

文件编号：WU-ISCMS-QM 20204461

版本号：V2.0

受控状态：

分发号：

分子科学公共实验平台

质量管理文件

蛋白纯化仪

AKTA Pure 标准操作规程

2021 年 05 月 01 日发布

年 月 日实施

分子科学公共实验平台 发布

修订页

[illegible]

目 录

1. 目的	1
2. 范围	1
3. 职责	1
4. 色谱实验室安全管理规范	2
4.1. 进入或离开实验室规定	2
4.2. 实验操作规定	2
4.3. 气瓶使用规定	3
5. 色谱实验室仪器设备管理规范	4
5.1. 蛋白纯化仪预约与使用	4
5.2. 预约制度	4
5.3. 培训考核制度	5
6. 实验内容	6
6.1 准备工作	6
6.2 登录系统	6
6.3 放置收集架	8
6.4 冲洗管路	9
6.5 安装柱子	11
6.6 方法编辑	14
6.7 上样	20
6.8 运行程序	21
6.9 结果查看	23
6.10 实验结束处理	24
7. 相关/支撑性文件	25
8. 记录	25

1. 目的

建立蛋白纯化仪使用操作规程, 使其被正确、规范地使用。

2. 范围

本规程适用于所有使用蛋白纯化仪的用户。

3. 职责

3.1. 用户: 严格按本程序操作, 发现异常情况及时汇报实验室技术员。

3.2. 实验室技术员: 确保操作人员经过相关培训, 并按本规程进行操作。

3.3. 文章致谢格式:

根据学校指导意见, 使用各校级平台仪器设备表征产生的科研成果必须致谢平台。如果您在文章成果中使用了光谱、色质谱、磁共振波谱以及其他属于分子科学平台的仪器设备, 请务必在文末致谢分子科学公共实验平台。

英文文章致谢:

① Acknowledgement: The author thanks (Dr. XXX from) Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences at Westlake University for (the assistance/discussion/supporting in) ... measurement/data interpretation.

② Coauthorship on the resulting publications would be appreciated if our staff make technical contributions (including but not limited to critical sample preparation, novel experiment designation and comprehensive data analyzation).

Affiliation address: "Key Laboratory of Precise Synthesis of Functional Molecules of Zhejiang Province, School of Science, Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences, Westlake University, 18 Shilongshan Road, Hangzhou 310024, Zhejiang Province, China."

中文文章致谢:

① 致谢: 感谢西湖大学分子科学公共实验室平台 XXX 博士(或者 XXX 老师)在.....表征或数据分析上提供的帮助。

② 共同作者: 如果分子科学平台老师在您课题组样品表征或文章发表上有重要技术贡献(包括但不限于关键样品制备、新型实验设计和深度数据分析), 我们感谢您将相

关老师列为共同作者，作者单位地址如下：西湖大学，分子科学公共实验平台，功能分子与精准合成浙江省重点实验室，杭州，310030，浙江。

4. 质谱实验室安全管理规范

4.1. 进入或离开实验室规定

- 4.1.1. 进入实验室之前必须通过学校、中心和平台的安全考试或考核，严格遵守本实验室的各项安全警示标识。
- 4.1.2. 进入质谱实验室，请仔细阅读本实验室的安全管理规定。
- 4.1.3. 进入实验室需穿戴实验服，严禁穿拖鞋、高跟鞋进入实验室，长发请束发。
- 4.1.4. 进入实验室应了解消防器具与紧急逃生通道位置，实验室通道及消防紧急通道必须保持畅通。
- 4.1.5. 严禁将自己授权的门卡转借他人，一旦发现将进行禁用处理。
- 4.1.6. 禁止将实验无关人员带入实验室。
- 4.1.7. 严禁在实验室饮食、吸烟或随意走动。
- 4.1.8. 夜间实验，需两人在场。
- 4.1.9. 为保持实验室内环境温度及湿度稳定，进入实验室后保持实验室门窗关闭。实验结束后，实验人员必须进行清场。最后离开实验室人员需检查水、电、门窗等。
- 4.1.10. 严禁戴手套接触门把手或电梯。禁止随意丢弃实验废弃物。
- 4.1.11. 实验室应保持整洁，严禁摆放与实验无关的个人物品。
- 4.1.12. 空压机及 UPS 所处房间应使用空调，要保持室内空气干燥，在潮湿的季节应该除湿。至少每周一次检查除湿机有无积水。

4.2. 实验操作规定

- 4.2.1. 实验室内均为大型科研设备，有专人负责管理，未经培训人员，不得擅自上机使用。
- 4.2.2. 送样或自主上机的用户，均需使用大仪系统进行系统。
- 4.2.3. 请严格按送样要求进行制样。由于样品问题造成色谱柱损坏或仪器配件更换，无论独立上机或是委托测试，费用将由用户所在课题组承担；

- 4.2.4. 请严格按仪器操作规程进行操作。实验过程中有任何不确定必须联系技术员，自主上机因操作错误造成设备或色谱柱等损坏的，该用户课题组也需承担相关费用。
- 4.2.5. 实验过程中如发现仪器设备发生异常状况、仪器报错、报警等，务必立即联系仪器负责人严禁擅自处理、调整仪器主要部件，凡自行拆卸者一经发现将给予严重处罚。
- 4.2.6. 色谱类仪器，必须根据样品分离方法和要求，选择合适的色谱柱或设置洗脱梯度、进样盘等，因用户本人选择色谱柱或梯度设置错误，导致仪器故障或色谱柱耗材损坏的，所有费用由课题组全权负责。
- 4.2.7. 仪器均为高压设备，使用仪器需严格遵守用电安全规定，严禁擅自更改电路或切断仪器电源等相关危险操作。
- 4.2.8. 实验室内的药品、试剂必须存放药品柜，并做好使用登记。
- 4.2.9. 使用化学试剂或药品前，必须了解其物理化学性质、毒性及防护方法，使用时必须配戴护目镜、手套等，做好个人防护。
- 4.2.10. 非常规实验测试须技术员同意并指导方可进行。实验数据须通过学校数据中心进行下载，禁止将个人 U 盘、移动硬盘等易带入病毒的存储设备与各色质谱仪器工作站连接拷贝数据。
- 4.2.11. 垃圾、废液必须严格按标识进行分类，禁止将锐器、玻璃丢弃在常规垃圾箱中。
- 4.2.12. 自主上机用户须在预约时间内须使用本人的账号登陆基理系统进行仪器使用；使用结束应做好仪器使用等级，如实记录仪器使用状态。

4.3. 气瓶使用规定

- 4.3.1. 首次使用实验室气瓶，须经实验室技术员培训指导。
- 4.3.2. 请按实验室气瓶标识选择正确的气源。
- 4.3.3. 打开气瓶，先确认管路已连接稳妥，禁止未接气路或气路未连接稳妥，开气瓶减压阀。
- 4.3.4. 更换气瓶，首先确保减压阀关闭，且管路中气压排空归零，先用扳手拧松后，再用手旋下管路。换气瓶，确认气瓶螺纹吻合后，先手紧气体管路，再用扳手拧 1/8 圈左右。
- 4.3.5. 开气瓶或更换气瓶，禁止站在减压阀出气口正前方。

4.3.6. 测试过程中, 请根据需要及时更换气瓶。使用者应根据气瓶使用情况, 变更气瓶使用牌状态“满瓶”“使用中”“空瓶”等。

4.3.7. 气瓶应保持正立并固定。

5. 质谱实验室仪器设备管理规范

5.1. 蛋白纯化仪预约与使用

该仪器遵从学校“科研设施与公共仪器中心”对大型仪器设备实行的管理办法和“集中投入、统一管理、开放公用、资源共享”的建设原则, 面向校内所有教学、科研单位开放使用; 根据使用机时适当收取费用; 并在保障校内使用的同时, 面向社会开放。

该仪器的使用实行预约制度, 请使用者根据样品的测试要求在学校“大型仪器共享管理系统”(以下简称大仪网)进行预约, 并按照要求登记预约信息。非特殊情况, 本仪器仅支持自主上机。根据预约制度可登陆大仪网站即时预约机时, 包括周末; 寒暑假及国庆假期将另行通知。

自主上机

- ① 质谱仪器培训至少需要两小时, 申请培训前先与仪器负责人联系。
- ② 请在大仪网预约培训机时, 培训时请携带纸质版仪器培训申请表。
- ③ 技术员进行现场培训。
- ④ 培训后两周内, 用户可在技术员指导下用实际样品进行上机测试, 并按自主上机计费; 根据自身掌握情况, 用户需在两周内进行上机考核, 考核通过的用户即获得自主上机权限, 原则上一星期复考; 未考核或考核不通过的用户, 需重新接受培训。

5.2. 预约制度

为充分利用仪器效能、服务全校科研工作, 根据测试内容与时间的不同, 实验室仪器需进行网上预约制度。蛋白纯化仪使用涉及流动相更换, 自主上机用户需根据预约制度登陆大仪共享网站最少提前 30 分钟预约机时, 包括周末; 寒暑假及法定节假日请关注实验室实时通知。

请严格遵守预约时间使用仪器, 以免浪费机时。如需调换时间段, 在技术员同意下可与其他使用者协商。因故不能在预约时间内测试者, 请提前 30 分钟取消预约并通知技术员。恶意预约机时或有多次无故不遵预约时间的用户, 实验室将进行批评教育、通报批评或取消上机资格等处罚。

预约时段		预约时间	测试内容
周一至周日	09:00 至 22:00	不限制	纯化制备

- (1) 校内使用者须经过技术员的实验操作培训，考核合格后方可上机使用；
- (2) 实验开始时务必在实验记录本上登记，结束后如实记录仪器状态；
- (3) 严禁擅自处理、拆卸、调整仪器主要部件。使用期间如仪器出现故障，使用者须及时通知技术员，以便尽快维修或报修，隐瞒不报者将被追究责任，加重处理；
- (4) 因人为原因造成仪器故障的（如硬件损坏），用户课题组须承担维修费用；
- (5) 本实验室所有原始数据不允许在仪器工作站上删改，尤其不允许用 U 盘与移动硬盘直接拷贝。用户应根据要求通过科研仪器网/数据服务器传送下载原始数据至本地电脑，以保存并做数据处理；实验数据在本实验室电脑中保留 2 年。
- (6) 用户应保持实验区域的卫生清洁，测试完毕请及时带走样品，技术员不负责保管。

