

# Cellufine™ ET clean

Cellufine ET clean 是一种聚赖氨酸(ε-赖氨酸)固定 Cellufine®(纤维素球形珠体)。存在于试样溶液中的内毒素可以通过在 ET clean 上的吸附作用从试样中去除。

聚赖氨酸(ε-赖氨酸)是一种微生物多聚赖氨酸(氨基酸)，含有 20-40 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。聚ε-赖氨酸残基的阳离子配体和聚合物的疏水区域作为混合模式向纤维素颗粒提供了相互作用。(图1)Cellufine ET Clean 的特点见表1。

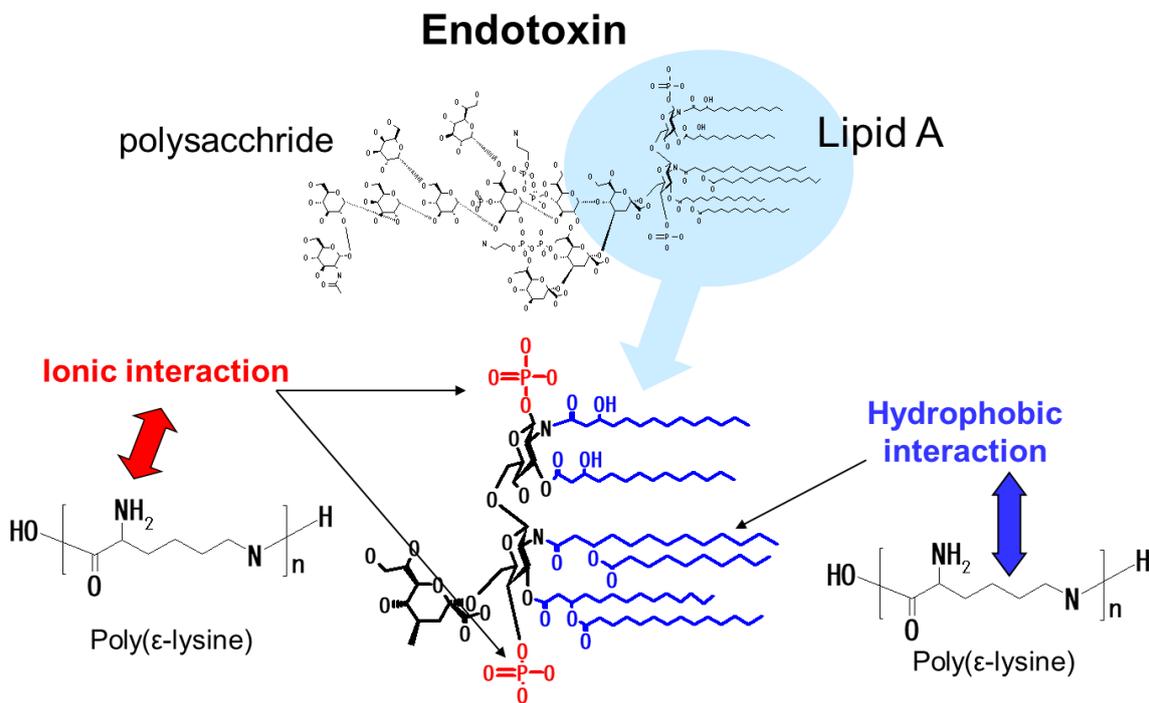


图 1 内毒素和聚ε-赖氨酸之间的相互作用

表1 Cellufine ET Clean的性能和特点

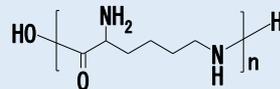
	ET clean S	ET clean L
配体	 <p>聚ε-赖氨酸 (n=20-40) pKa7.6</p>	
基底介质	真正的球形纤维素颗粒	
粒径	40-130 μm	
排除界限分子量	2000	>2×10 <sup>6</sup>
推荐操作压力	<0.30 MPa (<3000 cm/h)	<0.20 MPa (<900 cm/h)
推荐定置清洗液 (CIP)	0.2mol/l NaOH、0.2mol/l NaOH in 20% EtOH、 0.2mol/l NaOH in 95%EtOH	
pH 稳定性	2 ~ 13	1 ~ 13
保存方法	2~8 °C in 20 % ethanol	
蛋白质的恢复功能 (见表2和「推荐缓冲溶液」)	吸附性低, 回收率高	在加盐条件下, 可以实现低吸附和高回收
内毒素吸附 EU/mL-gel※	74×10 <sup>4</sup>	192×10 <sup>4</sup>

表1所示数值并非规格值。

※在0.1mL的吸附剂中加入4mL的内毒素溶液 (*E. coli* O111:B4 LPS 100~200 μg/mL), 分析上清液。pH7.0 0.02M PB, μ=0.05, (标准 LPS: *E. coli* UKT-B, 1 endotoxin unit (EU)=250pg) (文献1)

表2 Cellufine ET clean 从蛋白液中选择性除去内毒素

蛋白质		ET clean S 处理后		ET clean L 处理后	
pI	处理前内毒素 (pg/ml)	(0.02M PB, pH7.0, μ=0.05)		(0.02M PB+0.36M NaCl, pH7.0, μ=0.40)	
		内毒素 (pg/ml)	蛋白选择 (%)	内毒素 (pg/ml)	蛋白选择 (%)
卵白蛋白 4.6	28,000	81	99	<10	95
牛血清白蛋白 4.9	32,000	45	99	<10	97
肌红蛋白 6.8	4,500	18	99	<10	98
丙种球蛋白 7.4	5,600	20	99	<10	97
细胞色素 c 10.6	1,500	15	99	<10	98

用0.3 ml 湿吸附剂和2 ml 含有天然内毒素的蛋白溶液 (1mg/ml) 以分批法测定内毒素(LPS) 的去除结果。(标准 LPS: *E. coli* UKT-B, 1 endotoxin unit (EU) =250pg LPS) (文献1)

