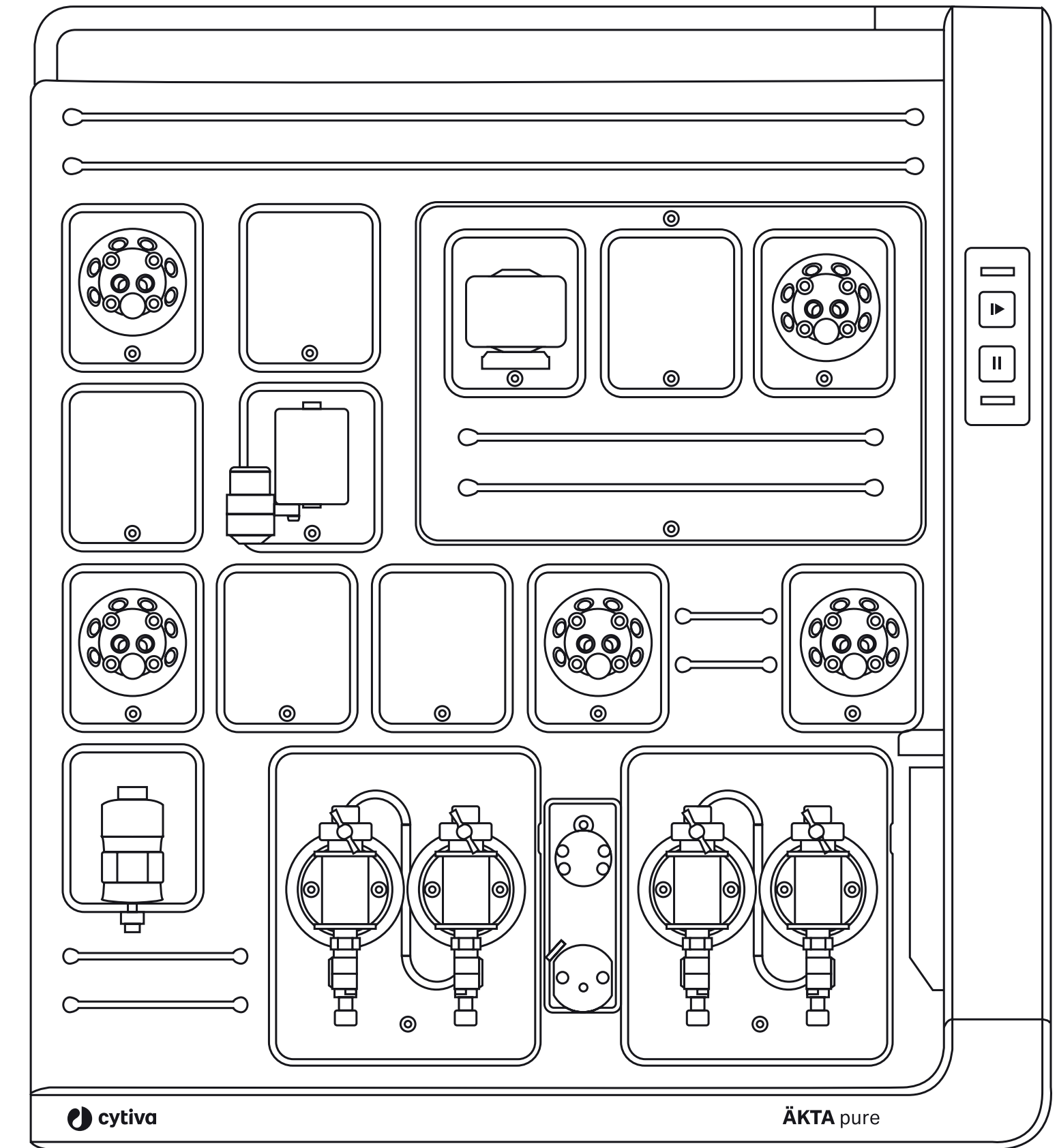


仪器管理手册

# ÄKTA™ 实验室规模 层析系统



# 目录

|    |                  |    |    |                      |    |                    |    |
|----|------------------|----|----|----------------------|----|--------------------|----|
| 01 | 介绍               | 4  | 07 | 系统压力                 | 36 | 附录 2               |    |
|    | 常见缩略词            | 5  |    | 背压影响                 | 37 | 管路指南               | 68 |
|    | • 层析术语           | 6  |    | 管路对背压的影响             | 38 | 管路材料和尺寸            | 68 |
|    | • 标志             | 5  |    | 压力报警                 | 38 | 内部体积               | 70 |
| 02 | 液相层析系统和重要的注意事项   | 7  |    | 压力监测                 | 39 | 背压                 | 70 |
|    | 章节概述             | 9  |    | 背压对层析柱和填充床的影响        | 40 |                    |    |
| 03 | 系统体积对分辨率和组分收集的影响 | 12 |    | 限流器的功能               | 41 | 附录 3               |    |
|    | 管路尺寸影响分辨率        | 13 |    | 限流器的去除               | 42 | 延迟体积的测定            | 71 |
|    | 在紫外监测器后的峰展宽      | 14 |    | 高背压故障排除              | 43 | 理论测定 ( 首选方法 )      | 71 |
|    | 系统体积注意事项         | 15 |    | 粘稠样品和溶液              | 43 | 实验方法               | 72 |
|    | 样品体积对分辨率的影响      | 16 |    | 控压上样                 | 44 |                    |    |
| 04 | 如何选择上样的方式        | 17 | 08 | 样品的监测和监测器            | 45 | 附录 4               |    |
|    | 样品环              | 18 |    | 监测紫外 / 可见光吸收率        | 46 | 层析柱常见疑难解答          | 74 |
|    | Superloop™       | 20 |    | 监测电导率                | 49 |                    |    |
|    | 自动进样器            | 23 |    | 监测 pH                | 50 | 附录 5               |    |
|    | 使用泵上样            | 24 |    | 其他监测器                | 50 | 组分收集器常见疑难解答        | 75 |
| 05 | 液体输送和泵           | 26 | 09 | 组分收集                 | 51 |                    |    |
|    | 调节泵以获得准确的液体输送    | 27 |    | 直接组分收集和峰组分收集         | 52 | 附录 6               |    |
|    | 泵和冲洗系统的介绍        | 29 |    | 组分收集延迟体积             | 53 | 实验室规模的 ÄKTA 系统的介绍  | 78 |
|    | 保护层析柱的空气传感器      | 31 |    | 无溢出组分收集              | 53 | 升级 ÄKTA 系统平台       | 80 |
| 06 | 梯度的形成和混合器        | 32 | 10 | 系统组件的清洗和保存           | 54 |                    |    |
|    | 选择混合器大小          | 33 |    | 清洗系统                 | 55 | 附录 7               |    |
|    | 电导率干扰            | 34 |    | 系统保存                 | 56 | 不同纯化技术的原理和标准条件     | 81 |
|    | 梯度延迟体积           | 34 |    | 清洗建议                 | 57 | 亲和层析 (AC)          | 81 |
|    |                  |    |    |                      |    | 固定化金属离子亲和层析 (IMAC) | 83 |
|    |                  |    |    |                      |    | 体积排阻层析 (SEC)       | 85 |
|    |                  |    |    |                      |    | 离子交换层析 (IEX)       | 87 |
|    |                  |    |    |                      |    | 疏水作用层析 (HIC)       | 90 |
|    |                  |    |    |                      |    | 反相层析 (RPC)         | 92 |
|    |                  |    |    |                      |    | 聚焦层析 (CF)          | 93 |
|    |                  |    |    | 附录                   | 59 |                    |    |
|    |                  |    |    | 附录 1                 |    |                    |    |
|    |                  |    |    | 实验室规模的 ÄKTA 系统中的系统组件 | 60 |                    |    |

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| <b>附录 8</b>           |            |
| <b>用于 ÄKTA 系统的层析柱</b> | <b>94</b>  |
| 预装层析柱                 | 94         |
| 空柱                    | 96         |
| <b>附录 9</b>           |            |
| <b>耐化学腐蚀性指南</b>       | <b>100</b> |
| 化学品清单                 | 101        |
| 液体接触材料                | 104        |
| <b>相关文献</b>           | <b>105</b> |
| <b>订购信息</b>           | <b>106</b> |

# Cytiva 提供的原理和方法手册

Cytiva 提供一系列的手册，涉及有关实验室常用方法的实用技巧和深入信息。

请访问 [cytiva.com/handbooks](https://www.cytiva.com/handbooks) 查看完整列表并立即下载。



01

# 介绍



# 介绍

ÄKTA™ 实验室规模层析系统手册重点介绍用于研究实验室规模蛋白质纯化的液相层析系统。初学者可以使用本手册了解纯化系统的基本工作原理以及获得成功结果的重要注意事项。有经验的系统用户也将发现关于不同硬件模块的宝贵和详细的信息。

当重复性结果十分重要以及当手动纯化变得太耗时和低效时应该使用层析系统。因为层析系统相比手动纯化具有自动控制流速，监测纯化过程，控制梯度和自动收集组分的功能。层析系统不仅能够进行自动化简单的阶段梯度洗脱，而且可以进行准确控制的线性洗脱达到高分辨率的分离。

本手册介绍了 ÄKTA 层析系统的不同方面，例如系统峰展宽对分辨率的影响、进样技术和混合器的选择。它还提供一些建议，例如如何排除泵中的气泡，如何解决较高背压的问题，以及如何进行系统组件的清洗。

附录包含不同的 ÄKTA 实验室规模系统和层析柱的概述以及对于特定的系统如何测定准确延迟体积的信息。

## 标志

 这个标志表示关于如何改进过程的一般性建议或在特定情况下的推荐措施

 这个标志表示要特别小心。

## 常用缩略语和简称

|                  |                               |
|------------------|-------------------------------|
| A <sub>280</sub> | 在特定波长的吸光值，在这个例子中为 280 nm      |
| AC               | 亲和层析                          |
| CF               | 聚焦层析                          |
| CIP              | 在位清洗                          |
| CV               | 柱体积                           |
| DS               | 脱盐 ( 通过凝胶过滤的组分离；缓冲液置换 )       |
| FPLC             | 快速蛋白液相层析                      |
| GF               | 凝胶过滤 ( 有时候也称为 SEC；尺寸排阻层析 )    |
| HIC              | 疏水作用层析                        |
| i.d.             | 内径                            |
| IMAC             | 固定化金属亲和层析                     |
| IEX              | 离子交换层析 ( 在文献中也见为 IEC )        |
| mAU              | 毫吸光值单位                        |
| MPa              | 兆帕；压力单位                       |
| mPas             | 粘度单位 ( 1 mPas = 1 cP，即 1 厘帕 ) |
| o.d.             | 外径                            |
| PM               | 预防性维护                         |
| RPC              | 反相层析                          |
| R <sub>s</sub>   | 分辨率，两个峰之间的分离程度                |
| s                | 秒                             |
| SEC              | 尺寸排阻层析 ( 与凝胶过滤相同 )            |
| UV/Vis           | 紫外 / 可见光                      |

# 层析术语

## 背压

由系统流路中的层析柱或系统组件引起的压力。

## 层析图

监测器响应值的图形展示。

## 层析

源于希腊字 chroma、color 和 graphein。

## 层析填料

固定相，也称为树脂。层析填料通常由多孔基体（基质）组成。基质通常是通过耦联能够结合待分离分子的配体而被赋予功能。

## CIP ( 在位清洗 )

用于清洗层析柱和/或系统的常用术语，目的是去除不想要的 /非特异结合的物质。

## 层析柱

通常指装有层析填料的柱状硬件。

## 层析柱硬件

层析柱管和适配器。除了层析柱填料/填充床外的所有层析柱部件。

## 层析柱硬件压力

层析过程中层析柱的内部压力。层析柱硬件压力太高可能会导致层析柱破裂。

## 脱气

溶解的空气从缓冲液/溶液中的去除。

## 延迟体积

对应于一部分系统的体积。收集延迟体积是监测器和收集器之间的管路和系统组件的体积。梯度延迟体积（也称为滞留体积）与两种溶液混合的点和层析柱之间的体积有关。

## 柱效

测量的理论塔板数。高柱效意味着将获得尖峰。

## 流量

流过层析柱和/或层析系统。以 ml/min 表示。

## 流速

流量除以层析柱的截面积。以 cm/h 表示。

## 内嵌

作为流路的一部分的组件。

## 介质

与层析填料相同。

## 峰展宽

当穿过层析柱或层析系统时溶质（例如蛋白质）区域的变宽。导致溶质的稀释和降低分辨率。也称为带展宽或区域展宽。

## 填充床上的压力

当溶液穿过层析柱时跨越填充床的压降。由填充床中的流动阻力引起。

## 分辨率

填充柱分离两种溶质（峰）的能力的测量。

## 选择性

两种溶质在层析柱中相对保留的测量。与两个峰之间的距离有关。

## 系统体积

在填充层析床外的所有管路和系统组件的总体积。（有时候是指系统死体积）。

02

# 液相层析系统和 重要的注意事项



# 液相层析系统和重要的注意事项

使用自动化蛋白质纯化系统可以衍生出许多优点。这样的系统：

- 确保更多的可控条件和可重复的结果
- 在运行过程中自动纯化蛋白，无需用户干预
- 可以更有效地纯化敏感的蛋白
- 可以使用高分辨率填料
- 提供在线检测，有助于作出决策，例如层析柱何时平衡，何时收集组分等。
- 可以以小的或大的体积自动收集纯化的蛋白
- 用户软件易于创建方法、监测运行和评估结果

蛋白质分离发生在层析柱中。通过系统泵提供缓冲液和其他液体，并可以以不同的方法上样（例如使用注射器充满样品环或使用样品泵）。监测器（例如紫外/可见光、电导率、pH）被放在层析柱后以监测分离过程。纯化的蛋白被收集在组分收集器中。图 2.1 显示了一个典型的系统流程图。

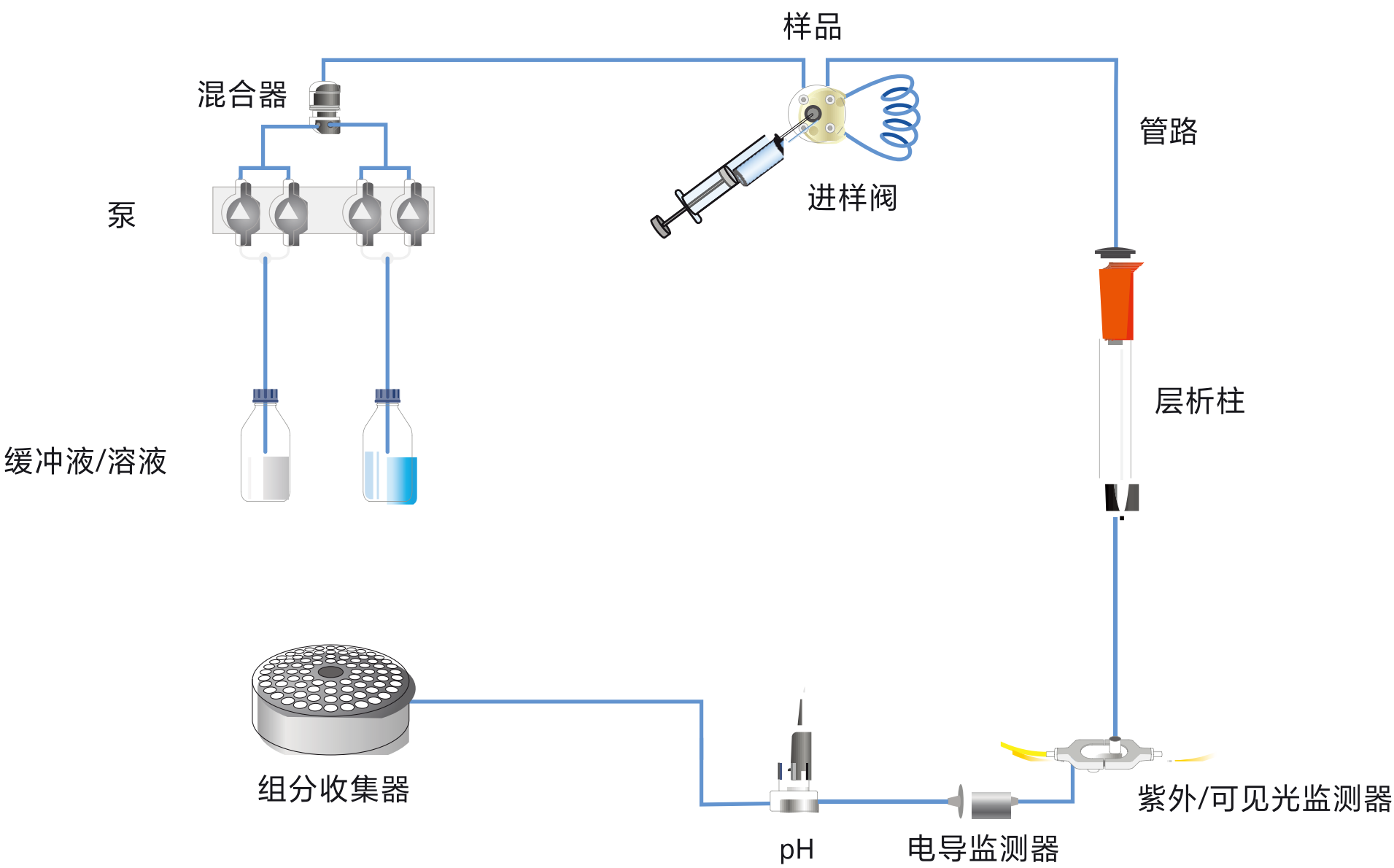


图 2.1. 典型的层析系统流路图。

# 章节概述

本节提供第 3 章到第 10 章的简要介绍。

## 峰展宽和分辨率

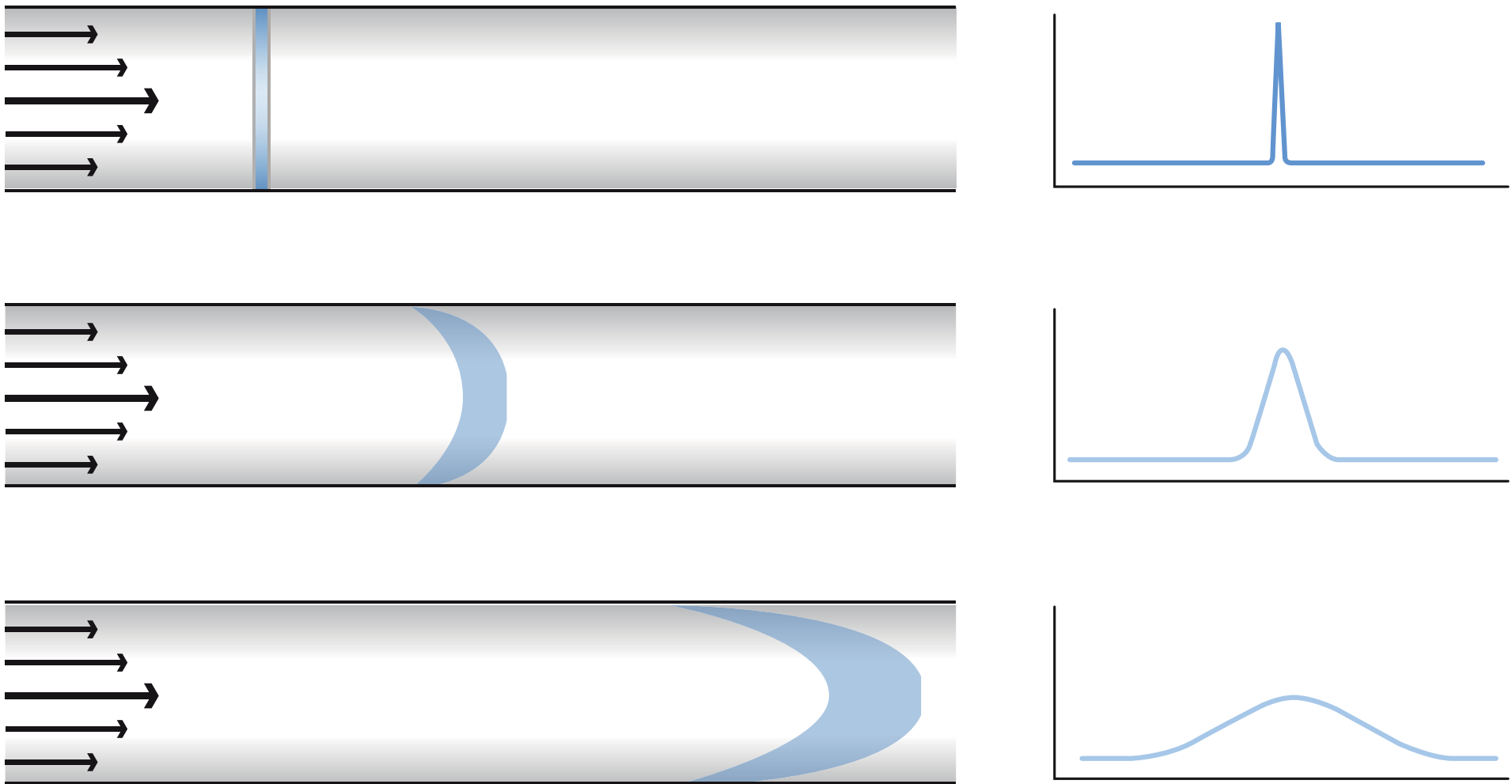
为了获得纯的产物，优化系统流路十分重要，确保系统匹配柱效。差的匹配如系统体积太大会导致峰展宽，从而使分辨率和蛋白质纯度降低 ( 图 2.2 )。管路太窄可能导致层析柱硬件的背压太高。第 3 章-系统体积对分辨率和组分收集的影响中介绍了更多关于如何避免这些问题的信息。

## 样品上样

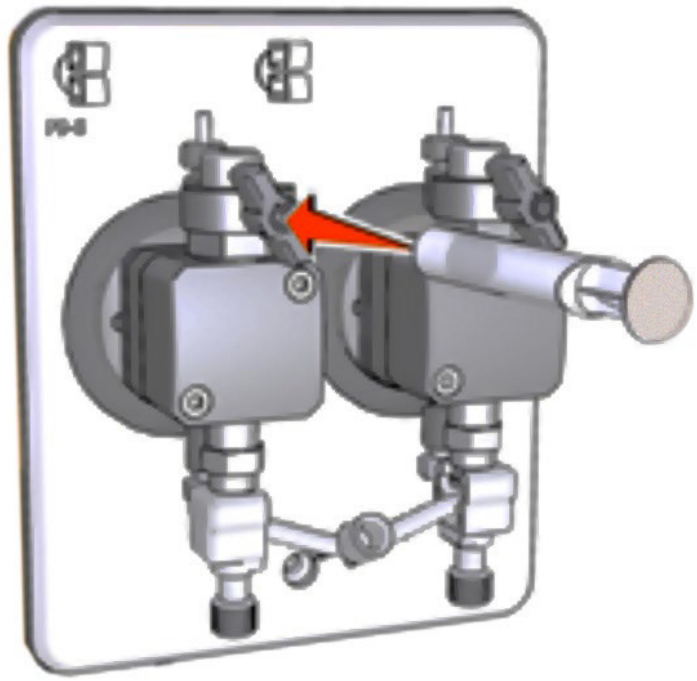
通常使用预先充满的样品环或泵将样品上样到层析柱。第 4 章-如何选择进样技术中介绍了更多不同的技术和何时使用它们。

## 液体输送

泵的性能对于确保可靠和重复的结果十分重要。失败层析的一个普遍原因是泵中有气泡，这能使液体输送时产生脉冲，导致不正确的流速。这种影响可以在压力曲线的波动中被观察到。第 5 章-液体输送和泵中介绍了如何以正确的方式调节泵。也可以见图 2.3。



**图 2.2.** 管路中的峰展宽。液体在管路中间比靠近管壁流动更快。一个蛋白峰通过管路越远，则它变得越宽，正如右边的层析图所示。



**图 2.3.** 通过使用注射器从除气阀吸取液体以去除气泡。图中显示了 ÄKTA avant™ 25 的泵头。



缓冲液混合

混合器在系统中具有两个重要功能。第一是在使用两种或更多种液体建立梯度时提供均匀的混合。第二是平复来自泵的脉冲效应。系统提供的混合器将覆盖系统流速范围内的大部分应用，但是在有些情况下，可能有必要切换到不同体积的混合器以获得最佳结果。关于本主题的更多信息见第 6 章 - 梯度形成和混合器。也参见图 2.4。

压力

用于获得高分辨率的高性能填料需要配合能够在高压下操作的高性能的泵。通常，这种泵能够产生高于层析柱硬件和填料可以耐受的压力。因此，监测系统压力十分重要，以便使压力不超过层析柱上限。第 7 章 - 层析柱压力中可以读到更多信息。

监测器

使用不同的监测器追踪纯化过程。对于蛋白质检测，通常使用多波长吸收监测器。大多数蛋白质可以通过测量 280 nm 的紫外吸光值进行检测，但是其他波长也可以被用于收集额外的信息（见图 2.5 示例）。电导率监测器被用于追踪层析柱平衡和盐梯度形成。对于一些应用，监测 pH 也十分重要。更多信息见第 8 章 - 样品监测和监测器。

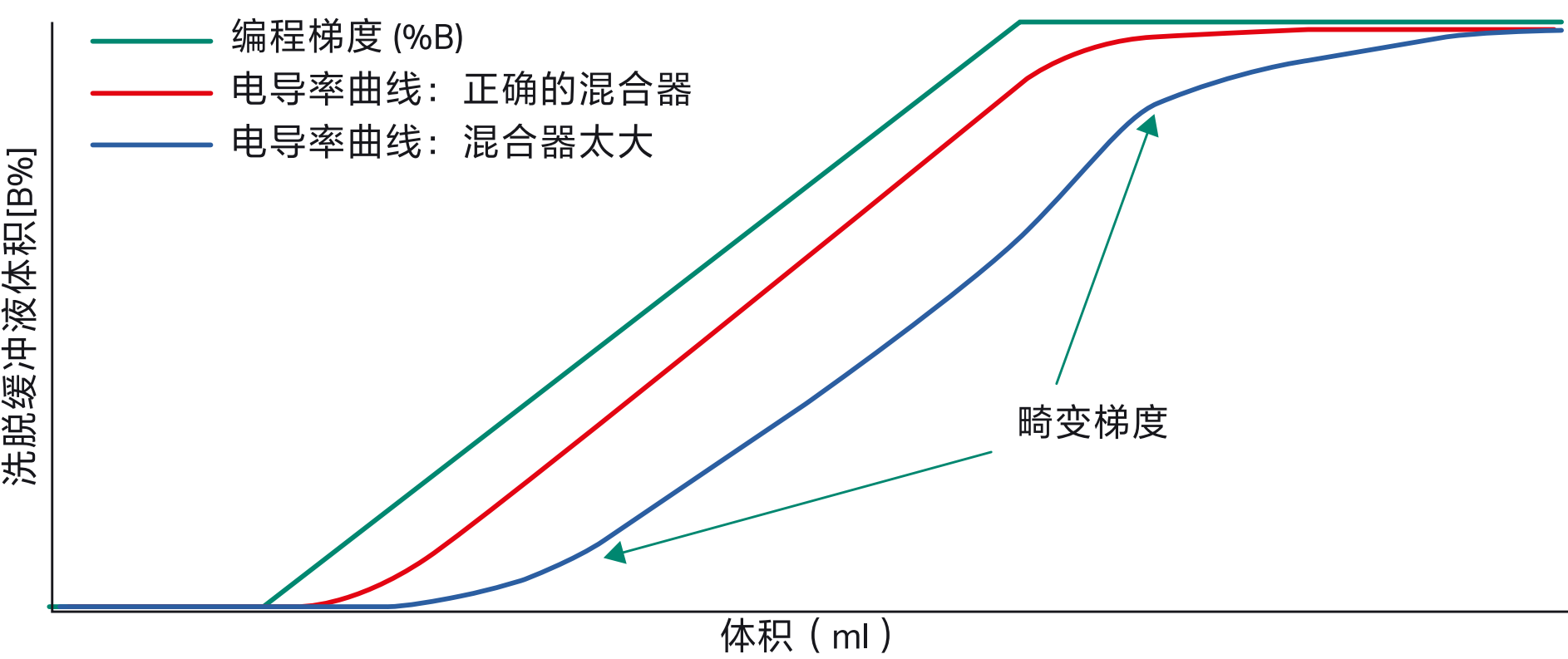


图 2.4. 在配有过大混合器的系统中，实际梯度将不同于编程梯度。

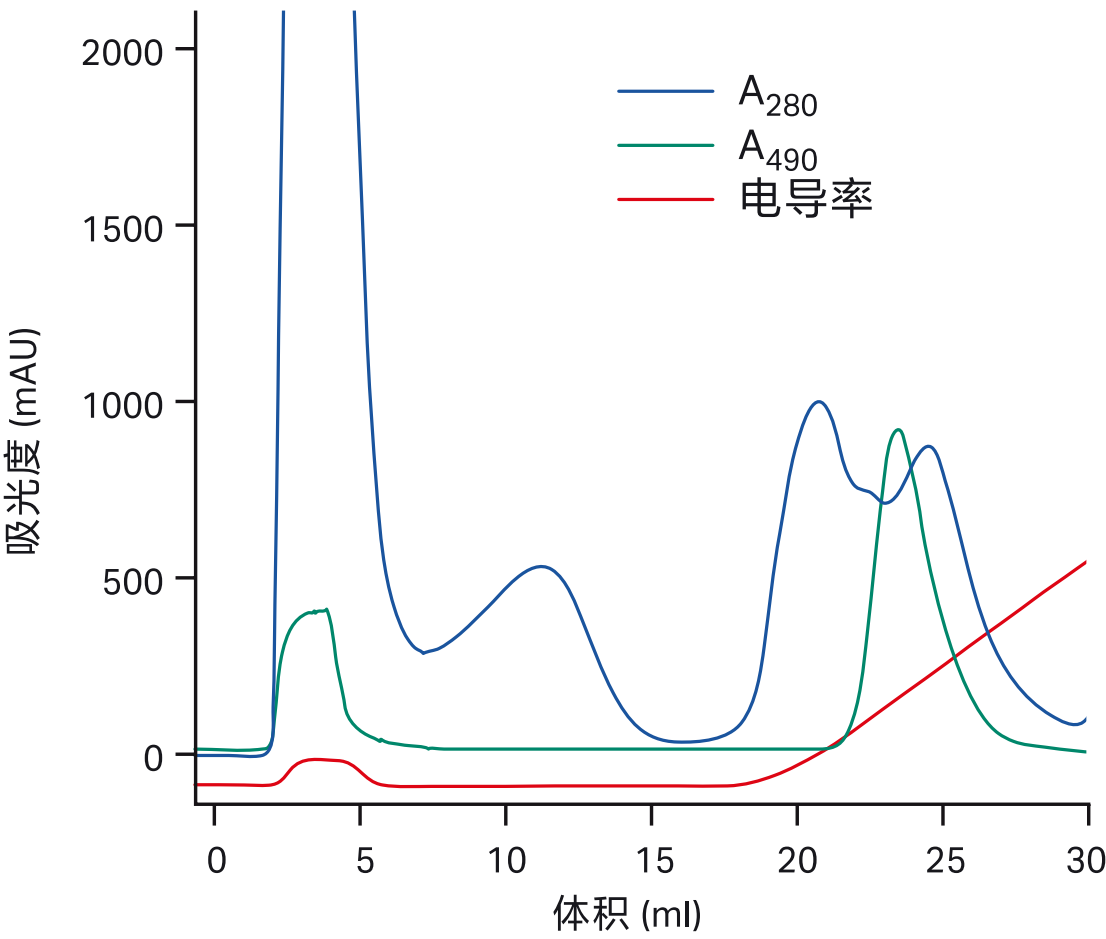


图 2.5. 绿色荧光蛋白 (GFP) 在 490 nm 的特异检测。

## 组分收集

制备型纯化要求纯化的蛋白可以被组分收集。洗脱的物质通过收集器或出口阀收集。关于控制蛋白峰收集的不同方法以及成功收集蛋白的重要参数的信息见第 9 章 - 组分收集。也见图 2.6。

## 系统清洗

为了保证系统的长期性能，定期维护十分重要。当有一段时间不使用系统时，正确地储存系统十分重要。第 10 章 - 系统组件的清洗和保存介绍了如何正确地清洗系统的不同组件。为了尽可能减少可能损坏密封的盐沉淀风险，应避免长期将系统组件暴露于高盐浓度下。

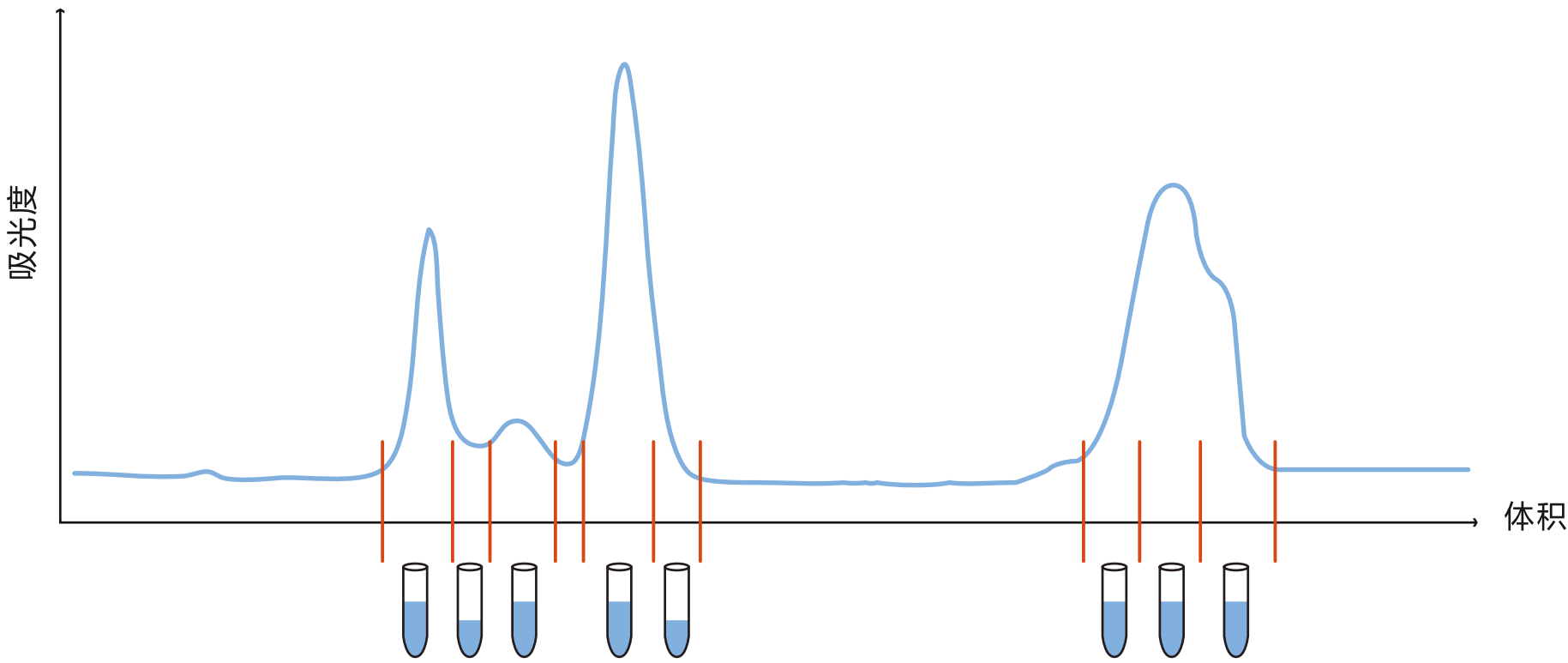


图 2.6. 在此运行期间，“峰收集”被用于收集洗脱的蛋白。

03

# 系统体积对分辨率和组分收集的影响



# 系统体积对分辨率和组分收集的影响

本章介绍了系统的内部体积如何影响液体传输和蛋白质纯化结果。

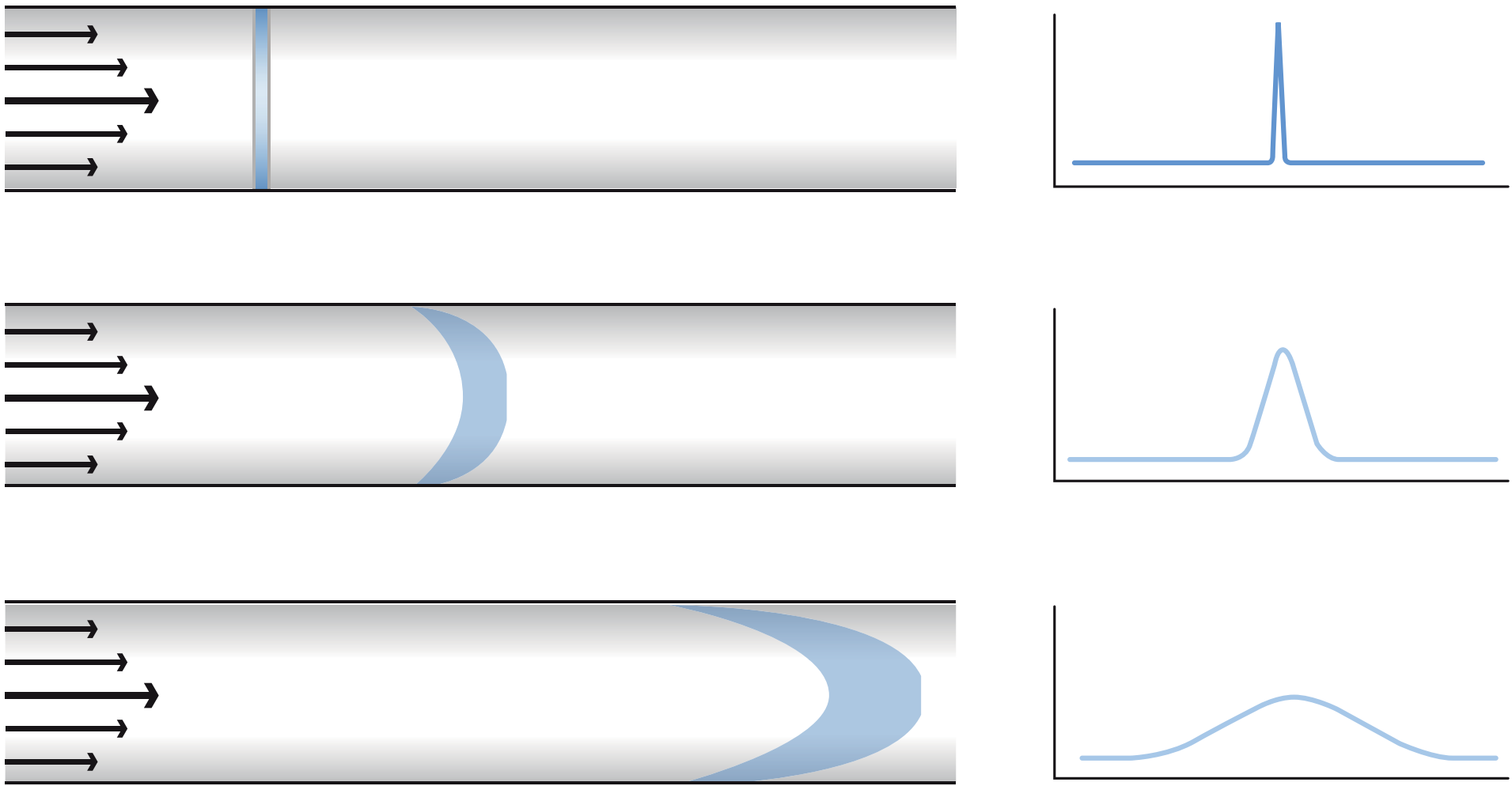
蛋白质层析的主要应用是分析蛋白质样品或者是制备纯的蛋白，有时候也被称为制备型纯化。为了获得这两种应用的成功结果，高分辨率通常十分重要。通过使用既具有高选择性又具有高柱效的层析填料获得高分辨率。高选择性保证蛋白质结合到填料上。高柱效意味着蛋白质峰是窄的，并且在它们之间可以实现良好的分离。

分析型层析系统通常处理小的样品体积。为了尽可能减少样品稀释和损失，分析系统中的组件应该具有小的内部体积，并允许使用高分辨率的填料。

在制备型层析中，使用分辨率适当的层析填料和层析柱十分重要。保持层析柱和收集器之间的距离足够短可以避免稀释分离后的蛋白。纯化小量蛋白时为了避免由于稀释效应引起的蛋白损失也十分重要。

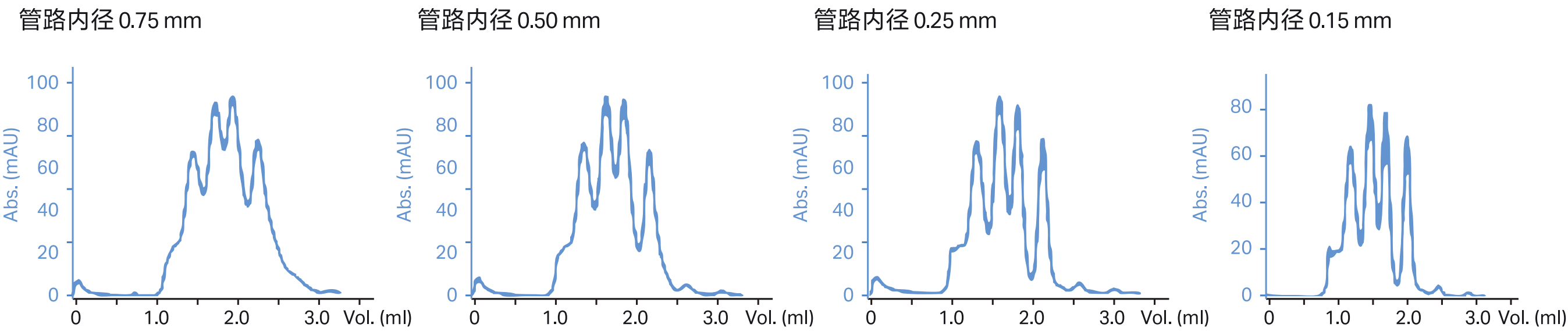
## 管路尺寸影响分辨率

系统中的所有组件（例如流动池、阀门等）都必须通过管路以某种方式互相连接。多余的管路将导致不必要的峰展宽，即，分离的蛋白被稀释，分辨率（获得的纯度）将被降低。峰展宽是由于管路中间的流速比靠近管壁的流速高导致。结果为穿过系统的蛋白峰随着它通过管路时变宽，如图 3.1 所示。



**图 3.1.** 管路中蛋白峰展宽的示意图。液体在管路中间的流速比靠近管壁的流速更快。一个蛋白峰通过管路越远，峰变得越宽，如右侧的层析图所示。

为了获得最佳纯化结果，找出纯化装置的最佳管路参数十分重要。图 3.2 显示一个示例，在此示例中使用不同内径 (i.d.) 的管路分析样品。在这里，当内径从 0.75 mm 缩小到 0.25 mm 时分辨率最受影响。进一步降低管路直径将不会对分辨率有大的影响。同时，系统中的背压将随着管路直径的降低而增加。这必须加以考虑。



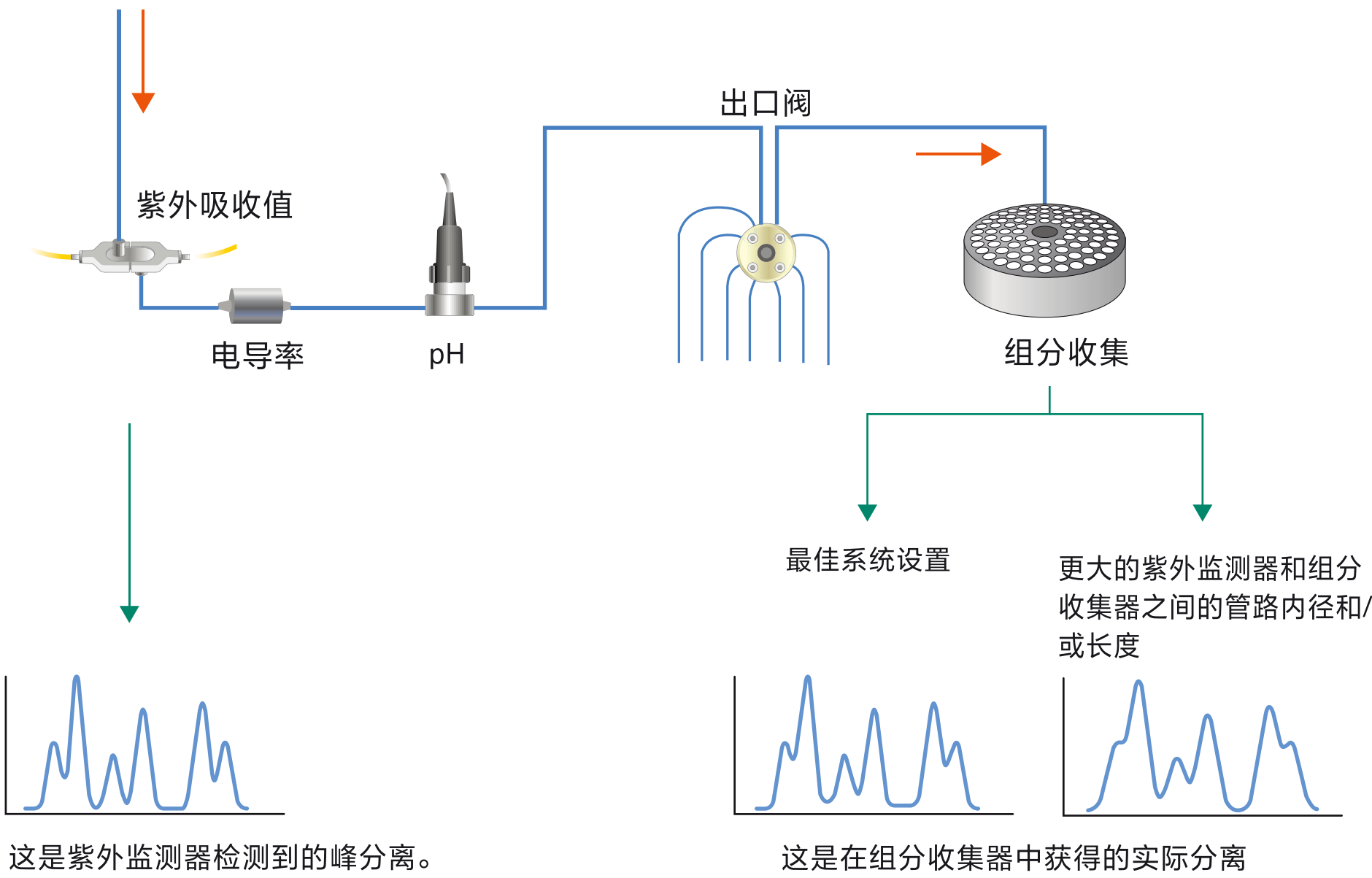
**Fig 3.2.** 分辨率随着管路直径降低而增加。层析柱：Superdex™ 200 5/150 GL(CVt 3 ml)。流速 0.3 ml/min。

## 在紫外监测器后的峰展宽

在一个给定的层析图中，紫外吸收曲线显示蛋白质通过紫外监测器时的纯化结果。在紫外监测器和组分收集器之间发生了什么在层析图上是不显示的。这种“隐藏”效应有时候是显著的，特别是对于高分辨率层析柱。图 3.3 显示了使用较大内径和/或较长管路从而增加系统体积的影响。增加系统体积的后果是层析柱中获得的高分辨率可能随着蛋白峰向收集器流动而被破坏。

 在紫外监测器和组分收集器之间使用尽可能短的管路。

在为高性能分离而设计的系统中，推荐使用窄而短的管路以保持低的峰展宽。缺点是窄的管路将增加背压。在第 7 章-系统压力中可以了解更多关于该内容的信息。需要管路长度和内径的一个最佳组合以实现所需要的分辨率，同时保持背压在所使用层析柱的压力范围内。



**图 3.3.** 如果在紫外监测器和组分收集器之间使用的管路太长或内径较大，则出现“隐藏的”系统作用的结果。

# 系统体积注意事项

对于一个给定的层析系统，峰展宽取决于层析填料的颗粒大小和层析柱尺寸。粒径小的填料和内径窄的层析柱产生窄的峰 ( 高性能层析柱 )，而颗粒大的填料和内径宽的层析柱产生宽的峰。