使用者若违犯以上条例，将酌情给予警告、通报批评、罚款及取消使用资格等惩罚措施。

5.3. 培训考核制度

校内教师、研究生均可提出预约申请，由技术员安排时间进行培训，培训内容包括仪器使用规章制度、送样须知及安全规范、基本硬件知识、标准操作规程（自主测试）及相应数据处理。

培训结束后，两周内培训者需管理人员监督下进行 5 次左右操作，培训者根据自己的掌握程度，联系技术员进行上机考核。初级考核合格后，可在管理人员监督下上机操作，一周后复考；

实验室技术员认为培训者达到独立操作水平后，给予培训者授权在所允许的可操作实验范围内独立使用仪器。如果因为人为操作错误导致仪器故障者，除按要求承担维修费用之外，给予重考惩罚、培训费翻倍。

对接受培训人员的核心要求：

- (1) 了解纯化制备的基本原理及其应用的多学科背景知识；
- (2) 熟练掌握软件使用，严格按照标准操作规程操作，防止因人为操作不当造成仪器

故障, 认真做好仪器的使用及故障记录。

6. 实验内容

6.1 准备工作

- (1) 样品准备: 样品过 0.22 μ m 滤膜以去除颗粒性物质。
- (2) 流动相准备: 配制好缓冲液, 并准备 1 瓶去离子水以及 1 瓶 0.1M NaOH 溶液, 并对所用溶液进行脱气 (超声 15min)。
- (3) 收集容器准备: 准备好深孔板或离心管以收集样品。

注: F9-C 方形收集器兼容 24、48、96 深孔板; 3、15、50 mL 离心管。

6.2 登录系统

6.2.1. 登录系统

双击桌面上的  图标, 输入账号密码登录系统。如图2.1所示, 用户名: 导师姓名全拼, 如ISCPS; 登录密码: 导师姓名全拼123, 如iscps123。

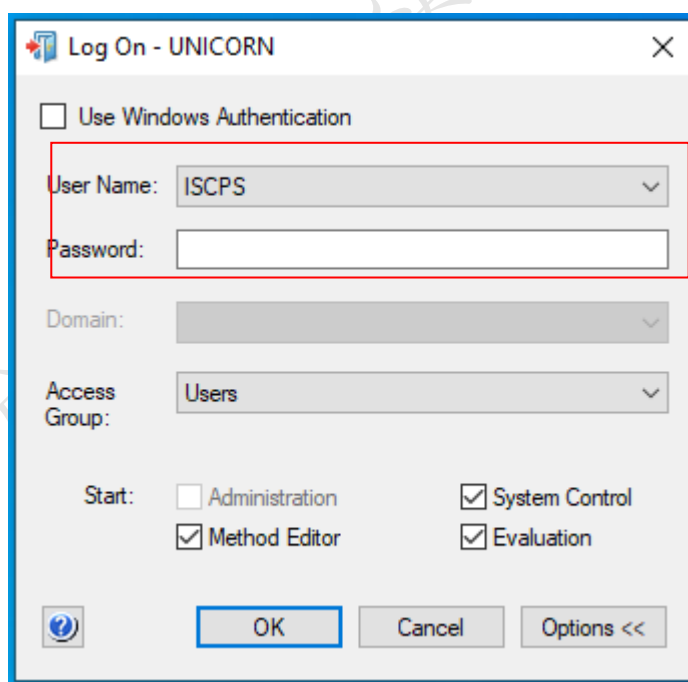


图2.1 登录系统

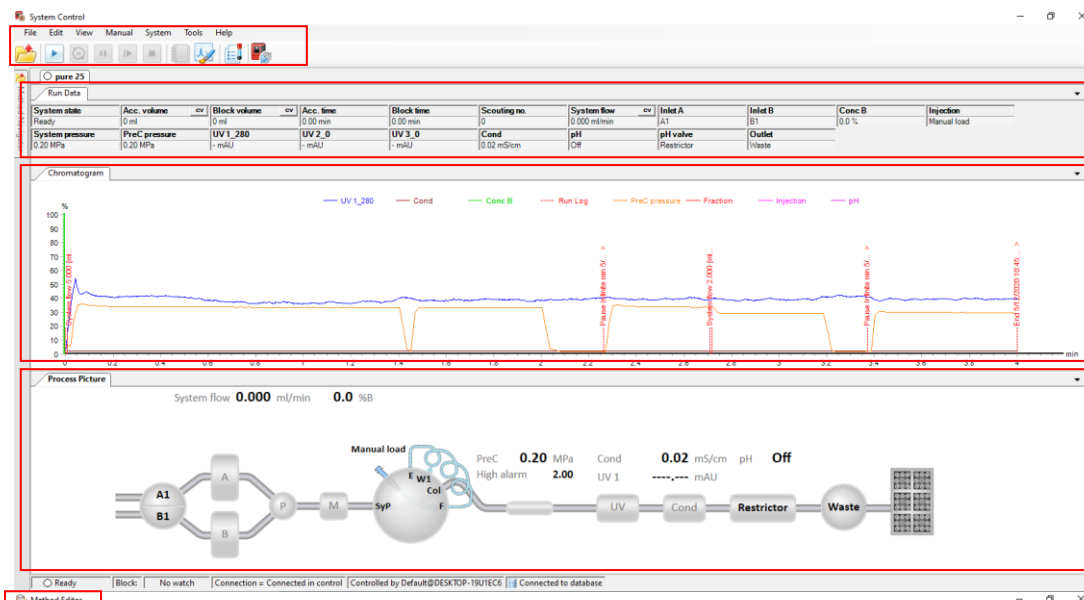
6.2.2. 操作界面

如图2.2所示, 登录系统时会弹出三个界面: System Control界面, Method Editor界面和Evaluation Classic界面。

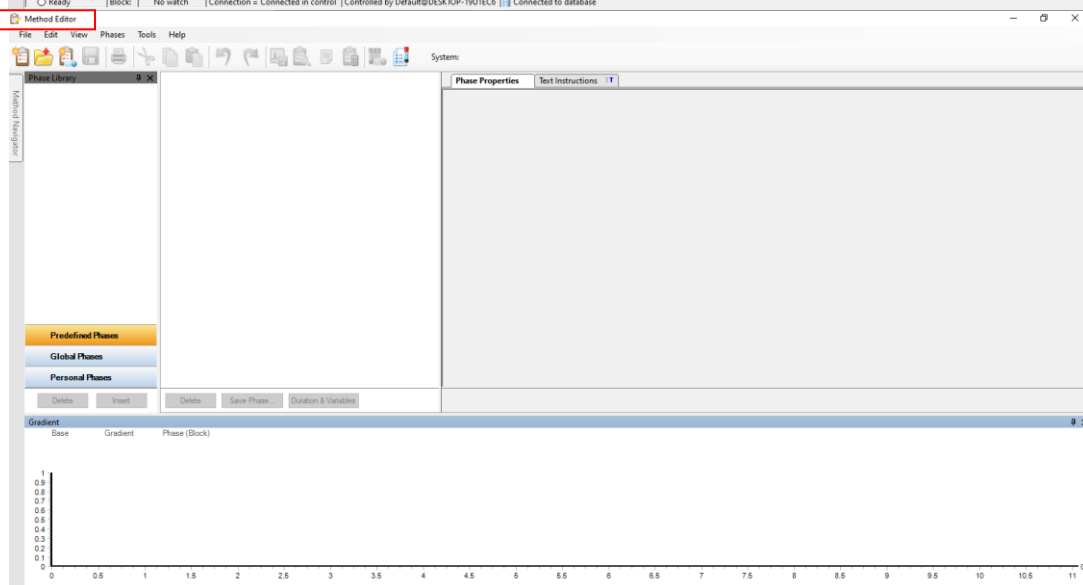
其中, System Control为主操作界面, 所有的手动设置选项都是在该界面下完成:

菜单栏包含Start、Pause、Hold、Continue、End等快捷按钮以及Manual、System等仪器参数设置选项，Run Data窗口显示实时运行数据，Chromatogram显示实时谱图，Process Picture为手动控制流路窗口；Method Editor为方法编辑界面；Evaluation Classic为结果数据查看及处理窗口。

a)



b)