## 向层析柱进行充填的步骤

### 材料及必需器具

- Cellufine ET clean S , L
  - 层析柱、适配器、容器
  - 泵
  - 过滤装置（玻纤过滤器、布氏漏斗、吸引瓶）
  - 刻度量筒
  - 充填液（纯水或盐溶液、缓冲溶液）
  - 充填评价时使用的流动相（纯水或盐溶液、缓冲溶液）
  - 充填评价时使用的标记（1-2 % (v/v) 丙酮或 1M NaCl 溶液）
- ※ 盐溶液请使用 0.1M NaCl 溶液等低盐浓度溶液；缓冲溶液请使用吸附缓冲溶液等。

### 悬浊液的调制

- 1) 将 Cellufine ET clean 的瓶子在室温下晃动数次，使瓶内的悬浊液变均匀。
- 2) 用玻纤过滤器吸引过滤，并用 5 倍容量的充填液清洗 3 遍。去除保存剂的 20%乙醇。清洗时也可以根据需要进行沉淀分取。
- 3) 最后一次清洗完成后将其移至烧杯，加入充填液进行悬浊，使其成为 50~60%悬浊液，并在减压下进行 30~40 分钟的脱气。这时如能用磁力搅拌器加以缓慢搅拌，则脱气效果更好。
- 4) 将悬浊液注入刻度量筒，静置 4 小时以上。通过该操作来测定自然沉降体积，确认正确的悬浊液浓度。

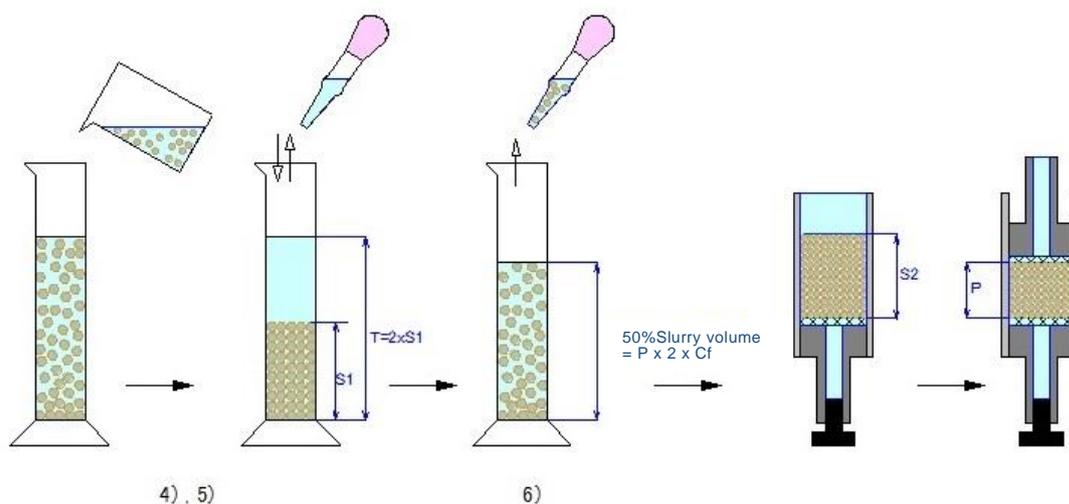


图 2 悬浊液调制

$$\text{悬浊液浓度 (\%)} = \text{自然沉降体积 (S1)} / \text{总体积 (T)} \times 100$$

- 5) 调节充填液量，使悬浊液浓度为 50%。在  $T = 2 \times S$  时悬浊液浓度会达到 50%。  
充填到层析柱内的悬浊液量可由以下计算式求得：

$$\text{50\%悬浊液必要量} = (\text{填塞物体积 (P)} \times 2) \times \text{Cf}$$

Cf 为压缩因子，由下式导出：

$$\text{Cf} = \text{自然沉降体积 (S2)} / \text{填塞物体积 (P)}$$

※填塞物体积是定为目标层析柱的体积。

Note: 填剂的压缩因子 Cf 对充填效率而言是重要的因子。请使用可动柱层析柱，对 Cf 值加以调节。Cellufine ET clean 的 Cf 举例如下：

ET clean	推荐 Cf
S	大约 1.1
L	大约 1.2

### 层析柱的充填

- 1) 组装层析柱。打开层析柱出口后，一边加进充填液，一边去除下部过滤器内残留着的空气。充填液要留存部分，大致高度为离层析柱底部 1cm 左右，以免空气进入。
- 2) 关闭层析柱出口，将悬浊液一次性注入层析柱内，这时要注意，不能让空气进入充填剂之间。
- 3) 打开层析柱出口，使充填剂沉降。充填剂沉降后，由于充填剂的沉降速度快，液面会变得透明。待离液面 2~3cm 的充填液都变透明后，关闭流出口。
- 4) 将充填液加满到层析柱上部，这时操作要十分小心，不能让已沉降的充填剂浮上来。
- 5) 在层析柱上设置上部适配器，这时要避免空气进入上部适配器和层析柱液面之间。闭合上部适配器的 O 型密封圈，降下上部适配器，排出上部适配器内的空气。
- 6) 将层析柱与泵连接，进行 30~60 分钟的充填液通液，使充填剂沉降。通过时的压力：ET clean S < 0.3MPa, ET clean L < 0.2 MPa

Note: 充填操作的线速要能保证充填时的层析柱内的压力 > 充填后的操作压。

- 7) 待充填剂的高度稳定后，停止通液。接着关闭层析柱出口。然后拆下层析柱上部入口的配管。慢慢将上部适配器降下到充填剂的表面。这时层析柱内的充填液会从层析柱入口倒流出来。
- 8) 在配管内充满液体的状态下在上部适配器上连接配管，这时要保证空气不进入，然后打开下部适配器的层析柱出口, 在进行通液。（通过时的压力：ET clean S <0.3MPa, ET clean L<0.2 MPa）如果通过该操作，充填剂被压缩，在上部适配器之间似乎出现间隙，就需要进行调节，降下上部适配器，使其与充填剂密切接触。
- 9) 从最终的层析柱高度来计算层析柱体积。如层析柱体积大于原来的计划数，要降下上部适配器来加以调节。而层析柱体积小于原来的计划数时，则有可能是注入层析柱之前的悬浊液浓度较低，或者是凝胶被过分压缩，因此需要抽出后再次充填。

