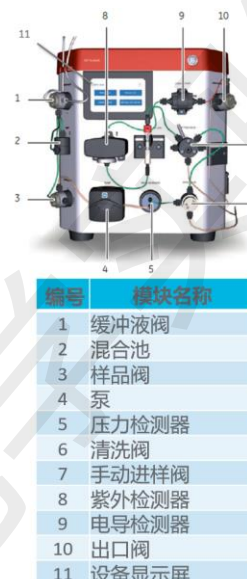
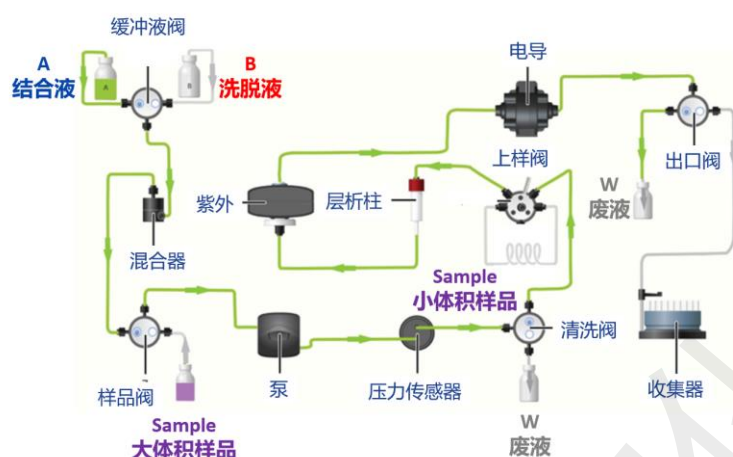


# ÄKTA start 层析系统操作指南

ÄKTA start 系统流路图和模块



编号	模块名称
1	缓冲液阀
2	混合池
3	样品阀
4	泵
5	压力检测器
6	清洗阀
7	手动进样阀
8	紫外检测器
9	电导检测器
10	出口阀
11	设备显示屏

**整个操作过程严格避免气体进入流路!!!**

## 金属螯合层析分离纯化 GFP

### 1、实验准备

- 层析柱: HisTrap HP 1 mL。
- 缓冲液 A (配制 200 mL): Tris-HCl 20 mmol/L (pH7.9), Imidazole 10 mmol/L, NaCl 0.5 mol/L, 5%甘油。
- 缓冲液 B (配制 100 mL): Tris-HCl 20 mmol/L (pH7.9), Imidazole 300 mmol/L, NaCl 0.5 mol/L, 5%甘油。
- 其他溶液: 超纯水; 20%乙醇 (助教提供, 每台仪器已经各配备一瓶)。
- 4 人一组, 使用 1 台仪器。
- 每台仪器准备 2 个 250 mL 蓝盖试剂瓶, 一个试剂瓶装 180 mL 的缓冲液 A, 另外一个试剂瓶装 100 mL 的缓冲液 B。
- 每台仪器配有 3 个 50 mL 离心管, 清洗后分装 30 mL 超纯水、30 mL 20%乙醇、20 mL 缓冲液 A。超纯水和 20%乙醇从公用溶液分装, 不要从装有仪器泵的试剂瓶分装, 避

免污染。缓冲液 A 从自配的 200 mL 中提前分装。

- 250 mL 塑料烧杯用于装废液，使用后清洗干净。

## 2、配制溶液和准备样品

- 按配方配制缓冲液 A 和缓冲液 B，AKTA 临用前用真空泵过 0.22  $\mu\text{m}$  或 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜去除杂质。
- 细菌提取液在 20 000  $\times g$  离心后，用 10 mL 注射器吸取上清液，针头注意避开管底的沉淀。上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  或 0.45  $\mu\text{m}$  滤器过滤，转移至 15 mL 离心管中待使用。（注射器重复使用，处理样品后需洗净干净，注意针头盖好盖子。）

## 3、开机

将仪器通过 USB 接口连接到电脑上，启动电脑，打开仪器左侧电源开关。待仪器启动完毕后，打开电脑桌面上的 Unicorn start 软件，共含四个窗口，在 System Control 中点击“Connect”，等待电脑与仪器连接。