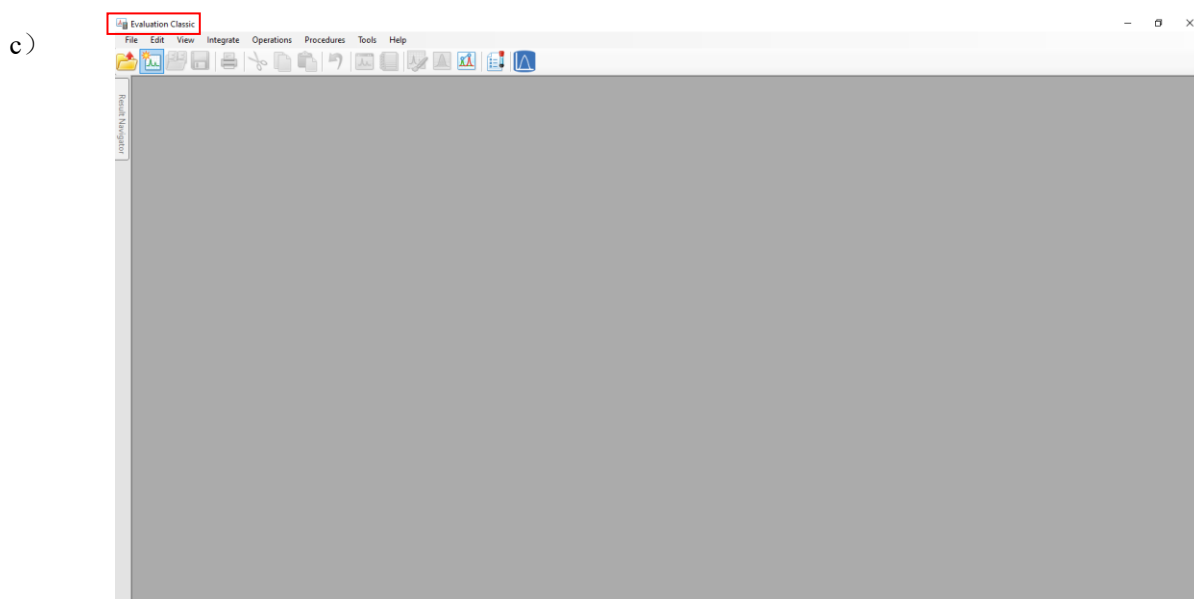
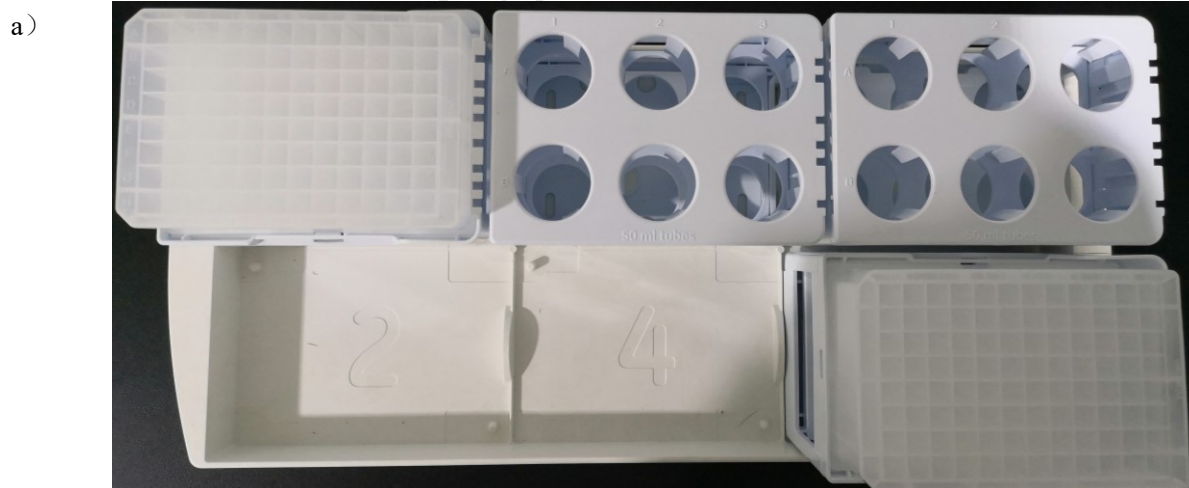


图2.2 操作界面

6.3 放置收集架

如图3.1（a）所示，收集器托盘一共可放6个架子，包括深孔板架和离心管架。实验前准备好深孔板或离心管放置到相应的架子上，然后将架子放入方形收集器内。

收集架放入后，仪器将进行自动识别。如图3.1（b）所示，点击View→Fraction Collector Content弹出图3.1（c）所示界面，显示收集器信息。若检测失败，则需重新放置。



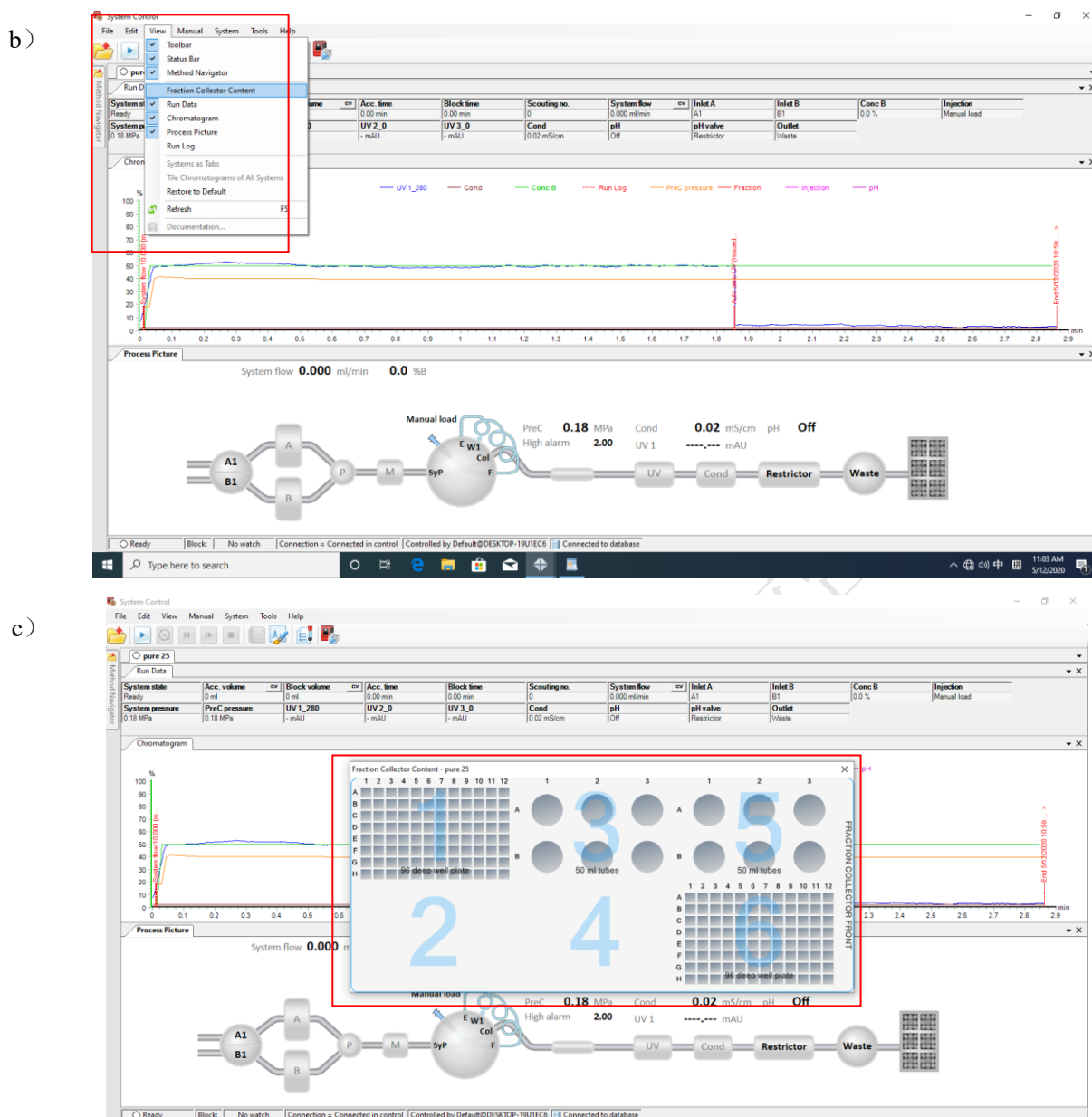


图3.1 样品收集架

6.4 冲洗管路

6.4.1 泵头抽气

若缓冲液进口管是空的或者有太多气泡，此时需要手动排气。如图4.1所示，在泵头上方的抽气螺母上连接一个注射器，拧松螺母并抽气排除气泡。泵头内的气泡也是导致压力和流速不稳定的主要原因，也需要采用这种方式来排除泵头内的气泡。



图4.1 泵头抽气

6.4.2 纯水冲洗

实验开始前整个系统保存在20%乙醇体系中, 先将进口管从20%乙醇保护液中转移到纯水中然后进行泵冲洗。

如图4.2所示, 点击Manual→Execute Manual Instructions, Pumps模块下选择Pump A wash, Inlet选择A1, 点击Insert插入指令, 然后点击Execute执行指令。



c)