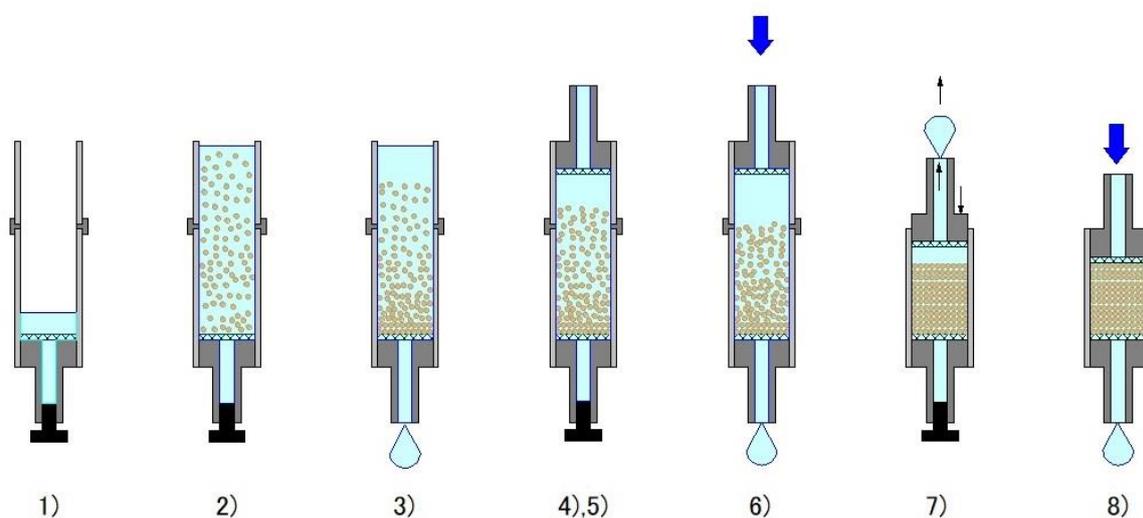


图 3 层析柱充填的步骤

### 充填状态的评价

层析柱充填效率如附录 1 所示，通过对 HETP、非对称性 (As) 的确认来进行评价。

### 清洗去除内毒素

- 1) 用 5 个柱体积的碱溶液洗涤 Cellufine ET clean。停止泵送，让其静置以下时间。

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

- 2) 用 5 个柱体积的无内毒素水清洗 Cellufine ET clean。在洗脱液达到中性后，测量洗脱液中的内毒素，以确认去除。
- 3) 用适当的 5 个柱体积的无内毒素缓冲液平衡色谱柱。使用 Cellufine ET Clean 可以很容易地制备低内毒素缓冲液。（见附录 3。）

## 操作指导

### 一般性的使用方法

- 1) 进行“清洗去除内毒素”。
- 2) 将溶解在吸附缓冲溶液中的试样载荷。
- 3) 收集洗脱液，测定内毒素含量和样品量。
- 4) 色谱柱使用“清洗去除内毒素”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。

## 推荐缓冲溶液

### 吸附缓冲溶液：

- 中性 pH, 0.01M-0.05M 磷酸钠缓冲液 + 0.1-0.4M NaCl
- 中性 pH, Tris-HCl 缓冲液 + 0.1-0.4M NaCl
- 只要样品稳定，内毒素水就足够可。

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。低 pI 的酸性蛋白质更有可能吸附在 ET clean 上。可以通过增加盐浓度、使用孔径较小的 ET Clean S 等方法减少蛋白质的吸附。（图 4）在 pH 值为 p I 左右时，蛋白质在 E T clean 上的吸附量往往较少。

Note: 去除内毒素的最佳条件可在附录 4 中测试。下面给出了目标蛋白 pI 和推荐的缓冲液和填料选择的例子。

蛋白的等电点 (pI)	吸附缓冲溶液	推荐 ET clean
4.0-6.5 (酸性蛋白质)	pH5-7、NaCl 0.1-0.4 M	ET clean S
7.0-10.5 (中性或碱性蛋白质)	pH7-9、NaCl 0.1-0.4 M	ET clean L

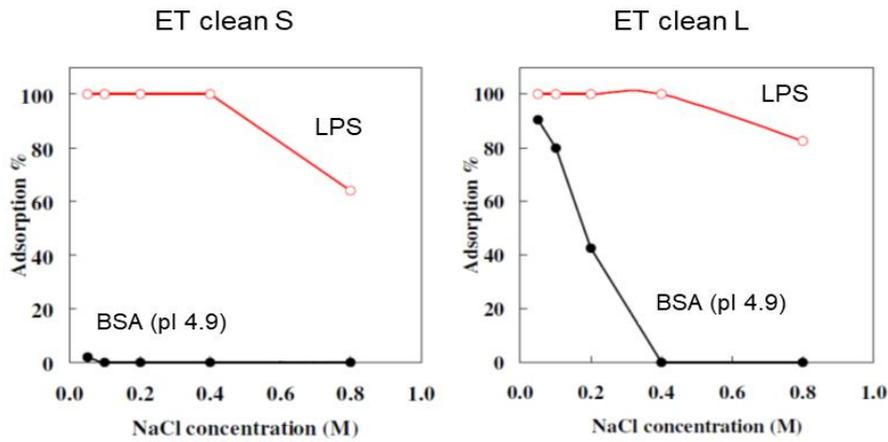


图4 盐浓度对BSA (Mw 66kDa) 吸附的影响。将2毫升样品溶液加入到0.2克湿填料中，分析上清液（批量法）。  
 (BSA:500 μg/ml, LPS:*E. coli* 0111:B4 100 ng/ml, pH 7.0 PB, NaCl:0.05-0.8M )