系统体积能够显著影响窄峰的峰展宽，但是对宽的峰几乎没有作用。如图 3.4 所示，对于较小的峰，系统对分辨率的影响将大得多。

重要的是要知道系统对峰宽度的影响是非线性的，如图 3.5 所示。此图显示了一个具有 0.5 mm 内径管路的典型实验室规模系统的影响。在这个例子中，系统对于大于 3 到 4 ml 的峰几乎没有影响。另一方面，如果峰小于 1 ml，系统的影响则变得显著。

除了管路直径外，峰展宽也受到管路长度、阀门和流动池尺寸的影响。因此，确定待使用的层析柱是否适用于系统十分重要。不要运行比系统推荐的更小的层析柱 ( 见相关文献中的选择指南 )。如果需要较小的层析柱，考虑通过修改系统以尽可能减少系统体积，例如，通过改变管路内径和/或从流路中排除组件以尽可能减小系统体积。

👉 如果要更改那些影响系统体积的硬件，请记住要在软件中更新相应的延迟体积。( 更多信息请参阅第 9 章和附录 3 )。

## 峰体积

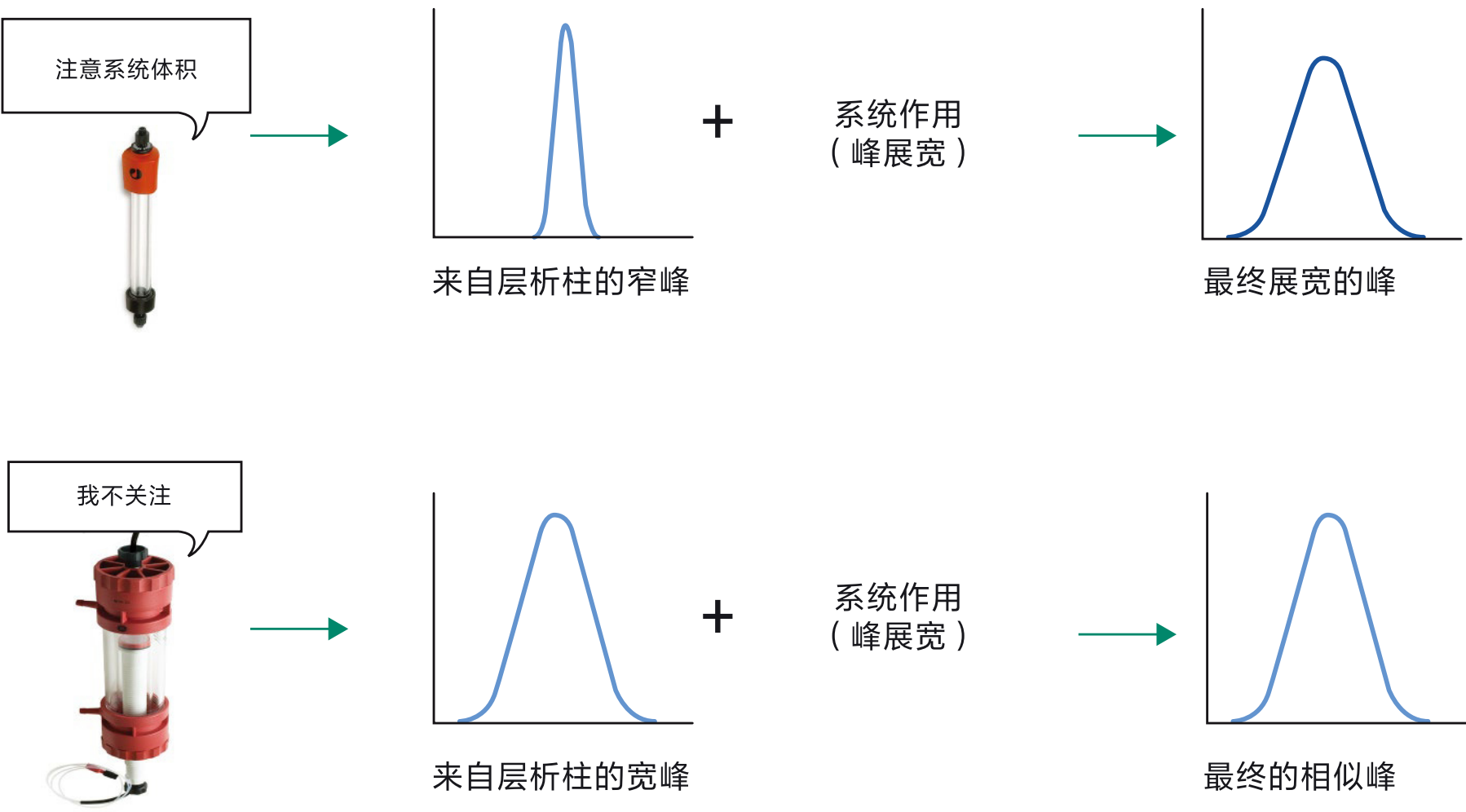


图 3.4. 较小的峰比较大的峰更容易受影响 ( 两种情况下均处于相同的系统 )。

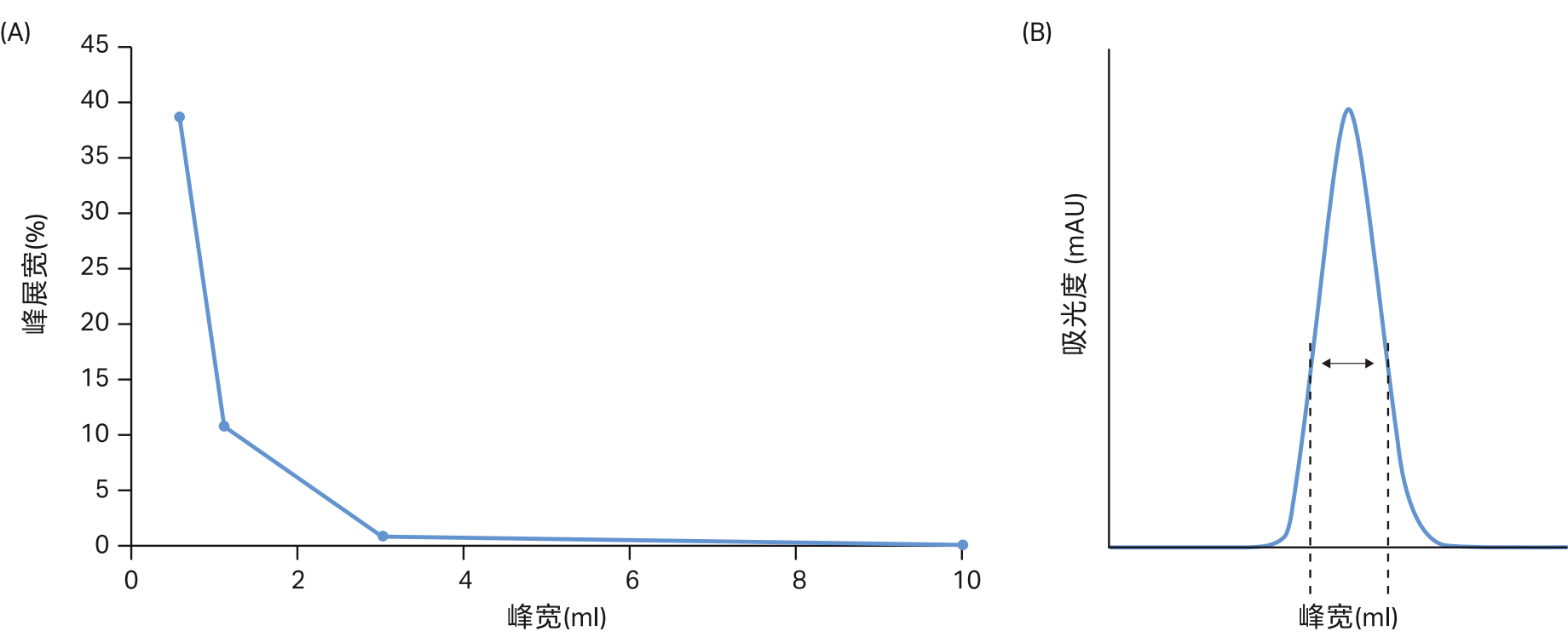


图 3.5. (A) 相对系统作用取决于峰的增加。(B) 本例子中在峰高度的一半处测定峰宽。

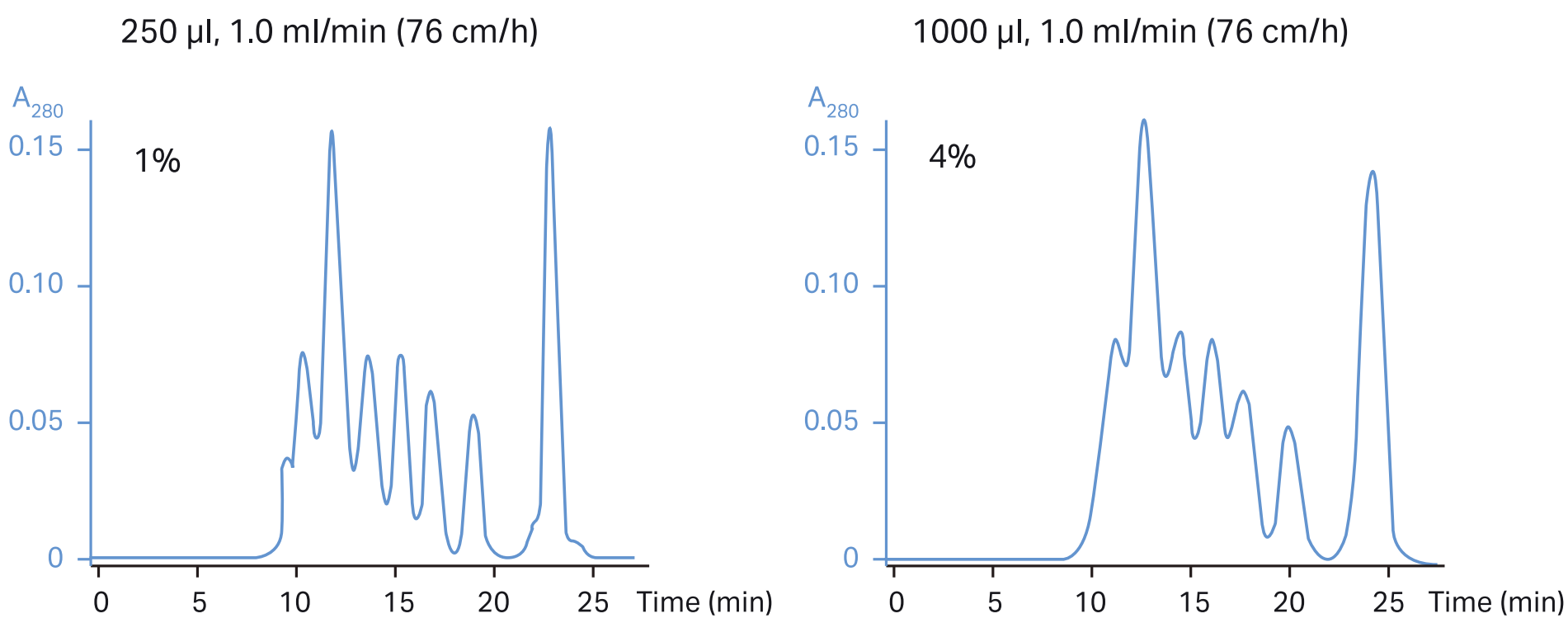


## 样品体积对分辨率的影响

样品体积不影响涉及目标蛋白吸附在层析柱上的层析技术中的分辨率。吸附性层析技术的例子有亲和层析 (AC)、离子交换层析 (IEX) 和疏水作用层析 (HIC)。然而，尺寸排阻层析 (SEC) 是一种非吸附性层析技术，因此，样品区域在穿过层析柱的过程中被展宽。结果，样品被稀释，而分辨率随着样品体积的增加而降低。

图 3.6 显示了一个 SEC 例子，其中不同体积的样品上样到 Superdex 200 10/300 GL 层析柱。在第一种情况下，上样 250  $\mu\text{l}$  的样品，这相当于 1% 的柱体积。在第二种情况下，上样 1000  $\mu\text{l}$  的样品，这相当于 4% 的柱体积。可以看出，当使用较小的上样体积时分辨率较高。

 当使用非吸附性层析技术时，上样的样品体积应该保持尽可能小。为了获得 SEC 中的最高分辨率，建议样品体积应小于总层析柱体积的 2%。



**图 3.4.** 样品体积对 SEC 中分辨率的影响。样品体积以填料体积的百分比表示。层析柱：Superdex 200 10/300 GL。

04

# 如何选择上样的方式



# 如何选择上样的方式

有三种常用的方法上样到层析柱：

- 1. 从预充的样品环上样
- 2. 通过样品泵直接上样
- 3. 通过系统泵直接上样

表 4.1. 上样技术。

| 技术         | 样品体积               | 重要提示                                | 优点                                            |
|------------|--------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 样品环        | 小 10 µl 至 10 ml    | 以正确的方式充满和排空样品环                      | 处理小体积<br>高重复性<br>当部分填充时可尽可能减少样品损失<br>可以在高压下使用 |
| Superloop™ | 中等 100 µl 至 150 ml | 充满和清洗环                              | 尽可能减少样品损失<br>中间允许重复注射而无需手动干预                  |
| 样品泵或系统泵    | 大 5 ml* 至 数升       | 从泵中去除气泡<br>在开始前用缓冲液/样品预冲管路<br>随后清洗泵 | 方便大体积样品                                       |

\* 在较低范围内的样品体积需要具有小内径的管路以尽可能减少样品损失。

## 样品环

样品环用于较小的样品体积。使用时必须以正确的方式充满和排空样品环。当使用样品环上样时重复性很高，因为该上样方式与任何流速的变化无关。样品环的上样范围可以从几微升到 10 ml，有数种不同体积的样品环可供选择。

当充满样品环时，考虑流体动力学十分重要，如图 4.1 和 4.2 所解释。

样品进入样品环后在管路中间的流速将比靠近管壁处更高；这在环中创建了一个抛物线状的流动曲线（图 4.1）。因此，为了完全充满样品环，需要上样更大的体积，这在下一节中进行解释，并如图 4.2 所示。

### F 流体动力学

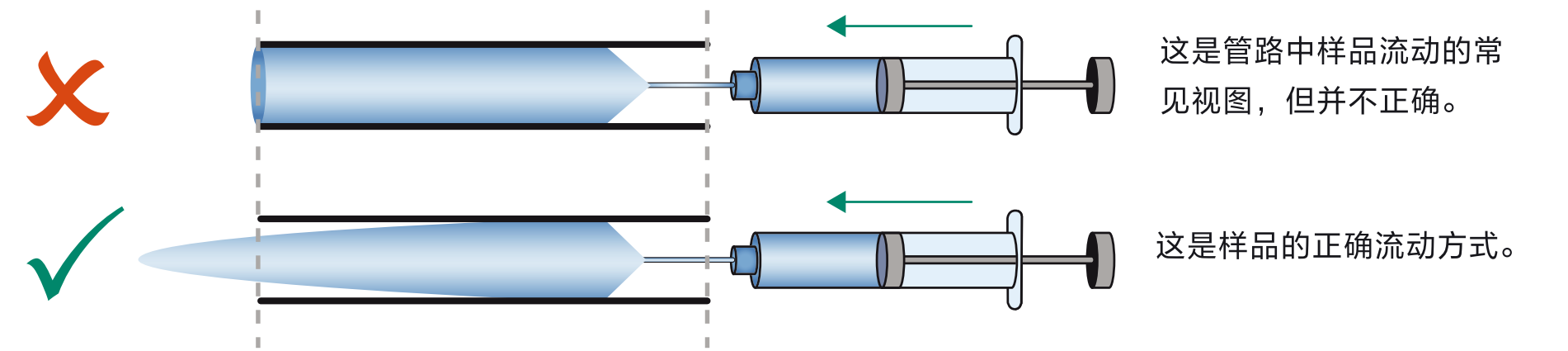


图 4.1. 通过管路的流体动力学。

充满样品环

有两种方法充满样品环：部分填充和过量填充；见图 4.2。采用部分填充时，没有样品损失，但是如果重复相同的程序时重复性较低。采用过量填充时，可以获得更好的体积准确度。为了完全充满，上样 3 到 5 倍环体积以获得高准确度。所需要的体积取决于环尺寸 (长度和内径)。通常，环体积越大，所需要的过量填充越少。

👉 对于一个部分填充的样品环，不要填充超过环总体积一半的样品。如果上样太多，部分样品可能会穿过并流出环，如图 4.2 所示。

排空样品环

排空样品环时为了避免稀释效应，应从与填充相反的方向排空。

达到完全回收率的样品体积将随着流速、样品环尺寸和样品的性质而改变，但通常 3 到 5 倍样品环体积就足够。

图 4.3 显示了以 0.5 ml/min 流速排空 100  $\mu$ l 样品环时在不同体积达到的回收率的例子。为了彻底清空环，在这个例子中，需要的缓冲液体积相当于三倍的样品环体积。

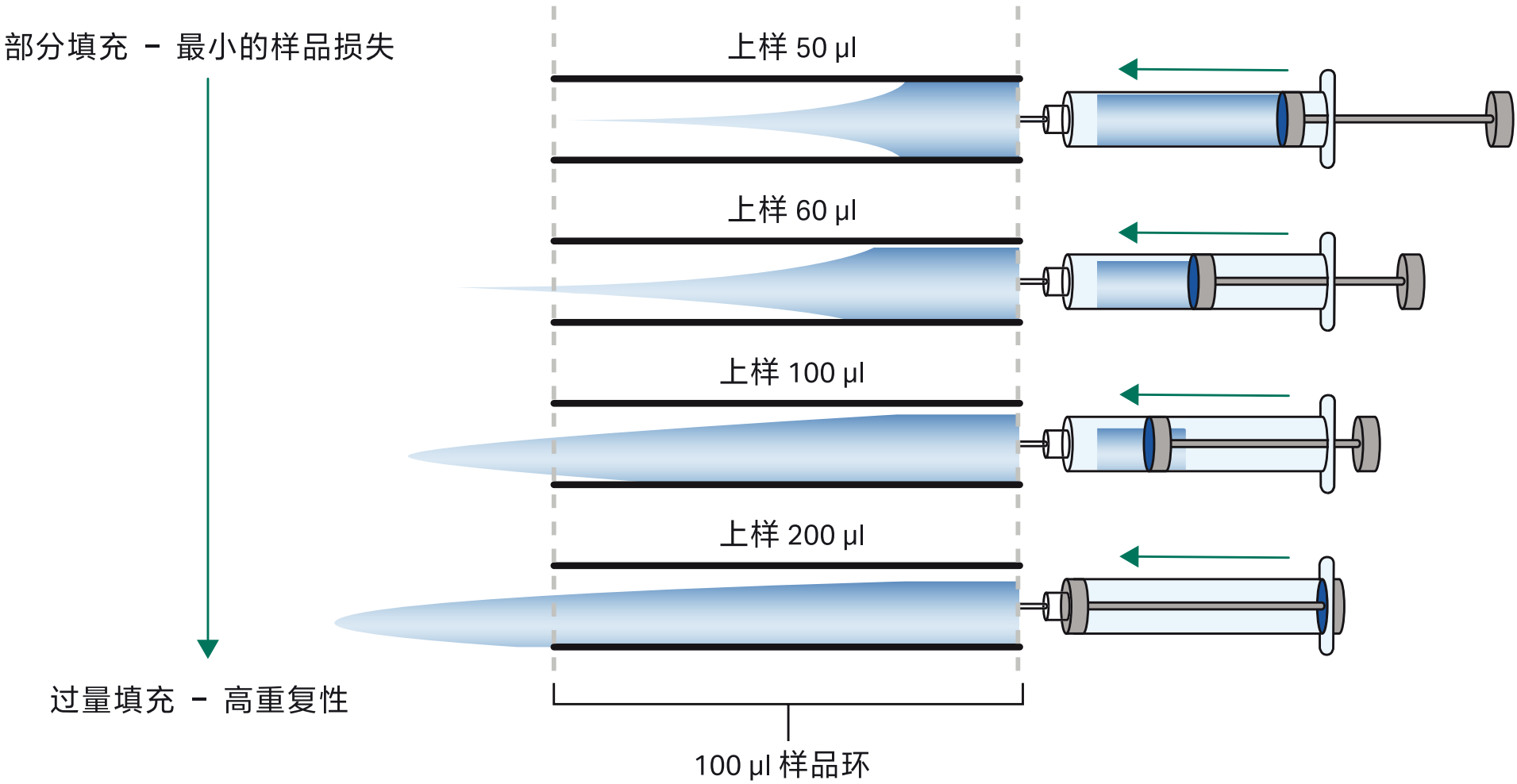


图 4.2. 填充样品环 (此处内径为 0.50 mm)。

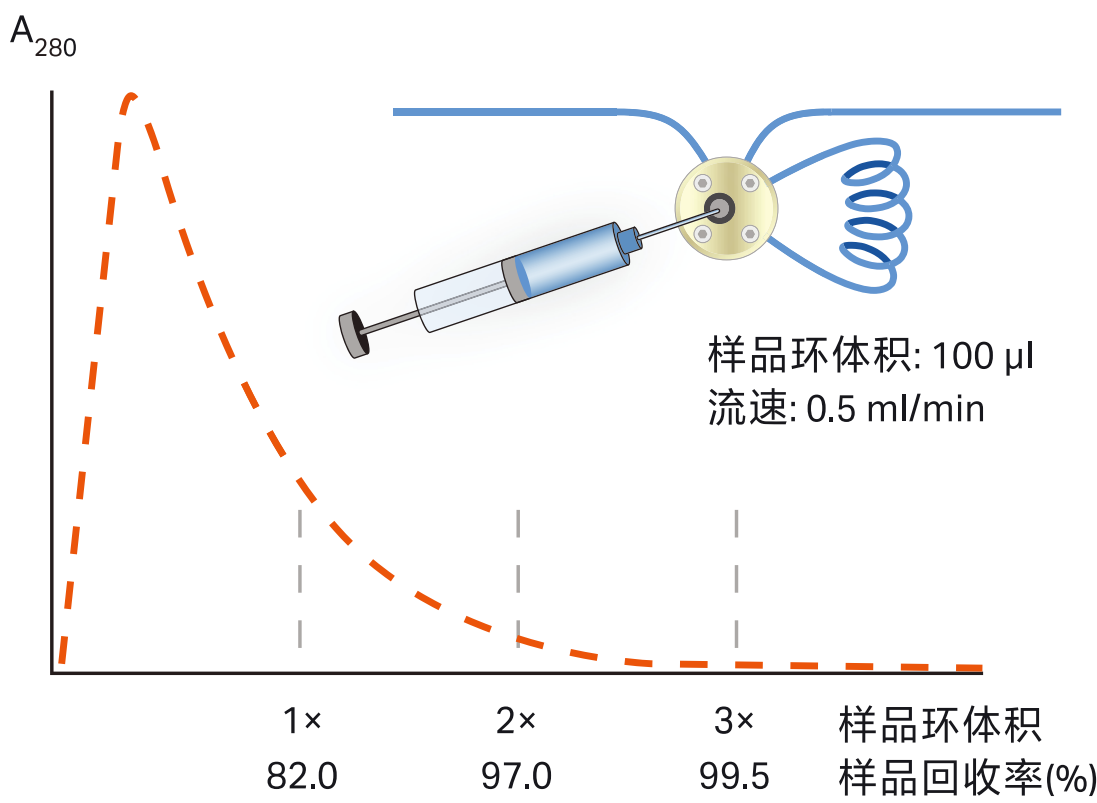


图 4.3. 当排空一个完全充满的样品环的内容物时的洗脱曲线和回收率。在这个装置中使用 0.50 mm 内径的样品环。



为了实现高的样品回收率，应使用大体积以排空样品环。对于非吸附性层析技术（例如脱盐和 SEC），由于所使用层析柱的大小而存在样品体积的限制。

图4.4显示了如何通过降低进样过程中排空样品环所使用的体积从而提高分辨率的例子。这是进行分析研究时常用的一种有效方法。

 在开始前，决定最重要的目标是高回收率或是高分辨率。

## Superloop

Superloop 有三种不同的尺寸-10、50 和 150 ml，可以用于 100  $\mu$ l 到 150 ml 范围内的样品体积。它们可以被用于注射全部体积的样品到层析柱上，或者在期间重复注射样品，无需手动干预。图 4.5 显示一个 10 ml 的 Superloop。

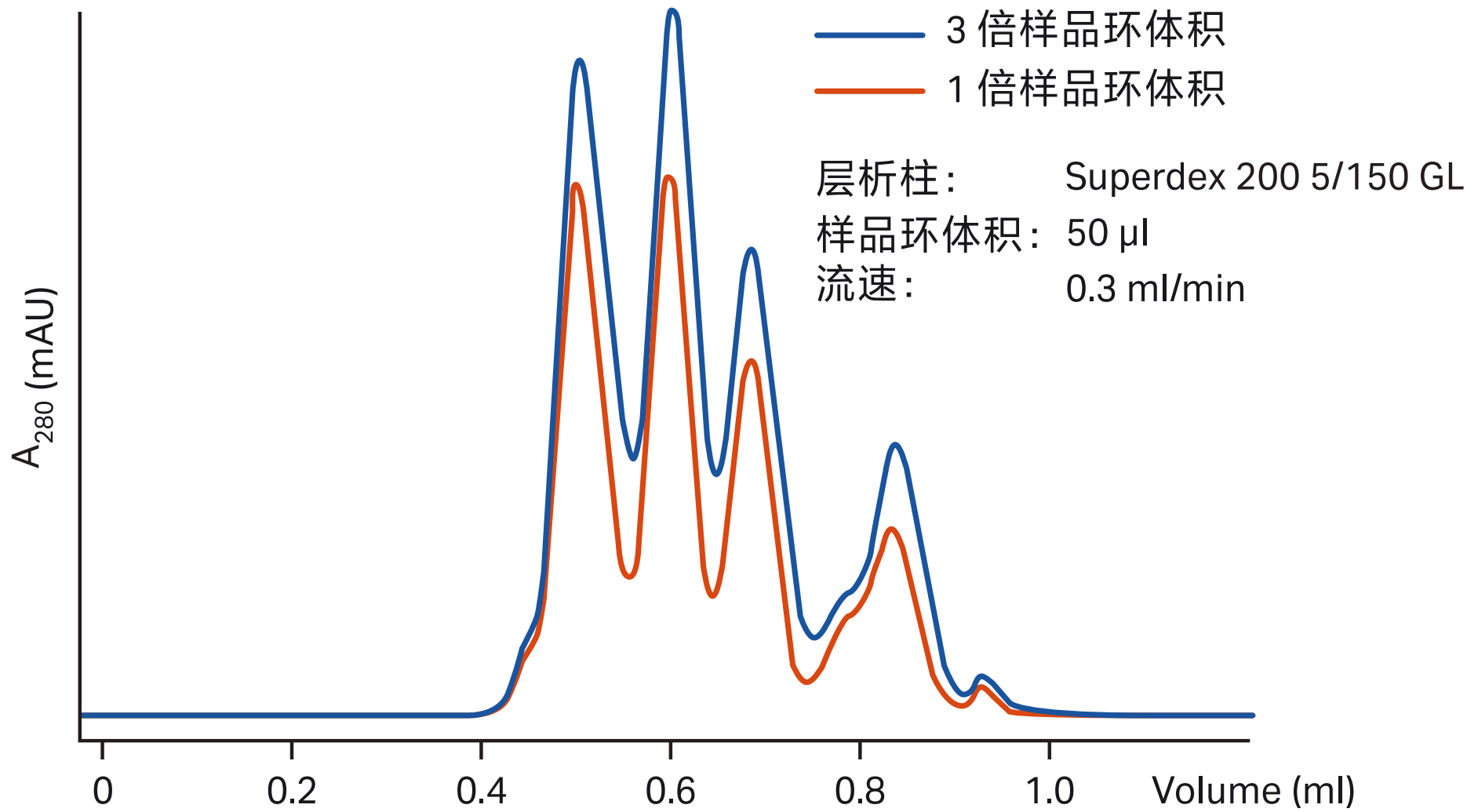


图 4.4. 层析图显示了 SEC 中的分离如何受进样过程中排空样品环所使用的不同体积的影响。

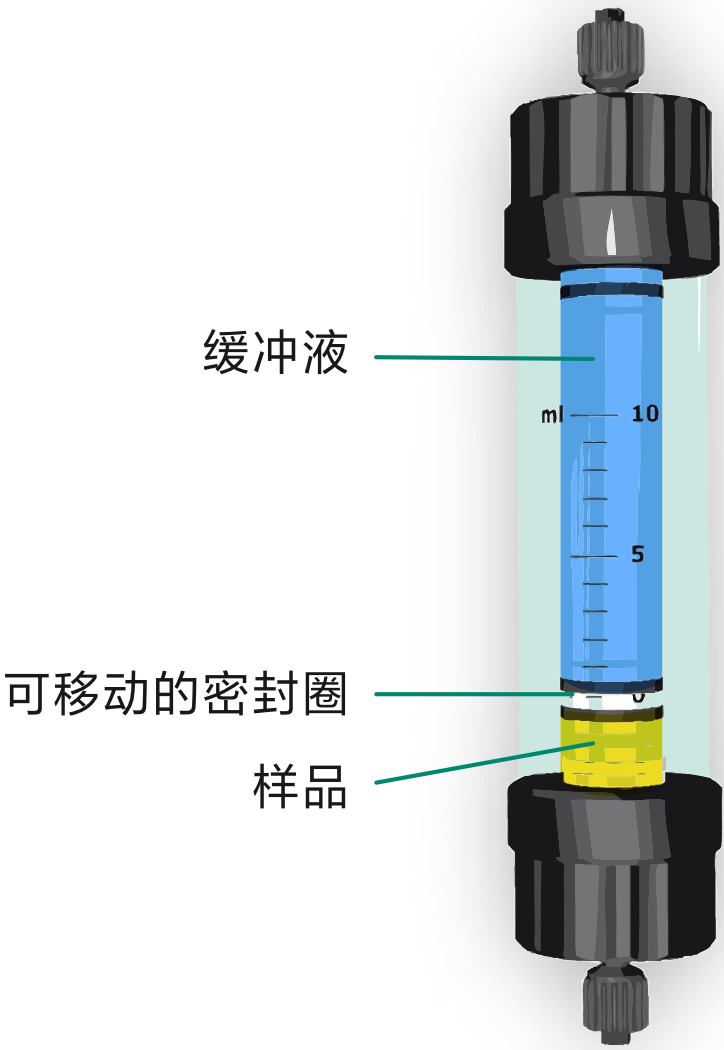


图 4.5. 10 ml Superloop 示意图。

如何填充和排空 Superloop

将一根 Superloop 连接到上样阀，并先用缓冲液充满。手动使用注射器或使用样品泵从底部上样 (图 4.6A)。通过推动缓冲液进入 Superloop 的顶部注射样品，从而使密封圈向下移动，把样品推出 Superloop。密封圈阻碍了样品和缓冲液的混合 (图 4.6B)。当可移动的密封圈到达底部位置时，缓冲液将自动绕过密封圈，随样品之后进入层析柱 (图 4.6C)。

使用 Superloop 时的注意事项

Superloop 提供的流速由系统流速决定。如果需要将样品完全注射进去，以略多于估计的样品体积运行泵从而确保 Superloop 和管路被完全排空 (图 4.6C)。

-  Superloop 具有有限的压力范围：对于 10 和 50 ml 环为 4 MPa (40 bar, 580 psi)，对于150 ml 环为 2 MPa (20 bar, 290 psi)。当 Superloop 在线连接时，要始终确保系统压力报警限不超过这些值。
-  如果使用比 Superloop 更耐压的层析柱，请记住在上样期间降低最高压力限制。在提高流速到正常值前，切换流路使其绕过 Superloop。
-  在 10 ml 和 50 ml 的 Superloop 中，可移动密封圈为一个氟碳橡胶制成的 O 形圈设计，其具有有限的化学腐蚀耐受性。它可以在缓冲水溶液和醇类中使用，其他溶剂应谨慎使用。
-  为 10 ml 和 50 ml Superloop 提供 耐受溶剂的 O 形圈作为配件。

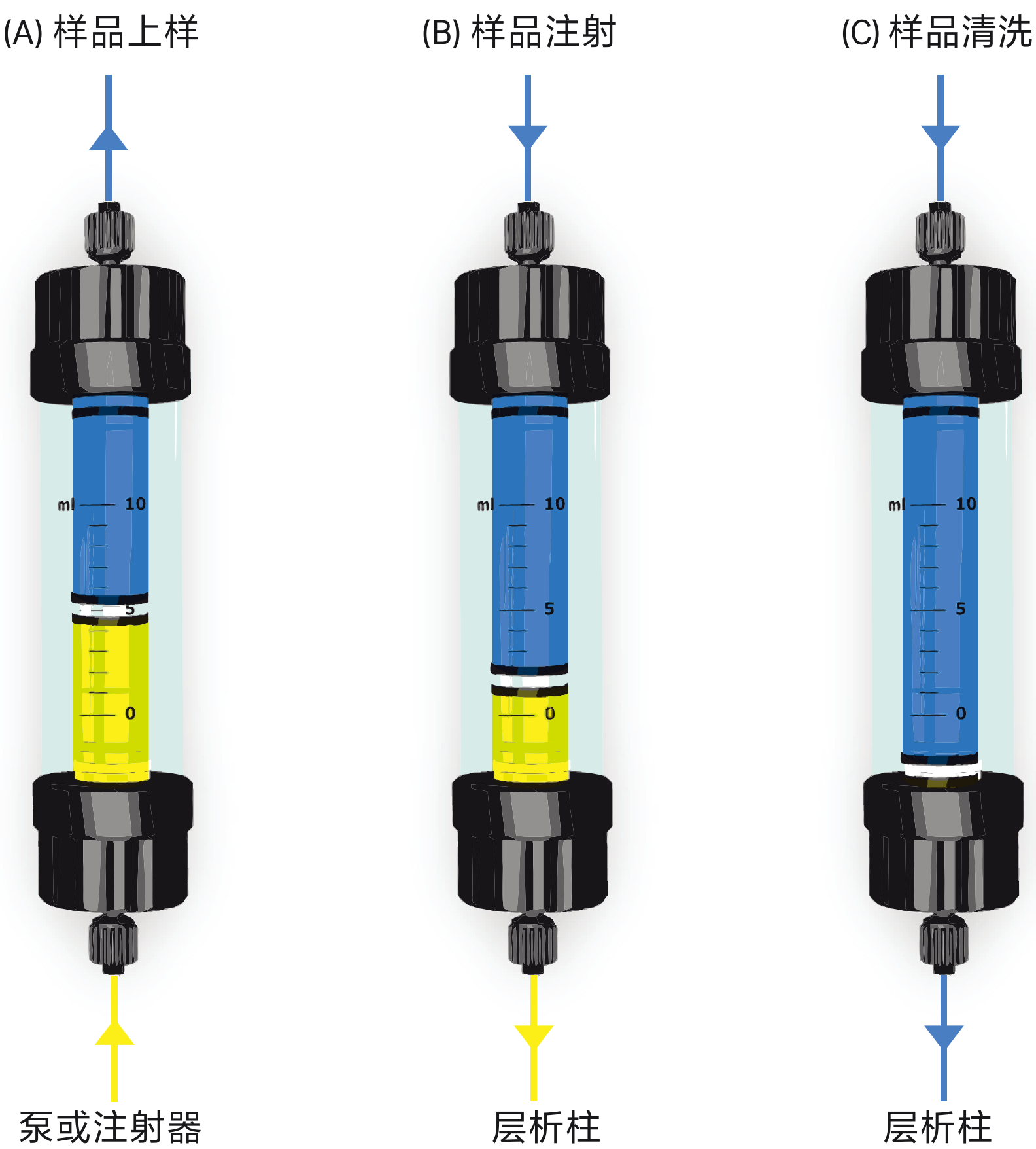


Fig 4.6. 填充和排空 Superloop。在这些图中，样品用黄色标示，缓冲液用蓝色标示。

## 如何准备 Superloop

在连接 Superloop 到系统前，拆下上末端的组件，如图 4.7 所示

放置可移动密封圈至 Superloop 底部，然后倒入缓冲液充满玻璃筒，如图 4.8 所示。重新装上顶部端组件，确保内部没有留下气泡，如图 4.9 所示。

 为了在特定的温度下上样，可以让所需温度的水在 Superloop 的外护罩内循环。

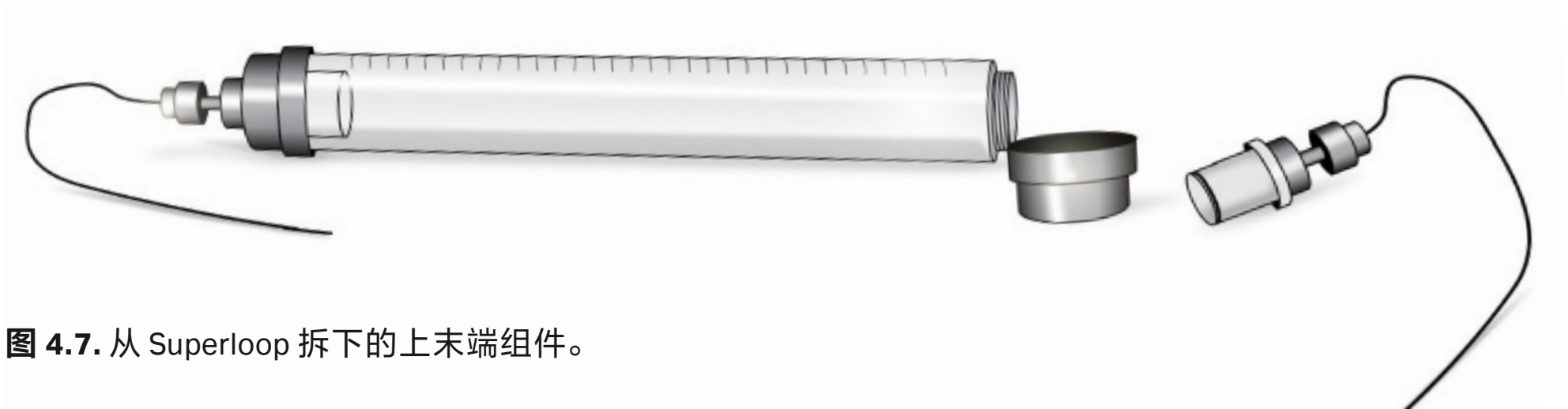


图 4.7. 从 Superloop 拆下的上末端组件。

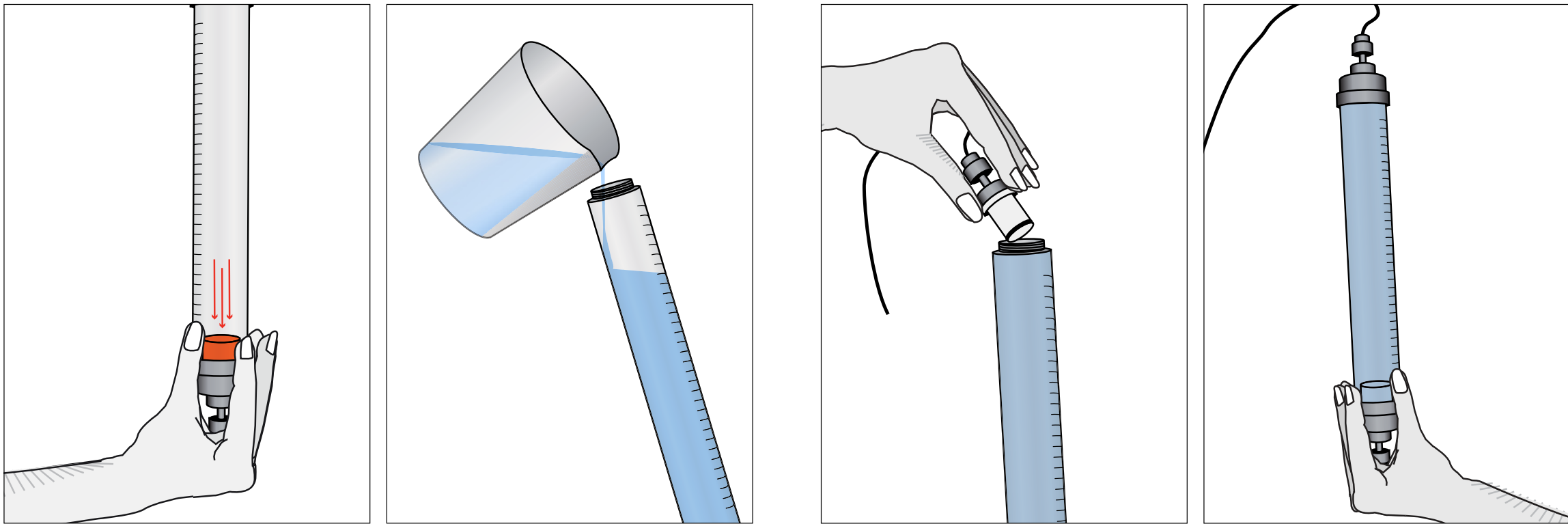


图 4.8. 可移动密封圈应该位于底部位置 (左图)。缓冲液倒入筒内 (右图)。

图 4.9. 如何安装顶部端组件 (左图) 以重装 Superloop (右图)。



## 如何连接 Superloop 到进样阀

Superloop 连接到与样品环相同的端口。为了找到哪个端口应该连接到 Superloop 的底部，连接注射器到进样阀，然后把阀门切换到“Manual load”模式。注射液体并检查液体出来的端口，如图 4.10 所示。连接来自 Superloop 底部的管路到这个端口。小心不要将气泡引入样品室内。

Superloop 顶部应该连接到在 Inject 模式时被泵得输送液体所流向的端口。如果不确定，可以启动一个流速，然后切换到“Inject”模式。液体出来的端口就是 Superloop 顶部应该连接的地方。

## 如何清洗 Superloop

Superloop 可以在连接到系统时进行清洗，通过将清洁剂或消毒剂泵入 Superloop 得以实现。推荐泵送 0.5 M NaOH 30分钟。另外，在使用 NaOH 后请确保正确地冲洗了样品环；例如，先用水清洗，然后用缓冲液，直到 pH 达到中性。

改变样品时为了避免残留，建议拆解 Superloop 并分别清洗所有的零件。

 当使用危险/腐蚀性化学药品时，请戴上手套和防护眼镜。

## 自动进样器

通过使用自动进样器，可以自动进样多个小体积的样品，这对于如蛋白质分析或微量纯化的工作来说十分方便。自动进样器确保一次使用一个进样环。表 4.2 列出不同的自动进样器和它们的性能。



图 4.10. 通过注射缓冲液到进样阀中检查连接 Superloop 底部的端口。

表 4.2. 可选的自动进样器

| 自动进样器                         | 样品体积                                                                                                | 冷却功能 | 用于                                 |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------------------------------------|
| A-900                         | 1 × 96孔板, 1.5 ml 小瓶 or 160 × 0.5 ml 小瓶                                                              | 是    | ÄKTAexplorer/purifier              |
| A-905                         | 1 × 96 孔板, 384 孔板, 或 48 × 1.5 ml 小瓶                                                                 | 是    | ÄKTAexplorer/purifier/micro        |
| Alias™ 自动进样器 (Sparks Holland) | 2 个 根 据 推 荐 微 孔 板 (SBS) 标准制作的微孔板。除 384 孔、2 × 48 ( 1.5 毫升 ) 小瓶或 2 × 12 ( 10 毫升 ) 小瓶外，还支持 96 高位与低位孔板。 | 是    | ÄKTA avant, ÄKTA pure™ and I/O box |

<sup>1</sup> A-900 and A-905 已经停产。

<sup>2</sup> Alias 是指由 Spark Holland 提供的 Alias 自动进样器。连接 Alias 自动进样器到 ÄKTA pure, 请查阅说明书 29040427。



# 使用泵上样

可以使用样品泵或系统泵直接上样到层析柱。图 4.11 显示了一个包含样品泵的流路示例。当使用泵上样时，可以选择一个所需要的预设体积，或者可以使用空气传感器上样全部的样品（未定义体积）到层析柱。当样品抽干后，触发空气传感器，然后进样阀将转向另一个端口。这也阻止了空气被注入层析柱内。对于连续的纯化运行，泵可以与一个入口阀一起使用以连续上样不同的样品。

- 将样品上样到层析柱前，下列准备工作十分重要：
1. 为了保证正确的体积输送，必须按照第 5 章所述从泵中去除气泡。

2. 在开始上样前，样品瓶到进样阀的流路必须充满样品（预充）。

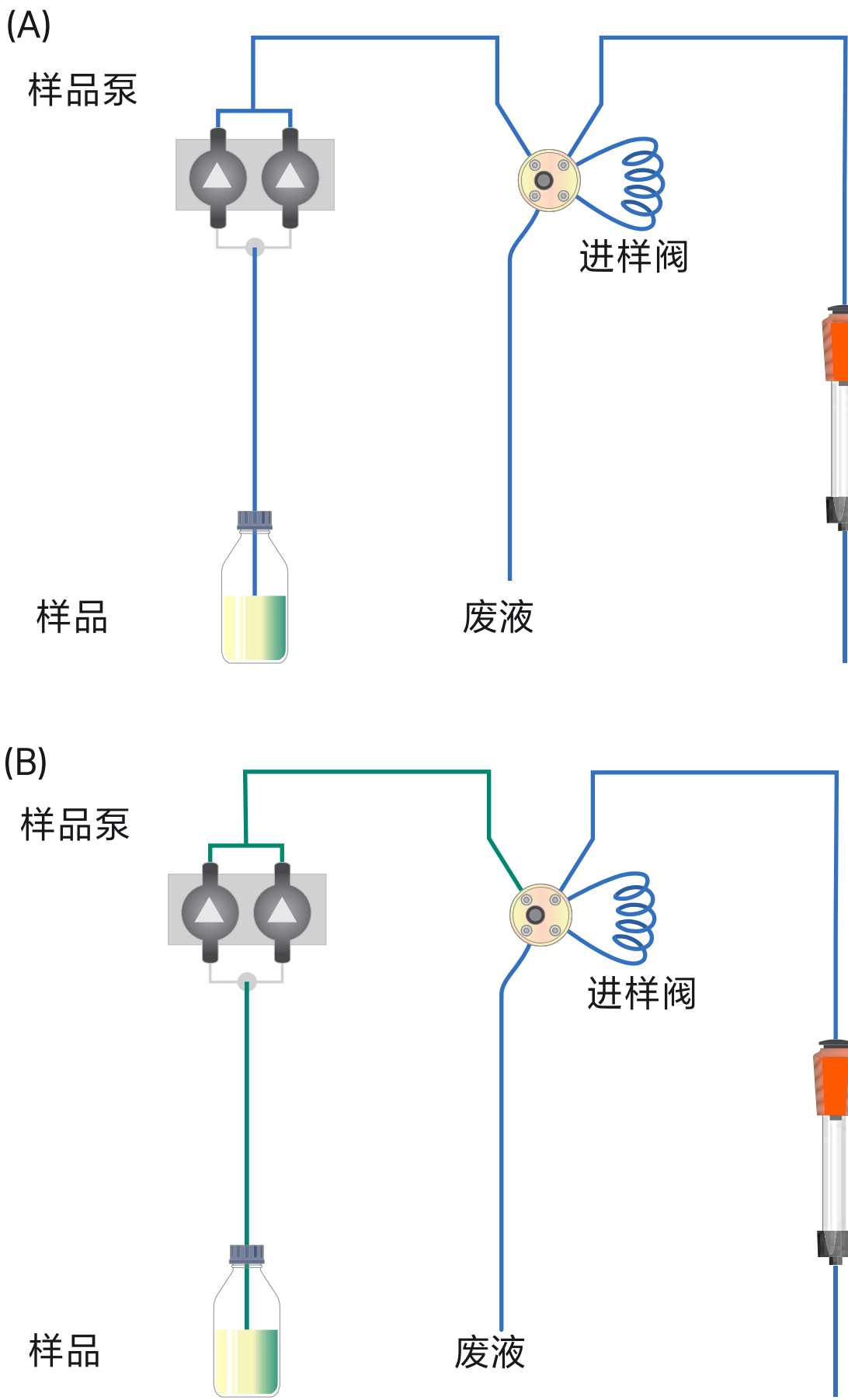
## 充满样品入口

当泵启动时，从样品容器到进样阀的体积将直接进入层析柱。如果流路未预先充满样品（即预充），则上样到层析柱的实际样品体积将小于预期。

## 充满样品入口所需体积

充满样品入口所需体积取决于流路中包含的管路和组件。确定这个体积的最简单方法是计算理论体积。要做到这一点，应该将从样品容器到进样阀的所有管路和组件都计算在内。详情见附录 3。