## 4、超纯水清洗流路

首先将 A、B 泵的泵头分别用洗瓶中的超纯水冲洗，放入装有超纯水的试剂瓶中（试剂瓶用 Parafilm 膜封口，留通气孔），所有废液出口（共三条导管）插入废液缸中。点击 System Control 菜单中的“Manual Run”，在跳出的窗口点击选中“Zero flow rate”。

按照以下操作进行**数据保存及命名**。点击窗口中的“Browse”选择保存程序的位置，选中 Default Home 文件夹，右键选择 New folder，要求用实验日期命名新建的文件夹，点击 OK 保存。选中新建的文件夹，在窗口下方 Name 处给本次实验文件命名。实验文件要求按照以下规则命名，**实验名-小组组号（2 个小组）-AKTA 仪器编号-日期**，如 GFP-Group1+4-AKTA01-20200827。同时填写仪器登记表，并在个人实验记录本上做好仪器的使用记录。点击 OK 后等待程序运行完毕，此时收集器会旋转归位。

在 Process Picture 界面“Pump”位置下方设置流速 1 (mL/min)，点击右侧“Set flow rate”（图 1），开始用超纯水清洗 A 管道及泵。观察 A、B 泵右侧的“Current State”窗口，当累计时间增加 5 min 或累计体积增加 5 mL 后，点击流路图缓冲液阀“Buffer Valve”（图 2）的相应位置（**B 泵侧空白小圆点**），改换清洗 B 管道及泵。5 min 后，改换清洗流路上侧其余管道，即点击清洗阀“Wash Valve”（图 3）相应位置，清洗 1 min。

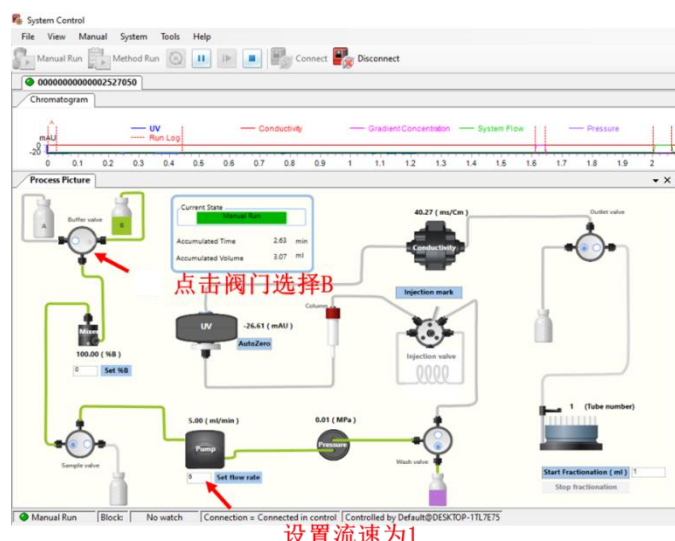


图 1 设置流速

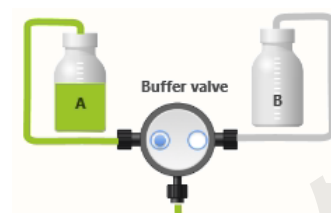


图 2 缓冲液阀



图 3 清洗阀

注意在 Process Picture 界面操作时，**建议在流速运行状态下更改阀门**，否则程序容易出错。仪器的响应需要缓冲时间，**任何操作切勿连续点击**。即使不确定是否点击中，也需等待 30 s 后再进行重复操作（或检查操作指令日志），否则极易引起程序报错，甚至出现流路运行状态（阀门位置）与实际不符。

Chromatogram 界面显示层析图谱，可观察系统的清洗状态，若有气泡会引起 UV 曲线的波动。Run Log 界面记录操作指令日志。

## 5、泵上样流路清洗

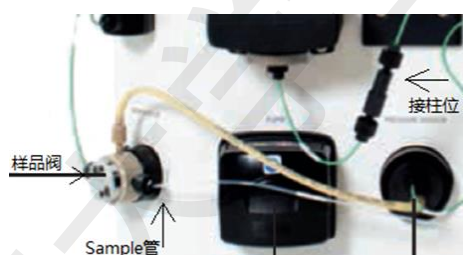


图 4 仪器的样品阀及上样管

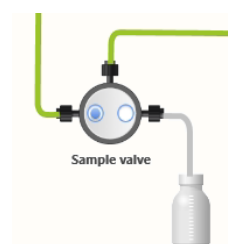


图 5 样品阀

暂停流速（可在电脑上点击“Pause”键，也可直接点击仪器显示屏上的“Pause”），将样品阀“Sample Valve”处的透明上样管插入装有超纯水的 50 mL 离心管中，恢复流速，点击流路图左下角阀门（图 5）的相应位置，选择从上样管进液，清洗流路 5 min。结束后将流路重新切换至 A 泵或 B 泵。