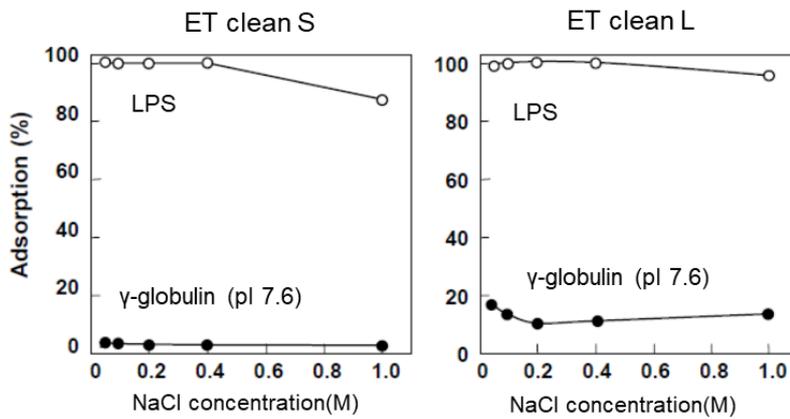


图5 盐浓度对γ-球蛋白 (Mw 160 kDa) 吸附的影响。将2毫升样品溶液加入到0.2毫升的湿填料中，分析上清液（批量法）。  
 (γ-球蛋白:500 μg/ml, LPS:*E. coli* UKT-B 100 EU/ml, pH 7.0 PB, NaCl:0.05-1.0M )

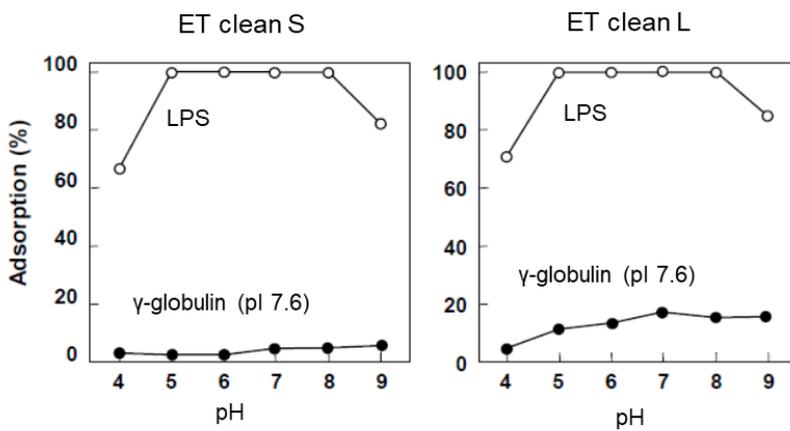


图6 pH值对内毒素 (LPS) 吸附的影响。将2毫升样品溶液加入0.2毫升的湿填料中，分析上清液（批量法）。  
 (γ-球蛋白:500 μg/ml, LPS:*E. coli* UKT-B 100 EU/ml, pH 4-9, 离子强度 μ:0.05)

**洗脱缓冲溶液：**在吸附缓冲溶液中加入 1~2 M 的 NaCl。随着盐浓度的增加进行梯度洗脱，最高可达约 0.5M (5~10 CV)。如果目标样品没有被洗脱则应进一步冲刷更高浓度的 NaCl，或改变缓冲液的 pH 值。

## 试样的准备和试样载荷

将试样溶解到吸附缓冲溶液中，浓度达到 1~20 mg/ml。  
不溶物用离心分离方式或过滤器加以去除。如有必要，也可以利用脱氯过滤器、透析以及 CellufineGH-25 等脱氯层析柱进行缓冲溶液交换。

## 推荐的操作流速

线速 10~50 cm/h

## 稳定性

推荐使用的 pH 范围为 2~13，使用温度为 4~25℃。不可高压蒸汽灭菌。可以进行五次回

## 推荐保存方法

请将未开封的产品在 2~8° C 下保存。请不要将其冻结。推荐在开封后的悬浊液及层析柱的状态下，置换成 20%乙醇，在 2~8℃ 下保存。

## 参考文献

- 1) Masayo Sakata, PhD, Yoshihisa Yamaguchi, Chuichi Hirayama, PhD, Ivars Bemberis, Masami Todokoro, PhD, Masashi Kunitake, PhD, Minoru Nakayama, BioPharm International, 2005, Volume 18, Issue 1

## 订货信息

产品名	容量	产品目录 No.
Cellufine ET clean L	5 x 1 mL (微型柱)	20051
	1 x 5 mL (微型柱)	20015
	10 mL	681 984 324
	50 mL	681 984 326
	500 mL	681 984 328
Cellufine ET clean S	5 x 1 mL (微型柱)	20151
	1 x 5 mL (微型柱)	20115
	10 mL	682 985 324

	50 mL	682 985 326
	500 mL	682 985 328

## 购买/技术支持

(北美)

JNC America Incorporated  
 555 Theodore Fremd Avenue, Suite C-206  
 Rye, NY 10580 USA  
 TEL: 914-921-5400  
 FAX: 914-921-8822  
 E-mail: cellufine@jncamericany.com

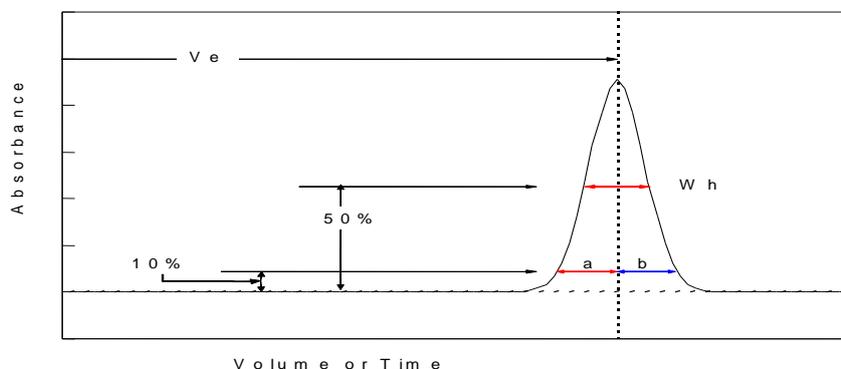
(日本、亚洲、其他)