图4.2 冲洗管路

6.4.3 Buffer冲洗

将纯水冲洗后的进样管放置到buffer中，按6.4.2相同的方法进行Pump wash。

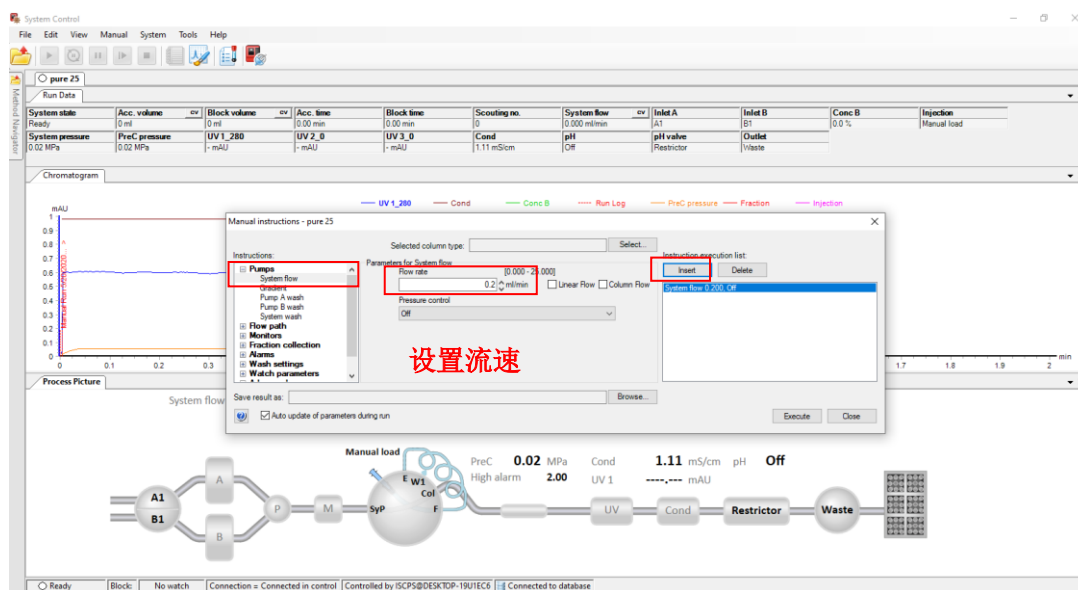
6.5 安装柱子

注意：安装柱子前仔细阅读说明书，根据柱子性质设置流速、压力等参数！

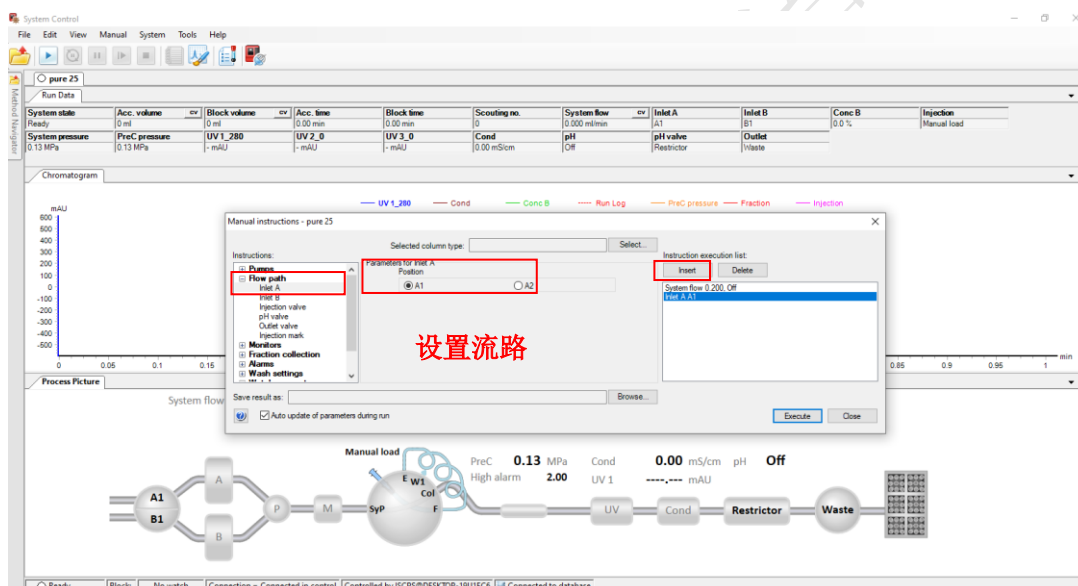
按照如下步骤装柱子：

- 首先按照“**给流路→给流速→设报警压**”的思路给系统设置一个低流速。如图5.1（a）所示，在Pumps命令组中选择System flow输入一个小流速，如0.2mL/ min，点击Insert；
- 如图5.1（b）在Flow Path命令组中选择入口，如Inlet A→A1，点击Insert；
- 如图5.1（c）在Alarms命令组选择Alarm pre column pressure，根据所使用柱子的耐受压设置High alarm，如2.0Mpa，点击Insert；
- 点击Execute后执行插入的所有命令，如图5.1（d）显示流路图；
- 如图5.1（e）所示，打开柱子上堵头，拧开二通阀连接进样阀的一端，当接头有液体流出时，将接头对准柱子上端，轻轻旋上，**注意不要旋紧，因为此时出口尚未打开；**
- 旋松柱子下堵头，然后将柱子上端旋紧。如图5.1（f）所示，观察到溶液从柱子下端流出；
- 将柱子下端旋进连接检测器的接头里；
- 至此，柱子安装完成，点击End结束操作。

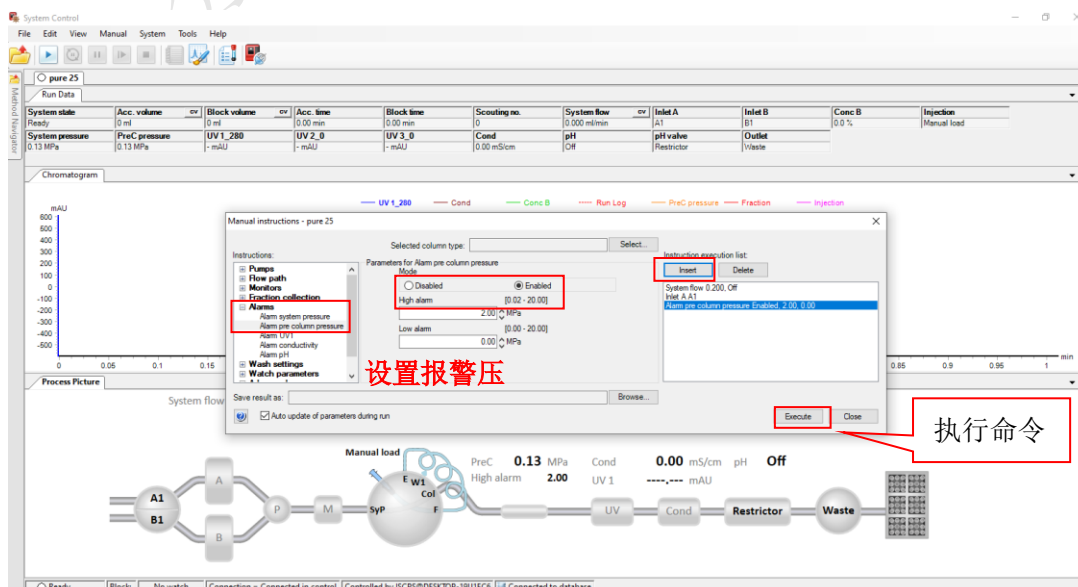
a)



b)



c)



d)



e)



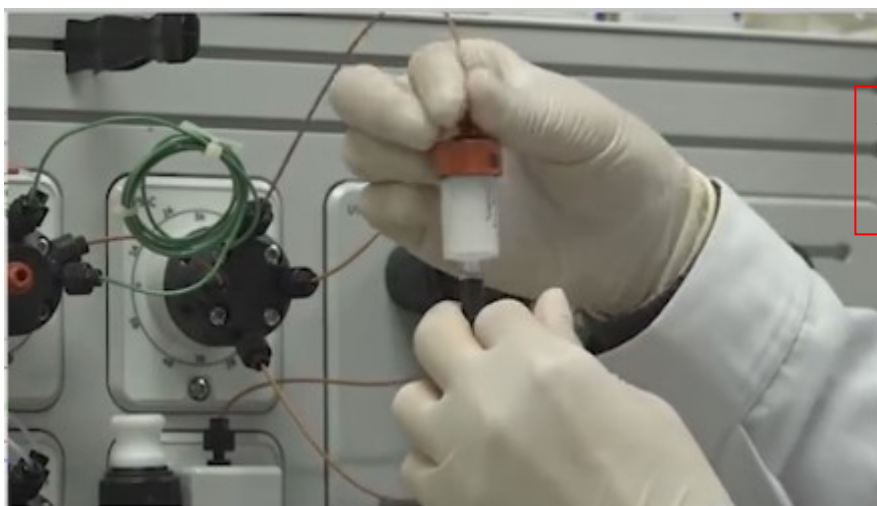
打开柱子上堵头，拧开二通阀连接进样阀的一端，当接头有液体流出时，将接头对准柱子上端，轻轻旋上，**注意不要旋紧，因为此时出口尚未打开。**

f)



旋松柱子下堵头，然后将柱子上端旋紧，观察到溶液从柱子下端流出。

g)



将柱子下端旋进连接检测器的接头里。

h)



图5.1 安装柱子

6.6 方法编辑

6.6.1 调用方法

若课题组已有编好的方法，在Method Editor界面，点击File→Open,直接调用方法，再按照6.6.3步骤对各模块方法进行修改后另存。若之前没有方法，按照6.6.2~6.6.3所示步骤新建层析方法。

6.6.2 新建方法

如图6.1 (a)，点击File→New Method，弹出如图6.1 (b) 所示界面，在Predefined Method下拉框中选择层析实验的类型，如凝胶过滤层析选择Gel Filtration (GF)，点击OK。然后按照6.6.3步骤进行方法编辑。