## 6、安装层析柱

检查流路，**确认经过接柱位并保持流速为 1 mL/min**，在运行流速的状态下准备安

装层析柱。将层析柱上下两端的黑色堵头拧开（新柱子下端的封闭堵头需卸掉，直接掰，勿旋转），接柱位管道从**红色螺丝**拧开，待上方管道流出液体后接入柱子的上端，确保管道深入内部并顶住，排出空气见液体溢出后拧紧。当柱子下方持续流出液体后，将柱子下端接入管道并拧紧（下方管道的两个部件也可拆分后依次与层析柱连接）。将层析柱用纸巾擦干，观察是否漏液。层析柱连接好后，继续用超纯水清洗流路 5 min。



图 6 层析柱的安装

## 7、样品纯化

### 缓冲液清洗流路

- 1) **暂停流速**，将 A、B 泵分别放入相应的缓冲液 A、缓冲液 B 试剂瓶中，使用缓冲液清洗各流路，流速 1 mL/min，每种缓冲液各清洗 5 CV（柱体积），即清洗 5 min。**注意先清洗 B 管道，再清洗 A 管道**，最终使层析柱及相应管道处于缓冲液 A 中待进样。
- 2) **暂停流速**，将样品阀的上样管从超纯水中转移至分装有缓冲液 A 的 50 mL 离心管，上样管需始终保持插入离心管底部的状态，使用缓冲液清洗上样管，流速 1 mL/min，清洗 2 CV（柱体积），即清洗 2 min。结束后将流路切换至 A 泵。

**注意：**样品阀的上样管在整个纯化过程中需始终保持插入液体中的状态，保持管道深入离心管底部，避免气泡进入系统。实验过程中注意观察离心管的液面状态，如果出现异常下降，及时检查流路是否正确。

### 收集器摆放收集管

- 3) 在收集器的外圈从 1 号位置开始摆放玻璃试管 5 支（1 号位收集延迟体积），内圈从 4

号或 5 号位置开始摆放 1.5 mL 离心管 20 支。具体收集的样品体积与实际操作过程相关，可适当多摆放离心管。电脑操作界面的收集器处（图 7）可设置每管的收集体积，先设为 10 mL，在外圈收集 GFP 上样透过液。可在上样开始前 1-2 min，提前开始收集，即点击收集器下方的“Start Fractionation”。**收集器收集的第 1 管是延迟体积，小于 1 mL**，从第 2 管开始，按照每管 10 mL 收集，在软件的层析图谱上有相应的标识。收集器开启后，一直保持收集状态，根据 UV 曲线的图谱保留透过峰和洗脱样品。收集器自动运转，**严禁手动强制改变收集器底盘**。使用后的试管清洗干净并放回原处，未使用且保持干净的离心管也放回原处。