J N C 株式会社  
 生命化学事业部  
 邮编 100-8105  
 东京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号  
 新大手町大厦 9 楼  
 Tel: +81-3-3243-6150  
 Fax: +81-3-3243-6219  
 E-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

### 附录 1: Cellufine 充填后的层析柱评价方法

评价层析柱的充填状态，使用理论级搭板数 (N)、相当于理论级数的高度 (HETP)、非对称性 (As) 等指标。这些评价指标会受测定条件的影响。比如，会因层析柱的直径/高度的不同、配管、溶媒试样量、流速、温度等的变化而变化。因此，需要每次使用同样的测定条件来进行层析柱充填后的评价，对同等性加以确认。评价时的流速推荐采用 30cm/h，但可以加快该速度。只是速度越快，理论级搭板数(N)有降低的倾向。为了评价层析柱，需要每次以相同条件（流速、层析柱尺寸、流动相、试样）进行测定。

参数	条件
试样载荷量	层析柱体积的 1 -2.5%的液量
试样组成	1-2 % (v/v) 丙酮 (流动相: 水及吸附缓冲溶液)
	1 M NaCl (流动相: 0.1-0.2M NaCl 溶液)
流速 (cm/h)	30 cm/h
检出器	吸光度 OD 280nm (丙酮时) 电气传导度 (NaCl 时)



L	层析柱高度 [cm or m]
$V_e$	溶出时间 (或溶出体积)
$W_h$	为峰值高度一半时的峰宽
a, b	高度为峰值高度的 10%时的: (a) 偏离中心的前半部的峰值宽度 (b) 偏离中心的后半部的峰值宽度
注意	单位应合并计算。

## 计算式

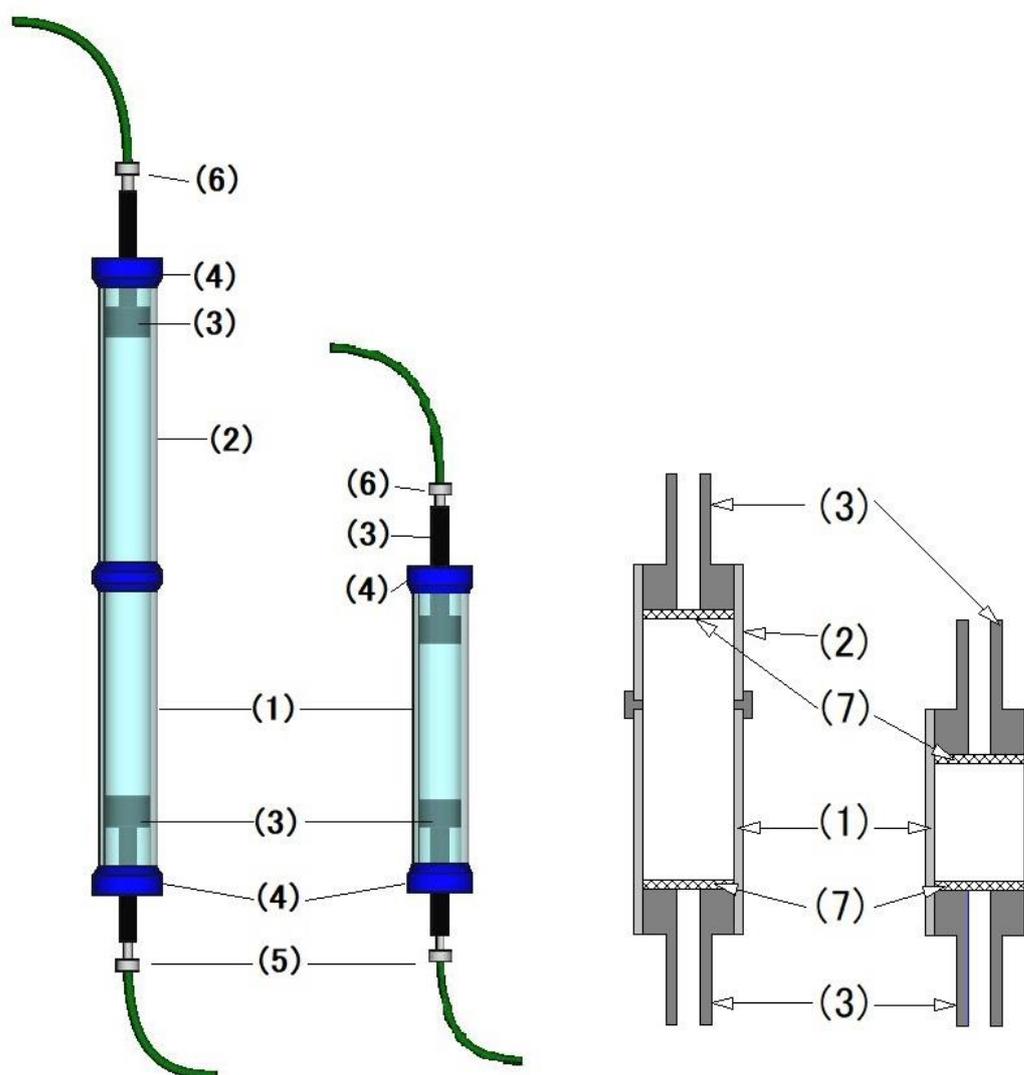
$$\text{HETP} = L/N$$

$$N = 5.54 \times (\text{Ve}/\text{Wh})^2$$

$$A_s = b/a$$

一般来说，理论级数超过 3,000N/m 即视为良好。另外， $A_s$  在 0.7~1.5 范围内，视为处于良好状态。

附录 2：普通的层析柱的图纸



本使用说明书用右示简单的层析柱截面图作了说明。

(1)	层析柱软管	(4)	层析柱端头
(2)	容器	(5)	层析柱出口
(3)	适配器	(6)	层析柱入口
(7)	过滤器 (FLITZ)		

