JNC CORPORATION

操作说明

微型柱 Cellufine ET clean S 与 L

1. 简介

微型柱 Cellufine ET clean，在生理 pH、0 - 25℃、离子浓度为 0.02 - 1.0 摩尔/升时，可从细胞产品溶液中去除内毒素。微型柱 Cellufine ET clean L 与 S 是一种用于去除内毒素的易用预装层析柱。预装有 Cellufine ET clean L 与 S 介质，由球形、刚性纤维素珠体固定多聚赖氨酸（ε-赖氨酸）组成。聚赖氨酸（ε-赖氨酸）基于与阳离子配体基团和纤维素球体上疏水性位点的混合模式相互作用，使介质具有独特的色谱选择性。Cellufine ET clean 在含有 0.2M 氢氧化钠与 2M 氯化钠的洗涤液中表现稳定。

聚赖氨酸（ε-赖氨酸）是一种含有 30-35 个由白斑链霉菌产生的赖氨酸残基的微生物聚氨基酸。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。

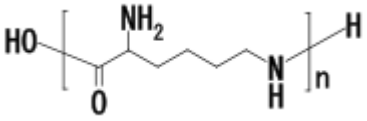

图 1. 聚赖氨酸(ε -赖氨酸)结构

2.特征

ET clean 分为两类，ET clean L 孔径大，能在 10pg /ml 水平下清除内毒素。在低盐浓度溶液中，易吸附酸性蛋白。ET clean S 孔径小，可提供 99%的蛋白质回收。能去除内毒素 10-80 pg/ml，其性能取决于样品。（图 2, 表 1)

名称	孔径（排阻限）
Cellufine ET clean S	2000
Cellufine ET clean L	≥2×10⁶

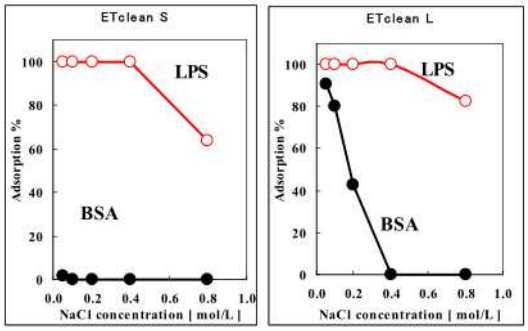

图 2. Cellufine ET clean 选择性吸附牛血清白蛋白(BSA)溶液中的内毒素。

取用 0.2 g 湿珠和 2 ml 样品溶液，采用分批法测定内毒素的选择性吸附。 (BSA: 500 µg/ml, 大肠杆菌(*E.coli O111*): B4 LPS: 100 ng/ml, pH 7.0, NaCl 0.05 - 0.8 mol/l)

表 1. Cellufine ET clean 从蛋白液中选择性除去内毒素

蛋白质	pI	处理前	ET clean S		ET clean L	
			处理后			
		内毒素 pg/mL	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。

1 endotoxin unit (EU) ＝250pg LPS

层析柱

Cellufine 微型柱由聚丙烯管和超高分子量聚乙烯筛板制成。该类柱采用 10-32UNF 螺纹连接 1/16 英寸外径管，可以与色谱系统连接。

表 2. 微型柱 Cellufine ET clean 特征

柱体积	1 毫升与 5 毫升
柱规格（内径×长）	6.7 毫米×30 毫米(1 毫升) 14.6 毫米×30 毫米(5 毫升)
配基	聚赖氨酸(ε -赖氨酸)
金属交换容量	Zn^{2+}；22-30 微摩尔/毫升 Cu^{2+} ； 35-45 微摩尔/毫升
粒径	约 40-130 微米
珠体基质	球形纤维素
压力范围	0.4 MPa (4 巴)
建议流速	0.1 - 1.0 毫升/分钟(1 毫升) 0.1 - 5.0 毫升/分钟(5 毫升)
pH 稳性	2-14
化学稳定性	0.2 M 氢氧化钠/20 - 95%乙醇
存储	20%乙醇，置于阴凉处