**注意：控制收集器必须通过图 7 所示的“Start”和“Stop”标识，不能使用图 8 所示的出口阀。出口阀只能控制溶液进入该侧导管，而收集器不会运转。**

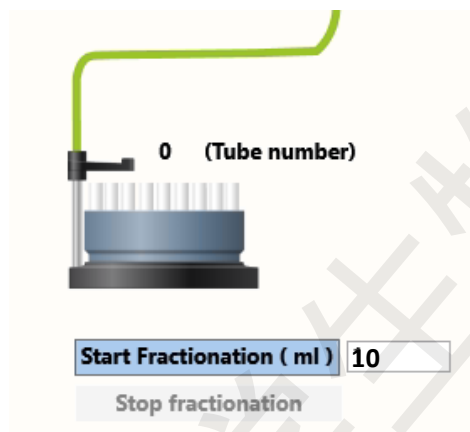


图 7 收集器

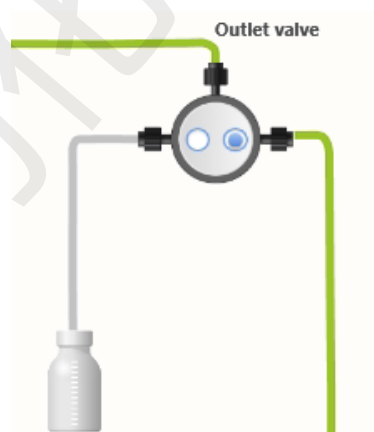


图 8 出口阀

#### 上样及开始收集

- 4) 在 Chromatogram 界面检查 UV 基线稳定后，在 Process Picture 界面的 UV 检测器处点击“Auto Zero”。**暂停流速**，将样品阀处的上样管插入准备好的样品中，在软件界面检查流路（确认样品阀和清洗阀的状态），**点击继续**，操作相应的阀门使流路与图 9 所示一致，开始上样。若之前未提前开始收集，此时应设置收集器并点击下方的“Start Fractionation”开始收集。

**注意：观察样品剩余量，保持上样管始终位于液面下方，残留少量样品即暂停流速停止上样，严格避免气泡进入管道。**



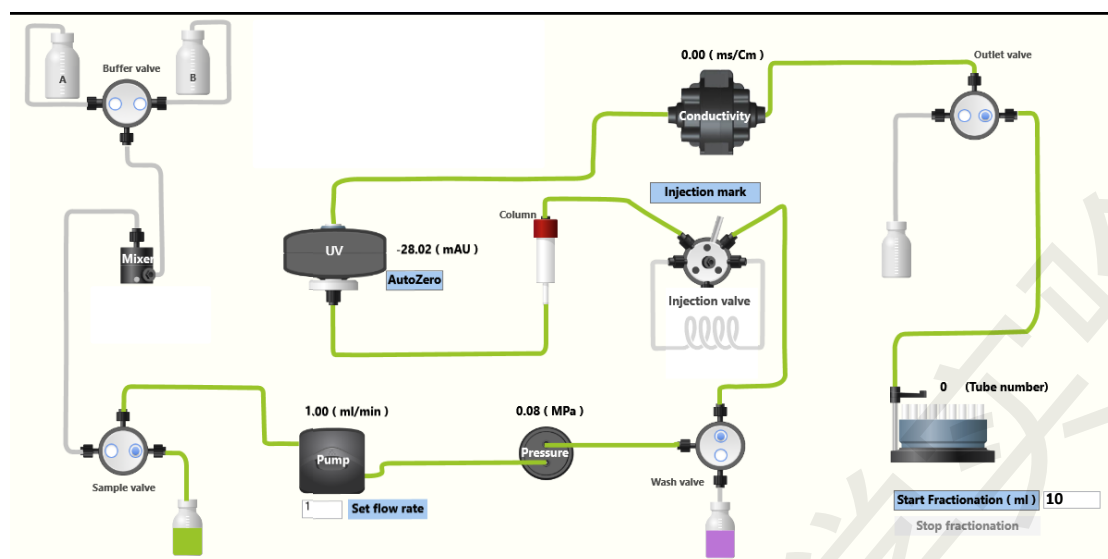


图 9 上样流路

### 平衡层析柱

- 5) 离心管中的样品上样结束后，**暂停流速**，将样品阀的上样管放入分装有缓冲液 A 的离心管中（**切勿在运行流速时更换溶液，会引入气泡**），恢复流速，将管道内残留的样品推入层析柱。待 UV 曲线开始下降后，**切换为 A 泵流路**，平衡层析柱。（若前一步中未能及时停止上样，已有气体进入上样管，则放弃残留的样品，直接用 A 泵流路平衡层析柱。）

**注意：观察离心管中缓冲液 A 的液面，及时切换 A 泵流路。切勿从上样管进入大量气体，会损坏层析柱。**

- 6) 待 UV 曲线降至基线后，点击“Stop Fractionation”停止收集透过峰。注意收集器不会立刻停止，会继续走完延迟体积，**严禁连续点击“Stop”**。即使不确认是否点击中，也需等待 1 min 后再进行重复操作（或检查操作指令日志）。
- 7) UV 基线稳定后，再用缓冲液 A 平衡 3 min。
- 8) 待收集器的“Start Fractionation”标识恢复蓝色后，更改收集体积为 1 mL，并将收集器导管改放到内圈，为收集洗脱峰做好准备。

