

Endotoxin Extractor:

полимер для удаление эндотоксинов из растворов

Предлагаемый полимер *Endotoxin Extractor* предназначен для удаления эндотоксинов из водных растворов нуклеиновых кислот или белков.

Условия хранения: **-20 °C** (долгосрочное хранение)
+ 4 °C (регулярное использование)

Введение

Полимер *Endotoxin Extractor* предназначен для удаления эндотоксинов из водных растворов методом экстракции эндотоксинов в гидрофобную фазу, образуемую полимером. Для улучшения визуализации при работе с двухфазной системой в полимер добавлен специально подобранный краситель. Краситель не мешает в последующих манипуляциях с освобожденным от эндотоксинов материалом.

Эндотоксины, известные также как липополисахариды (ЛПС), являются компонентами клеточной мембраны грам-отрицательных бактерий, к которым в частности относится *E. coli*. Внешний липидный слой наружной мембраны полностью состоит из молекул эндотоксина. Одна клетка *E. coli* содержит около двух миллионов молекул ЛПС. Молекула ЛПС состоит из гидрофобной липидной части и гидрофильной части фосфорилированных сахаридных остатков. При гибели клеток или в процессе их лизиса при выделении ДНК, молекулы эндотоксина переходят в раствор, образуя с ДНК мицелярные структуры. Эти структуры очень устойчивы и при выделении плазмидной ДНК мало разрушаются. Классические методы очистки (ультрацентрифугирование, Detoxi-Gel, ионообменная хроматография, полимиксин В) не всегда способны полностью удалить эндотоксины из раствора ДНК.

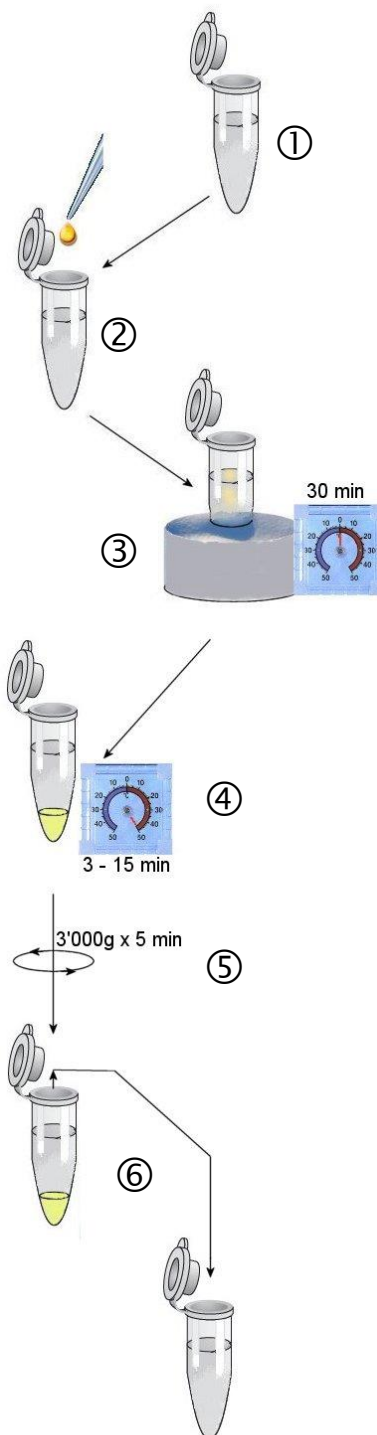
Присутствие эндотоксинов снижает эффективность трансфекции ДНК в чувствительные клеточные культуры, иммунные клетки (макрофаги, В клетки) и особенно в первичные клеточные линии. Поэтому возникает необходимость получения плазмидной ДНК, свободной от эндотоксинов.

Присутствие эндотоксинов в растворах белков, планируемых для иммунизации животных, могут приводить к развитию эндосептического шока.

