

操作说明

用以除去内毒素的亲层析介质

Cellufine® ET clean

简介

Cellufine ET clean 是一种聚赖氨酸(ε-赖氨酸)固定 Cellufine®(纤维素球形珠体)。聚赖氨酸(ε-赖氨酸)是一种微生物多聚赖氨酸(氨基酸)，含有 30-35 赖氨酸残基，由白色链霉菌产生。JNC Corporation 公司生产的本产品以聚赖氨酸(ε-赖氨酸)作为配体，以纤维素珠体为基质。

理化性质

产品名称	保存	颗粒尺寸	孔径*
Cellufine ET clean S	含有 20%乙醇的悬浮液	大约 40-130 微米	$M_{lim} 2000$
Cellufine ET clean L			$>M_{lim} 2 \times 10^6$

*通过尺寸排除色谱法得到的校正曲线，来估算珠体的孔径尺寸（分子量排阻限： M_{lim} ）。采用普鲁兰多糖和麦芽糖进行 M_{lim} 测定。

装柱

1. 计算需要的床体积。
2. 使用水、0.1M 氯化钠溶液或适当的缓冲剂制备 40 - 60 % (v/v) 悬浮液。将凝胶在室温下平衡一小时。
3. 轻轻搅拌或置于真空条件下脱气。
4. 关闭柱出口，小心地将悬浮液倒入柱中。根据容量，可能需要填料管。
5. 打开柱入口，释放空气，将顶部调节组件插入并固定在悬浮液界面处。
6. 打开色谱柱出口，开始以比操作流速快至少 10%-20% 的速率泵入吸附缓冲液。
7. 床稳定后，关闭色谱柱出口。然后打开入口，重新复位床顶部的端部单元。在上样前用 10 个柱体积的吸附缓冲液平衡。

床压缩

压缩因子 (Cf) = 已沉降的床高*/装柱床高*

*重力沉降体积 (24 小时后)

Cellufine 介质强度大，装柱效果好，压缩小。

目标

ET Clean S 的压缩因子 ≈ 1.1

ET Clean L 的压缩因子 ≈ 1.2

添补 (HETP 与不对称)

■HETP

- 装柱良好的 HETPs 的范围为 2 - 4×平均颗粒直径
- 对于 75 微珠体，HETP 目标是 0.015 至 0.030 厘米
- 不对称
 - 良好的工作范围是 0.8-1.5
 - 不对称<1.0, 通常表示装柱“硬”
 - 不对称>1.0, 通常表示某种类型的流限制

操作指南

一般操作

1. 在位清洗去除内毒素。用 5 个柱体积的碱溶液洗涤 Cellufine ET clean。按需要的时间完成，直到没有内毒素。然后用不含内毒素的水洗涤。

➤ 注意：

碱性溶液，以及消除内毒素需要的时间。

碱性溶液	消除内毒素需要的时间
0.2 摩尔/升 NaOH	16 小时或过夜
含 0.2 摩尔/升 NaOH 的 20% EtOH	3-5 小时
含 0.2 摩尔/升 NaOH 的 95%EtOH	1 小时

- 2.用适当的 5 个柱体积的无内毒素缓冲液平衡色谱柱。
- 3.在 4-25℃下，以 10 – 50 厘米/小时的流速在柱上涂敷样品。
4. 收集流出液并测定其内毒素含量，作为去除内毒素处理后的样品溶液。
5. 色谱柱使用(1)至(2)的清洗方法洗涤后可重复使用。我们已经测试过这些珠体可以再生 5 次。

建议缓冲剂

一般情况下，中性 pH 的 10mM ~ 50mM 磷酸钠缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液，均可使用。只要样品稳定，内毒素水就足够即可。

由于酸性蛋白可以吸附在 ET-clean 上，所以当蛋白吸附后，盐浓度会升高。只要让缓冲液 pH 值低于蛋白 pI，那么蛋白就会很难吸附在 ET-clean 上。

