

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死体或细菌代谢物，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。

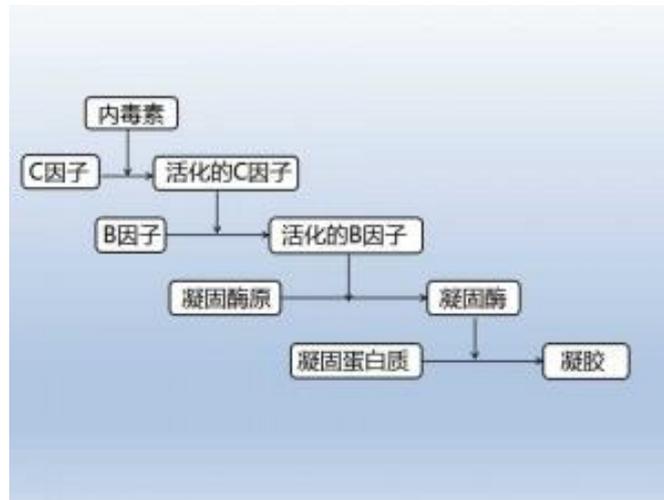
内毒素去除实验常见问题：

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。

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB® 单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

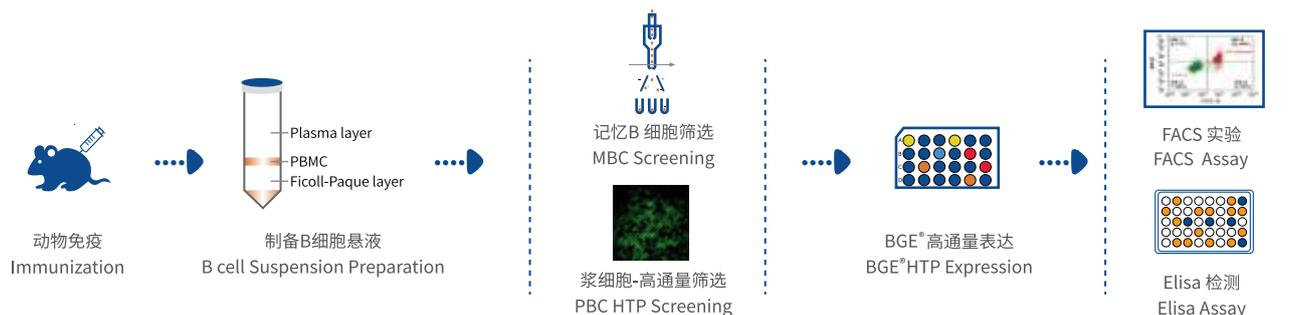
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

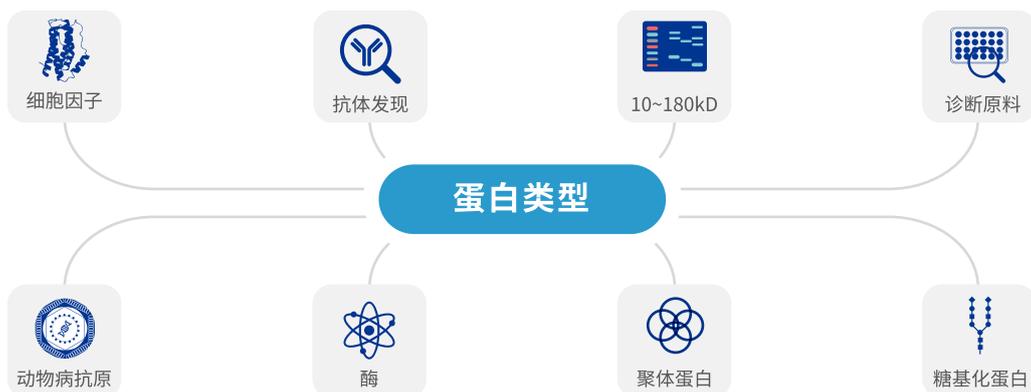


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

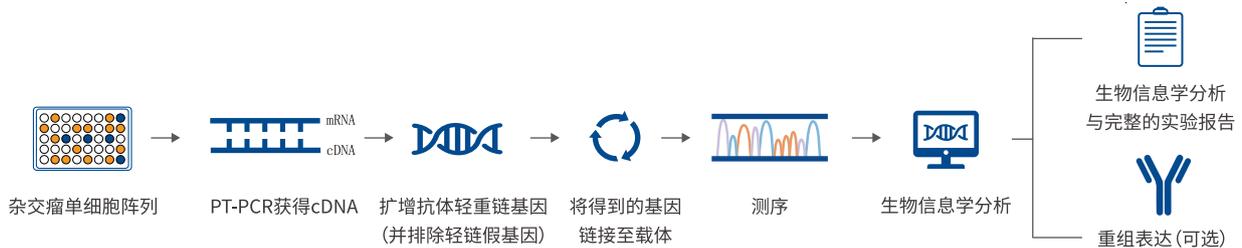
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除k轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



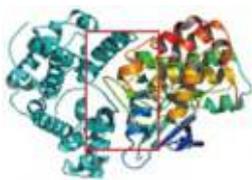
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

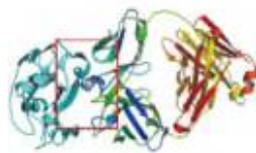
检测范围



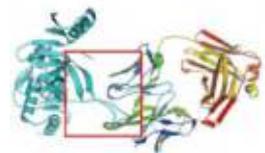
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



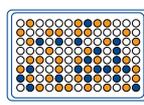
基因合成&质粒抽提



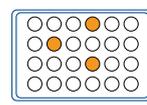
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L