也可以通过实验测定该体积。从流路中绕过层析柱。用缓冲液充满系统，使用含有 1%丙酮的缓冲液作为样品。使用样品泵上样丙酮溶液。注意使用的体积，直到紫外监测器（使用 A280）检测到丙酮。也可以用 NaCl 取代丙酮。此时应测量所使用的体积直到电导率监测器检测到盐。注意：从实验测定中获得的体积略高于使用计算方法获得的体积，因为增加了从进样阀到监测器的管程。



**图 4.11.** 一开始，流路中（包括样品入口）被充满缓冲液 (A)。预充管路时，样品入口和进样阀之间的管路充满样品 (B)，确保进样过程中正确的体积被上样到层析柱。在图中，样品用绿色标示，缓冲液用蓝色标示。

## 固定体积样品上样

为了使用泵上样固定的样品体积，如上所述，首先测定用样品预充流路所需要的体积。

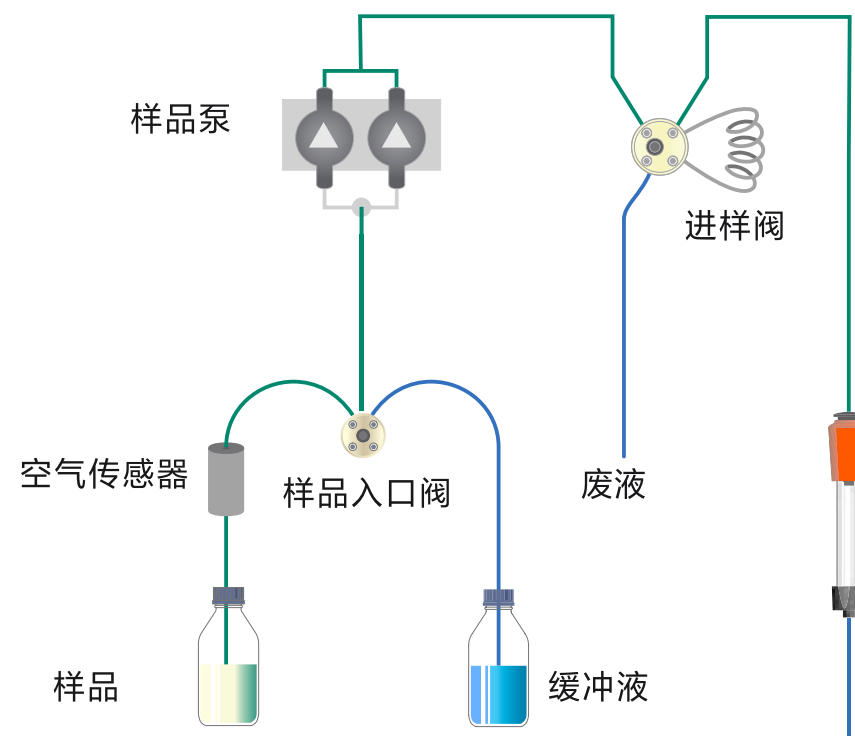
把样品入口放置在缓冲液中，按照第 5 章所述，清除将要使用的所有泵中的气泡。然后将样品入口浸没在样品容器中，开始预充。预充后，系统已经准备好进行上样。

## 使用空气传感器实现完全上样

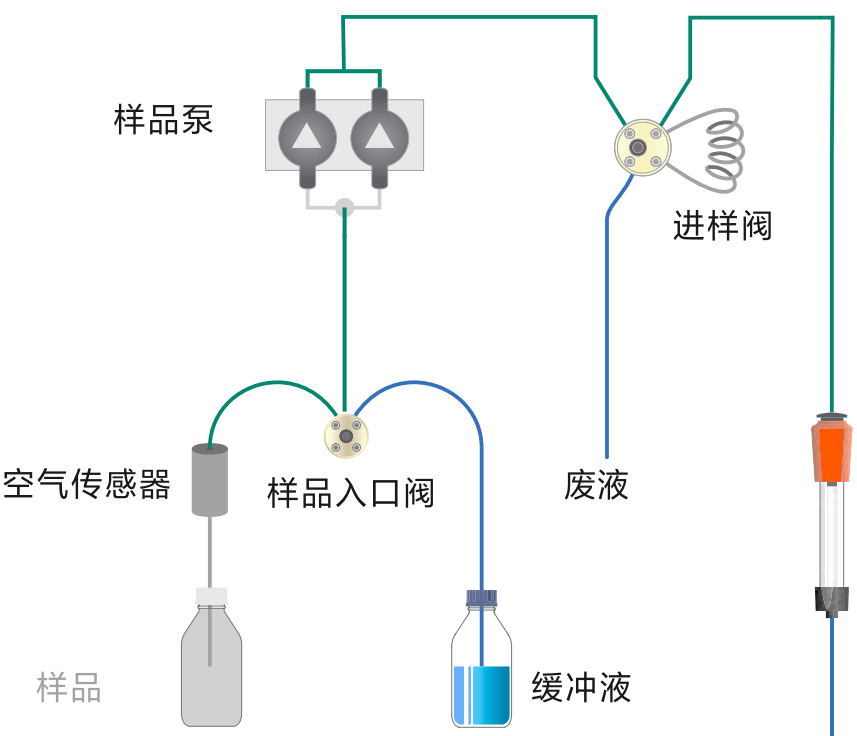
使用样品泵和空气传感器以实现完全上样。用待用的缓冲液预充样品入口，并且如第 5 章所述从泵中去除气泡。然后把样品入口浸没在样品容器中，使用样品泵上样 (图 4.12A)。上样样品到层析柱直到空气传感器检测到气泡 (图 4.12B)。检测到空气后，样品入口阀切换到缓冲液进口，使从样品入口阀到进样阀管路中的剩余样品上样到层析柱 (图 4.12AC)。

 在一些系统中，提供预编程的方法用于使用样品预充样品泵和空气传感器。

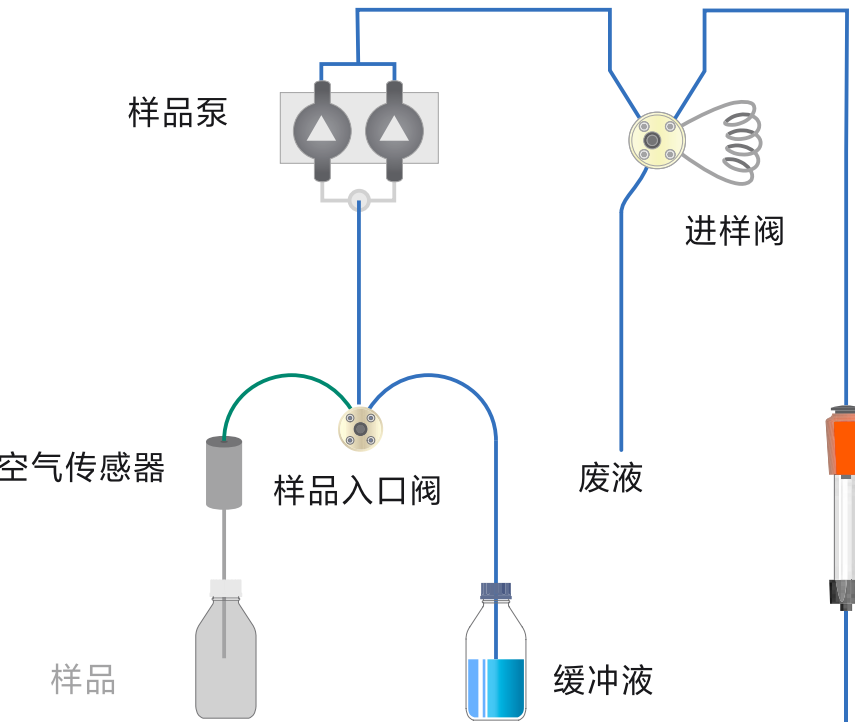
(A) 上样



(B) 在检测到空气后从上样切换到上缓冲液



(C) 继续上缓冲液以输送样品到层析柱



**图 4.12.** 使用样品泵和空气传感器上样时的进样示例。在图中，样品用绿色标示，缓冲液用蓝色标示。关于 (A)、(B) 和 (C) 图的介绍请参考图中的文字。



05

# 液体输送和泵

# 液体输送和泵

本章介绍在实验室规模的 ÄKTA 系统中使用的高性能泵。准确的流速、重复性好的液体输送和低脉冲是获得最佳纯化结果必不可少的元素。在实验室规模的层析中所使用的层析柱和填料常常产生不同的背压，因此，泵也必须在高压和低压下都能工作。

 注意：本章中的介绍不适用于使用蠕动泵的系统，例如，ÄKTA start™。

 在开始运行前要始终保证去除泵中的所有气泡。

 为了获得最佳分离，确保泵提供准确的流速。

## 调节泵以获得准确的液体输送

一些系统拥有两个泵以便能够建立准确的梯度，其他系统则使用一个泵和一个切换阀以形成梯度。每个泵正常含有两个泵头，它们以相反的模式工作以形成均匀的流速。

### 如何检测泵中的气泡

存在于泵中的气泡不能通过目测被检测到，但是可以通过分析压力曲线来检测。

当泵运行在背压 0.2 MPa (20 bar，290 psi) 以上时，可以通过压力曲线的波动看到存在的气泡 (图 5.1)。为了生成 0.2 MPa (20 bar，290 psi) 以上的背压，可以使用具有较小内径的标准管路 (附录 2 中的表 A2.1)。

 即使泵内仅存在非常小的气泡 (几微升) 也会影响其所提供体积的准确度。

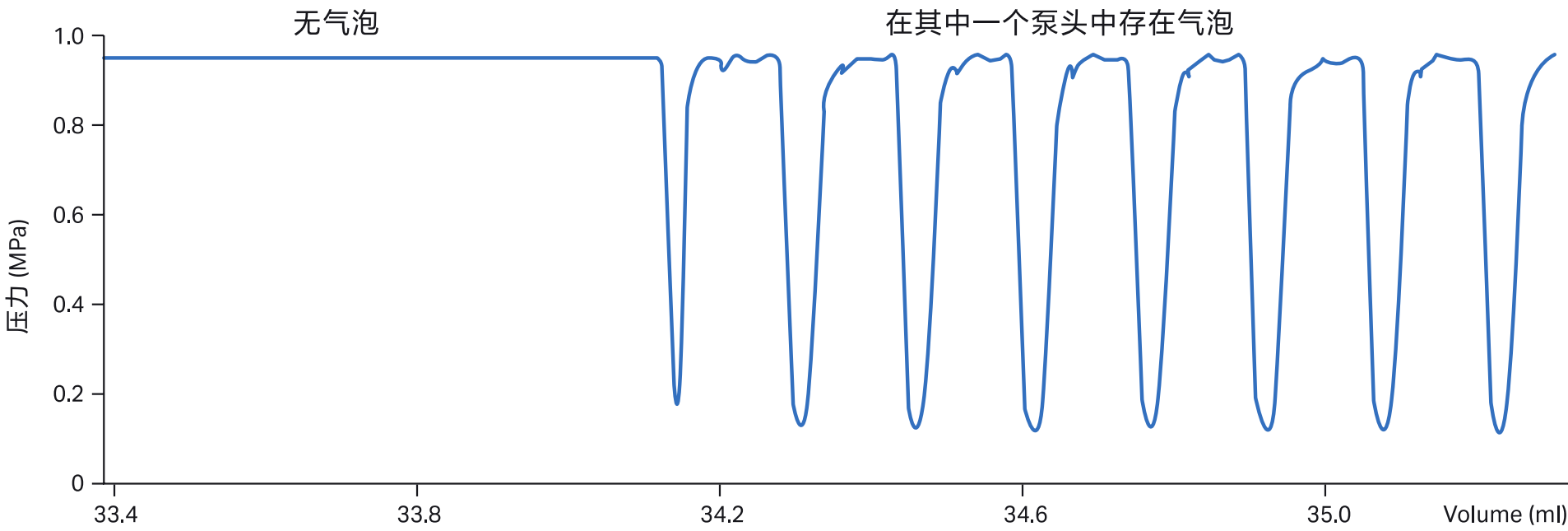


图 5.1. 当泵中存在气泡时系统压力曲线图。

## 如何去除气泡

通过如下所述的方法, 使用注射器经过泵的除气阀抽出液体去除气泡。这个过程被称为“除气”。

 为了避免空气进入泵, 确保所有入口都预先充满液体。并检查泵和入口的所有管路连接紧密。

为了清除泵中的气体, 连接一根注射器到除气阀 (图 5.2)。打开除气阀并缓慢用注射器抽取泵中的液体。缓慢地抽出液体十分重要, 不超过 1 ml/s, 否则将产生一个下压力, 将更多的气泡释放在泵中。

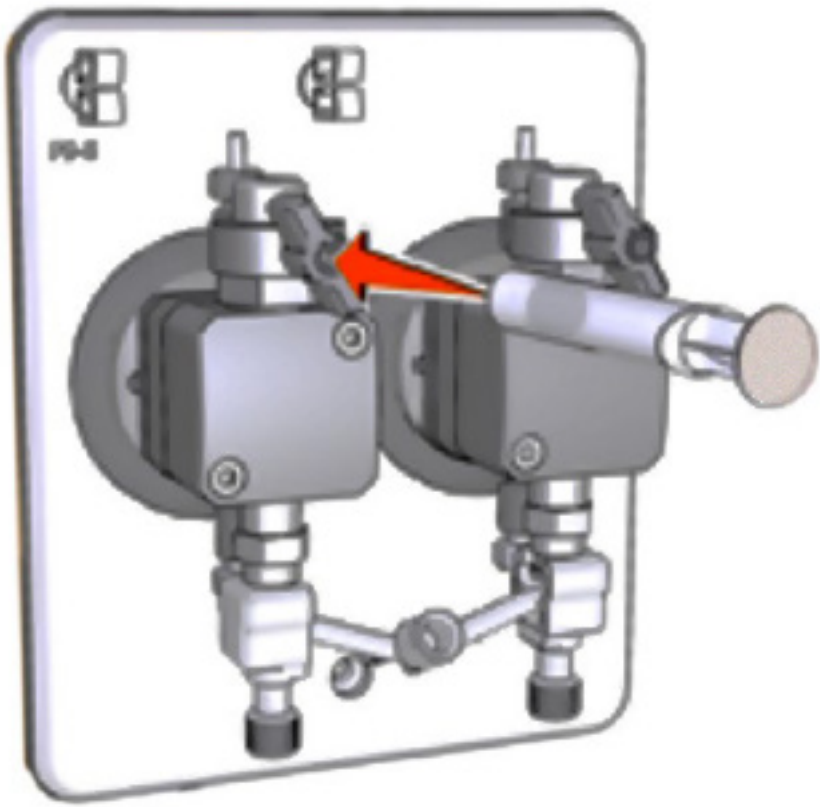
如果泵以10%左右的系统最大流速运行, 则除气将更加有效。这样的流速将有助于机械地释放粘附在泵头内壁上的任何气泡。通常情况下, 设计用于高流速运行的泵因为泵头的体积较大更容易驱赶气泡。

 为了获得最佳结果, 清除每个泵中所有泵头的气泡。

在清除气泡后, 通过分析压力曲线检查所有的气泡是否已经被去除 (图 5.1)。启动一个流速, 并在 0.2 MPa (20 bar, 290 psi) 以上的压力运行泵。如果压力曲线显示仍然有气泡存在, 则重复清除气泡程序并再次检查压力曲线。

如果使用缓冲液去除气泡后仍有气泡, 则用 100%甲醇替代缓冲液。确保泵含有水, 然后使用注射器把 100%甲醇抽入泵中, 让泵以 10%的系统最大流速运行, 直到压力曲线波动消失 (图 5.1)。为了去除甲醇, 停止运行, 并切换为水。确保没有引入气泡。以 1 ml/min 流速运行泵 5 min 以洗掉甲醇。然后使用注射器再次去除泵的气泡。

 驱赶气泡后如果泵仍然提供错误的流速, 请联系您的 Cytiva 商务服务代表。



**图 5.2.** 通过使用注射器从除气阀抽出液体去除气泡。



## 气泡来源

当压力下降时, 气泡可能从液体中释放。当泵在运行时, 泵内的压力将高于液体输送过程中的大气压力。当泵处于抽吸阶段时, 压力将低于大气压力, 气泡可能被释放。为了避免这种情况, 把瓶子放在泵的上方 ( 或至少是相同的高度 )。

 不要把液体放在泵的下方, 除非用户手册说明可以 ( 一些系统有允许这样的放置的泵设计 )。

因为溶液始终与空气相接触, 建议在使用前进行脱气。

 特别注意在低温下储存而将在室温下使用的溶液。  
在低温下更多的空气被溶解, 因此在使用前需要让液体调节到室温。

当水溶液和有机溶剂在泵中切换时也可能生成气泡。由于溶解空气的能力不同, 气泡可能在两种液体混合时被释放。为了避免这种情况, 当两种不同的液体切换时, 把流路导向进样阀的废液端, 然后以相当高的流速 ( > 50% 的系统最大流速 ) 泵送一段时间。

## 泵和润洗系统的介绍

### 泵的功能

由于 ÄKTA 泵的设计, 它们几乎不会产生脉冲且不会引入破坏蛋白质的剧烈机械力。泵也可以在高压和低压下操作, 这使其可以适应蛋白质纯化中遇到的各种条件。

为了在操作过程中生成设定的流速, 泵使用特定算法来控制活塞如何移动。只要泵中没有气泡, 则流速准确度就可以很高, 误差率通常小于等于 2%。

大多数 ÄKTA 泵由两个泵头组成 ( 图 5.3 )。单个泵头完全相同, 但分别通过各自的步进电机以相反的相位运行。两个活塞和泵头交替工作, 以提供连续的低脉冲液体输送。

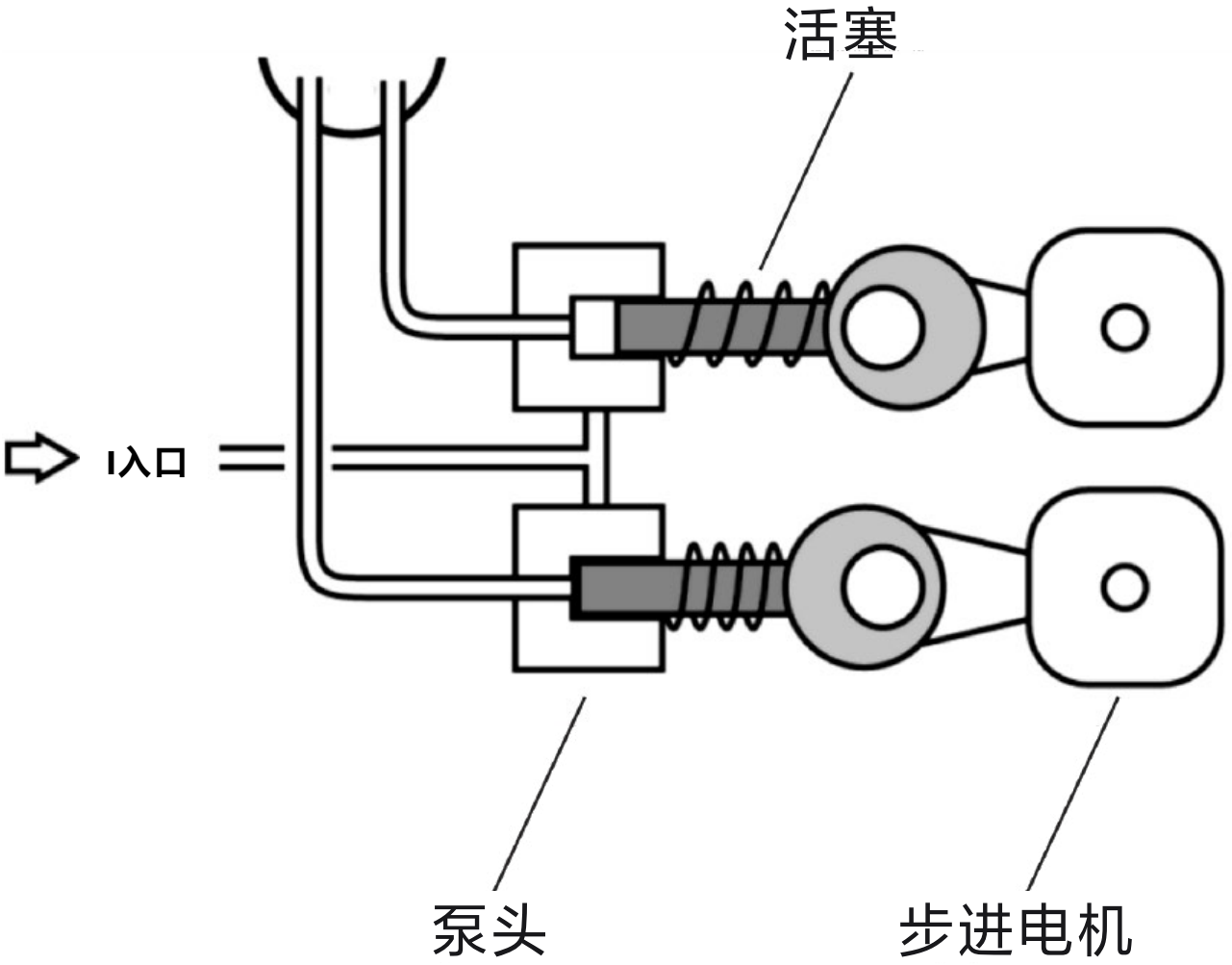


图 5.3. P-901, P-903, P-905, P9, P9-S, 和 P9H 泵的示意图

图 5.4 显示了泵头设计。在抽吸过程中，随着活塞从腔中移出，进止阀将开启，出止阀将关闭，使腔内充满液体。在输送阶段，出止阀将开启，而进止阀将关闭。在这个阶段，活塞将移入腔中，把液体推出泵。

活塞密封润洗系统

活塞密封润洗系统具有两个功能：

- 1. 通过防止含有所使用溶液组分沉积物的累积保护活塞密封圈和泵头, 例如盐结晶。
- 2. 通过防止密封圈变干延长密封圈寿命。

润洗系统的进口和出口管路经常放在同一个容器中。冲洗系统应该始终充满 20% 乙醇, 然后在泵头的背面循环, 如图 5.5 和 10.2 所示。在这个过程中, 沉积物将被冲出, 而乙醇防止了微生物的生长。

 经常检查 20% 乙醇溶液。每周更换一次, 或如果溶液出现浑浊或容器中的乙醇水平下降时更换。

 为了提醒更换, 可以把润洗溶液放在显眼的地方, 例如在系统顶部或仪器湿侧。

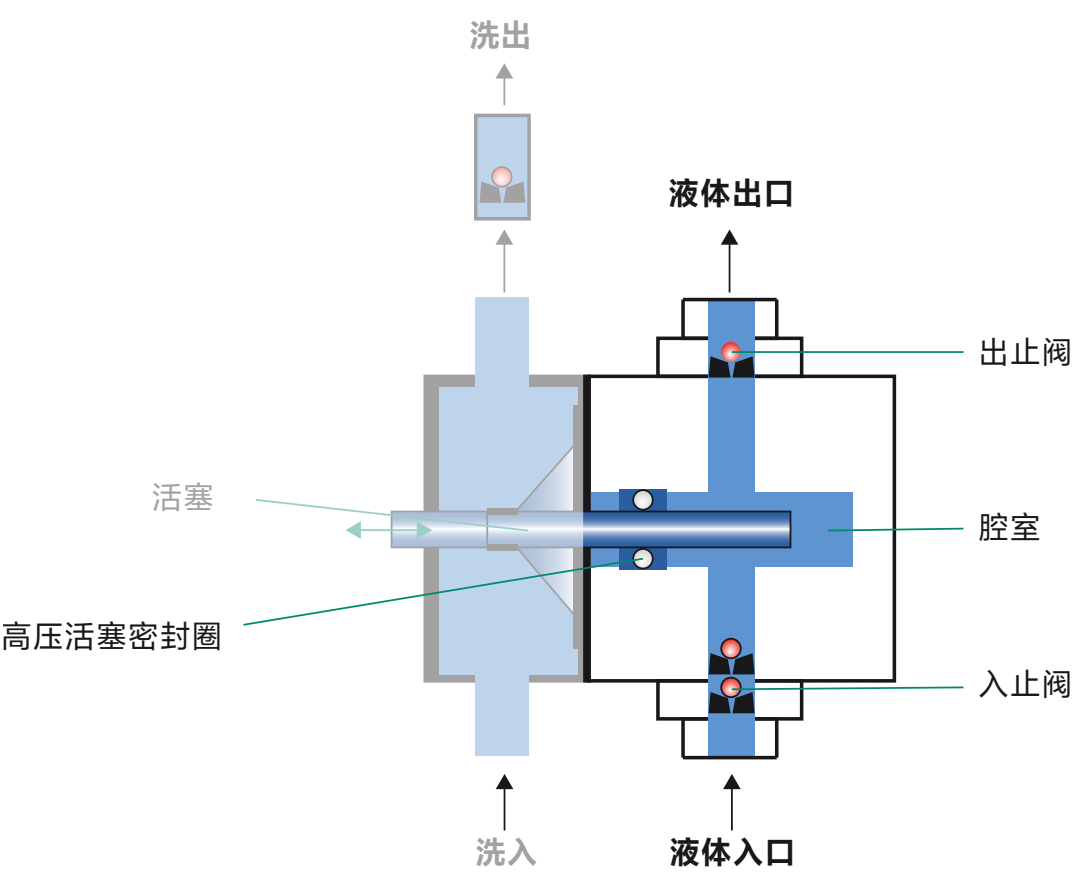


图 5.4. P-901, P-903, P-905, P9, P9-S, 和 P9H 的一个泵头的示意图。

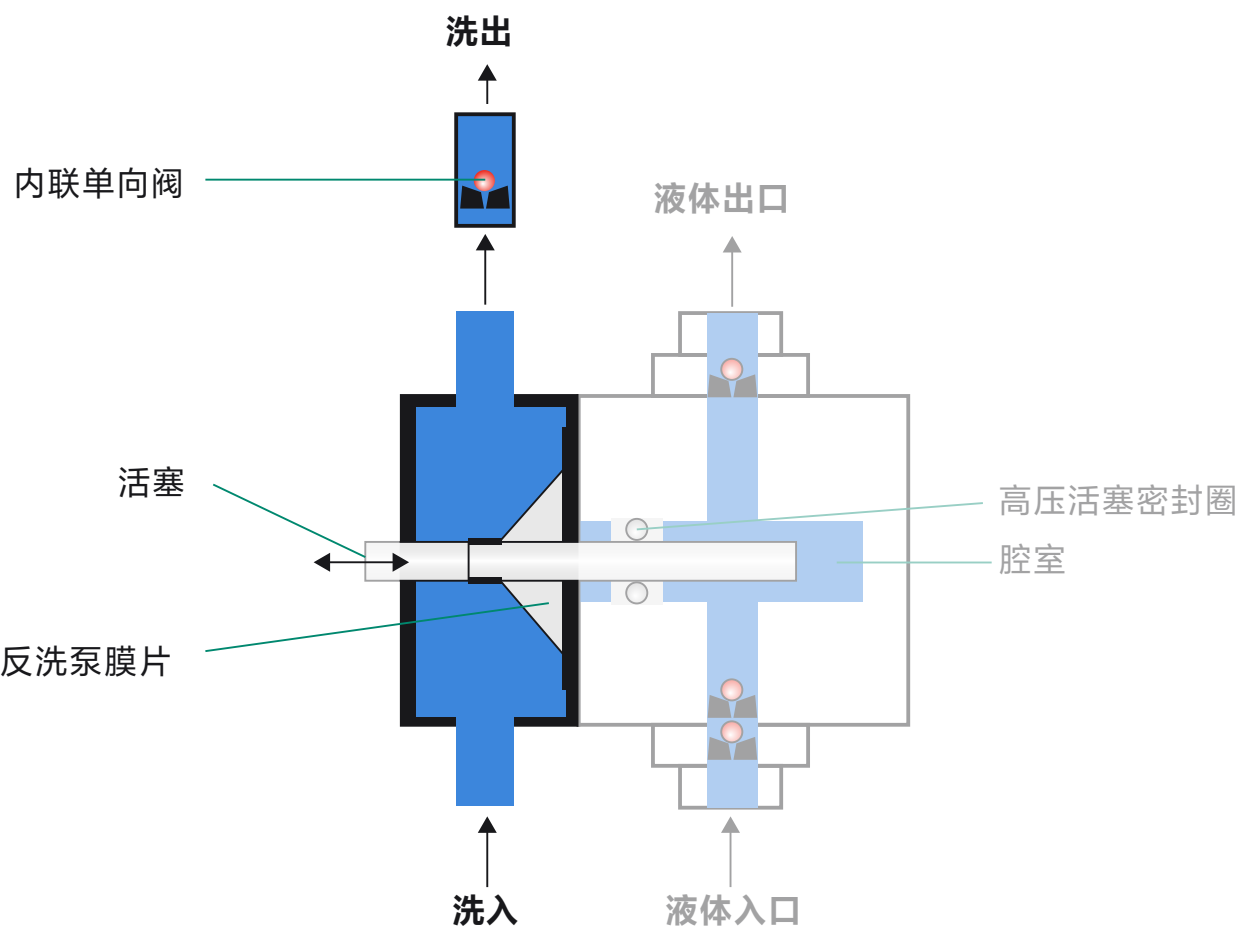


图 5.5. P-901, P-903, P-905, P9, P9-S, 和 P9H pump 的活塞密封润洗系统示意图。



# 保护层析柱的空气传感器

在缓冲液进口使用一个空气传感器以防止引入空气到层析柱和系统中。一旦触发空气传感器警报, 系统将停止。

 为避免气泡滞留在空气传感器内进而触发警报, 应始终垂直安装空气传感器的入口和出口, 并保持上流方向 ( 即与重力流方向相反 )。

可以设定不同水平的空气检测灵敏度; 关于一般建议见表 5.1。

表 5.1. 设定空气检测的灵敏度水平。

| 水平             | 检测                            | 用途                     |
|----------------|-------------------------------|------------------------|
| 低              | 大体积的空气                        | 防止缓冲液/溶液耗尽             |
| 中/正常           | 中等大小的气泡<br>( 例如 30 到 100 µl ) | 当使用样品泵上样全部样品时<br>终止上样  |
| 高 <sup>1</sup> | 小的气泡<br>( 例如几十分之一微升 )         | 当空气传感器放在进样阀和层<br>析柱之间时 |

<sup>1</sup> 小心使用高灵敏度, 因为它能够捕捉到对过程无害的零散气泡, 这可能不必要地激活警报、暂停运行和停止流路。

06

# 梯度的形成和 混合器

# 梯度的形成和混合器

从层析柱中洗脱被吸附蛋白的过程会使用梯度。高准确度的流速是形成一个最佳梯度的关键。第 5 章介绍了如何确保一个准确的流速。要形成正确的梯度, 必须尽可能减少泵脉冲的影响, 并确保用于形成梯度的液体在进入层析柱前被混合成均匀的溶液。混合器可以实现这些功能。可以采用不同的方法, 在层析系统中可以使用动态和静态的混合器。有些系统拥有两个泵以便能够形成准确的梯度。其他系统则使用一个泵和一个开关阀门以形成梯度。

## 选择混合器的大小

需输送的溶液体积和类型将决定所需要的混合器大小 ( 见表 6.1 )。

通常情况下, 系统随附的混合器适用范围很广, 但有时也需要考虑更换不同尺寸的混合器。请查阅系统用户手册, 了解应使用哪种混合器。

当使用水溶液和有机溶剂建立梯度时可能需要较大的混合器。水溶液和有机溶剂的不适当混合会导致吸光值基线的扰动。改用较大的混合器, 并在不连接层析柱的情况下进行测试运行, 以确保吸光值基线是稳定的。

表 6.1. 混合器大小的建议

| 运行时                                       | 如何做                |
|-------------------------------------------|--------------------|
| 以较低的流速和较小的梯度体积运行小的层析柱时                    | 改用较小的混合器将减少系统体积的影响 |
| 以高流速和 / 或使用难混合的溶液时, 例如使用高盐浓度或混合具有有机溶剂的水溶液 | 改用较大的混合器进行适当的混合    |



# 电导率干扰

电导率曲线形状的扰动表明混合不当。如果混合器的内部体积太大，则梯度的形状和斜率将会受到影响，这可以从电导率曲线上观察到，即斜率受到干扰。这种影响在低电导率和高电导率时最为明显，如图 6.1 所示。特别重要的是，当放大到较大的层析柱时，尤其要注意这种影响。

当更换不同大小的混合器时，可通过不使用层析柱测试运行，将实际梯度的斜率和编程梯度的斜率进行比较。

# 梯度延迟体积

当计划一个梯度运行时，考虑层析柱前的系统延迟体积十分重要。这就是所谓的梯度延迟体积。如图 6.2 所示，在层析图谱中，实际梯度将比编程梯度（B%曲线）延迟。梯度的形状也受到混合器效应的影响。通过在最终洗脱条件下继续运行直到达到目标值，以此确保到运行结束时电导率达到编程梯度的值。需要根据实验确定添加的体积。

 在 ÄKTA 系统中，默认的混合器效应已经包含在系统 /UNICORN™ 软件的“梯度延迟体积”中。

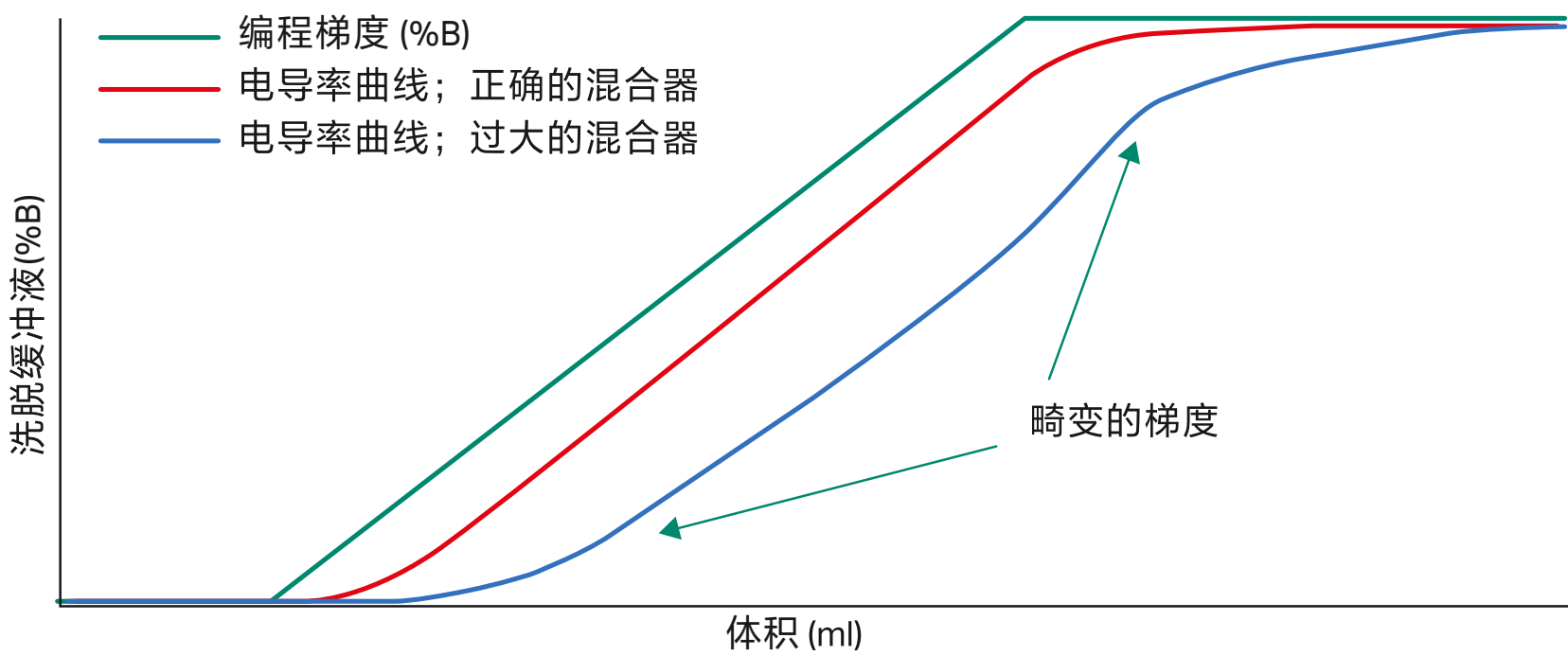


图 6.1. 在混合器过大的系统中，实际梯度将与编程梯度不同。

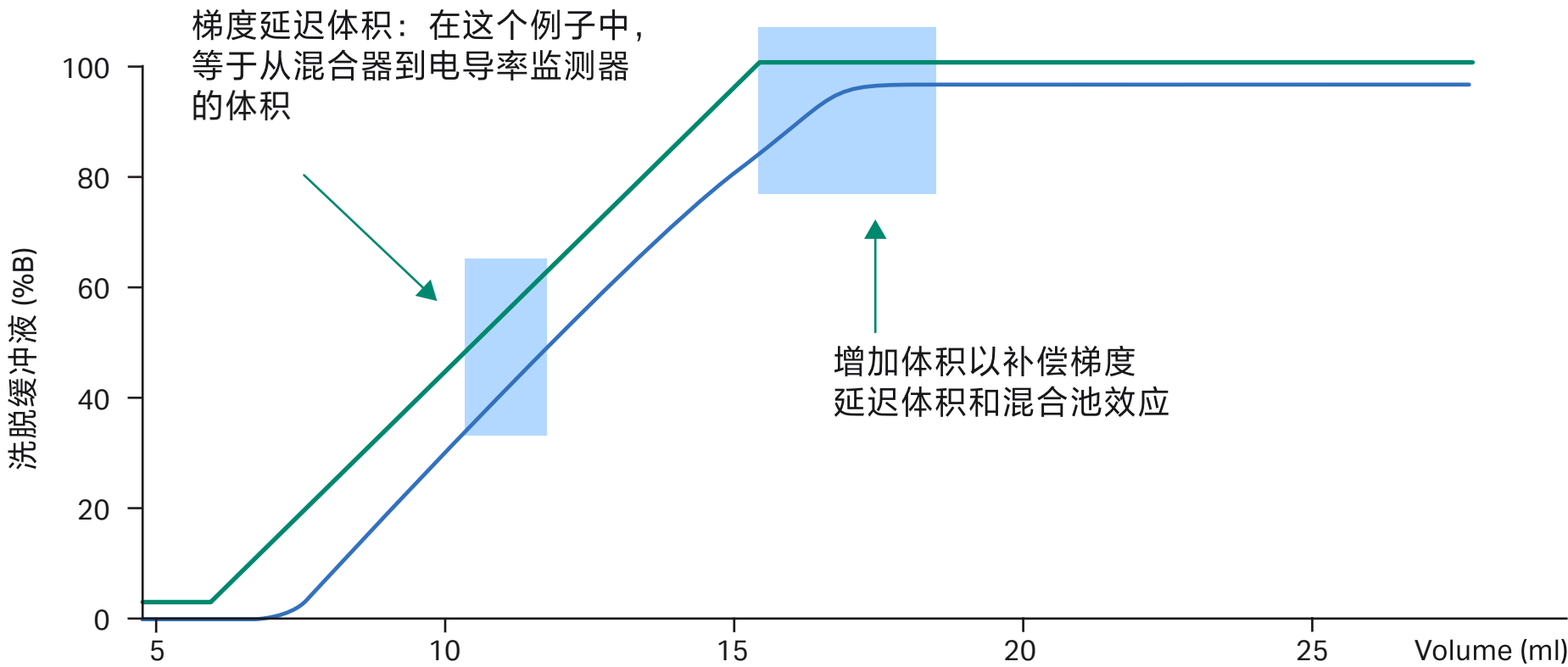


图 6.2. 实际梯度（蓝色）与编程梯度（绿色）的比较。

## 当改变层析柱大小时维持恒定的梯度斜率

梯度长度通常用  $X$  层析柱体积 (CV) 来定义。维持恒定的梯度将保证放大或缩小时梯度的斜率不会发生变化。例如, 如果梯度长度是 10 CV, 对于一根 1 ml 的层析柱这等于 10 ml, 而对于 10 ml 的层析柱这等于 100 ml。

梯度延迟体积与所使用的层析柱无关。只要层析柱在相同的系统中使用相同的混合器运行, 延迟体积就会相同。例如, 梯度延迟体积是 5 ml, 当运行在上述例子时要增加 5 ml。因此, 对于一根 1 ml 的层析柱, 加入的总体积将等于 10 ml + 5 ml, 而对于 10 ml 的层析柱, 它将等于 100 ml + 5 ml。

 如果系统自带编程的方法, 则梯度延迟体积将包含在方法中 ( 例如, 在系统体积补偿模块中 )。

 附录 3 介绍了如何计算延迟体积。

 在放大或缩小过程中, 确保使用最佳大小的混合器 ( 见上文 )。如果新的规模需要改变混合器, 也记得在系统 / UNICORN 软件中更新“梯度延迟体积”。



07

# 系统压力

# 系统压力

当运行液体通过系统时将生成背压。如果背压超过任何设定的压力上限, 将会触发警报, 并且系统将会停止, 这是层析中一个常见的问题。因此, 理解高压产生的原因以便避免它十分重要。

## 背压影响

保持背压尽可能低十分重要, 因为层析柱和系统组件往往对高压敏感。表 7.1 重点介绍了背压过高的原因, 并就如何避免背压过高提出了建议。

表7.1. 导致背压增加的因素

| 因素       | 如何尽可能减少影响                                                  | 注释                                                      |
|----------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 管路       | 保持管路尽可能短, 并优化内径                                            | 较大的内径将降低背压, 但是对分辨率有不利的影响, 见第 3 章                        |
| 在线滤器     | 定期更换过滤器                                                    | 在线滤器将防止溶液中的颗粒进入流路和层析柱。随着时间推移, 过滤器将开始堵塞, 压力将会增加          |
| 缓冲液 / 溶液 | 当运行高粘度缓冲液 / 溶液时降低流速                                        | 混合不同的液体, 例如在梯度中, 能够增加粘度, 从而导致更高的背压                      |
| 样品       | 在上样过程中稀释粘性样品或降低流速; 如果用系统泵上样, 则去除在线滤器。                      | 为了避免超压, 一些系统具有压力控制的上样, 其流速随着压力增加而降低                     |
| 层析柱      | 清洗层析柱不要使用小于应用要求的颗粒或层析柱直径                                   | 关于清洗程序见层析柱说明书; 较小的颗粒将提供较高的分辨率, 但也会提供较高的背压               |
| 限流器      | 当使用在高流速下产生低压的层析填料时, 可考虑除限流器。但要注意, 气泡有可能进入紫外 / 可见光吸收监测器流通池。 | 限流器存在的原因是防止气泡存在于紫外 / 可见光吸收监测器流通池。当运行会产生高背压的层析柱时, 这十分重要。 |

# 管路对背压的影响

为了保持低的峰展宽, 管路应该具有小的内径, 并且很短 ( 见第 3 章 )。缺点是狭窄的管路增加了系统中的背压。如果系统配备的管路太狭窄, 产生的压力对于所使用的层析柱可能过高。

图 7.1 显示了不同内径的管路生成的压力。在这个例子中, 要运行压力上限 0.5 MPa (5 bar, 72.5 psi) 的层析柱, 需要内径至少为 0.35 mm 的管路。在实际中, 建议不要在接近层析柱压力上限时运行, 因为压力报警会停止系统。在上述例子中, 推荐使用 0.5 mm 的管路。

# 压力报警

为了保护层析柱硬件和层析填料的填充床, 防止压力过高, 设置正确的压力报警十分重要。为了找到压力上限, 请查看层析柱和填料说明书, 并按照下面所述设定报警。

对于只测定系统泵压力的系统:

- 压力报警上限应设定为层析柱硬件或填料填充床的最低限。

对于具有三个压力传感器的系统:

- 柱前压力的压力报警应设定为层析柱硬件的压力限值。这受层析柱以及位于柱后的系统流路所产生的压力的影响。
- 对于  $\Delta p$  的压力报警应设定为填料的压力限值, 如果有的话。

压力之间的关系是:

$\Delta p = p1$  ( 由层析柱和柱后流路产生的压力 )–  $p2$  ( 由柱后流路产生的压力 ), 见表 7.2 和图 7.2。

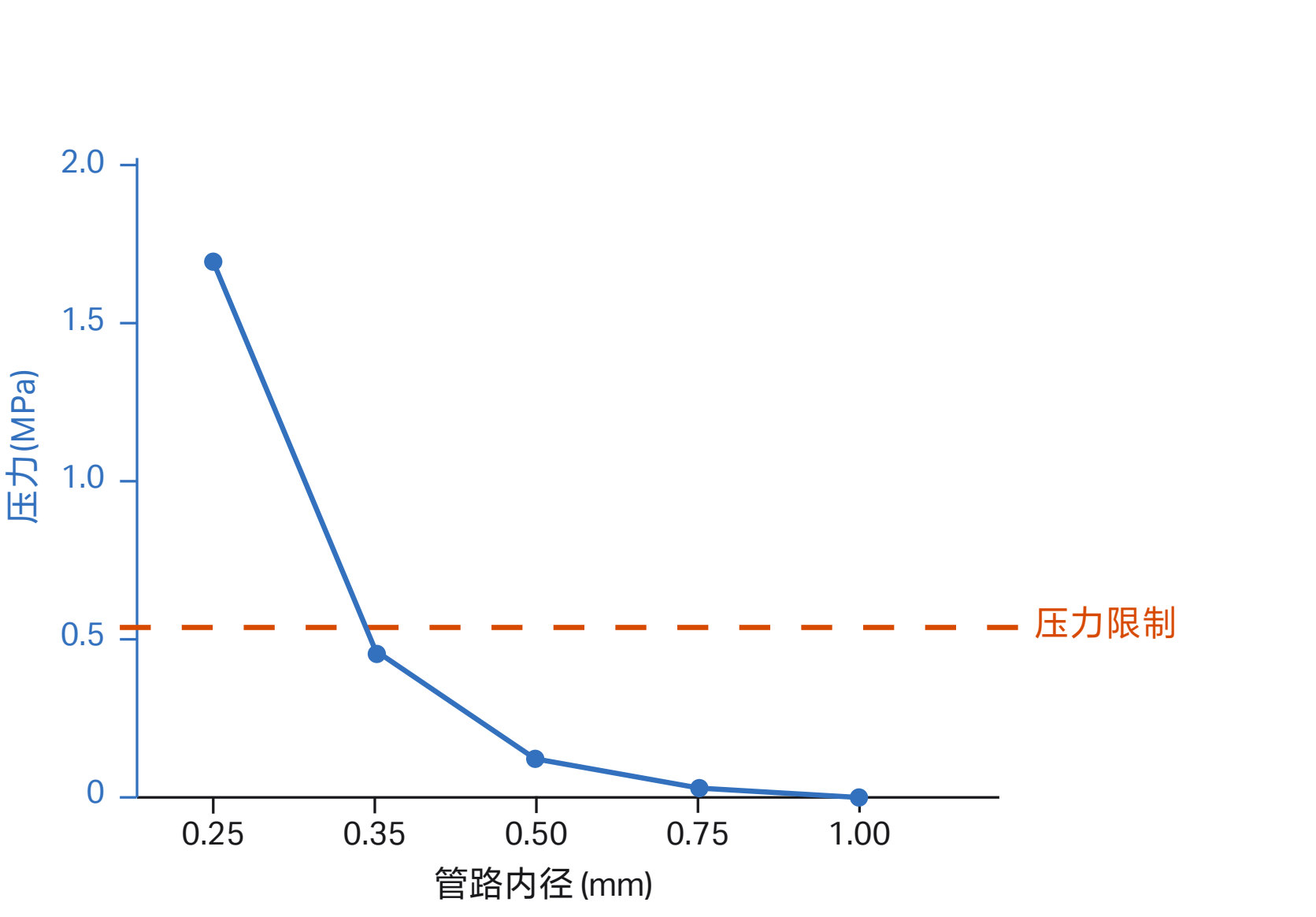


图7.1. 管路内径对背压的影响。管路长度: 200 cm。流速: 10 ml/min。使用的溶液: 室温下的水。



表 7.2. 压力监测

| 监测器             | 测量的压力 | 包含           | 压力限保护 |
|-----------------|-------|--------------|-------|
| P <sub>系统</sub> | 系统压力  | 包括层析柱在内的完整流路 | 系统*   |
| p1†             | 柱前压力  | 层析柱 + 柱后流路   | 层析柱硬件 |
| p2†             | 柱后压力  | 柱后流路         | N/A   |
| Δp = p1 – p2    | Δ柱压   | 层析柱          | 填充床‡  |