### 附录 3：缓冲液中的内毒素去除。

ET Clean L 能轻松去除缓冲液中的内毒素。它比多粘菌素固定化填料或阴离子交换器 Cellufine A-500 更容易减少内毒素。

#### 材料

- 层析柱：用 ET Clean L 包装的柱子 (9mm I.D. x 100mm = 6.36mL)
- 泵：带硅胶管的蠕动泵
- 缓冲液：1M 磷酸钠缓冲液、pH 7.0 (加入标准的 2.6 EU/ml LPS)
- 干热灭菌的试管
- LAL 检测试剂盒：各公司的内毒素测量试剂

#### 预洗

进行“清洗去除内毒素 1)~2)”。

#### 方法

- 1) 流动缓冲液通过柱子。流速 30ml/h (滞留时间 12.8 分钟、线速 47cm/h)
- 2) 按柱体积收集洗脱液。
- 3) 使用 LAL 试剂分析洗脱液中的内毒素浓度。

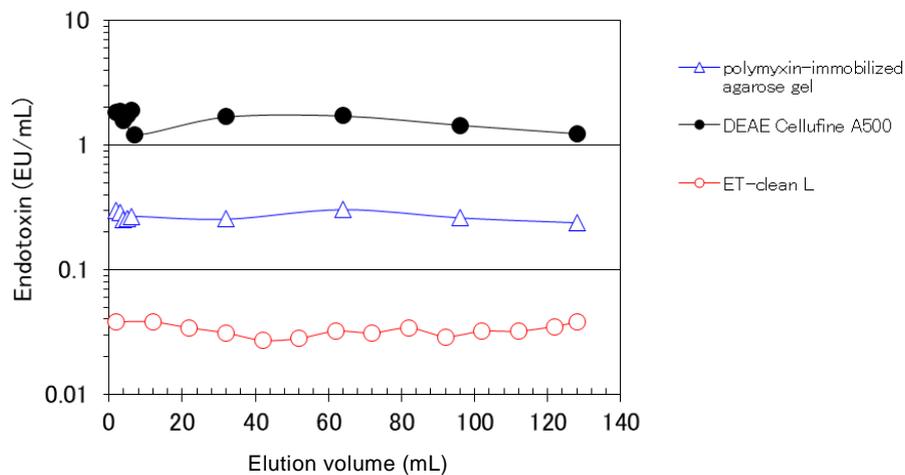


图 1. ET-clean L 和多粘菌素固定琼脂糖凝胶及 DEAE Cellufine A-500 对从 1M 磷酸盐缓冲液去除脂多糖能力的比较。

## 附录 4：去除内毒素的实验方法(批量处理)

### 材料

- 过滤装置：玻纤过滤器、吸引瓶
- 勺子：金属制成的
- 移液器：玻璃制成的
- 浸泡的容器：烧杯、玻璃瓶
- 储存容器：玻璃瓶、清除了内毒素的塑料容器
- 铝箔
- 三角瓶：10mL~20mL
- 一次性注射器：1~2.5mL
- 膜过滤器：注射器连接型，不含内毒素
- LAL 检测试剂盒：各公司的内毒素测量试剂
- 水：如果水是由超纯水生产设备制成的，则应检查内毒素是否足够低。（无内毒素的水= pyrogen Free 水= PF 水）注射用水不受内毒素污染。

### 方法

#### 从仪器中去除内毒素

- 1) 玻璃器皿应洗净并擦干。开口用铝箔覆盖，并在 250°C/3 小时的干热下进行灭菌。
- 2) 金属物品应被清洗和干燥。用铝箔覆盖，在 250°C/3 小时内干热灭菌。
- 3) 将铝箔切成 5 厘米见方，放在玻璃或金属培养皿中，在 250°C/3 小时内干热灭菌。

#### 吸附剂中的内毒素去除

- 1) 搅拌瓶中的 ETclean，使之成为浆液。在一个玻璃过滤器中放入适量，用吸力过滤。用水清洗，直到防腐剂的 20%乙醇消失，用吸力过滤。
- 2) 在实验室超纯水中制备 0.2mol/L NaOH/20% EtOH。
- 3) 将 0.2 mol/L NaOH/20% EtOH 加入到冲洗过的玻璃过滤器上的 ETclean 中，直到完全浸入。用药匙轻轻搅拌，用吸力过滤。进行这种碱性洗涤三次。
- 4) 通过抽吸过滤去除碱性溶液，直到出口处只剩下很少或没有液体。将 ETclean 置于烧杯或旋盖瓶中。以两倍的体积加入 0.2mol/L NaOH/20% EtOH，在 4°C 至 25°C 下放置过夜（约 3 小时或更长时间）。
- 5) 用 0.2 mol/L NaOH 20% EtOH 在干热灭菌的玻璃过滤器上进行过滤洗涤（3 次）。用不含内毒素的水清洗，直到中性。应使用 pH 试纸或 pH 计检查中性，目标是 pH 值为 8 或以下。工作区应该是一个干净的工作台或其他没有掉落细菌的环境。

- 6) 用吸附缓冲液清洗 ETclean。通过过滤洗涤进行平衡，直到滤液的 pH 值与缓冲液的 pH 值相同。
- 7) 测量滤液中的内毒素以确认无内毒素状态。在最后的过滤过程中，继续抽吸 10 到 15 分钟，将滤液排出来。湿重是在这种状态下对填料进行称重，当时的重量以 g-wet 表示。
- 8) 无内毒素的填料应立即称重并用于批量实验，或转移到干热灭菌的容器中并密封保存。为了长期保存，加入 PF 水和平衡缓冲液，密封保存（4℃左右）。