**注意：内圈收集的管位顺接外圈（不是从 1 号位重新开始收集）。收集器自动运转，严禁手动强制改变收集器底盘。**

## 洗脱及停止收集

- 9) **确认流路状态是用 A 泵平衡层析柱**，在此条件下设置梯度洗脱（图 10）。在 Manual 菜单中选择第一项 Execute Manual Instructions，在 Pumps 的 Gradient 中设置洗脱条件。Target 设置为 **100%B**，即洗脱过程是 Buffer B 从 0%变为 100 %。本次实验 Length 设置为 **15 mL**，即完成梯度洗脱的溶液量为 15 mL。可提前开始收集，在确认收集器无异常后，点击 Execute 执行。此时可听到仪器阀门不停变换的声音，并可在图形界面 A、B 泵下方的混合器处看到 B 溶液百分比的变化。

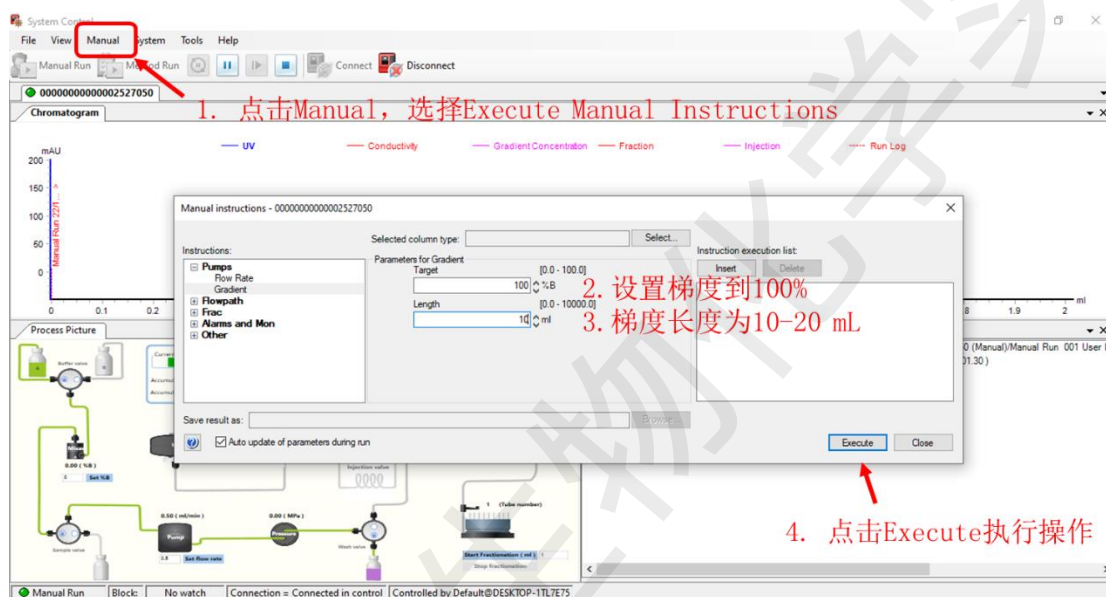


图 10 梯度洗脱

- 10) 建议提前开始收集，但也可在梯度洗脱出峰后重启收集器，点击“Start Fractionation”在**内圈**以每管 **1 mL** 收集洗脱峰。注意收集的第一管是延迟体积，不足 1 mL。
- 11) 洗脱峰结束后点击“Stop Fractionation”停止收集。注意收集器不会立刻停止，因为有延迟体积。**严禁连续点击“Stop Fractionation”**，即使不确认是否点击中，也需等待 1 min 后再进行重复操作（或检查操作指令日志）。
- 12) 等待梯度洗脱结束，**切勿提前终止程序或直接更换 A、B 溶液**。当混合器处的 B 溶液显示 100%后，继续运行 5 min，方可进行下一步操作。**注意 A、B 泵在更换溶液前需暂停流速**，防止气泡进入系统。

