

# ÄKTA pure 操作教程

<b>1. 新装 Unicorn 软件的基本设置</b> .....	<b>4</b>
1.1 系统设置.....	4
1.2 新建用户及权限设置 .....	6
1.2.1 新建用户 .....	6
1.2.2 设置用户权限.....	7
1.3 系统默认参数设置 .....	7
1.4 校正.....	8
<b>2. UNICORN 软件的使用</b> .....	<b>11</b>
2.1 开机.....	11
2.2 实验前的准备 .....	12
2.2.1 缓冲液准备 .....	12
2.2.2 泵头抽气.....	12
2.2.3 泵冲洗 .....	13
2.2.4 安装柱子 .....	14
2.3 采用手动命令进行层析实验操作 .....	16
2.3.1 平衡 .....	16
2.3.2 上样 .....	19
2.3.3 设置组分的收集方式 .....	21
2.3.4 洗脱.....	24
2.3.5 其他命令 .....	25
2.4 方法编辑.....	31
2.5 结果分析.....	44
2.5.1 打开结果.....	44
2.5.2 层析结果的显示设置 .....	47

2.5.3 显示 Vertical marker 及显示设置参考点 .....	50
2.5.4 更改横坐标显示类型 .....	51
2.5.5 结果积分处理 .....	52
2.5.6 生成层析报告 .....	58
2.5.7 结果比对 .....	59
2.5.8 结果注释 .....	63
2.5.9 结果分析 .....	63
2.5.10 结果导出 .....	75
<b>3. 实验操作 .....</b>	<b>79</b>
3.1 使用脱盐柱进行蛋白缓冲液的置换 .....	79
3.1.1 实验目的 .....	79
3.1.2 实验材料 .....	79
3.1.3 实验准备 .....	79
3.1.4 准备收集器 .....	82
3.1.5 运行实验 .....	82
3.1.6 结果分析与讨论 .....	85
3.1.7 清洗与储存 .....	85
3.2 离子交换层析实验 .....	87
3.2.1 实验目的 .....	87
3.2.2 实验材料 .....	87
3.2.3 实验准备 .....	87
3.2.4 方法编辑 .....	91
3.2.5 运行实验 .....	96
3.2.6 结果分析与讨论 .....	97
3.2.7 清洗与储存 .....	98
3.3 应用亲和层析纯化 His 标签蛋白 .....	100
3.3.1 实验目的 .....	100

3.3.2 实验材料.....	100
3.3.3 实验准备.....	100
3.3.4 方法编辑.....	103
3.3.5 运行实验.....	109
3.3.6 结果分析与讨论.....	109
3.3.7 清洗与储存.....	110

## I. 培训目的

本教材是为不熟悉 UNICORN™ 6 软件和 ÄKTApure 新装机用户培训而编写，您可以在本教材中学到 UNICORN 6 控制软件的基础知识以及如何通过 UNICORN 6 来控制 ÄKTApure 系统。

通过本次培训您将掌握以下方面的内容：

- 掌握 ÄKTApure 的硬件操作，包括开机、关机及系统维护
- 通过手动命令完成层析实验
- 通过方法编辑设置自动运行的程序
- 基本的结果处理

## II. 培训准备

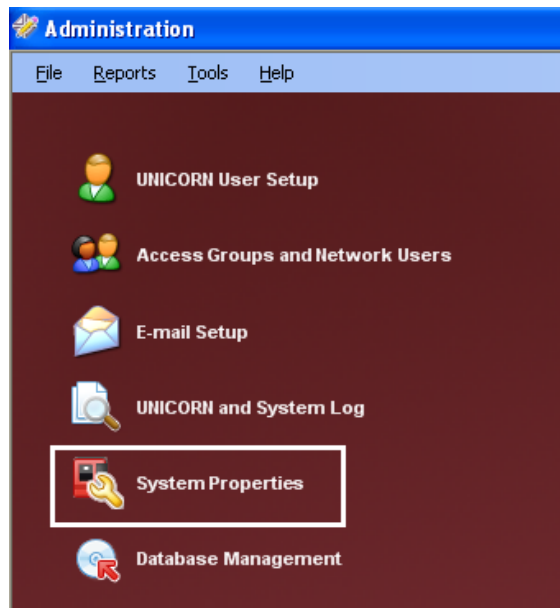
- 仪器设备: ÄKTApure 设备以及安装有 UNICORN 6 的电脑
- 缓冲液准备：在培训中用到的各种溶液都要经过 0.22 µm 滤膜过滤，且通过真空抽滤或超声（至少 15 min）除去气泡
- 样品准备：经 0.22 µm 针头滤器过滤以去除颗粒性物质

## III. 培训内容

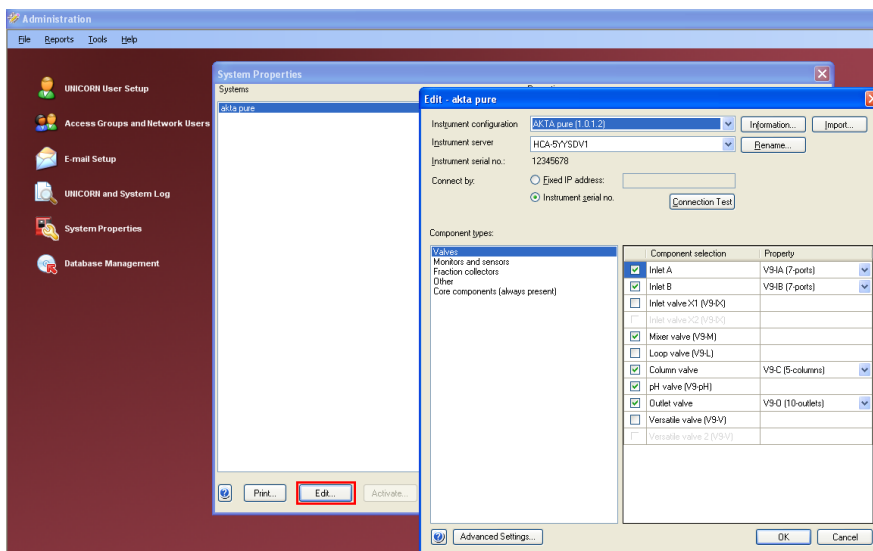
### 1. 新装 Unicorn 软件的基本设置

#### 1.1 系统设置

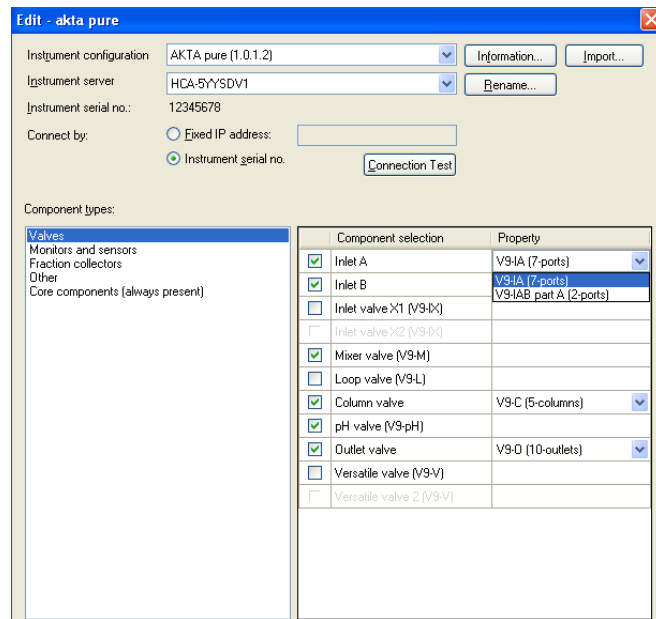
新安装 UNICORN 6 软件后，需要根据 ÄKTApure 的硬件配置在软件中将相应的硬件选择或删除。在 Administration 窗口中点击 System Properties



选中已连接的系统，并点击下侧 Edit 按钮



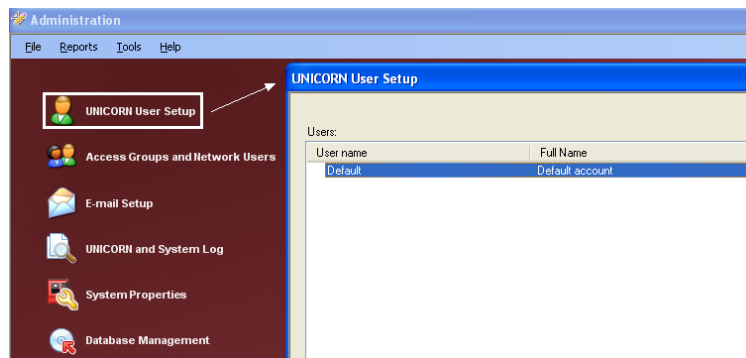
在跳出的编辑对话框左侧选择组件类型“Component types”，根据 ÄKTApure 的硬件配置，在右侧选定相应的组件，然后点击 OK 即可使 UNICORN 6 软件识别 ÄKTApure 相应的硬件。在硬件升级需要添加组件或者需要减少硬件组件时也需要在此处进行设置。



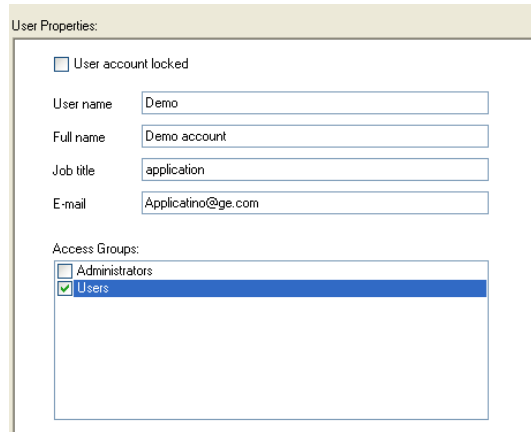
## 1.2 新建用户及权限设置

### 1.2.1 新建用户

在 Administration 窗口中选择 UNICORN User Setup

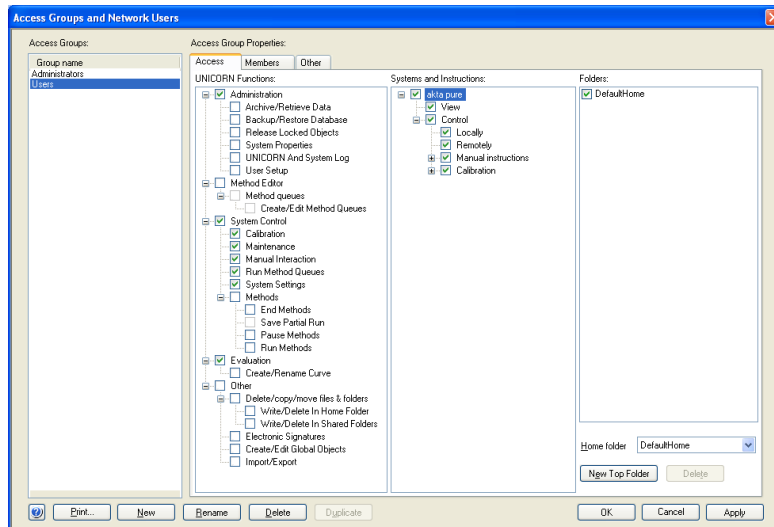


在跳出的对话框中选择 New，在右侧 User Properties 一栏中输入用户名、职位、E-mail，为该用户选择所属的用户组，点击 OK 创建该用户。软件向注册的 E-mail 发送注册信，确认后即可成功新建用户。



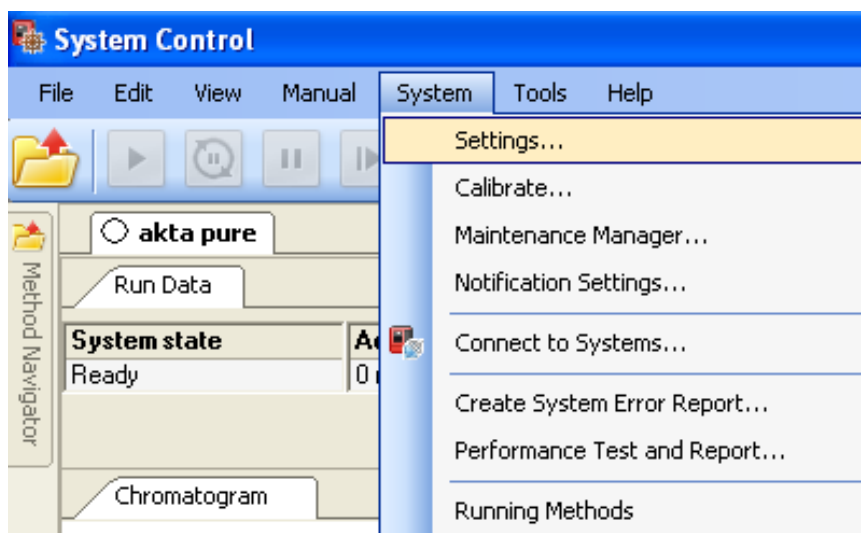
### 1.2.2 设置用户权限

- 1) 点击 Administration 窗口中 Access Groups and Network Users , 在弹出的窗口中可以设置各用户组的权限或新建用户组
- 2) 在 Access Groups 中选中要编辑的用户组名称 , 在右侧指定该用户组能够打开的操作窗口、能够控制的硬件设备以及文件存储位置 , 点击 OK 保存设置

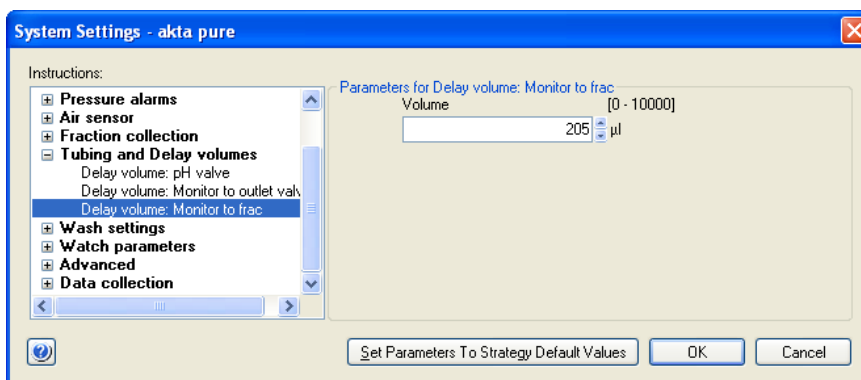


### 1.3 系统默认参数设置

为了方便使用，系统的操作和检测参数已经进行了默认设置，一般情况下不需修改；如果需要对系统默认参数进行修改，可以进入 System Control 窗口，在 System 下拉菜单中选择 Settings

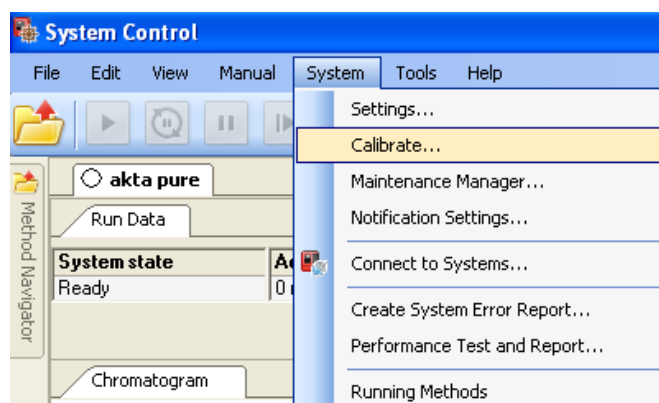


在弹出的对话框中设置各种开机默认参数，譬如报警参数以及检测器参数。如果更换了系统标配的管线，需要重新测量检测器之后的延迟体积，并把这个体积输入到 Delay volume 输入框中，点击 OK 保存并退出



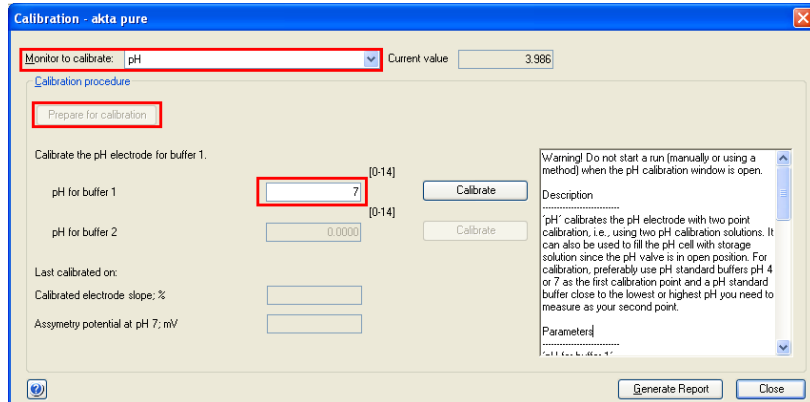
#### 1.4 校正

如果需要对各种检测器（pH、电导、压力）进行校正，请在 System Control 窗口中的 System 下拉菜单中选择 Calibrate





- 1) 如果需要校正 pH 探头，在 Monitor to calibrate 下拉框中选择 pH，点击下边的 Prepare for calibration 并在 pH for buffer 1 一栏中输入标准液 1 的 pH 值

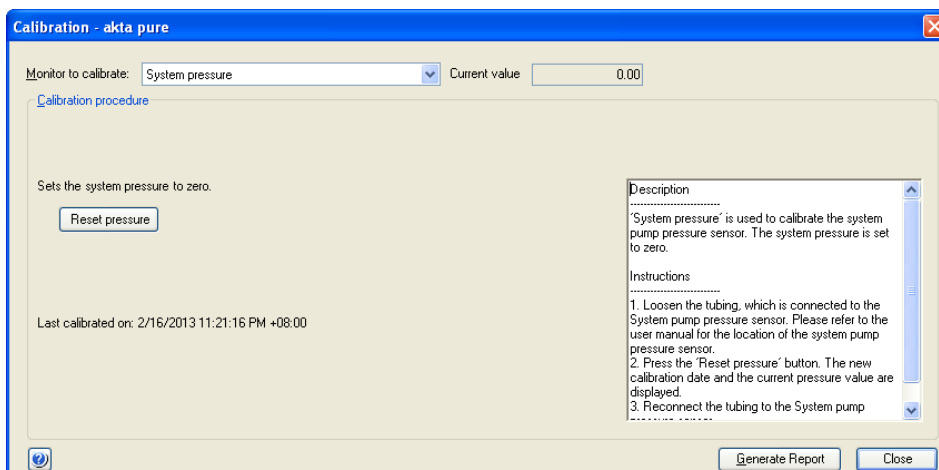


使用注射器向 pH 阀中注入约 10 ml pH 标准液 1，待 Current value 读数稳定后点击 Calibrate，然后向 pH 阀中注入去离子水对其进行清洗

在 pH for buffer 2 一栏中输入标准液 2 的 pH 值，使用注射器向 pH 阀中注入约 10 ml pH 标准液 2，待 Current value 读数稳定后点击 Calibrate

slope 和 asymmetry 反应了电极的状态，如果 slope > 80% 且 asymmetry 在  $\pm 60$  mV 范围内，则电极状态良好，否则需要对电极进行清洗或更换

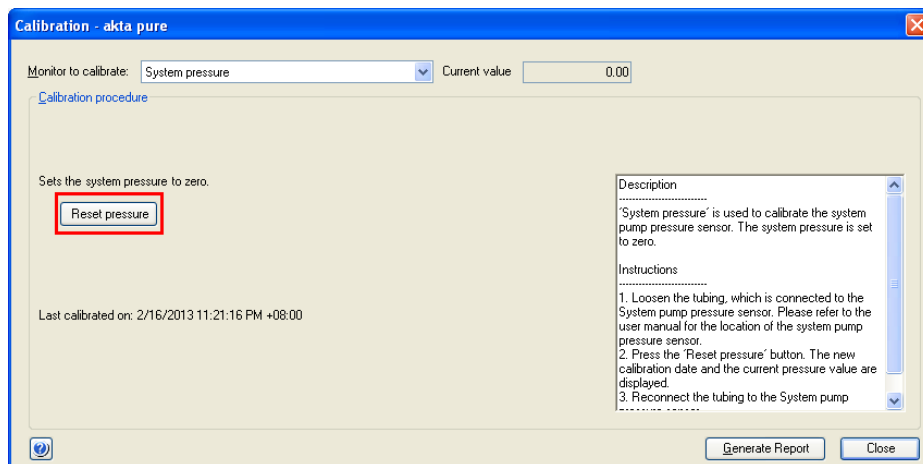
- 2) 如果发现层析系统的压力检测不准确（譬如在没有流速的情况下仍然显示有一定的压力），需要对压力感受器进行校正，在 Monitor to calibrate 下拉框中选择 System pressure



将泵头抽气旋钮拧松，确保压力感受器不受任何压力



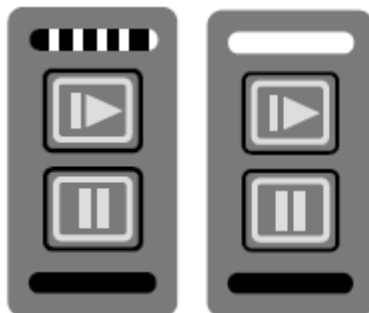
点击 Reset pressure 对压力进行归零



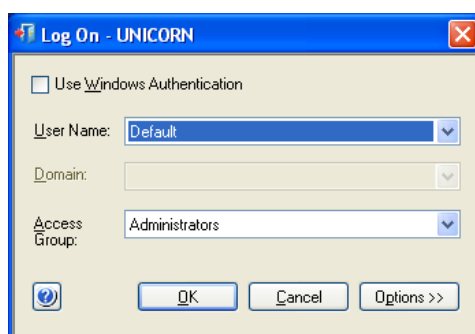
## 2. UNICORN 软件的使用

### 2.1 开机

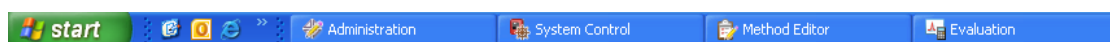
- 1) 先打开 ÄKTApure 电源，当控制面板上的 Power 灯稳定不再闪烁时打开电脑，双击电脑桌面上的 UNICORN 6 图标打开软件



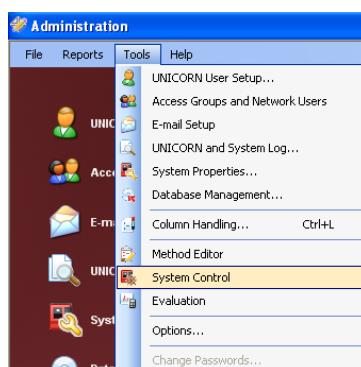
- 2) 选择用户，输入密码（如果进行了设置），点击 OK 进入软件



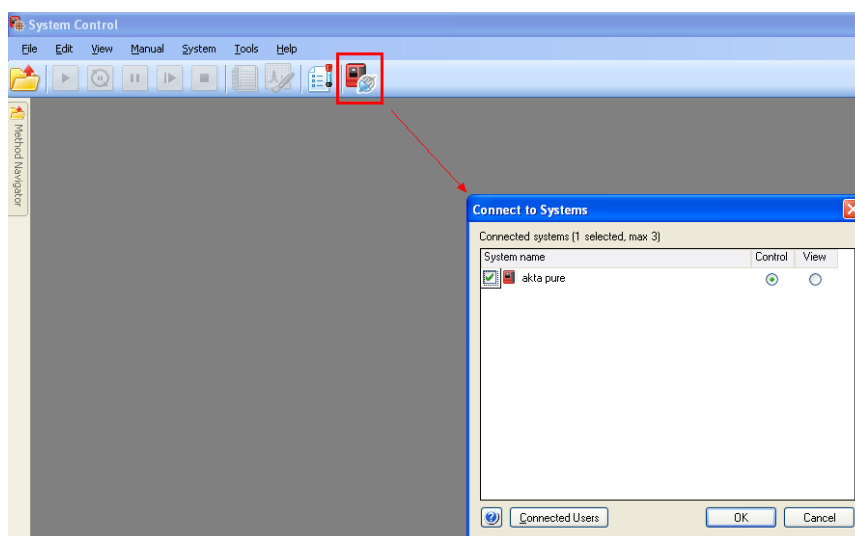
- 3) 在任务栏中将出现四个软件窗口，单击系统控制（System Control）



如果 System Control 窗口没有自动弹出，可在任意打开的窗口中点击 Tools > System Control 打开



- 4) 进入 System Control 窗口，点击 Connect to Systems，在弹出的对话框中选中已连接的系统名称，点击 OK 确认连接



## 2.2 实验前的准备

### 2.2.1 缓冲液准备

所有层析用的缓冲液及样品都需要用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤，并对缓冲液进行脱气处理（如超声波脱气或者负压脱气）

### 2.2.2 泵头抽气

如果缓冲液进口管是空的或者有太多气泡，此时需要手动排气。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。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