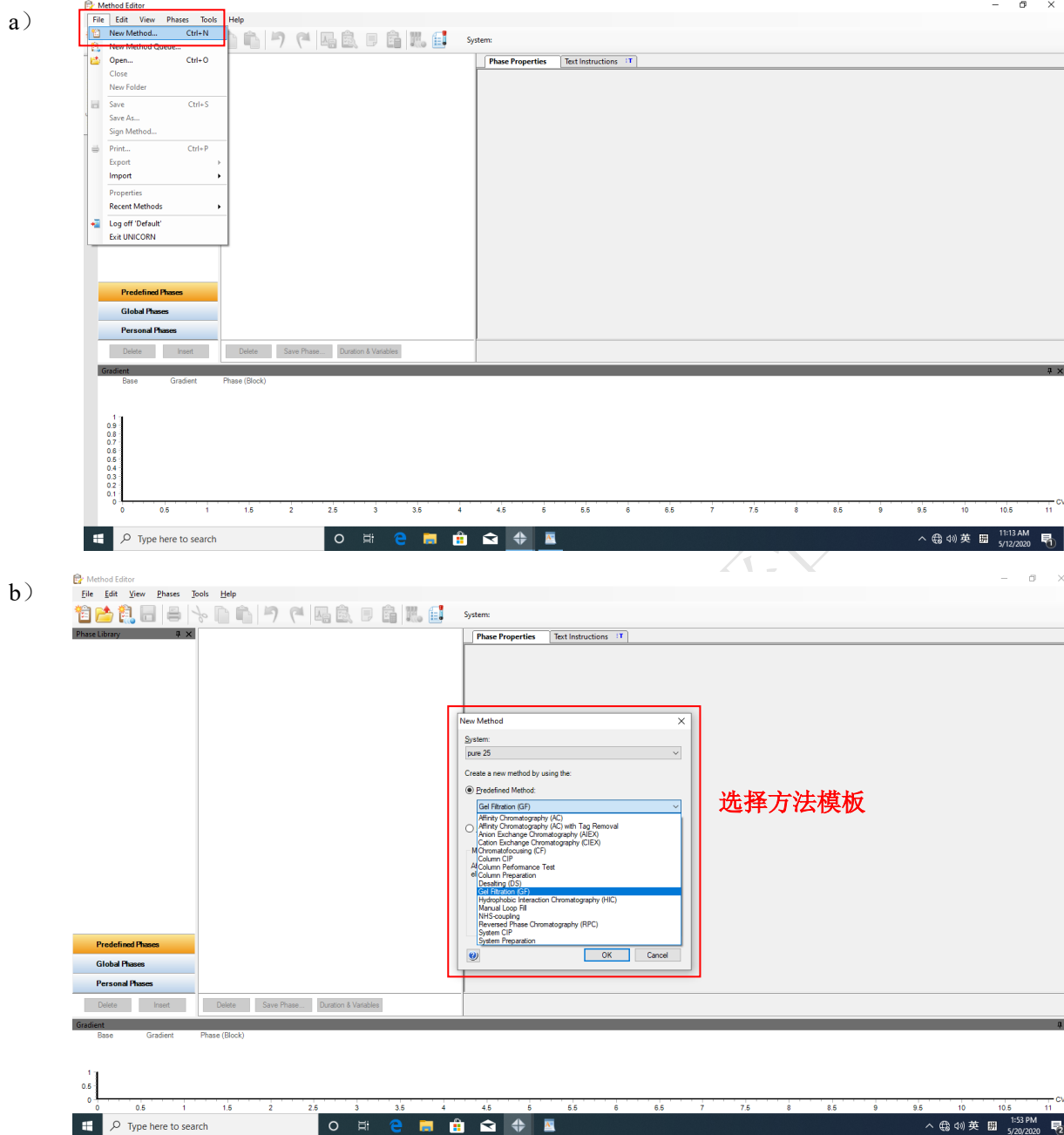


图6.1 新建方法

6.6.3 方法编辑

按照以下步骤从上往下设置各实验阶段参数：

6.6.3.1 如图6.2方法编辑界面中出现预设的Gel Filtration层析实验的各个阶段及参数。

如需添加新的实验阶段，可以从Phase Library中选中目标操作并拖动到编辑窗口适当的位置处。

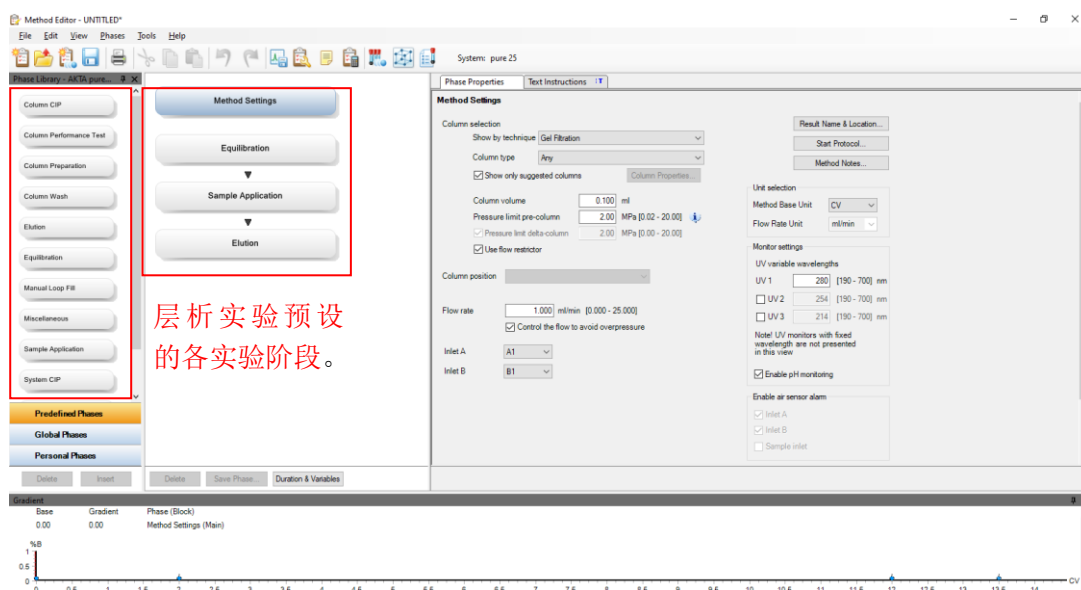


图6.2 新建方法

6.6.3.2 Method Settings

如图6.3，在Method Settings界面中进行参数设置。

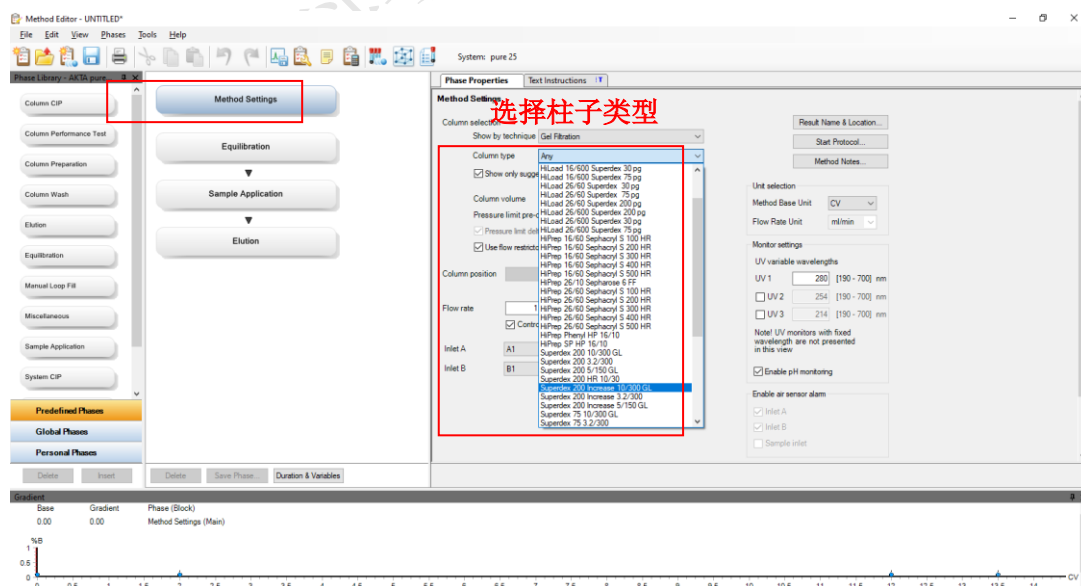
Column Type: 选择柱子类型，系统自动调入柱子的柱体积、柱前压等信息。

