

蛋白层析纯化系统

FPLC: 快速蛋白液相色谱 (Fast protein liquid chromatography)

一、操作流程:

(一) 开始层析实验前的准备

注意: 紫外灯: 如果只是平衡层析柱, 关闭紫外灯。UPC-900面板旋钮逆时针旋转, 进入 Lamp (on), 点击 OK, 通过旋钮选择 ON 或 OFF。一般在上样前15min 打开紫外灯。

1、检测系统管路中是否有气泡。若有小气泡, 可以使用 pump wash, 以大流速冲走气泡; 若有大气泡, 需要用注射器手动排气。

2、打开 FPLC 的电源, 系统立即进行自检

3、打开电脑电源

4、双击 unicon 5.11图标, 进入系统窗口。ÅKTA 层析软件有四个窗口: UNICORN Main Menu、Method Editor、System Control、Evaluation。如使用程序运行, 在 Method Editor 窗口里编方法设置各种参数; 如使用手工运行, 在 System Control 窗口里设置各种参数。

(1) 清洗及管路准备: System Control 设置参数

Pump→Pump Wash 选择要冲洗的泵 (Pump A 和 Pump B) →Execute, 冲洗完成后系统自动停止, 之后可进行报警压力的设置: Alarms & Mon→Alarm_Pressure→HighAlarm, 设置最高报警压力 (柱压力加0.2MPa) →Execute

(2) 安装层析柱

设置较小的流速 Pump→Flow 0.5mL/min。将层析柱接入系统: 样品阀1号为的连接管有液体滴出时, 将层析柱上端堵头去掉, 把连接管插入, 注意不要拧紧; 打开下端堵头, 与 UV 检测器上的接头连接, 再把上端接头拧紧。(拆层析柱时, 先把连接 UV 检测器端的接头拧开, 堵上堵头, 在把上方连接去掉。)

(3) 在 Method Edit 窗口中进行方法编辑 (也可参照下一部分进行手动运行)



进入 Method Edit 窗口, 点击“新建方法” 。New Method→Use 中选择 Method Editor→OK→Parameters: Base (用于确定各个命令的开始点), 可选择 Time、Volume 和 CV (柱体积), 现在按体积 Volume 来确定命令开始点→Insert

Alarm & Mon→Alarm_Pressure→HighAlarm (柱压力加0.2MPa) →Insert

Pump→Flow: 1 mL/min→Insert

以上设置的命令都是在0 mL 的 breakpoint 时进行的, 之后在 Breakpoint 中输入需要插入新命令的点 (可以是时间、体积或柱体积, 这里以体积为例): 5 mL, 以及需要执行的命令: Flowpath→Injection Valve: Inject→Insert, 以此类推, 将需要执行的命令插入到相应段点中。

Alarm & Mon→Auto ZeroUV→Insert



Breakpoint: 5.5 mL, Flowpath→Inject Valve: load→Insert



Breakpoint: 7 mL, Pump→Gradient: Target 100%B, Length (到达 Target

的体积): 10 mL→Insert, Frac→Fractionation: FracSize: 1 mL→Insert

↓

Breakpoint: 19 mL, Others→End-Method→Insert

↓

保存方法: 输入 Method Name 和 Technique (纯化类型)

运行保存的方法: 进入 System Control 窗口, File→Run, 选定方法, 显示运行提示→START。之后只需将样品注入样品环, 放好收集管, 系统自动完成。

(二) 手动运行开始层析实验

1、平衡层析柱: System Control 设置参数

Manual→Pump→Flow: 1 mL/min→Insert

Alarm & Mon→Alarm_Pressure→Mode: Enabled, HighAlarm (柱压力加0.2MPa)
→Insert

Other→Record On

↓

Execute, 平衡层析柱

2、上样

(1) 用 loop 上样:

正向上样: 先用缓冲液冲洗上样环 (用注射器将缓冲液注入上样环)。将样品吸进注射器, 退掉气泡, 从 injection valve 的3号位推入 (进样量不得低于样品环体积的2倍), 推好后不要取下注射器。

↓

柱子平衡后, 将紫外曲线调零。Alarm & Mon→Auto ZeroUV→Insert

Manual→Flowpath→Inject→Insert

↓

Execute, 上样环中的样品加入层析柱。之后, 设置梯度进行洗脱。

(2) 用泵上样

点击 pause (load 状态), 将 A1放入样品中, 点击 countinue, 待样品上完后, 再将 A1放入到平衡液中继续清洗柱子。**注意: 样品必须经过0.22μm 的滤膜过滤。**

(3) 洗脱

Pump→Gradient→Target 100%B, Length 10 min→Insert

设置分组收集器参数。Frac→Fractionation900→FracSize: 1→Insert,

↓

Execute 样品开始洗脱

注意: 样品采集方式可以采用“固定体积收集和峰收集加固定体积收集”两种方式

✓ 固定体积收集

Fractionation 900→Frac Size 需要收集的每管体积 ml→Execute 开始收集

Fractionation Stop 900→Execute 停止收集

当管位上无管子时也停止

✓ 峰收集加固定体积收集

Peak FracParameters UV→Level 设定 UV 收集峰值→Execute (此时没有开始收集)