\* 对于在泵上具有一个压力监测器的系统, 仍然可以通过将系统压力限值设置为层析柱硬件或填料填充床的最低压力限值来保护层析柱。

† 适用于ÄKTA avant 和 ÄKTA pure ( 连接 5 根层析柱的柱位阀 V9-C )。对于 ÄKTA pure ( 无柱位阀或具有柱位阀 V9-Cs[连接一根层析柱] ), 需根据系统的压力 (P<sub>系统</sub>)、流速、温度和管路尺寸计算 p1。

‡ 为了充分利用层析柱 ( 例如 Superdex Increase 和 Superose™ Increase 层析柱 ), 需要测定各个 Δ 柱压限值。 关于操作步骤的详细说明, 请参阅层析柱随附的使用说明书。

Δp报警用于:

- 自填层析柱的质量检查  
对于一根新填的层析柱, 太高的 Δp 表明可能需要改进装柱。
- 对增加的 Δp 的通知  
反复使用后, 层析柱被杂质附着, 因此压力将会增加。为了恢复最佳的层析柱条件, 进行在位清洗 (CIP) 和 /或更换层析柱顶部过滤器。
- 流量调节  
“使用压力控制的样品上样”一节中介绍通过“压力控制的样品上样”调节流速以避免压力报警。

## 压力监测

系统总压力是由整个系统流路产生的。所有的 ÄKTA 层析系统在系统泵处测量这个压力 ( 图 7.2 ), 而有些系统也层析柱前后安装了额外传感器 (p1 和 p2)。这样就可以计算出层析柱上的压力降 (Δp), 从而获得有关填充床状况有用的信息。在不使用柱位阀或使用单柱位阀的 ÄKTA pure 系统中, p1 被计算并显示为柱前压力。

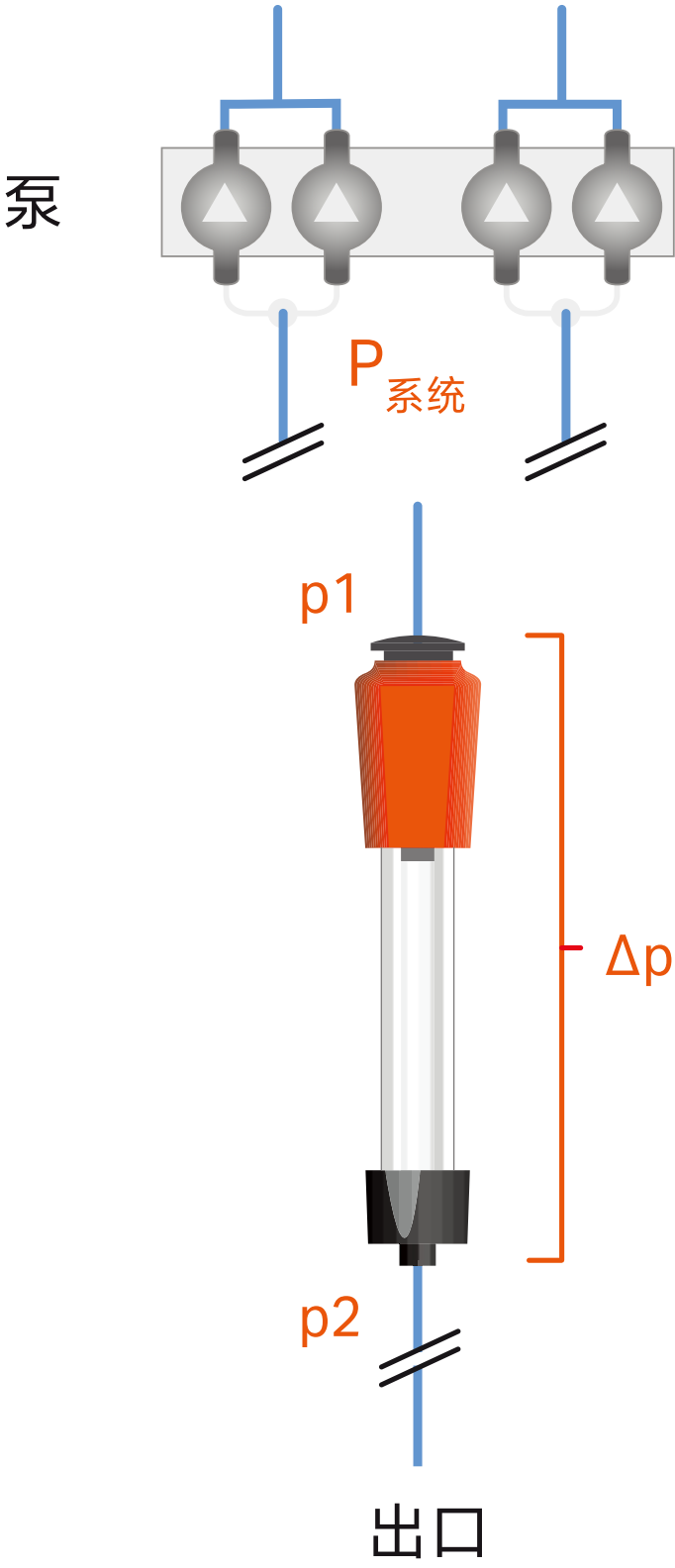


图 7.2. 压力在 ÄKTA 色谱系统的系统泵柱前 (p1) 和柱后 (p2) 处测量。

对于不同的压力监测器可以设定不同的报警上限, 如表 7.2 所示。

-  测量的值包括用于连接层析柱到仪器的管路
-  管路尺寸 ( 内径、长度 ) 可能会影响压力值。

## 背压对层析柱和填充床的影响

压力由流过层析系统的液体产生。为了获得最佳的层析性能, 理解在层析系统的不同部分压力降的原理十分重要。

-  层析柱硬件和填充床具有不同的耐压性, 如图 7.3 和 7.4 所示。

### 保护层析柱硬件:

影响层析柱硬件的压力 (p1) 取决于由层析柱本身所生成的背压和由层析柱后的系统所生成的背压的总和。

层析柱硬件压力限是硬件可以耐受而不被损坏的最大压力。这个值对于每种类型的层析柱是固定的。

层析柱硬件压力限在用户说明书中以及 UNICORN 层析柱列表中能够查询到。

### 保护填充床:

最大流速是填充床可以耐受且不会形成间隙或发生塌陷的最大流速。最大流速可以在层析柱说明书和 UNICORN 层析柱类型列表中找到, 它是在室温下用水测定的。当改变运行条件时, 如温度和粘度, 最大流速会受到影响 ( 表 7.3 )。因此, 根据所使用的运行条件调节流速十分重要。

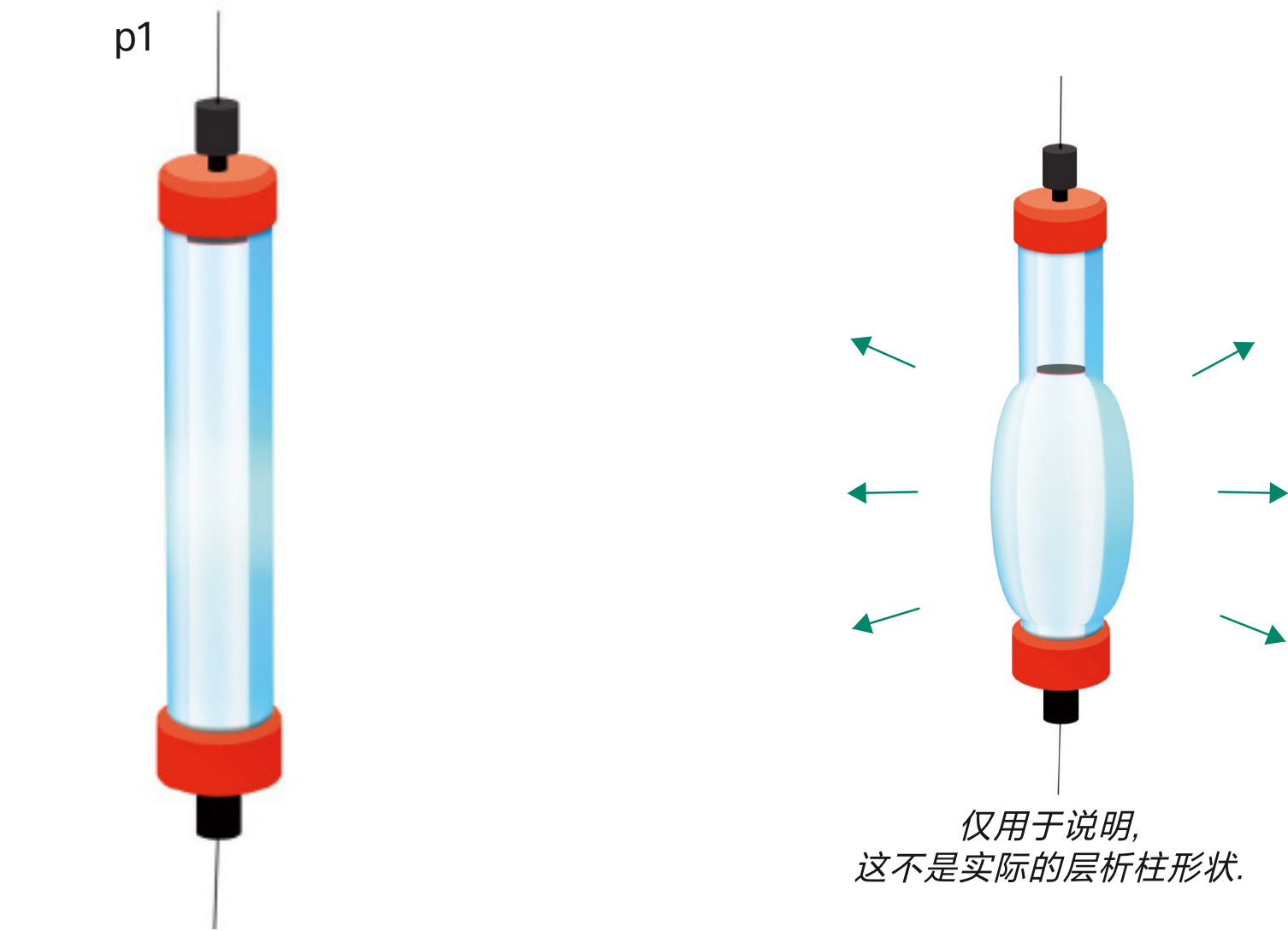


图 7.3. 柱前压力 (p1) 影响层析柱硬件。当达到层析柱硬件压力限时, 层析柱将破裂或开始泄漏。



**Table 7.3.** 如何设置常用运行条件下的最大流速; 经验法则。

| 液体             | 室温下流速  | 冷库中流速  | 典型应用 |
|----------------|--------|--------|------|
| 水              | 最大流速*  | 最大流速/2 | †    |
| 20% 乙醇         | 最大流速/2 | 最大流速/4 | 保存   |
| 10% 甘油         | 最大流速/2 | 最大流速/4 | 稳定   |
| 2 M 硫酸铵        | 最大流速/2 | 最大流速/4 | HIC  |
| 0.5 至 1 M NaOH | 最大流速*  | 最大流速/2 | 清洗   |

\* 室温下用水测定

† 大多数常用的缓冲液如 PBS 和 Tris 具有与水几乎相同的粘度

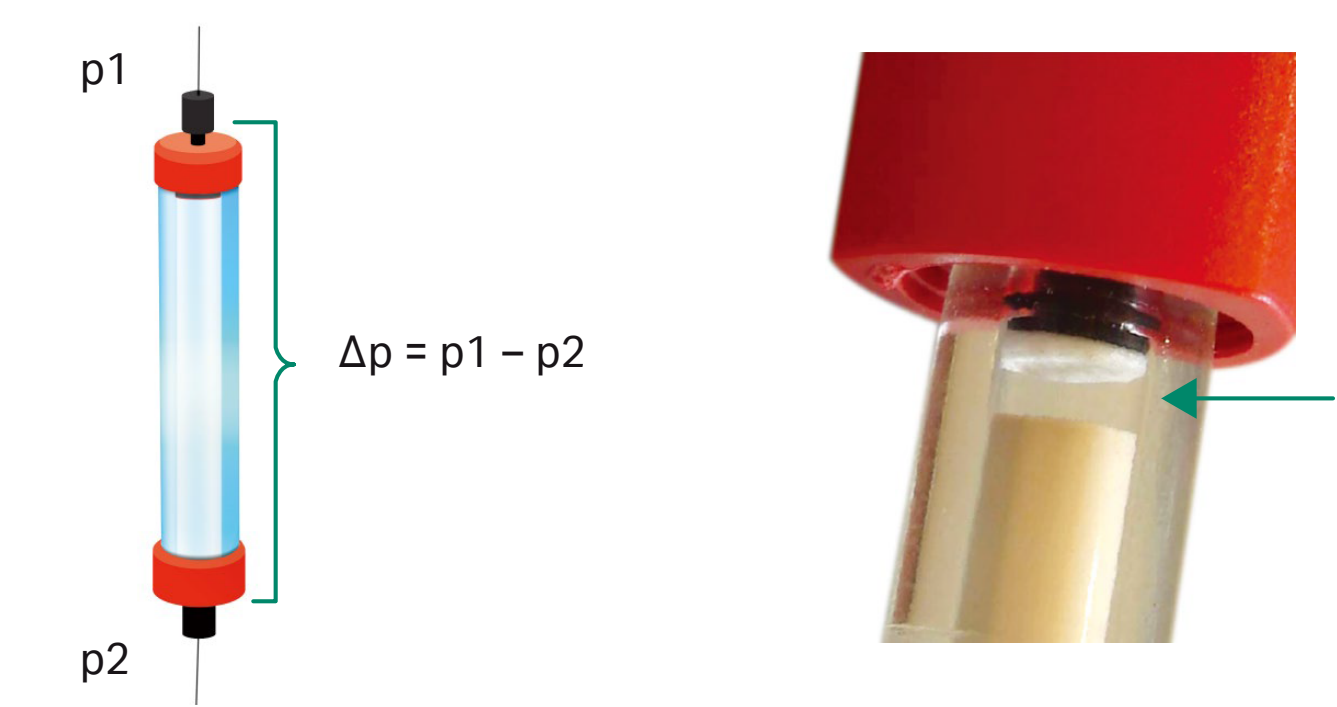
在规定的粘度和温度下, 对于一种特定类型的层析柱 ( 柱尺寸和层析填料 ) 的最大流速是固定的, 而不同层析柱下最大流速下产生的最大  $\Delta p$  则各不相同 ( 图 7.4 )。

对于每种类型的层析柱, 在层析柱说明书和 UNICORN 层析柱列表中提供  $\Delta p$  或填充床上的最大压降, 并提供起始值。

 根据运行条件改变流速 ( 表 7.3 ) 是保护填充床的一个好办法。

## 限流器的功能

限流器可产生稳定的背压。因此, 它可以防止可能会干扰监测器信号的气泡的形成, 气泡是由于压降而在柱后形成。此外, 限流器可以用于防止虹吸, 例如, 如果溶液被放置在泵的上面。限流器可以比作香槟瓶上的软木塞 ( 图 7.5 )。由限流器产生的压力将有助于保持空气溶解在溶液中。



**图7.4.**  $\Delta p$  是影响层析柱内层析填料的压力。最大的  $\Delta$  层析柱压力定义为填充床在最大流速下的压力降。超过这个限度可能导致缝隙形成 ( 用箭头表示 ) 或填充床的崩塌。



**图 7.5.** 限流器可以被比作香槟瓶上的软木塞。



图 7.6 举例说明了在 1 ml/min 流速下, 限流器对填充床的影响。在没有限流器 ( 图 7.6A ) 时, 流速产生的泵压读数为 0.3 MPa (3 bar, 44 psi)。这个压力等于层析填料和层析柱硬件上的压降。为了简化, 本示例中不包括由柱后管路产生的背压。当在层析柱后添加一个产生 0.2 MPa (2 bar, 29 psi) 背压的限流器时 ( 图 7.6B ), 层析柱硬件上的压力 (p1) 受到影响, 达到 0.5 MPa (5 bar, 72 psi)。因此, 在系统泵处的系统压力读数将是 0.5 MPa (5 bar, 72 psi)。然而, 填充床上的压降仍是 0.3 MPa (3 bar, 44 psi), 因为  $\Delta p = p1 - p2$ 。

 限流器只影响层析柱硬件压力, 填充床的压力不受影响。

## 限流器的去除

我们建议保持限流器在线连接, 因为溶液中形成的气泡有可能干扰监测器。

 在只有泵处监测压力的系统中使用 HiTrap™ 和 HiPrep™ 层析柱时, 请考虑下列的修改: 与其移除限流器以避免触发高压警报, 不如提高压力限, 将限流器产生的压力包括在内 (例如 0.2 MPa [2 bar, 29 psi])。然而, 不要设定压力限超过 0.5 MPa (5 bar, 73 psi), 因为这是 HiTrap 和 HiPrep 层析柱的柱硬件压力限。( 注: UNICORN 色谱柱列表中已针对支持的层析柱执行了此操作 )。

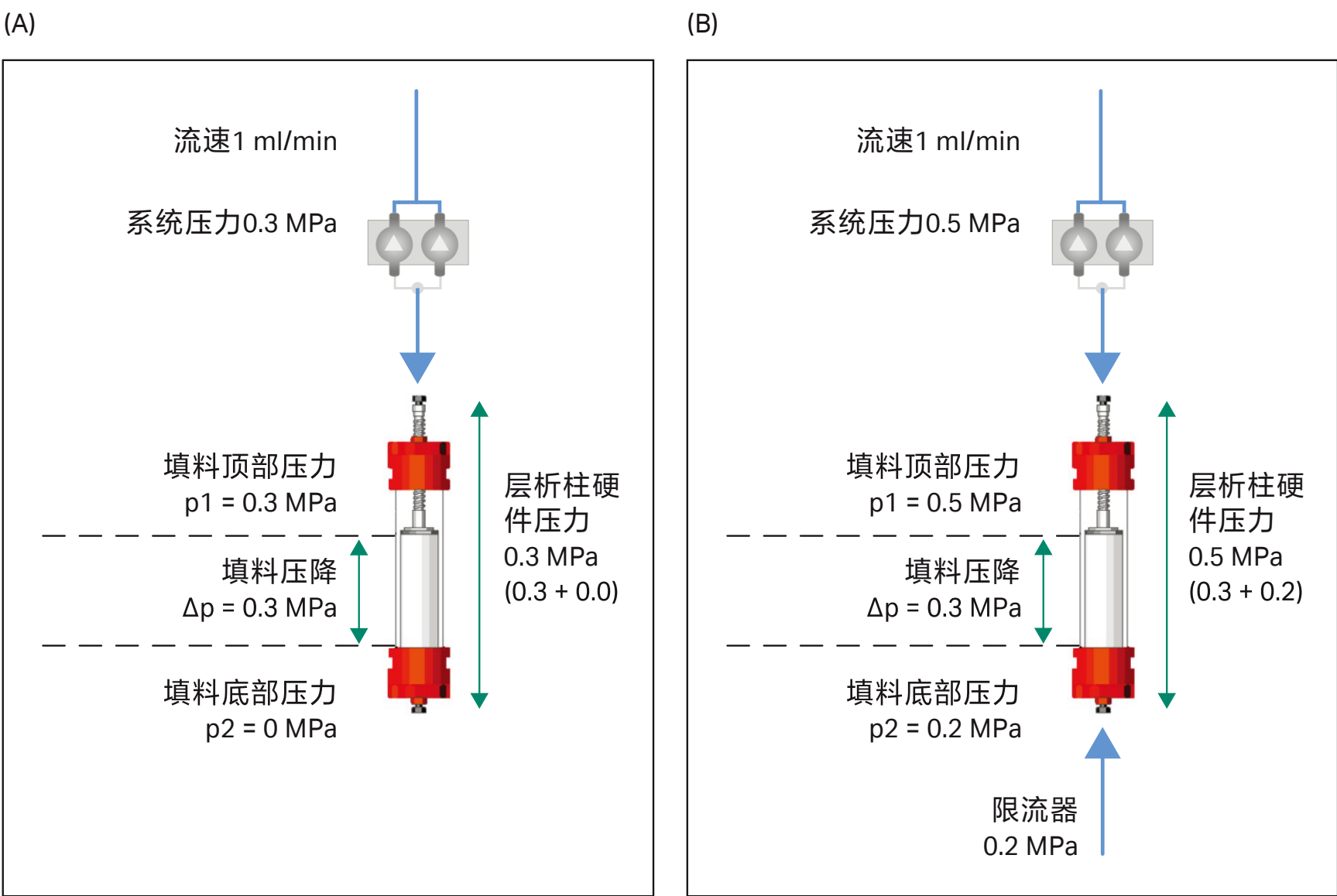


图 7.6. 限流器对不同压力读数的影响。(A) 无限流器, (B) 有限流器。

# 高背压故障排除

背压过高的原因有很多 ( 表 7.1 )。确定问题的逻辑方法如图 7.7 所示。首先绕过或断开层析柱。如果高压在旁路模式中被释放, 则需要检查和清洗层析柱。工作流程建议见附录 4, 如果高压与层析柱无关, 应按照下文所述定位系统堵塞。

 如何清洗层析柱的信息, 请参阅层析柱说明书

为了找出流路堵塞, 请以能保持压力足够低的流速启动泵, 这样就不会触发警报。记下测得的系统压力。然后, 从组分收集器开始, 松开第一个接头。如果压力没有变化, 则重新拧紧, 并移到下一个接头 ( 向泵的方向 )。松开这个接头, 检查压力变化, 拧紧, 直到找到释放压力的接头为止。这就是流路堵塞的地方。堵塞经常是由管路堵塞引起。如果是这种情况, 根据需要更换管路。在不太严重的情况下, 进行系统流路的在位清洗。

在有些情况下, 需要校准系统以重置压力传感器。这应该在零压力下进行。详细信息见具体的系统用户手册。

# 粘稠样品和溶液

系统背压受到液体粘度的影响。一些盐、高盐浓度和低温以及有机溶剂和水溶液的混合液增加了液体的粘度。原样 ( 例如细胞裂解物 ) 通常具有很高的粘性。

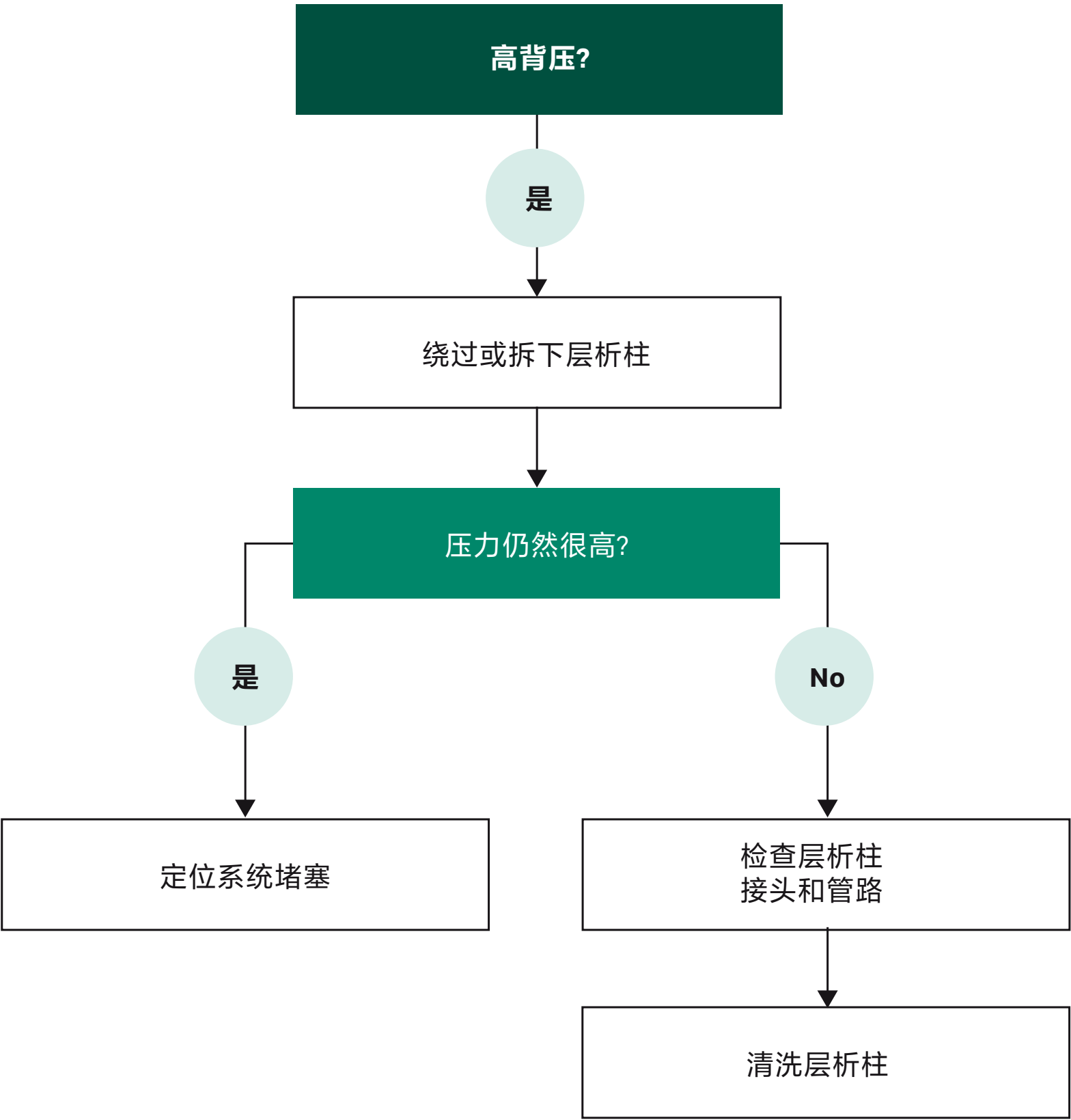
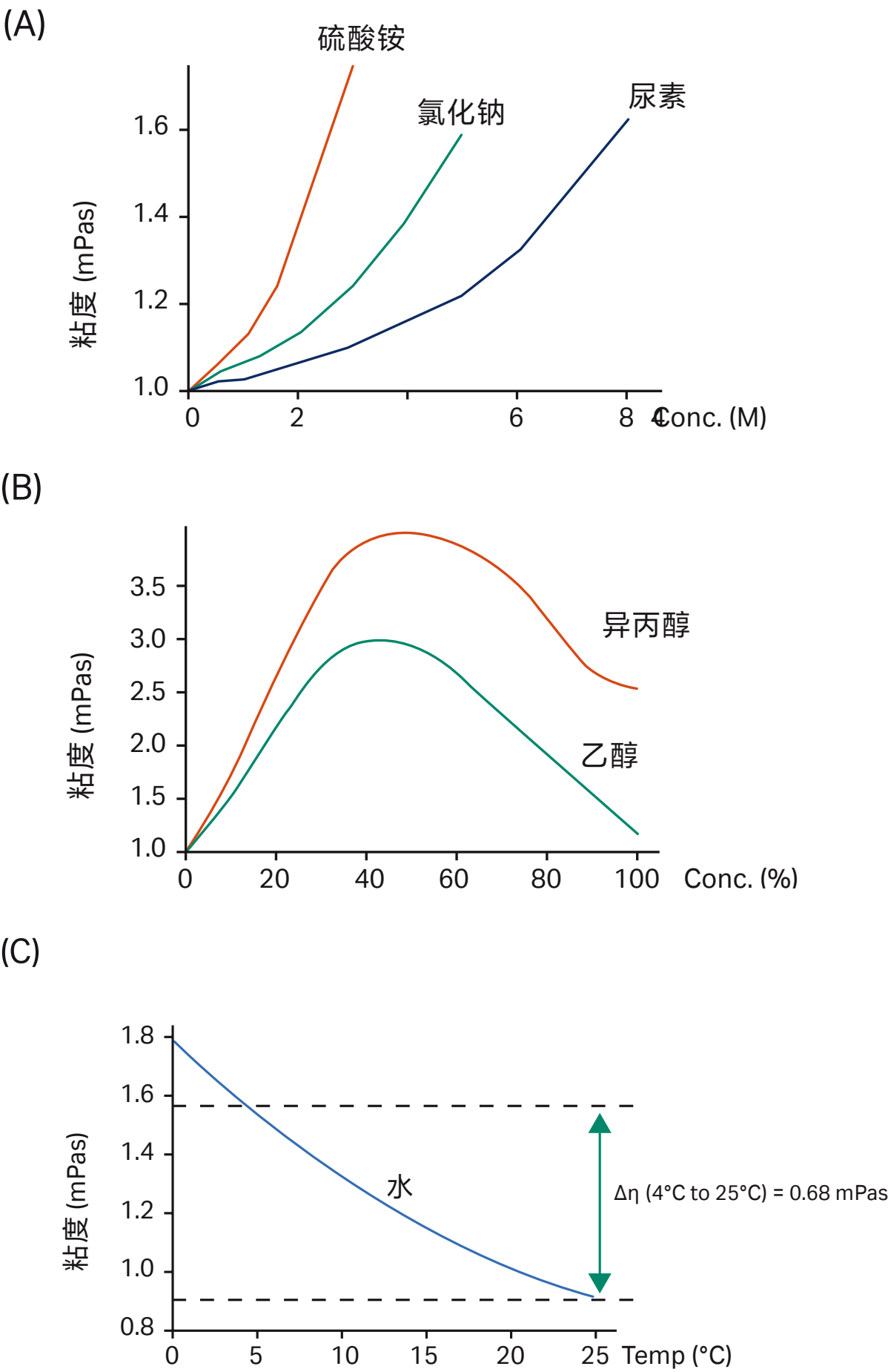


图 7.7. 高背压故障排除。



**图 7.8** 盐的种类、盐浓度 (A)、水中有机溶剂含量 (B) 和温度 (C) 对粘度的影响。1 mPas = 1 cP。

图 7.8 显示了常用的液体和层析中的温度引起粘度变化的一些例子。

常用缓冲液和溶液的粘度, 甚至包括 1 M NaCl 和 1 M NaOH, 只略高于水, 因此通常在 层析运行过程中不会成为问题 (图 7.8A)。当混合水和有机溶剂 (例如 20% 乙醇) 时, 粘度将明显升高 (图 7.8B), 产生的背压也大大升高。在清洗层析柱中的乙醇时就

会出现这种现象。为了保持在压力范围内, 需要降低流速。

由于粘度与温度有关, 因此压力随着温度降低而增加。在冷库温度 (大约 4°C 下) 产生的压力几乎是室温 (大约 25°C) 下的两倍 (图 7.8C)。由于层析柱的压力限, 需要降低流速以避免高压。

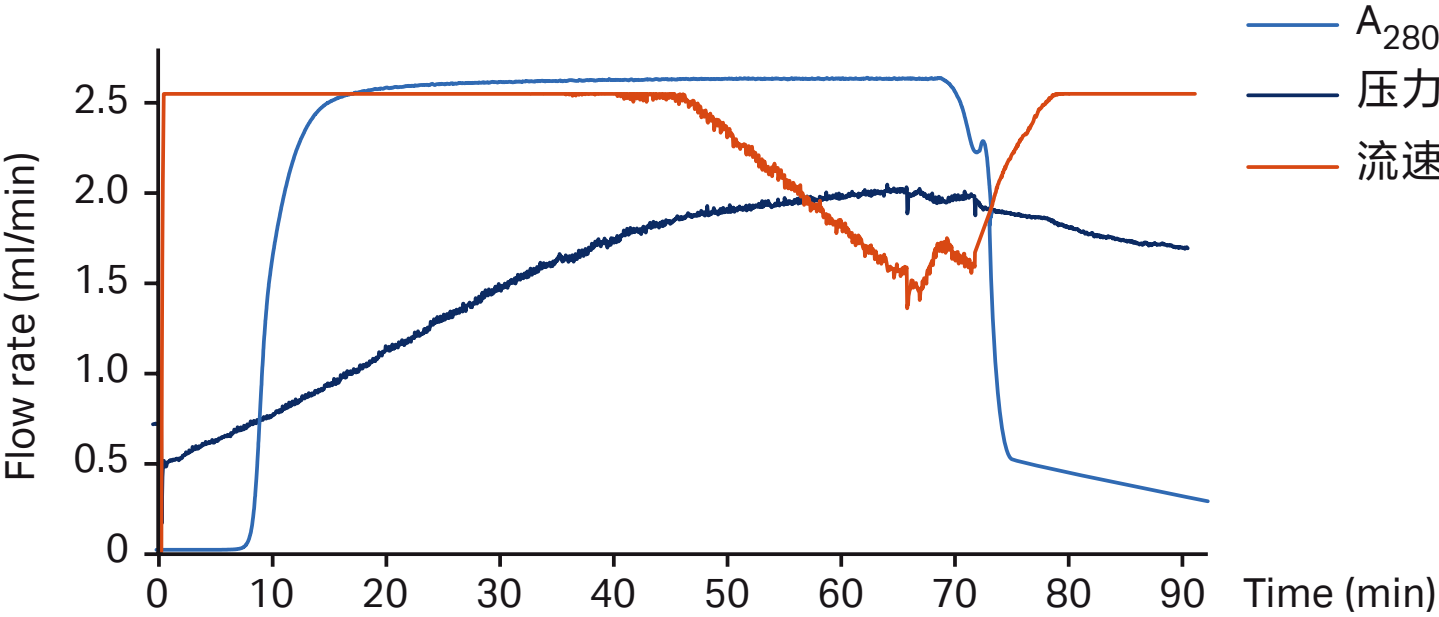
## 控压上样

当上样时, 层析柱上物质会大量积累, 导致达到压力上限并触发警报。累积物由污染物组成, 例如变性蛋白、核酸和脂类。即使样品在运行前已经澄清, 也会出现这种物质堆积。

在一些 ÄKTA 系统中, 可以使用控压上样。然后在运行过程中, 系统将监测压力, 如果压力接近设定的上限, 则流速将被逐渐降低以避免触发警报。

图 7.9 显示了一个例子, 其中 150 ml 的样品被上样到层析柱上。在大约上样 110 ml 后 (即 44 min), 压力变得太高, 流速自动下调以便压力保持在一个可接受的水平。当压力降低时 (在洗涤阶段), 流速将被自动上调。

**层析柱:** HiScreen™ Capto™ adhere  
**样品:** 来自 MabSelect SuRe™ 的洗脱组分; pH 6.75, 条件用 NaCl 调节为 15 mS/cm 电导率  
**上样:** 穿透模式, 150 ml of 200 mg MAb/ml  
**流速:** 2.5 ml/min  
**系统:** ÄKTA avant 25



**图 7.9** 控压上样。



08

# 样品的监测和 监测器

# 样品的监测和监测器

蛋白质纯化中使用在线监测器。为了监测纯化过程, 通常使用紫外/可见光监测器, 因为大多数蛋白质在 280 nm 处吸收光。在吸光度曲线下方的面积对应于蛋白质浓度, 并提供蛋白量的指示。

其他类型的监测器可以用于收集关于纯化过程的更多信息, 例如, 电导率和 pH 监测器。

## 监测紫外 / 可见光吸收率

### 使用的波长

测量 280 nm 的紫外吸光值将提供关于被洗脱蛋白和总蛋白含量的信息。蛋白质吸收紫外光的能力主要是由于色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的存在, 它们在 280 nm 强烈吸收光。然而, 一些蛋白质只有几个或非暴露的芳香族氨基酸残基, 因此在 280 nm 显示弱的吸光值。

除了蛋白质外, 其他生物分子也能够吸收光。对于一个纯化方案, 有时候检查这些分子是有用的。表 8.1 举例说明了一些可以用于检测不同生物分子的波长。

 如果在 280 nm 获得低吸光值读数, 尝试在 214 nm 检测, 此波长下肽键会吸收光。

 ÄKTA 紫外 / 可见光吸收监测器线性达到 2000 mAU。高于该值的信号与蛋白浓度不成正比。

一些层析系统具有多波长监测器, 可以同时观察目标蛋白和关键的杂质。一些蛋白质在多个波长下都有吸收, 例如 GFP, 它在 490 nm 也具有最大的吸光值。这种情况下, 在 280 nm 和 490 nm 的测定将有助于确定哪个峰含有目标蛋白 (图 8.1)。

表 8.1. 检测不同生物分子的波长

| 波长 (nm) | 吸收                      |
|---------|-------------------------|
| 214     | 肽键, 部分的肽和蛋白质            |
| 230     | 有机化合物或离液盐               |
| 260     | DNA/RNA                 |
| 280     | 芳香族氨基酸残基 (色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸) |
| 390/420 | 辅酶 (例如血红素蛋白)            |
| 490     | 绿色荧光蛋白 (GFP)            |
| 600     | 蛋白质聚合物                  |



在纯化过程中, 有可能获得有关样品中污染物的信息。在 230 nm 附近的吸光度, 表示存在有机化合物或离液盐。在 260 nm 的高读数表示存在核酸。

 A260/A280 的比值可以衡量 DNA 和 / 或 RNA 纯度, 因此是纯化 DNA 或 RNA 时的一种有用的分析方法。如果这个比例接近 2, 则表示 DNA/RNA 纯度很高。

### 如何计算蛋白质浓度和量

用于 ÄKTA 层析系统的软件包括浓度计算和定量功能。简单输入蛋白质的消光系数和所使用的紫外/ 可见光流通池的光径长度, 软件会根据在 280 nm 的紫外吸光值数据计算蛋白质浓度和量。

为了获得高度准确的结果, 两个标准十分重要:

1. 紫外 / 可见光吸收率信号必须在紫外 / 可见光监测器的线性范围内。
2. 在计算中必须使用准确的紫外 / 可见光流通池光径长度。

对于 ÄKTA avant, 确切的光径长度已经被预定义并包含在软件计算中。对于其他系统, 各个系统的确切光径长度需要通过已知的吸光值测量一种或多种溶液的吸光值来通过实验确定 ( 见订购信息以确定使用哪种紫外/可见光流通池校准套件 ) 。当使用紫外 / 可见光流通池校准套件时, 根据朗伯 - 比尔定律测定确切的光径长度 ( 见下文 )。然后, 确切的光径长度必须手动输入软件的系统设置中。

### 使用哪种紫外 / 可见光流通池

根据朗伯 - 比尔定律, 吸光值和浓度之间的关系可以描述为:

$A = \epsilon \times b \times c$

其中 A = 吸光值,  $\epsilon$  = 消光系数, b = 流通池光径长度, c = 浓度

为了获得线性吸光值范围内的吸光值信号, 可以选择不同的流通池长度 ( 如表 8.2 所示 )。

 蛋白质的氨基酸序列可用于计算其理论吸收系数。网络计算器可用于帮助测定这个数字。  
比如<http://www.biomol.net/en/tools/proteinextinction.htm> 就是这样一个计算机。

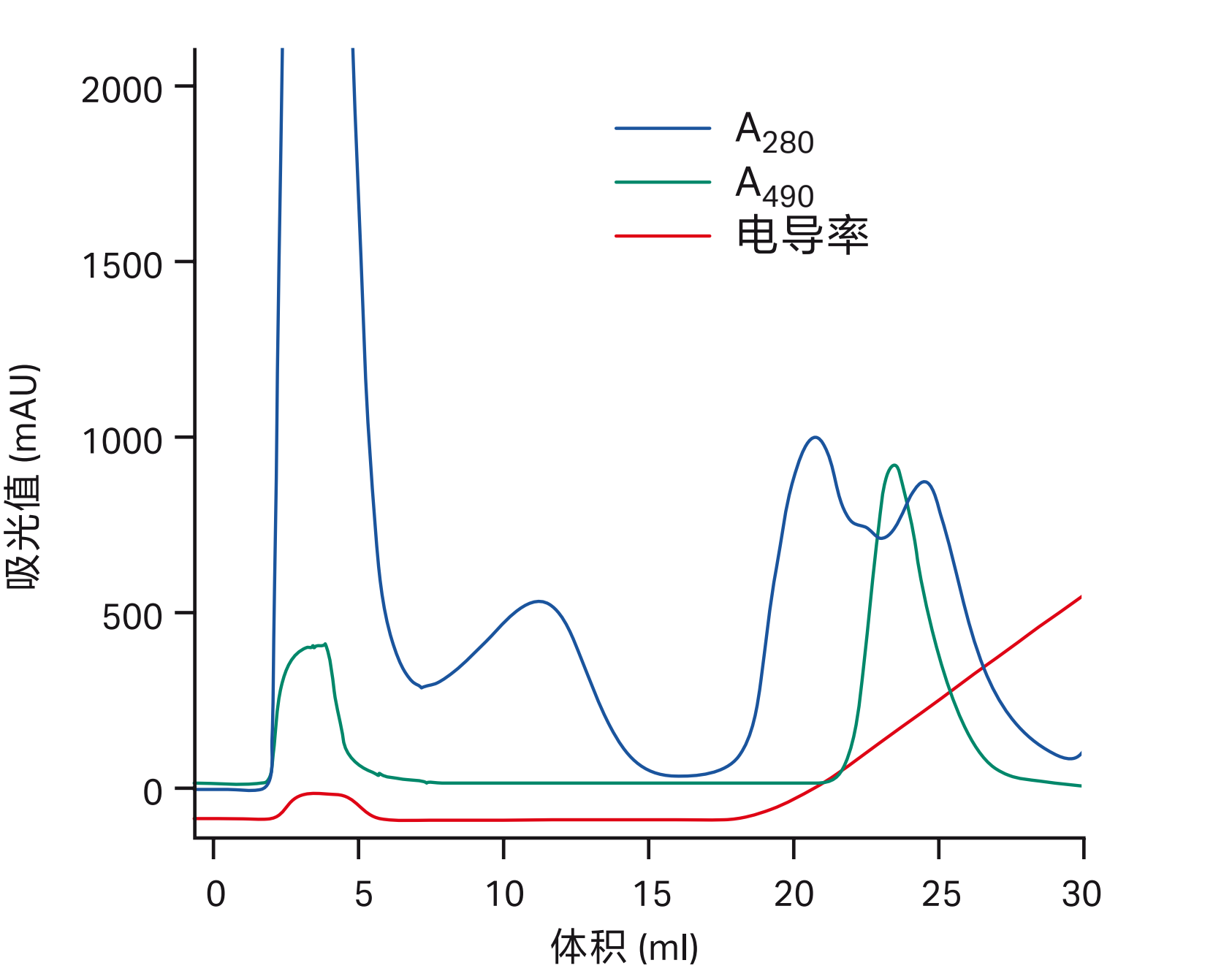


图 8.1. GFP 在 490 nm 吸光度值测量的特异检测。

表 8.2. 紫外/可见光流通池光径长度的影响

| 吸收信号 | 紫外 / 可见光流通池光径长度的影响           |
|------|------------------------------|
| 低    | 切换为较长的流通池将增加信号。              |
| 高    | 如果吸光值超出线性范围, 切换到较短的流通池将降低信号。 |

液体和化合物

在纯化运行过程中, 不同的溶液和化合物能够导致紫外 / 可见光吸光度曲线的偏差。表 8.3 列出了一些常见的例子和解决方法。

噪声和不敏感的紫外 / 可见光吸光度测量

噪声和不敏感的紫外/可见光吸光度曲线的最常见原因是流通池脏了。如第 10 章所述清洗流通池。

这个问题也可能是由于流通池内的气泡。更详细的信息见第 7 章中关于限流器的讨论。

老化的紫外灯

随着时间推移, 紫外 / 可见光吸光监测器灯的光强度将降低。当出现低强度警告时, 就该更换灯了。

注意：只要没有出现强度警告，所显示的紫外 / 可见光吸光度信号都将是正确的值。这是因为监测器使用了一个参考信号，测量的紫外/可见光吸光度就是根据这个参考信号进行归一化的。

表 8.3. 处理紫外 / 可见光吸光度曲线的偏差

| 影响                               | 原因                                                                                                                        | 如何解决                                                                     |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 在紫外 / 可见光吸光度曲线中的意外漂移<br>或假阴性或假阳性 | 折射率的偏差, 例如, 当从以下溶液切换时: <ul style="list-style-type: none"><li>RPC 过程中从水到有机溶剂。</li><li>HIC 过程中高盐到无盐</li></ul>               | 如果可能, 切换到具有不同折射率的溶剂。<br>当评估结果或进行峰积分时, 调整基线。                              |
| 高的紫外/可见光吸光值基线                    | 溶液吸收紫外光, 例如： <ul style="list-style-type: none"><li>214 nm 的柠檬酸盐缓冲液</li><li>280 nm 的不纯的咪唑</li><li>280 nm 氧化型 DTE</li></ul> | 如果可能, 使用另一种缓冲液系统取代柠檬酸盐。<br>使用高纯度的咪唑。<br>DTE 是一种还原剂, 会随着时间而氧化。仅使用新鲜配制的溶液。 |

# 监测电导率

电导率监测器用于检测层析运行过程中盐浓度和其他带电分子的变化。它可以用于收集如表 8.4 所示的各种信息。电流施加在电导池中，然后测量电极之间的电阻并用于计算洗脱液中的电导率。

 电导率只对大约 0.3 M 的盐浓度是线性的。因此测量所使用溶液的电导率而不是计算它十分重要。

在盐梯度中，随着盐浓度的升高，将看到线性关系的降低 ( 图 8.2 )。

## 电导率测量具有温度依赖性

根据以下公式, 电导率信号将随温度升高:

$$C_t = C_{t_{cal}} (1 + \alpha)^{\Delta t}$$

其中 Ct = 测量的电导率; C<sub>t cal</sub> = 参考温度下的电导率; 而 Δt = 参考温度与实际温度之间的差别。

常数 α 是浓度 - 和盐 - 依赖性, 但是对于许多盐, 0.02 是很好的平均值。

在所有的 ÄKTA 系统中 ( 除 ÄKTAexpress 外 ), 温度传感器安装在电导池内，以便进行温度补偿。补偿的电导值将会显示出来，这意味着可以比较在不同温度下生成的电导率曲线。

表 8.4. 从电导率监测收集的信息的例子

| 使用过程   | 使用目的              |
|--------|-------------------|
| 平衡     | 稳定的信号表示层析柱已被平衡    |
| 上样和洗涤  | 盐峰的检测             |
| 梯度洗脱   | 监测梯度形成            |
| 脱盐     | 盐峰的检测             |
| 洗脱故障排查 | 错误的流速在电导率曲线中被视作干扰 |