Method Base Unit: 选择CV（柱体积），流速单位设置为mL/min。

Flow rate: 参考柱子说明书设置流速。

UV variable wavelengths: 设置检测的UV波长。

Inlet: 缓冲液入口。



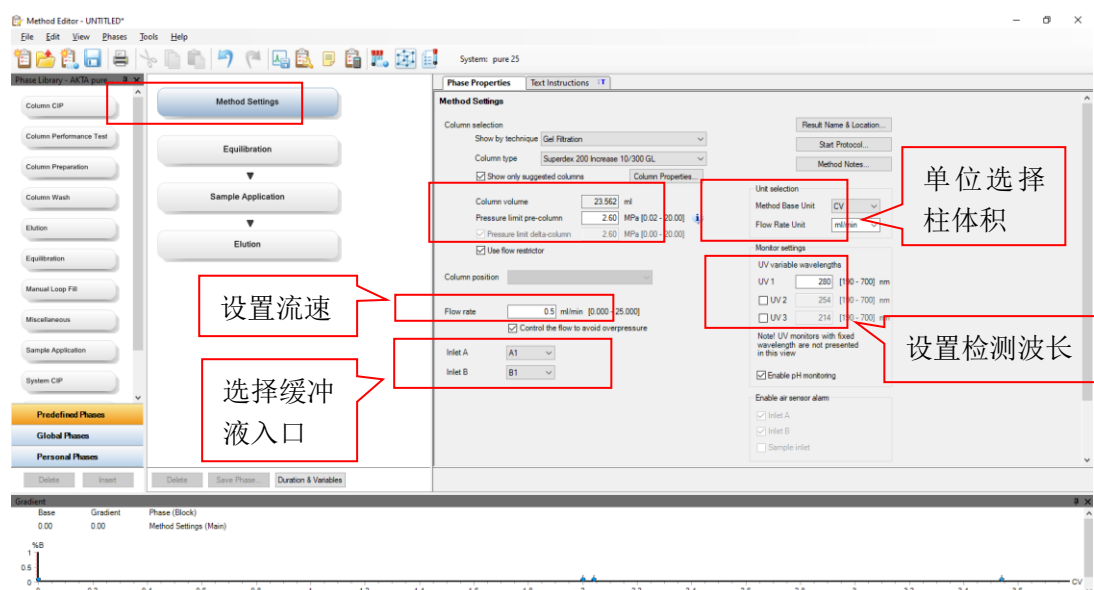


图6.3 Method Settings

6.6.3.3 Equilibration

如图6.4, 勾选Reset UV monitor, 设置流速和流路(可勾选与Method Settings相同, 也可此模块独立设置参数), 设置平衡体积。

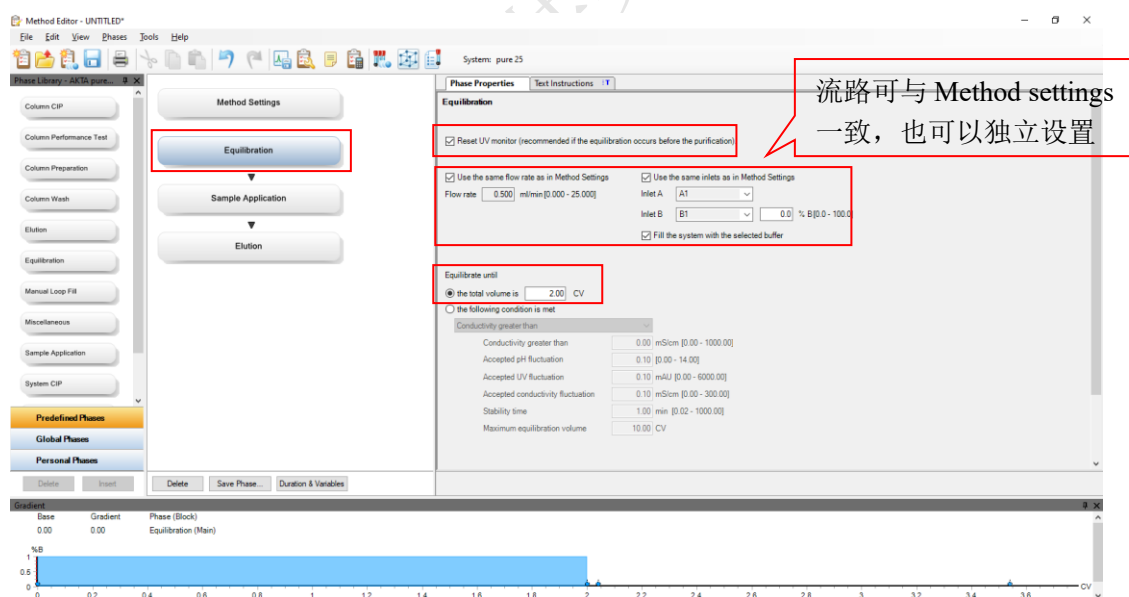


图6.4 Equilibration

6.6.3.4 Sample Application

如图6.5, 设置上样的流速, Loop Type选择样品环类型, Empty loop with选项输入清空样品环的buffer体积, 一般设置为样品环体积的2~3倍, 并设置buffer入口(Inlet)。

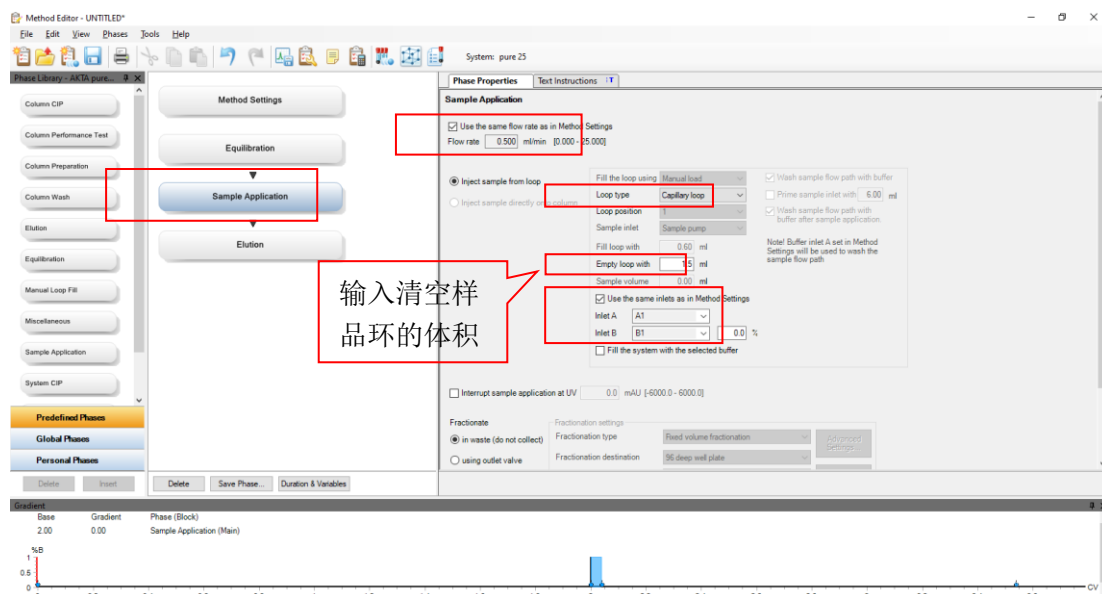


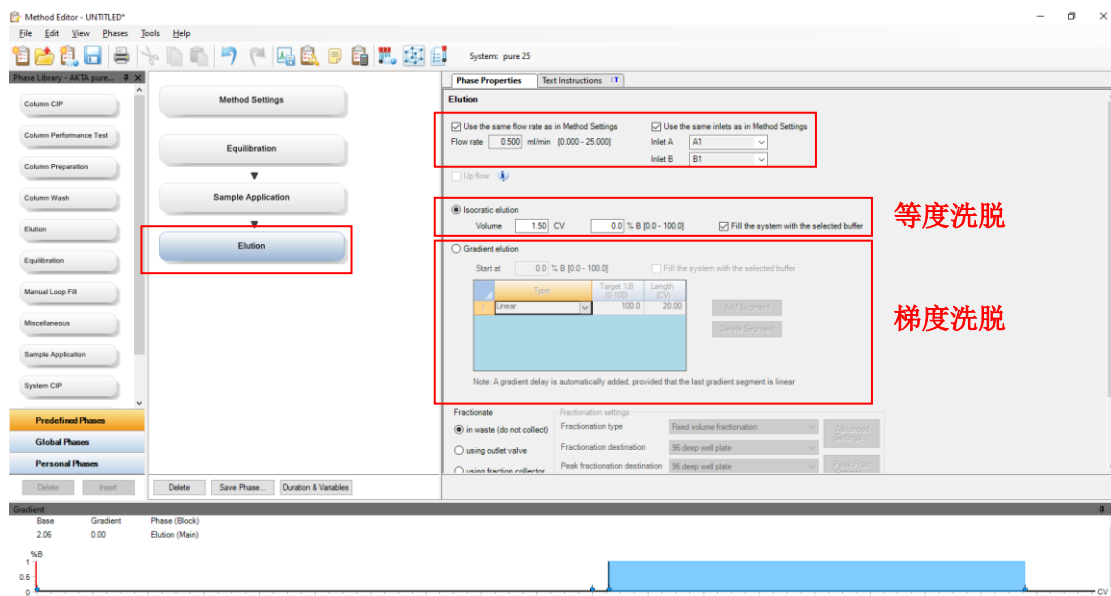
图6.5 Sample Application

6.6.3.5 Elution

如图6.6 (a)，设置洗脱阶段的流速和流路，洗脱模式可选择Isocratic elution（等度洗脱）或Gradient elution（梯度洗脱），其中梯度洗脱可选择Linear、Step和Step with fill三种模式，点击Add Segment可添加行。

设置收集参数：如图6.6（b）在Fractionate选项选择using fraction collector使用收集器收集。Fraction Type，收集方式可选择峰收集（Peak fractionation）、固定体积收集（Fixed volume fractionation）及两种方式结合（Fixed volume and Peak fractionation）等三种模式。如图6.6（c），Fractionation destination选择所使用的深孔板或离心管类型，在Peak fractionation volume输入每一管的收集体积。

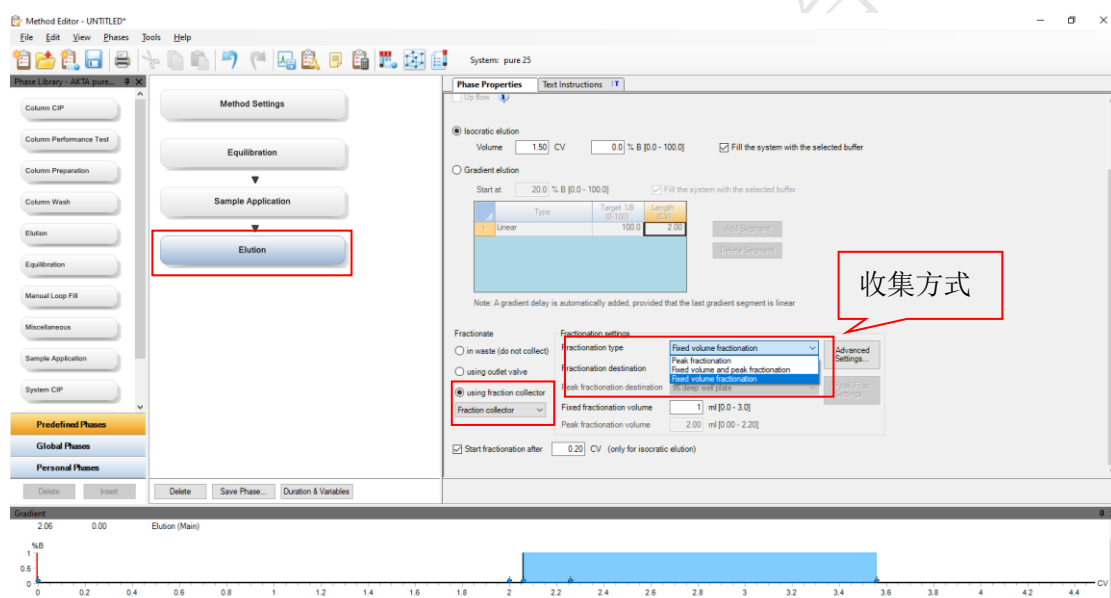
a)



等度洗脱

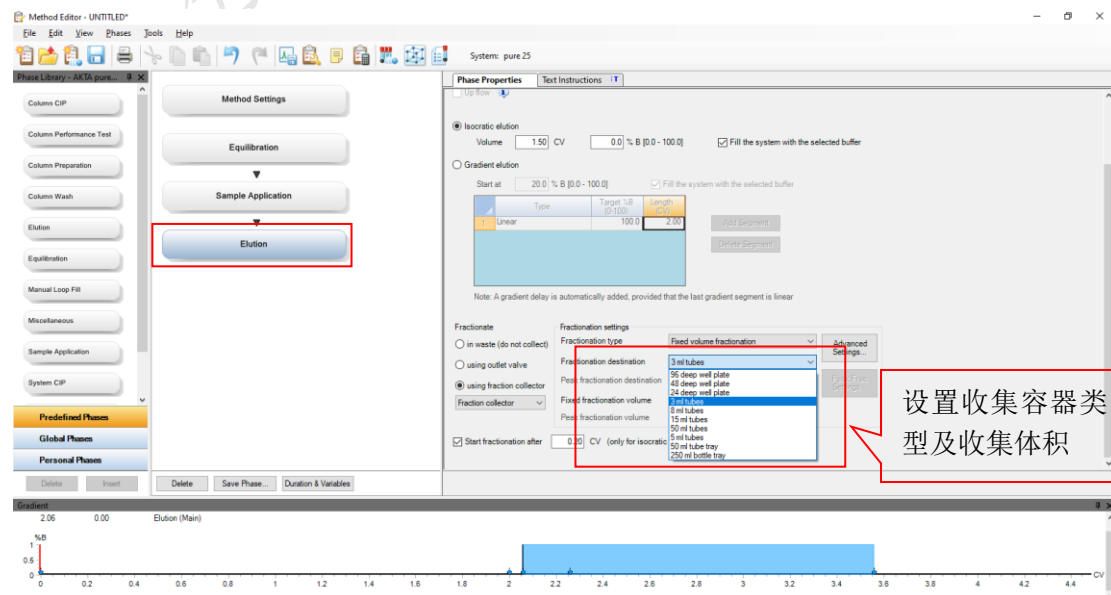
梯度洗脱

b)



