

凝胶法测定内毒素SOP

实验原理：内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁的脂多糖，具有广泛的生物学活性，可引起机体发热、休克、弥漫性血管内凝血、补体系统的激活和血管活性物质释放等。鲎（hòu，亦称马蹄蟹）试验是检查内毒素的一种快速而灵敏的方法。用海洋生物鲎的变形细胞水解物所制备的鲎试剂，含有凝固酶原、凝固蛋白原、Ca²⁺及Mg²⁺离子，当鲎试剂与微量内毒素作用时，可发生一系列酶催化反应，形成肉眼可见的胶状凝固物质（凝固蛋白），通过观察有无凝胶形成作为反应的终点。此法操作比较简单，经济，不需要专用测定设备，可以进行定性或半定量测定。

1.实验仪器

| 仪器名称 | 型号/厂家 |
|---------|---------------------|
| 生物安全柜 | BSC-1300 II A2 |
| 二氧化碳培养箱 | Pansisonic MCO-18AC |
| 低速涡旋混合器 | VORTEX 1 |

2.实验试剂

| 试剂名称 | 生产公司 |
|----------------------|-------------|
| 鲎试剂（Sens=0.25 EU/mL） | 湛江安度斯生物有限公司 |
| 内毒素检测标准品(10EU/支) | 湛江安度斯生物有限公司 |
| 内毒素检测用水 | 湛江安度斯生物有限公司 |

3.实验步骤

（1）准备待测样品

根据样品内毒素最终要求和待测样品大概内毒素含量，以内毒素检测用水将待测样品依次稀释一定倍数，如：10×，100×，1000×，10000×，100000×，1000000×。

（2）准备标准品

将1mL 内毒素检测用水加入到一支标准品内，充分溶解即10 EU，然后将其稀释至0.5 EU备用。（鲎试剂灵敏度的2×即0.5 EU，阳性对照孔加入0.5 EU的内毒素标准品。）

（3）准备鲎试剂

打开一定数量的鲎试剂，每支管内加入100 μ L内毒素检测用水将其溶解充分，备用。

（4）检测

依次将稀释好的待测样品逐一加入鲎试剂管内，做好标记。设置阳性对照加入100 μ L 标准品，阴性对照加入100 μ L 内毒素检测用水。

37 $^{\circ}$ C 水浴锅 / 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱静止孵育1h左右，迅速将所有试管倒立，观察内部凝胶情况并做记录：短时间内凝胶稳定且不脱落记做阳性，凝胶成乳状沿管壁流下或者瞬间脱落记为阴性。

（5）结果分析

根据实验结果，确定阴性值与阳性值区间范围，将样品对应的稀释倍数乘以鲎试剂灵敏度的2倍即为样品内毒素含量区间（乘以2的原因在于，最后将100 μ L样品加入鲎试剂时先加入了100 μ L 水溶解鲎试剂，相当于样品再次稀释2 \times ）。如：样品A测定结果10 \times 为阳性，100 \times 为阴性，则样品A内毒素含量为5-50 EU/mL。

The end



• 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台