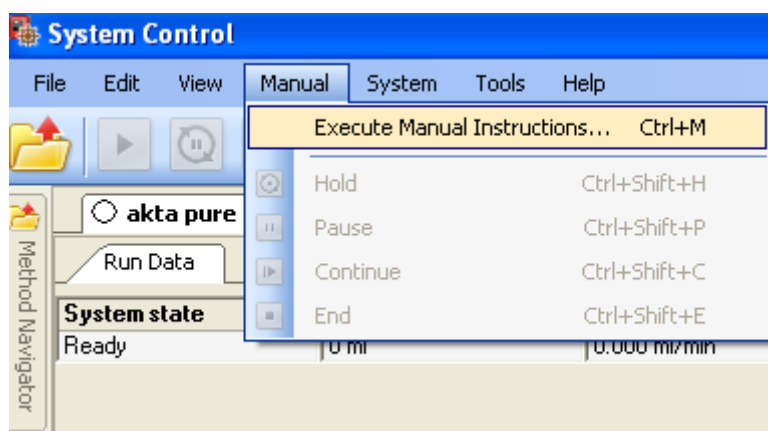


### 2.2.3 泵冲洗

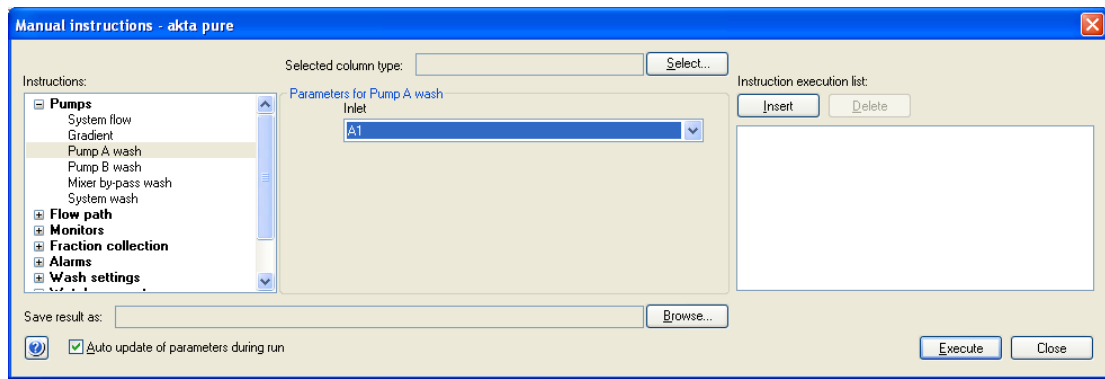
- 1) 将进口管转移到缓冲液中：将缓冲液进口管从 20%乙醇保护液中转移到相应的缓冲液瓶中。如果是凝胶过滤通常只需要使用一种缓冲液，而亲和层析、离子交换等吸附性层析则通常需要两种或更多的缓冲液。如果缓冲液含高盐，建议先将进口管转移到去离子水中进行泵冲洗，然后再转移到相应缓冲液瓶中再进行泵冲洗



- 2) 在 System Control 界面的 Manual 下拉菜单中选择 Execute Manual Instructions

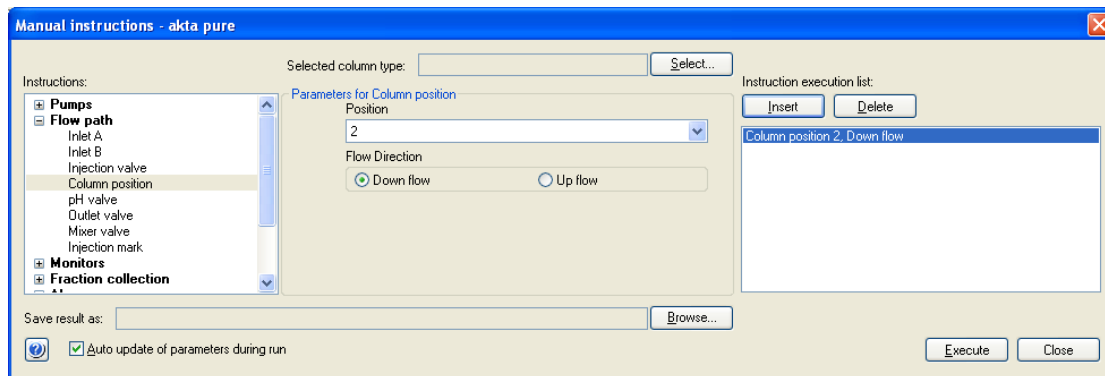


- 3) 在跳出的 Manual instructions 窗口中，选择 Pumps > Pump A wash，选择需要冲洗的缓冲液入口，点击 Execute，进行泵的自动冲洗

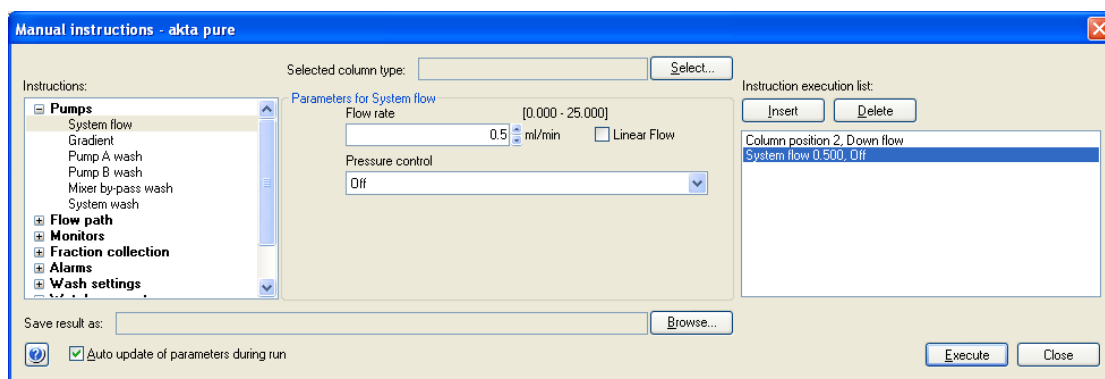


## 2.2.4 安装柱子

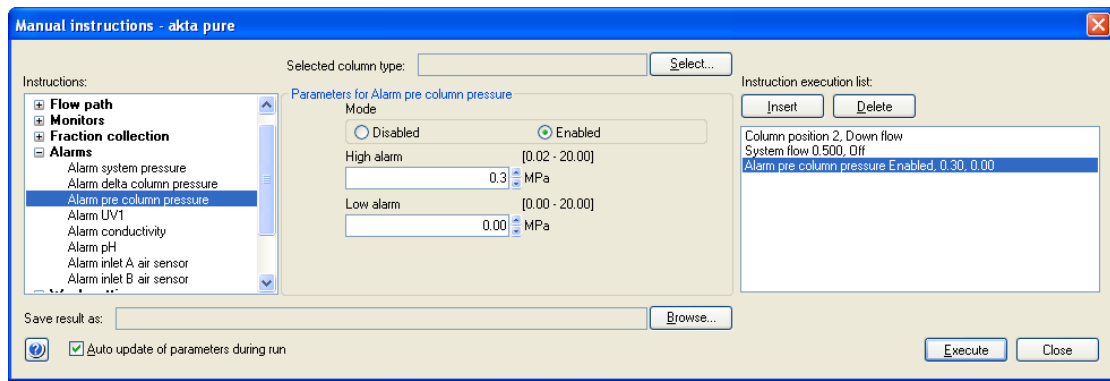
- 1) 在 Flow path 命令组中选择 Column position，在 Position 下拉框中选择柱子需要连接的位置，在 Flow Direction 复选框中选择溶液流向，点击 Insert



- 2) 在 Pumps 命令组中选择 System flow，在 Flow rate 一栏中输入一个较小的流速如 0.5- 1 ml/min，点击 Insert



- 3) 在 Alarms 命令组中选择 Alarm pre column pressure，根据所使用柱子的耐受压设置 High alarm，如 0.3 MPa，点击 Insert。点击 Execute 后将执行插入的所有命令



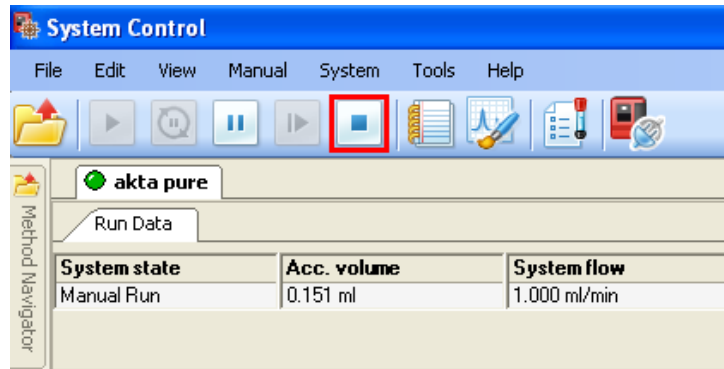
- 4) 在柱位阀的相应位置上连接一根 PEEK 管，待 PEEK 管的出口有持续液体流出时，除去层析柱的上堵头，将层析柱柱头与连接管出口相连，但不要拧紧，因为此时出口尚未打开



- 5) 除去层析柱下堵头，并将层析柱出口连接到柱位阀的相应位置上，然后拧紧上接头



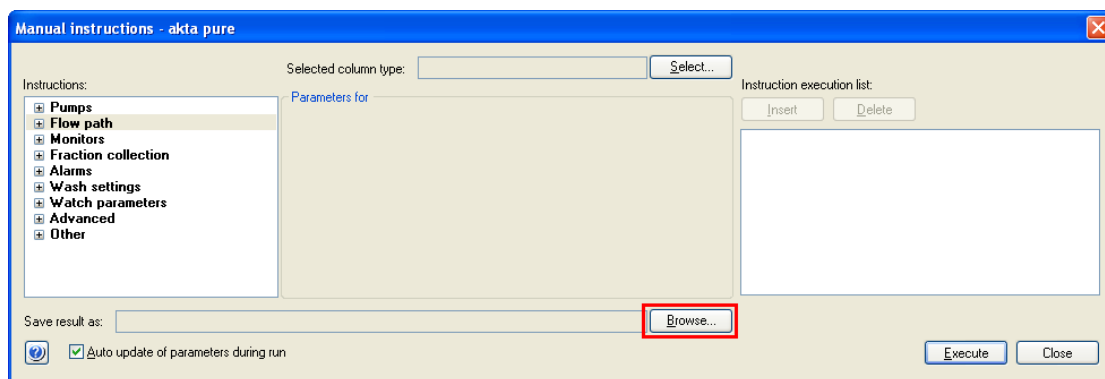
- 6) 点击 end，完成准备工作



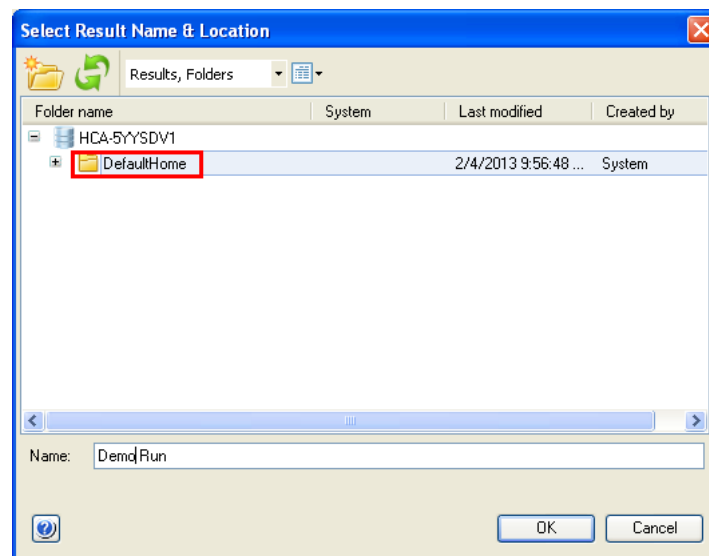
## 2.3 采用手动命令进行层析实验操作

### 2.3.1 平衡

- 1) 为了完整保存手动命令运行结果，在 Manual instruction 界面中选择 Save result as 后的 Browse 按钮

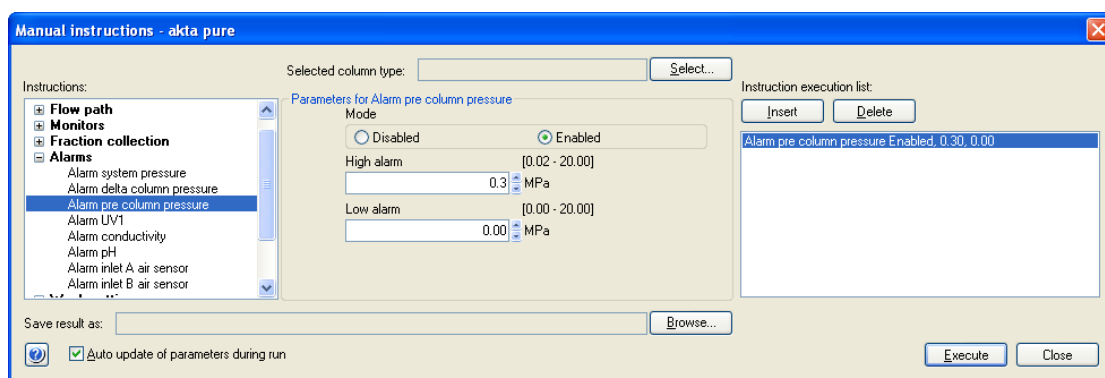


选择保存的路径，输入结果文件名，点击 OK 即可

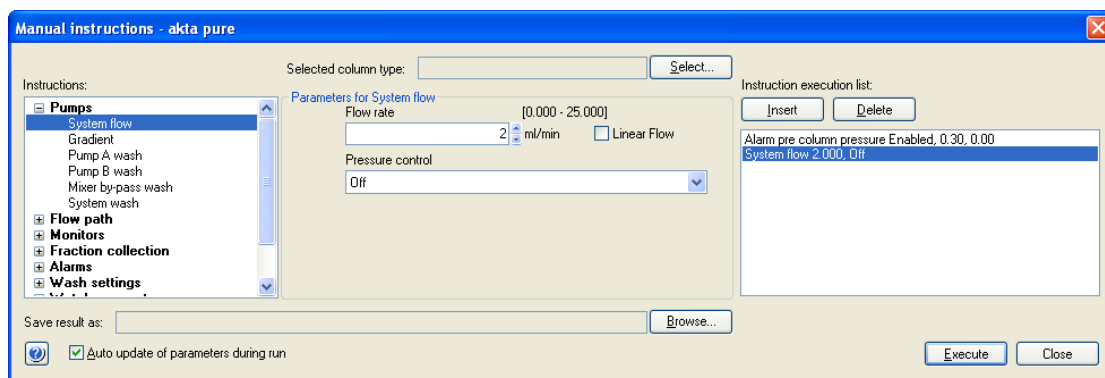




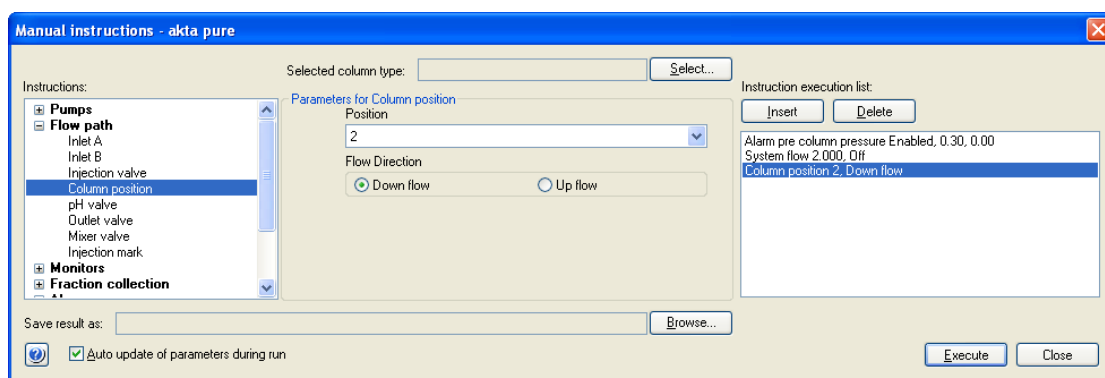
- 2) 检查缓冲液入口是否在合适的溶液中，在 Alarm pre column pressure 命令输入框中输入高压报警值，譬如 0.3 MPa，点击 Insert 插入命令



- 3) 在 Pumps 命令组中的 System flow 命令的输入框中输入层析柱的平衡流速，点击 Insert

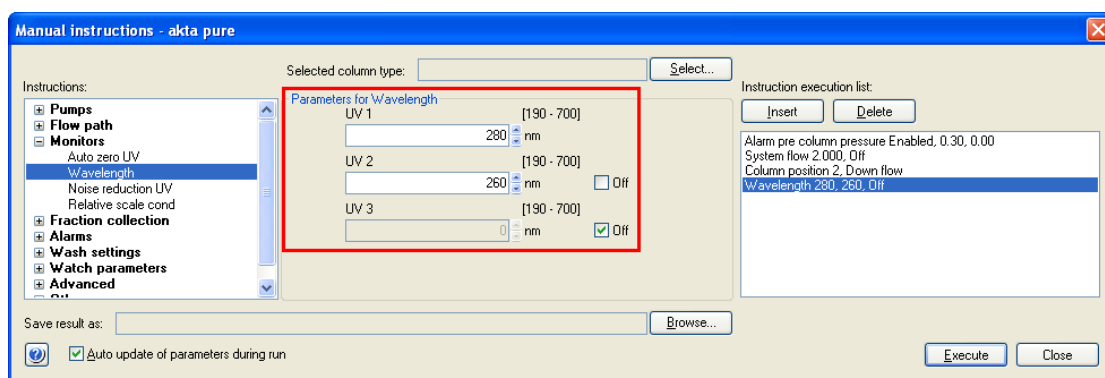


- 4) 在 Flow path 命令组中的 Column position 下选择层析柱位置及液流方向，点击 Insert 插入命令

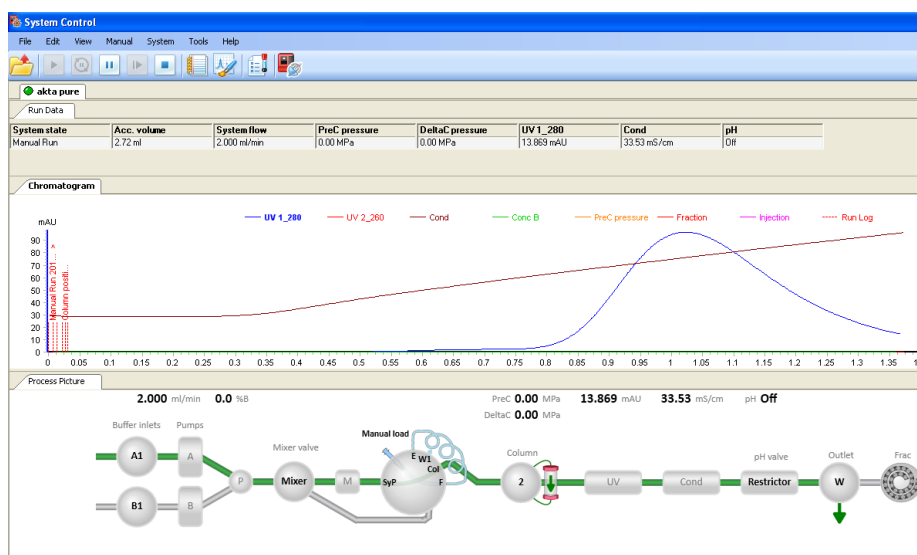


- 5) 如果检测器默认的三个检测波长不是自己需要的，可进入 Monitors 命令组在 Wavelength 命令的输入框中输入您需要的波长，并且可以

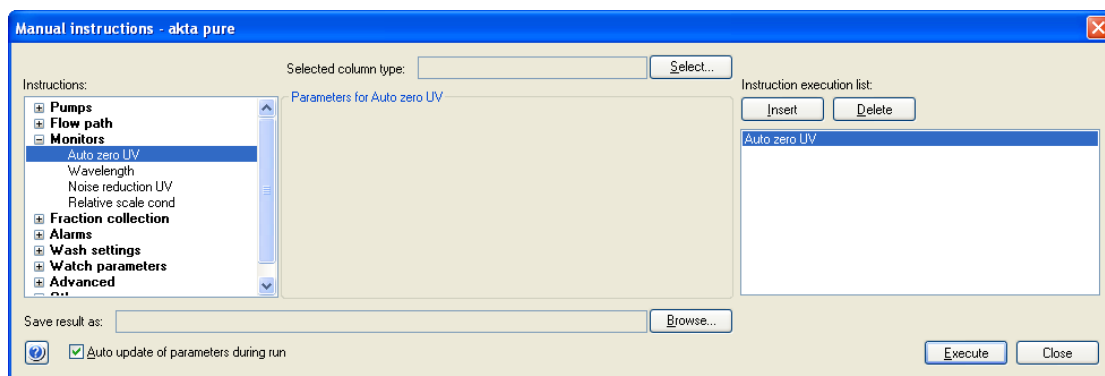
通过选定 UV2 和 UV3 后面的 Off 复选框来关闭这两个波长，点击 Insert 插入命令



6) 点击 Execute 执行所有插入的命令，系统开始对层析柱进行平衡



7) 在层析柱平衡完成时，上样前通常还会做一个紫外调零的动作。在 Monitors 命令组中选择 Auto zero UV，点击 Execute 执行

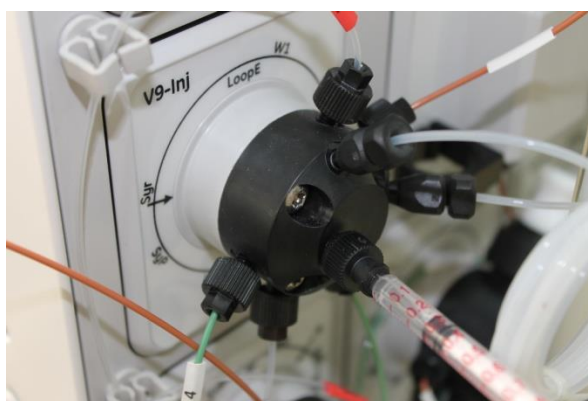


## 2.3.2 上样

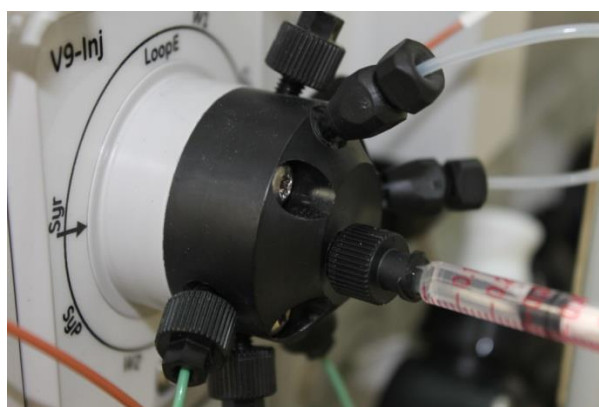
根据上样体积的大小，可以有 3 种上样方式:

### 2.3.2.1 使用样品环上样（上样体积 5ml 以内）

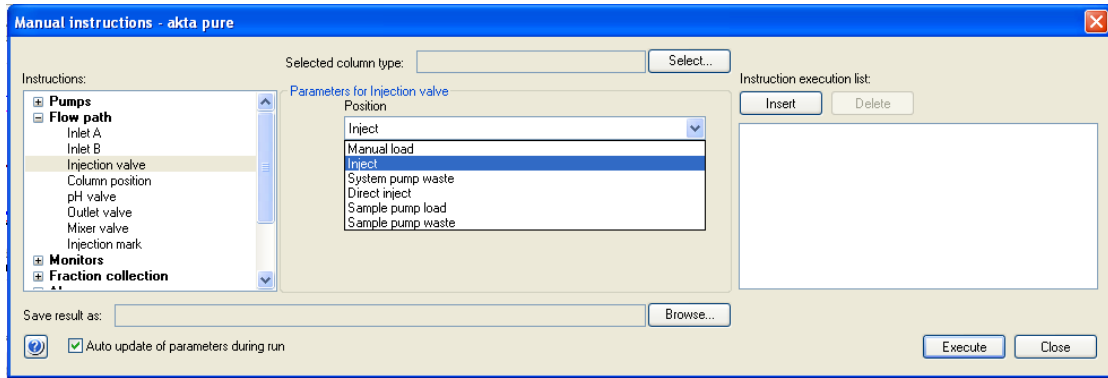
- 1) 将合适的样品环连接于上样阀的 LoopF 与 LoopE 口上，用注射器抽取平衡缓冲液，从 Syr 上样口推入，冲洗样品环



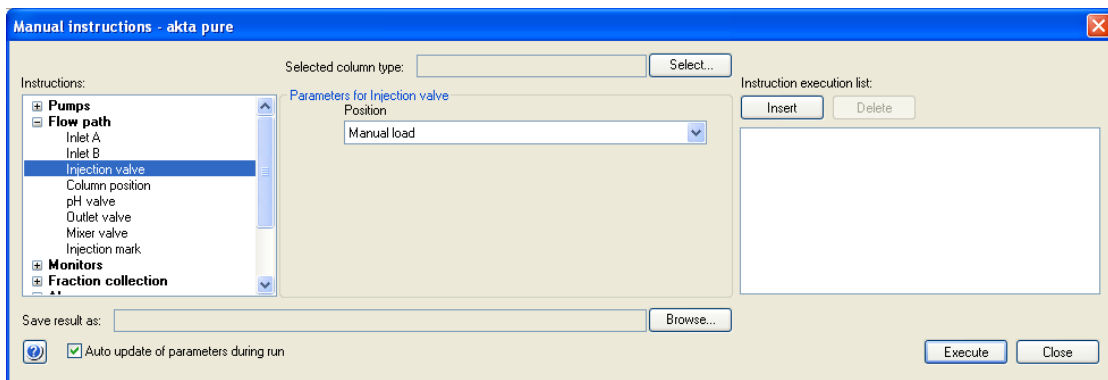
- 2) 用注射器吸取稍大于样品环体积的样品，将注射器内的样品从 Syr 口推入，注意不要将气泡推入样品环