收集方式

c)



设置收集容器类型及收集体积

图6.6 Elution

6.6.4 方法保存

如图6.7，各模块参数设置完毕后，可在Gradient窗口预览方法运行所需的总时间、总体积和总柱体积。（点击横坐标可切换单位）

方法确认无误后，点击保存按钮，将方法进行命名和保存。存储位置为课题组所在文件夹，如ISCPS。命名方式为姓名-日期-柱子类型，如HY-20200520- Superdex 200。

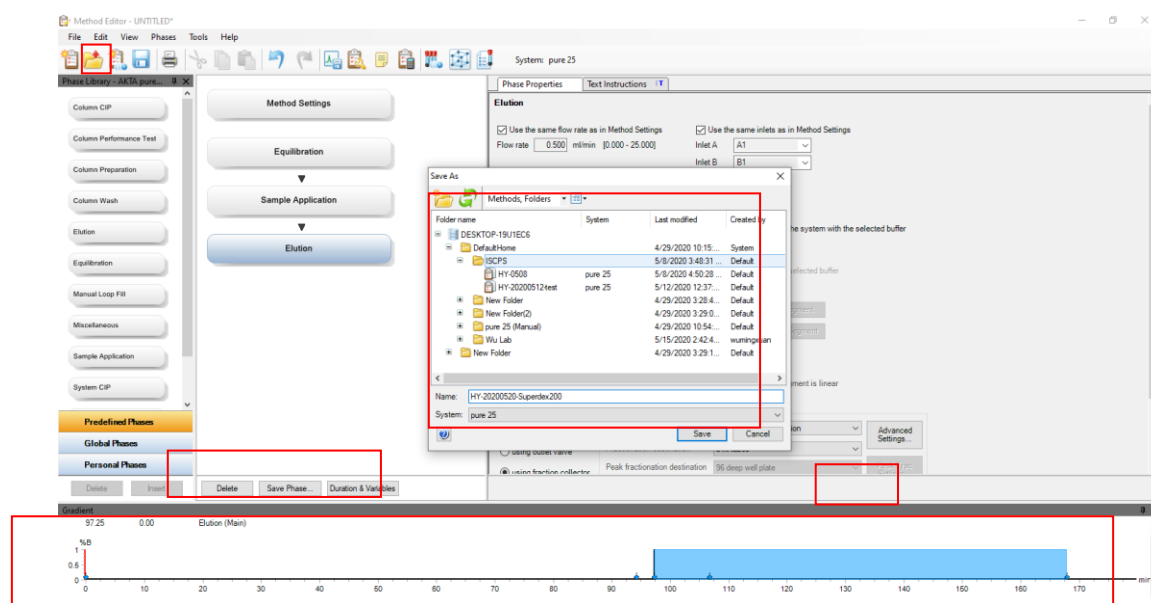


图6.7 方法保存

6.7 上样

采用手动上样方式。先用2~3倍样品环体积的纯水冲出样品环中的20%乙醇溶液，再用2~3倍样品环体积的buffer将纯水冲出，最后将样品注入到样品环中。

上样时注意排气泡，勿将气泡注入系统中。

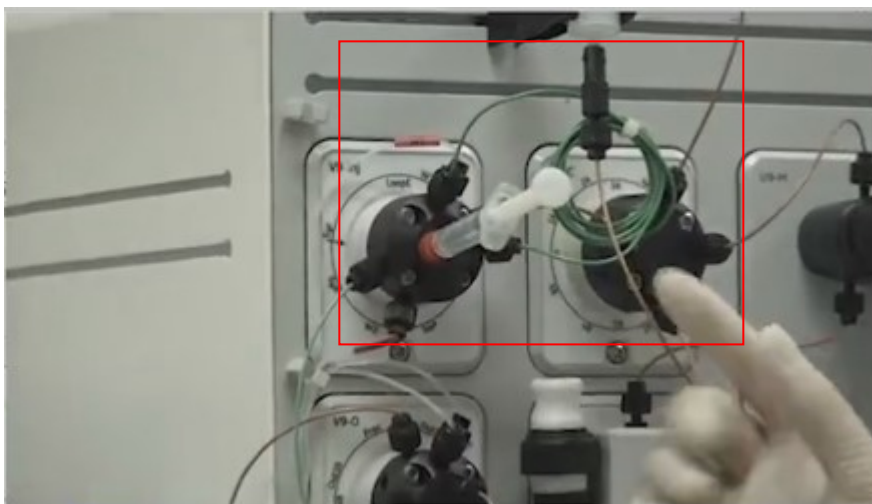
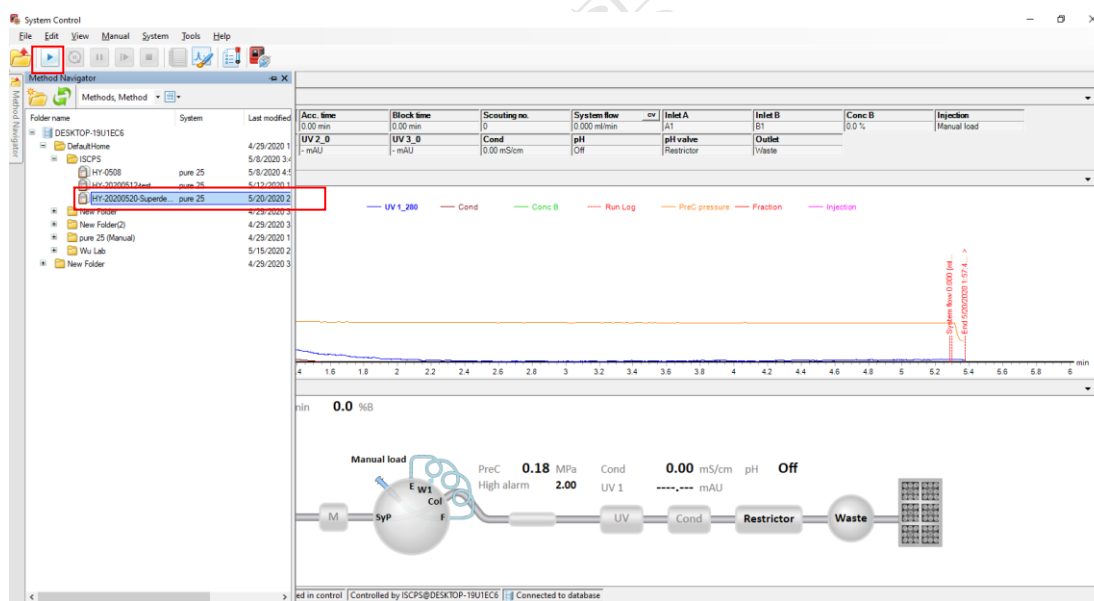


图7.1 上样

6.8 运行程序

6.8.1 如图8.1所示, 确认上样到loop环以后, 切换到System Control界面, 选择6.6中编辑好的方法, 在菜单栏点击Run按钮→点击start, 开始运行。

a)



b)

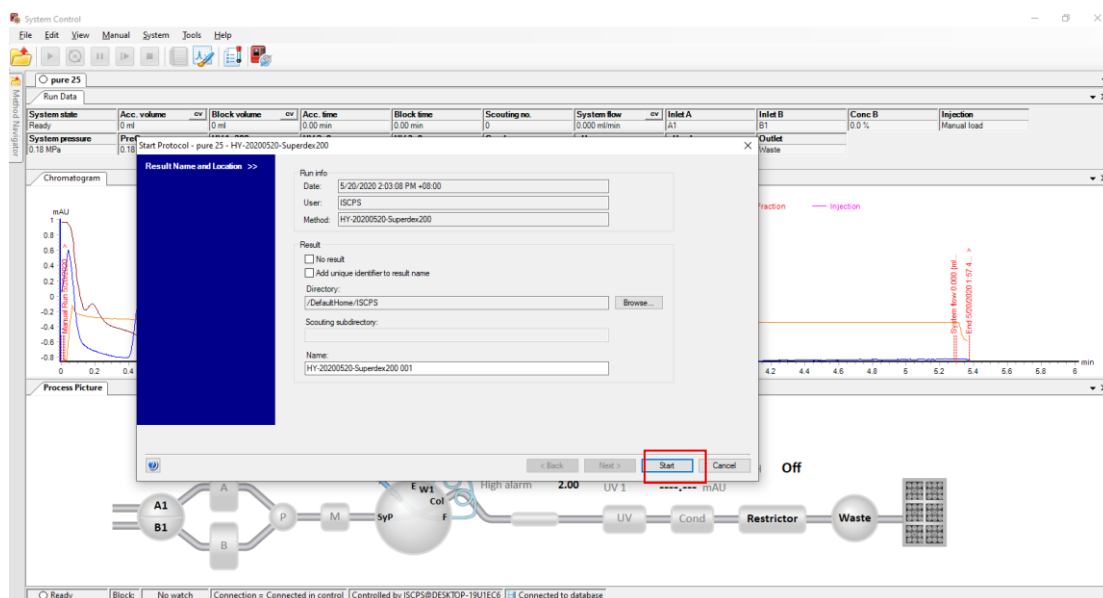


图 8.1 运行程序

6.8.2 运行状态查看

方法运行过程中，在System Control界面可以查看运行状态和手动控制运行进程。通过菜单栏的hold、pause、continue等按钮可以手动控制进程。此外，点击Manual→Execute Manual Instructions界面也可手动控制进程:例如，点击Other→Next breakpoint，可结束当前正在运行的阶段，进行下一步骤。