样品制备与上样

在吸附缓冲液中制备浓度为 1-20 毫克/毫升的样品。通过离心法或微滤法除去不可溶性物质。如有必要，使用渗析法、透滤法或脱盐色谱法置换样品缓冲液。

如果在过量的 ET-clean 中加入极低浓度和极少量的蛋白质，则可能无法恢复该蛋白质。

选择指导

Cellufine ET clean 珠体的内毒素吸附能力强烈依赖于“排阻限度”（英语缩写为 Mlim.），每毫升湿珠体吸附能力从 500 增加到 1000×10^{-6} 克（源自大肠杆菌 O111: B4 的脂多糖），而排阻限度在 pH 7.0 和 NaCl 浓度为 0.17M 时从 2.0×10^3 增加到 $> 2 \times 10^6$ 。虽然 Cellufine ET clean-L 具有较大的排阻限度 $> 2 \times 10^6$ ，显示出最大的内毒素去除活性，但是除了内毒素之外，其它成分的离子结合可通过该成分进入珠体而发生。

珠体必须根据如下条件选择：

（1）若要减少 pl 4.0 - 6.5、含有酸性蛋白的样品溶液中的内毒素，可以使用在 pH 为 5 - 7、NaCl 浓度为 0.1 - 0.4 M 时具有较小孔径的 Cellufine ET clean-S 珠体。

（2）若要减少 pl 7.0 - 10.5、含有中性或酸性蛋白的样品溶液中的内毒素，可以使用在 pH 为 7 - 9、NaCl 浓度为 0.1 - 0.4 M 时具有较大孔径的 Cellufine ET clean-L 珠体。

存储

短期存储（不超过或 2 周），溶液主体和色谱柱可以在 2 - 4°C、中性 1M 的氯化钠缓冲液中保存。长期存储，则可在相同条件下进行；但是，应在缓冲液中加入防腐剂（如 0.1% 福尔马林，0.05% 氯丁醇或 0.02% 叠氮化钠）。置于 2 - 8°C 条件下保存。切勿冷冻。

贮存期：

自生产之日起 10 年期

分批办法

Cellufine ET clean 珠体必须是无内毒素的。参阅“一般操作”。

（示例）

（1）在带玻璃圆盘（孔径：30 微米-米）的玻璃布氏漏斗内加入 5 毫升的 Cellufine ET clean 珠体。再加入 25 毫升碱液，用抹刀将混合物悬浮起来。将悬浮液放置一段时间，直到无内毒素，然后用真空器将溶液移除。

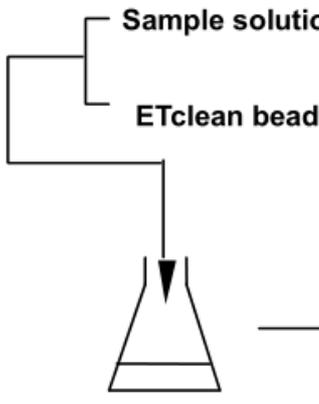
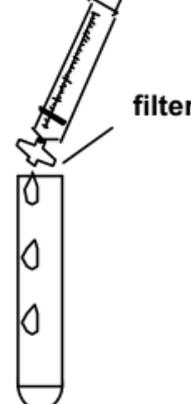
碱性溶液	消除内毒素需要的时间
0.2 摩尔/升 NaOH	16 小时或过夜
含 0.2 摩尔/升 NaOH 的 20% EtOH	3-5 小时
含 0.2 摩尔/升 NaOH 的 95%EtOH	1 小时

（2）然后用与（1）类似的方法，用其他清洗剂（2 M NaCl 等，无内毒素水，然后平衡缓冲液）洗涤珠体。

（3）将 0.2- 0.4 g 的湿吸附剂（用真空器除去平衡缓冲液后）悬置于装有 2 毫升样品溶液的烧瓶中。将悬浮液在 4-25°C 的温度下摇晃 2 小时，然后通过膜滤器(0.8 微米-m)过滤，去除珠体。