- 3) 在 Flow path 命令组中的 Injection valve 中选择 Inject，按 Execute 执行



- 4) 待上样完成后（完全上样通常需 2 倍以上样品环容积的缓冲液流过），将上样阀状态切换为 Manual load，点击 Execute 执行，完成上样

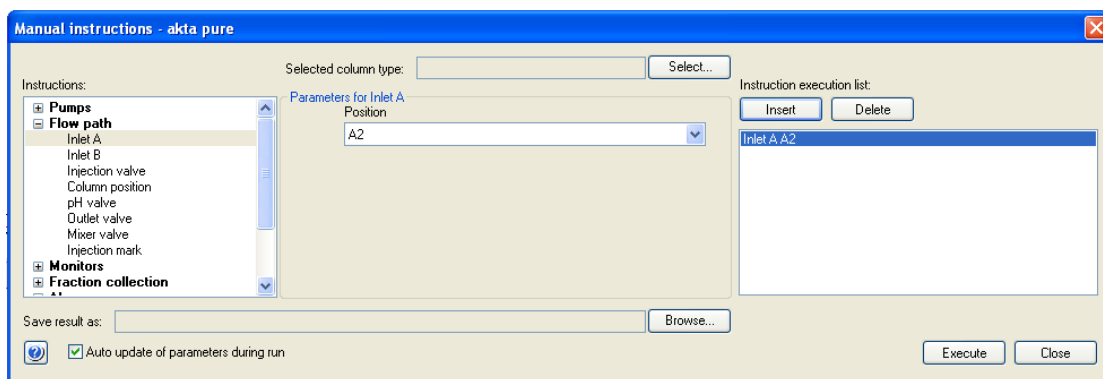


### 2.3.2.2 使用 Superloop 上样（适合上样体积 1 ml 至 150 ml）

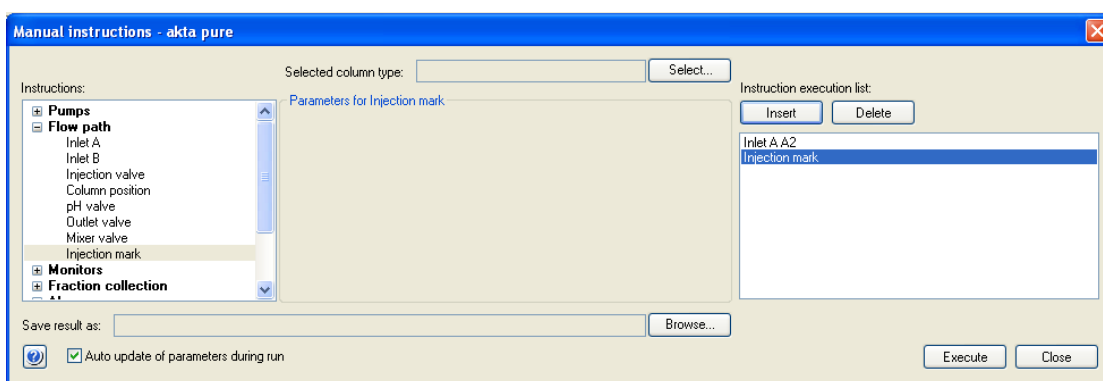
- 1) 将 Superloop 连接于上样阀上，注意 Superloop 的上端连接到上样阀的 LoopE 位置，下端连接到 LoopF 位置
- 2) 从 Syr 口打入样品，将样品阀状态改为 Inject 开始上样，通过 Superloop 上的刻度计算上样体积，当 Superloop 内的活塞达到预定刻度时，将样品阀的位置改为 Manual load，完成上样

### 2.3.2.3 用系统泵上样（适合上样体积大于 100 ml）

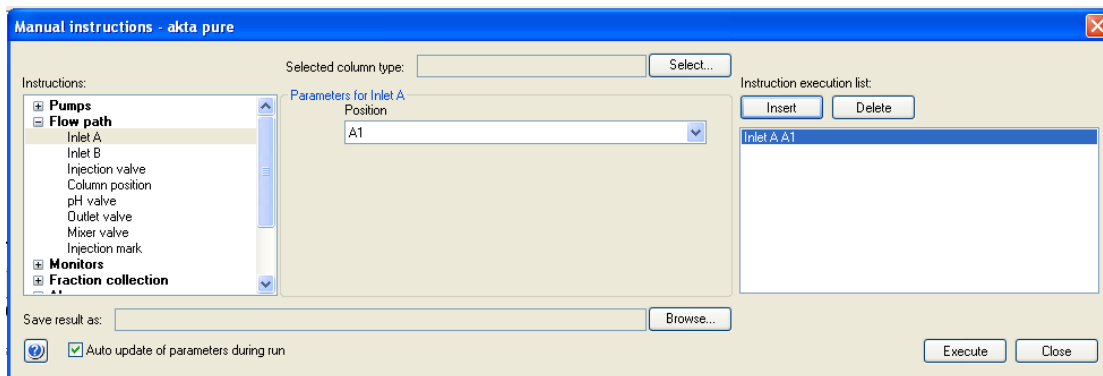
- 1) 首先使用平衡缓冲液泵洗 A2 入口，然后将 A2 缓冲液进口管放入样品中，确保进口管中没有气泡，在 Flow path 命令组中的 Inlet A 命令中选择 A2 点击 Insert



2) 插入 Flow path 命令组中的 Injection mark，点击 Execute 执行，样品就会由 A2 进口管进入层析柱



3) 达到预计的样品体积时，将 A 泵进口管再更改为 A1，就完成了上样

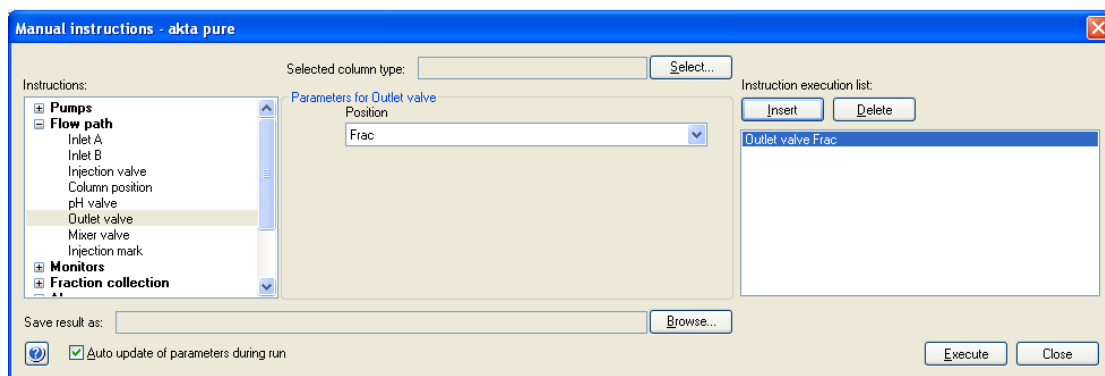


### 2.3.3 设置组分的收集方式

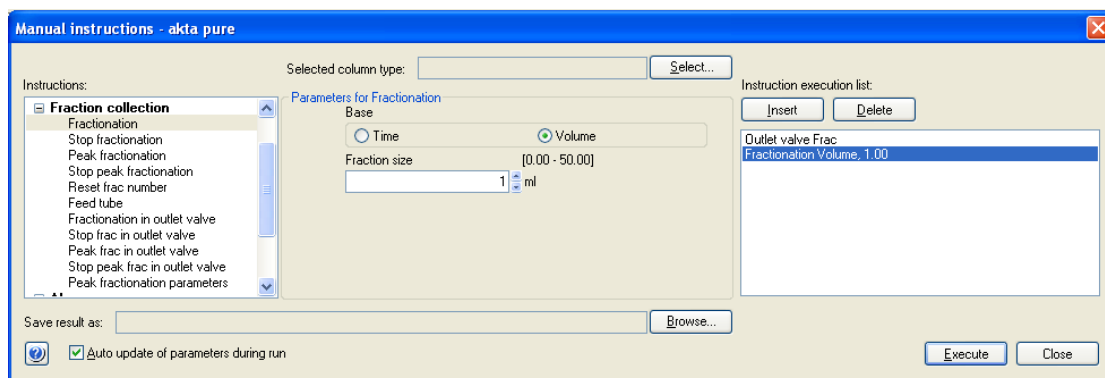
组分的收集可以采用组分收集器收集，也可以采用出口阀收集。采用组分收集器收集可以分为固定体积收集和按峰收集

### 2.3.3.1 固定体积收集

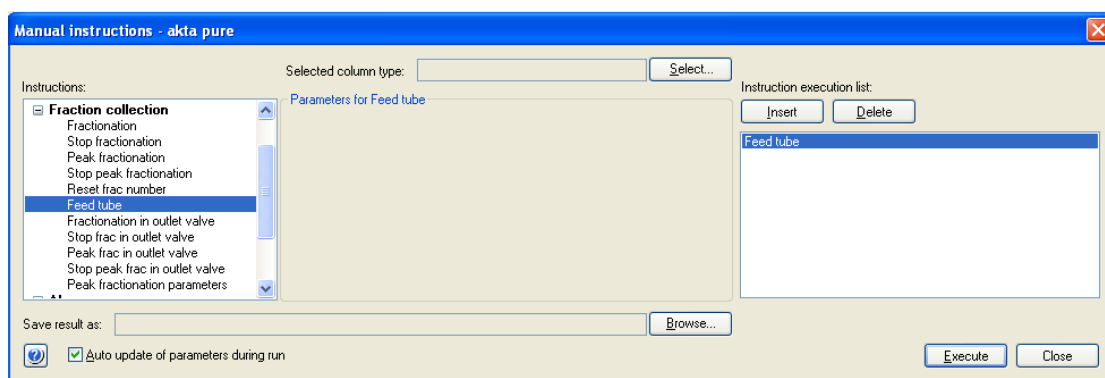
- 1) 在 Flow path 命令组中将出口阀 Outlet valve 的位置由 Waste 改为 Frac



- 2) 在 Fraction collection 命令组中的手动收集命令 Fractionation 中设置每管收集的体积 (或时间) Fraction size, 点击 Execute 执行



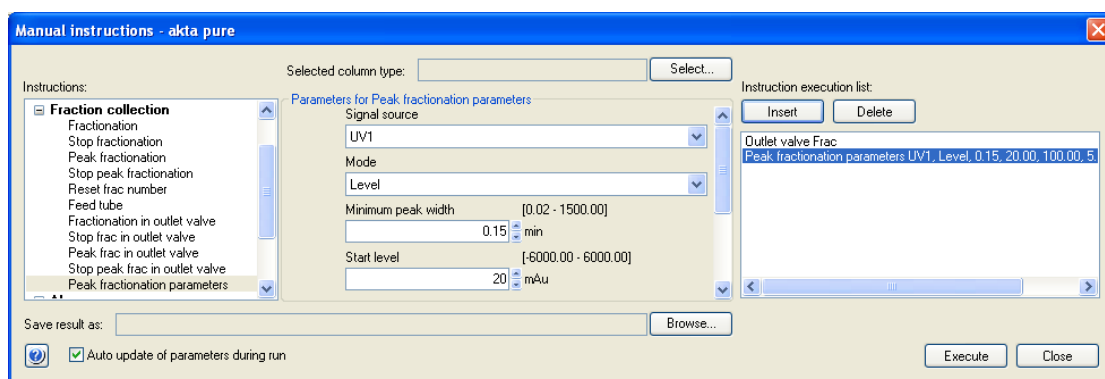
当收集的样品还没有达到设定的体积，而需要换到下一管时，可以执行 Feed tube 命令进行跳管



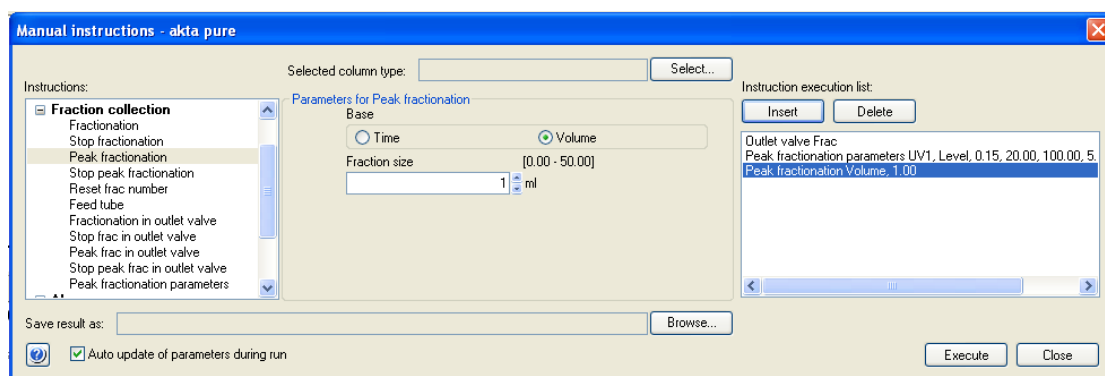
- 3) 当需要停止收集时，执行 Stop fractionation 命令或者在 Fraction size 中输入 0，点击 Execute 执行

### 2.3.3.2 按峰收集

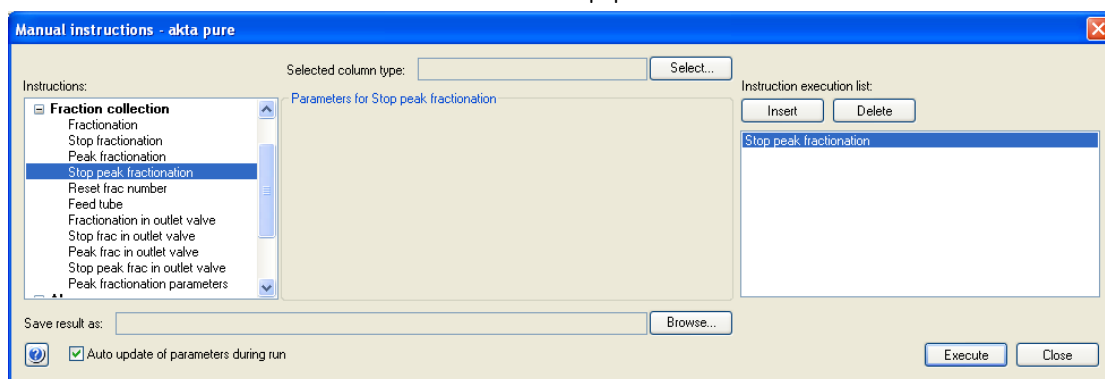
- 1) 首先需要设定峰的判断标准，在 Peak fractionation parameters 命令中选择 Signal source 为 UV1 ( 或者其它 )，Mode 选择为 Level ( 或者 slope )，在 Start level 输入框中输入峰的判断标准，一旦紫外吸收值达到设定值就会触发组分收集器进行收集



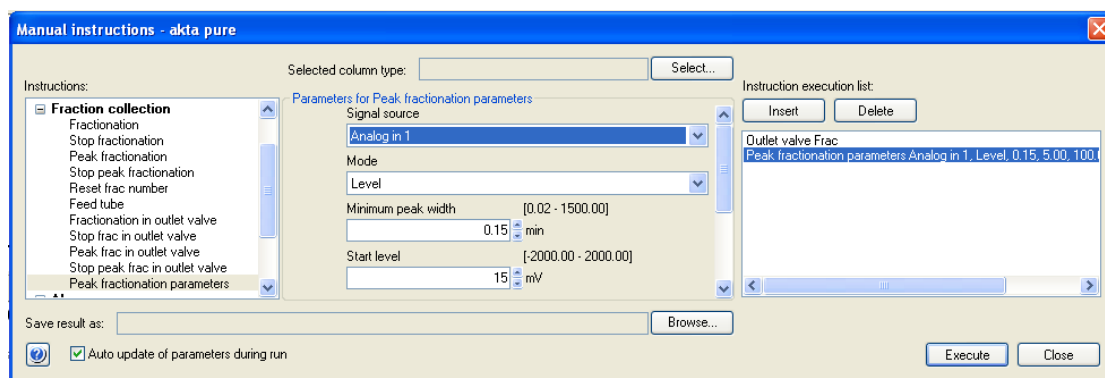
- 2) 在 Peak fractionation 命令中输入 Fraction size，点击 Insert，后点击 Execute 执行



- 3) 需要停止峰收集的时候执行 Stop peak fractionation

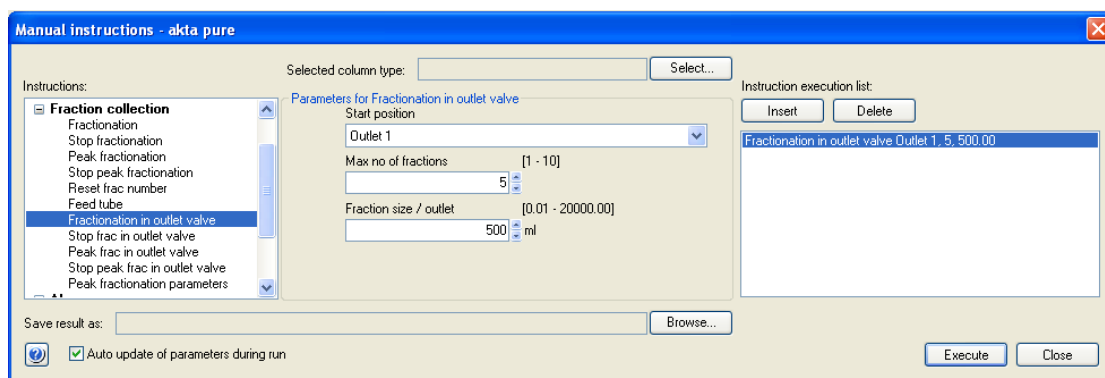


- 4) 如果希望按照外接检测器（譬如视差检测器）的吸收峰来进行峰收集，在选择判断峰的标准时需要选择 Fraction collection > Peak fractionation parameters > Signal source > Analog in 1, 在 Start level 中输入临界电压值来启动峰收集



### 2.3.3.3 使用出口阀进行大体积收集

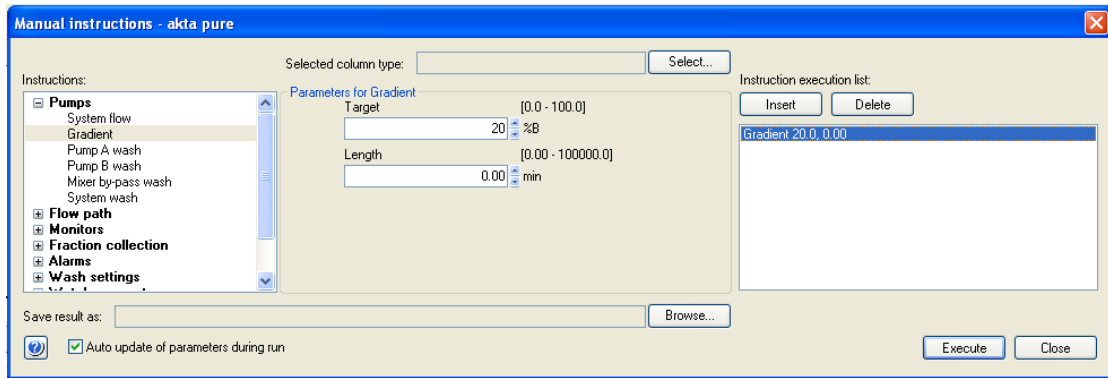
除了 Frac 和 Waste 位置外，出口阀 V9-O 还有 10 个出口，都可以用来进行不同组分的大体积收集。在 Fraction collection > Fractionation in outlet valve 命令中选择 Start position，并输入收集的组分数以及每个组分的收集体积，点击 Execute 执行



### 2.3.4 洗脱

对于吸附性层析往往需要改变洗脱液的洗脱强度来实现分离，这就需要在洗脱时 A、B 泵相互配合来实现。在 Pumps 命令组中的 Gradient 中输入目标洗脱缓冲液的比例，如果是阶段梯度洗脱在 Length 中输入 0 min，B 的比例立即达到设定值；如果需要线性梯度洗脱，在 Length 中输入时间，洗脱液将会在设定的时间内逐渐达到设定的比例

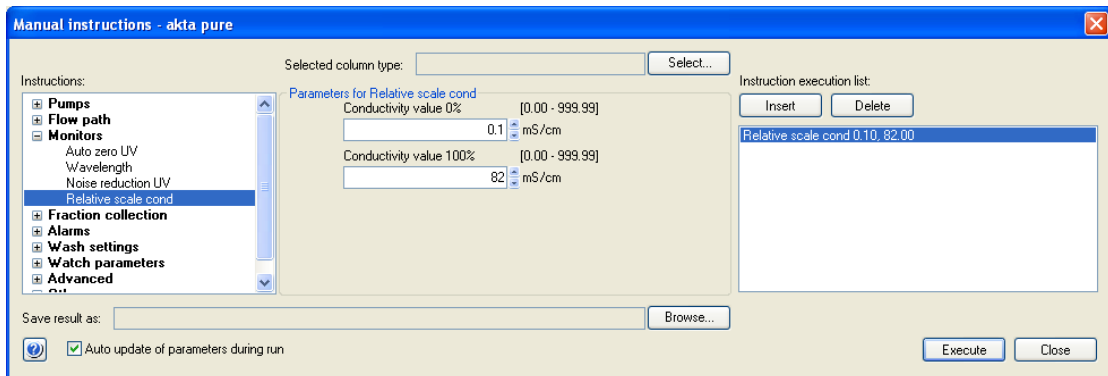




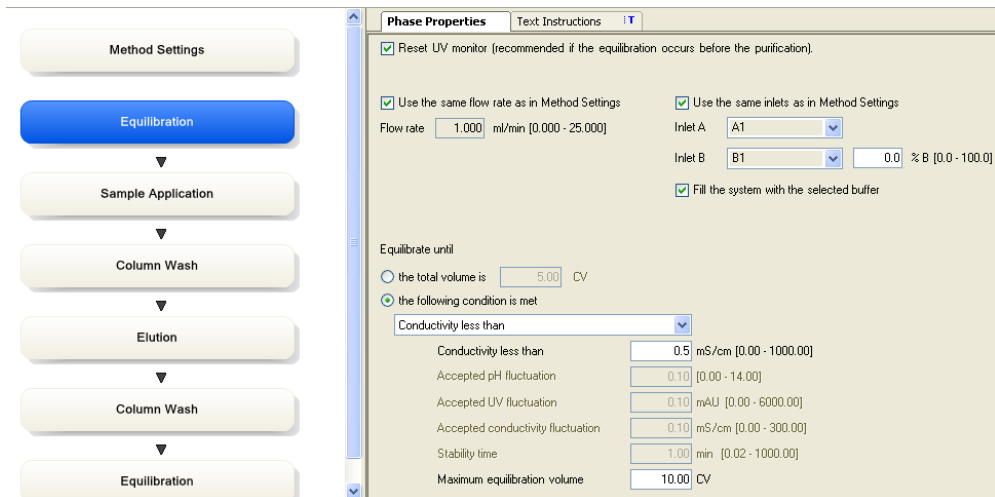
## 2.3.5 其他命令

### 2.3.5.1 关于手动命令中的一些其他命令

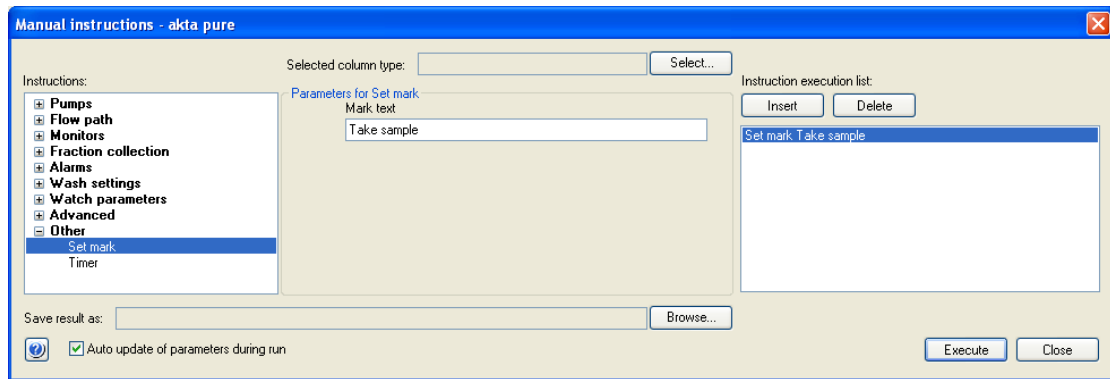
- 1) Monitors > Relative scale cond 命令中 Conductivity value 0% 和 Conductivity value 100%: 在离子交换中将平衡液的电导率值输入到 Conductivity value 0% 的输入框中，将洗脱液的电导率值输入到 Conductivity value 100% 的输入框中，这样就可以根据 Cond% 曲线所显示的数值来判断那一时刻从层析柱流出的液体中洗脱液所占的比例



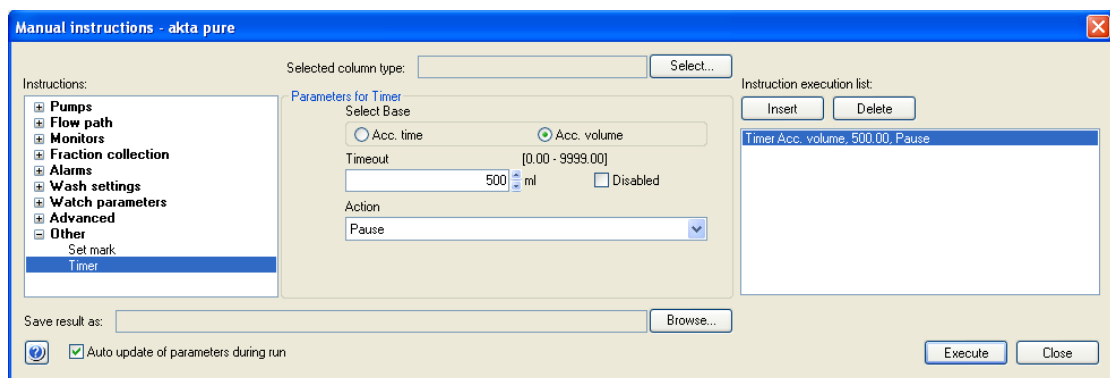
- 2) Watch Parameters 这一设置的前提是在方法编程中使用了 Conductivity less than 或者 Stable pH 这类功能做为触发下一操作点的判断标准