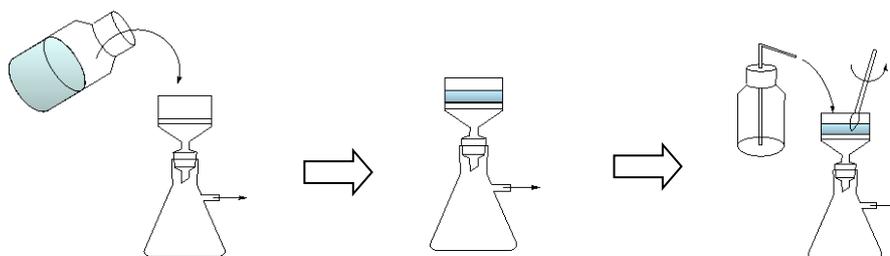


图 1 清洁和过滤

### 吸附实验

改变盐浓度，测量吸附的蛋白质和内毒素的数量，以设定最佳的盐浓度。

- 1) 称取 0.2 克无内毒素的 ETclean 到一个 10-20 毫升的三角瓶中。
- 2) 加入 2mL 在表 1 中准备的样品。
- 3) 用塞子或无菌铝箔盖住口子，并进行搅拌。搅拌时间通常为 2 小时，温度为 25℃，但如果试样热不稳定，可以在较低的温度下进行。

表 1 试样系列的例子（试样稀释度为 75%）。※见 Note

最终盐浓度	试样	4M NaCl	无内毒素的水
mol/L	mL	mL	mL
0.00	1.5	0.000	0.50
0.05	1.5	0.025	0.48
0.10	1.5	0.050	0.45
0.20	1.5	0.100	0.40
0.30	1.5	0.150	0.35
0.40	1.5	0.200	0.30
0.50	1.5	0.250	0.25
0.60	1.5	0.300	0.20
0.70	1.5	0.350	0.15
0.80	1.5	0.400	0.10
0.90	1.5	0.450	0.05
1.00	1.5	0.500	0.00

4) 用注射用的注射器吸出液体。吸出的液体通过附在注射器上的薄膜过滤器过滤。首先对滤液进行内毒素的定量，剩余的滤液用于蛋白质的定量。

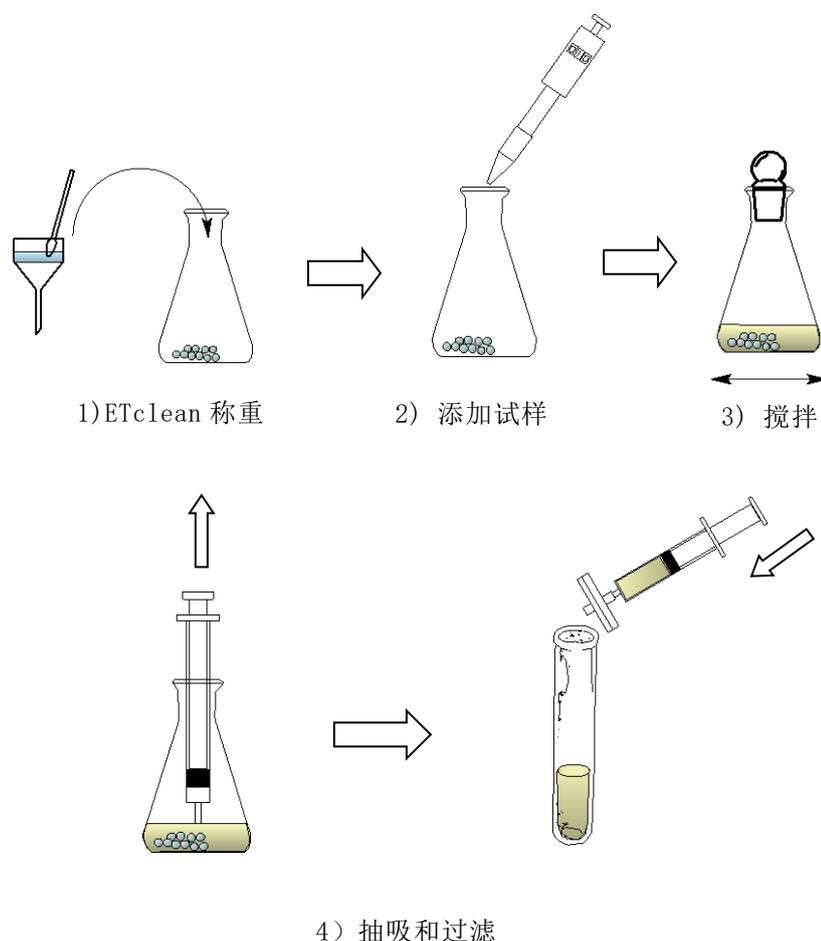


图 2 批量方法的操作

## Note

- 只有在温度充分冷却后，才能取出干热灭菌的器械。
- 操作时要戴上防护眼镜（建议戴护目镜），因为 NaOH 溶液如果进入眼睛可能会导致失明。
- 如果将 20% 的 EtOH 改为 95% 的 EtOH，成为无内毒素的离开时间至少为 1 小时。
- 对于空白试样，加入 0.2mL 无内毒素的水，而不是 ETclean，其他操作方法相同。
- 表 1 中的最终盐浓度没有考虑到溶解样品的缓冲溶液的盐浓度（离子强度）。提前准备好样品的缓冲溶液的浓度为 0.01-0.05mol/L。
- 为了制作 100 毫升 4mol/L 的氯化钠，称量 23.4 克氯化钠，用无内毒素的水制作 100 毫升。为了制备内毒素浓度较低的样品，将 23.4 克氯化钠称量到 100 毫升内螺纹烧瓶中，在 250℃ 下干热灭菌 3 小时后，溶解在 100 毫升无内毒素的水中。