Peak Fractionation 900→PeakSize 设定收集每管体积→Execute 当 UV>设定值时, 开始收集

Peak FracStop 900→Execute 停止收集

(三) 实验结束后系统维护

1、实验过程中有液体泼洒到设备表面，需要及时用湿抹布擦拭干净

2、实验结束后清洗泵及卸下层析柱

(1)层析柱反方向接入系统(可选择使用),将缓冲液进口管 A1和 B1入口放入1M(或0.5M) NaOH 中,流速0.1ml/min (load 模式),走1—2个柱体体积的流量(冲洗30min),使穿透峰洗回基线,用去离子水冲洗 A1和 B1入口后放入纯水中,再用纯水走一遍,清洗干净,之后用20%乙醇走一遍。系统给柱子一个慢流速0.5-1ml/min,然后先拆柱子的下端,正在滴水的时候将堵头拧上(不要拧紧),再拆柱子的上端,拧上上端的堵头,最后把下堵头拧紧。整个过程防止气泡进入。**注意:亲和层析柱不能用 NaOH 洗。**

(2)启用 pump wash 功能,用20%乙醇冲洗 A 泵、B 泵及管路。**注意: pump wash 不能冲洗紫外流动池,必须在 load 模式震清洗紫外流动池**

(4)清洗 loop 环:用注射器注入20%乙醇

(3)关机:仔细检查完毕,确信用过的所有管道都已经充满20%乙醇后,退出 ÄKTA 层析软件各窗口,脱出 UNICORN 软件,关闭电脑

9.关闭系统电源

二、注意事项:

技术指标注意事项:

1. 报警压力参数设置:所有程序运行和手动运行中,必须首先设定报警压力(使用预装柱,编程时由软件自动设定)。压力值参阅层析柱及填料说明书,取较小的一个最大耐受压力。我们实验室的层析柱如 XK16/70Superdex75、200、DEAE-FF 等柱子的报警压力均为 0.3MPa。Sephacryl-200、Sephacryl-300的报警压力为0.2MPa。

2.紫外灯:如果只是平衡层析柱,关闭紫外灯。FPLC 通过 FPLC 系统主机关闭; Purifier 通过软件 lamp off 关闭。一般在上样前15min 打开紫外灯。

3.层析柱的连接:层析柱是玻璃的,一定要轻拿轻放。

层析柱特别是凝胶过滤柱不能有气泡进入,将柱子接入系统时,可在柱子一端接带有液体的注射器,用手推,将气泡排出,同时,给系统一定流速,保证没有气泡的情况下将柱子连入系统。如果有问题,请找管理人员。

4.缓冲液及样品:所有溶液须经过滤和脱气,缓冲液现用现抽滤,以保护系统和层析柱。已经抽滤过的溶液长时间放置后,使用前必须再重新抽滤。

如果是室温纯化,从冰箱拿出的缓冲液温度升到室温后再用,防止温差产生气泡进入系统和层析柱。

所有样品须经过滤,以保护层析柱。少量样品必须经过离心,取上清,不得带入颗粒性和不溶性物质。

5.ÄKTA 系统的日常维护:

紫外灯:紫外灯的使用是有一定的寿命的,所以平时清洗系统及平衡层析柱时,请关闭紫外灯。ÄKTA FPLC 的紫外灯只有单波长280nm 和254nm,一般用280nm。ÄKTA purifier 100的紫外灯可在190nm-700nm 间任选三波长,但是对于已知蛋白一般选用280nm 关闭其他两个波长足够了,这样可减少摩擦,保护仪器。

pH 电极:小心处理 pH 电极。每天使用完后从流路中取出保存在电极保护液中。切记不可保存在水中或长时间留在流路中。

在线过滤器(On-line Filter):如果在没接层析柱时,系统仍有一定压力,若限压器(Flow Restrictor FR-902, FR-904)没有接在流路中,(可能影响低压柱的报警设置),应检查在位过滤器中的滤膜是否堵塞。

检查方法:拧松过滤器进口接头,若压力恢复正常,则可确认滤膜堵塞。

更换:拧开在位过滤器,取出滤膜。滤膜可以清洗后再用,若效果仍不理想,则需更换。

系统泵：每天结束时，系统可以装满缓冲液过夜；如果系统在次日使用其他缓冲液，先用抽滤过的 **MiliQ 水洗**，再用所用**缓冲液冲洗**。如果有几天不使用，用水流动通道。拆下柱子和酸度计，连接系统，然后用**20%乙醇洗系统**，并保存在**20%乙醇**中。确保所有的管和流动通道经过冲洗。

泵和系统清洗：**使用前：依次用水，缓冲液；使用后：依次用水，20%乙醇**。系统管路包括上样环全部保存在**20%乙醇溶液**中。

入口筛网：它有一定的过滤作用和防止丝状和颗粒性进入系统的作用，使用时不能私自拆除入口筛网。

三、仪器使用注意事项：

- 1.经培训后考核合格的人员才能独立上机使用 ÄKTA 层析系统，并严格按操作规程使用仪器。其他人员应在管理人员的指导下进行操作，否则造成仪器损坏、影响机器运行和层析柱性能的人员，要酌情严肃处理。
- 2.所有使用 ÄKTA 层析系统的人员请提前一天预约，并认真填写使用预约登记表。
- 3.实验完成后，请认真填写使用记录，记录内容应完整、规范。并经管理人员验收，确认仪器、层析柱等是否完好。
- 4.实验完成后，请大家一定要及时清理自己所用物品，打扫卫生，包括擦洗仪器、桌面、地面等。
- 5.实验完成后，对于两次以上不及时清理自己所用物品的人员，暂停使用仪器。
- 6.使用前、后请认真阅读《ÄKTA 层析系统的保护》，检测是否做到了以上几点。
- 7.为了使大家的实验顺利进行，请严格按照规定进行