Протокол экстракции

(перед использованием разморозьте полимер при комнатной температуре и тщательно перемешайте)

- Внесите в пробирку водный раствор образца
 - объем пробирки зависит от объема обрабатываемой пробы
 - водный раствор может содержать буферизирующие агенты и соли, это не влияет на результаты удаления эндотоксинов
- Добавьте к водному раствору образца полимер *Endotoxin Extractor* в количестве 1/5 от объема образца.
 - например, на 100 мкл водного раствора нужно добавлять 20 мкл полимера
 - при добавлении полимера к водному раствору с pH выше 7.2 цвет добавленного красителя меняется на красный. Изменение цвета не влияют на свойства полимера или материала
- Тщательно перемешайте полимер пипетированием. Инкубируйте пробирку в течение 30 мин при 0 °C.
 - в процессе инкубации полимер равномерно перераспределяется по всему объему раствора, связывая эндотоксины
- Перенесите пробирку в термоблок (или водяную баню) с температурой +50 °C на 3 мин (для пробирок объемом 0.5 мл), на 5 мин (для пробирок объемом 1.5-2.0 мл), или на 15 мин для пробирок большего объема.
 - в процессе инкубации при +50 °C происходит разделение ранее однородного раствора на две фазы: верхняя непрозрачная водная фаза содержит материал, свободный от эндотоксинов, нижняя окрашенная фаза представляет собой полимер, связавший эндотоксины
- Центрифугируйте пробирку при 3'000 g в течение 5 минут.
- Перенесите прозрачную водную фазу, содержащую свободный от эндотоксинов материал, в новую пробирку.



Обычно, для удаления эндотоксинов из водных растворов препаратов плазмидной ДНК выделенных по методу Бирнбойма и Доли (Birnbom H.C., Doly J. Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979)) достаточно одной процедуры обработки полимером. Но процедуру можно повторить. Особенно рекомендуется повторная обработка для очистки растворов белков, которые могут содержать примеси эндотоксинов.

Дополнительная информация

Влияние эндотоксинов на эффективность трансфекции

Не все клеточные линии одинаково реагируют на присутствие эндотоксинов. Например, эффективность трансфекции в клеточную линию CHO почти не зависит от присутствия эндотоксинов. В то же время, эффективность трансфекции в клеточную линию 293, COS7 или Huh7 ухудшается почти в десять раз даже от незначительного количества эндотоксина. Негативное действие эндотоксинов может усиливаться присутствием в препарате ДНК остаточных количеств солей гуанидина, которые часто используются при очистке плазмидной ДНК.

Факторы, влияющие на эффективность выделения плазмиды

Количество и качество выделяемой плазмидной ДНК зависят от нескольких факторов, которые мы рассмотрим ниже.

Число копий плазмиды

Количественный выход плазмиды в первую очередь определяется числом копий данной плазмиды в клетке (копийность плазмиды). Копийность плазмиды, в свою очередь, зависит от:

1. *ориджина репликации (origin of replication)*, который содержит плазмиды;
2. *размера плазмиды*;
3. *размера вставки*, которую несет плазмиды.

Очень большие плазмиды (30-60 т.п.н.) часто присутствуют в клетке в количестве 1-4 копии. Такое же количество копий могут иметь плазмиды содержащие вставки генов, чьи белки токсичны для клетки.

Штамм-хозяин

Большинство штаммов *E. coli* могут быть успешно использованы для наращивания и выделения плазмидной ДНК. Однако каждый штамм имеет свои генетические особенности, которые в той или иной степени отражаются на биохимии штамма и таким образом влияют на качество и/или количество выделяемой плазмидной ДНК. Такие штаммы как DH1, DH5 α , C600 позволяют выделять ДНК хорошего качества. Очень хорошего качества получается ДНК, выделенная их штамма XL1-Blue, недостатком этого штамма считается медленный рост бактериальных клеток. Штамм HB101 и его производные – TG1 и штаммы JM100-й серии – содержат большое количество углеводов и эндонуклеаз. Если в процессе выделения плохо освободится от углеводов, то активность многих ферментов будут ими ингибироваться.

Система метилирования штамма также оказывает влияние на рост и качество плазмиды.

В литературе описаны штаммы *E. coli*, дефектные по генам, отвечающим за продукцию липополисахаридов. К сожалению, отсутствуют данные по использованию этих штаммов для выделения плазмидной ДНК для трансфекции.

Среда для культивирования бактерий

Для наращивания бактериальной культуры мы рекомендуем использовать стандартную среду Лурия-Бертани (LB) (состав среды в расчете на 1 литр: триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 10 г). Растить клетки необходимо до плотности $3\text{-}4 \times 10^9$ клеток на мл. Мы рекомендуем выращивать клетки в течение 12-16 часов, что соответствует началу перехода клеток из логарифмической стадии роста в стационарную. В этой стадии соотношение плазмидной ДНК к РНК наибольшее и количество эндотоксинов в среде относительно невелико.