## 8、清洗流路及拆卸层析柱

- 1) **暂停流速**，A、B 泵清洗后放入超纯水的试剂瓶中，在 1 mL/min 流速条件下，按图 11 设置流路，清洗系统 3 min。点击缓冲液阀切换为 A 泵，将收集器导管置于废液缸

内，点击出口阀切换为收集器导管，按图 12 所示的流路清洗 3 min。暂停流速，将样品阀的上样管插入到分装有超纯水的 50 mL 离心管底部，恢复流速，点击切换样品阀和清洗阀，按图 13 所示的流路清洗 3 min。

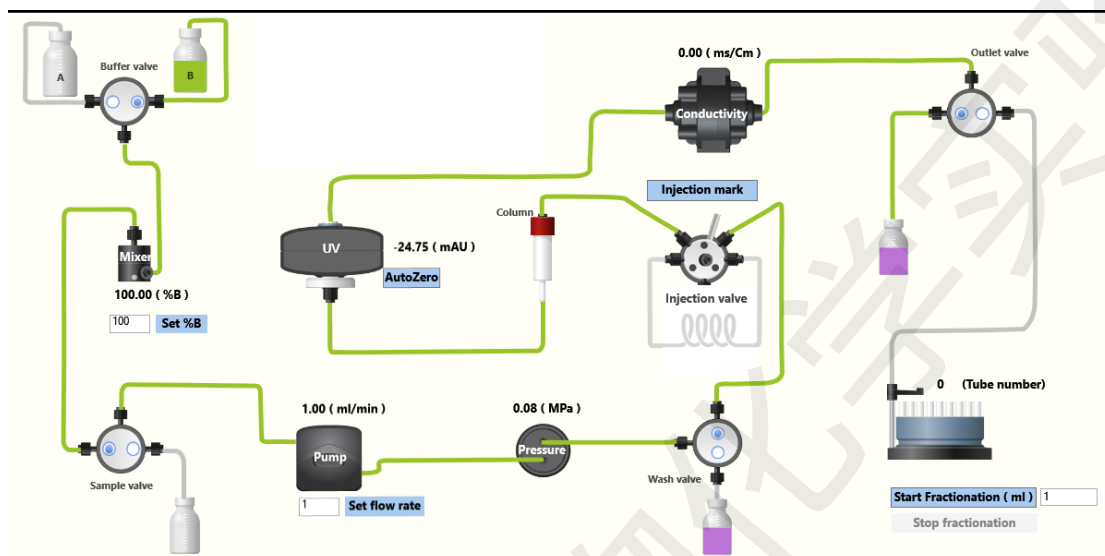


图 11 清洗流路 1

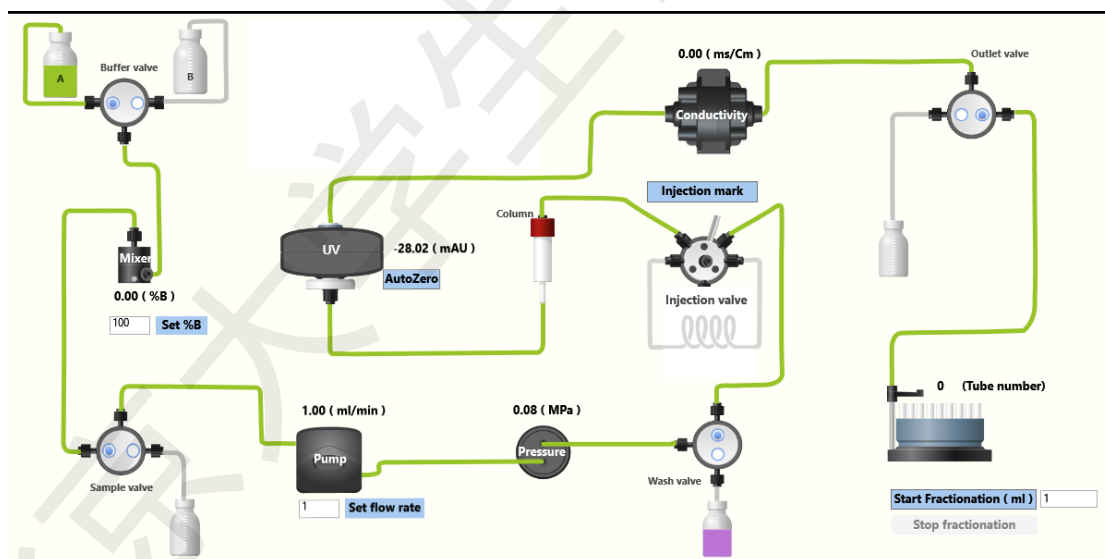


图 12 清洗流路 2



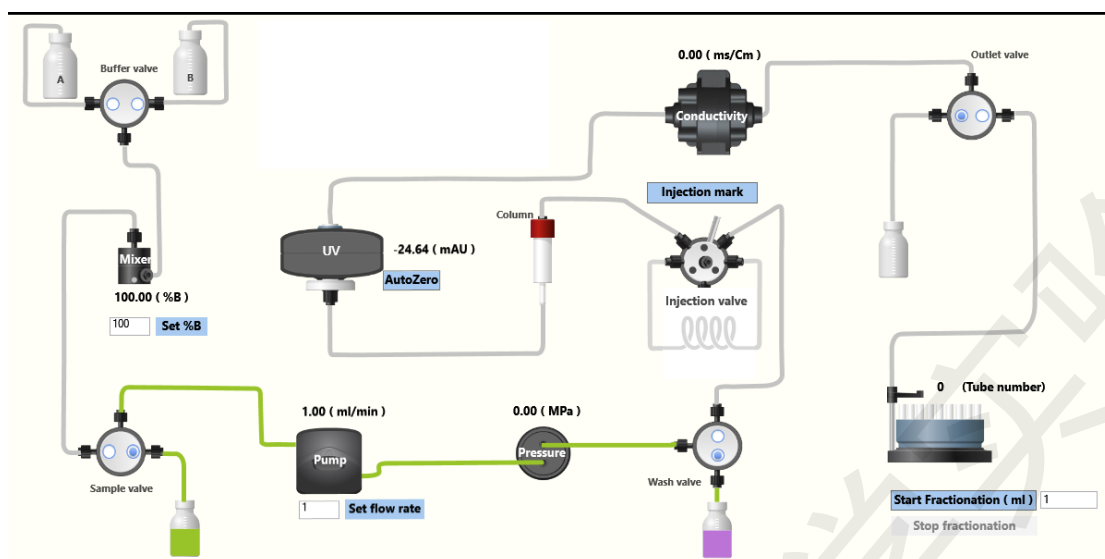


图 13 清洗流路 3

- 2) **暂停流速**，将 A、B 泵放入 20%乙醇中，在 1 mL/min 流速条件下，对整个系统进行清洗，清洗过程与超纯水相同。注意样品阀的上样管也用分装的 20%乙醇进行清洗。  
(进行此步骤时先通知老师已完成纯化实验)