（4）测定滤液中内毒素的含量，作为除去内毒素处理后的样品溶液

（5）每次使用前，采用(1)~(2)的清洗方法，珠体都可以再生。

样品溶液 ET clean 珠体	注射器	过滤器
		
悬浮并摇晃 4-25°C, 2 消失	用注射器恢复	用过滤器从样品中移除珠体

补充

ET clean L 可以很容易从缓冲液中移除脂多糖。

与多粘菌素固定琼脂糖凝胶或者 DEAE Cellufine A-500 (阴离子交换剂) 相比, ET clean L 更容易将脂多糖降低到低浓度。

材料与方法

层析柱: 9 毫米内径×100 毫米

泵: 带硅胶管的蠕动泵

缓冲液: 1M 磷酸钠, pH7.0 (加入标准的 2.6 EU/ml LPS)

去除脂多糖 (预洗涤)

层析柱与介质: 用 5 柱体积 0.2M 的 NaOH 洗涤; 放置 16 小时, 然后用不含内毒素的水洗涤。

硅胶管: 用 0.5M 的 NaOH 洗涤; 放置 16 小时, 然后用不含内毒素的水洗涤。

※含 0.2M NaOH 的 20% EtOH 对内毒素更有效。

层析流速: 30 毫升/小时 【滞留时间 12.8 分钟; 线性流速 47 厘米/小时】

馏分 6.36ml (总 128 管)

含量测定

LAL (速率法, EndospecyES-50M Set; SEIKAGAKU CORPORATION)

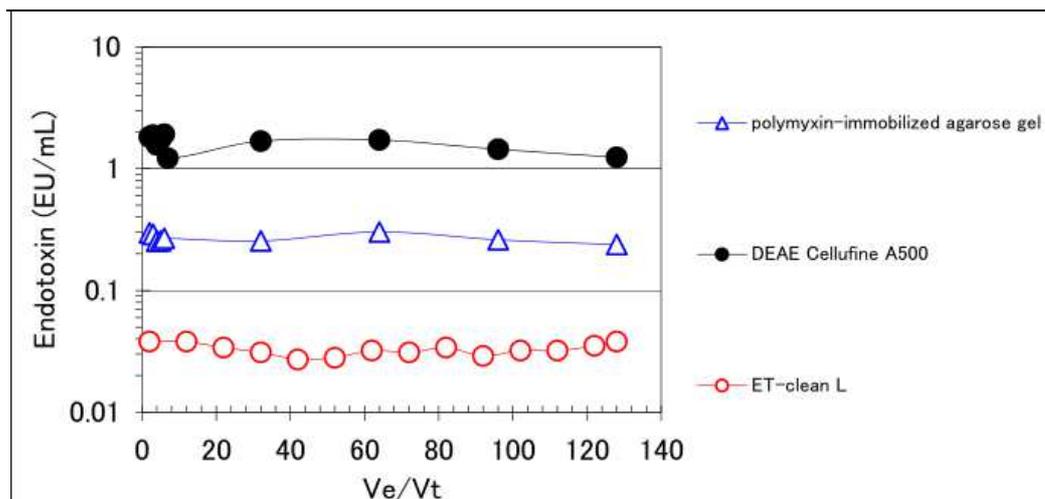


图. ET-clean L 和多粘菌素固定琼脂糖凝胶及 DEAE Cellufine A-500 对从 1M 磷酸盐缓冲液去除脂多糖能力的比较。

产品订购信息

Cellufine ET clean L		Cellufine ET clean S	
包装尺寸	商品目录号	包装尺寸	商品目录号
微型柱 1 毫升×5	20051	微型柱 1 毫升×5	20151
微型柱 5 毫升×1	20015	微型柱 5 毫升×1	20115
10 毫升	681 984 324	10 毫升	682 985 324
50 毫升	681 984 326	50 毫升	682 985 326
500 毫升	681 984 328	500 毫升	682 985 328
5 升	681 984 330	5 升	682 985 330
10 升	681 984 335	10 升	682 985 335

Cellufine ET clean 由熊本大学与 JNC Corporation 公司联合计划开发。

JNC CORPORATION 公司

生命化学事业部

日本东京都千代田区大手町 2 丁目 2-1, 邮政编码 100-8105

电话+ 81-3-3243-6150, 传真+ 81-3-3234-6219

电子邮件: cellufine@jnc-corp.co.jp

<http://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/>