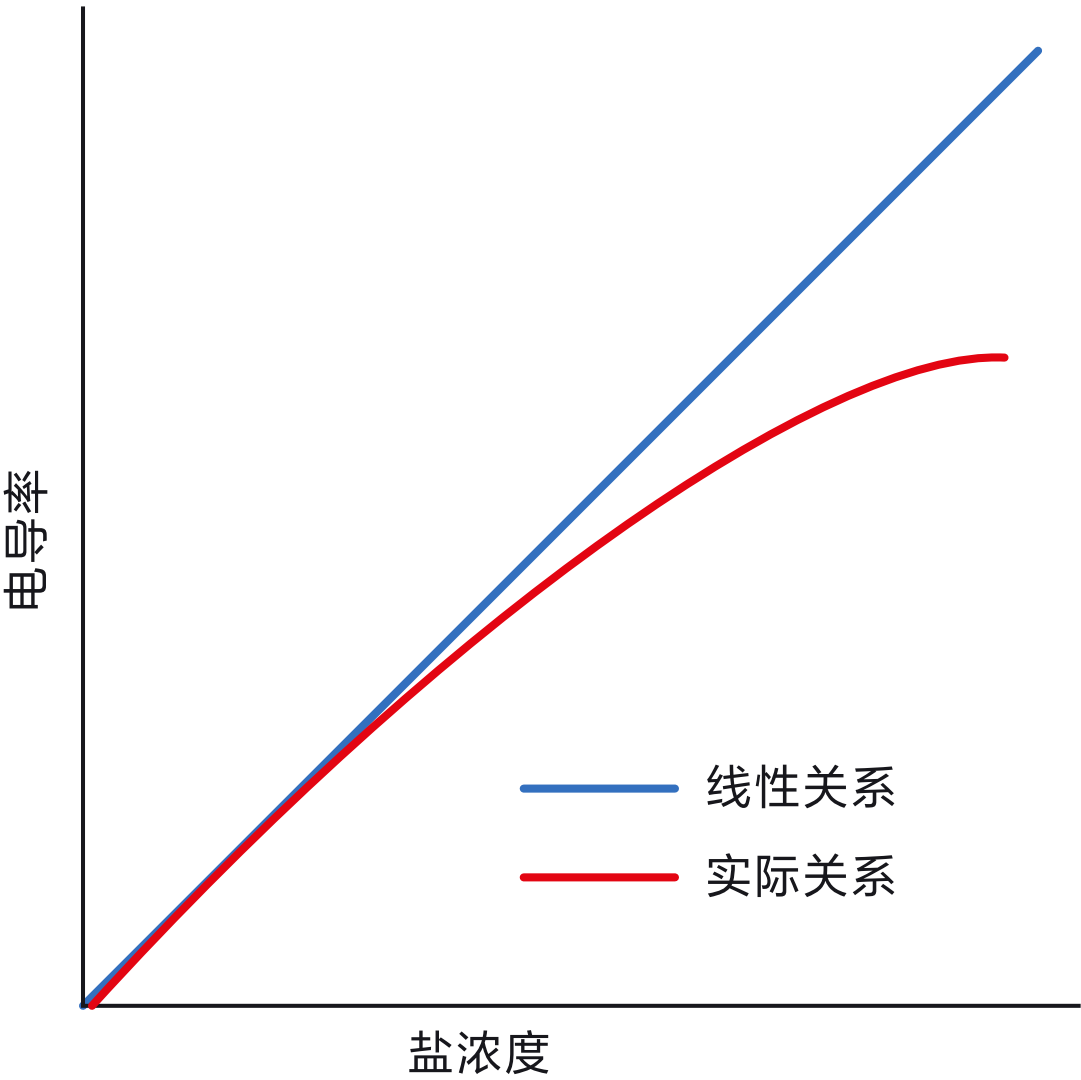


图 8.2. 电导率与盐浓度之间的关系图。



# 监测 pH

对于大多数 ÄKTA 系统，需在低压一侧连接 pH 电极 ( 即在紫外 / 可见光监测器后 )。为了获得准确的测量值，校准 pH 电极十分重要。pH 电极对于一些溶液十分敏感，例如 20% 乙醇，因此把它们保存在适当的储存溶液中十分重要 ( 见 pH 监测器用户手册 )。

 如果使用 FR-904 限流器，确保 pH 传感器被放置在限流器后，因为它不能承受所生成的背压。

# 其他监测器

有一些系统有可能整合来自外部监测器 ( 即非 ÄKTA 监测器 ) 的信号。这对于一些应用可能是有用的，例如，需要高度灵敏的监测器或更高质量的信息时。

与 ÄKTA 系统组合使用的常见监测器包括荧光、光散射和折射率监测器。

09

# 组分收集



# 组分收集

制备型层析要求收集从层析柱上洗脱的目标样品。有两种常用的方法，一种是采用组分收集器，另一种是采用多出口阀，将洗脱液导入不同的容器 ( 管子或瓶子 )。表 9.1 比较了这些方法。

在层析运行的不同步骤中，收集组分的体积通常是不同的。在上样过程中，作为一种安全措施，通常收集较大体积的组分，以防目标蛋白直接流穿层析柱。根据上样体积和之后的清洗体积，流穿组分被收集在一个或多个组分中。在洗脱过程中，为了从重叠的峰中获得较纯的蛋白，通常收集较小体积的组分，即一个洗脱峰通常会被分为许多组分。

组分收集器上的管子或孔排成一排，通常可以选择不同的组分收集模式。可以从左到右对每一行进行收集，或以蛇形方式，即每隔一行以相反的方向收集。当选择蛇形方式时，可以最大限度减少溢出的风险。

## 直接组分收集和峰组分收集

为了能够分析峰的不同部分，通常会将洗脱过程中的组分大小设置为小于预计峰体积的值。如图 9.1A 所示，当使用直接组分收集时 ( 有时候称为固定组分 )，组分收集器将根据设定的体积在整个组分收集过程中不断地切换试管。为了进一步提高收集到的蛋白峰的纯度，可以使用“峰组分收集”。如图 9.1B 所示，设定紫外 / 可见光监测器阈值何时开始和停止峰组分收集。直接组分收集和峰组分收集也可以在一个运行中结合使用。

表 9.1. 用于收集纯化的样品的两种方法

| 组分收集器                      | 出口收集                               |
|----------------------------|------------------------------------|
| 组分体积 100 µl 至 250 ml       | 组分体积 > 5 ml                        |
| 可以收集许多组分 ( 通常 20 到 200 个 ) | 组分的数量受限于出口阀端口的数量 ( 通常 8-10 个 / 阀 ) |
| 用于预计有多个峰的复杂的样品             | 当预计会出现一些明确的峰时使用                    |

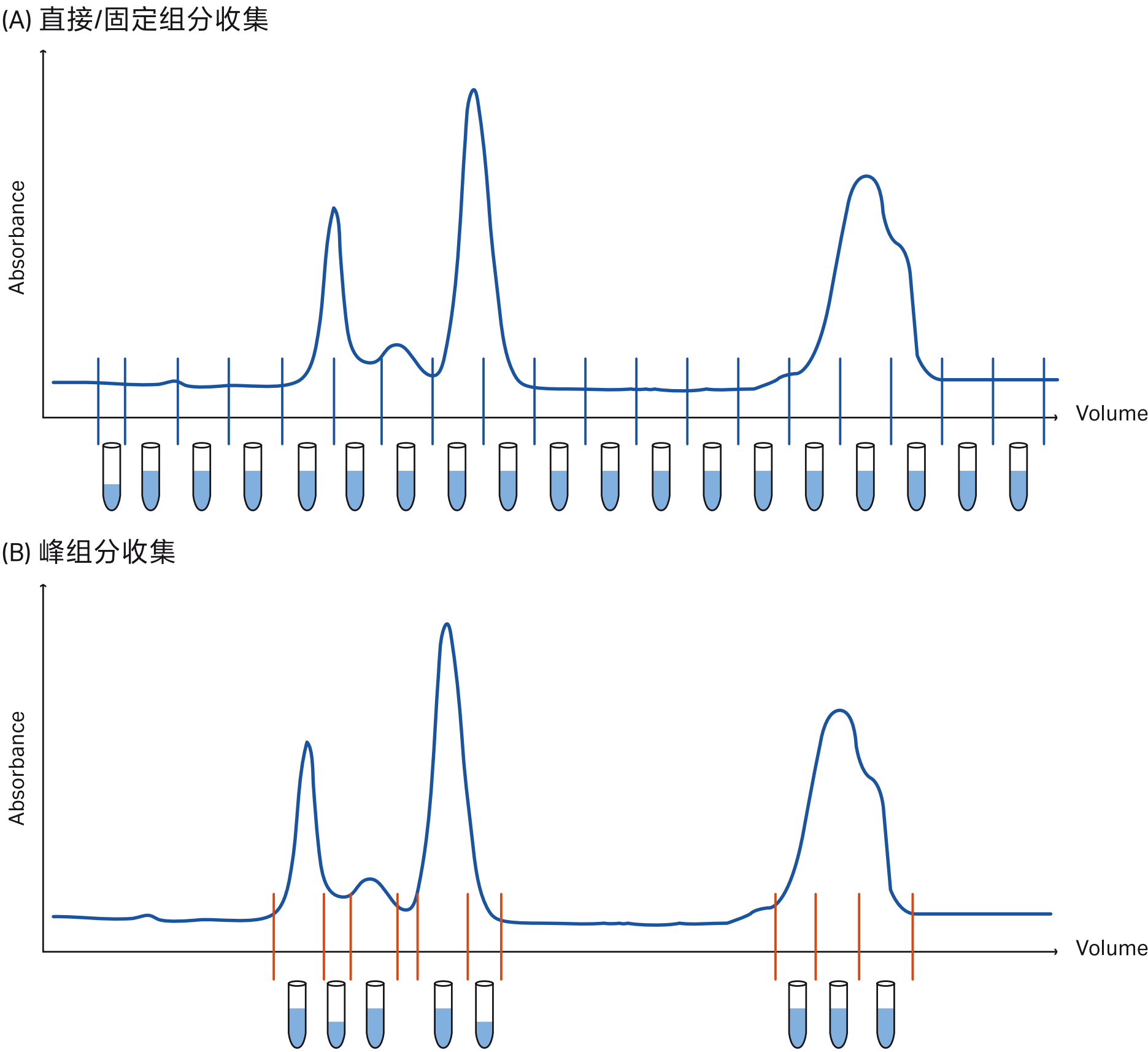


图 9.1. 直接组分收集 (A), 峰组分收集 (B)。

# 组分收集延迟体积

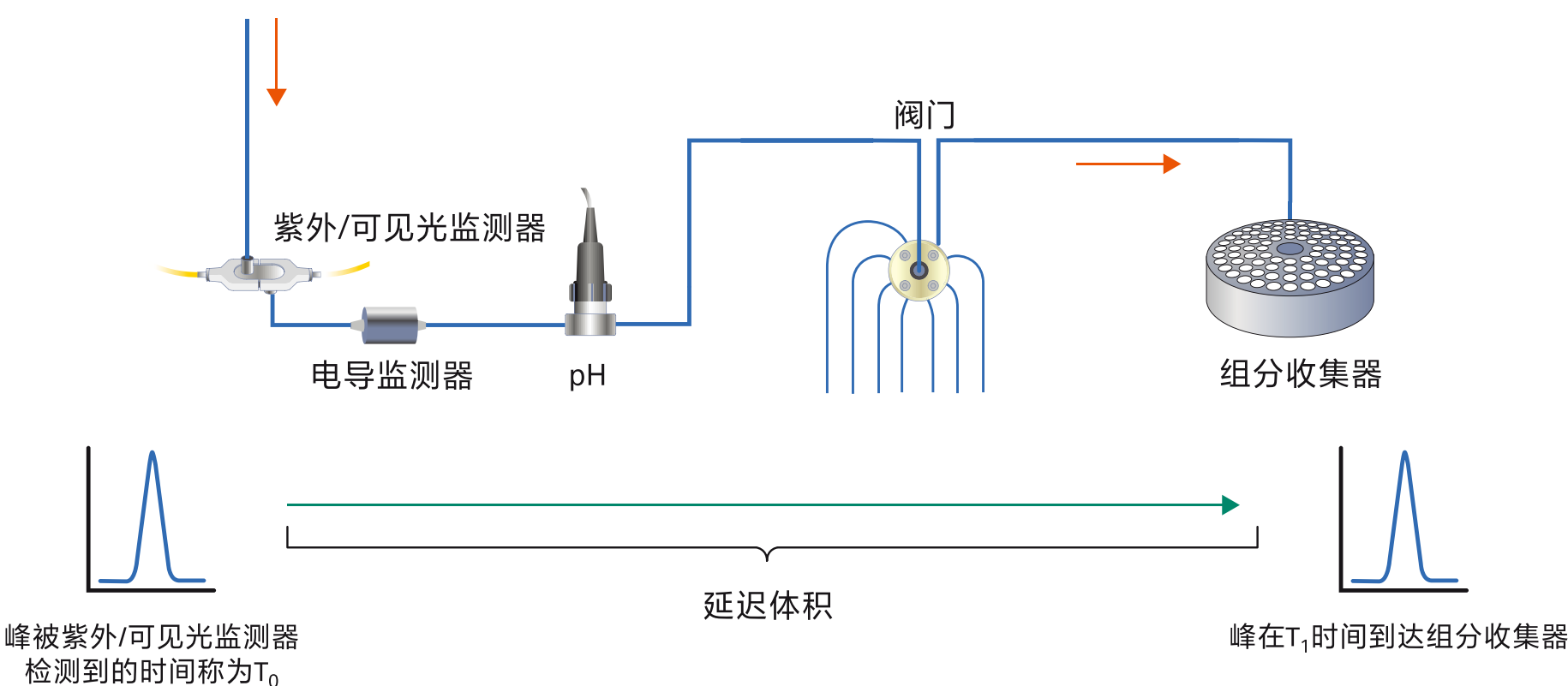
组分收集延迟体积是紫外/可见光监测器的流通池与分部收集器之间的体积。在软件中输入正确的延迟体积十分重要。系统将利用所定义的延迟体积来计算时间  $T_1$ ，即峰到达组分收集器的时间。 $T_1$  使层析图谱中的组分收集器标记和组分收集器的管开关同步 ( 图 9.2 )。在组分收集开始时, 延迟体积会被导入废液或第一个组分的试管, 具体取决于所使用的层析系统。

 如果使用了组分收集器的储液槽，记住要包含与储液槽连接的管路。

# 无溢出组分收集

为了尽量减少溢出，在 ÄKTA 组分收集器通常包含滴同步功能。组分收集器出口的传感器可检测液滴的存在，并同步更换试管。液滴同步的最大流速取决于液体的表面张力，以及组分收集管路尖端的形状和内径。当液体开始连续流动时，就无法使用。最大流速还受到液滴检测速度的限制。通常情况下，滴同步可以用于较低的流速 ( 即低于 2 到 3 ml/min )。

避免组分收集试管之间溢出的另一种方法是安装一个储液槽。在试管更换的过程中，储液槽会储存液体，然后当新的试管就位时，液体会被快速推出。储液槽可以用于较高的流速，并包含在 Frac-950 和 ÄKTA avant 的组分收集器中。关于如何解决组分收集器问题的信息请参阅附录 5。



**图 9.2.**  $T_1$  是组分收集器移动以收集与紫外 / 可见光监测器检测到的相匹配的组分的时间。  $T_1 = T_0 + \text{延迟体积} / \text{流速}$ 。

10

# 系统组件的清洗 和保存



# 系统组件的清洗和保存

如果遵循正确的清洗和保存流程，系统的使用寿命和性能将得到最大限度的提高。本章介绍如何维护系统。表 10.1 提供维护提示，可以帮助保持系统长期无故障运行。

表 10.1. 预防性维护提示

| 目的                      | What to do                                                                      |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 防止颗粒进入流路，从而保持较低的背压      | 使用过滤的溶液。推荐 0.45 μm 的过滤器孔径<br>在所有入口管路上使用入口过滤器 ( 图 10.1A ) 定期更换在线过滤 ( 图 10.1B )   |
| 清洗系统，以防多次运行之间的残留物和流路的污染 | 用 0.5 到 1 M NaOH 定期清洗系统流路<br>建立适当的清洗程序<br>每周更换一次泵清洗溶液( 20% 乙醇 )( 只适用于具有清洗系统的泵 ) |
| 保持系统清洁，以防微生物在流路中生长      | 当系统2天或2天以上不使用时，使用20% 乙醇作为保存溶液                                                   |
| 避免系统组件出现冷凝水             | 如系统在冷库中，请保持电源开启 ( 紫外/可见光监测器可以关闭以节省灯运行时间 )。 当系统移到一个新的温度时，系统需要一些时间 ( 通常为数小时)调整到室温 |
| 保护仪器的外部                 | 擦掉溢出物，避免金属零件的腐蚀                                                                 |
| 延长紫外 / 可见光监测器灯的寿命       | 不使用时，请关闭 UPC-900 上的紫外线/可见光监测器灯                                                  |
| 避免软件连接问题                | 如果系统由计算机控制，至少每 14 天重启一次系统和电脑。定期清理临时文件夹                                          |

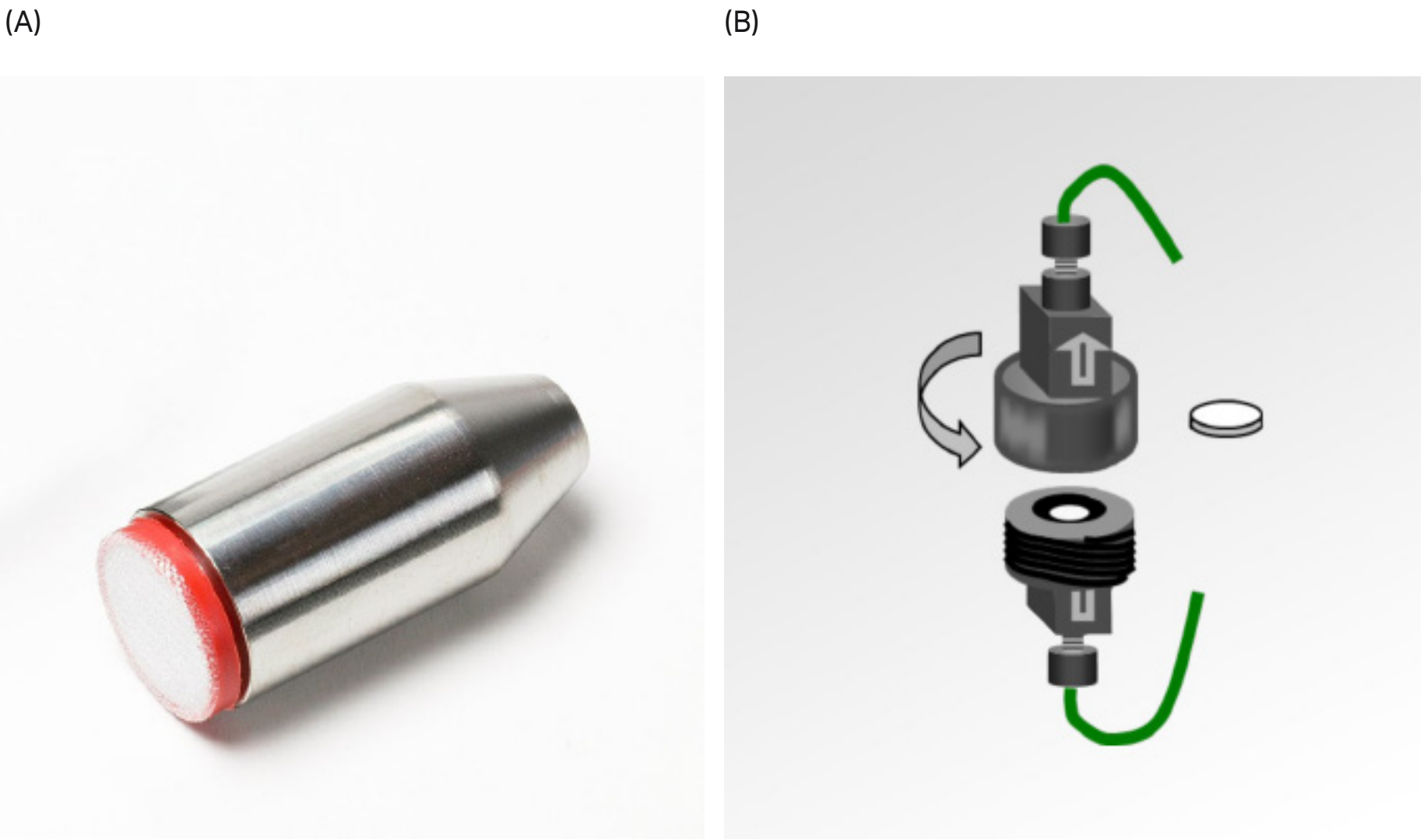


图 10.1. 入口过滤器 (A) 安装在入口管路。在线过滤器 (B) 连接在流路中的混合器后或混合器内。  
注释: 在一些文献中, 入口过滤器也被称为在线过滤器。



# 清洗系统

## 最小化清洗

由于缓冲溶液中的盐分可能会沉淀和堵塞阀门和管路，因此在每次运行后都要用缓冲液或水洗涤整个系统流路。同样重要的是，每次运行后都要尽快清除入口管路中的任何样品。

## 彻底清洗

常规的清洗建议是在使用时每周用 0.5 到 1 M NaOH 冲洗系统一次，首先以适当的流速冲洗泵。

准备一种系统清洗方法并加以使用！在不连接层析柱或绕过层析柱的情况下进行清洗。确保清洗到整个流路，并在用清洗溶液洗涤系统流路时改变阀门位置。清洗包括组分收集器管路、储液槽和手动进样口在内的所有的管路。

建议的清洗溶液见表 10.2。

 通过产生背压，例如将限流器放置在使用的废液管路上，清洗溶液在清洗过程中将更容易进入 “死角”，例如阀门内部。

 当使用危险 / 腐蚀性化学品时要佩戴手套和安全眼镜。

 确保在清洁过程中堵住未连接管道的阀口，并将所有的废液管路插入废液容器中。

# 系统保存

当系统超过 2 天不使用时，将系统保存在 20% 乙醇中以防微生物生长。当准备保存系统时，用水冲洗系统防止缓冲液组分与乙醇混合而发生的沉淀。然后用 20% 乙醇溶液充满系统。确保充满整个流路，包括所有进口和出口管路。

 对于一些 ÄKTA 系统，软件中包含了用于准备系统的预设方法。

 保存后，在使用系统前先用水去除乙醇。

**表 10.2.** 系统组件使用的清洗溶液建议，不包括 pH 电极。

| 去除                      | 使用               |
|-------------------------|------------------|
| 缓冲液和盐                   | 水                |
| 蛋白质、脂类、细胞碎片             | 0.5 到 1 M NaOH   |
| 未被 NaOH 去除的蛋白质、脂类和细胞碎片  | 1 到 10 M 醋酸      |
| 未被 NaOH 或醋酸去除的脂类或其它疏水组分 | 有机溶剂，例如 100% 异丙醇 |

# 清洗建议

## 系统泵

因为沉淀的盐会堵塞阀门和缩短密封圈寿命，因此在运行后应尽快用缓冲液或水冲洗泵。

大多数 ÄKTA 泵都配有一个 20% 乙醇溶液自循环的冲洗系统。图 10.2 为清洗系统的示意图。清洗溶液一直与泵头的背面接触，可防止微生物生长。每周更换一次清洗溶液。注意溶液会随着时间蒸发。如果使用可选路径(无循环)，则需要更频繁地注入清洗溶液。

## 样品泵

每次运行后用水、缓冲液或清洁剂冲洗样品泵以去除任何残留的样品。对于具有清洗系统的样品泵, 例如 ÄKTA avant, 请遵循如上所述的相同步骤操作。

## 紫外/可见光流通池

紫外 / 可见光流通池的清洗要求会有所不同。对于常规清洗, 使用如下所述的 10% Decon™ 90。如果不想使用去垢剂或流通池在用 10% Decon 90 清洗后不够干净, 则可尝试下表 10.3 中所列的溶液。

 使用注射器直接注射少量的 10% Decon 90 去垢剂到流通池内, 静置至少 20 分钟后用水冲洗。如需严格清洗, 可使用加热的 Decon 90 溶液 ( 大约 60°C ) 或将去垢剂静置在流通池内过夜。

表 10.3 列出了推荐用于清洗紫外 / 可见光流通池的其它溶液。

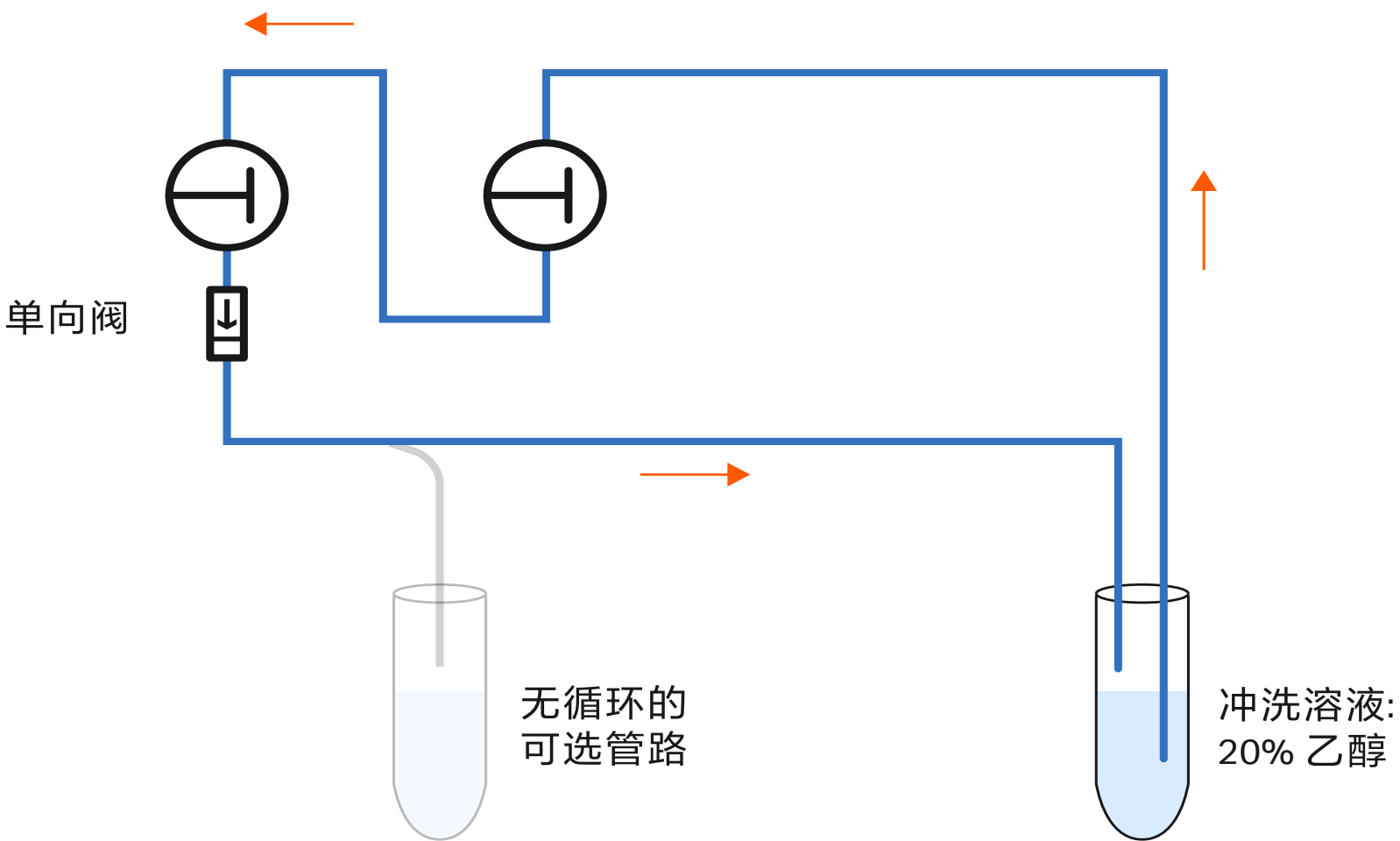


图 10.2. 泵冲洗系统示意图。

表10.3. 用于清洗紫外/可见光监测器流通池的溶液。

| 去除        | 使用                           |
|-----------|------------------------------|
| 缓冲液、盐和去垢剂 | 水                            |
| 蛋白质       | 0.5 到 1 M NaOH 15 分钟, 然后用水冲洗 |
| 脂类和其它疏水成分 | 30% 到 100% 异丙醇, 然后用水冲洗       |



## pH电极

pH 电极是系统中最灵敏的部件之一。表 10.4 列出了推荐用于清洗 pH 电极的溶液。

在电极清洗后, 需要进行保存和校准。请参阅用户指导手册。

## 组分收集器

保持组分收集器的外部和滴同步光电单元清洁十分重要。如有溢出, 立即擦去溢出物, 并使用布和水或温和的清洁剂清洗外部。应使用湿布小心擦拭滴同步光电单元。通常管架可以拆下清洗。

- 

清洗后, 检查组分收集器的管路是否正确放置, 并检查管路是否挡住液滴传感器的光路。如果挡住光路, 在组分收集过程中会收到错误信号。
- 

对于具有储液槽的组分收集器, 为了实现无溢出收集, 也要记住在系统清洗方法中添加储液槽清洗。

**表 10.4.** 用于清洗 pH 电极的溶液。

| 去除    | 使用                              |
|-------|---------------------------------|
| 盐沉淀   | 交替使用 100 mM HCl 和 100 mM NaOH   |
| 脂类沉淀  | 去垢剂或有机溶剂                        |
| 蛋白质沉淀 | 含有 1% 胃蛋白酶的 100 mM HCl 。然后彻底去除! |

# 附录

# 附录 1

## 实验室规模的 ÄKTA 系统中的系统组件

表 A1.1 重点介绍了一些系统组件及其相关的 ÄKTA 系统。包含每个组件的压力极限、流速范围、内部体积等信息。

表 **A1.1.** ÄKTA 系统组件的参数。

| 泵              | 流速范围                                 | 冲程体积 <sup>1</sup> / 总内部体积   | 最大压力                       | 一起使用的系统 <sup>2</sup>                                     |
|----------------|--------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------|
| ÄKTA start 蠕动泵 | 0.5 to 5 ml/min ( 冲洗时可达10 ml/min )   | N/A/Internal volume: 126 µl | 0.5 MPa (5 bar, 73 psi)    | ÄKTA start                                               |
| P-901          | 0.01 to 100 ml/min                   | 286 µl/1.4 ml               | 10 MPa (100 bar, 1450 psi) | ÄKTApurifier UPC 100, ÄKTApurifier 100, ÄKTAexplorer 100 |
| P-903          | 0.001 to 10 ml/min                   | 36 µl/0.6 ml                | 25 MPa (250 bar, 3625 psi) | ÄKTApurifier UPC 10, ÄKTApurifier 10, ÄKTAexplorer 10    |
| P-905          | 0.001 to 2 ml/min                    | 36 µl/0.6 ml                | 35 MPa (350 bar, 5075 psi) | ÄKTAmicro                                                |
| P-920          | 0.01 to 20 ml/min                    | 10 ml/10 ml                 | 5 MPa (50 bar, 725 psi)    | ÄKTA <sub>FPLC</sub>                                     |
| P-960          | 0.1 to 50 ml/min                     | 200 µl/1 ml                 | 2 MPa (20 bar, 290 psi)    | 样品泵: ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer        |
| P9             | 0.001 to 25 ml/min                   | 54 µl/0.55 ml               | 20 MPa (200 bar, 2900 psi) | ÄKTA avant 25, ÄKTA pure 25                              |
| P9-S           | 0.01 to 25 ml/min ( 冲洗时可达65 ml/min ) | 286 µl/1.4 ml               | 10 MPa (100 bar, 1450 psi) | 样品泵: ÄKTA avant 25 and ÄKTA pure 25                      |
| P9H            | 0.01 to 150 ml/min                   | 429 µl/1.8 ml               | 5 MPa (50 bar, 725 psi)    | 系统和样品泵: ÄKTA avant 150 and ÄKTA pure 150                 |

<sup>1</sup> 冲程体积是从泵的每个活塞冲出液体的量。

<sup>2</sup> ÄKTApurifier UPC 是指 ÄKTApurifier UPC 10、ÄKTApurifier UPC 100; ÄKTApurifier 是指 ÄKTApurifier 10、ÄKTApurifier 10 plus、ÄKTApurifier 100、ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 是指 ÄKTAexplorer 10、ÄKTAexplorer 10S、ÄKTAexplorer 1 00、 ÄKTAexplorer 100 Air; ÄKTA avant 是指 ÄKTA avant 25 和 ÄKTA avant 150; ÄKTApurifier 10 也指 ÄKTApurifier 10 plus; ÄKTApurifier 100 也指 ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 10 也指 ÄKTAexplorer 10S; ÄKTAexplorer 100 也指 ÄKTAexplorer 100 Air。



| 混合器             | 内部体积    | 最大压力                        | 一起使用的系统 <sup>2</sup>                                                         |
|-----------------|---------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| M-925 ( 磁力搅拌器 ) | 90 µl   | 35 MPa (350 bar, 5075 psi)  | ÄKTAmicro                                                                    |
| M-925 ( 磁力搅拌器 ) | 0.2 ml  | 35 MPa (350 bar, 5075 psi)  | ÄKTAmicro                                                                    |
| M-925 ( 磁力搅拌器 ) | 0.6 ml  | 25 MPa (250 bar, 3625 psi ) | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC 10, ÄKTApurifier 10, ÄKTAexplorer 10 |
| M-925 ( 磁力搅拌器 ) | 2 ml    | 25 MPa (250 bar, 3625 psi)  | ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer                                 |
| M-925 ( 磁力搅拌器 ) | 5 ml    | 25 MPa (250 bar, 3625 psi)  | ÄKTApurifier UPC 100, ÄKTApurifier 100, ÄKTAexplorer 100                     |
| M-925 ( 磁力搅拌器 ) | 12 ml   | 10 MPa (100 bar, 1450 psi)  | ÄKTApurifier UPC 100, ÄKTApurifier 100, ÄKTAexplorer 100                     |
| 静态混合器           | 0.37 ml | 3 MPa (30 bar, 435 psi)     | ÄKTA start                                                                   |
| M9              | 0.6 ml  | 20 MPa (200 bar, 2900 psi)  | ÄKTA avant 25, ÄKTA pure 25                                                  |
| M9              | 1.4 ml  | 20 MPa (200 bar, 2900 psi)  | ÄKTA avant, ÄKTA pure                                                        |
| M9              | 5 ml    | 20 MPa (200 bar, 2900 psi)  | ÄKTA avant, ÄKTA pure                                                        |
| M9              | 15 ml   | 5 MPa (50 bar, 725 psi)     | ÄKTA avant 150, ÄKTA pure 150                                                |

| 在线过滤器          | 内部体积   | 最大体积                       | 一起使用的系统 <sup>2</sup>                                            |
|----------------|--------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 过滤器支架          | 115 µl | 35 MPa (350 bar, 5075 psi) | ÄKTApurifier UPC 100, ÄKTApurifier 100, ÄKTAexplorer 100        |
| 过滤器支架          | 20 µl  | 35 MPa (350 bar, 5075 psi) | ÄKTApurifier UPC 10, ÄKTApurifier 10, ÄKTAexplorer 10,ÄKTAmicro |
| 混合器 M9 中的过滤器支架 | 50 µl  | 20 MPa (200 bar, 2900 psi) | ÄKTA avant, ÄKTA pure                                           |

<sup>2</sup> ÄKTApurifier UPC 是指 ÄKTApurifier UPC 10、ÄKTApurifier UPC 100; ÄKTApurifier 是指 ÄKTApurifier 10、ÄKTApurifier 10 plus、ÄKTApurifier 100、ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 是指 ÄKTAexplorer 10、ÄKTAexplorer 10S、ÄKTAexplorer 1 00、 ÄKTAexplorer 100 Air; ÄKTA avant 是指 ÄKTA avant 25 和 ÄKTA avant 150; ÄKTApurifier 10 也指 ÄKTApurifier 10 plus; ÄKTApurifier 100 也指 ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 10 也指 ÄKTAexplorer 10S; ÄKTAexplorer 100 也指 ÄKTAexplorer 100 Air。

| UV监测器流通池         | 池体积/总体积     | 最大压力                    | 一起使用的系统 <sup>2</sup>                                |
|------------------|-------------|-------------------------|-----------------------------------------------------|
| 2 mm for UPC-900 | 2 µl/30 µl  | 4 MPa (40 bar, 580 psi) | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC, ÄKTA start |
| 5 mm for UPC-900 | 6 µl/20 µl  | 4 MPa (40 bar, 580 psi) | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC             |
| 2 mm for UV-900  | 2 µl/7 µl   | 2 MPa (20 bar, 290 psi) | ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer                          |
| 3 mm for UV-900  | 0.7 µl/3 µl | 2 MPa (20 bar, 290 psi) | ÄKTAmicro                                           |
| 10 mm for UV-900 | 8 µl/13 µl  | 2 MPa (20 bar, 290 psi) | ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer                          |
| 0.5 mm for U9-M  | 1 µl/10 µl  | 2 MPa (20 bar, 290 psi) | ÄKTA avant, ÄKTA pure                               |
| 2 mm for U9-M    | 2 µl/11 µl  | 2 MPa (20 bar, 290 psi) | ÄKTA avant, ÄKTA pure                               |
| 10 mm for U9-M   | 8 µl/12 µl  | 2 MPa (20 bar, 290 psi) | ÄKTA avant, ÄKTA pure                               |
| 2 mm for U9-L    | 2 µl/30 µl  | 2 MPa (20 bar, 290 psi) | ÄKTA avant, ÄKTA pure                               |
| 5 mm for U9-L    | 6 µl/20 µl  | 2 MPa (20 bar, 290 psi) | ÄKTA avant, ÄKTA pure                               |

| 电导率流通池 | 内部体积  | 最大压力                       | 一起使用的系统 <sup>2</sup>                                               |
|--------|-------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 流通池    | 24 µl | 5 MPa (50 bar, 725 psi)    | ÄKTAFPLC, ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer, ÄKTA start |
| 流通池    | 22 µl | 5 MPa (50 bar, 725 psi)    | ÄKTA avant, ÄKTA pure                                              |
| 流通池    | 2 µl  | 35 MPa (350 bar, 5075 psi) | ÄKTAmicro                                                          |

| pH流通池  | 内部体积  | 最大压力                    | 一起使用的系统 <sup>2</sup>                                    |
|--------|-------|-------------------------|---------------------------------------------------------|
| 标准池    | 88 µl | 0.5 MPa (5 bar, 73 psi) | ÄKTAFPLC , ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer |
| V9-pH  | 76 µl | 0.5 MPa (5 bar, 73 psi) | ÄKTA avant 25, ÄKTA pure 25                             |
| V9H-pH | 76 µl | 0.5 MPa (5 bar, 73 psi) | ÄKTA avant 150, ÄKTA pure 150                           |

<sup>2</sup> ÄKTApurifier UPC 是指 ÄKTApurifier UPC 10、ÄKTApurifier UPC 100; ÄKTApurifier 是指 ÄKTApurifier 10、ÄKTApurifier 10 plus、ÄKTApurifier 100、ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 是指 ÄKTAexplorer 10、ÄKTAexplorer 10S、ÄKTAexplo rer 100、ÄKTAexplorer 100 Air; ÄKTA avant 是指ÄKTA avant 25 和ÄKTA avant 150; ÄKTApurifier 10 也指ÄKTApurifier 10 plus; ÄKTApurifier 100 也指ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 10 也指ÄKTAexplorer 10S; ÄKTAexplorer 100 也指ÄKTAexplorer 100 Air。



| 限流器                    | 内部体积   | 在 20°C 由 10 ml/min 水产生的背压                                                                                                        | 一起使用的系统 <sup>2</sup>                                                                   |
|------------------------|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| FR-902                 | 10 µl  | 0.2 MPa (2 bar, 29 psi)                                                                                                          | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier 100, ÄKTAexplorer 100, ÄKTA avant, ÄKTA pure       |
| FR-904                 | 10 µl  | 0.4 MPa (4 bar, 58 psi)                                                                                                          | ÄKTApurifier UPC 10, ÄKTApurifier 10, ÄKTAexplorer 10, ÄKTAmicro                       |
|                        |        |                                                                                                                                  |                                                                                        |
| 空气传感器                  | 内部直径   | 使用的接头                                                                                                                            | 一起使用的系统 <sup>2</sup>                                                                   |
| Air-912 N <sup>3</sup> | 1.2 mm | Fingertight connector 1/16" M                                                                                                    | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier 100, ÄKTAexplorer 100, ÄKTA avant, ÄKTA pure       |
| Air-925 N <sup>3</sup> | 2.5 mm | Tubing connector for o.d. 3/16" with blue ferrule f<br>or 3/16" o.d. tubingor Tubing connector for o.d. 1/8" with yellow ferrule | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer, P-960             |
| Air-915 N <sup>3</sup> | 1.5 mm | Tubing connector for o.d. 1/8" with yellow ferrule                                                                               | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer, P-960             |
| L9-1.2                 | 1.2 mm | Fingertight connector 1/16" M                                                                                                    | ÄKTA avant, ÄKTA pure                                                                  |
| L9-1.5                 | 1.5 mm | Tubing connector for o.d. 3/16" with blue ferrule for 3/16" o.d. tubing or Tubing connector for o.d. 1/8" with yellow ferrule    | ÄKTA avant, ÄKTA pure                                                                  |
| Built-in air sensor    | 1.5 mm | —                                                                                                                                | ÄKTA avant and ÄKTA pure inlet valves: V9-IA, V9H-IA, V9-IB, V9H-IB, V9-IS, and V9H-IS |

<sup>2</sup>ÄKTApurifier UPC 是指 ÄKTApurifier UPC 10、ÄKTApurifier UPC 100; ÄKTApurifier 是指 ÄKTApurifier 10、ÄKTApurifier 10 plus、ÄKTApurifier 100、ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 是指 ÄKTAexplorer 10、ÄKTAexplorer 10S、ÄKTAexplorer 100、ÄKTAexplorer 100 Air; ÄKTA avant 是指 ÄKTA avant 25 和ÄKTA avant 150; ÄKTApurifier 10 也指 ÄKTApurifier 10 plus; ÄKTApurifier 100 也指 ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 10 也指 ÄKTAexplorer 10S; ÄKTAexplorer 100 也指 ÄKTAexplorer 100 Air。

<sup>3</sup>为了连接到ÄKTA<sub>FPLC</sub>、ÄKTApurifier UPC、ÄKTApurifier 和ÄKTAexplorer, 使用Air-900 N 控制箱。

| 阀门                                     | 内部体积           | 最大压力                       | 一起使用的系统 <sup>2</sup>                                                       |
|----------------------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| FV-923                                 | 113 µl         | 0.2 MPa (2 bar, 29 psi)    | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAmicro           |
| SV-903                                 | 113 µl         | 0.2 MPa (2 bar, 29 psi)    | ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer, ÄKTAmicro, ÄKTA start                          |
| IV-908                                 | 26 µl          | 2 MPa (20 bar, 290 psi)    | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer        |
| PV-908                                 | 7 µl           | 25 MPa (250 bar, 3625 psi) | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer        |
| PV-908H                                | 30 µl          | 3.5 MPa (35 bar, 508 psi)  | High Flow kit for ÄKTApurifier UPC 100, ÄKTApurifier 100, ÄKTAexplorer 100 |
| INV-907<br>port 1/7<br>port 2/3        | 9 µl<br>5 µl   | 25 MPa (250 bar, 3625 psi) | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer        |
| INV-907H<br>port 1/7<br>port 2/3       | 41 µl<br>28 µl | 3.5 MPa (35 bar, 508 psi)  | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer        |
| INV-917                                | 1.5 µl         | 35 MPa (350 bar, 5075 psi) | ÄKTAmicro                                                                  |
| V9-IA, V9-IB, V9-IS, V9-I2, V9-IX      | 88 µl          | 1 MPa (10 bar, 145 psi)    | ÄKTA avant 25, ÄKTA pure 25                                                |
| V9H-IA, V9H-IB, V9H-IS, V9H-I2, V9H-IX | 212 µl         | 2 MPa (20 bar, 290 psi)    | ÄKTA avant 150, ÄKTA pure 150                                              |

<sup>2</sup>ÄKTApurifier UPC 是指 ÄKTApurifier UPC 10、ÄKTApurifier UPC 100; ÄKTApurifier 是指 ÄKTApurifier 10、ÄKTApurifier 10 plus、ÄKTApurifier 100、ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 是指 ÄKTAexplorer 10、ÄKTAexplorer 10S、ÄKTAexplorer 1 00、 ÄKTAexplorer 100 Air; ÄKTA avant 是指 ÄKTA avant 25 和 ÄKTA avant 150; ÄKTApurifier 10 也指 ÄKTApurifier 10 plus; ÄKTApurifier 100 也指 ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 10 也指 ÄKTAexplorer 10S; ÄKTAexplorer 100 也指 ÄKTAexplorer 100 Air。

| 阀门                     | 内部体积               | 最大压力                         | 一起使用的系统 <sup>2</sup>          |
|------------------------|--------------------|------------------------------|-------------------------------|
| V9-Inj                 | 9 µl               | 20 MPa (200 bar, 2900 psi)   | ÄKTA avant 25                 |
| V9H-Inj                | 23 µl              | 5 MPa (50 bar, 725 psi)      | ÄKTA avant 150                |
| V9-C                   | 110 µl             | 20 MPa (200 bar, 2900 psi)   | ÄKTA avant 25                 |
| V9H-C                  | 191 µl             | 5 MPa (50 bar, 725 psi)      | ÄKTA avant 150                |
| V9-pH                  | 15 µl (via bypass) | 10 MPa (100 bar, 1450 psi)   | ÄKTA avant 25                 |
| V9H-pH                 | 36 µl (via bypass) | 2 MPa (20 bar, 290 psi)      | ÄKTA avant 150                |
| V9-O                   | 9 µl               | 10 MPa (100 bar, 1450 psi)   | ÄKTA avant 25                 |
| V9H-O                  | 82 µl              | 2 MPa (20 bar, 290 psi)      | ÄKTA avant 150                |
| V9-IAB                 | 95 µl              | 1 MPa (10 bar, 145 psi)      | ÄKTA pure 25                  |
| V9H-IAB                | 212 µl             | 2 MPa (20 bar, 290 psi)      | ÄKTA pure 150                 |
| V9-M                   | 14 µl              | 20 MPa (200 bar, 2900 psi)   | ÄKTA pure 25                  |
| V9H-M                  | 31 µl              | 5 MPa (50 bar, 725 psi)      | ÄKTA pure 150                 |
| V9-Cs                  | 14 µl              | 20 MPa (200 bar, 2900 psi)   | ÄKTA pure 25                  |
| V9H-Cs                 | 31 µl              | 5 MPa (50 bar, 725 psi)      | ÄKTA pure 150                 |
| V9-L                   | 17 µl              | 20 MPa (200 bar, 2900 psi)   | ÄKTA pure 25, ÄKTA avant 25   |
| V9H-L                  | 76 µl              | 5 MPa (50 bar, 725 psi)      | ÄKTA pure 150, ÄKTA avant 150 |
| V9-O2, V9-O3, V9-C2    | 11 µl              | 20 MPa (200 bar, 2900 psi)   | ÄKTA avant 25                 |
| V9H-O2, V9H-O3, V9H-C2 | 82 µl              | 5 MPa ( 50 bar, 725 psi )    | ÄKTA avant 150                |
| V9-Os                  | 9 µl               | 20 MPa ( 200 bar, 2900 psi ) | ÄKTA pure 25                  |
| V9H-Os                 | 28 µl              | 5 MPa (50 bar, 725 psi)      | ÄKTA pure 150                 |
| V9-V                   | 14 µl              | 20 MPa (200 bar, 2900 psi)   | ÄKTA pure 25, ÄKTA avant 25   |
| V9H-V                  | 31 µl              | 5 MPa (50 bar, 725 psi)      | ÄKTA pure 150, ÄKTA avant 150 |