- 3) 系统清洗结束后，更改流路经过层析柱（图 11），在运行 1 mL/min 流速的条件下拆卸层析柱。**先拆层析柱下端**，再拆层析柱上端，让液体从层析柱溢出后安装上端堵头，然后安装下端堵头。同时接柱位的管道也需连接好。**(拆卸层析柱前先咨询老师)**
- 9、**结束程序**：点击电脑操作界面的方形图标 End 键。**程序停止后才会保存完整的实验数据**，否则无法用 Evaluation 窗口打开实验文件。
- 10、**保存样品**：对应层析图谱，在收集器上寻找装有目标组分的离心管并做好标记。
- 11、**导出层析图谱**：在 Unicorn start 软件的 Evaluation 窗口打开实验文件，按需求编辑层析图谱的样式，导出 PDF 文件。在电脑桌面新建文件夹，按实验日期命名，将导出的数据保存在该文件夹下。（电脑可联网传输文件，切勿使用个人 U 盘连接公共电脑）

**注意：**样品纯化后应严格按照操作流程完成整个系统所有流路的清洗，不可随意缩短清洗时长。必须按要求正常停止程序，实验中途不可关闭程序窗口，否则可能遗失实验数据。本次实验要求仪器在运行流速时，至少留有一人监督仪器状态。实验结束后清洁并整理台面至初始状态，收集器上不可留有试管或离心管，3 支 50 mL 离心管需清洗干净（尤其缓冲液 A 管中会混有蛋白质样品）。