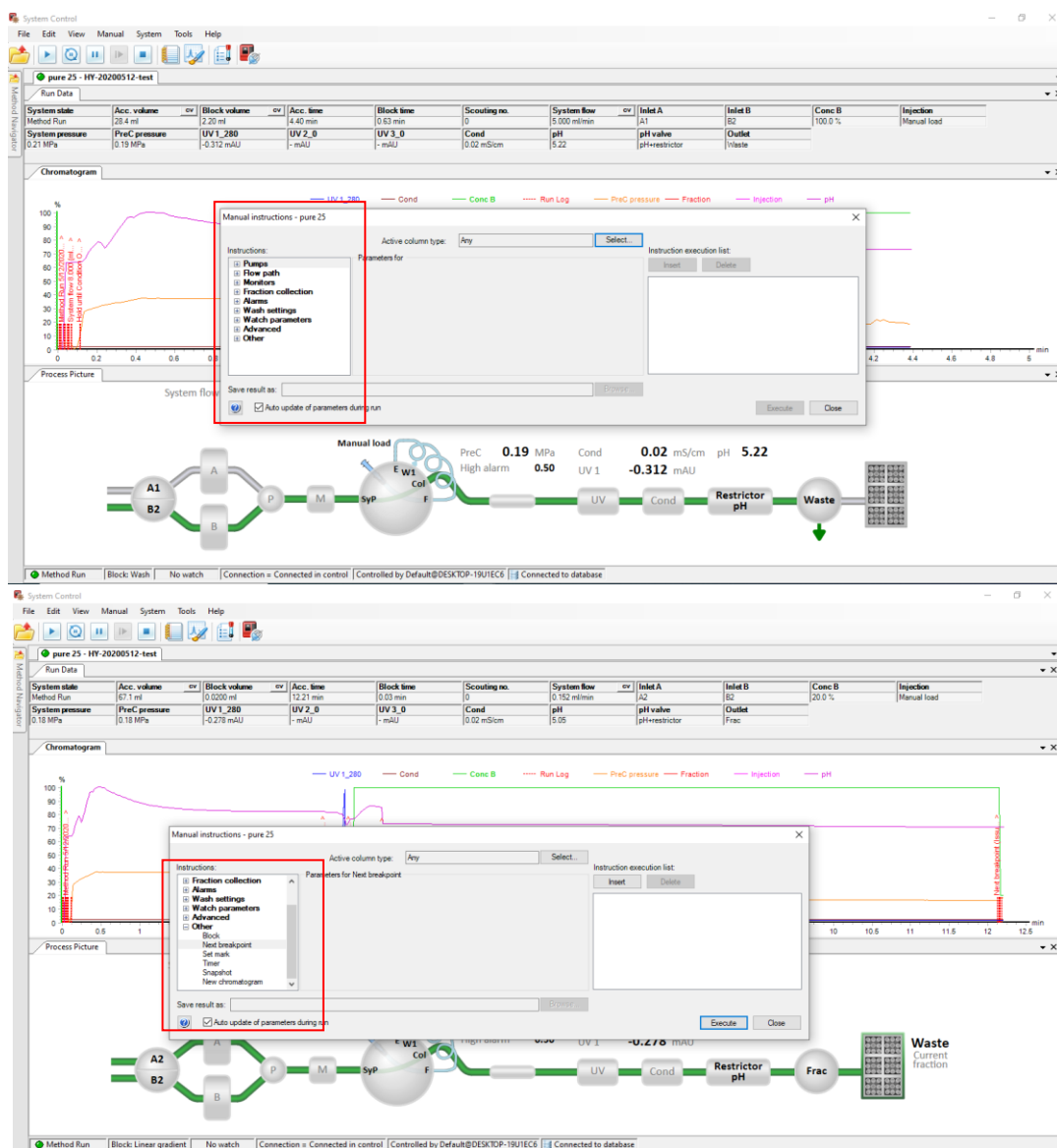


图8.2 手动控制运行进程

6.9 结果查看

运行结束后在Evaluation Classic界面可查看样品的谱图信息。

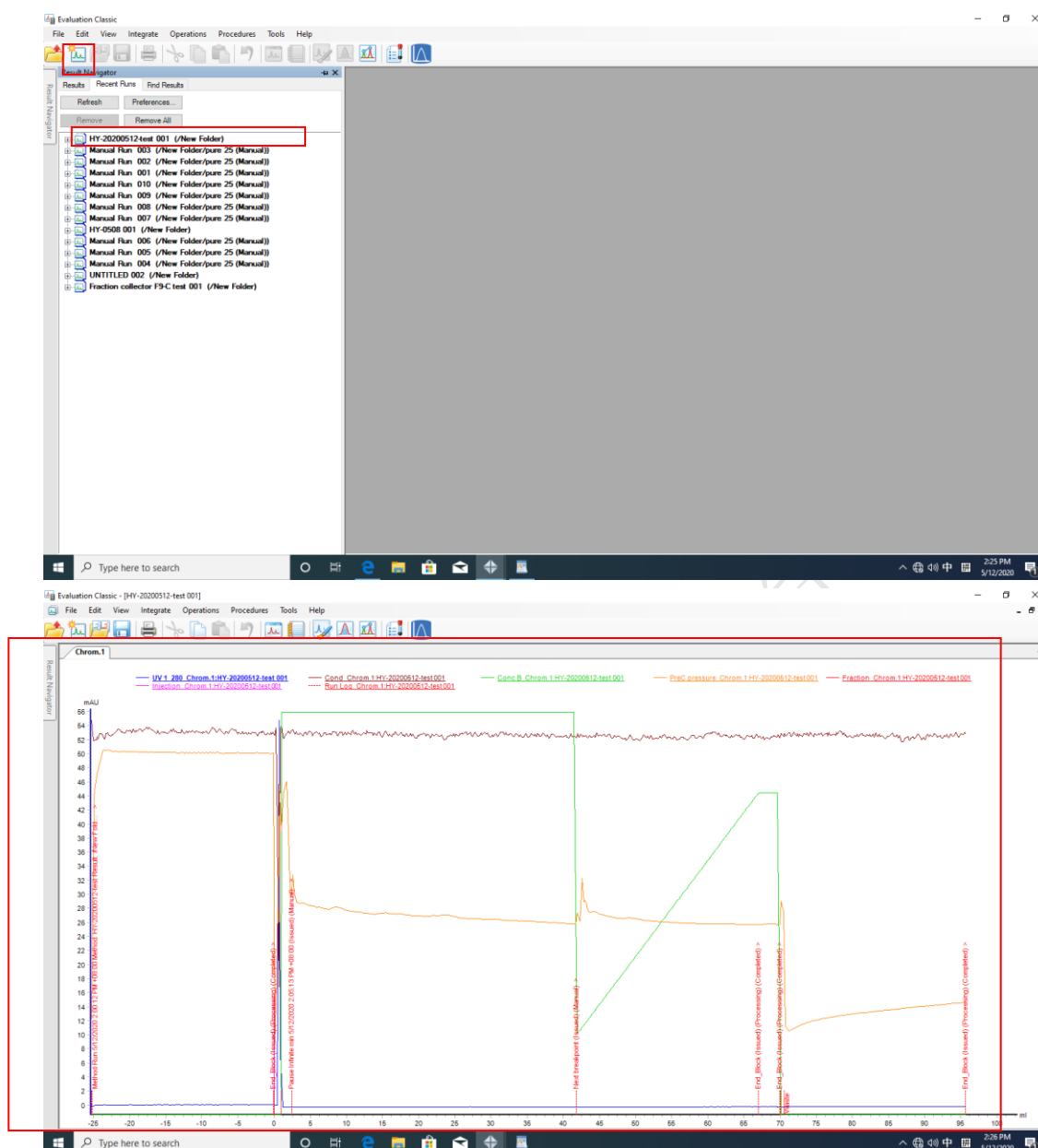


图8.1 结果查看

6.10 实验结束处理

6.10.1 冲洗柱子

实验结束后, 先用2~3倍柱体积纯水冲洗柱子, 再用1倍柱体积20%乙醇冲洗柱子。按照与7.5中安装柱子相反的步骤, 拆下柱子, 将柱子保存在20%乙醇中。

6.10.2 冲洗系统

拆下柱子以后, 先用0.1M NaOH溶液冲洗系统, 将系统置换到NaOH体系后, 将流速设置为0, 使整个系统在NaOH系统中保持1小时。然后用水冲洗系统置换NaOH溶液, 最后用20%乙醇冲洗系统, 使整个系统保存在20%乙醇中。

注意：实验结束后，整个系统必须保存在20%乙醇体系中。

6.10.3 样品收集

实验结束后，打开方形收集器，取出收集架，取走纯化后的样品。

6.10.4 实验结束，关闭系统界面，在使用记录本上登记仪器使用信息。

注意：由于冷室开启，仪器及电脑禁止关闭！

7. 相关/支撑性文件

Q/WU FLHR001 文件编写规范

8. 记录

蛋白纯化仪使用登记表

分子科学公共实验平台

色质谱实验室仪器使用记录							仪器名： <u>蛋白纯化仪（KATA PURE25）</u>			
日期 月.日	使用人	课题组 导师	检测方式（√）		开始时间	结束时间	文件数据存储路径	仪器状态		备注
			送样	自主				正常	报错	
										</

**请注意：使用前先检查谱仪状况，一切正常方可操作；一旦开始实验，默认为使用前谱仪状况良好；使用过程中出现故障须立即联系技术员；测试后请及时取回样品。