<sup>2</sup>ÄKTApurifier UPC 是指 ÄKTApurifier UPC 10、ÄKTApurifier UPC 100; ÄKTApurifier 是指 ÄKTApurifier 10、ÄKTApurifier 10 plus、ÄKTApurifier 100、ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 是指 ÄKTAexplorer 10、ÄKTAexplorer 10S、ÄKTAexplo rer 100、ÄKTAexplorer 100 Air; ÄKTA avant 是指ÄKTA avant 25 和ÄKTA avant 150; ÄKTApurifier 10 也指ÄKTApurifier 10 plus; ÄKTApurifier 100 也指ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 10 也指ÄKTAexplorer 10S; ÄKTAexplorer 100 也指ÄKTAexplorer 100 Air。



| 组分收集器    | 容量                                                                                                                                                                             | 其它功能                           | 一起使用的系统 <sup>2</sup>                                                                   |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Frac30   | 30 × 1.5 ml/2 ml 微量离心管<br>30 × 5 ml (12 × 75 mm) 或30 × 12 ml 试管 (17 × 100 mm) 或<br>30 × 15 ml 试管 (17 × 118 mm)                                                                 |                                | ÄKTA start                                                                             |
| F9-R     | 175 × 3 ml (o.d. 12 mm) 或 95 × 8 或 15 ml (o.d. 12 to 18 mm) 或<br>40 × 50 ml (o.d. 30 mm)                                                                                       | 滴同步                            | ÄKTA avant, ÄKTA pure                                                                  |
| F9-C     | 6 个管架或 55 个收集瓶 (50 ml) 或 18 个收集瓶 (250 ml)<br>管架选项:<br>6 个试管 (50 ml)<br>15 个试管 (15 ml)<br>24 个试管 (8 ml)<br>40 个试管 (3 ml)<br>1 个深孔板<br>( 24, 48, 或 96 孔 )                        | 储液槽<br>管架自动识别<br>最多 6 个管架      | ÄKTA pure                                                                              |
| Frac-920 | 95 个试管 (o.d. 10-18 mm) 或 175 个试管 (o.d. 12 mm) 或 40 个试管<br>(o.d. 30 mm)                                                                                                         | Drop sync                      | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer, or as stand-alone |
| Frac-950 | 4 个微孔板 ( 96 孔 )和 8 个试管 (o.d. 30 mm )或 120 个试管<br>(o.d. 18 mm) 个8个试管 (o.d. 30 mm)或 240 个试管 (o.d. 12 mm) 或45 个试管 (o.d. 30 mm)<br>制备模式使用:<br>80 个试管 (o.d. 30 mm) 或20个收集瓶 (250 ml) | 储液槽<br>滴同步<br>可选制备模式<br>可选微量模式 | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC, ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer, ÄKTAmicro         |

<sup>2</sup>ÄKTApurifier UPC 是指 ÄKTApurifier UPC 10、ÄKTApurifier UPC 100; ÄKTApurifier 是指 ÄKTApurifier 10、ÄKTApurifier 10 plus、ÄKTApurifier 100、ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 是指 ÄKTAexplorer 10、ÄKTAexplorer 10S、ÄKTAexplorer 100、 ÄKTAexplorer 100 Air; ÄKTA avant 是指 ÄKTA avant 25 和 ÄKTA avant 150; ÄKTApurifier 10 也指 ÄKTApurifier 10 plus; ÄKTApurifier 100 也指 ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 10 也指 ÄKTAexplorer 10S; ÄKTAexplorer 100 也指 ÄKTAexplorer 100 Air。

| 组分收集器              | 容量                                                                                                                                                               | 其它功能                            | 一起使用的系统 <sup>2</sup> |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| ÄKTA avant 内置组分收集器 | 6 个管架或55 个收集瓶 ( 50 ml ) 或 18 个收集瓶 (250 ml)<br>管架选项:<br>6 个试管 (50 ml)<br>15 个试管 (15 ml)<br>24 个试管 (8 ml)<br>40 个试管 (3 ml and 5 ml)<br>1 个深孔板<br>( 24, 48, 或96 孔 ) | 制冷<br>储液槽<br>管架自动识别<br>最多 6 个管架 | ÄKTA avant           |

| 自动进样器              | 容量                                          | 其它功能 | 一起使用的系统 <sup>2</sup>                  |
|--------------------|---------------------------------------------|------|---------------------------------------|
| A-900              | 96 个标准瓶 (1.5 ml) 或 160 为微型瓶 (0.5 ml)        | 制冷   | ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer            |
| A-905              | 1个深孔板或微孔板 ( 96 或 348 孔) 或 48 个瓶 (0.5 ml)    | 制冷   | ÄKTApurifier, ÄKTAexplorer, ÄKTAmicro |
| Alias <sup>4</sup> | 微孔板: 2个瓶: 2 × 48 (1.5 ml)或可选 2 × 12 (10 ml) | 制冷   | 通过I/O box与ÄKTA avant和ÄKTA pure一起使用    |

<sup>1</sup> 冲程体积是从泵的每个活塞冲出液体的量。

<sup>2</sup> ÄKTApurifier UPC 是指 ÄKTApurifier UPC 10、ÄKTApurifier UPC 100; ÄKTApurifier 是指 ÄKTApurifier 10、ÄKTApurifier 10 plus、ÄKTApurifier 100、ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 是指 ÄKTAexplorer 10、ÄKTAexplorer 10S、ÄKTAexplorer 100、ÄKTAexplorer 100 Air; ÄKTA avant 是指 ÄKTA avant 25 和ÄKTA avant 150; ÄKTApurifier 10 也指ÄKTApurifier 10 plus; ÄKTApurifier 100 也指 ÄKTApurifier 100 plus; ÄKTAexplorer 10 也指 ÄKTAexplorer 10S; ÄKTAexplorer 100 也指 ÄKTAexplorer 100 Air。

<sup>3</sup> 为了连接到 ÄKTAFPLC、ÄKTApurifier UPC、ÄKTApurifier 和 ÄKTAexplorer, 使用 Air-900 N 控制箱。

<sup>4</sup> Alias 是指由 Spark Holland 提供的 Alias 自动进样器。

# 附录 2

## 管路指南

许多不同大小/类型的管路可以连接到层析系统。较小内径 (I.d.) 的管路具有较小的延迟体积, 因此蛋白峰稀释较少。然而, 狭窄的管路会增加系统的压力, 特别是在高流速下运行时。因此, 使用的管路应该符合应用要求。

## 管路材料和尺寸

### PEEK

PEEK( 聚醚醚酮 ) 是一种生物兼容性材料, 通常用于中高压系统。对于颜色的表述见表2.1。

### ETFE and PTFE

在系统的低或中压零件 ( 例如入口和出口管路 ) 中, 经常使用 ETFE ( 乙烯四氟乙烯 ) 或 PTFE ( 聚四氟乙烯 ) 管路。利用这些透明的材料可以轻松地检测到气泡。ETFR 和 PTFE 均是生物兼容性材料。ETFE 在两者中有更高的硬度。

### 钢和钛

高压系统通常使用钢或钛管路。钢易于腐蚀, 因此不适用于生物分子的纯化。



表 A2.1. 管路数据

| 内径      | 管路颜色 | 10 cm 管路对应体积 | 100 cm 管路生成压力 <sup>2</sup>       | 与标准管路一起使用的系统                                                                                                                |
|---------|------|--------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0.13 mm | 红色   | 1.3 µl       | 24 MPa ( 240 bar, 3481 psi )     | Optional for ÄKTA avant to generate high pressure                                                                           |
| 0.15 mm | 紫色   | 1.8 µl       | 13 MPa ( 130 bar, 1885 psi )     | ÄKTAmicro                                                                                                                   |
| 0.25 mm | 蓝色   | 4.9 µl       | 1.7 MPa ( 17 bar, 247 psi )      | ÄKTApurifier UPC 10, ÄKTApurifier 10, ÄKTA explorer 10, ÄKTA pure 25                                                        |
| 0.50 mm | 橙色   | 20 µl        | 0.11 MPa ( 1.1 bar, 16 psi )     | ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC 10, ÄKTApurifier 10, ÄKTA explorer 10, ÄKTA avant 25, ÄKTA pure 25, ÄKTA start      |
| 0.75 mm | 绿色   | 44 µl        | 0.02 MPa ( 0.2 bar, 2.9 psi )    | ÄKTApurifier UPC 100, ÄKTApurifier 100, ÄKTA explorer 100, ÄKTA avant 25, ÄKTA pure 25, ÄKTA pure 150, ÄKTA start           |
| 1.0 mm  | 米色   | 78 µl        | 0.007 MPa ( 0.07 bar, 1.02 psi ) | ÄKTA avant 150, ÄKTA pure 150                                                                                               |
| 1.0 mm  | 透明   | 78 µl        | 0.007 MPa ( 0.07 bar, 1.02 psi ) | ÄKTA start                                                                                                                  |
| 1.6 mm  | 透明   | 200 µl       | — <sup>2</sup>                   | 入口管路至 ÄKTA <sub>FPLC</sub> , ÄKTApurifier UPC 10, ÄKTApurifier 10, ÄKTA explorer 10, ÄKTA avant 25, ÄKTA pure 25,ÄKTA start |
| 2.9 mm  | 透明   | 660 µl       | — <sup>2</sup>                   | 入口管路至 ÄKTApurifier UPC 100, ÄKTApurifier 100, ÄKTA explorer 100, ÄKTA avant 150, ÄKTA pure 150                              |

<sup>1</sup>用于10 ml/min流速和室温下的水

<sup>2</sup>可忽略的压力

# 内部体积

为了计算特定管路的内部体积 (V), 使用公式:

$$V = L \times \pi \times d^2/4$$

L = 长度 (mm)

d = 内径 (mm)

 如果使用毫米作为内径单位, 则需要使用微升作为体积单位。

# 背压

为了计算在特定管路上生成的背压 (MPa), 使用下列基于 Hagen-Poiseuille 研究的公式计算:  $P = c \times L \times Q \times v/d^4$

$c = 0.000000679$

L = 长度 (mm)

Q = 流速 (ml/min)

v = 粘度 (mPas)

d = 内径 (mm)

 该公式也适用于计算层析柱上生成的背压。然而, 常数c往往是不同的, 这取决于层析填料。

 注意, 粘度随着温度降低而增加 ( 图7.7 )。

 1 MPa = 10 bar = 145 psi

表 A2.2. 常见溶液在室温下的粘度值

| 溶液       | 25°时的粘度 ( mPas) |
|----------|-----------------|
| 水        | 0.89            |
| 1 M NaCl | 0.97            |
| 1 M NaOH | 1.11            |
| 8 M 尿素   | 1.66            |
| 6 M 盐酸胍  | 1.61            |
| 20% 乙醇   | 1.87            |
| 50% 乙醇   | 2.41            |
| 100% 乙醇  | 1.07            |
| 50% 甲醇   | 1.62            |
| 100% 甲醇  | 0.54            |
| 50% 异丙醇  | 2.65            |
| 100% 异丙醇 | 2.04            |

# 附录 3

## 延迟体积的测定

测定系统延迟体积的方法有很多, 其中最简单和首选建议的方法是进行理论测定。

### 理论测定 ( 首选方法 )

通过三个步骤进行理论测定:

- 1. 确定系统流路中组成相关延迟体积的所有组件
- 2. 测定所有组件的内部体积 ( 关于硬件组件见附录1, 关于管路见附录2 )。
- 3. 将所有体积求和, 以获得总延迟体积。

**示例:**组分收集器延迟体积的测定, 包括UV监测器到组分收集器之间的所有组件。在这个例子中, 使用了 ÄKTApurifier UPC 10。关于系统组件见图 A3.1。

- 1. 确定所有系统组件:  
在这个例子中, 确定下列组件: 具有 2 mm 检测池的UV 监测器、管路、电导池、pH 池、管路、出口阀、组分收集器( Frac-950 )。
- 2. 创建一个表格并填写每个系统组件的所有内部体积。用直尺测量管路长度, 并使用附录 1 和2 ( 或系统手册 ) 找到所有组件的内部体积。对于该例子见表 A3.1。
- 3. 使用求和得到的总体积更新 UNICORN 系统控制中的延迟体积。

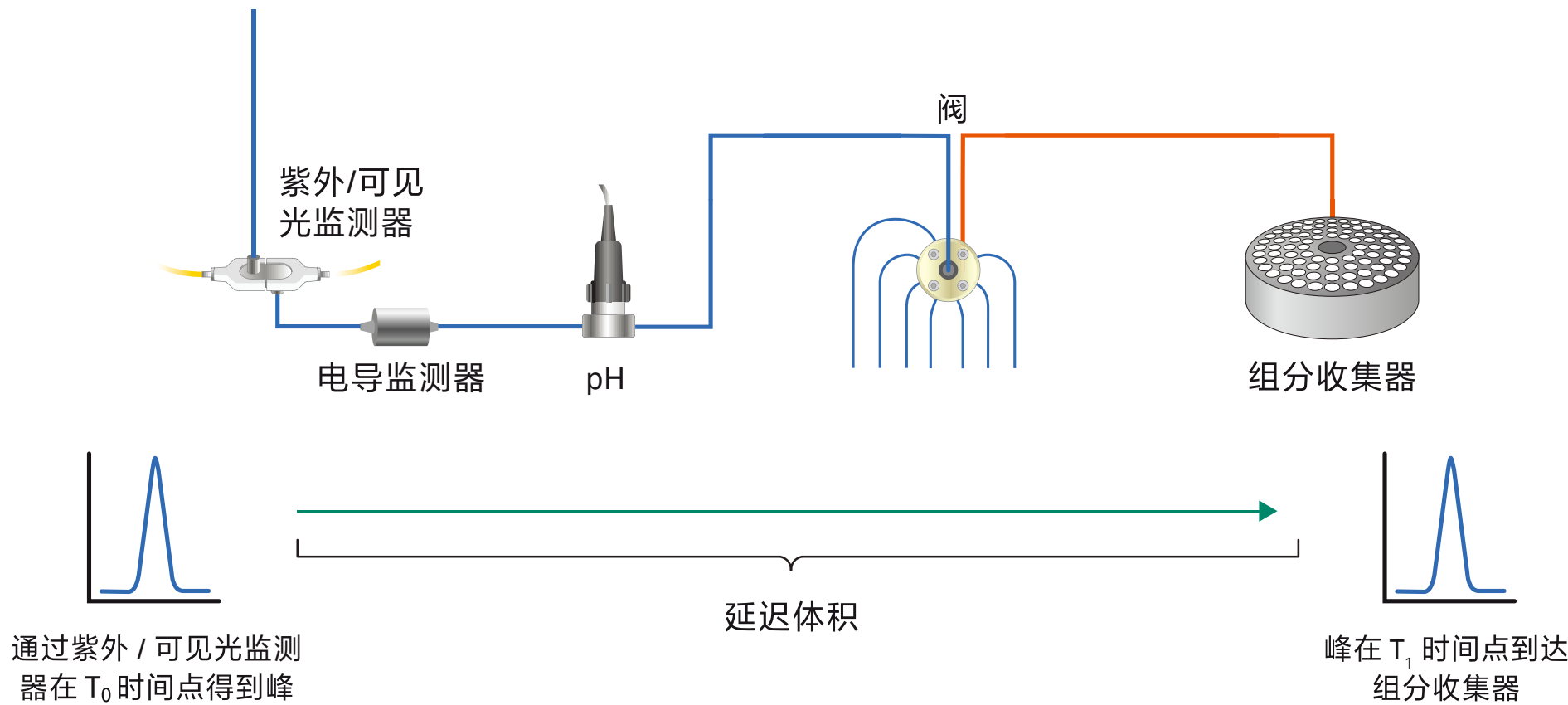


图 A3.1. 确定在示例中使用的系统组件。



**T表 A3.1.** 示例中需要确定的延迟体积数据。

| 系统组件                      | 详情                | 内部体积             | 注释                    |
|---------------------------|-------------------|------------------|-----------------------|
| UPC-900 UV 池              | 2 mm 池总体积         | 30 µl/2 = 15 µl* | 见附录1                  |
| 蓝色管路:UV/Vis 吸收<br>监测器→电导池 | 内径 0.25 mm, 8 cm  | 3.9 µl           | 见附录2中的公式              |
| 电导池                       | 标准 14 µl          | 14 µl            | 见附录1                  |
| 蓝色管路:电导池→pH 池             | 内径 0.25 mm, 10 cm | 4.9 µl           | 见附录2中的公式              |
| pH 池                      |                   | 88 µl            | 见附录1                  |
| 蓝色管路:<br>pH 池→出口阀         | 内径 0.25 mm, 12 cm | 5.9 µl           | 见附录2中的公式              |
| 出口阀                       | PV-908            | 7 µl             | 见附录1                  |
| 橙色管路:<br>出口阀→组分收集器        | 内径 0.5 mm, 30 cm  | 58.9 µl          | 见附录2中的公式<br>( 绕过储液槽 ) |

总体积

\* 使用一半的紫外/可见光流通池的总内部体积。

 如果使用组分收集器储液槽, 应记住包含进出储液槽管路的体积。

实验方法

延迟体积也可以通过实验测定。具体两种方法介绍如下:

使用紫外/可见光监测器测量延迟体积<sup>1</sup>

为了通过实验测定延迟体积, 必须测量两个体积。这两个体积是 V1 和 V2。

V1 = 进样阀和紫外 / 可见光监测器之间的体积  
V2 = 进样阀和组分收集管路末端之间的体积

1. 检查泵在 1 ml/min 时是否提供正确的流速。如果不是, 确保泵内没有气泡 ( 见第 5 章 )。
2. 用 1% 到 5% 的丙酮溶液充满小的样品环 ( 即 100 µl )。
3. 用水充满系统。以 1 ml/min 运行系统, 并注入丙酮溶液作为样品。在层析图中从上样点到峰出现的体积等于 V1。
4. 重新配置系统:
  - a) 为了更换紫外 / 可见光流动池, 断开两节管路并用具有低死体积的接头连接它们。例如, 使用 1/16" female--1/16" female union 接头。
  - b) 安装组分收集管路末端在紫外 / 可见光流动池的顶部, 并从紫外 / 可见光流动池的底部连接废液管路。
5. 设定组分收集大小为大体积, 例如 100ml , 以保证使阀门在整个运行过程中位于组分收集状态。以 1 ml/min 流速启动泵并注射丙酮溶液。在层析图中从上样点到峰出现的体积等于 V2。
6. V1 减去 V2 获得延迟体积。

<sup>1</sup> 这种方法不能与ÄKTA avant一起使用, 因为组分收集管路不能由用户断开。

## 称量水

为了以称量水的方式实验测定延迟体积, 需要一个预先称重的容器 ( 例如组分收集管 )。

1. 确保设置系统流路, 以便把液体从紫外 / 可见光流动池导向组分收集器。
2. 用鲁尔接头更换紫外 / 可见光流动池的入口管路。
3. 用至少 5 ml 的水充满注射器并注射到流动池内, 以确保流路到组分收集器的管路充满水。
4. 用至少 20 ml 的空气填充注射器 ( 因为压缩 ), 然后收集注射空气时被替换的水。
5. 通过称量水测定延迟体积。
6. 重复至少两次用于计算平均值。

 1 mg的水等于1 µl( 4°C; 随温度变化而变化 )

# 附录 4

## 层析柱常见疑难解答

如果系统压力过高是层析柱导致, 下列流程 ( 图A 4.1 ) 可能有助于解决这个问题。

- 👉 关于如何清洗层析柱的信息, 见层析柱说明书。
- 👉 在清洗程序开始时系统背压短时间提高是正常的。

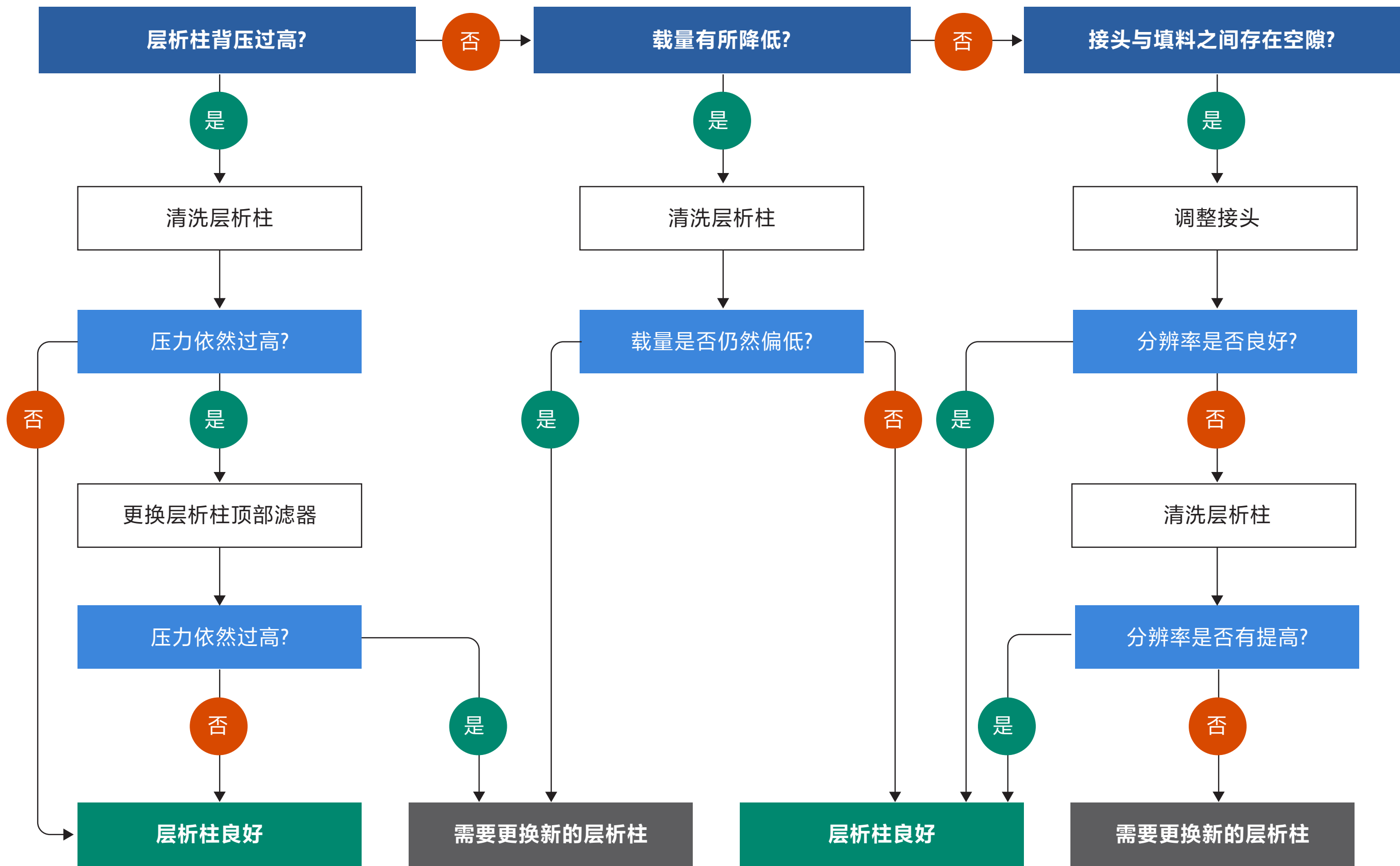


图 A4.1. 处理层析柱问题的决策树。



# 附录 5

## 组分收集器常见疑难解答

一些组分收集器的问题和预防/修正措施如表A5.1所示。

表 A5.1. 使用组分收集器时的常见问题与解决方法

常见问题

| 问题                  | 原因                                        | 预防/修正措施                                                    |
|---------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 组分标记与实际的收集管更改不匹配    | 软件中输入了错误的延迟体积                             | 确保输入正确的体积。关于如何测定延迟体积见附录3                                   |
| 收集管之间溢出             | 软件没有设定收集同步<br>组分收集器中无收集管或收集管已满<br>使用的流速过高 | 在软件中, 视情况选择滴同步/储液槽/蛇形模式进行收集<br>确保在开始前用空的收集管摆满组分收集器<br>降低流速 |
| 错误信息 "Sensor dirty" | 收集管位置错误<br>光电管变脏                          | 确保正确放置组分收集管路末端, 以便它不会挡住用于液滴同步的光路。<br>清洗滴同步光电管; 见第10章       |

| Frac-950 问题                                       |                        |                                                              |
|---------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 问题                                                | 原因                     | 预防/修正措施                                                      |
| 收集管之间溢出                                           | 在方法中选择了错误的收集管类型和/或管架类型 | 确保所使用的的收集管和管架与方法中选择的相同                                       |
|                                                   | 在 Frac-950 的初始化过程中排列错误 | 确保组分收集器有足够的空间进行移动<br>如果排列不正确 ( 即使在重启后 ), 联系服务商以重新校准 Frac-950 |
| 错误信息 “Controller Board Error 2012 Frac not Found” | Frac-950 UniNet-1 连接错误 | 确保 UniNet-1 电缆插入了正确的插座。详细信息请查阅用户手册                           |

| Frac-900/920 问题              |                                  |                                                          |
|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 问题                           | 原因                               | 预防/修正措施                                                  |
| 收集管未切换                       | 驱动套筒磨损                           | 更换驱动套筒                                                   |
| 不能正确地切换收集管, 例如, 每次移动超过一个收集管。 | 收集管传感器磨损                         | 更换收集管传感器                                                 |
| 收集管之间溢出                      | 使用了错误的收集管中心位置<br>组分收集器的收集臂未能正确定位 | 切换到收集臂正确的收集管选项, 使液滴落在收集管中心位置<br>确保收集臂按照手册中的说明, 朝向收集管正确定位 |

ÄKTA avant 组分收集器问题

| 问题               | 原因                   | 预防/修正措施                                                                                                           |
|------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 扫描失败             | 扫描失败的原因有很多           | 开启和关闭组分收集器, 让系统重复扫描<br>检查并更换管架 ( 例如, 当管架识别区受损或被堵塞 )<br>如果仍有问题, 检查用户手册中关于组分收集器的故障排除章节<br>如果问题仍无法解决, 请联系 Service 团队 |
| 当组分收集器的门打开时有液体出现 | 液体进入组分收集器组件, 而不是废液容器 | 为了避免废液堵塞, 请确保废液管路没有被弯曲或接触废液容器的底部                                                                                  |

 ÄKTA avant 组分收集器的扫描仅读取试管架的数量和类型。如果没有试管/试板, 系统仍会运行该方法, 这会导致样品损坏。



# 附录 6

## 实验室规模 ÄKTA 系统的介绍

ÄKTA 系统专为从微克到数十克目标蛋白质的纯化而设计。除 ÄKTA start 外, 所有系统均由 UNICORN 软件控制。ÄKTA start 则由 UNICORN start 软件控制, 这是 UNICORN 的简化版本。UNICORN 具有一个通用的控制平台和用户界面, 适用于所有操作规模的层析和过滤。

在以下几页中简单介绍实验室规模的 ÄKTA 系统。

表 A6.1 列出适用于当前可用系统的标准 ÄKTA 系统配置。



图 A6.1 标准的 ÄKTA 系统配置。

图 A6.1 标准的 ÄKTA 系统配置。

| 工作方法                              | ÄKTA 蛋白纯化系统   |                 |                 |
|-----------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|
|                                   | ÄKTA start    | ÄKTA pure       | ÄKTA avant      |
| 简单的一步脱盐、缓冲液置换                     | •             | •               | •               |
| 使用包括支持梯度洗脱的所有常用技术在内的、自动和可重复的蛋白质纯化 | •             | •               | •               |
| 软件兼容法规要求, 例如良好实验室规范 ( GLP )       |               | •               | •               |
| 使用实验设计 ( DoE )的方法开发和优化            |               | ◦               | •               |
| 自动缓冲液配置                           |               |                 | •               |
| 自动 pH 条件筛选                        |               | ◦               | •               |
| 自动填料或层析柱筛选                        |               | ◦               | •               |
| 自动多部纯化                            |               | ◦               | ◦               |
| 放大, 工艺开发                          |               | ◦               | •               |
| 用于系统控制和数据处理的软件 <sup>1</sup>       | UNICORN start | UNICORN 6 或更新版本 | UNICORN 6 或更新版本 |

<sup>1</sup> 对于所选择的系统可能需要特定的软件版本。关于各个系统见网页 [www.cytiva.com.cn](http://www.cytiva.com.cn)

- = 包含
- =可选





图 A6.2 ÄKTA start 系统

**ÄKTA start** 是一种用于实验室规模蛋白质一步纯化的制备型层析系统 (图A6.2)。ÄKTA start 被设计为一种独立的系统，具有直观的设计、简单的流路和用户友好的触摸屏界面。

ÄKTA start 使用内置的快速启动方法或预定义的模板，或通过创建用户自己的方法，使纯化各种蛋白质变得简单，可以与 Frac30 组分收集器、用户友好的 UNICORN start 1.0 控制软件和以应用为中心的预装层析柱结合使用。



图 A6.3. ÄKTA pure 系统

**ÄKTA pure** 是一种灵活的和易于定制的蛋白质纯化系统，可以定制以满足任何蛋白质纯化挑战 (图 A6.3)。这个系统提供有两种版本，分别具有 25 ml/min 和 150 ml/min 的最大流速。ÄKTA pure 25 提供蛋白质、肽和核酸从皮克到微克水平的快速纯化。ÄKTA pure 150 设计用于常规的大规模制备型纯化，并提供较高样品体积的平稳处理和较大量目标蛋白的收集。

ÄKTA pure 取代了停产的 ÄKTApurifier 和 ÄKTAFFLC 系统。



图 A6.4. ÄKTA avant 系统

**ÄKTA avant** (图A 6.4)包含了实现快速和安全的蛋白质纯化的功能。ÄKTA avant 提供有两种版本，分别具有 25 和 150ml/min 的泵。ÄKTA avant 25 专为实验室规模的纯化中填料筛选和方法优化而设计。ÄKTA avant 150 设计用于大规模纯化和稳定性测试。

ÄKTA avant 连同 UNICORN 含有多个功能以促进和自动化蛋白质纯化。

实验设计(DoE)软件模块整合到用于 ÄKTA avant 的 UNICORN 中。它实现实验设计的运行方案的自动化，并在方法开发过程中较少数量实验的同时最大化获得的信息量。

BufferPro 是一种高级的在线缓冲液制备功能，无需人工干预就能给进行缓冲液混合。

内置的组分收集器通过冷却纯化的样品和防止引入灰尘，提供安全性。

ÄKTA avant 具有通用阀门配置以加快纯化和提高重复性：可以自动纯化多达8个样品；监测柱上的压差；可以并联5根层析柱；以及内置的空气传感器防止引入气泡。

# 升级 ÄKTA 系统平台

自 20 世纪 90 年代以来, ÄKTA 层析系统 直提供着多功能、可靠的蛋白质纯化服务。随着 ÄKTA 系统平台的更新和改进, ÄKTAexplorer、ÄKTApurifier、ÄKTAFPLC 和 ÄKTAmicro 已经停产。表 A6.2 列出了这些系统的升级建议。

表 A6.2. 停产的 ÄKTA 系统及其替代产品。

| 产品货号     | 停产系统                  | 升级为                   |
|----------|-----------------------|-----------------------|
| 18130000 | ÄKTAexplorer 10       | ÄKTA avant 25         |
| 18114505 | ÄKTAexplorer 10S      |                       |
| 18111241 | ÄKTAexplorer 100      | ÄKTA avant 150        |
| 18140300 | ÄKTAexplorer 100 Air  |                       |
| 18190026 | ÄKTA <sub>FPLC</sub>  | ÄKTA pure 25 L        |
| 28406268 | ÄKTApurifier UPC 10   |                       |
| 28406264 | ÄKTApurifier 10       | ÄKTA pure 25 M        |
| 28991436 | ÄKTApurifier 10 plus  |                       |
| 28406271 | ÄKTApurifier UPC 100  | ÄKTA pure 150 L       |
| 28406266 | ÄKTApurifier 100      | ÄKTA pure 150 M       |
| 28991435 | ÄKTApurifier 100 plus |                       |
| 28948303 | ÄKTAmicro             | 配有微克级别流路的ÄKTA pure 25 |



# 附录 7

## 不同纯化技术的原理和标准条件

制备型蛋白质纯化的最常用方法均涉及层析。这些方法根据待纯化的蛋白质 ( 目标蛋白 ) 与样品中其他物质之间的性质差异进行分离。本附录对这些关键纯化方法进行了概述。有关方法介绍和实际建议的更多详情, 包括具体例子, 可以在不同的 Cytiva 手册中找到。

### 亲和层析 ( AC )

AC 根据目标蛋白 ( 蛋白组 ) 和连接到层析基架上的特异性配基之间的可逆相互作用分离蛋白质 ( 图 A7.1 )。

这种相互作用可以是生物特异性的, 例如抗体结合 protein A 或受体结合激素。也可以是非生物特异性的, 例如蛋白质结合染料或含有组氨酸的蛋白质结合金属离子 ( 通过固定化金属离子亲和层析 [IMAC], 由于其重要性而在单独章节中介绍 )。AC 提供高选择性, 和中等至高的载量。通常可以在温和条件下进行洗脱。

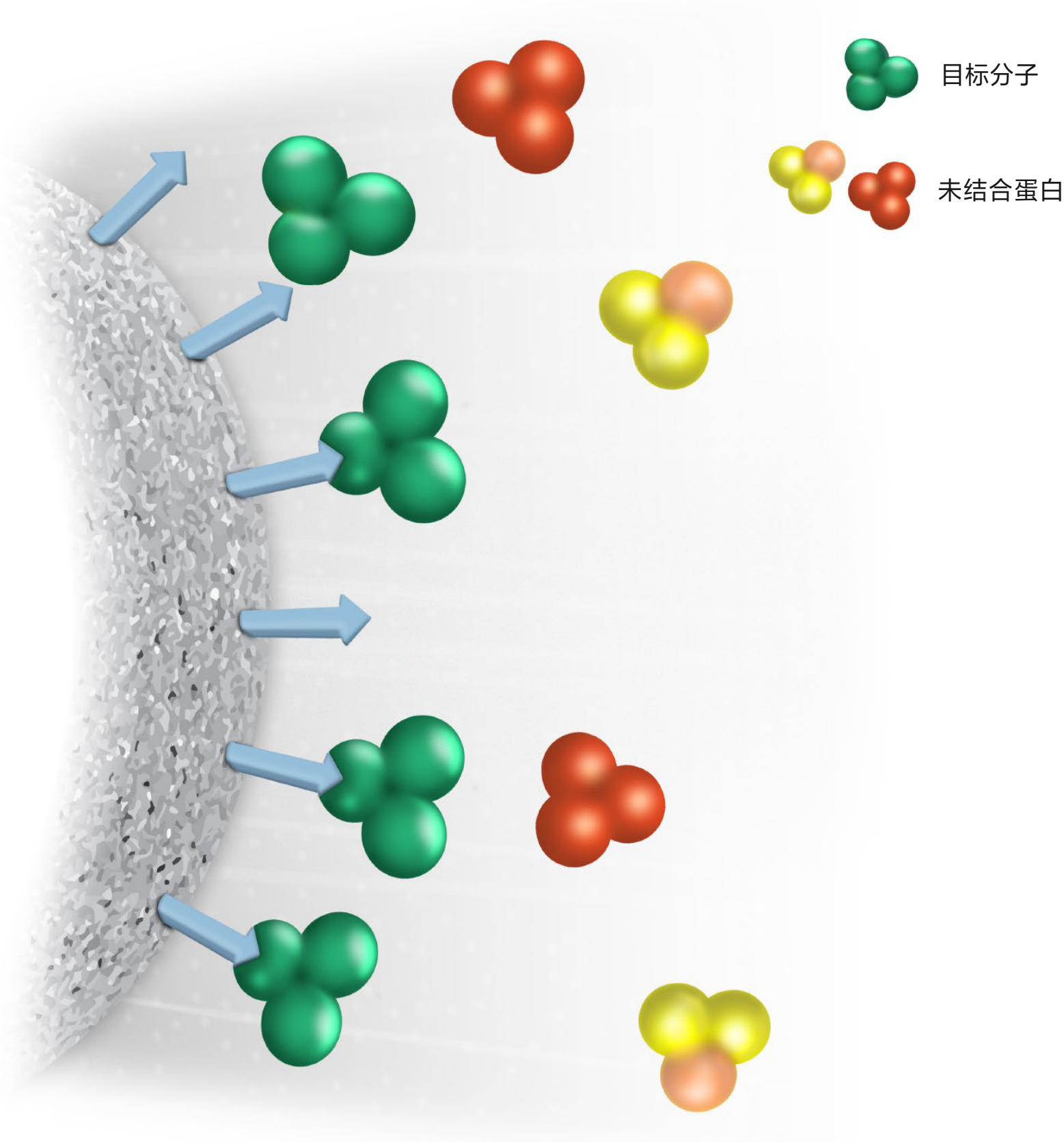


图 A7.1. AC 示意图

原理

在 AC 中, 目标蛋白被互补的结合物质 ( 配基 ) 特异和可逆地结合。样品在有利于与配基特异性结合的条件下上样。未结合的物质被洗出层析柱, 结合的目标蛋白则通过改变条件以有利于洗脱的方式回收。可使用竞争性配基特异的洗脱, 或通过改变如 pH、离子强度或极性等进行非特异性的洗脱。目标蛋白在洗脱过程中得到纯化和浓缩。AC 分离中的关键阶段如图 A7.2 所示。

AC 中的配基被分为两大类: 单特异性配基和族特异性配基。单特异性 AC 的配基在结构上和生物学上与目标分子密切相关。这使得配基的选择在每种情况下都是特异的。这也使得商业上很难生产用于单一特异性分离的 AC 填料。然而, 市场上有用于各种偶联化学的预活化填料, 可供那些想要进行单一特异性 AC的用户使用。这类填料包括 CNBr 活化的 CNBr-activatedSephrose™和 NHS 活化的 NHS-activatedSephrose ( 通过伯胺基耦联蛋白质 ), 或 Epoxy 活化的 Epoxy-activated Sephrose ( 通过分子上的羟基进行耦联 )。

族特异性配基对一组相关物质而不是单一分子具有亲和力。相同的通用配基可用于纯化多种物质( 例如一类酶的成员 ), 而无需为该组内的每种不同物质更换新的填料。用于族特异性 AC 的配基具有更广泛的适用性, 而且有市售用于此目的的亲和填料。表A7.1列举了族特异性配基及其特异性的一些例子。

由于它的高选择性, AC 有时候可以用于单步纯化或在可接受一些杂质的情况下使用。然而, 更常见的将 AC 用于第一个纯化步骤, 然后再用第二步去除残留的杂质或聚合物。 在纯度要求非常高的情况下, 可能需要一个或多个额外的纯化步骤。

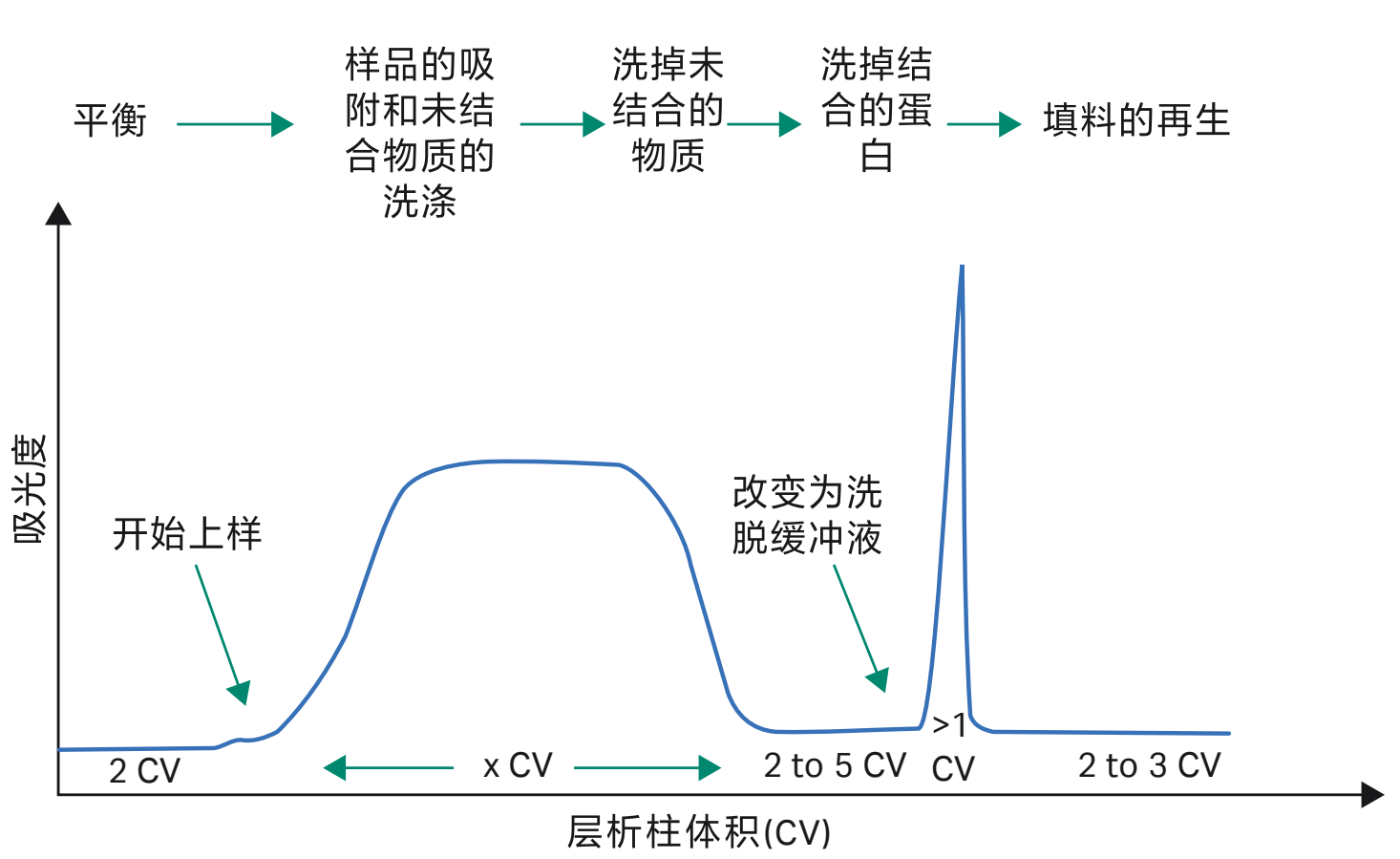


图 A7.2. 典型的亲和纯化

表A7.1. 族特异性配体及其特异性的例子。

| 配基                    | 特异性                |
|-----------------------|--------------------|
| Protein A 或 Protein G | IgG 的 Fc 区         |
| 伴刀豆球蛋白 A              | 吡喃葡萄糖鼠李糖基团         |
| Cibacron™ Blue        | 广泛的酶, 血清白蛋白        |
| 赖氨酸                   | 纤溶酶原, 核糖体 RNA      |
| 苯甲脒                   | 丝氨酸蛋白酶             |
| 钙调蛋白                  | 受钙调蛋白调控的蛋白质        |
| 肝素                    | 凝血因子、脂蛋白、脂肪酶、核酸结合酶 |
| 金属离子 ( 例如 Ni2+ )      | 含有组氨酸的蛋白质或肽        |

## 亲和标签蛋白用于实验室规模的纯化

目前, 大多数的实验室规模纯化主要利用亲和标签蛋白。大量不同的亲和标签填料和预装层析柱可供选择, 以便为每个目标蛋白和纯化任务选择最佳纯化条件。一个常见的任务是使用 IMAC 纯化组氨酸标记蛋白或在填料上耦联谷胱甘肽纯化谷胱甘肽S转移酶 ( GST ) 标记蛋白的纯化。

AC 也被用于去除特定的污染物, 例如 Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow, 它用于丝氨酸蛋白酶的去除。预活化的填料可以用于各种配基的共价偶联。例如, 抗体可以靶向目标蛋白, 因此将其偶联在 NHS 活化的 NHS-activated Sepharose 上, 对所需要蛋白的进行免疫亲和纯化。

## 更多信息 – 手册

- Strategies for protein purification, 28983331*
- Purifying challenging proteins, principles and methods, 28909531*
- Affinity chromatography, principles and methods, 18102229*
- Antibody purification, principles and methods, 18103746*
- Recombinant protein purification handbook: principles and methods, 18114275*
- GST gene fusion system, 18115758*

## 固定化金属离子亲和层析 (IMAC)

IMAC 是基于蛋白质表面某些氨基酸残基与螯合配基固定的二价金属离子 ( 例如  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ) 之间的相互作用。这种相互作用主要发生在组氨酸和金属离子之间, 但也有其他氨基酸, 例如色氨酸和半胱氨酸。组氨酸标签蛋白在 IMAC 中具有非常高的亲和力, 这是因为标签上有多个组氨酸残基 ( 6-10个 )。这些蛋白通常是样品粗提取物 ( 例如细菌裂解物 ) 中的结合能力是最强的, 而其他细胞蛋白将不结合或弱结合。



原理

IMAC纯化首先要以含有低浓度咪唑的结合缓冲液平衡层析柱。咪唑的浓度取决于所选择的填料( 可以在特定填料的说明书中找到 )。咪唑与固定化金属离子结合, 并成为反配体。样品在上样到层析柱前应该调整到与结合缓冲液相同的咪唑浓度。含有组氨酸标签的蛋白质与层析柱结合, 同时取代咪唑反配体。使用结合缓冲液洗涤层析柱。使用从 100 到 500 mM 的咪唑线性梯度或通过分步梯度洗脱结合的蛋白。

梯度洗脱 ( 图A7.3 ) 通常会出现两个峰, 前一个峰对应于裂解物中天然结合的蛋白, 后一个峰对应于组氨酸标签蛋白, 它具有对填料更高的亲和力。分步梯度洗脱 ( 图A7.4 ) 只产生一个峰, 组氨酸标签蛋白通常具有较低的纯度。不过, 这是一个强大的捕获步骤, 可以与第二个纯化步骤如凝胶过滤层析结合使用, 以获得更高的纯度。

组氨酸标签很小, 通常对蛋白质性质的影响比其他标签小。所以, 融合蛋白纯化后不一定需要去除组氨酸标签。在大肠杆菌中表达的组氨酸标签蛋白能够以两种主要的形式累积: 一种是具有生物学功能的可溶性蛋白, 另一种是包涵体, 即或多或少未折叠、无活性的目标蛋白质。

