒素含量可小于  $2\text{EU/ml}$ 。

#### 二、ENDOCLING® 内毒素去除试剂盒去除效果

##### 2.1 蛋白样品

使用试剂盒去除大肠杆菌裂解液样品中的内毒素,不论内毒素水平高和低,都能达到较好的去除效果。表2展示的是不同初始含量样品,在去除之后的内毒素含量。

表 2 大肠杆菌裂解液样品的内毒素去除结果

初始内毒素 (EU/ml)	反应后的内毒素 (EU/ml)
100-500	1-2
4000-5000	$<100$

##### 2.2 核酸样品

对于质粒样品中的内毒素,试剂盒同样可达到很好的效果,既保证了去除率,又有很高的回收率,具体结果请见表3。同时通过去除前后的电泳结果(见图3)比较可以看出,样品反应前后条带均未发生变化,并经酶切验证表明,质粒的性质不会随着内毒素去除发生改变。

表 3 质粒样品的内毒素去除效果和样品回收率

初始内毒素 (EU/ml)	反应后的内毒素 (EU/ml)	样品回收率 (%)
100-200	1-2	98

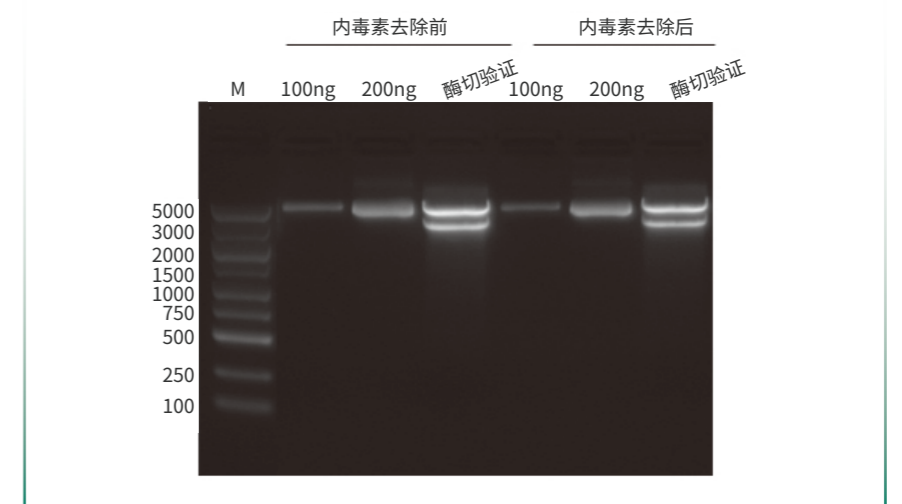


图3 质粒 DNA 样品去除内毒素前后电泳图