



内毒素清除剂(Endotoxin Removal Solution)

目录号: DP2701 10ml, DP2702 25ml

储存: 4℃储存1个月, -20℃长期储存。

组成: 内毒素清除剂 10 ml, 200 次清除。内毒素清除剂 25 ml, 500 次清除500μl内毒素清除剂可处理500μl DNA样品。

适用: 清除DNA、RNA、蛋白质或其他液体样品中的内毒素。

自备试剂: 无内毒素的高纯水, 沉淀DNA用的3M醋酸钠(PH 7.5)或5M氯化钠溶液, TE缓冲液, 异丙醇或乙醇, 内毒素检测试剂。

产品描述: 内毒素(endotoxin)的化学本质为脂多糖(lipopolysaccharides), 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要组成成分。脂多糖共价连接到非极性的疏水性类脂A(lipid A)形成带负电荷的大分子, 同时还具有一个亲水性的寡糖核, 因而具有疏水和亲水双重性质。制备质粒DNA和重组蛋白时, 细菌破壁之后将释放大量脂多糖。无论是普通制备纯化程序, 还是离子交换、凝胶排阻过滤、甚至是氯化铯超速离心等高级制备程序, 脂多糖将不可避免地与DNA或蛋白质牢固结合而被共同纯化。脂多糖具有强烈的免疫活性和细胞毒性, 并能产生多种复杂的细胞生物学效应, 大多数情况下会明显干扰并产生不可预测的实验结果。例如在DNA转染实验中, 内毒素竞争性干扰转染试剂与DNA的结合, 显著降低转染效率, 并产生明显细胞毒性降低外源基因表达水平。在体外转染时与DNA结合的内毒素无疑是主要的致热原。DNA、蛋白质或其它样品内毒素污染, 无论是对原代和传代细胞还是整体动物均具有显著的毒性作用。

内毒素清除剂(Endotoxin Removal Reagent)能与DNA、重组蛋白、以及液体样品中的内毒素特异结合。在特定pH、盐浓度、温度条件下, 经过室温12000 rpm离心, 而DNA或蛋白质等保留在水相, 内毒素被浓缩到极小体积的下层相而被清除, 从而达到清除内毒素效果。经过3次重复抽提可将活性为5,000~50,000 EU/ml的内毒素水平降低到5~0.5 EU/ml以下, 即降低1,000~10,000倍。

使用方法:

*预冷的内毒素清除剂是提取成功的关键。提取前内毒素清除剂放在冰上15分钟, 期间翻转瓶子数次使液体均匀冰冷。按照推荐的温度操作绝对重要。可按比例加大或缩小提取

规模。

1.a. 已纯化的质粒DNA内毒素清除：吸取500 μ l DNA溶液于微型离心管，加入1/10 体积3M 醋酸钠或1/20体积5M 氯化钠溶液。冰水浴5分钟。

b. 在提取质粒时清除内毒素：以碱裂解法质粒提取为例，在加入裂解和中和溶液并离心去除碎片之后，吸取含DNA的上清溶液于新离心管，冰水浴5分钟。

2. 加入50 μ l （1/10 体积）预冷的内毒素清除剂，振荡混匀，冰水浴或4 $^{\circ}$ C 10-20分钟。溶液应该清亮,中间不时颠倒几次充分混匀。

内毒素清除剂加入溶液后，溶液会变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮。。

3. 37 $^{\circ}$ C水浴，溶液又会变为浑浊，不时振荡数次每次30秒。然后37 $^{\circ}$ C-42 $^{\circ}$ C孵育20-30 min或直到溶液分为两相。

4. 12,000 rpm离心5 min，30 $^{\circ}$ C。离心温度至少大于25 $^{\circ}$ C以上。

5. 溶液必须分为两相，否则应重复步骤3-4。上层水相含DNA，下层油状相含内毒素。

6. 将含DNA的上层水相转移到新管，弃层油状相。重复抽提2次，即重复步骤2-6两次。

7. 最后加2.5体积的乙醇或者0.6体积的异丙醇，与DNA上清液混合。 -20 $^{\circ}$ C 30 min 或过夜。12,000 rpm 4 $^{\circ}$ C离心15 min，弃上清。加入70%乙醇洗涤沉淀，12,000 rpm 4 $^{\circ}$ C离心5 min弃上清。空气干燥沉淀。加入100~200 μ l 无内毒素的高纯水或缓冲液溶解沉淀。

8. 用内毒素检测试剂测定样品中内毒素活性，并与初始样品比较。

说明：

1. DNA 浓度>1mg/ml 时清除内毒素效率降低。由于 DNA 和蛋白质本身的性质，清除程序可导致 10-50% DNA 丢失，所幸的是与清除内毒素的艰难相比 DNA 更容易提取制备。

2. 所有溶液应用无内毒素的高纯水配制。所有器械材料均应不含内毒素。玻璃器皿可高温烘烤，非挥发性水溶液可高压 120 $^{\circ}$ C 高温处理。

3. 步骤 2~6 可用于清除蛋白质、溶液、水中的内毒素。蛋白丢失约 10%，但疏水性蛋白丢失可超过 50%以上。