3. 操作指南

常规操作

（1）用 5-10 毫升纯水洗净防腐剂

（2）用含 0.2 mol NaOH 的 95%乙醇 5-10ml 洗涤使 ET 再生，静置 3 小时。（注意：ET clean 在每次使用前都必须重新再生）

（3）用 5 - 10ml 无热原缓冲液或水清洗再生溶液。
（4）用吸附缓冲液平衡色谱柱
（5）上样（样品应调整到吸附缓冲液的组成）
（6）收集流穿峰。如果需要，可用高离子强度缓冲液帮助进行洗脱。
（7）重复第 1、2 和 3 步，以再生 ET clean。

建议缓冲液

吸附缓冲液：0.01 - 0.05 M 磷酸钠、Tris-HCl，含 0.1 - 0.4 M NaCl，中性 pH。根据应用情况，还可以使用其他缓冲离子。一般来说，吸附强度与 pH 值和离子强度成反比。稍微提高离子强度有助于蛋白质的选择性洗脱。

洗脱缓冲液：如果样品被吸附在 ET clean 上，则可以增加缓冲液的离子强度来洗脱样品。在吸附缓冲液中加入 1-2M 氯化钠，通过梯度洗脱将盐浓度增加到约 0.5M，进行洗脱。

再生缓冲液：

0.2 M NaOH, 95% (v/v) 乙醇：需要放置一个小时。
0.2 M NaOH, 20% (v/v) 乙醇：需要放置 3-5 小时
0.2 M NaOH：需要放置过夜或 16 小时

样品制备

通过离心法或微滤法去除不溶性物质。如有必要，可使用透析、渗滤或脱盐层析（如 Cellufine GH-25）交换样品缓冲液。在吸附缓冲液中制备浓度为 1-20 毫克/毫升的样品。

4. 纯化流程

（1）用吸附缓冲液填充泵管或注射器出口。打开入口塞（层析柱的顶端），将色谱柱与泵管或注射器连接，“滴入缓冲液”，避免空气进入柱内。
（2）打开出口塞（层析柱的末端）
（3）洗净防腐剂，并用 10 柱体积的吸附缓冲液平衡色谱柱。
（4）使用注射器或将样品泵入柱中。
（5）用 5-10 柱体积的吸附缓冲液洗涤。
（6）用 5-10 柱体积的洗脱缓冲液洗提。

5.按比例增加

两个或三个 Cellufine ET clean 微型柱可以串联。

6.存储

用 5-10 柱体积 20%乙醇清洗色谱柱。用 20%乙醇将色谱柱贮存于阴凉处。
注意：为防止泄漏，必须确保末端塞紧。

7.参考

Cellufine ET clean 由熊本大学与 JNC Corporation 联合开发。
1) M. Sakata, M. Todokoro, C. Hirayama, American Biotechnol. Lab., 20 (2002) 36.
2) M. Todokoro, M. Sakata, S. Matama, M. Kunitake, J. Ohkuma, C. Hirayama, J. Liq. Chrom. & Rel. Technol., 25 (2002) 601.
3) Ivars Bemberis, Masayo Sakata, Chuichi Hirayama et al. BioPharm International, January 2005 pp 50-51
(www.biopharminternational.com)

8.更多信息

查阅更多信息请登录：
https://www.jnc-corp.co.jp/fine/en/cellufine/

9.订购信息

产品	数量	产品编号
微型柱 Cellufine ET clean L, 1 毫升	5×1 毫升	20051
微型柱 Cellufine ET clean S, 1 毫升	5×1 毫升	20151
微型柱 Cellufine ET clean L, 5 毫升	1×5 毫升	20015
微型柱 Cellufine ET clean S, 5 毫升	1×5 毫升	20115
微型柱 Cellufine ET clean S	10 毫升	681984324
Cellufine GH-25	100 毫升	670000327
微型柱 Cellufine GH-25	5×5 毫升	19711-55

10.联系我们

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
https://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/