- 3) 在层析实验过程中随时可以根据需要使用 Other > Set mark 命令在图谱中添加标记

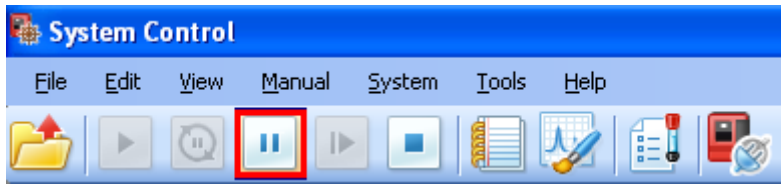


- 4) 如果希望系统过一段时间或者体积后能自动暂停或停止，可以使用 Other > Timer 命令，选择判断标准为时间或者体积，在输入框中输入数值，选择后续的操作为 Pause 或 End，点击 Execute 执行

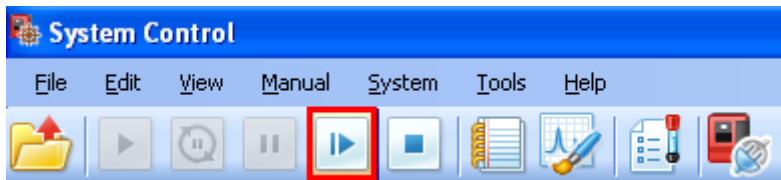


### 2.3.5.2 工具栏中的命令

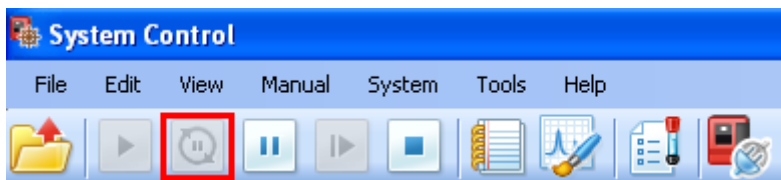
- 1) 在层析实验过程中可以通过点击工具栏中的 Pause 按钮让系统暂停



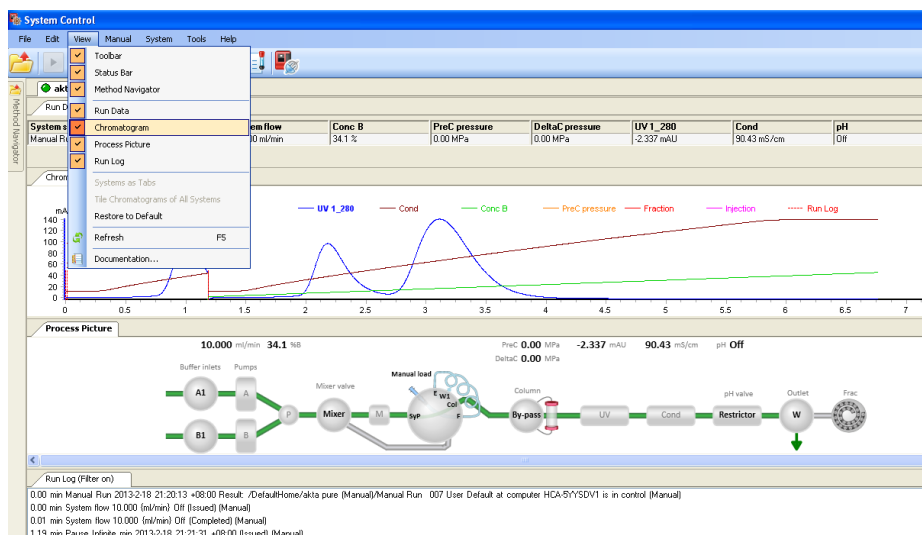
点击 Continue，继续



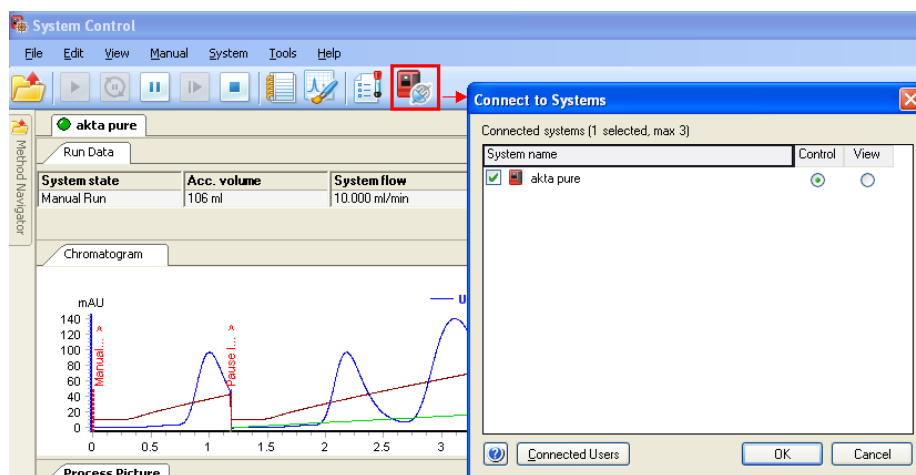
2) Hold 只有在运行自动程序时起作用，点击 Hold，系统将维持现有状态运行，直至点击 Continue 后继续运行后续程序



3) 系统控制窗口有四个窗格组成，窗格的相对大小可以通过拖动边界线来实现，并且可以有选择的显示窗格

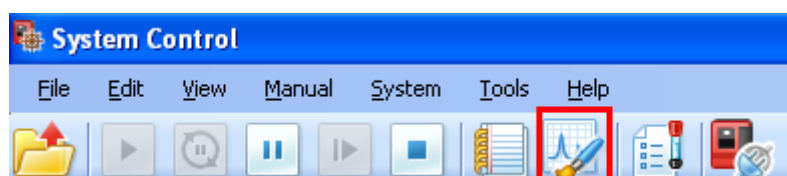


4) 如果需要断开该 ÄKTA 与计算机之间的连接可以点击断开连接按钮

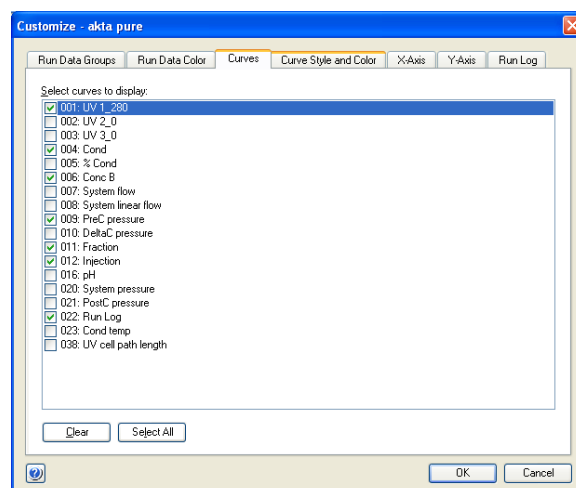


### 2.3.5.3 系统属性选项卡

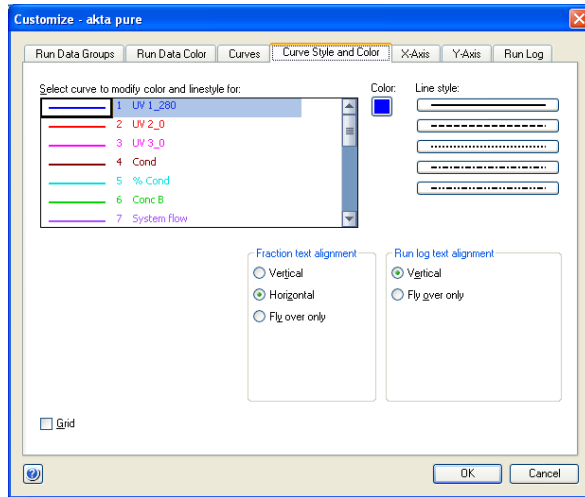
- 1) 点击工具栏中的属性按钮



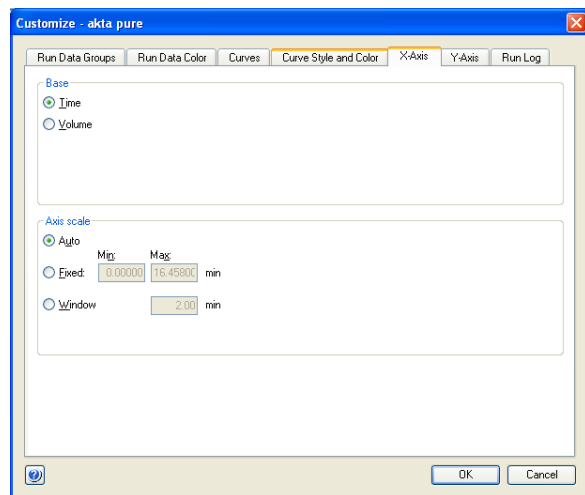
- 2) 启动属性选项卡，在曲线选项卡中可以调整在曲线窗口中显示的曲线



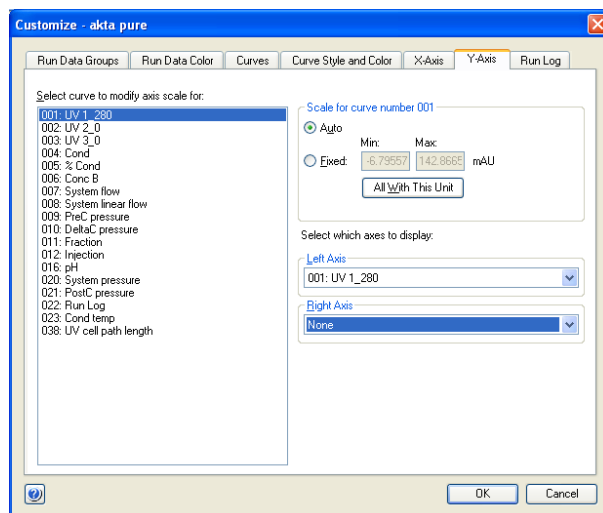
- 3) 在曲线类型和颜色选项卡中选择用哪种颜色和类型的曲线标志哪一个参数



- 4) 在 X 轴选项卡中设置 X 轴是以体积还是时间为显示单位以及固定 X 轴显示范围还是可变 X 轴范围

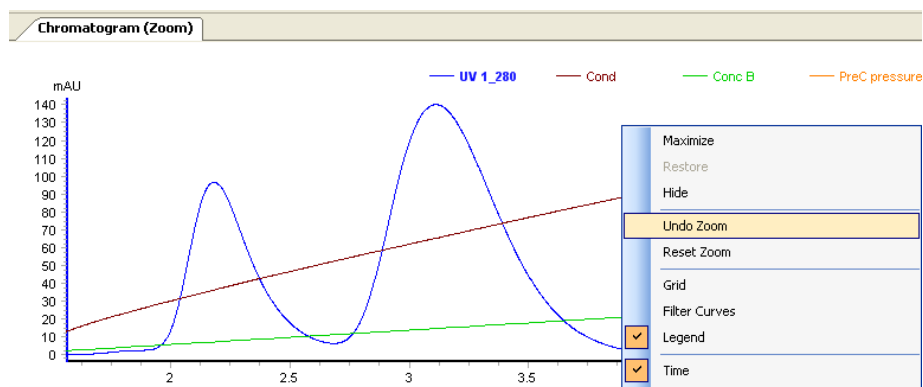


- 5) 在 Y 轴选项卡中可以设置 Y 轴的显示哪一数据以及显示范围

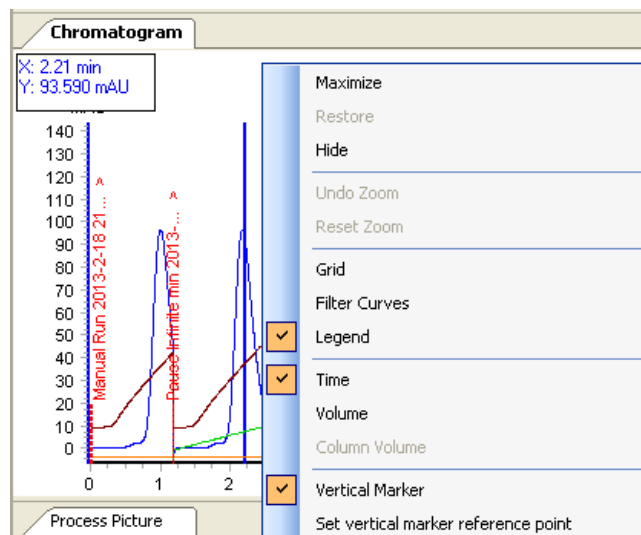


### 2.3.5.4 右键工具

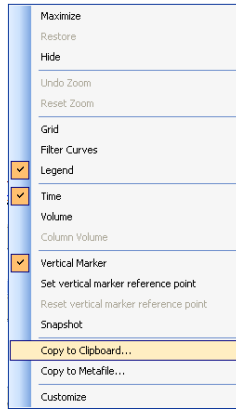
- 1) 在层析过程中，我们可以随时通过框选图谱的某一部分放大图谱，以便观看，如果需要恢复到原来的状态，可以点击右键后在悬浮框中选择 Undo Zoom 或者 Reset Zoom



- 2) 如果需要查看曲线上的某一点的坐标值，可以右键点击后选择 Vertical Marker，图谱中将会出现一条垂直的 Marker，鼠标按住 Mark 进行拖动，在显示框中显示的就是曲线上的坐标值，鼠标点击曲线窗口上部的图例，Marker 就会显示相应曲线上的坐标

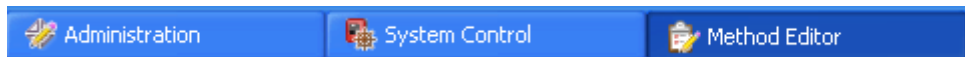


- 3) 右键点击并选择 Copy to Clipboard 可以将现有图谱拷贝到剪切板上，进而可以粘贴到 word 等文档中

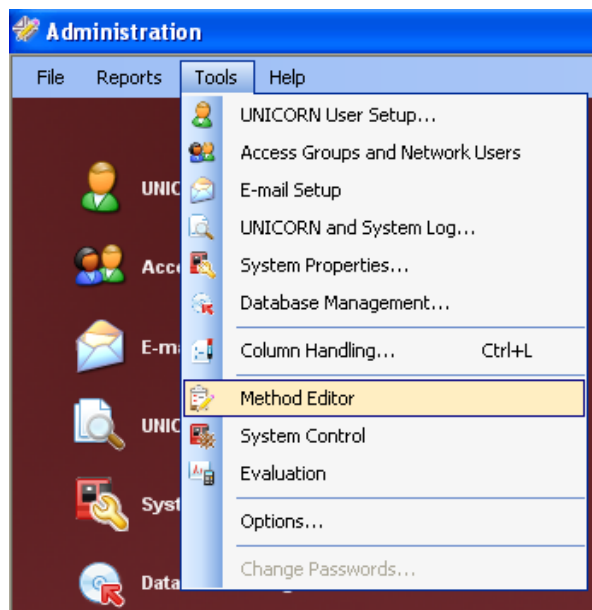


## 2.4 方法编辑

1) 在任务栏中点击进入 Method Editor 窗口



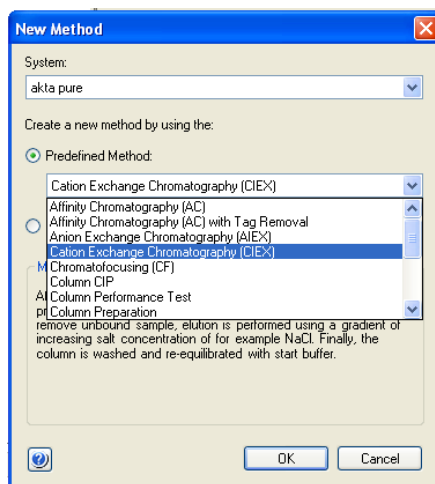
如果任务栏中没有 Method Editor 窗口，可以在任意已打开的 UNICORN 6 窗口中点击 Tools，选择 Method Editor 打开



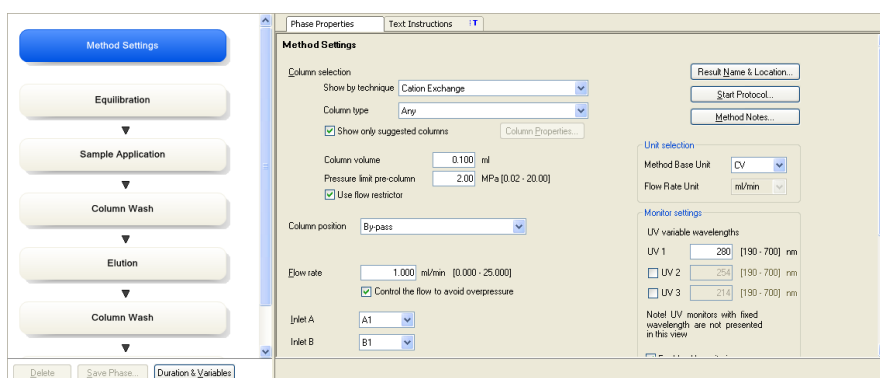
2) 在工具栏中点击 Create a new method，启动方法编程



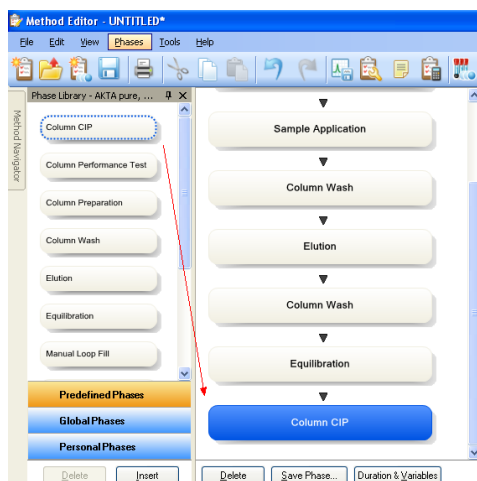
- 3) 在 Predefined Method 下拉框中选择层析实验的类型 Cation Exchange Chromatography (CIEX)，根据原理还包括：亲和层析、阴离子交换、疏水、反相以及凝胶过滤等



- 4) 点击 OK，方法编辑界面中出现预设的 CIEX 层析实验各个阶段及参数

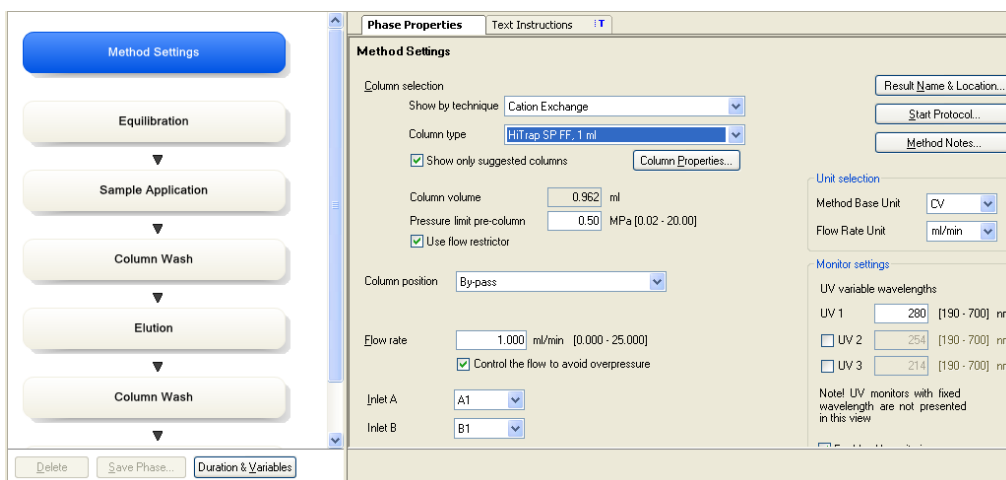


如需添加新的实验阶段，可以从 Predefined Phases 中选中目的操作并拖动到编辑窗口中适当的位置处





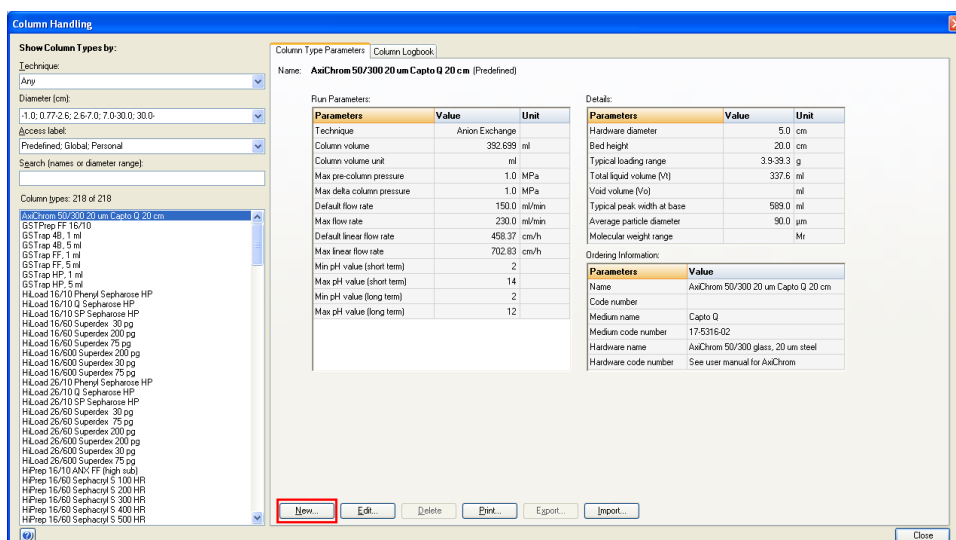
5) 在 Method Settings 编辑界面中，选择实验所用的层析柱 HiTrap SP FF, 1 ml



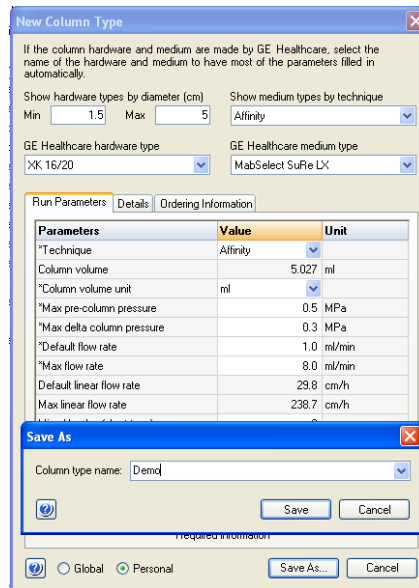
6) 如果在列表中没有您所要使用的柱子，或者您使用的是自行装填的柱子，您可以选择 Any；或者将层析柱的信息先输入到系统中去，输入层析柱信息需要在任意 UNICORN 6 窗口中选择 Column Handling



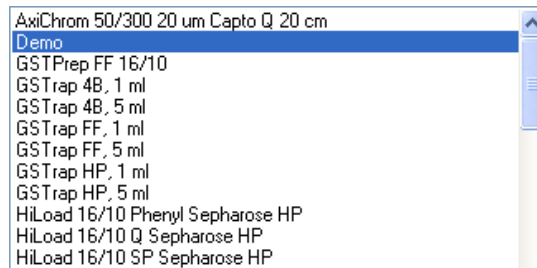
在弹出的柱列表中，点击 New 新建一个信息



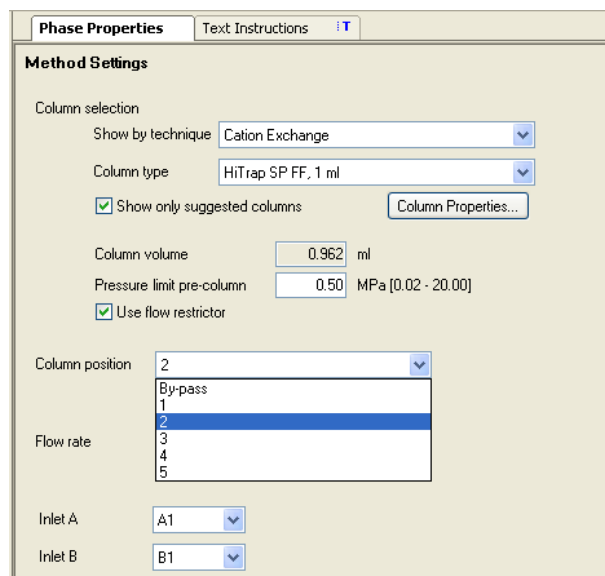
输入层析技术、体积单位、压力、流速、柱高、内径等需要强制输入的内容以及其他可选输入信息后点击 Save as , 输入名称后点击 OK 保存



这样在 Column 列表中就有了所建立的柱子信息



7) 选择柱子连接到柱位阀上的位置以及缓冲液入口



对于选择的预装柱，系统会预设好默认流速，也可以在一定范围内进行修改

- 8) 选择检测的 UV 波长以及是否激活 pH 检测器、A B 缓冲液入口的气泡检测器

Monitor settings

UV variable wavelengths

UV 1  [190 - 700] nm

UV 2  [190 - 700] nm

UV 3  [190 - 700] nm

Note! UV monitors with fixed wavelength are not presented in this view

Enable pH monitoring

Enable air sensor alarm

Inlet A

Inlet B

- 9) 点击 Equilibration 进入平衡阶段设置，输入平衡时缓冲液 B 所占的比例（默认为 0%，有时为了减少非特异性吸附可以用一定比例的 B 缓冲液来平衡），输入平衡体积

Phase Properties Text Instructions IT

Equilibration

Reset UV monitor (recommended if the equilibration occurs before the purification).