- 为了进行有效的搅拌，旋转式或旋转式的搅拌是有效的。涂有特氟隆的转子在 250°C 干热灭菌 3 小时后，也可用于磁力搅拌器。
- 蛋白质浓度由 280nm 处的吸光度和各种比色法确定。如果 2mL 的测试液不足以测量活性等，则将表 1 中的液体体积增加一倍。在这种情况下，应以同样的方式增加 ET clean 的容量。
- 在本实验中，测试溶液体积 ET clean 体积的比例设定为 10 倍，但可根据内毒素浓度进行相应改变。
- 如果要研究 pH 值的影响，请使用用无内毒素的水洗过的 ET clean。样品应事先在相应 pH 值的缓冲液中准备好。

## 附录 5: 去除内毒素的实验方法 (柱法)

## 例 1

将含有内毒素的牛血清白蛋白 (BSA : 等电点 4.9) 溶液泵入一个 1 毫升的柱子。将洗脱液收集在试管中, 测定内毒素和 BSA 水平。BSA 是一种酸性蛋白质, 等电点很低, 但在缓冲液中加入 NaCl 后, 减少了对色谱柱的吸附, 结果是几乎 100% 的回收, 没有吸附到 ET 清洁。另一方面, 内毒素被 ET Clean 吸附并降低到 1/1000 的浓度。内毒素被选择性地吸附在 ET clean 上, 从而得到了低内毒素的 BSA 溶液。

## 材料

- 层析柱: 用 ET Clean L 包装的柱子 (11mm I.D. × 10mm ⇒ 1mL)
- 泵
- 缓冲液 : pH7.0 50 mM 磷酸钠缓冲液+ 0.15M NaCl
- 干热灭菌的试管
- 试样: 含有 100 EU/mL 内毒素的 BSA 1 mg/mL 溶液 (150mL)

## 预洗

进行“清洗去除内毒素”。

## 流速

0.17mL/min (线速 10cm/h)

## 分析

- BSA 浓度: Abs. 280 nm
- 内毒素浓度: LAL 检测试剂盒

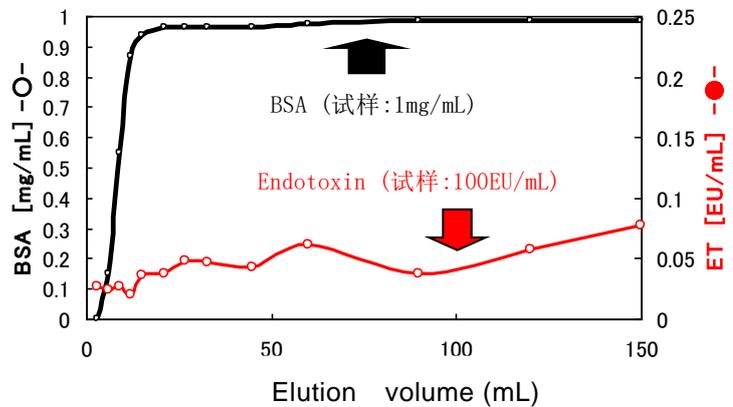


图 1 从 BSA 溶液中去除内毒素 (柱法)。

## 例 2

将含有内毒素的溶菌酶（Lysozyme 等电点：11）溶液泵入一个 9.6 毫升的柱子。用吸附缓冲液清洗后，用 NaCl 进行梯度洗脱。将洗脱液收集在试管中，测定内毒素和溶菌酶水平。溶菌酶在 ET Clean 上没有被吸附，并被回收，而内毒素在 ET Clean 上被吸附，并通过 NaCl 浓度增加的梯度洗脱而被回收。内毒素被选择性地吸附在 ET Clean 上，从而得到了低内毒素的溶菌酶溶液。

## 材料

- 层析柱：用 ET Clean L 包装的柱子（9 mm I.D. × 100 mm ⇒ 9.6 mL）
- 泵
- 吸附缓冲液：1 mM Tris-HCl, pH7.3
- 洗脱缓冲液：1 mM Tris-HCl pH7.3 + 1.0 M NaCl
- 干热灭菌的试管
- 试样：14 mg/mL 溶菌酶溶液 (1 mL, 含有内毒素)

## 预洗

进行“清洗去除内毒素”。

## 流速

0.5 mL/min（线速 47 cm/h）

## 分析

- BSA 浓度：Abs. 280 nm
- 内毒素浓度：LAL 检测试剂盒

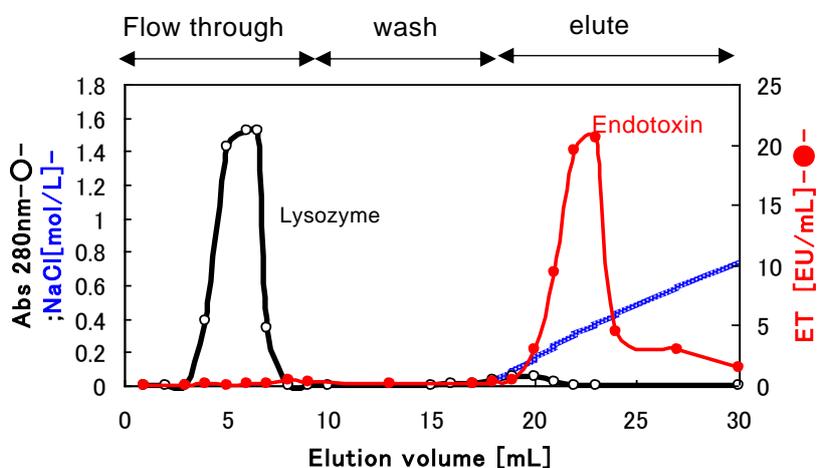


图 2 从溶菌酶溶液中去掉内毒素（柱法）。