

M5 HiPer Endotoxin Removal Kit

内毒素去除试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Endotoxin Removal Kit	3-5T	MF492-01

【储存条件】

室温

【产品简介】

细菌内毒素（脂多糖）是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分。人们在研究革兰氏阴性菌血症和内毒素血症的过程中发现，脂多糖在其中起着关键的作用，内毒素可使机体免疫功能严重受损，进一步地发展可能引发脓毒性休克、弥散性血管内凝血、急性呼吸窘迫综合症、全身炎症反应综合症或致命性多器官功能衰竭。因此，内毒素的去除对于下游纯化处理来说是非常必须又非常困难的工作。本产品是一类高效内毒素去除的树脂，它是以修饰过的多粘菌素 B（PMB）为配体，进行特异性地去除内毒素。经 ToxinEraser™ 内毒素去除树脂的纯化，样品最终的内毒素水平可低于 0.1 EU/ml。

【主要特点】

- 高稳定性，高去除效率
- 高结合力：> 2,000,000 EU / ml (CV) **（处理体积，根据质粒中内毒素含量不同而不同）**
- 无需恒流泵即可调节流速
- 重复使用 5 次不会改变柱子效果
- 使用方便，试剂盒中提供无热源缓冲液，无热源收集管，无热源枪头等

【产品组分】

	3 - 5 次检测使用
内毒素去除树脂	1.5 ml 预装柱
再生缓冲液	125 ml
平衡缓冲液	125 ml
流速控制器	1 个
无热源接收管	1 包（3 个/包）
无热源枪头（1 ml）	2 包（6 个/包）

【客户自备】

1. 铁架台
2. 0.1 M NaOH 和 0.1M HCl，用于调节样品 PH 值
3. 氯化钠和乙醇

【使用方法】

一、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：

A. 结合内毒素的 pH 范围为 6-9，pH 范围 7-8 进行纯化最佳。

B. 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，纯化之前可以使用无内毒素的 3M 氯化钠、0.1 M NaOH 或 0.1M HCl 来调节离子强度或 PH 值。

二、内毒素去除

A. 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，但是勿使柱床干燥，沿柱壁缓缓加入 5 ml 冷的再生缓冲液（受热会变浑浊），调节流速控制器，保持流速在 0.25 ml/min(或者 10 滴/min)，待再生缓冲液流干，再加入 5 ml 再生缓冲液，重复操作两次以上，确保体系无热原（即内毒素）存在，即使是第一次使用也必须进行这一步操作。此过程中需用再生缓冲液冲洗柱壁，此过程大约需要 60 min。

B. 平衡树脂

活化完毕，沿柱壁缓缓加入 6 ml 的平衡缓冲液，调节流速控制器，保持流速在 0.5 ml/min，流干平衡缓冲液。在此过程中需用平衡缓冲液冲洗柱壁，重复该平衡步骤两次以上。此过程大约需要 40 min。

C. 内毒素去除

将流速控制器关闭，使用无热源枪头将样品沿柱壁加入，打开控制器，控制流速为 0.25ml/min 或 10 滴/min，流出液体体积达到 1.5 ml 后，开始使用无热源接收管收集流出液，样品流干后，再加入 1.5 ml-3.0 ml 的平衡缓冲液淋洗，收集淋洗液，并合并。检测样品浓度及内毒素水平。

D. 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，然后再次上样纯化。

E. 保存条件

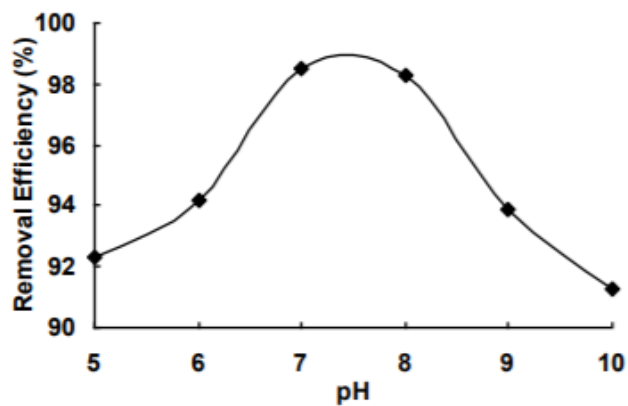
如果预装柱用完后需要保存，先用 10 ml 平衡缓冲液平衡柱子，待平衡液流干，加入 1.5 ml 的再生缓冲液（含 20%的乙醇），2°C-8°C 保存。

三、影响内毒素去除效率的因素

虽然多粘菌素 B（PMB）和内毒素特异性结合的机理还存在很多争议，但是，有一点是大家普遍接受的事实，那就是它们之间是通过静电作用、离子作用、亲水作用和分子之间的相互作用等多种因素共同作用的结果。因此，在实验中存在若干因素可能会影响内毒素的去除效率，例如：缓冲液的 PH 值、内毒素的浓度、内毒素与亲和树脂的接触时间、离子强度、温度以及样品的特性等等。下面是对影响亲和树脂内毒素去除效率因素的一些研究：

A. PH 值对内毒素去除的影响

图 1. 在 pH 为 5-10 时，亲和树脂对内毒素的去除率均在 92%以上；而当 pH 超过此范围时，内毒素去除效果明显降低。而 pH 在 pH7-8 的范围内效率最高。



B、内毒素浓度对去除效率的影响

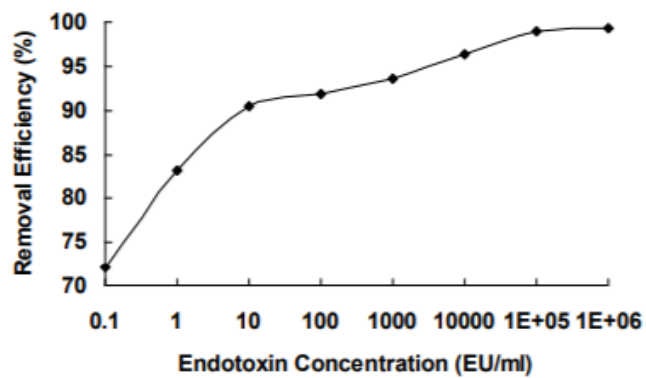


图 2. 样品内毒素的浓度直接影响内毒素的去除效率。

C、可能出现的问题及解决方法

问题	可能原因	解决方法
去除效率低	样品的pH值不在7-8之间	调节pH至7-8
	样品和亲和树脂的接触时间太短	降低样品的流速 ,或者通过低温孵育来解决
	去除或检测系统受到外来因素污染	使用无热源的实验仪器 ,保证体系不受污染
	内毒素与目的蛋白结合太牢固	1. 优化样品的pH ,使它们解离 2. 增加接触样品与亲和树脂的时间
样品损失高	样品通过非特异性作用结合在亲和树脂上	增加样品和平衡缓冲液中NaCl的含量
	目的蛋白与内毒素结合牢固 ,一起被去除	1. 优化样品的pH ,使它们解离 2. 增加接触样品与亲和树脂的时间
样品被污染	树脂用于处理过其他的样品	尽量避免使用同一个预装柱处理不同样品。如果无法避免 ,可以在处理一个样品之后 ,用10-20 ml 2M NaCl 淋洗树脂 ,然后再处理另外一 种样品
再生缓冲液出现浑浊	当再生缓冲液达到室温时将会出现浑浊	使用之前在冰上冷却再生缓冲液或者在4℃条件下进行再生



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。