Use the same flow rate as in Method Settings

Flow rate  ml/min [0.000 - 25.000]

Use the same inlets as in Method Settings

Inlet A

Inlet B   % B [0.0 - 100.0]

Fill the system with the selected buffer

Equilibrate until

the total volume is  CV

the following condition is met

Conductivity greater than

Conductivity greater than  mS/cm [0.00 - 1000.00]

Accepted pH fluctuation  [0.00 - 14.00]

Accepted UV fluctuation  [0.00 - 1000.00]

Delete Save Phase... Duration & Variables

如果需要监测平衡，还需要输入达到平衡时的判断条件，所设条件得到满足后即结束平衡进入下一实验阶段

Equilibrate until

the total volume is  CV

the following condition is met

Stable UV  mAU [0.00 - 6000.00]

Conductivity greater than  mS/cm [0.00 - 1000.00]

Accepted pH fluctuation  [0.00 - 14.00]

Accepted UV fluctuation  mAU [0.00 - 6000.00]

Accepted conductivity fluctuation  mS/cm [0.00 - 300.00]

Stability time  min [0.02 - 1000.00]

Maximum equilibration volume  CV

10) 点击 Sample Application 进入上样阶段设置，选择上样的方式，如果是采用手动上样（样品环或者 Super loop），请输入清空样品环的体积（该体积如果比样品环的容积小，则输入的体积就是上样体积，如果输入的体积大于样品环的体积，则上样体积为样品环的容积）

Method Settings

Equilibration

**Sample Application**

Column Wash

Elution

Column Wash

Delete Save Phase... Duration & Variables

Phase Properties Text Instructions

**Sample Application**

Use the same flow rate as in Method Settings

Flow rate  ml/min [0.000 - 25.000]

Inject sample from loop

Inject sample directly onto column

Fill the loop using  ml

Loop type

Loop position

Sample inlet

Fill loop with  ml

Empty loop with  ml

Sample volume  ml

Use the same inlets as in Method Settings

Inlet A

Inlet B   %

Fill the system with the selected buffer

Wash sample flow path with buffer

Prime sample inlet with  ml

Wash sample flow path with buffer after sample application.

Note! Buffer inlet A set in Method Settings will be used to wash the sample flow path

11) 如果选择系统泵直接上样，需要选择样品入口，输入上样体积、上样流速，选择是否使用默认进口中的缓冲液冲洗上样流路以及上样后是否使用默认进口中的缓冲液将样品完全冲进去

Phase Properties Text Instructions

**Sample Application**

Use the same flow rate as in Method Settings

Flow rate  ml/min [0.000 - 25.000]

Inject sample from loop

Inject sample directly onto column

Inject all sample using air sensor

Set maximum volume to  ml

Sample inlet

Inject fixed sample volume  ml

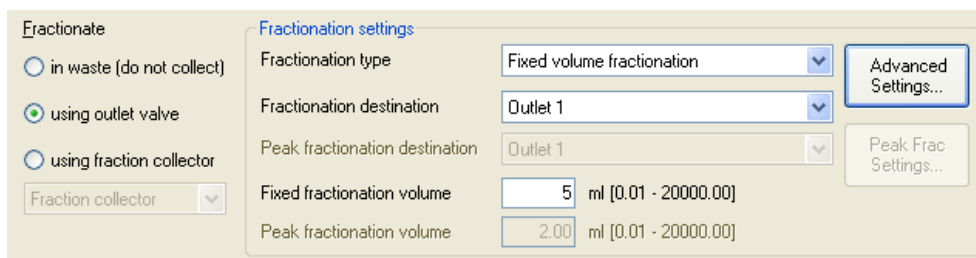
Wash sample flow path with buffer

Prime sample inlet with  ml

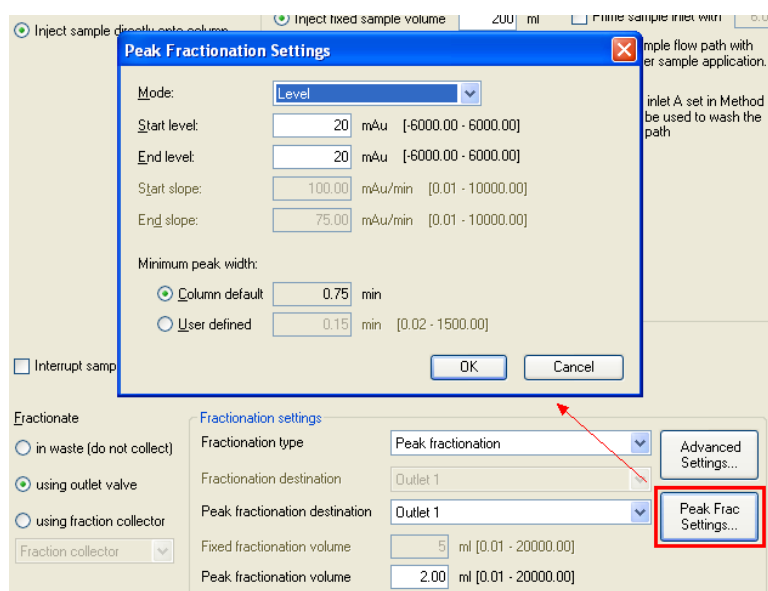
Wash sample flow path with buffer after sample application.

Note! Buffer inlet A set in Method Settings will be used to wash the sample flow path

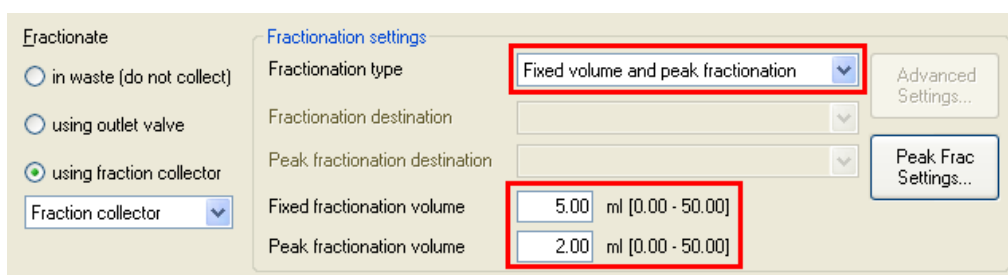
12) 对于流穿峰可以选择收集或者不收集，如果选择收集可以选择用出口阀收集或者用组分收集器收集。点击 using outlet valve，选择 Fixed volume fractionation，选择出口阀起始位置，输入每管收集的体积



如果选择峰收集，需要首先定义峰的参数，可以选择以紫外的吸收值或斜率来判断峰，输入吸收值或斜率，再输入每管收集的体积即可



如果选择用组分收集器收集，除了可以设置固定体积收集或峰收集外，还可以选择二者结合，在没有出峰的时候，可以设置较大的收集体积，出峰后改为精细收集



13) 点击 Column Wash 进入柱冲洗阶段设置，选择冲洗使用 B 液浓度（默认为 0%）以及冲洗的溶液体积，也可以选择监视冲洗的再平衡状态

**Column Wash**

Use the same flow rate as in Method Settings  
Flow rate: 1.000 ml/min [0.000 - 25.000]

Use the same inlets as in Method Settings  
Inlet A: A1  
Inlet B: B1 0.0 % B [0.0 - 100.0]

Fill the system with the selected buffer

Wash until

the total volume is 5.00 CV

the following condition is met

Stable UV

UV less than: 0.0 mAU [-6000.0 - 6000.0]

Stability time: 1.00 min [0.02 - 1000.00]

Accepted UV fluctuation: 0.10 mAU [0.00 - 6000.00]

Maximum wash volume: 20.00 CV [0.00 - 999999.0]

冲洗液也可以选择是否收集以及收集的方式

**Fractionate**

in waste (do not collect)

using outlet valve

using fraction collector

Fraction collector: [dropdown]

Fractionation settings

Fractionation type: Fixed volume fractionation [dropdown]

Fractionation destination: [dropdown]

Peak fractionation destination: [dropdown]

Fixed fractionation volume: [input]

Peak fractionation volume: [input]

Advanced Settings...  
Peak Frac Settings...

14) 点击 Elution 进入洗脱设置，首先选择洗脱的流速、缓冲液入口以及缓冲液流向

**Phase Properties** Text Instructions

**Elution**

Use the same flow rate as in Method Settings  
Flow rate: 1.000 ml/min [0.000 - 25.000]

Use the same inlets as in Method Settings  
Inlet A: A1  
Inlet B: B1

Up flow

Isocratic elution  
Volume: 1.50 CV 0.0 % B [0.0 - 100.0]  Fill the system with the selected buffer

Gradient elution  
Start at: 0.0 % B [0.0 - 100.0]  Fill the system with the selected buffer

	Type	Target %B (0-100)	Length (CV)
1	Linear	100.0	20.00

Add Segment  
Delete Segment

Note: A gradient delay is automatically added, provided that the last gradient segment is linear

Fractionate Fractionation settings

洗脱方式有两种，Isocratic elution 洗脱方式只使用一种缓冲液洗脱，通常用于凝胶过滤层析。设置收集体积为 1.5 CV，使用 0% B 液，使用 Fraction collector 进行峰收集（也可以如前所述进行自由设置），可以通过勾选 Start fractionation after 0.3 CV 从洗脱开始过三分之一一个柱床体积后才开始收集

Isocratic elution

Volume: 1.50 CV    % B: 0.0 [0.0 - 100.0]     Fill the system with the selected buffer

Gradient elution

Start at: 0.0 % B [0.0 - 100.0]     Fill the system with the selected buffer

Type	Target %B (0-100)	Length (CV)
1. Linear	100.0	20.00

Add Segment    Delete Segment

Note: A gradient delay is automatically added, provided that the last gradient segment is linear

Fractionate

in waste (do not collect)

using outlet valve

using fraction collector

Fraction collector: [dropdown]

Fractionation settings

Fractionation type: Peak fractionation

Fractionation destination: [dropdown]

Peak fractionation destination: [dropdown]

Fixed fractionation volume: 2.00 ml [0.00 - 50.00]

Peak fractionation volume: 2.00 ml [0.00 - 50.00]

Advanced Settings...    Peak Frac Settings...

Start fractionation after 0.3 CV (only for isocratic elution)

线性梯度的洗脱方式适用于各种吸附性层析的洗脱条件摸索。使用线性梯度方式洗脱，需要输入开始及结束时缓冲液 B 的比例以及在多少个柱床体积内 B 逐渐达到目标

Gradient elution

Start at: 0.0 % B [0.0 - 100.0]     Fill the system with the selected buffer

Type	Target %B (0-100)	Length (CV)
1. Linear	100.0	20.00

Add Segment    Delete Segment

通过点击 Add Segment 可以设置更复杂的多步洗脱，首先在 Type 一栏中选择 Step，输入 Target %B 为 20 以及 Length 5 CV 进行第一阶段洗脱

Gradient elution

Start at  % B [0.0 - 100.0]  Fill the system with the selected buffer

	Type	Target %B (0-100)	Length (CV)
1	Step	20.0	5.00

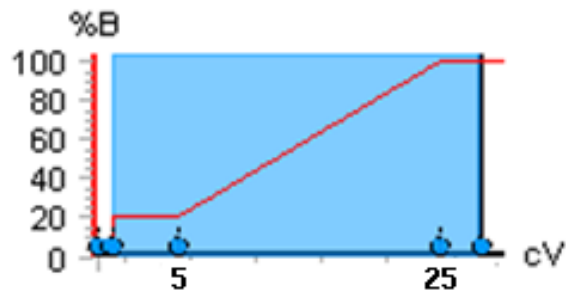
点击 Add Segment 添加洗脱步骤，在 Type 一栏中选择 Linear，输入 Target %B 为 100 以及 Length 20 CV，设置第二步线性洗脱

Gradient elution

Start at  % B [0.0 - 100.0]  Fill the system with the selected buffer

	Type	Target %B (0-100)	Length (CV)
1	Step	20.0	5.00
2	Linear	100.0	20.00

最终的洗脱方式如下图所示



收集方式与之前的设置方法相同，可以进行自由选择

Fractionate

in waste (do not collect)
   
 using outlet valve
   
 using fraction collector

Fraction collector

Fractionation settings

Fractionation type

Fractionation destination

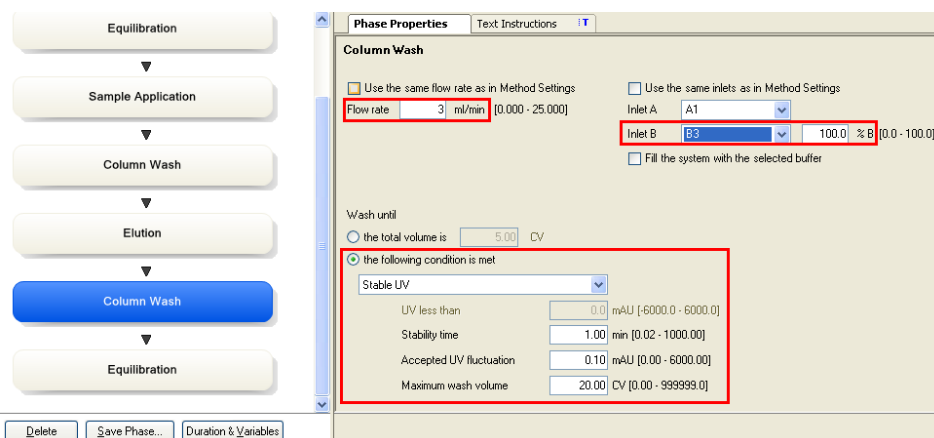
Peak fractionation destination

Fixed fractionation volume  ml [0.00 - 50.00]

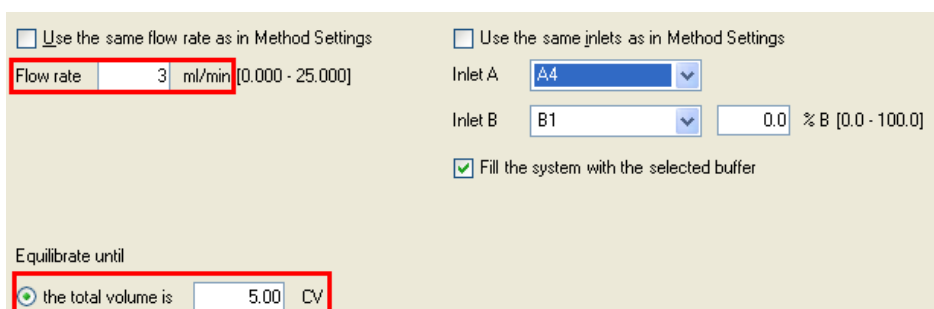
Peak fractionation volume  ml [0.00 - 50.00]



15) 点击 Column Wash 进入柱冲洗阶段设置，此阶段目的是对层析柱进行再生。设置再生时缓冲液的流速、进口、洗脱体积，也可以设置监视平衡



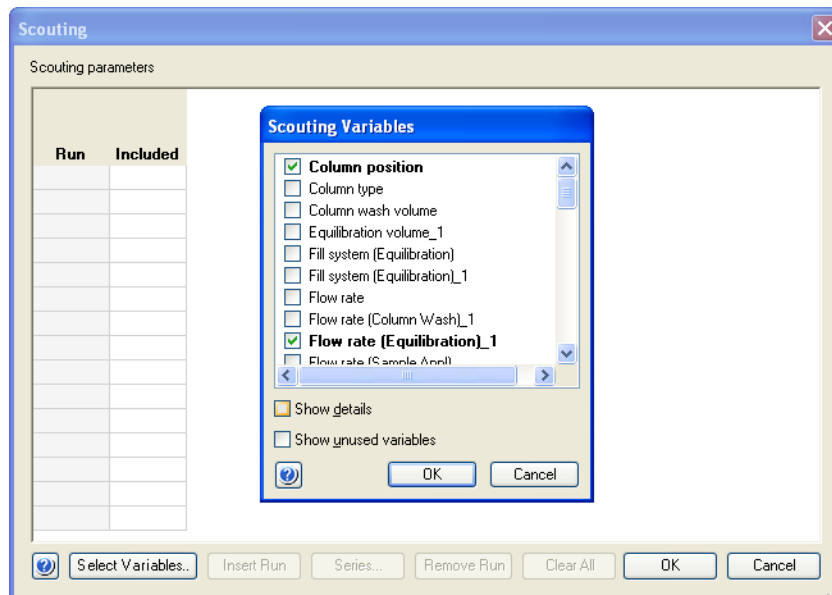
16) 点击 Equilibration 进入层析柱再平衡阶段设置，此阶段目的是将层析柱中的缓冲液置换为适当的平衡或保存缓冲液。设置再平衡时缓冲液的流速、进口、洗脱体积，也可以设置监视平衡



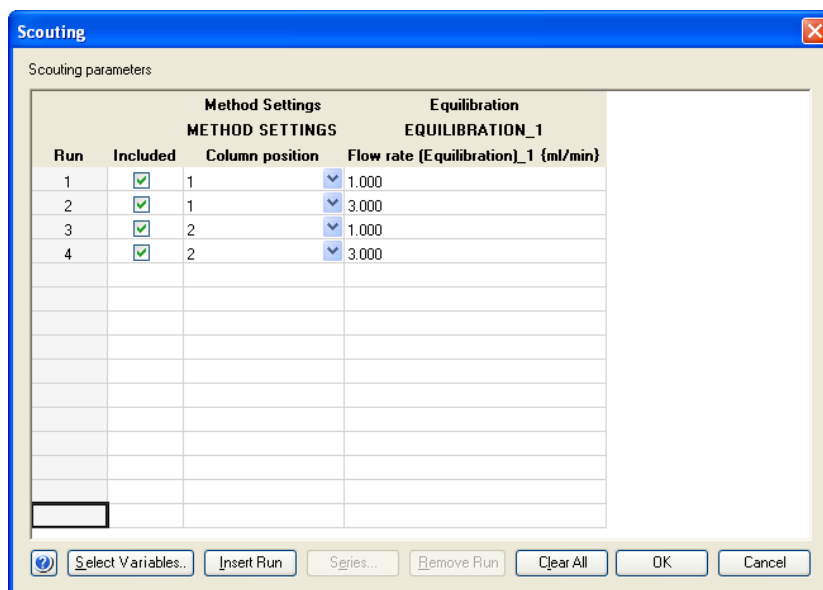
17) Scouting 功能可以实现方便快速的条件摸索，点击工具栏上 Scouting 按钮



选定需要探索的参数，点击 OK



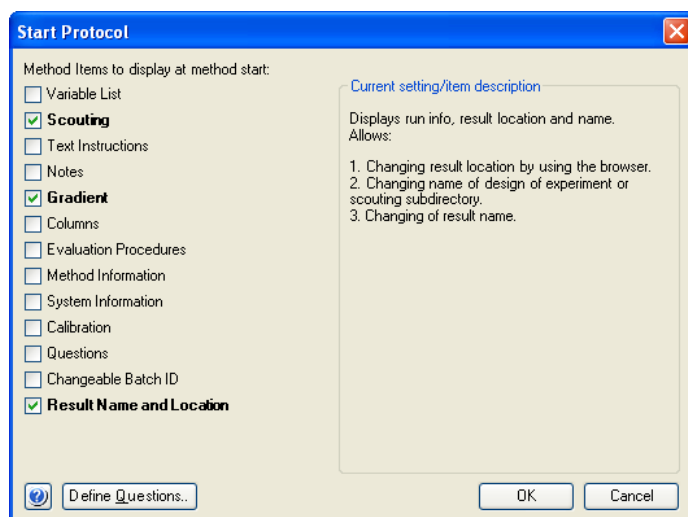
点击 Insert Run 添加实验，输入各变量的参数值，点击 OK 确认，系统将会按照设定的参数进行多次运行



18) 选择工具栏中的 Start Protocol



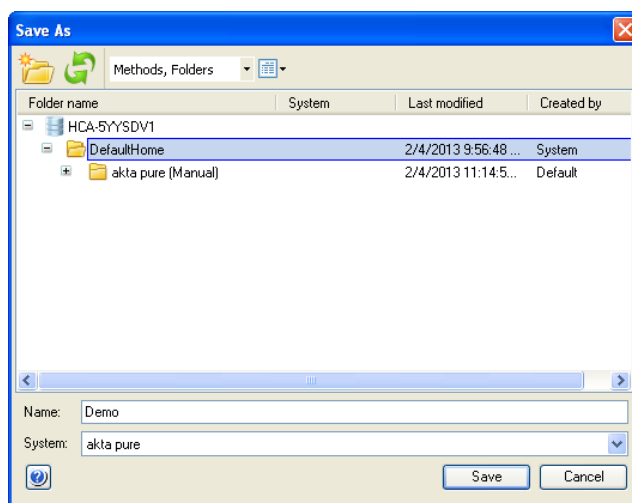
选择需要检查的方法项目，方法开始运行前将会提示对这些项目进行确认，然后才开始运行



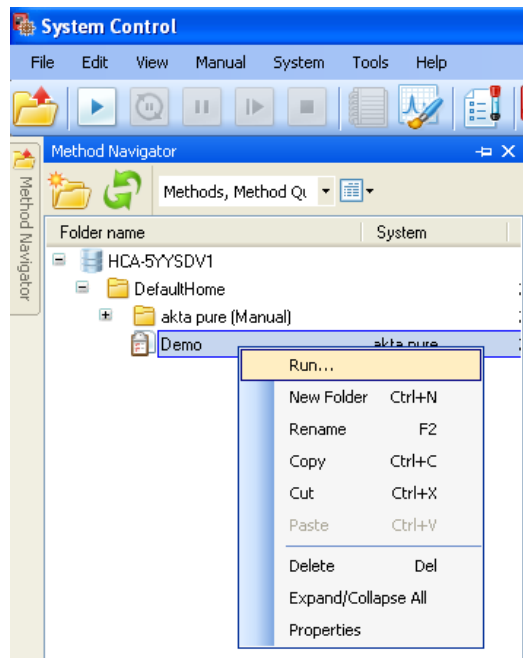
19) 完成所有设置后点击工具栏中的保存按钮



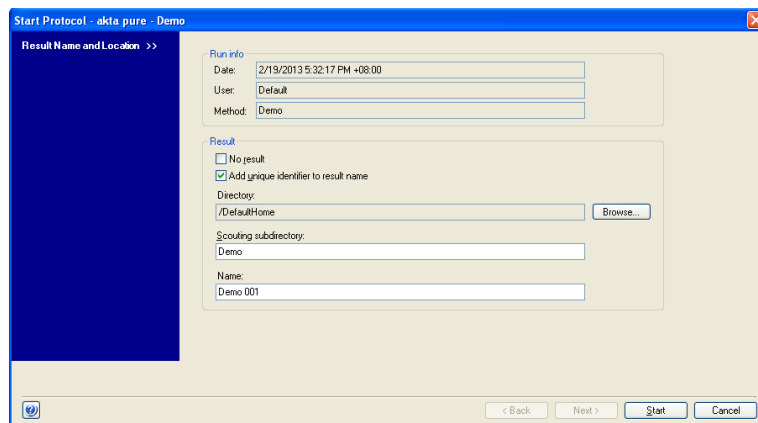
选择保存的路径，输入方法名称后 Save



20) 如要运行已创建的方法，在 System Control 窗口 Method navigator 中选择方法，右键点击 Run



在跳出的 Start Protocol 中确认设置的项目，点击 Start 开始运行



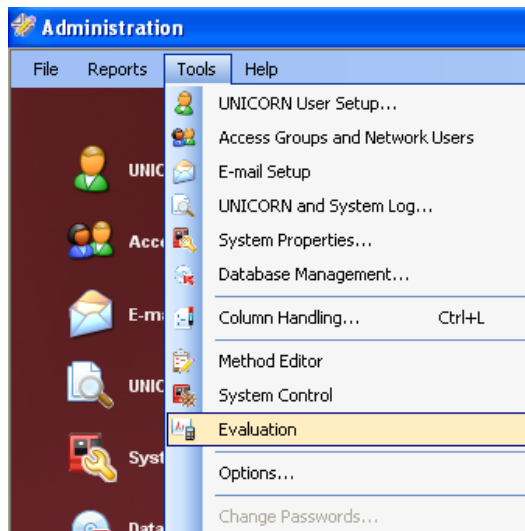
## 2.5 结果分析

### 2.5.1 打开结果

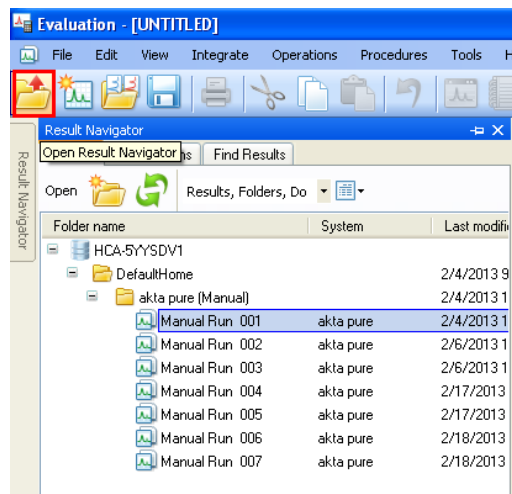
- 1) 点击任务栏中的 Evaluation，进入结果处理窗口



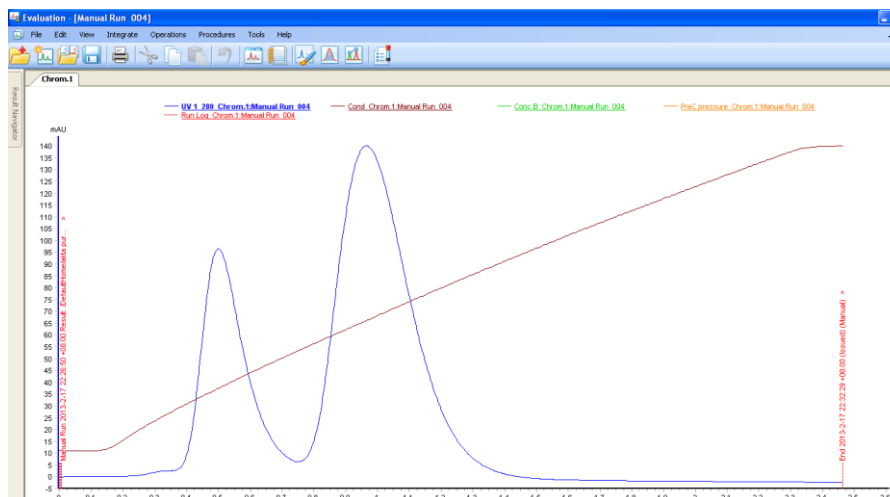
如果任务栏中没有 Evaluation 窗口，可以在任意已打开的 UNICORN 6 窗口中点击 Tools，选择 Evaluation 打开