更多信息 - 手册

Recombinant protein purification handbook: principles and methods, 18114275

Strategies for protein purification, 28983331

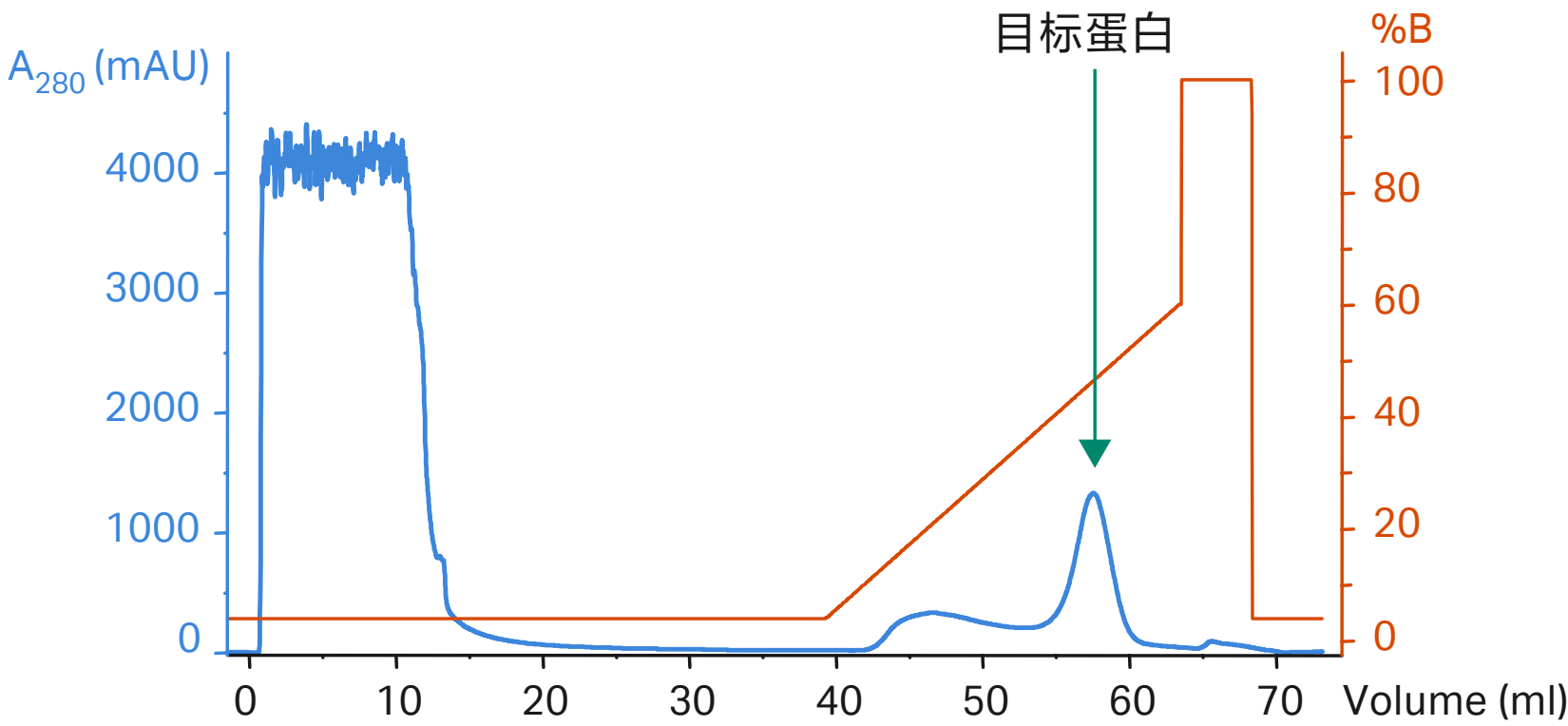


图 A7.3. 利用梯度洗脱的典型的 IMAC 纯化。

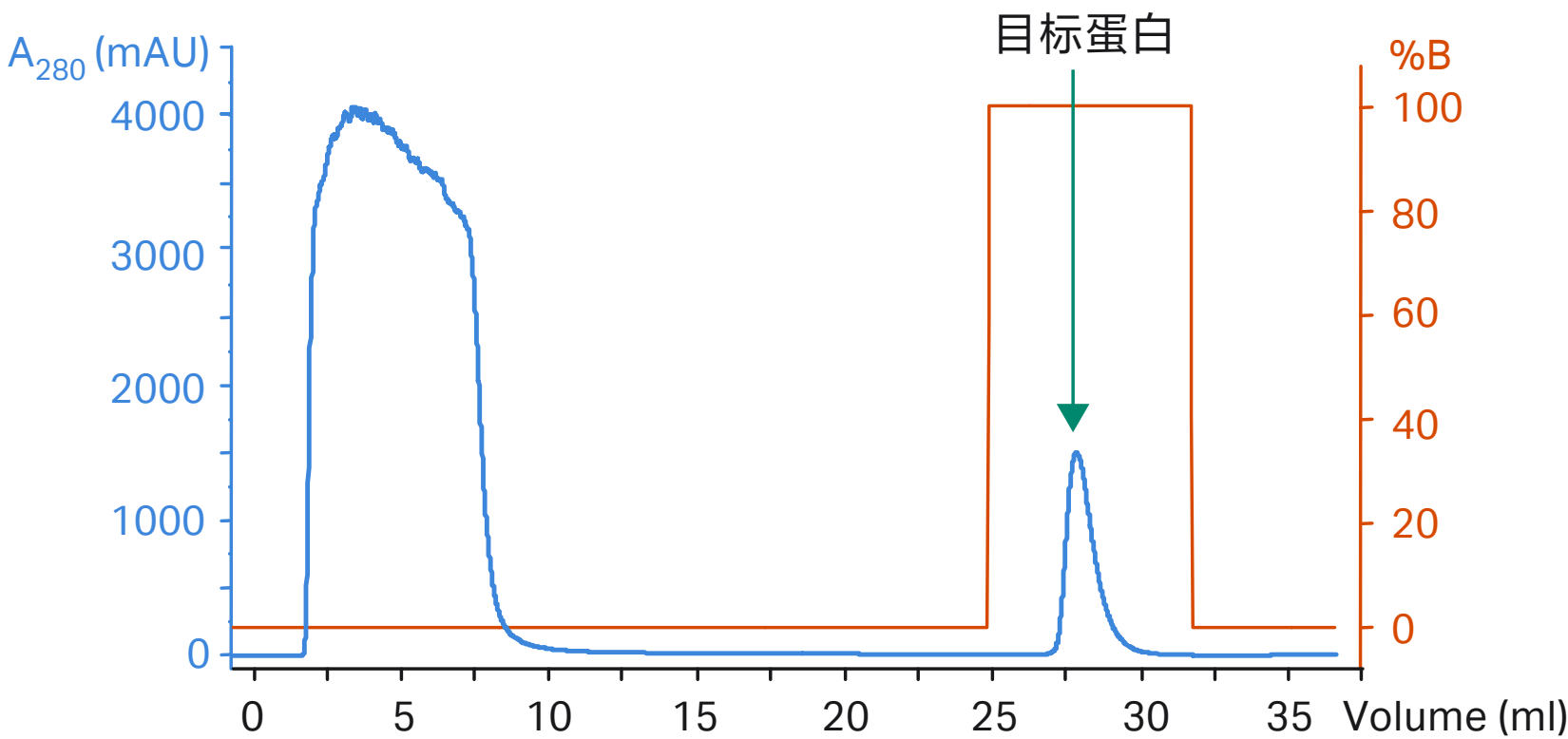


图 A7.4. 利用分步洗脱的典型的 IMAC 纯化。

# 尺寸排阻层析 (SEC)

SEC 可以在温和条件下利用分子量大小的不同进行物质的分离。这种技术可以用于蛋白质纯化 (图 A7.5 ) 或组分离 (图 A7.6 )。组分分离主要用于样品的脱盐和缓冲液置换。

SEC 是一种非吸附方法 (图 A7.7 ), 这意味着样品组分不被浓缩。事实上, 样品区带在流穿层析柱后会变宽, 导致样品的稀释。必须保持较小的上样体积。在制备型 SEC 中, 0.5% 到 2% 总层析柱体积的上样量可以获得最大的分辨率; 然而, 高达 5% 的总层析柱体积的上样量也能提供可接受的分离效果。如果目标蛋白与杂质之间的分辨率很高, 甚至可以使用更大的上样体积。为了提高载量, 在 SEC 前可以浓缩样品, 但是应避免浓度超过 70 mg/ml, 因为粘度影响可能会导致严重的区带展宽 (所谓的粘性指进), 从而降低分辨率。

样品组分被等度洗脱 (单一缓冲液, 无梯度)。可以在广泛的 pH、离子强度和温度范围内进行分离。此外, 填料耐受多种添加剂: 如辅酶、蛋白质稳定剂、去垢剂、尿素和盐酸胍等。缓冲液组成通常不影响分辨率, 建议包含低浓度的盐, 例如 25 到 150 mM NaCl, 以消除蛋白质与 SEC 基质之间的弱的静电作用。选择缓冲液条件以适合样品类型和维持目标蛋白的活性。SEC 的一个优点是样品不必与用于平衡和运行所使用的缓冲液完全相同。样品中的缓冲液在分离过程中可将被置换为运行缓冲液。因此, 可以根据用于进一步纯化、分析、保存或使用所需要的条件选择平衡缓冲液。填料的选择是 SEC 分辨率优化的关键参数。

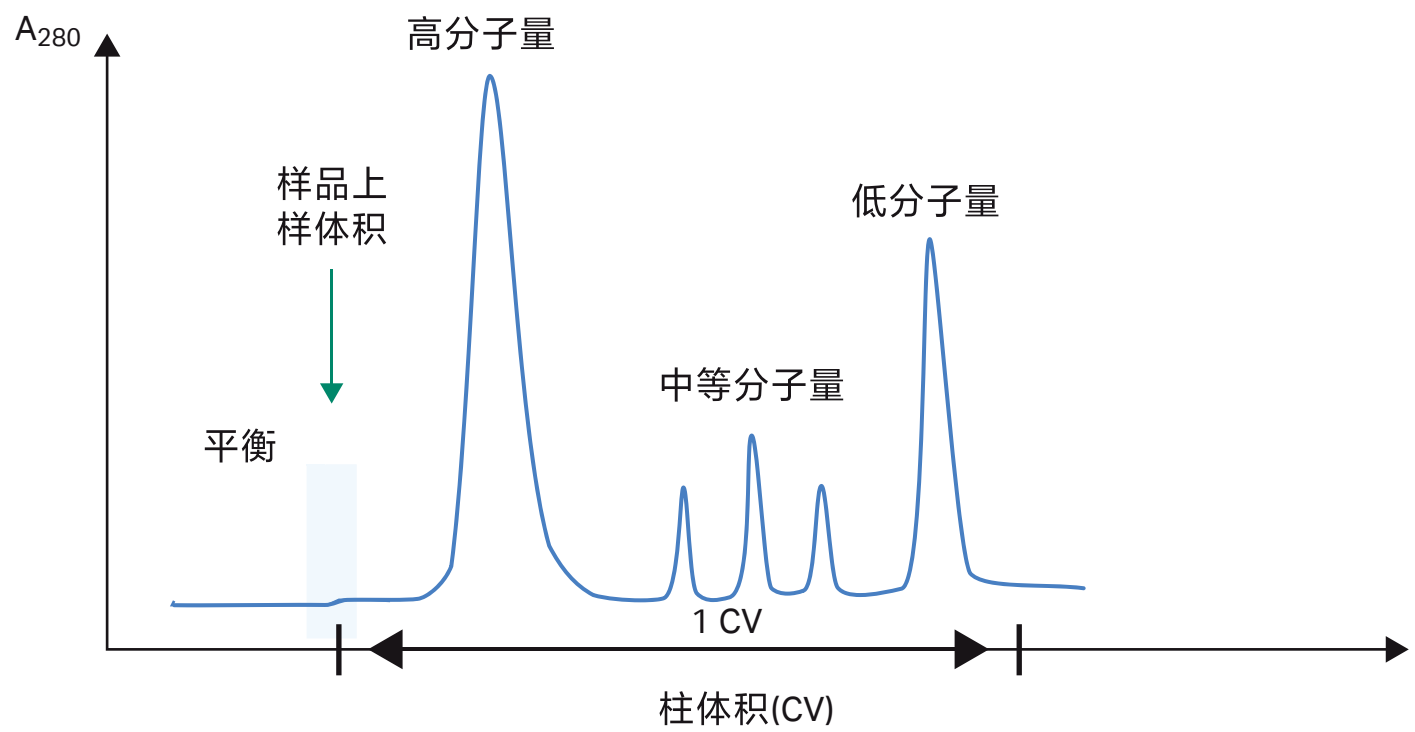


图 A7.5. SEC 纯化原理。

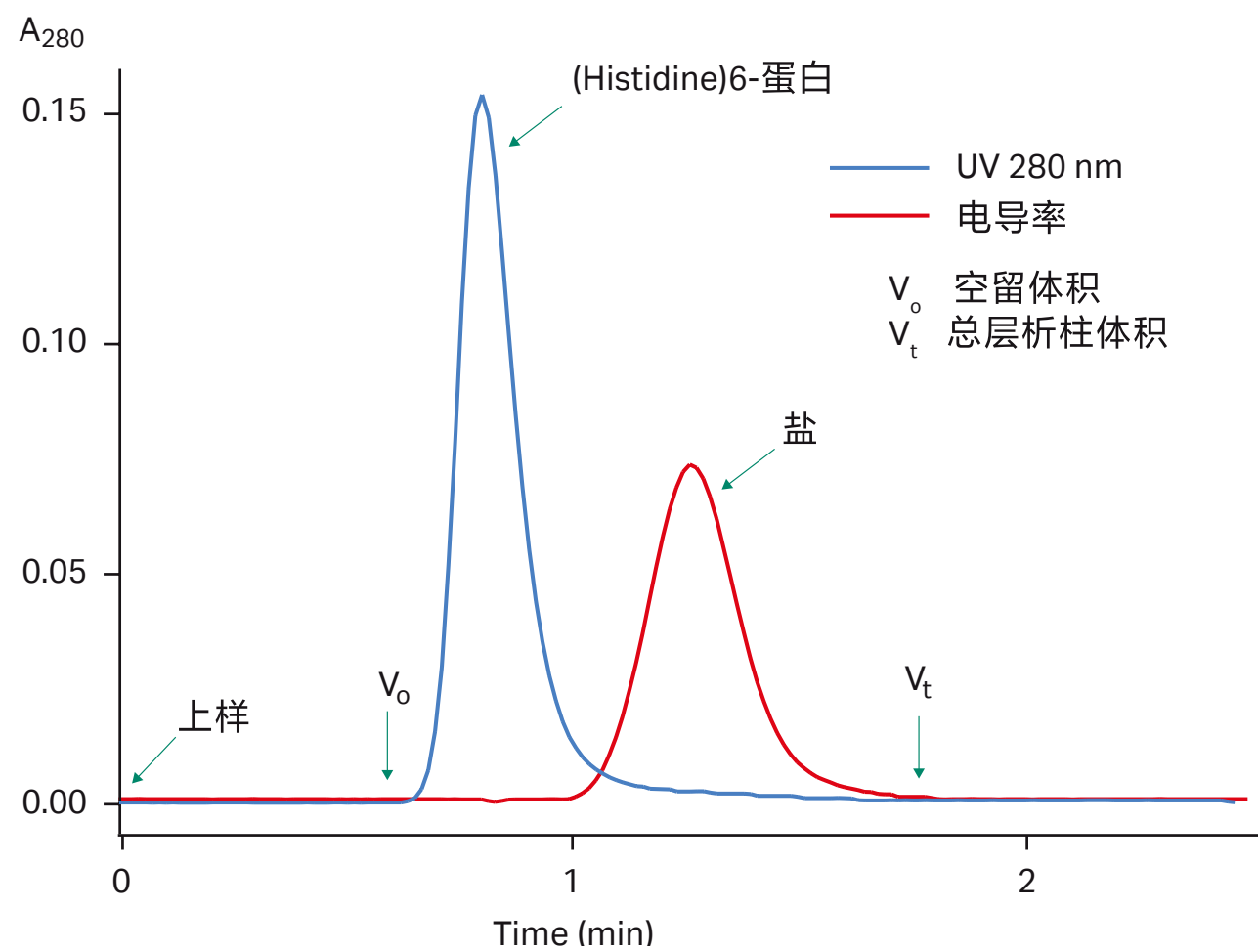


图 7.6. 用于蛋白质脱盐的组分分离的典型例子。

SEC 应用

SEC 是一种强大的蛋白质纯化方法, 可用于已经通过一个或多个初始纯化步骤的蛋白质纯化方法。经过这些步骤后, 样品被浓缩, 而且大量的杂质已被去除。SEC 用于去除剩余的杂质。它也将去除目标蛋白的寡聚体或多聚体。因此, SEC 后获得的纯化目标蛋白在大小上也将是均一的。SEC 很少用作第一个纯化步骤, 但对于中等复杂程度的小样品可能是有用的。

更多信息 - 手册

- Size exclusion chromatography, principles and methods*, 18102218
- Strategies for protein purification*, 28983331
- Purifying challenging proteins, principles and methods*, 28909531

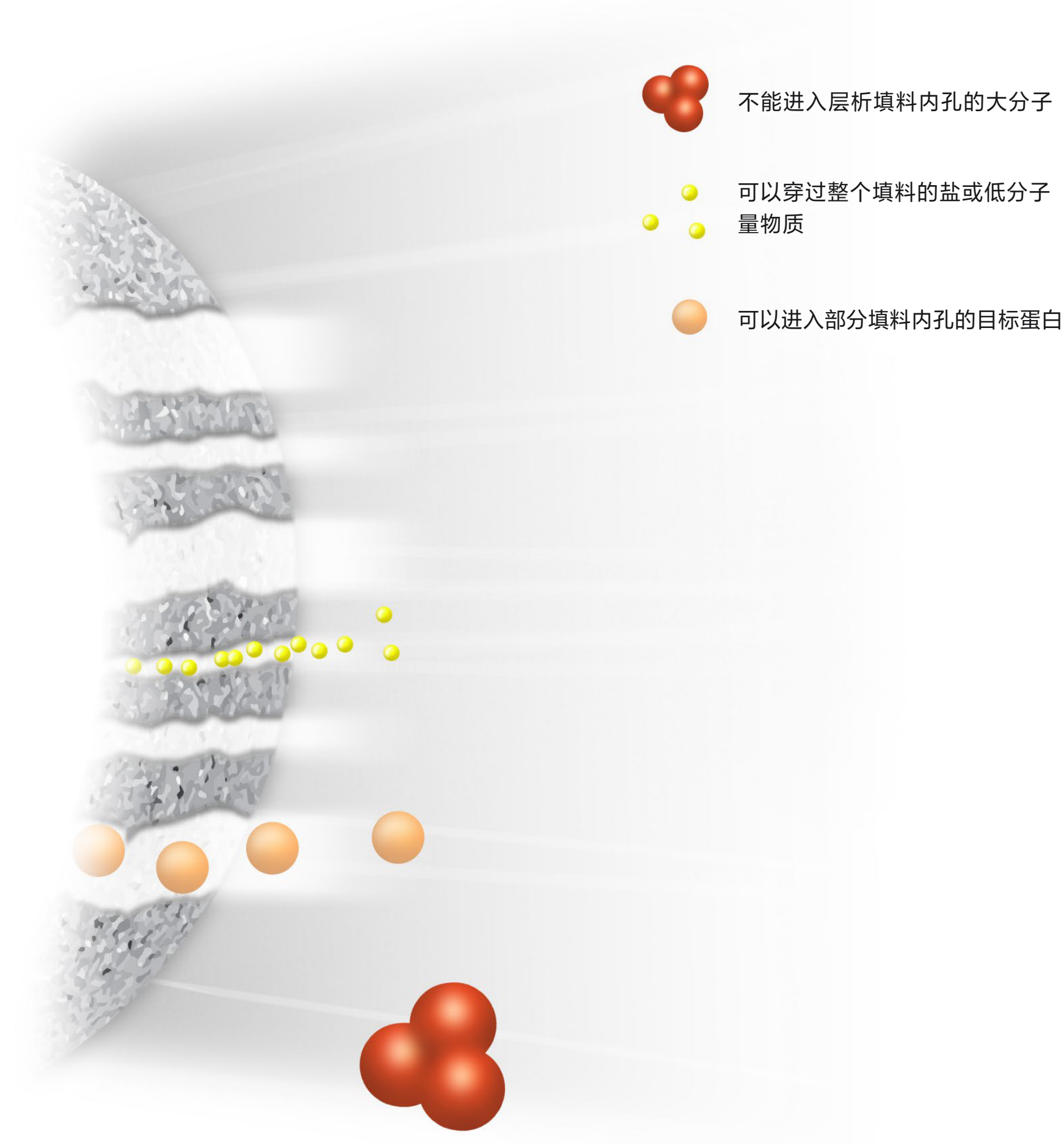


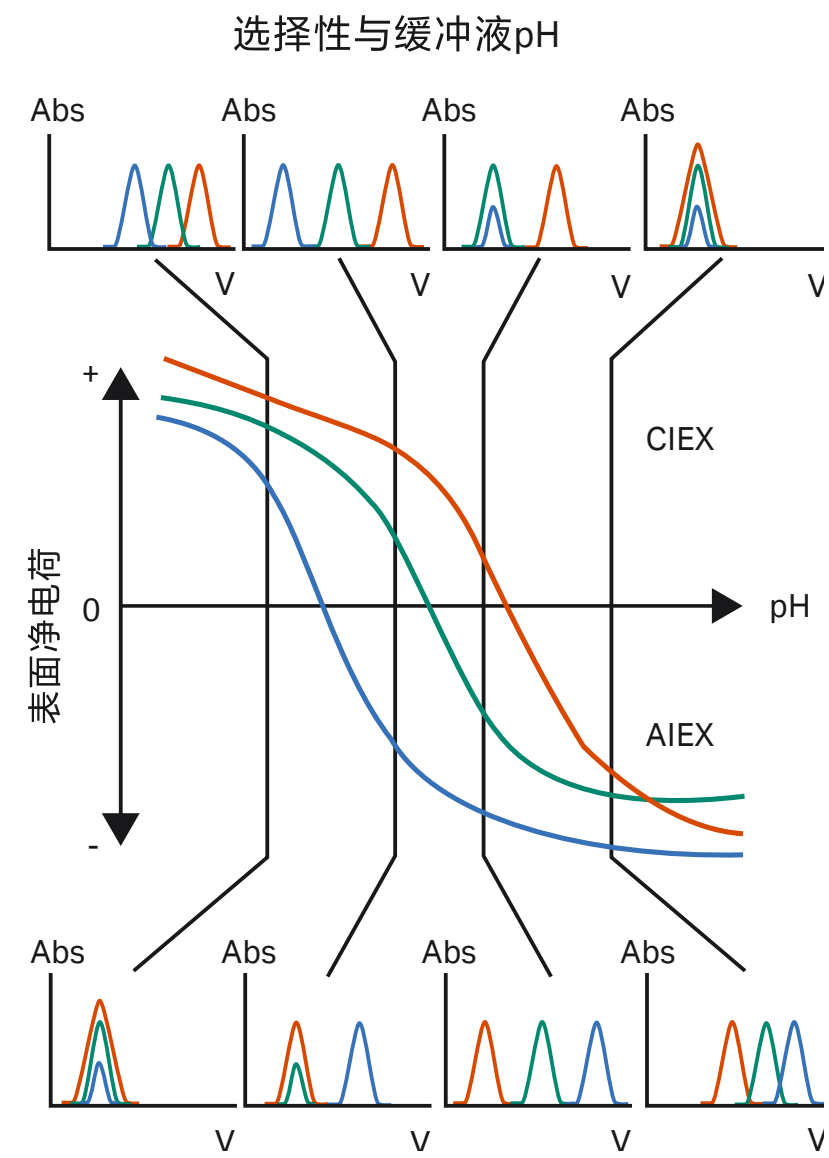
图 A7.7. SEC 示意图



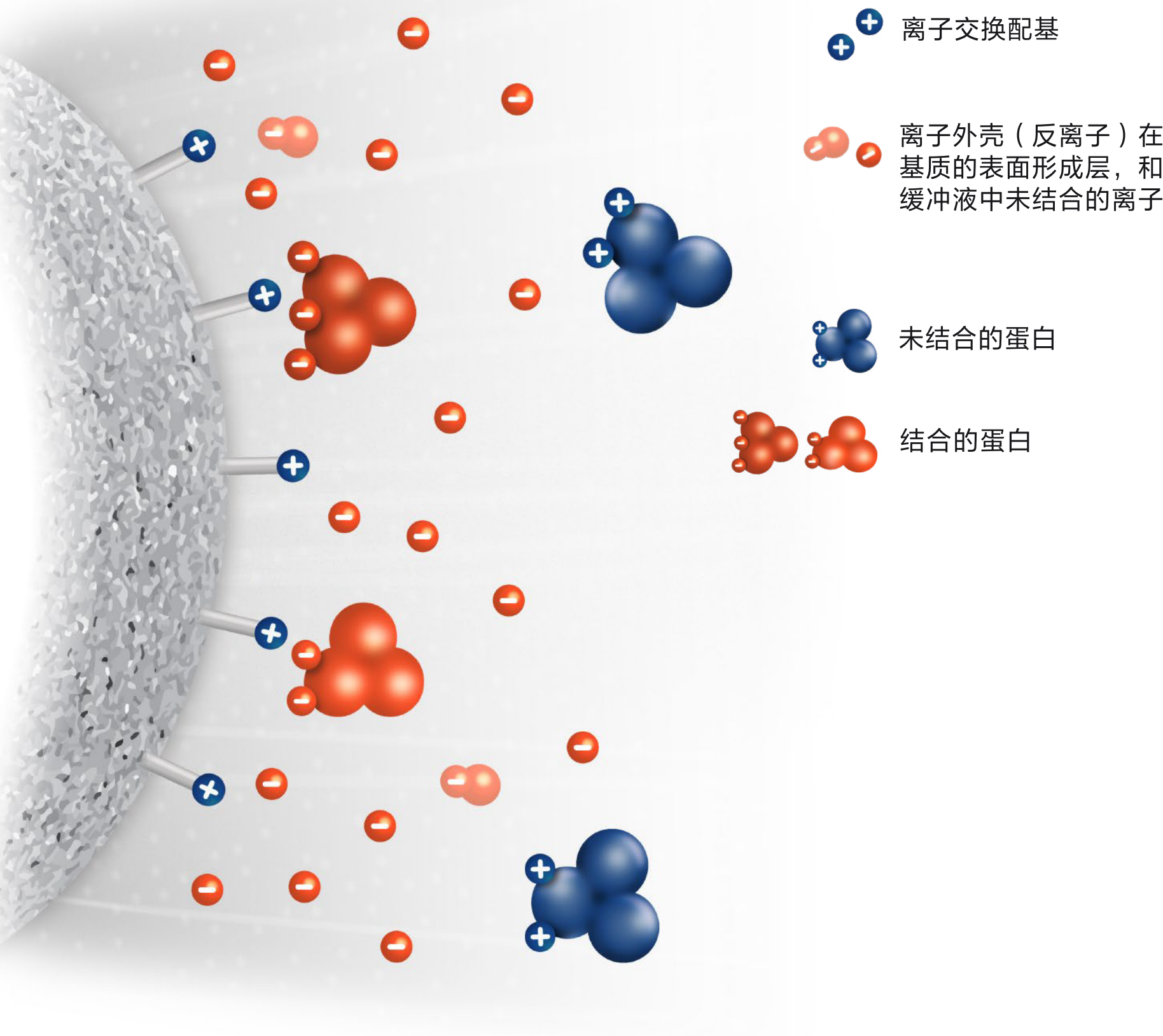
## 离子交换层析 (IEX)

IEX 利用蛋白质表面电荷的差异, 从而实现高分辨分离和高载量能力 ( 图 A7.8 )。该分离是基于带电蛋白与带相反电荷的填料之间的可逆相互作用, 目标蛋白在结合过程中被浓缩, 并以纯化、浓缩的形式收集。由于 IEX 的结合动力学是快速的, 因此可以在高流速下使用 IEX 填料, 而且可以使用刚性的层析填料颗粒。

蛋白质的表面净电荷随周围环境 pH 的变化而变化 ( 图 A7.9 )。通常情况下, 当环境 pH 高于等电点 (pI) 时, 蛋白质将结合到带正电的阴离子交换剂上; 当环境 pH 低于等电点时, 蛋白质将结合到带负电的阳离子交换剂上。



**图A7.9.** pH对蛋白质洗脱模式影响的示意图。中间图显示三种蛋白质的表面净电荷 ( 蓝色、绿色和红色 )。顶部四个层析图描述了在阳离子交换层析 (CIEX) 中这些蛋白在不同 pH 值下进行盐梯度洗脱的情况。底部层析图则显示的是在阴离子交换层析 (AIEX) 中的情况。



**图A7.8.** 带正电荷配基的阴离子交换层析 ( AIEX )的示意图。相同的原理适用于阳离子交换层析 ( CIEX ), 但配基带负电荷。

原理

蛋白质在低离子强度下结合到层析柱上。然后改变条件, 使结合的物质不同程度地解吸下来。通常通过提高盐浓度或改变 pH 来进行线性梯度洗脱( 图 A7.10 )或分步梯度洗脱( 图 A7.11 )。最常用的盐是NaCl, 但其他盐也可以用于洗脱, 例如含有K<sup>+</sup>, Ca2<sup>+</sup>, Mg2<sup>+</sup>, CH3 COO<sup>-</sup>, SO42<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, or Br<sup>-</sup> 的盐。所使用的缓冲液也可能影响分离效果。与蛋白质结合的离子可能改变蛋白质在 IEX 中的表现。

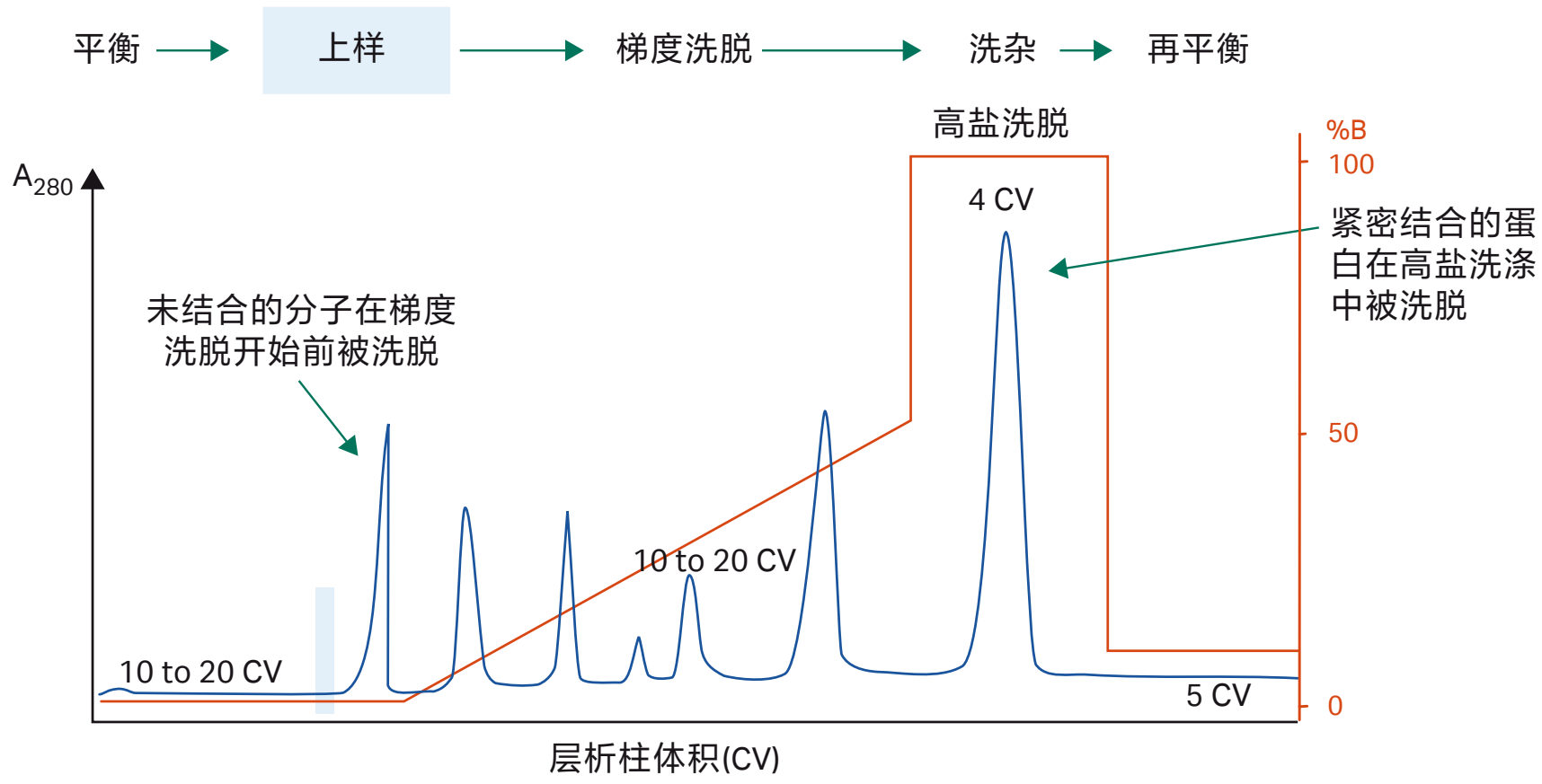


图 A7.10. 经典的利用梯度洗脱 IEX 纯化。

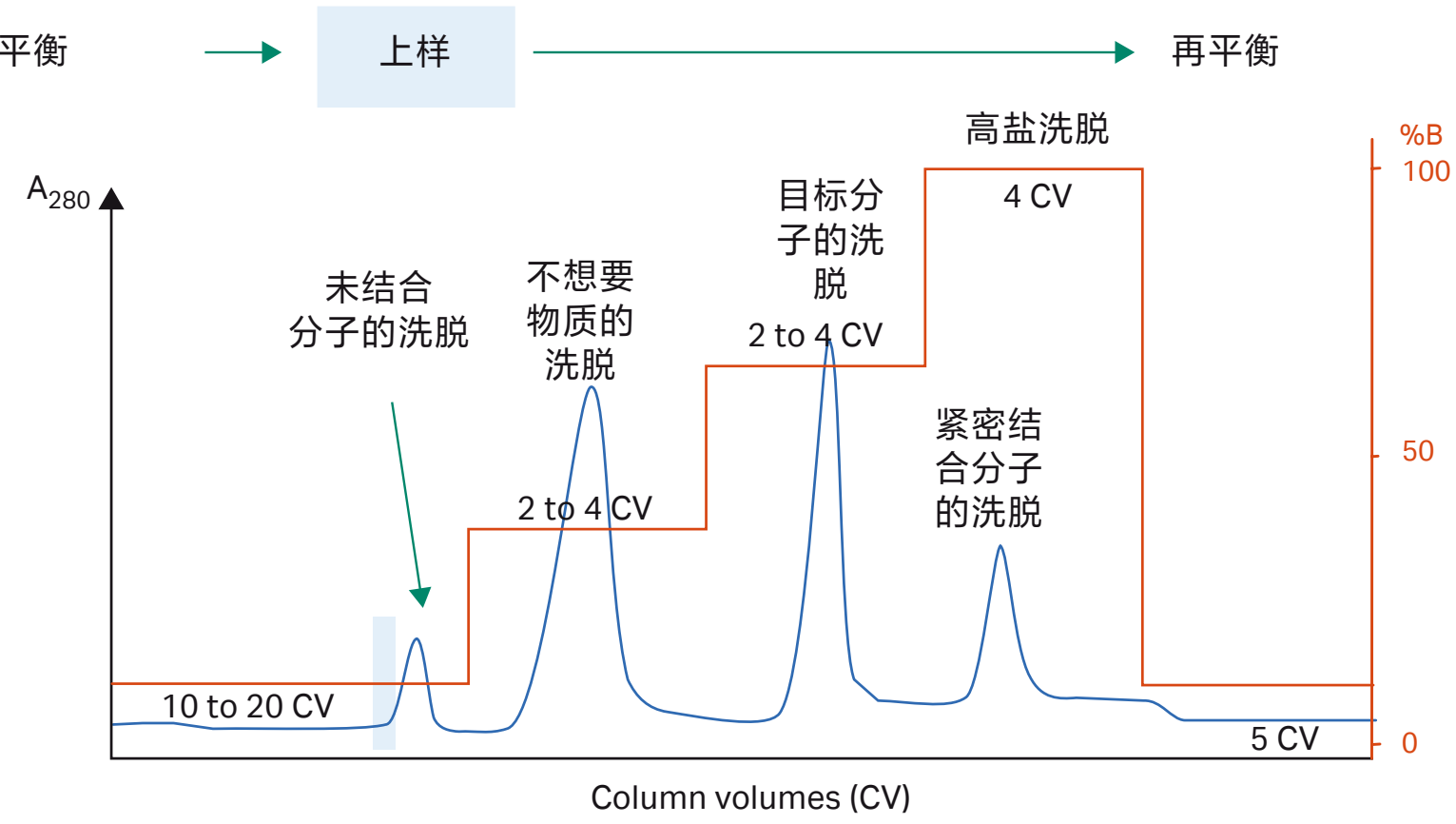


图 A7.11. 经典的利用分步洗脱的 IEX 纯化。

## 强与弱离子交换剂

离子交换剂可分为强阳/阴离子交换剂或弱阳/阴离子交换剂。强的 IEX 填料在广泛的 pH 范围具有相同的表面电荷密度, 而弱离子交换剂的电荷密度随 pH 变化而变化。在不同的 pH 下, 弱离子交换剂的选择性和载量会有所不同。建议首先尝试强离子交换剂。如果需要其他的选择性, 则尝试弱的离子交换剂。

## IEX 应用

IEX 可以用于多步纯化步骤的任何一步: 作为第一步, 其高结合载量和高流速可以从大体积样品中捕获目标蛋白; 作为中度纯化步骤可以除去大部分杂质; 或作为最后一步用于高分辨率纯化以去除残留的杂质。通常, IEX 用于结合目标分子, 但是它也可以用于结合杂质, 让目标蛋白流穿层析柱。可以在不同 pH 下重复进行 IEX 以分离具有截然不同的电荷属性的多个蛋白。另外, 使用 CIEX 的纯化步骤可以在相同 pH 下使用 AIEX 的完成第二个纯化步骤。

## 多模式离子交换剂

多模式离子交换剂, 例如 Capto™ adhere 和 Capto™ MMC 填料, 就是为了提供新型选择性而开发的。带电荷的配基由于引入额外的功能基团, 因此具有多种相互作用力 ( 氢键、疏水作用和范德华力的结合 )。Capto™ adhere 用于除去单克隆抗体 ( MAbs ) 的聚集体以获得纯的单体。羟基磷灰石层析 ( HAC ) 也可以被认为是一种多模式离子交换方法。羟基磷灰石晶体 (  $\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_3\text{OH}$  ) 可以用作层析填料。人们认为蛋白质能够同时结合羟基磷灰石的钙离子和磷酸根离子。羟基磷灰石在中性 pH 时带负电荷, 而结合AIEX的蛋白质往往也结合羟基磷灰石。HAC 是一种不常见的纯化方法, 部分原因是由于其分离机制难以预测以及结合载量较低。

## 更多信息 – 手册

*Ion exchange chromatography and chromatofocusing, principles and methods*, 11000421

*Multimodal chromatography handbook*, 29054808

*Strategies for protein purification*, 28983331

*Purifying challenging proteins, principles and methods*, 28909531



# 疏水作用层析 (HIC)

HIC 分离具有疏水性差异的蛋白质。这种方法非常适合作为纯化方案中的捕获或中度纯化步骤。分离是基于蛋白质与层析填料的疏水官能团之间可逆的相互作用 ( 图 A7.12 )。高离子强度缓冲液可以增强这种相互作用, 这使 HIC 成为硫酸铵沉降或 IEX 中的高盐洗脱后一个极好的纯化步骤。目前 HIC 机制还没有普遍接受的理论。对于机制的简要讨论, 见 Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography: Principles and Methods, 11001269。

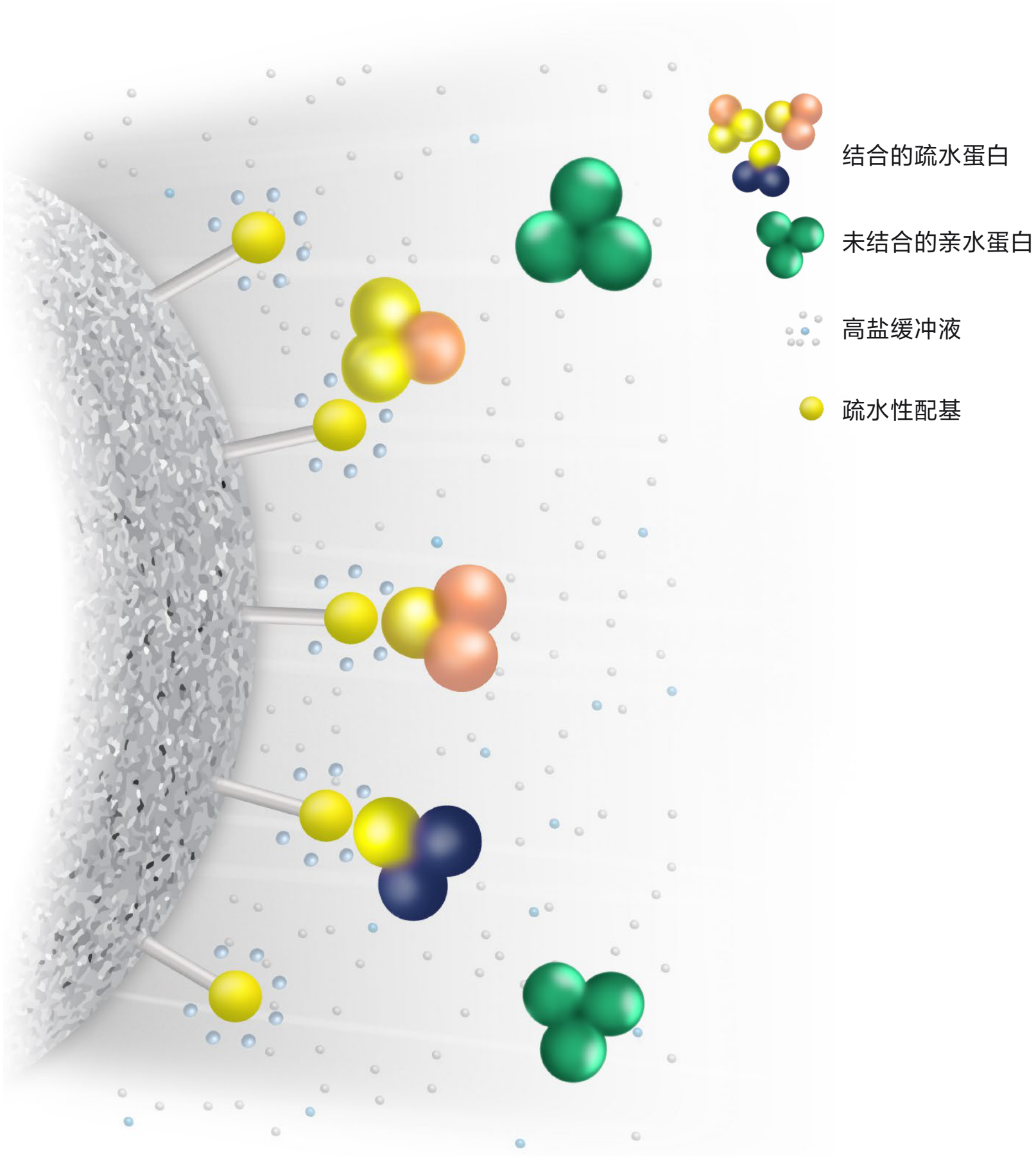


图 A7.12. HIC 原理图。

原理

许多样品组分会在高离子强度的溶液中结合 HIC 层析柱, 通常为 1 到 2 M 硫酸铵或 3 M NaCl。然后改变条件使结合的物质被不同程度的洗脱下来, 通常通过降低盐浓度进行洗脱。通过连续 (图 A7.13) 或逐步 (图 A7.14) 降低盐浓度进行洗脱。最常用的是利用降低硫酸铵浓度梯度洗脱样品, 目标蛋白在结合过程中被浓缩。其他洗脱步骤包括减少洗脱液的极性 (乙二醇梯度达到 50%)、添加离液剂 (例如尿素和盐酸胍) 或去垢剂, 或改变 pH 和温度。

HIC 的优化涉及筛选不同的配基和配基密度的填料, 并摸索获得最佳结合选择性和载量的条件。高浓度的盐, 特别是硫酸铵, 可能会沉淀蛋白质。因此, 需要检测目标蛋白在要使用的结合条件下的溶解性。

更多信息 - 手册

*Hydrophobic interaction and reversed phase chromatography, principles and methods*, 11001269

