

内毒素去除及内毒素检测的实验操作

在[原核蛋白表达服务](#)中，细菌内毒素去除和内毒素检测是比较重要的一个环节。本文详细讲解了内毒素去除及检测的原理和操作方法，并附有相关问题解答。

什么是细菌内毒素？

细菌内毒素系指细菌的尸体或细菌代谢物，细菌内毒素的主要成份是产生于革兰氏阴性菌（以革兰氏阴性杆菌最多）细胞外壁层的脂多糖类物质，其活性主要源于其结构中的类脂 A。各种细菌的内毒素大致相同，可引起发热、微循环障碍、内毒素休克及播散性血管内凝血等。涉及细胞和动物实验时，一般对内毒素控制都有严格要求。

细菌内毒素具有很强的耐热性和化学稳定性，100 °C 以下无大变化，在 120°C 高温下加热 4 小时仅能破坏 98%，要完全灭活需在 180°C 高温下，加热 2 小时以上，这样的方法进行内毒素去除有相当难度。一般化学药品不影响细菌内毒素的活性，只有强酸、强碱或强氧化剂可以破坏细菌内毒素。

内毒素去除

细菌内毒素去除的原理

因细菌内毒素体积小，耐热性及化学稳定性强，所以一般的过滤、加热和化学方法不易去除或灭活内毒素。现比较常用的内毒素去除方法多为超滤法或亲和层析法。超滤膜孔径（5~100nm）的下限与细菌内毒素相近，所以可用小孔径的超滤膜去除细菌内毒素。

内毒素去除实验操作

亲和层析内毒素去除的方法较复杂，具体操作如下：

1. 样品处理：样品的 pH 值和离子强度在内毒素去除的过程中起着重要作用。虽然结合内毒素的 pH 范围在 6-9，但是 7-8 的 pH 范围是纯化的最佳范围。合适的离子浓度可以降低非特异性吸附，0.15-0.5M NaCl 的条件可以得到一个很好的去除效率和低的样品损失。所以，纯化之前可以使用处理过的氯化钠，0.1M 的氢氧化钠或 0.1M 盐酸来调节离子强度或 pH 值。
2. 活化树脂：将预装柱置于铁架台，垂直固定，去除预装柱顶部的盖子，打开流速控制器，使保护液在重力作用下流干，加入 5mL 的再生缓冲液，调节流速控制器，保持流速在 0.25mL/min（或者 10 滴/min），

待再生缓冲液流干，再加入 5mL 再生缓冲液，再重复操作两次，确保体系保持无热原（即内毒素）存在。

即使是第一次使用也必须进行这一步操作。这步操作大约需要 60 分钟完成。

3. 平衡树脂：活化完毕，加入 6mL 的平衡缓冲液，调节流速控制器，保持流速在 0.5mL/min，流干平衡缓冲液，再按此操作重复两次。这步操作大约需要 40 分钟完成。
4. 内毒素去除：将流速控制器关闭，使用无热源枪头将样品加入，打开控制器，控制流速不高于 0.25mL/min，流出液体积达到 1.5mL 后，使用无热源接收管接受样品，样品流干后，再加入 1.5mL-3.0mL 的平衡缓冲液淋洗，收集淋洗液。检测样品浓度及内毒素水平。
5. 再次使用：如果流出样品内毒素水平未能达到预期值，需要将预装柱重新再生，按照步骤 1 重新再生，然后上样纯化。
6. 保存条件：如果预装柱用完后需要保存，先用 10mL 平衡缓冲液平衡柱子，待平衡液流干，加入 1.5mL 的再生缓冲液（含 0.02%的叠氮化钠）

内毒素去除亲和填料的注意事项：

1. 内毒素去除用的亲和填料每次使用前都需用 Buffer 处理；
2. 配制缓冲液要用无内毒素的注射级用水，配制过程要防止引入内毒素；
3. 适当延长填料与样品溶液的处理时间可以加大内毒素的吸附量；
4. 如果用磁力搅拌要注意转速别太快，避免搅碎填料；
5. 样品如果本身是带负性电荷，为增加样品回收率，样品中可以加 $0.2M NaCl$；
6. 样品 pH 可以在 7-9 范围内；
7. 样品内毒素太高，超过填料处理量，需要稀释样品找到内毒素的范围，和经内毒素去除后的范围对照，就可以知道效果，如果一次去除不完全，可以重复，直到合格为止；
8. 内毒素去除使用的亲和填料保存条件为 20%乙醇，4~8°C。