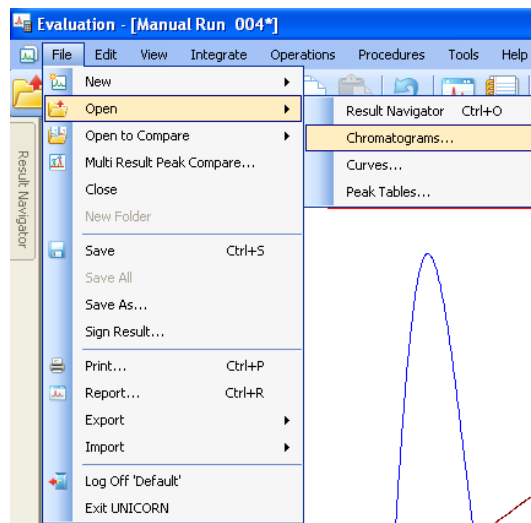
2) 在 Evaluation 窗口中点击 Open Results Navigator 打开 Results 文件导航窗口



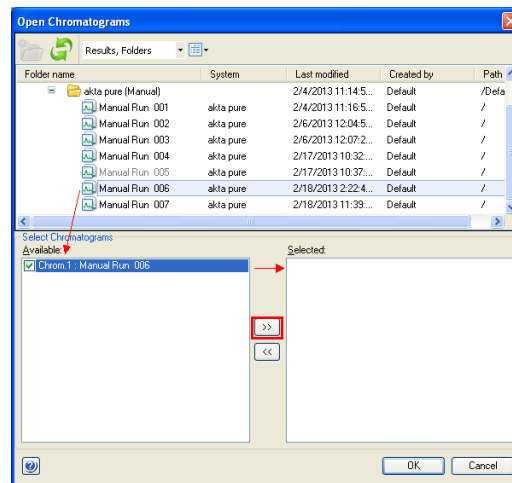
双击待分析的结果文件打开



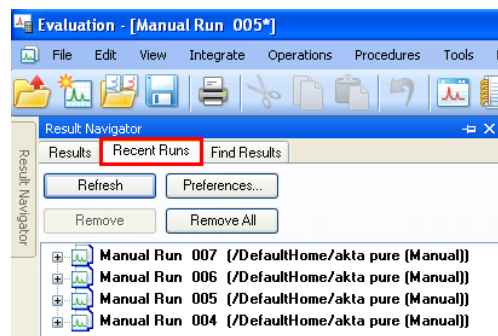
也可以在 Evaluation 窗口中点击 File > Open > Chromatograms 打开结果选择窗口



在弹出的窗口中双击待分析的结果，勾选 Chrom 1，点击向右双箭头选中结果后按 OK 键打开

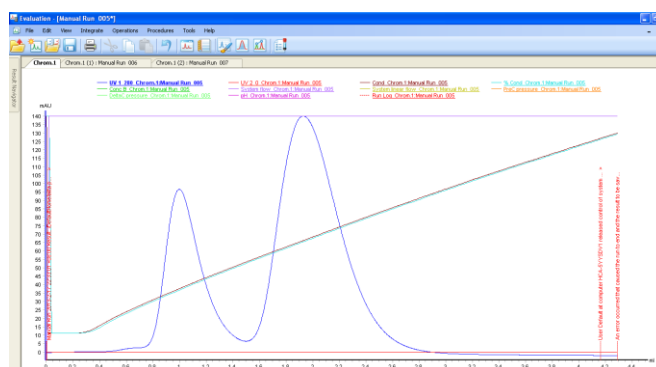


还可以通过单击“最近的运行(Recent Runs)”选项，找到需要分析的层析结果双击打开

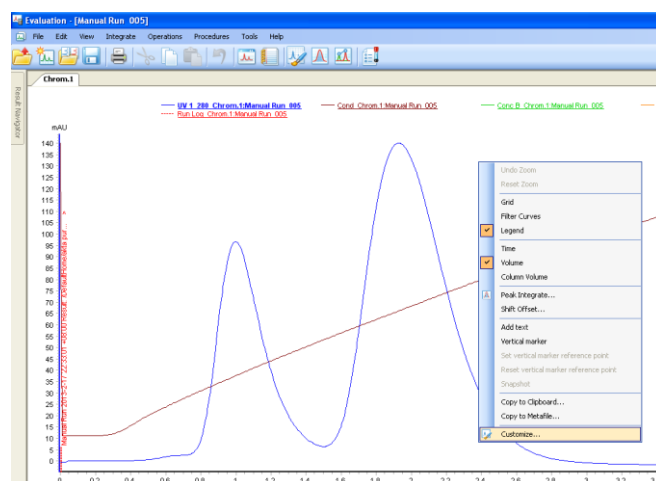


## 2.5.2 层析结果的显示设置

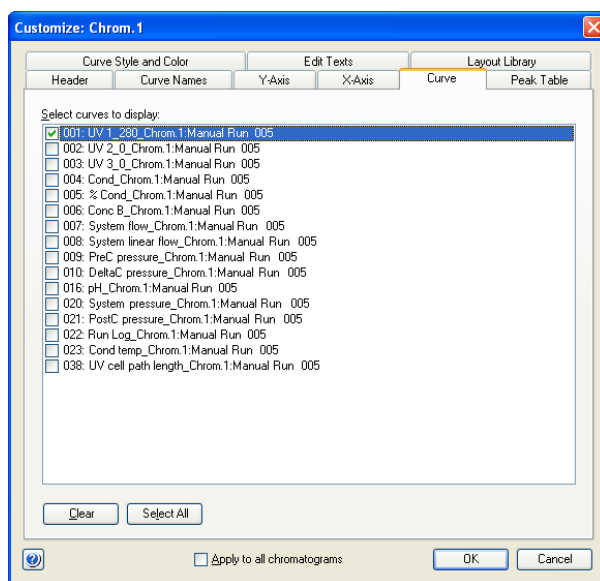
1) 正常打开的结果如下



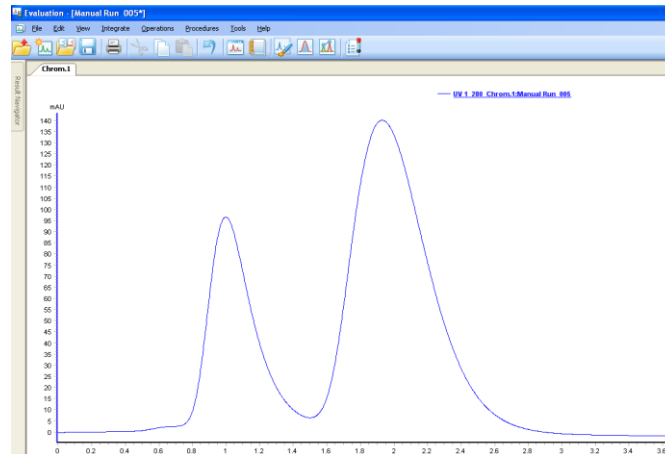
2) 在 Curve 窗格点击鼠标右键，点击菜单中的 Customize



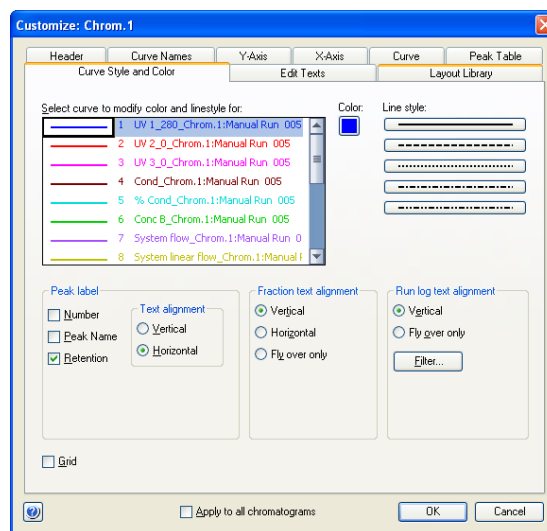
在复选框中选中需要显示的色谱曲线



点击 OK 即可使图谱简化，或者显示更丰富的曲线

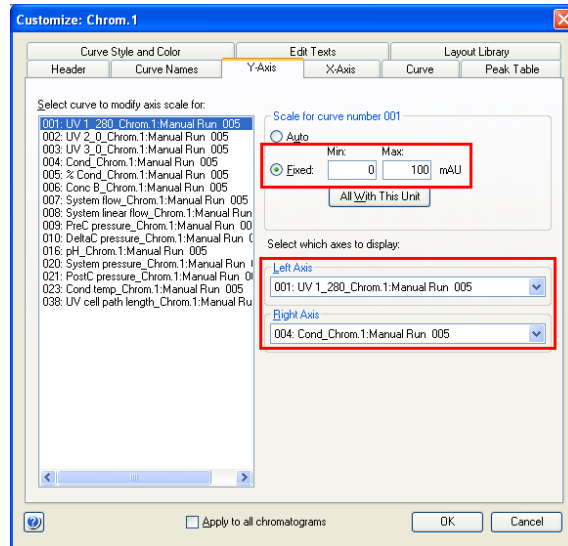


- 3) 如需对色谱曲线颜色及线型进行更改，点击 Curve Style and Color，就可以对色谱曲线的属相进行编辑

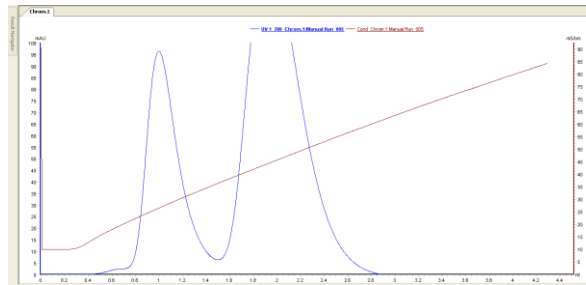


- 4) 如需对 Y 轴显示区间进行更改，点击 Y-Axis 选项卡。在左侧 Select curve to modify axis scale for 对话框中选中需要更改的曲线，点击 Fixed，并在对话框中填入 Min 和 Max 值；如需在色谱曲线右侧也显示另外一条色谱曲线的 Y 轴左边，在 Right 下拉菜单中选中所定义的曲线。点击 Ok 即完成曲线显示区间自定义

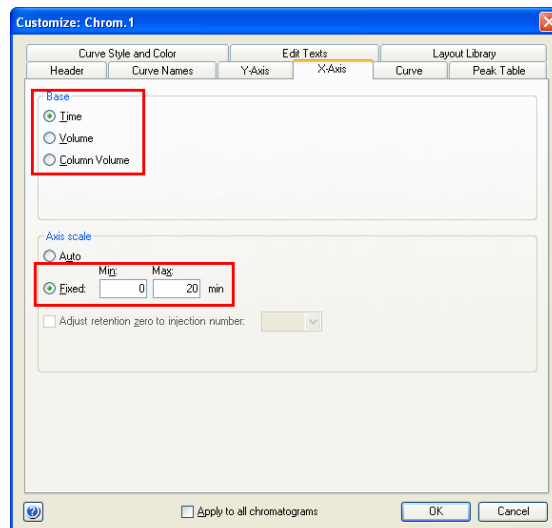




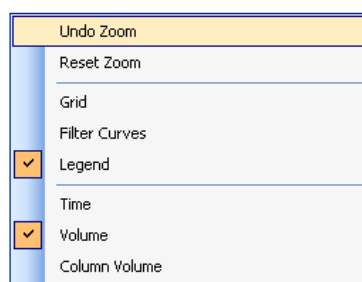
自定义曲线以及显示结果如下图



- 5) 如果需要对 X 轴显示类型和显示范围进行自定义，点击 X-Axis 选项卡。选择 X 轴类型为 Time、Volume 或 Column Volume，如需固定 X 轴显示区间，在 Axis scale 复选框中选定 Fixed 并填写 Min 和 Max 数值；如果需要在上样后 X 轴自动归零，则需要在 Adjust retention zero to injection number 复选框中打钩

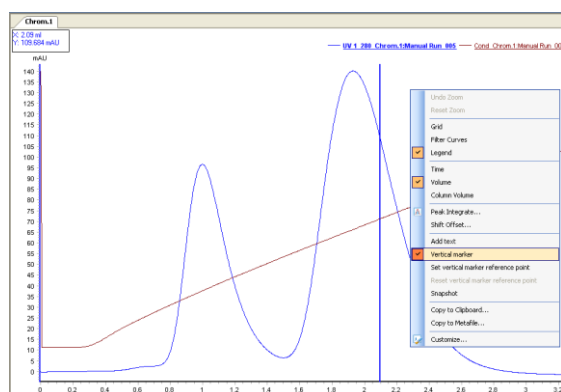


- 6) 框选 Curve 窗格中的区域可以放大选中的部分，当需要将放大部分恢复到原大小时，点击右键后选择 Undo Zoom 或 Reset Zoom

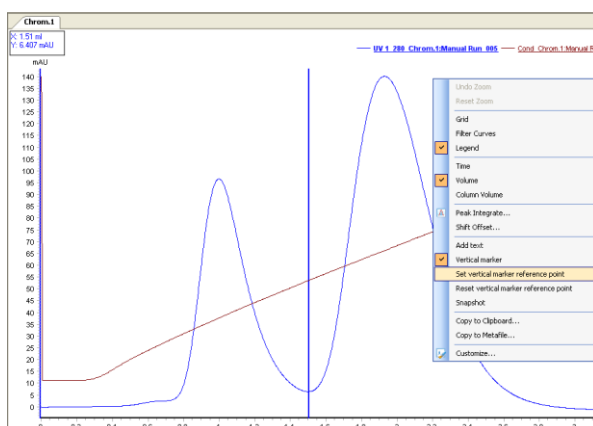


### 2.5.3 显示 Vertical marker 及显示设置参考点

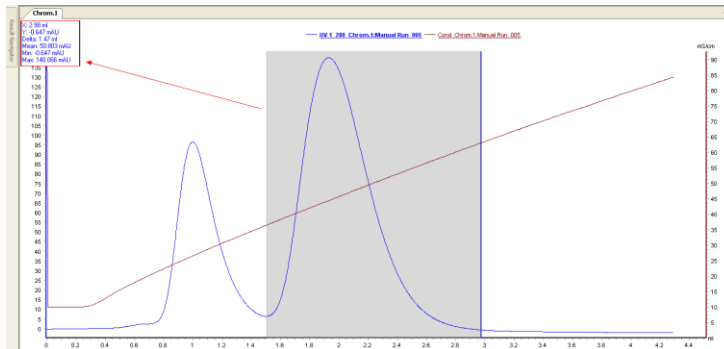
- 1) 在 Curve 窗格中点击鼠标右键，在悬浮菜单中左键点击 Vertical marker 以显示垂直游标线，拖动 Vertical marker 将显示与曲线交点的坐标



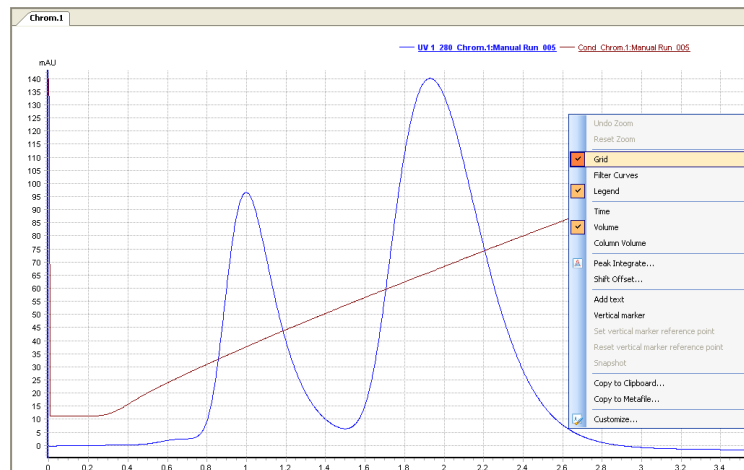
- 2) 如果需要计算曲线上两点之间的距离，可以通过设置参考点来实现，在 Curve 窗格中标记 Vertical marker 后，点击鼠标右键，在悬浮菜单中选择 Set vertical marker reference point



- 3) 拖动鼠标移动 Vertical marker 到需要对比的位置，显示框中将显示这两点之间的距离，这两点之间曲线的最大值、最小值以及平均值

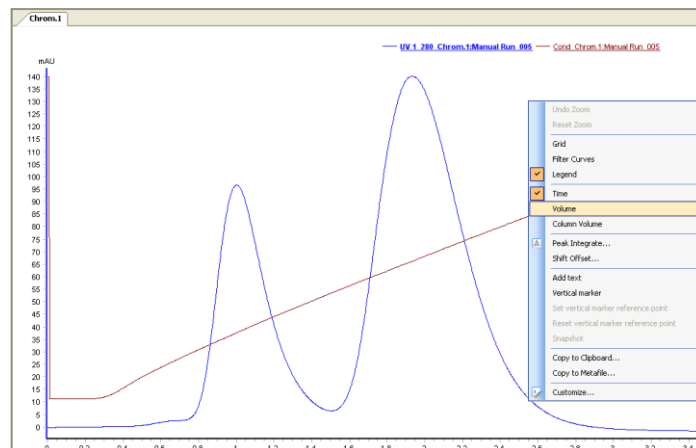


- 4) 为了方便比较，可以点击鼠标右键，在悬浮菜单中选择 Grid 功能，Curve 窗格中出现横竖参考线



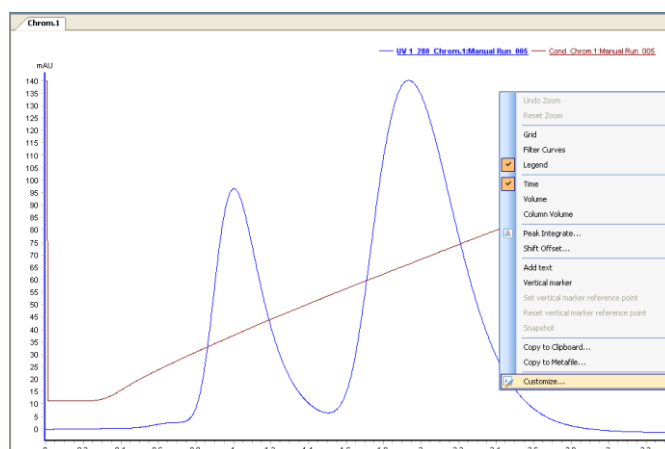
## 2.5.4 更改横坐标显示类型

Curve 窗格中点击鼠标右键，在悬浮菜单中选择 Time，Volume 或者 Column Volume 为横坐标显示类型

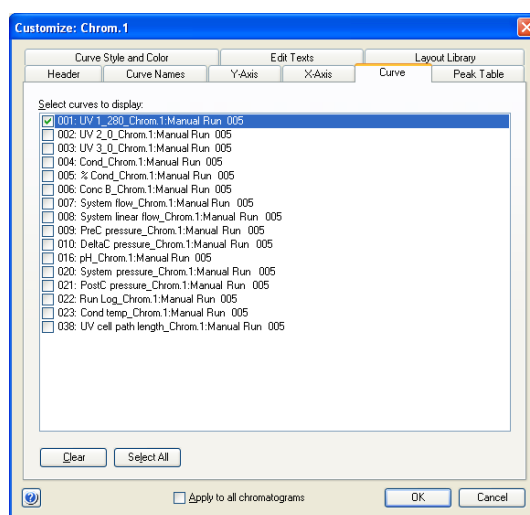


## 2.5.5 结果积分处理

1) Curve 窗格中点击右键，选择 Customize



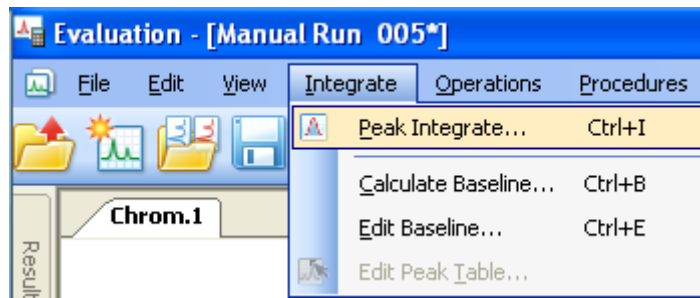
2) 勾选复选框去掉不需要显示的曲线



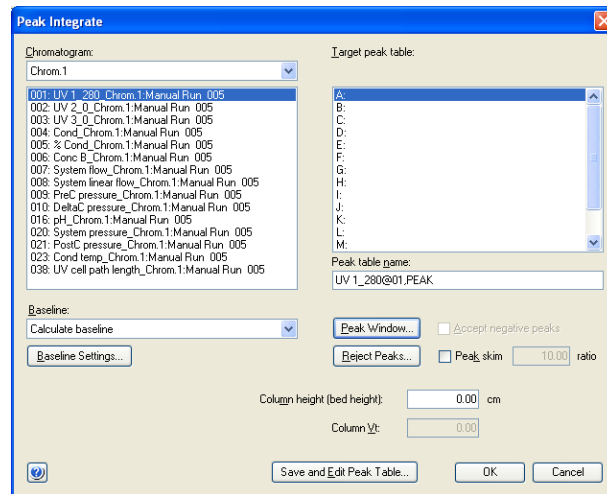
3) 在工具栏中点击峰积分按钮，进行积分处理



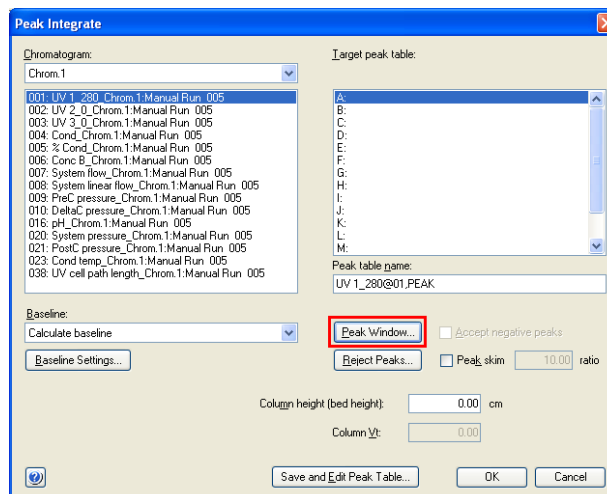
或者在 Integrate 下拉菜单中点击 Peak Intergrate 进行积分处理



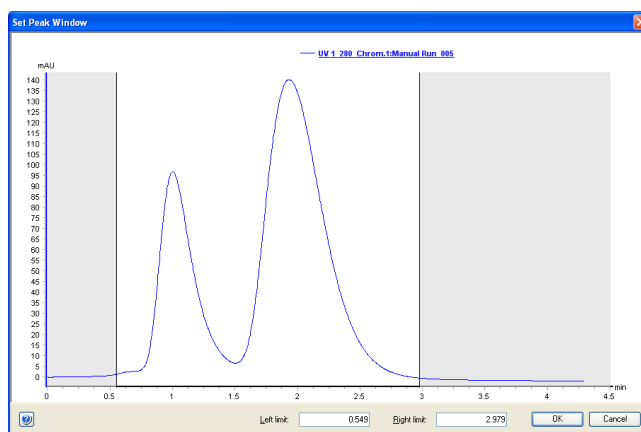
- 4) 选择需要积分的曲线以及积分表存储位置，基线类型默认为 Calculate baseline