*Strategies for protein purification*, 28983331

*Purifying challenging proteins, principles and methods*, 28909531

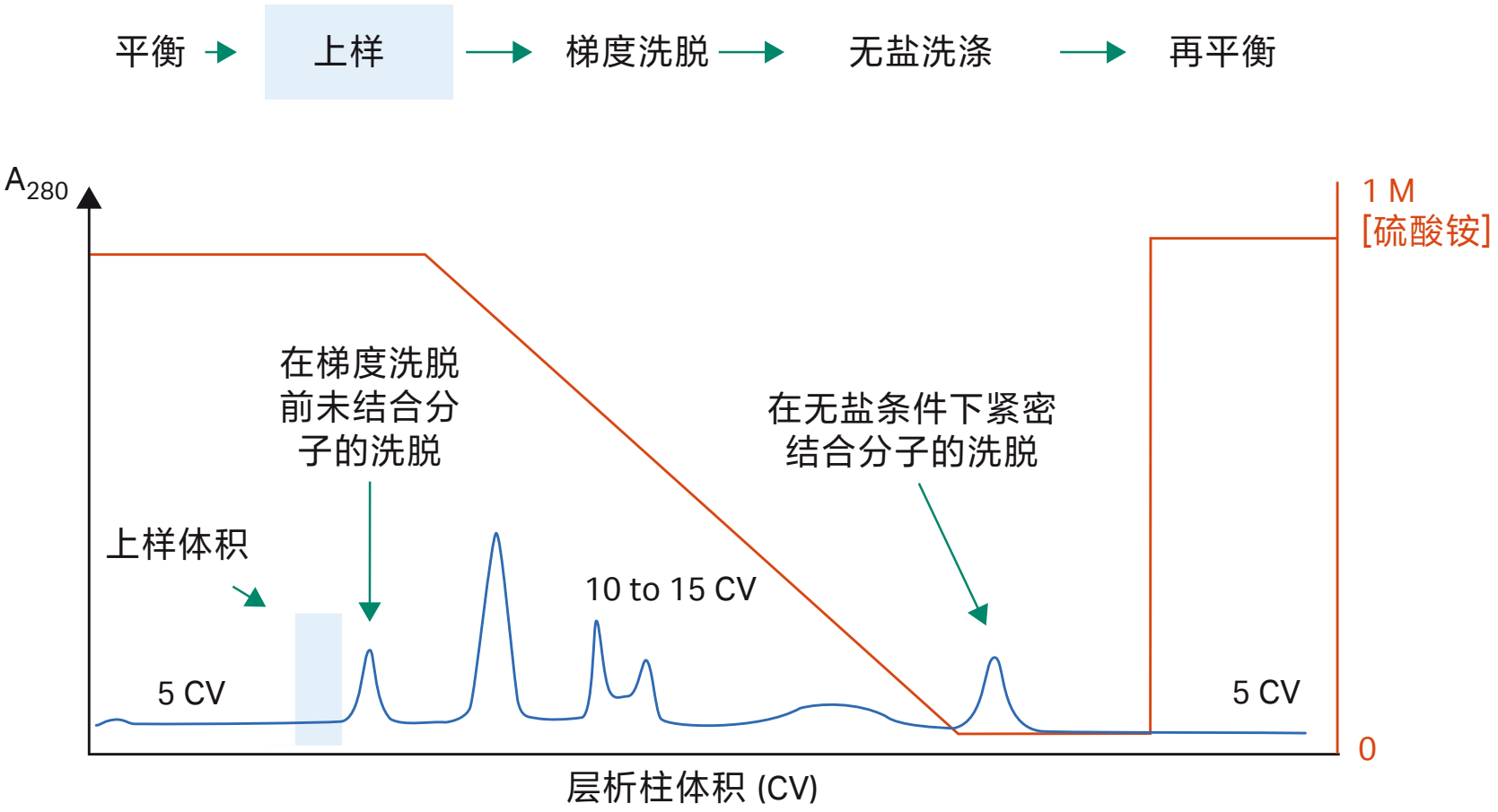


图 A7.13. 利用梯度洗脱的 HIC 纯化。

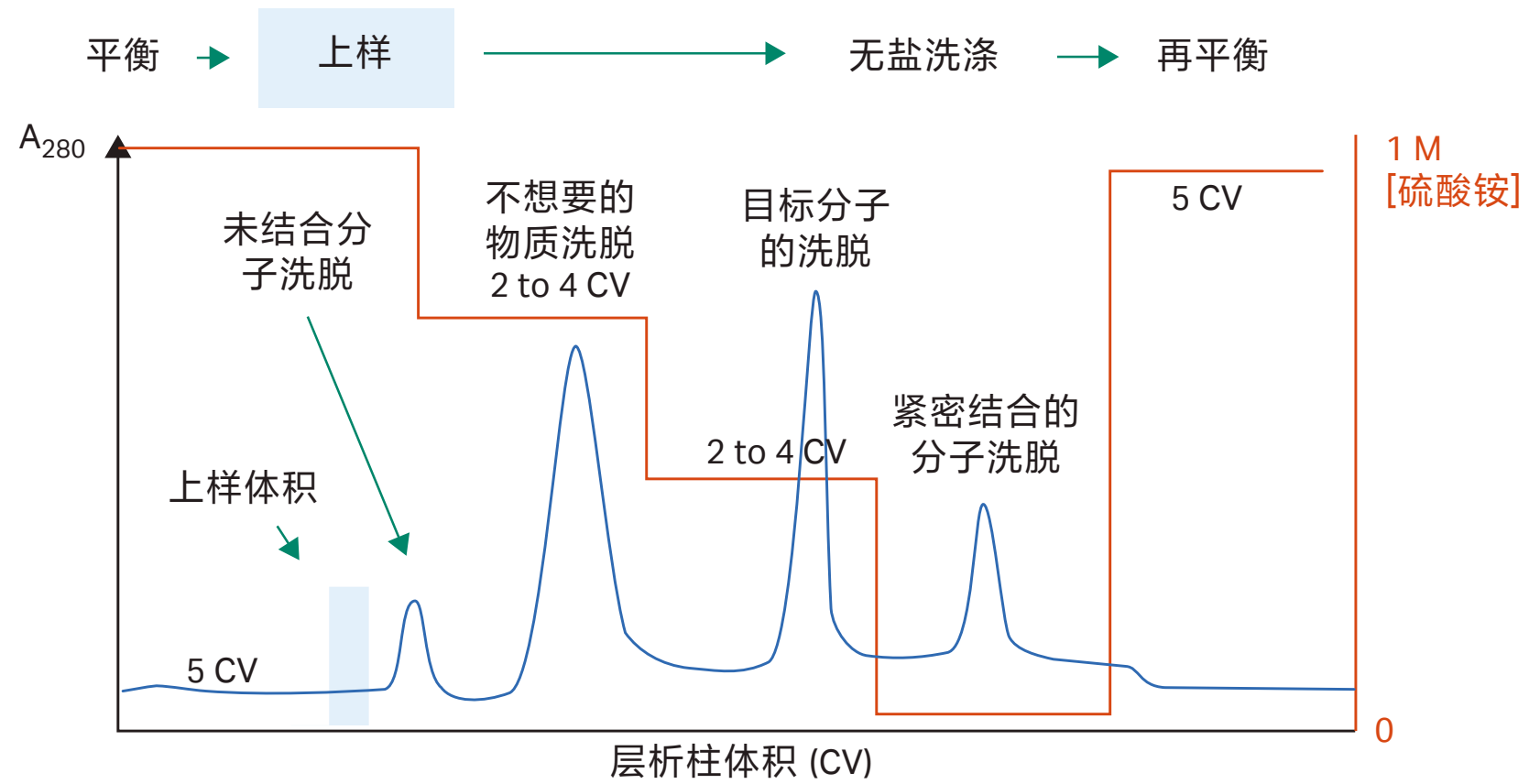


图 A7.14. 利用分步洗脱的典型 HIC 纯化。



# 反相层析 (RPC)

RPC 根据疏水性分离蛋白质和肽( 图 A7.15 )。RPC 是一种高分辨率方法, 需要使用有机溶剂。

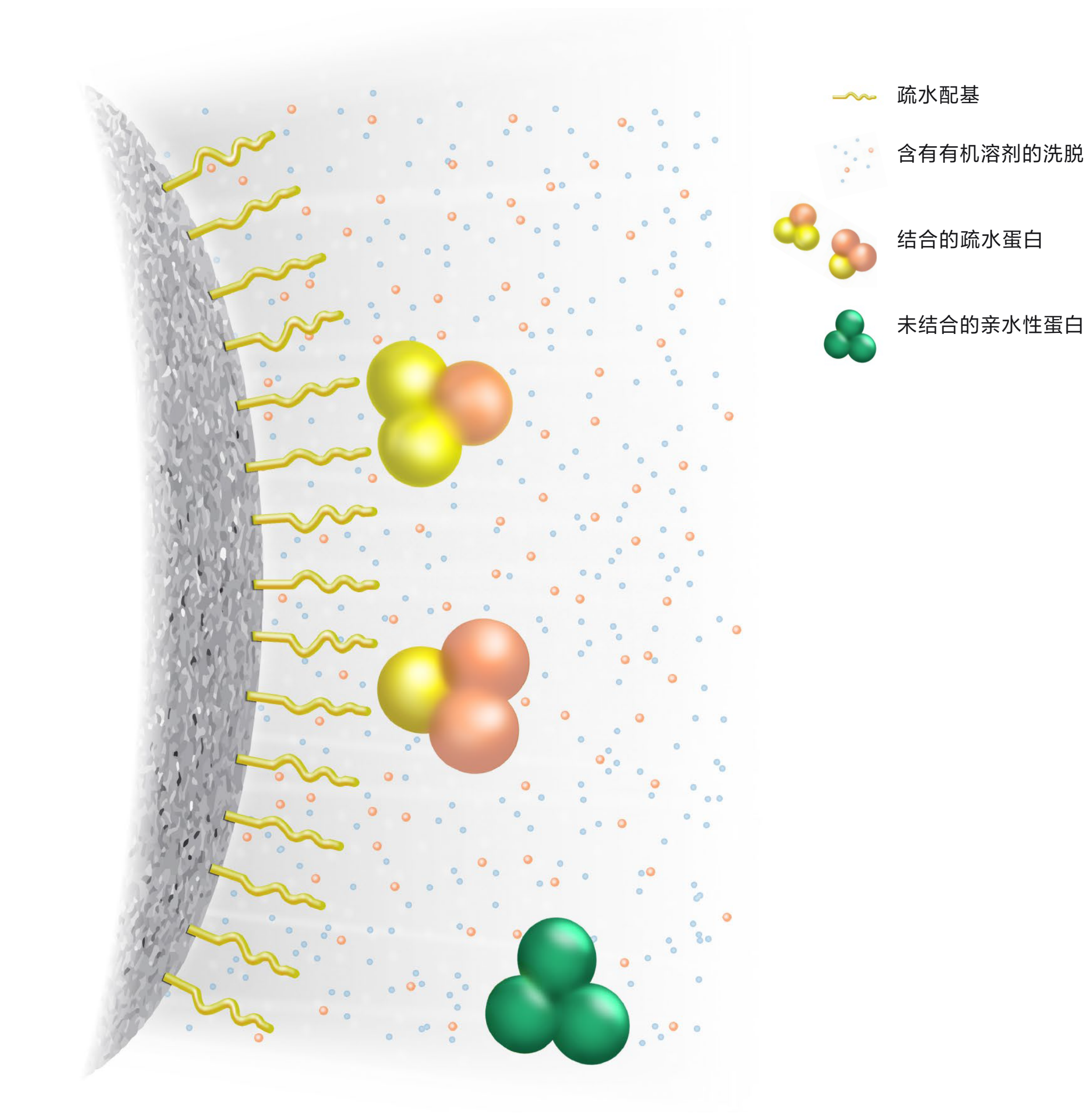


图 A7.15. RPC 原理图

原理

当蛋白质活性和三级结构不是研究重点时, RPC 广泛用于纯度分析。因为许多蛋白质能被有机溶剂变性, 所以这种方法通常不推荐用于制备型蛋白质纯化——多数情况下会破坏蛋白活性和其三级结构。蛋白质在有机溶剂中往往会变性, 而且与 RPC 填料较强结合, 可能非常难以被洗脱。然而, 在精细纯化阶段, 当大多数蛋白杂质已经被去除时, RPC 的效果非常好, 特别是对于那些有机溶剂耐受的小的目标蛋白。样品组分通过上样到层析柱而与填料结合, 然后改变条件使结合的物质被不同程度的洗脱。由于反相基质的性质, 结合通常非常强。

可以使用有机溶剂和其他添加剂 ( 如离子对试剂 ) 调节结合。通常通过增加有机溶剂的浓度进行洗脱, 其中最常用的是乙腈、甲醇、乙醇和丙醇。目标蛋白在过程中被纯化和浓缩。分离的关键阶段如图 A7.16 所示。

更多信息 – 手册

*Hydrophobic interaction and reversed phase chromatography, principles and methods*, 11001269

*Strategies for protein purification*, 28983331

*Purifying challenging proteins, principles and methods*, 28909531

等电聚焦 (CF)

CF 根据等电点 (pI) 的差异分离蛋白质。它是一种强大的方法, 可以分辨非常小的 pI 差别 ( 低至 0.02 pH 单位 ), 从而能够分离非常相似的蛋白。然而, 这种方法的载量非常低; CF 最好用于部分纯化的样品。

缓冲液和填料的相互作用时, 会在层析柱上生成pH梯度。填料是弱阴离子交换剂, 而缓冲液是一种多聚两性电解质缓冲液, 其中含有可缓冲广泛pH值范围的聚合物缓冲物质混合物。具有不同pI值的蛋白质随着pH梯度变化以不同的速率沿着层析柱向下迁移, 不断地结合和解吸, 并聚集在狭窄的条带, 最后被洗脱。

CF 应用

如果 IEX 和其他的方法不能提供令人满意的纯化效果时, CF 对于高分辨率分析型分离和制备型纯化十分有用。

更多信息 – 手册

*Ion exchange chromatography and chromatofocusing, principles and methods*, 11000421

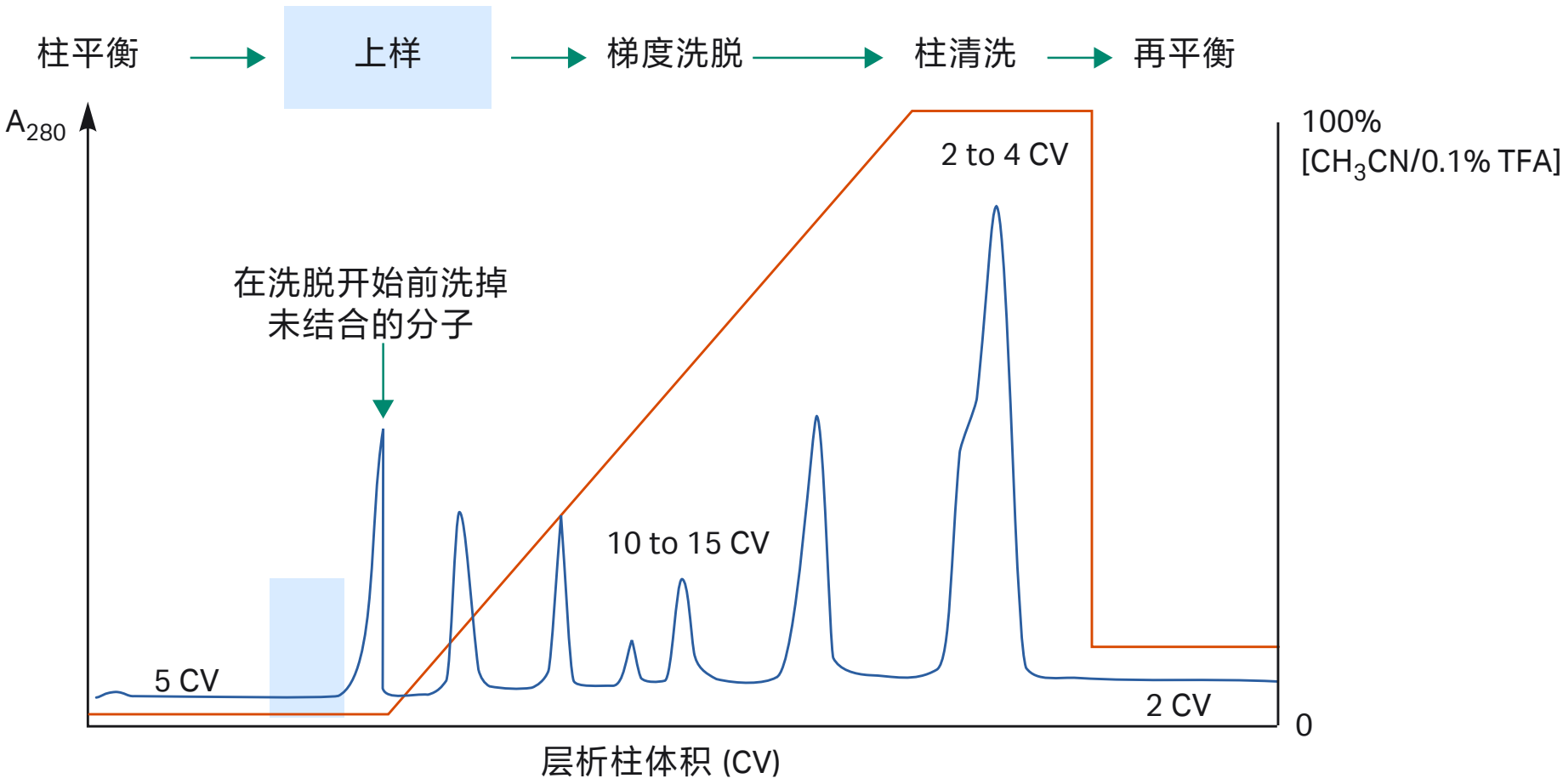


图 A7.16. 经典的具有梯度洗脱的 RPC 纯化。

# 附录8

## 用于 ÄKTA 系统的层析柱

高质量的装柱是实现良好分离的必要条件。差的装柱导致不均匀的液流分布、较大的峰宽和降低分辨率。下面介绍各种可用的层析柱, 覆盖不同的原理、基架和尺寸。

为了装填层析柱, 提供一系列空的层析柱。关于如何搭配填料和层析柱的指南见表 A8.1。

### 预装层析柱

Cytiva 的预装层析柱确保可重复的结果和出色的性能。

 更多信息, 请参阅指南 Prepacked chromatography columns for ÄKTA systems, 28931 778.



RESOURCE™ 层析柱预装 SOURCE™ 15 填 料, 用于 IEX、HIC 和 RPC。RESOURCE 层析柱由 PEEK( 聚醚醚酮 )制成, 它具有高的耐压性和耐化学腐蚀性。( 图 A8.1 )。RPC 填料被装入钢层析柱中。SOURCE 填料是基于由单分散的、刚性的聚苯乙烯 / 二乙烯基苯制成的亲水性基质。这种填料显示出非常高的化学和物理稳定性。小的颗粒尺寸允许快速结合和解吸以达到高的分辨率, 而颗粒的均匀性和稳定性确保在低背压下的高流速。RESOURCE 层析柱不能被 拆卸和重新装填。

图 A8.1. RESOURCE 层析柱





**图 A8.2.** Precision 层析柱。例子：Mini Q PC 3.2/3( 左图)和Superdex Peptide 3.2/300( 右图)。

**Precision™** 层析柱用于蛋白质和肽的微量纯化和分析 ( 图A8.2 )。这种层析柱在多肽测序和蛋白质结构/功能研究中被广泛地使用。它们非常适合于小规模蛋白质纯化的精细步骤和纯度分析。小体积的层析柱减少了预装填料的总面积, 这尽可能减少了非特异性结合和稀释效应。与 Tricorn™ 层析柱相比, 这种层析柱的体积缩小了 10 倍。Precision 层析柱可用于 SEC 和 IEX。SEC 填料是: Superdex Peptide、Superdex 75 和 200、Superose™ 6和 12、Superose 6 Increase 和 Superdex 200 Increase。IEX 填料是: Mono Q™、Mono S™ 、Mini Q™ 和 Mini S™。Precision层析柱需要一个特殊的 Precision 层析柱支架用于在 ÄKTA 系统上使用, 而且层析柱不能被打开和重新装填。



**图 A8.3.** HiTrap 预装层析柱

**HiTrap** 层析柱是一种方便和可靠的层析柱 ( 1 或 5 ml ), 具有 2.5 cm 的柱床高度用于快速和简单的制备型纯化, 可以单独使用或串联使用( 图A8.3 )。它们可以与注射器、蠕动泵或层析系统一起使用。HiTrap层析柱可使用广泛的层析填料: 用于AC、固定化金属亲和层析( IMAC )、IEX、脱盐和HIC。一系列的 Sephadex™、Sephacrose High Performance、Sephacrose XL、Sephacrose 4B 和 Sepharose Fast Flow 层析柱, 以及 Capto ImpRes, Capto、MabSelect™、MabSelect Xtra™、MabSelect SuRe 和 MabSelect SuRe LX 填料。HiTrap 层析柱进口由 1/16" 内螺纹铸成, 而出口具有 1/16" 外螺纹, 用于直接连接ÄKTA 系统, 无需额外的接头。HiTrap 层析柱不能被拆卸和重新装填。



**Fig A8.4.** HiScreen 预装层析柱

**HiScreen** 层析柱是Cytiva提供的工艺开发解决方案的一部分( 图 A8.4 )。这种层析柱预装有一系列的 BioProcess™ 层析填料( 用于 AC、IMAC、IEX 和 HIC ), 并设计用于参数筛选和方法优化。HiScreen 层析柱具有小的柱床体积 ( 4.7 ml ), 因此需要低的样品和缓冲液体积。可以采用工艺流体速度, 因为 10 cm 的柱床高度提供足够的保留时间, 结果可以作为线性工艺放大的基础。如有必要, 可以很容易地串联两根层析柱以提供 20 cm 的柱床高度。小的体积使 HiScreen 层析柱也适用于实验室规模的纯化。HiScreen 层析柱不能被拆卸和重新装填。



图A8.5. HiPrep 预装层析柱

**HiPrep** 预装层析柱用于放大纯化 (图 A8.5)。HiPrep 层析柱现有四种不同的尺寸 (分别为 20 ml、53 ml、120 ml 和 320 ml) 用于 SEC、脱盐、AC、IEX 和 HIC。用于 SEC 的 HiPrep 层析柱预装有 Sephacryl™ High Resolution 填料, 大小为 120 ml 和 320 ml。HiPrep Desalt-ing 层析柱具有 53 ml 的柱体积, 用于最高达 15 ml 样品体积的方便的脱盐 / 缓冲液置换。IEX 和 HIC 层析填料提供有 20 ml 的 HiPrep 层析柱。层析柱的进口和出口铸有 1/16" 内螺纹用于直接连接到 ÄKTA 系统。HiPrep 层析柱不能被拆卸和重新装填。



图A8.6. HiLoad 层析柱

**HiLoad™** 层析柱预装高性能的 Superdex 填料用于方便和可靠的 SEC (图 A8.6)。HiLoad 层析柱提供有 120 ml 和 320 ml 两种规格, 预装 Superdex 30 prep grade、Superdex 75 prep grade 和 Superdex 200 prep grade 以覆盖不同分子量蛋白质的广泛的高分辨率分离。这种层析柱具有一个外塑料管保护层析柱, 并在发生破裂时提供人身安全保护。



图 A8.7. Tricorn 层析柱

**Tricorn** 高性能层析柱专为实验室规模的高分辨率蛋白质纯化而设计, 使它们成为多步纯化方案中精细纯化步骤的一个很好的选择 (图A8.7)。Tricorn层析柱提供有一系列层析填料用于SEC (Superose、Superose Increase、Superdex、Superdex Increase)、IEX (Mono Q、Mono S、SOURCE 15Q 和 SOURCE 15S)、聚焦层析 (Mono P)和 HIC (SOURCE 15PHE)。

这种层析柱简单易用, 简单设计的接头用于连接到 ÄKTA 系统和其它高效液相色谱系统。这种层析柱裹有一层保护性塑料膜以保护层析柱并在层析柱发生破裂时提供个人安全保护。也提供空的 Tricorn 层析柱用于装填选择的层析填料 (见下文)。





图 A8.8. Tricorn 层析柱

**Tricorn** 层析柱专为高效层析填料而设计，例如 MonoBeads、Sephacrose High Performance、Superdex 和 SOURCE (图 A8.8)。当操作捕获填料如 Capto, MabSelect 或 Sepharose Fast Flow 时, 推荐使用 Tricorn Coarse Filter Kit 以减少堵塞的风险。Tricorn 层析柱现有 5 mm 内径 (长度分别为 20、50、100、150 和 200 mm) 和 10 mm 内径 (长度分别为 20、50、100、150、200、300 和 600 mm)。5 mm (内径) 层析柱的最大压力为 100 bar, 10 mm (内径) 层析柱的最大压力为 50 bar。



图A8.9. XK 层析柱

**XK** 层析柱专门用于装填大多数的层析填料, 包括 Superdex prep grade 和 Sepharose High Performance (图 A8.9)。它们具有夹套并提供 16、26 和 50 mm (内径) 的层析柱 (XK16、XK26 和 XK50), 长度从 20 到 100 cm。XK16 和 XK26 层析柱的最大压力为 5 bar, XK50 层析柱为 3 bar。预装 XK 层析柱也命名为 HiLoad。



图 A8.10. HiScale 层析柱

**HiScale™** 层析柱专门为制备型实验室规模纯化和使用标准层析填料的工艺开发而设计(图 A8.10)。提供的 HiScale 层析柱有 16、26 和 50 mm 的内径, 长度达到 20 或 40 cm。最大压力为 20 bar。适配器轴的 QuickLock 机制有利于适配器的快速和简单的移动, 简化了调整以及拆卸和清洗。转动层析柱末端帽能够进行填料床的可控轴向压缩, 这在刚性填料的装柱过程中十分适用。

## 空柱

为了获得具有高装柱质量的层析柱, 并能够耐受所选择的填料上的压降而形成的压力, 根据表 A8.1 中提供的指南选择合适的空柱。在装柱过程中, 按照随层析填料和空柱一起提供的说明书操作。

表 A8.1 空柱和填料基架指南

| 推荐空柱                                   |         |                   |         |
|----------------------------------------|---------|-------------------|---------|
| 散装填料                                   | Tricorn | XK                | HiScale |
| 尺寸排阻                                   |         |                   |         |
| Sephadex                               | o       | •                 | o       |
| Sepharose                              | •       | •                 | o       |
| Sephacryl™                             | •       | •                 | o       |
| Superdex prep grade                    | •       | • <sup>2</sup>    | o       |
| Superose                               | •       | •                 | o       |
| 离子交换                                   |         |                   |         |
| Capto                                  | •       | —                 | •       |
| Capto ImpRes                           | •       | —                 | •       |
| Capto S ImpAct                         | •       | —                 | •       |
| Sepharose Fast Flow                    | •       | •                 | o       |
| Sepharose High Performance             | •       | • <sup>1, 2</sup> | o       |
| Sepharose XL                           | •       | •                 | o       |
| SOURCE                                 | •       | —                 | •       |
| 亲和                                     |         |                   |         |
| Capto                                  |         |                   |         |
| Capto Blue                             | •       | —                 | •       |
| Sepharose 6B/4B/CL-4B                  | •       | —                 | •       |
| Sepharose Fast Flow                    | •       | •                 | o       |
| Sepharose High Performance             | •       | •                 | o       |
| MabSelect/MabSelect Xtra/<br>MabSelect | •       | • <sup>1</sup>    | o       |
| SuRe/MabSelect SuRe LX                 | •       | o <sup>1</sup>    | •       |
| 反相                                     |         |                   |         |
| SOURCE                                 | •       | —                 | —       |

| 推荐空柱                       |         |                   |         |
|----------------------------|---------|-------------------|---------|
| 散装填料                       | Tricorn | XK                | HiScale |
| 疏水作用                       |         |                   |         |
| Capto                      | •       | —                 | •       |
| Capto Phenyl               | •       | —                 | •       |
| Capto Butyl                | •       | —                 | •       |
| Sepharose Fast Flow        | •       | •                 | ◦       |
| Sepharose High Performance | •       | • <sup>1, 2</sup> | ◦       |
| SOURCE                     | •       | —                 | •       |
| 系统                         |         |                   |         |
| ÄKTAmicro                  | •       | —                 | —       |
| ÄKTapurifier 10            | •       | •                 | —       |
| ÄKTapurifier 100           | •       | •                 | •       |
| ÄKTA pure 25               | •       | •                 | •       |
| ÄKTA avant 25              | •       | •                 | •       |
| ÄKTA pure 150              | —       | •                 | •       |
| ÄKTA avant 150             | —       | •                 | •       |
| ÄKTA start                 | ◦       | —                 | —       |

• 推荐的组合。

◦ 技术上可以使用, 但不是一个最佳组合。

- 不推荐或不适用。

<sup>1</sup> 不推荐用于 XK 50。

<sup>2</sup> 为了获得最佳性能, 在纯化参数被预定义时使用预装层析柱。

更多信息请访问 [www.cytiva.com/protein-purification](http://www.cytiva.com/protein-purification), [www.cytiva.com/bioprocess](http://www.cytiva.com/bioprocess), 或 [www.cytiva.com/purification\\_techsupport](http://www.cytiva.com/purification_techsupport)。



# 附录9

## 耐化学腐蚀性指南

本节详细说明了 ÄKTA 实验室规模系统对液相层析中一些最常用的化学药品的化学耐腐蚀性。

 ÄKTA start 由于其特殊的泵管路而具有特定的耐化学腐蚀性限制。请参考 ÄKTA start 操作说明书, 29027057。

ÄKTA 系统专为高的生物兼容性而设计, 具有生物化学惰性的流路主要由钛、PEEK 和高耐腐蚀性的氟聚合物和氟橡胶制成。钛被用于尽可能地减少潜在的金属离子如铁、镍和铬的变性作用。在流路中没有标准的不锈钢。而选择塑料和橡胶材料以避免单体、增塑剂和其他添加剂的泄漏。

使用 2 M 的氢氧化钠、70% 乙酸或乙醇、甲醇和异丙醇具有良好的清洗效果。由于压力传感器的灵敏度, 应该避免使用 1 M 的盐酸进行完全的系统清洗。使用 1 M 盐酸清洗分离介质时, 应使用耐酸的 loop 环注射。

 确保层析柱不是安装在柱阀门 V9-C 或 V9H-C 上 ( 它们含有压力传感器 )。

 如果使用次氯酸钠取代 2 M 的氢氧化钠作为消毒剂, 则使用的浓度达到10%。

 蛋白质的反相层析采用 100% 乙腈和 0.2% 的三氟乙酸或 5% 的甲酸效果良好。

 应该避免使用强有机溶剂, 如乙酸乙酯、100% 丙酮或氯化有机溶剂。这些可能导致塑料材料的膨胀和减少PEEK管路的耐压性。出于这个原因, 不建议在系统上进行快速层析和正向分配层析。

# 化学品清单

下面的表格介绍了与 ÄKTA 系统兼容的化学品清单。在制作清单时, 已经做出下列假设:

- 没有考虑化学混合物的协同效应。
- 假定室温和有限的超压。

 化学品影响具有时间和压力依赖性。除非另有说明, 否则所有浓度都是 100%。

 用户可能会长期接触大量化学物质。材料安全数据表 (MSDS) 为用户提供关于特征、人体与环境的风险和预防措施的信息。请确保你可以从化学品分销商和 / 或互联网数据库中获得 MSDS。

 ÄKTA 系统可以耐受大多数 pH 在 2 和 12 之间的缓冲水溶液的连续使用。

表 A9.1. 用于 CIP 的强化学品和盐类

| 化学品 <sup>1</sup> | 浓度      | CAS号/EC号            |
|------------------|---------|---------------------|
| 乙酸               | 70%     | 75-05-8/200-835-2   |
| Decon 90         | 10%     | N/A                 |
| 乙醇               | 100%    | 75-08-1/200-837-3   |
| 甲醇               | 100%    | 67-56-1/200-659-6   |
| 盐酸 <sup>2</sup>  | 100 mM  | 7647-01-0/231-595-7 |
| 异丙醇              | 100%    | 67-63-0/200-661-7   |
| 氢氧化钠             | 2 M     | 1310-73-2/215-185-5 |
| 氢氧化钠 / 乙醇        | 1 M/40% | N/A                 |
| 氯化钠              | 4 M     | 7647-14-5/231-598-3 |
| 次氯酸钠             | 10%     | 7681-52-9/231-668-3 |

<sup>1</sup> 在室温下达到 2 小时的接触时间。

<sup>2</sup> 系统压力监测器或在柱阀 V9-C 或 V9H-C 中的压力监测器中的次氯酸浓度不能超过 100 mM。  
对于系统的其他部分, 短期使用可以接受高达 1 M 的 HCl。  
用浓度为 100 mM 以上的 HCl 清洗层析柱, 使用 HCl 手动充满环, 并注射清洁剂。



表 A9.2. 增溶剂和变性剂

| 化学品 <sup>1</sup> | 浓度  | CAS号/EC号            |
|------------------|-----|---------------------|
| 盐酸胍              | 6 M | 50-01-1/200-002-3   |
| 十二烷基硫酸钠 (SDS)    | 1%  | 151-21-3/205-788-1  |
| Triton™ X-100    | 1%  | 9002-93-1           |
| Tween™ 20        | 1%  | 9005-64-5/500-018-3 |
| 尿素               | 8 M | 57-13-6/200-315-5   |

<sup>1</sup>连续使用, 作为分离和纯化方法中的添加剂。

表 A9.3. 在反相层析 (RPC) 中使用的化学品

| 化学品 <sup>1</sup>       | 浓度                  | CAS号/EC号           |
|------------------------|---------------------|--------------------|
| 乙腈 <sup>2</sup>        | 100%                | 75-05-8/200-835-2  |
| 乙腈 / 四氢呋喃 <sup>2</sup> | 85%/15%             | 109-99-9/203-726-8 |
| 乙腈/ 水/TFA <sup>3</sup> | Max. 0.2% TFA       | N/A                |
| 乙醇                     | 100%                | 75-08-1/200-837-3  |
| 异丙醇                    | 100%                | 67-63-0/200-661-7  |
| 甲醇                     | 100%                | 74-93-1/200-659-6  |
| 水/ 有机流动相/ 甲酸           | Max. 5% formic acid | N/A                |

<sup>1</sup> 连续使用。

<sup>2</sup> 有机溶剂比缓冲水溶液更容易渗透PEEK管壁中的薄弱处。因此, 在压力极限处长期使用有机溶剂时应特别小心。  
根据压力, 需要更换泵头和压力监测器之间的管路。

<sup>3</sup> 流动相系统。

 如果系统长期暴露于有机溶剂或高浓度的有机酸, 如乙酸和甲酸。请将 ÄKTA avant 和 ÄKTA pure 中的混合器密封圈更换为高耐腐蚀的 O 型圈 (产品编号 29011326 )

表 A9.4. 用于 HIC的盐和添加剂

| 化学品 | 浓度  | CAS号/EC号             |
|-----|-----|----------------------|
| 氯化铵 | 2 M | 12125-02-9/235-186-4 |
| 硫酸铵 | 3 M | 7783-20-2/231-984-1  |
| 乙二醇 | 50% | 107-21-1/203-473-3   |
| 甘油  | 50% | 56-81-5/200-289-5    |

<sup>1</sup> 连续使用。

表 A9.5. 还原剂和其他添加剂

| 化学品 <sup>1</sup> | 浓度     | CAS号/EC号             |
|------------------|--------|----------------------|
| 精氨酸              | 2 M    | 74-79-3/200-811-1    |
| 苯甲醇              | 2%     | 100-51-6/202-859-9   |
| 二硫赤藓醇 (DTE)      | 100 mM | 3483-12-3/222-468-7  |
| 二硫苏糖醇 (DTT)      | 100 mM | 3483-12-3 /222-468-7 |
| 乙二胺四乙酸 (EDTA)    | 100 mM | 60-00-4/200-449-4    |
| 巯基乙醇             | 20 mM  | 37482-11-4/253-523-3 |
| 氯化钾              | 4 M    | 7447-40-7/231-211-8  |
| 丙酮               | 10%    | 67-64-1/200-662-2    |
| 氨水               | 30%    | 7664-41-7/231-635-3  |
| 二甲基亚砷 (DMSO)     | 5%     | 67-68-5/200-664-3    |
| 用于长期保存的乙醇        | 20%    | 75-08-1/200-837-3    |
| 磷酸               | 100 mM | 7664-38-2/231-633-2  |

<sup>1</sup> 连续使用。

# 液体接触材料

右表列出了与 ÄKTA 实验室规模系统中与工艺流体接触的典型材料。

表 A9.6. 在主流路和泵冲洗系统中使用的材料。

| 材料               | 缩写        |
|------------------|-----------|
| 主流路              |           |
| 乙烯 - 三氟氯乙烯       | ECTFE     |
| 乙烯 - 四氟乙烯        | ETFE      |
| 氟化乙烯丙烯           | FEP       |
| 含氟丙烯单体           | FPM/FKM   |
| 全氟丙烯单体           | FFPM/FFKM |
| 聚三氟氯乙烯           | PCTFE     |
| 聚醚醚酮             | PEEK      |
| 聚丙烯              | PP        |
| 聚四氟乙烯            | PTFE      |
| 聚偏氟乙烯            | PVDF      |
| 超高分子量聚乙烯         | UHMWPE    |
| 氧化铝              |           |
| Elgiloy™         |           |
| Hastelloy™ C-276 |           |
| 石英玻璃             |           |
| 红宝石              |           |
| 蓝宝石              |           |
| 2级钛              |           |
| 5级钛              |           |
| 泵冲洗系统            |           |
| 三元乙丙 M 级橡胶EPDM   | EPDM      |
| 聚醚醚酮PEEK         | PEEK      |
| 聚丙烯 PP           | PP        |
| 聚苯硫醚 PPS         | PPS       |
| 聚偏氟乙烯PVDF        | PVDF      |
| 硅胶               |           |



# 相关文献

|                                                                                                                                                                 | Product code |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Handbooks</b>                                                                                                                                                |              |
| GST Gene Fusion System                                                                                                                                          | 18115758     |
| Affinity Chromatography, Principles and Methods                                                                                                                 | 18102229     |
| Antibody Purification, Principles and Methods                                                                                                                   | 18103746     |
| Purifying Challenging Proteins                                                                                                                                  | 28909531     |
| Protein Sample Preparation                                                                                                                                      | 28988741     |
| Strategies for Protein Purification                                                                                                                             | 28983331     |
| Recombinant Protein Purification, Principles and Methods                                                                                                        | 18114275     |
| Size Exclusion Chromatography, Principles and Methods                                                                                                           | 18102218     |
| Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography, Principles and Methods                                                                               | 11001269     |
| Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing, Principles and Methods                                                                                        | 11000421     |
| 2-D Electrophoresis                                                                                                                                             | 80642960     |
| Design of Experiments in Protein Production and Purification                                                                                                    | 29103850     |
| <b>Selection guide</b>                                                                                                                                          |              |
| Prepacked chromatography columns for ÄKTA systems                                                                                                               | 28931778     |
| <b>User manuals for ÄKTA system</b>                                                                                                                             |              |
| Refer to <a href="http://www.cytiva.com">www.cytiva.com</a> and search for specific system's user manual within the Literature Documents and Downloads section. |              |
| <b>CDs</b>                                                                                                                                                      |              |
| Column Packing CD — The Movie                                                                                                                                   | 18116533     |
| <b>Data files, interactive selection guides, apps, and application notes</b>                                                                                    |              |
| Refer to <a href="http://www.cytiva.com/protein-purification">www.cytiva.com/protein-purification</a>                                                           |              |

| Cue cards                  |          |
|----------------------------|----------|
| Good ÄKTA systems practice | 29109616 |
| ÄKTA routine maintenance   | 29130436 |

# 订购信息

| Description                                    | Quantity/pack size | Product code |
|------------------------------------------------|--------------------|--------------|
| <b>Tubing</b>                                  |                    |              |
| PEEK tubing i.d.: 0.25 mm, o.d.: 1/16"         | 2 m                | 18112095     |
| ETFE tubing i.d.: 0.25 mm, o.d.: 1/16"         | 2 m                | 18112136     |
| PEEK tubing i.d.: 0.50 mm, o.d.: 1/16"         | 2 m                | 18111368     |
| ETFE tubing i.d.: 0.50 mm, o.d.: 1/16"         | 2 m                | 18112096     |
| PEEK tubing i.d.: 0.75 mm, o.d.: 1/16"         | 2 m                | 18111253     |
| ETFE tubing i.d.: 0.75 mm, o.d.: 1/16"         | 2 m                | 18111974     |
| PEEK tubing i.d.: 1.0 mm, o.d.: 1/16"          | 2 m                | 18111583     |
| ETFE tubing i.d.: 1.0 mm, o.d.: 1/16"          | 3 m                | 18114238     |
| FEP tubing i.d.: 1/16", o.d.: 1/8"             | 3 m                | 18112116     |
| FEP tubing i.d.: 1/8", o.d.: 3/16"             | 3 m                | 18111247     |
| <b>Fingertights and tubing connectors</b>      |                    |              |
| Fingertight connector 1/16" M - Narrow - Black | 10                 | 18117263     |
| Fingertight connector 1/16" M - Narrow - Red   | 8                  | 28401081     |
| Fingertight connector 1/16" M                  | 10                 | 18111255     |
| Tubing connector for o.d. 1/16"                | 10                 | 18112707     |
| Tubing connector for o.d. 1/8"                 | 10                 | 18112117     |
| Tubing connector for o.d. 3/16"                | 10                 | 18111249     |
| M6 connector                                   | 10                 | 18117264     |
| <b>Unions</b>                                  |                    |              |
| Union Luer F - M6 F                            | 2                  | 18102712     |

| Description                                 | Quantity/pack size | Product code |
|---------------------------------------------|--------------------|--------------|
| Union 1/16" F - 1/16" F                     | 5                  | 11000339     |
| Union Fingertight i.d. 0.3 mm               | 4                  | 11000852     |
| Union 1/16" M - M6 F                        | 8                  | 18111258     |
| Union 1/16" F - 1/16" F Ti                  | 1                  | 18385501     |
| Union 1/16" F - M6 M                        | 6                  | 18111257     |
| Union Luer F - 1/16" M                      | 2                  | 18111251     |
| Union 1/16" M - 1/16" M - i.d. 0.13 mm      | 1                  | 18112090     |
| Union 1/16" M - 1/16" M - i.d. 0.25 mm      | 2                  | 18112092     |
| Union 1/16" M - 1/16" M - i.d. 0.5 mm       | 2                  | 18112093     |
| Union 5/16" F - M6 M                        | 3                  | 18112776     |
| Union 5/16" F - 1/16" M                     | 8                  | 18114208     |
| Union M6 F - 1/16" M                        | 5                  | 18385801     |
| Union 1/16" M - 1/16" M - i.d. 0.5 mm       | 5                  | 28954326     |
| Union M6 F-M6 F SRTC-2                      | 5                  | 19214301     |
| <b>Ferrules</b>                             |                    |              |
| Ferrules for 1/16" tubing connector - Blue  | 10                 | 18112706     |
| Ferrules for 1/8" tubing connector - Yellow | 10                 | 18112118     |
| Ferrules for 3/16" tubing connector - Blue  | 10                 | 18111248     |
| <b>Stop plugs</b>                           |                    |              |
| Stop plug 1/16" Narrow                      | 5                  | 11000355     |
| Stop plug 5/16" M                           | 5                  | 18111250     |
| Stop plug 1/16" M                           | 5                  | 18111252     |

| Description                                                | Quantity/pack size | Product code |
|------------------------------------------------------------|--------------------|--------------|
| <b>Sample loops</b>                                        |                    |              |
| Assorted sample loops, PTFE ( 25, 50, 100, 200, 500 pl)    | 1 each             | 18040401     |
| Sample loops, PTFE ( 1 and 2 ml)                           | 1 each             | 18589701     |
| Sample loop, PTFE, 10 ml                                   | 1                  | 18116124     |
| Sample loop, PEEK, 1 ml                                    | 1                  | 18111401     |
| Sample loop, PEEK, 10 pl                                   | 1                  | 18112039     |
| Sample loop, PEEK, 100 pl                                  | 1                  | 18111398     |
| Sample loop, PEEK, 500 pl                                  | 1                  | 18111399     |
| Sample loop, PEEK, 2.0 ml                                  | 1                  | 18111402     |
| Sample loop, PEEK, 5.0 ml                                  | 1                  | 18114053     |
| Sample loop, ETFE, 10.0 ml                                 | 1                  | 11000302     |
| Loop extension kit for AKTExpress, ETFE,10.0 ml            | 5                  | 28904438     |
| Superloop 10 ml, 1/16" fittings                            | 1                  | 18111381     |
| Superloop 50 ml, 1/16" fittings                            | 1                  | 18111382     |
| Superloop 150 ml, M6 fittings                              | 1                  | 18102385     |
| <b>Solvent resistant O-rings to Superloop 10 and 50 ml</b> |                    |              |
| O-ring to movable seal ( 11.3 x 2.4 mm) KAL                | 3                  | 18630001     |
| O-ring to movable seal ( 11.3 x 2.4 mm) FFPM/FFKM          | 2                  | 18110497     |



| Description                                   | Quantity/pack size | Product code |
|-----------------------------------------------|--------------------|--------------|
| <b>Mixers</b>                                 |                    |              |
| Mixer M-925 Mixing chamber 90 pl              | 1                  | 18114724     |
| Mixer M-925 Mixing chamber 200 pl             | 1                  | 18114721     |
| Mixer M-925 Mixing chamber 0.6 ml             | 1                  | 18111890     |
| Mixer M-925 Mixing chamber 2 ml               | 1                  | 18111891     |
| Mixer M-925 Mixing chamber 5 ml               | 1                  | 18111892     |
| Mixer M-925 Mixing chamber 12 ml              | 1                  | 18111893     |
| ÄKTA avant and ÄKTA pure Mixer chamber 0.6 ml | 1                  | 28956186     |
| ÄKTA avant and ÄKTA pure Mixer chamber 1.4 ml | 1                  | 28956225     |
| AKTA avant and ÄKTA pure Mixer chamber 5 ml   | 1                  | 28956246     |
| ÄKTA avant and ÄKTA pure Mixer chamber 15 ml  | 1                  | 28980309     |
| Mixer ÄKTA start                              | 1                  | 29023960     |
| <b>UV/Vis flow cells</b>                      |                    |              |
| Flow cell, 2 mm for UPC-900                   | 1                  | 18112825     |
| Flow cell, 5 mm for UPC-900                   | 1                  | 18112824     |
| Flow cell, 2 mm for UV-900                    | 1                  | 18111110     |
| Flow cell, 3 mm for UV-900                    | 1                  | 18114725     |
| Flow cell, 10 mm for UV-900                   | 1                  | 18111111     |
| UV flow cell, 0.5 mm for U9-M                 | 1                  | 28979386     |
| UV flow cell, 2 mm for U9-M                   | 1                  | 28979380     |
| UV flow cell, 10 mm for U9-M                  | 1                  | 28956378     |

| Description                                                                 | Quantity/pack size | Product code |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------|
| UV flow cell, 2 mm for U9-L                                                 | 1                  | 29011325     |
| UV flow cell, 5 mm for U9-L                                                 | 1                  | 18112824     |
| UV-900 cell, 1 mm calibration kit                                           | 1                  | 18632401     |
| UV-900 and UPC-900 cell, 2 mm calibration kit                               | 1                  | 18632402     |
| UV-900 cell and UPC-900, 5 mm calibration kit                               | 1                  | 18632404     |
| UV-900 cell, 10 mm calibration kit                                          | 1                  | 18632405     |
| UV-900 cell calibration file                                                | 1                  | 18632406     |
| <b>pH detectors for ÄKTA systems</b>                                        |                    |              |
| pH electrode with cell and holder, round tip                                | 1 each             | 18113484     |
| pH electrode, round tip                                                     | 1                  | 18111126     |
| pH electrode for ÄKTA avant and ÄKTA pure                                   | 1                  | 28954215     |
| Dummy electrode, round tip                                                  | 1                  | 18111103     |
| <b>Air sensors</b>                                                          |                    |              |
| Air-900 N control unit                                                      | 1                  | 18112122     |
| Air-912 N flow cell ( 1.2 mm i.d.)                                          | 1                  | 18117415     |
| Air-925 N flow cell ( 2.5 mm i.d.)                                          | 1                  | 18117416     |
| AirSensor L9-1.2                                                            | 1                  | 28956502     |
| AirSensor L9-1.5                                                            | 1                  | 28956500     |
| <b>Racks and cassettes for ÄKTA avant and ÄKTA pure fraction collectors</b> |                    |              |
| Cassette, holds 6 x 50 ml tubes                                             | 2                  | 28956402     |
| Cassette, holds 15 x 15 ml tubes                                            | 2                  | 28956404     |
| Cassette, holds 40 x 3 ml tubes                                             | 2                  | 28956427     |

| Description                                                                           | Quantity/pack size | Product code |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------|
| Cassette, holds 40 x 5 ml tubes                                                       | 2                  | 29133422     |
| Cassette, holds 1 x 96-, 48-, or 24-deep-well plate                                   | 2                  | 28954212     |
| Rack, holds 55 x 50 ml tubes                                                          | 1                  | 28980319     |
| Rack, holds 18 x 250 ml bottles                                                       | 1                  | 28981873     |
| Cassette, holds 24 x 8 ml tubes                                                       | 2                  | 28956425     |
| <b>Racks and options for Frac-950</b>                                                 |                    |              |
| Rack A, 18 mm and 30 mm tubes                                                         | 1                  | 18608311     |
| Rack B, 12 mm tubes                                                                   | 1                  | 18608312     |
| Rack C, 4 x 96-well and 30 mm tubes                                                   | 1                  | 18608313     |
| Rack D, 30 mm tubes                                                                   | 1                  | 18608314     |
| <b>Prep mode</b>                                                                      |                    |              |
| Prep Mode Conversion Kit ( for use with Rack E and Rack F)                            | 1                  | 18608318     |
| Rack E for Prep mode using 30 mm tubes                                                | 1                  | 18608315     |
| Rack F for Prep mode using 250 ml bottles                                             | 1                  | 18608316     |
| Funnel to Flask Kit with funnels, tubing, and tubing organizer ( for use with Rack E) | 1                  | 18608317     |
| <b>Microfractionation</b>                                                             |                    |              |
| Microfraction Collection Kit                                                          | 1                  | 28948780     |
| <b>Racks for Frac-920 and F9-R</b>                                                    |                    |              |
| Tube rack 95 x 10-18 mm, complete                                                     | 1                  | 18305003     |
| Tube rack 175 x 12 mm, complete                                                       | 1                  | 19868403     |
| Tube rack 40 x 30 mm, complete                                                        | 1                  | 18112467     |
| Frac30 Bowl Assembly                                                                  | 1                  | 29024045     |

<sup>1</sup> Inline filter is sometimes also referred to as online filter.

| Description                                                         | Quantity/pack size | Product code |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------|
| <b>Filter assemblies</b>                                            |                    |              |
| Inline <sup>1</sup> filter ( 10 and 20 ml/min systems)              | 1                  | 18111801     |
| Inline <sup>1</sup> filter kit ( 10 ml/min systems)                 | 2                  | 18112094     |
| Inline <sup>1</sup> filter holder ( 20, 50, and 100 ml/min systems) | 1                  | 18111244     |
| Inline <sup>1</sup> filter kit ( 20, 50, and 100 ml/min systems)    | 10                 | 18102711     |
| Inlet filter set                                                    | 10                 | 18111442     |
| <b>Column holders</b>                                               |                    |              |
| <b>ÄKTA avant and ÄKTA pure</b>                                     |                    |              |
| Column block for 5 columns                                          | 1                  | 28956270     |
| Column holder                                                       | 1                  | 28956282     |
| Flexible column holder                                              | 1                  | 28956295     |
| Column clip                                                         | 5                  | 28956319     |
| Column holder HiScale 50                                            | 1                  | 28964499     |
| <b>Other ÄKTA</b>                                                   |                    |              |
| Large column holder                                                 | 1                  | 28400737     |
| Column holder, short, plastic                                       | 1                  | 18111317     |
| Column holder XK 50                                                 | 1                  | 18309460     |
| Column holder, extra long, metal                                    | 1                  | 18112632     |
| Column clamp, small column                                          | 1                  | 18114998     |
| Clamp for lab rods                                                  | 1                  | 18111319     |
| ÄKTA extension equipment holder                                     | 1                  | 18115831     |

| Description                                | Quantity/pack size | Product code |
|--------------------------------------------|--------------------|--------------|
| <b>For external equipment</b>              |                    |              |
| AD-900 Analog/digital converter            | 1                  | 18114862     |
| I/O box E9                                 | 1                  | 29011361     |
| <b>For extra modules</b>                   |                    |              |
| Extension Box for ÄKTA avant and ÄKTA pure | 1                  | 29110806     |

**cytiva.com.cn/akta**

Cytiva 和 Drop 是 Global Life Sciences IP Holdco LLC 或其附属公司的商标。ÄKTA、BioProcess、Capto、HiLoad、HiPrep、HiScale、HiScreen、HiTrap、MabSelect、MabSelect SuRe、MabSelect Xtra、Mini Q、Mini S、Mono Q、Mono S、RESOURCE、Sephacryl、Sephadex、Sephарose、SOURCE、Superdex、Superloop、Superose、Tricorn 和 UNICORN 是 Global Life Sciences Solutions USA LLC 或以 Cytiva 名义开展业务的关联公司的商标。

Alias 是 Spark Holland B.V. 的商标。Decon 是 Decon Laboratories Ltd. 的商标。Hastelloy 是 Haynes International Inc. TRITON 是 Union Carbide Chemicals and Plastic Company Inc. Tween 是 Croda 集团公司的商标。Tween 是 Croda 集团公司的商标。各自所有者的财产。

© 2020 Cytiva

所有商品和服务的销售均受Cytiva业务范围内供应公司的销售条款和条件的约束。您可索取这些条款和条件的副本。请联系您当地的Cytiva代表获取最新信息。

有关当地办事处的联系信息，请访问 [cytiva.com.cn/contact](http://cytiva.com.cn/contact)

CY45539-05Jun24-HB