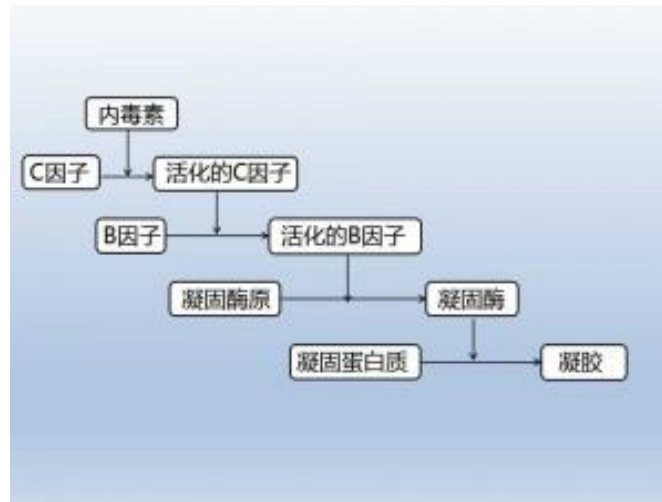
内毒素去除实验常见问题：

问题	可能原因	解决方法
	样品的 pH 没有在 7-8 之间	pH 调至 7-8 之间

去除效率低	样品和亲和树脂的接触时间太短	降低样品的流速或进行低温孵育
	去除系统受到外来因素干扰	使用无热源的实验仪器
	内毒素与目的蛋白结合太牢固	1.增加样品的 pH，使它们解离 2.增加样品与亲和树脂的接触时间
	样品通过非特异性作用结合在亲和树脂上	增加样品与平衡缓冲液中 NaCl 的量
样品损失高	目的蛋白与内毒素结合牢固，一起结合在亲和树脂上	1.增加样品的 pH，使它们解离 2.增加样品与亲和树脂的接触时间
	树脂处理过其他产品	尽量避免同一个预装柱处理不同样品； 如果无法避免，建议用 10-20mL， 2Mol NaCl 淋洗树脂，再处理其他样品

内毒素检测

内毒素检测原理：利用鲎试剂能与内毒素产生凝聚反应的特点，来检测内毒素的含量。



内毒素检测流程图

1. 阳性样品对照溶液的制备：将 5MVD 倍的样品 1.0mL 与 4λ浓度的内毒素标准溶液混合制成 2λ浓度的内毒素溶液；
2. 取 8 只鲎试剂，每支加入 1mLBET（细菌内毒素检查用水）溶解；

3. 取其中两支作为对照管分别加入 0.1mL 内毒素标准溶液，2 支加入 0.1mL 混合制成 2λ 浓度的内毒素溶液，2 支加入 0.1mL BET 作为阴性对照，2 支加入 0.1mL 样品，将 8 支试剂混匀，封口并放入 37 摄氏度恒温水浴 60min;

4. 结果分析

① 阳性对照为阳性，阴性对照为阴性，样品阳性对照为阳性，实验成功；

② 若 2 支样品管都为阳性，样品不符合要求；若 2 支样品管均为阴性，样品符合要求；若分别为阴阳性，则需重新进行内毒素检测，复试时做 4 支试剂管有一支为阳性则样品不符合规定。

内毒素检测的注意事项：

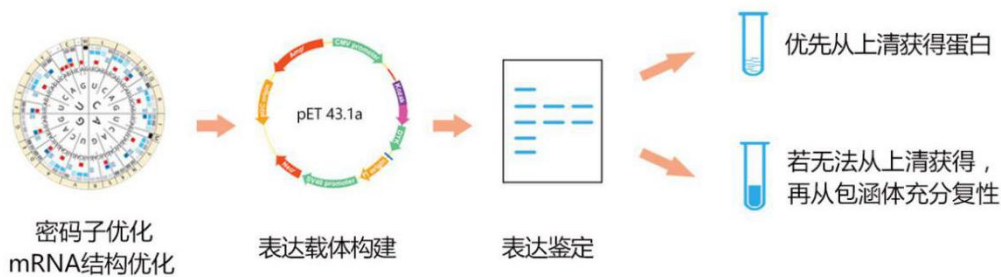
- 鲎试剂是一种生物试剂，建议进行内毒素检测时进行复核；
- 内毒素检测时稀释所用的仪器不能交叉反复使用；
- 严格控制内毒素检测时的反应温度和时间；
- 鲎试剂应该在低温下保存，虽然在温热的条件下鲎试剂还是相对比较稳定的，但是需要避免长时间的置于在高温于 25°C 的温度条件下。
- 在内毒素检测时用的鲎试剂一般只能冻融一次，复溶的鲎试剂需存放在 2-8°C 的冰箱内或 -20°C 以下保存。

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

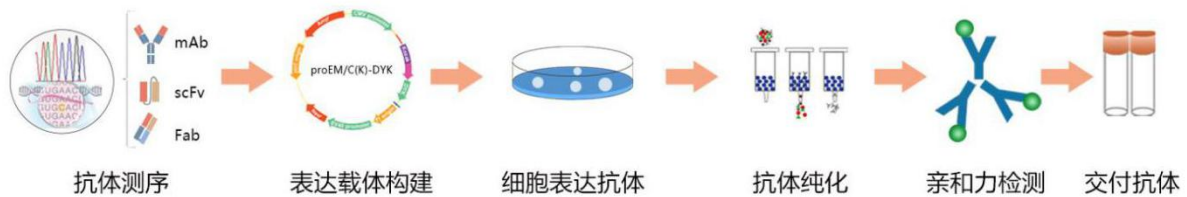
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