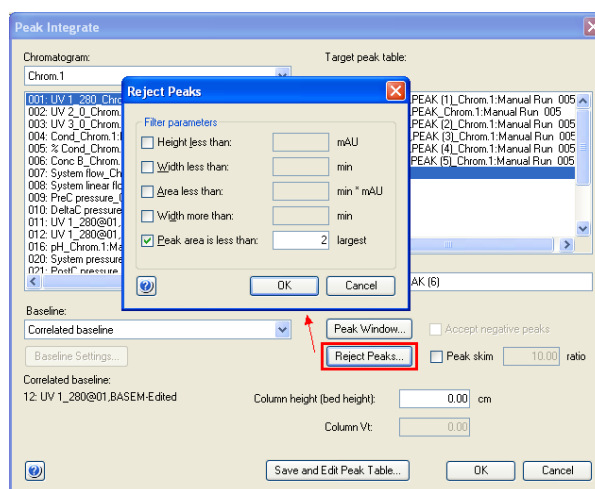
- 5) 在积分窗口中点击 Peak Window



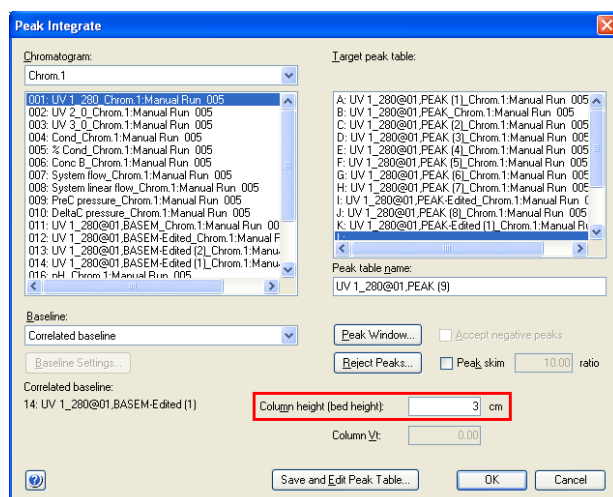
出现以下窗口，通过拖动左右两条直线可以选择需要进行积分的范围，点击 OK 确认



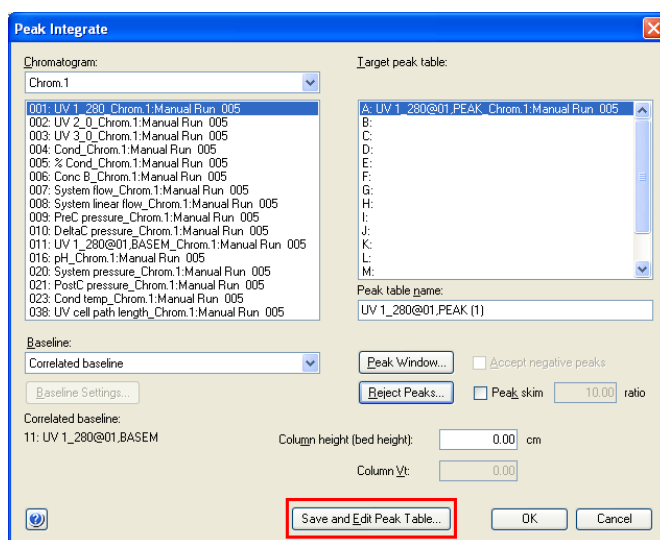
- 6) 在积分窗口点击 Reject Peaks 对需要分析的色谱峰可进行高级定义，包括最小峰高、峰宽、峰面积、峰个数等，在这里最常用的是在 Peak area is less than 输入需要显示的最大峰的个数，点击 OK 确定



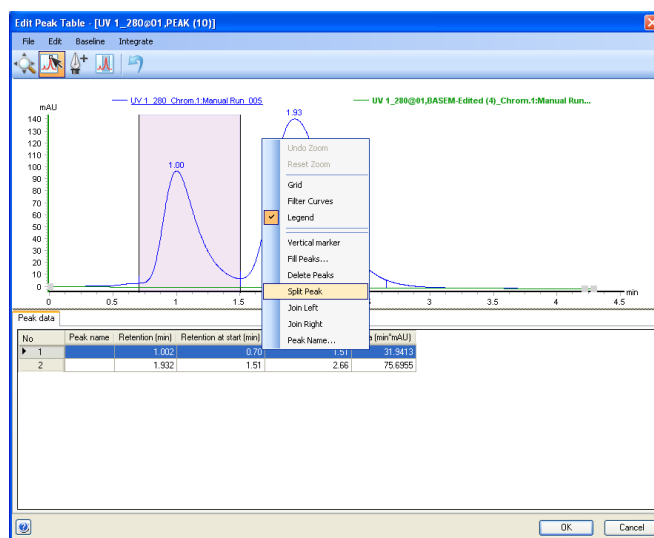
- 7) 在 Column height (bed height)一栏中输入柱床高度，在柱效测定中此项必须填写



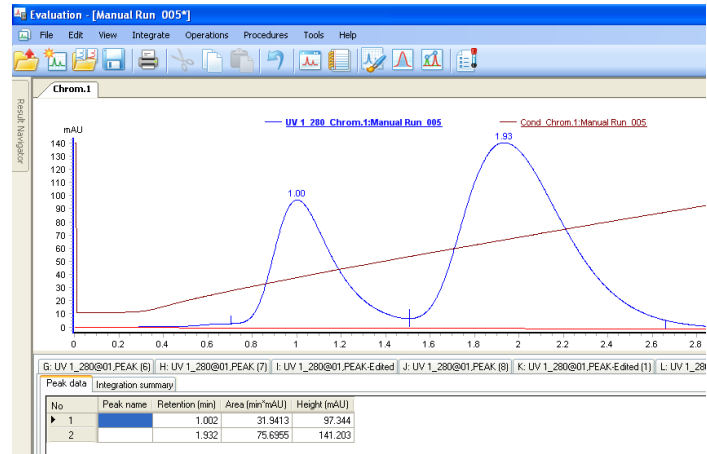
8) 点击积分窗口中 Save and Edit Peak Table 按钮，可以对峰进行高级操作



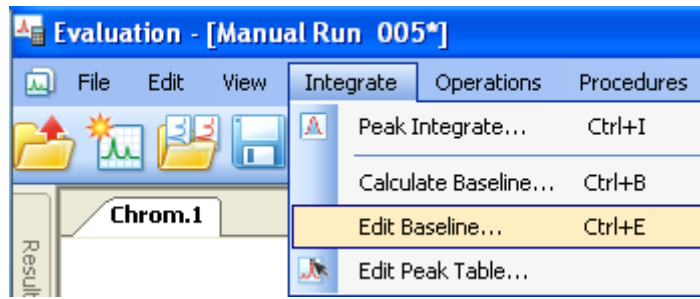
在弹出的编辑窗口中右键，选择相应的命令可以对峰进行填充图案、删除、分割、合并以及命名等操作，编辑后按 OK 确认



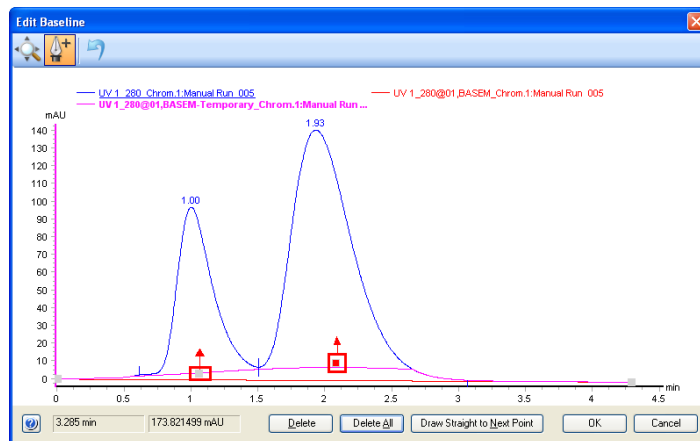
9) 点击积分窗口中的 OK，查看积分结果



10) 如果默认基线不理想，可以对基线进行调节，点击菜单栏中 Integrate 按钮，选择 Edit Baseline

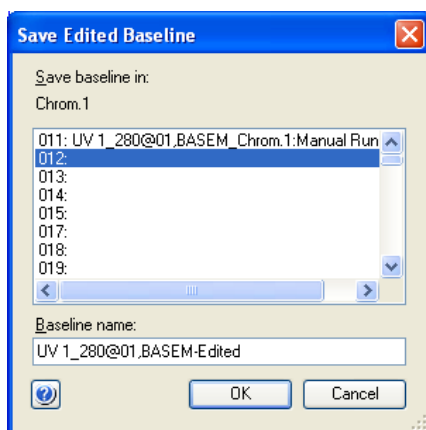


在适当的位置点击左键设置新的基线参考点并拖动，直至基线到达合适的位置，点击 OK 确认

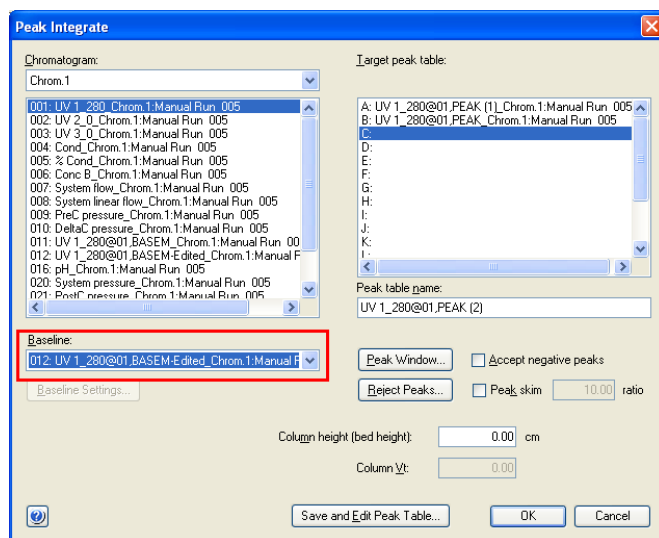


将调整后的基线保存到合适的位置，设置新基线的名称，点击 OK 确认

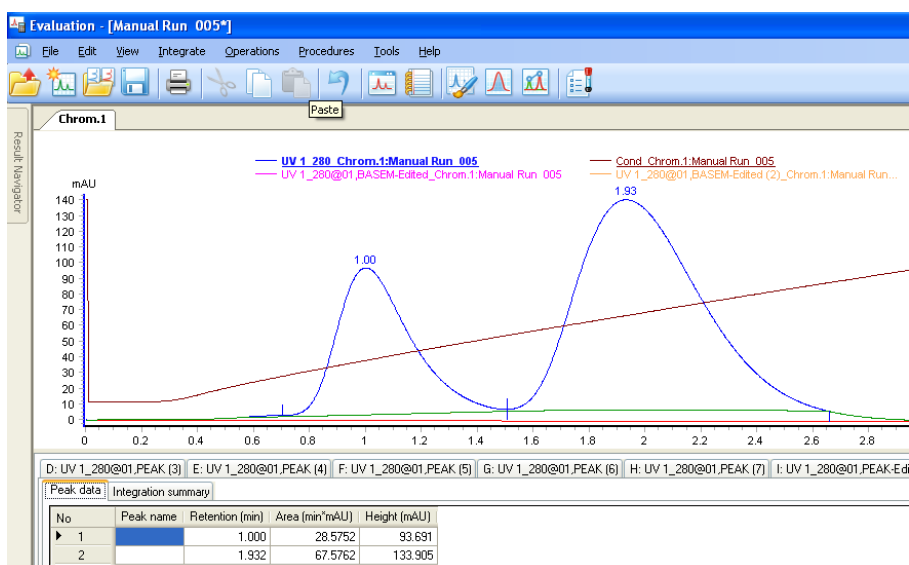




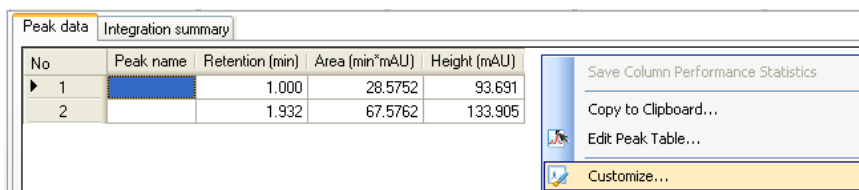
设置新的基线后需要对色谱曲线重新积分，在 Baseline 下拉菜单中选中新基线，点击 OK 进行积分



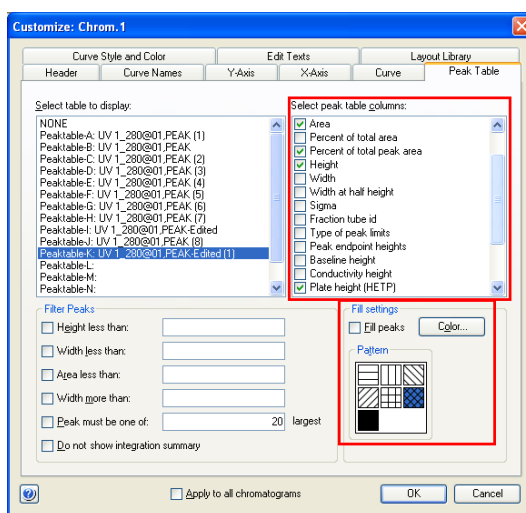
积分结果如下图显示，Peak data 中默认显示保留时间、面积和高度



- 11) 如果需要查看更多数据，可以在 Peak data 区域点击右键，选择 Customize



在 Select peak table columns 对话框中找到需要显示的数据，如 percent of total peak area、plate height ( HETP )、Asymmetry 等，如需对峰用阴影填充，选择 Fill peaks 复选框，并选择填充阴影类型和颜色 ( Color )，点击 OK 执行



Peak data 区域中将会显示增选的分析结果

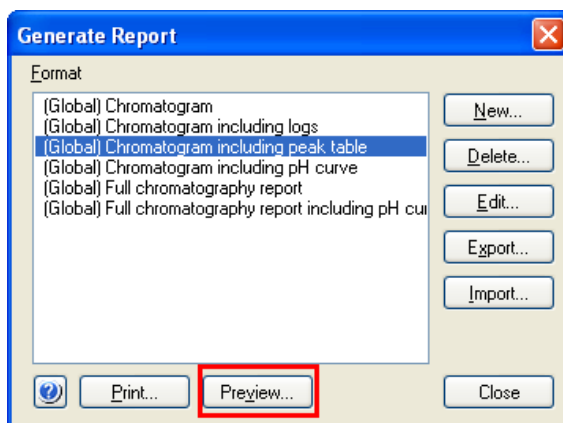
No	Peak name	Retention (min)	Area (min*mAU)	% of total peak area	Height (mAU)	Plate height (cm)	Plates per meter	Asymmetry
1		1.002	31.9413	29.68	97.344	0.04544	2200.5	2.09
2		1.932	75.6955	70.32	141.203	0.03637	2749.7	1.77

## 2.5.6 生成层析报告

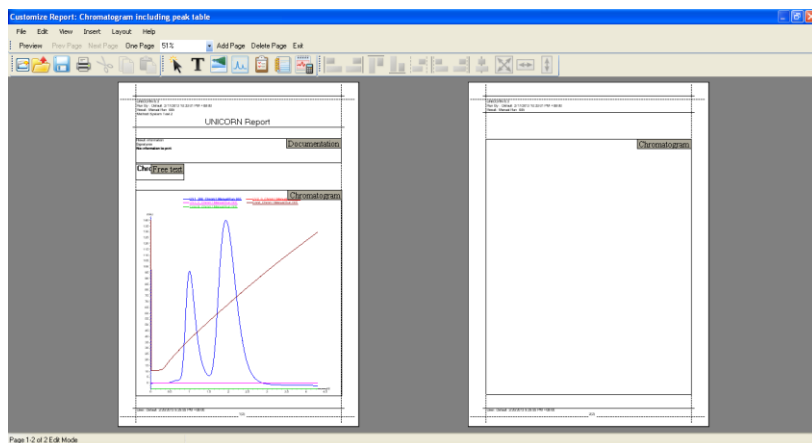
- 1) 如果想将层析结果以报告的形式打印或输出出来，请在工具栏中点击报告按钮



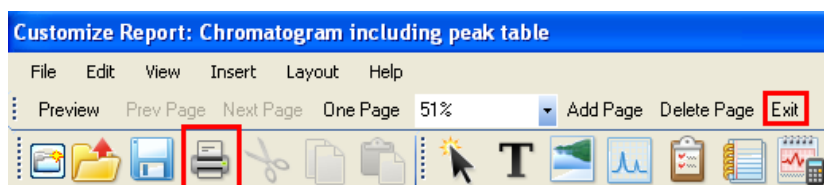
2) 选择合适的报告模板，单击 Preview



也可以点击 Edit，在弹出的自定义窗口中通过工具栏中的功能按钮，编辑文字、图片、图谱以及层析数据



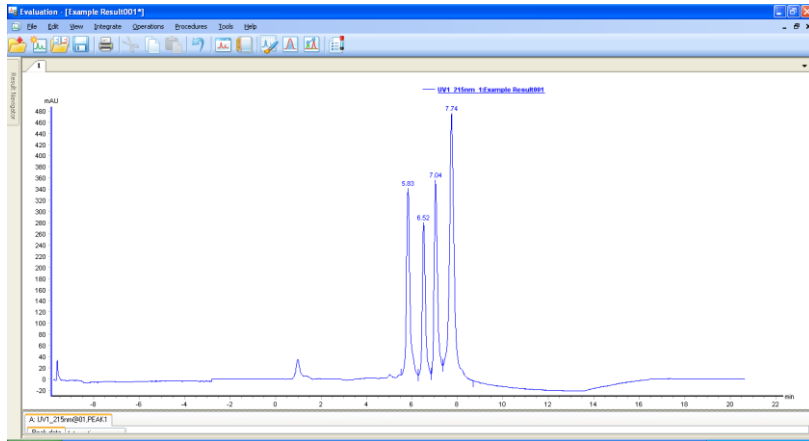
3) 将显示的报告打印出来即可，点击右边的 Exit 退出报告模式



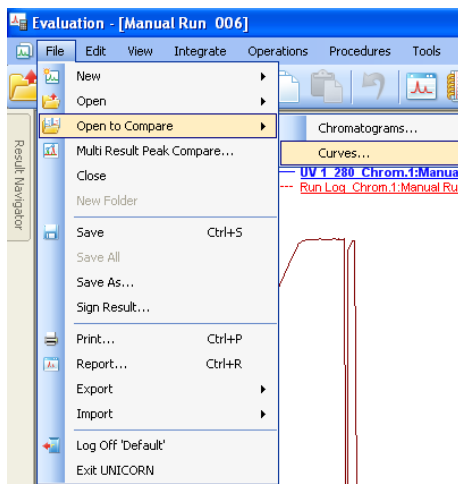
## 2.5.7 结果比对

### 2.5.7.1 色谱曲线叠加比对

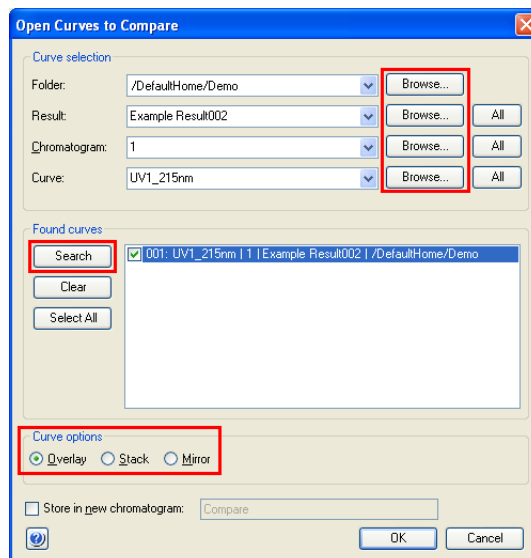
1) 首先打开一个层析结果，通过编辑使其只显示待比较的曲线



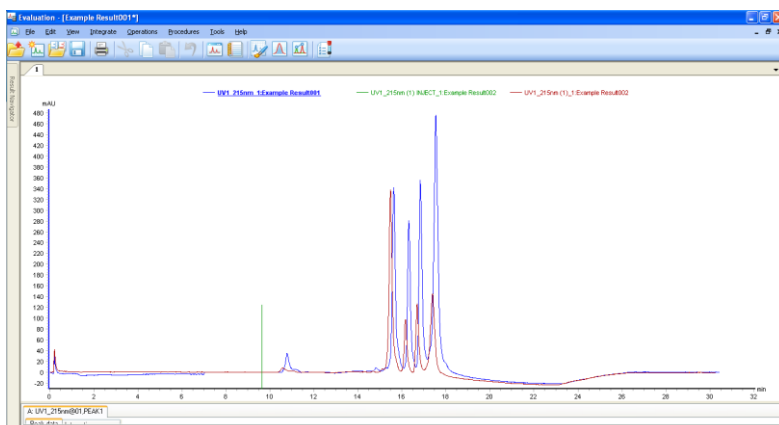
- 2) 需要与其他色谱图曲线进行叠加对比时，在 File 下拉菜单中选中 Open to Compare，点击 Curves



- 3) 在弹出的对话框中点击 Browse 寻找需要比对的结果，选择曲线显示方式，点击 OK 完成色谱图曲线比对

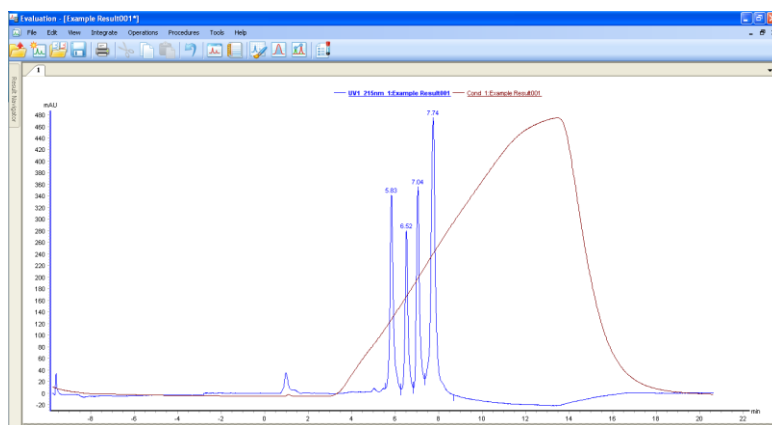


结果如图

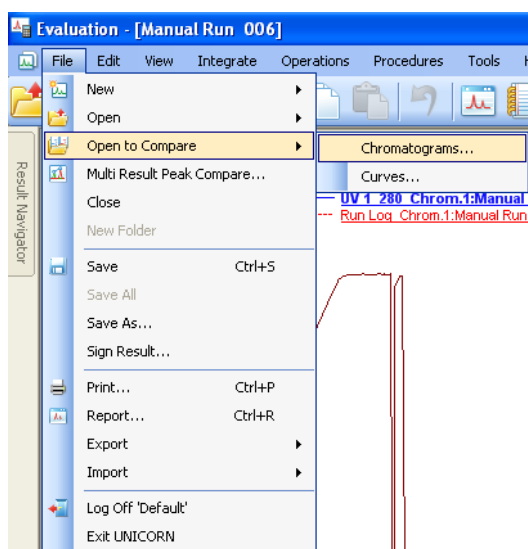


### 2.5.7.2 色谱结果比对

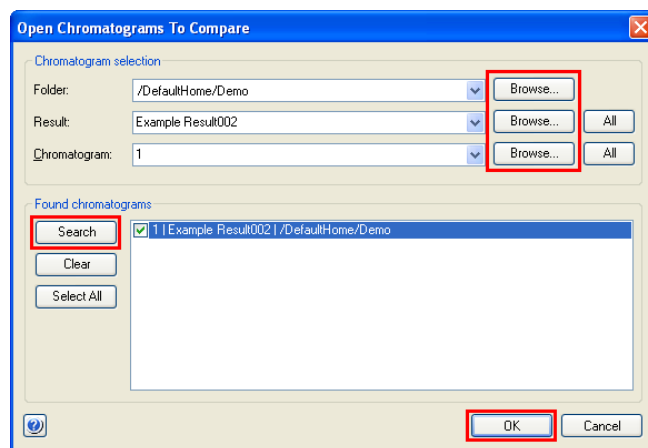
1) 首先打开一个层析结果，如下图



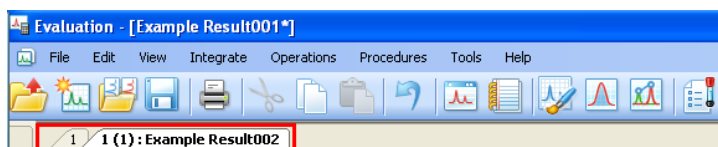
2) 在 File 下拉菜单中选中 Open to Compare，点击 Chromatograms



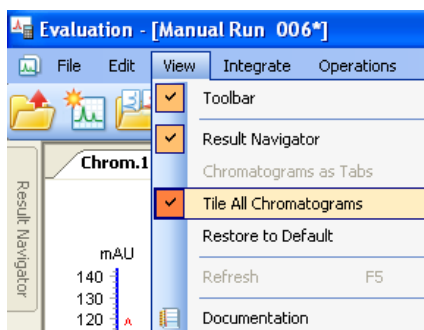
3) 点击 Browse 寻找需要比对的色谱图



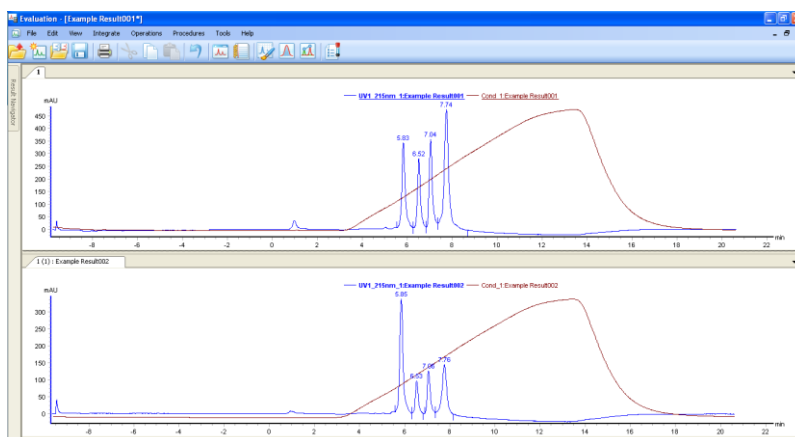
点击 OK 打开第二色谱图，两图并列显示在不同的显示卡界面中



4) 点击命令栏中的 View > Tile All Chromatograms

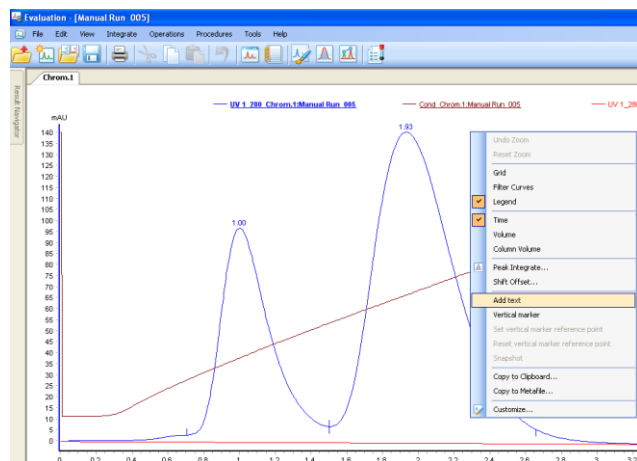


两图谱将同时显示出来

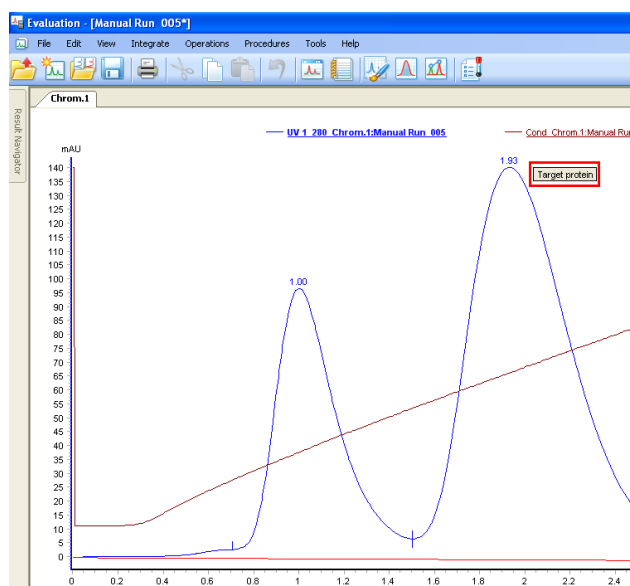


## 2.5.8 结果注释

- 1) 如需在结果中添加文字注释，在 Curve 窗格中点击右键，选择 Add text



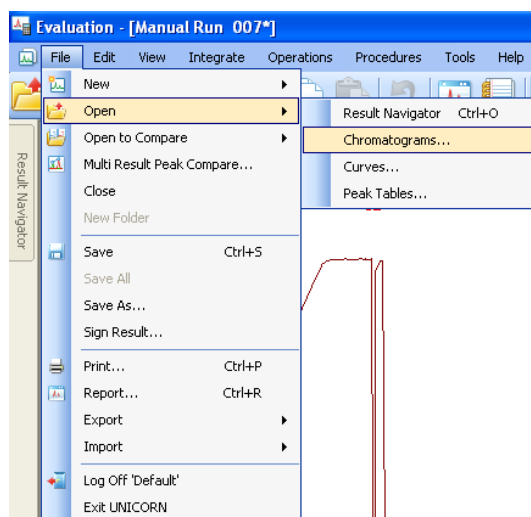
- 2) 在目标位置点击左键，在出现的框中输入文字注释即可



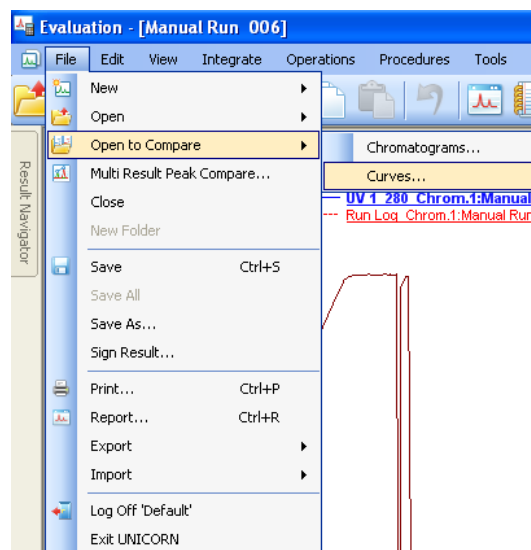
## 2.5.9 结果分析

### 2.5.9.1 色谱曲线相加

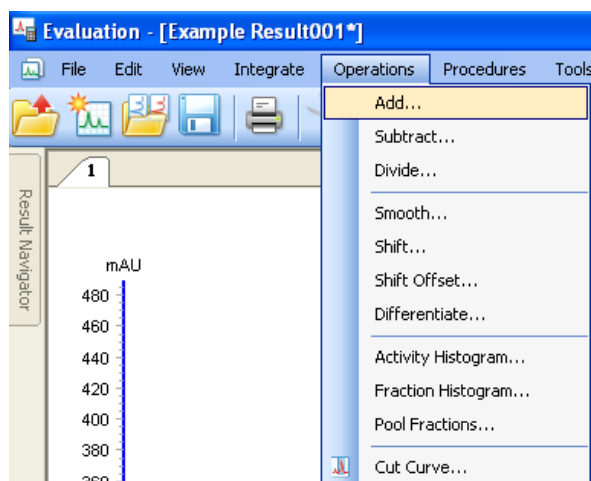
- 1) 如需要将两条色谱曲线叠加，点击菜单栏中 File > Open > Chromatograms，将其中一个色谱图打开



- 2) 点击菜单栏中 File > Open to Compare > Curves 打开待叠加的第二条曲线

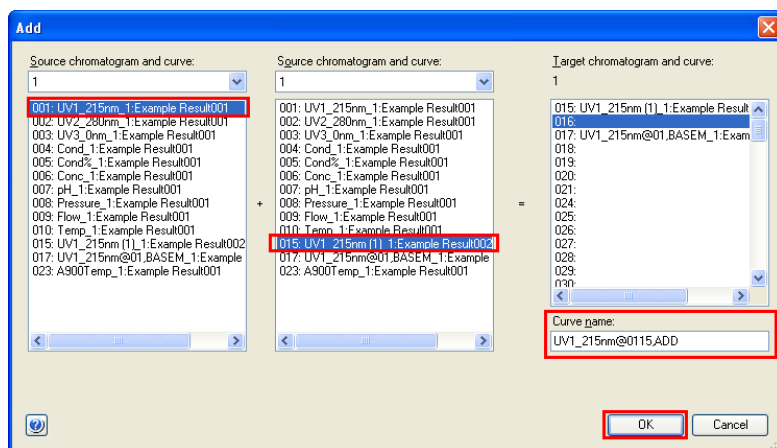


- 3) 点击菜单栏中 Operations > Add

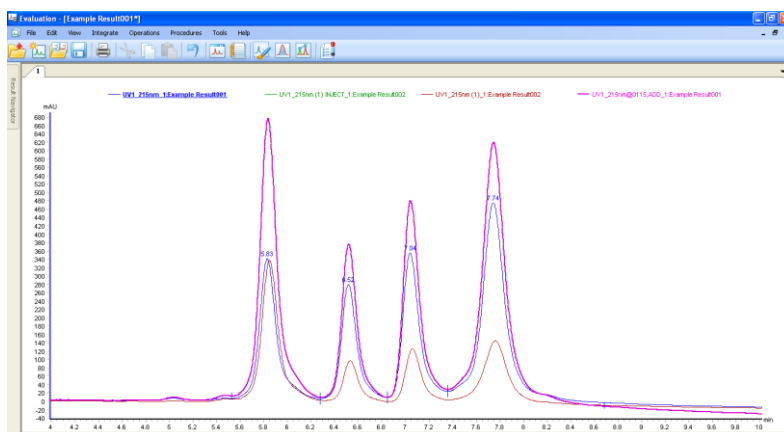




- 4) 出现以下对话框后，在左边和中间 Source chromatogram and curve 框中分别选中两条需要叠加的曲线，输入叠加后曲线的名称选择存储位置，单击 OK

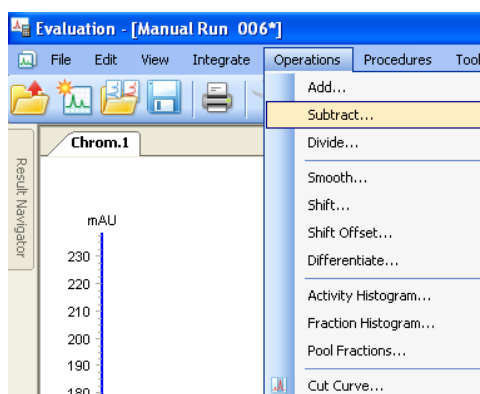


- 5) 图中将出现叠加后的曲线，叠加曲线的后缀为 ADD

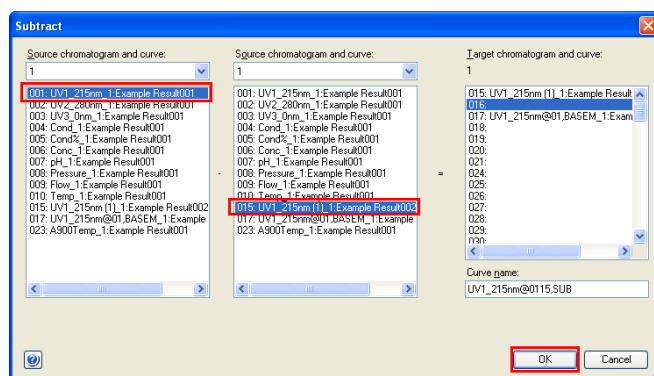


### 2.5.9.2 色谱曲线相减

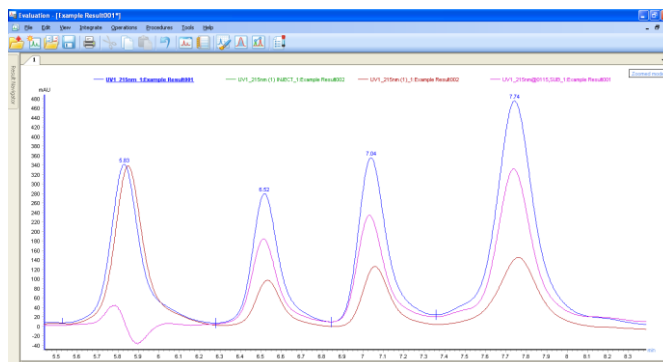
- 1) 如果有一些假峰来源于洗脱液中的杂质，可以通过减去空白运行曲线方式消除假峰，先将两条曲线打开，点击 Operation > Subtract



- 2) 出现以下对话框后，在 Source chromatogram and curve 框中分别选中两条需要相减的曲线，输入相减后曲线的名称选择存储位置，单击 OK

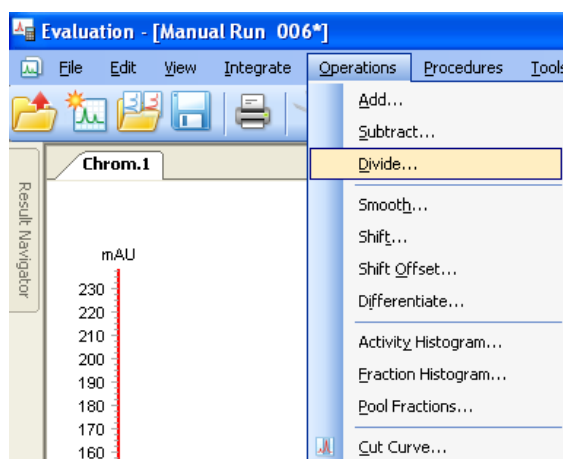


- 3) 曲线相减后将出现相减后的另一条曲线，相减后得到的曲线的后缀为 Sub

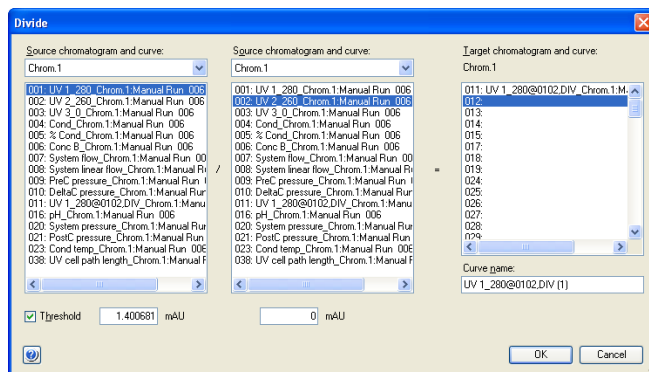


### 2.5.9.3 色谱曲线相除

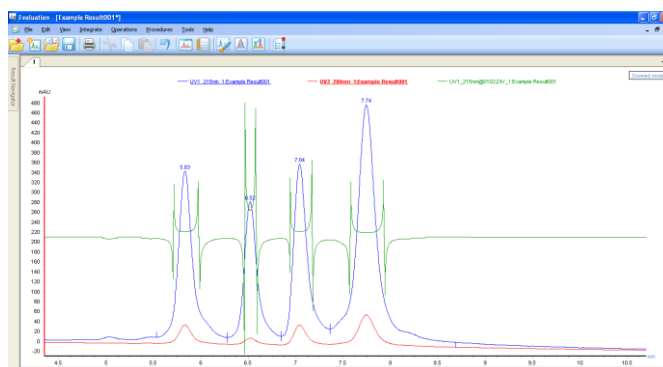
- 1) 物质在不同波长下的吸光度比值往往可以作为鉴别物质的一种方法，UNICORN 中可以通过两条曲线相除来实现这一功能，先将两条曲线打开，点击 Operation > Divide



- 出现以下对话框后，在 Source chromatogram and curve 框中分别选中两条需要相除的曲线，输入相除后的曲线名称，选择存储位置序号，单击 OK

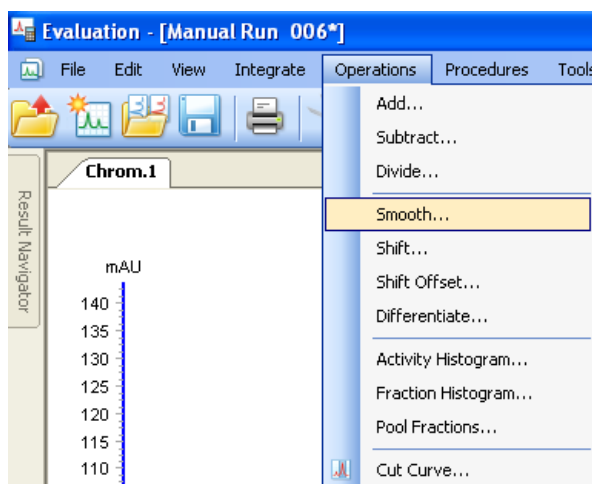


- 相除后得到的曲线的后缀为 DIV

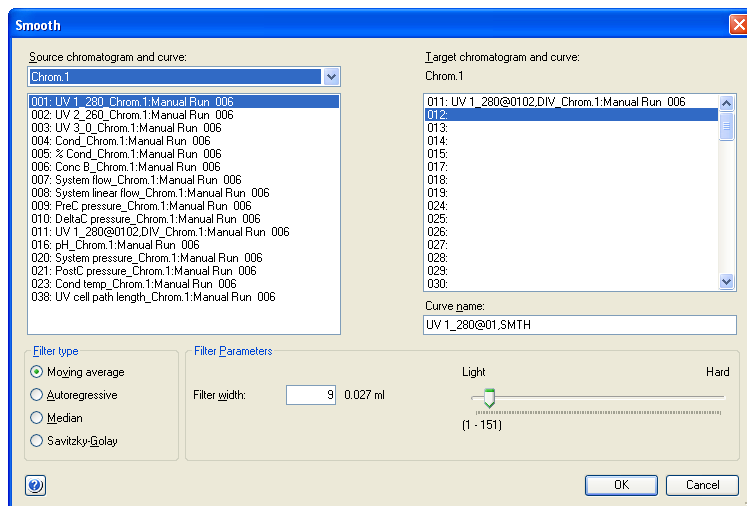


#### 2.5.9.4 曲线平滑功能

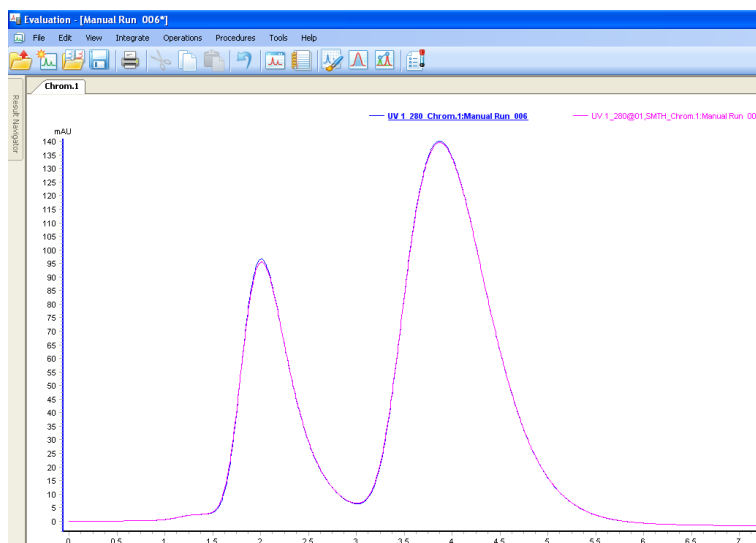
- 有时候色谱曲线中带有噪音，噪音可由几种原因引起，例如流动池脏了、空气泡、电子噪音、缓冲液不干净等等。如需对色谱图进行去除噪音处理，消除一些小杂峰，可点击 Operation > Smooth



- 2) 出现以下对话框后在左边的 Source chromatogram and curve 对话框中选中需要处理的曲线，然后在 Filter type 下选中平滑处理的方式，拖动 Light 与 Hard 之间的滑块选择一个合适的平滑度，单击 OK

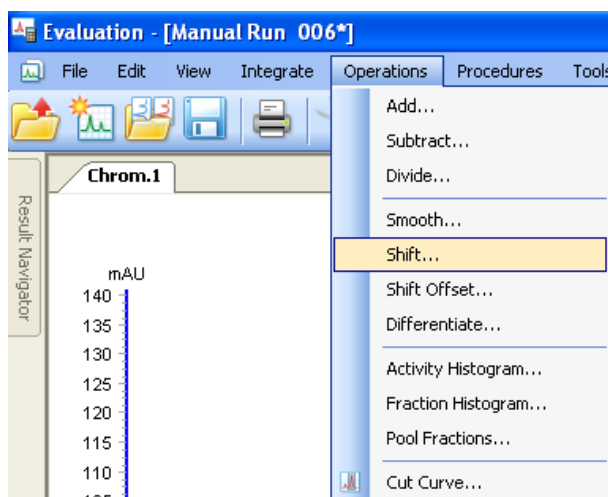


- 3) 曲线平滑性处理后将得到另一条新曲线，新曲线的后缀为 SMTH

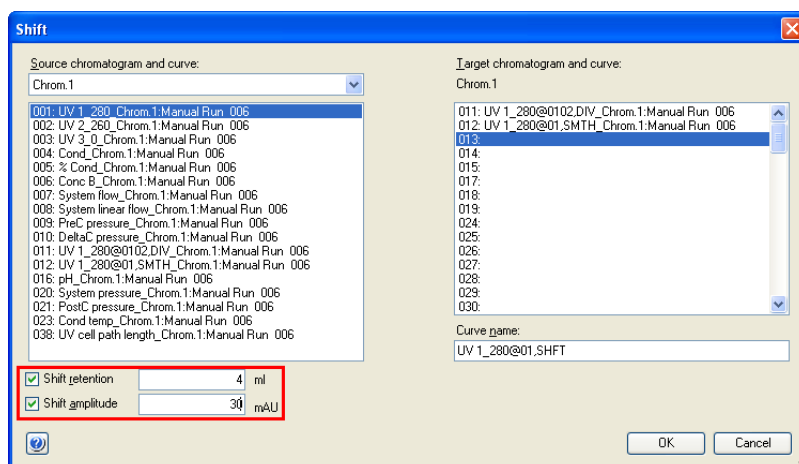


### 2.5.9.5 曲线平移

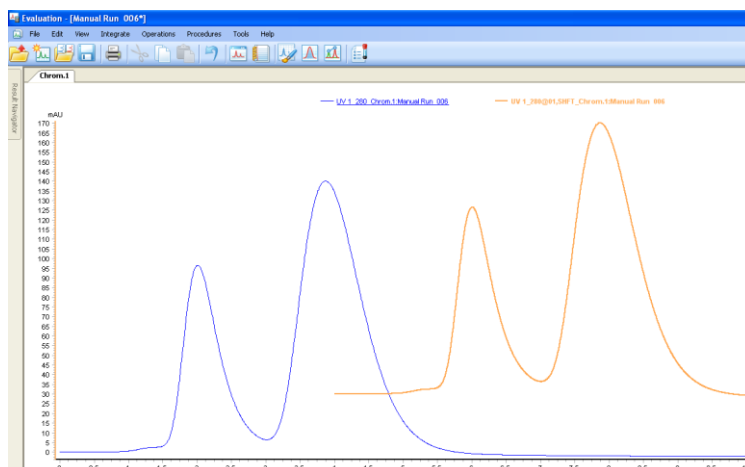
- 1) 在曲线比较时经常会遇到将某条曲线左右或上下移动，选择 Operations > Shift



- 2) 在 Source chromatogram and curve 栏中选择需要移动的曲线，在 Shift retention 或 Shift amplitude 复选框中打钩选择左右或上下移动，填入需要移动的数值，点击 OK

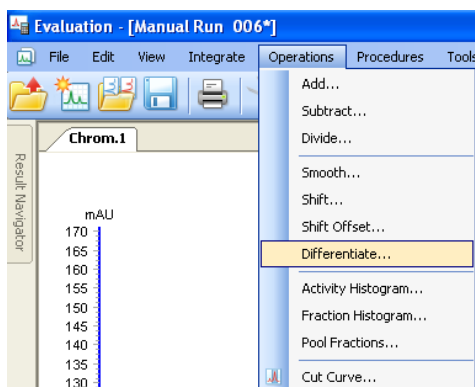


- 3) 曲线移动处理后将得到另一条新曲线，移动后的曲线会出现 SHFT 的后缀

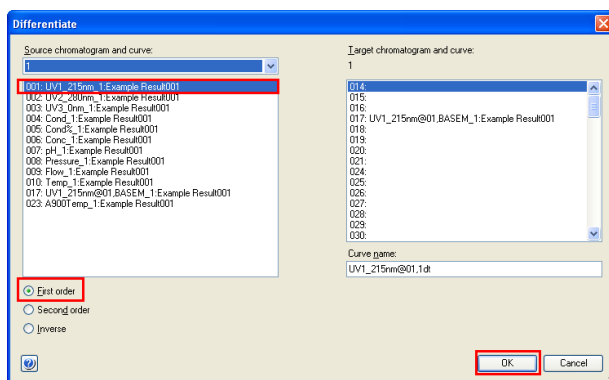


### 2.5.9.6 曲线斜率计算

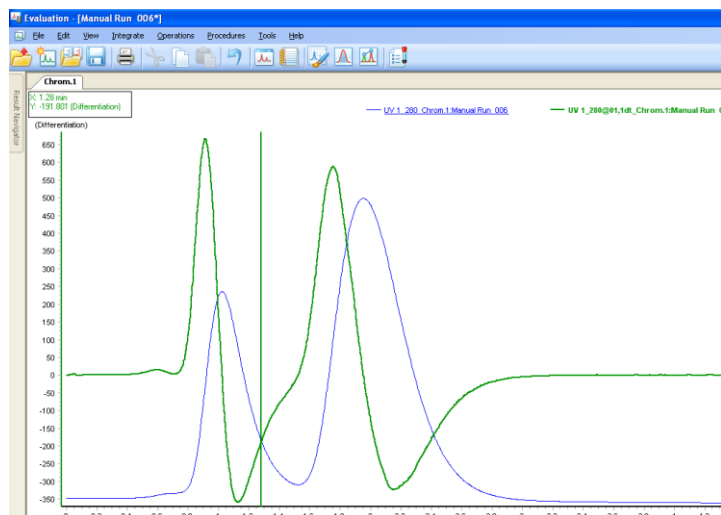
- 1) 如需要了解色谱曲线的斜率值，可以通过对曲线进行一阶求导来实现。  
在打开色谱图的情况下，选择 Operations > Differentiate



- 2) 在 Source chromatogram and curve 栏中选择需要求导的曲线，并选择一阶求导 ( First order ) ，点击 OK

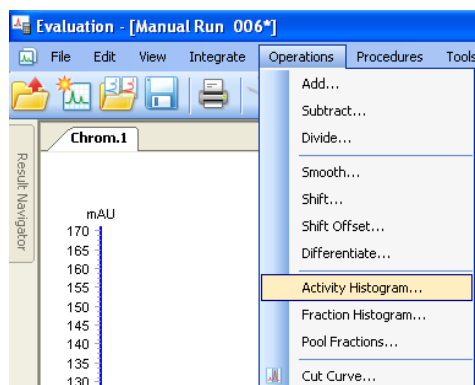


- 3) 色谱图中将出现一阶求导的曲线，曲线后缀为 dt ，该曲线上的数值即为对应曲线的斜率 ( Slope )

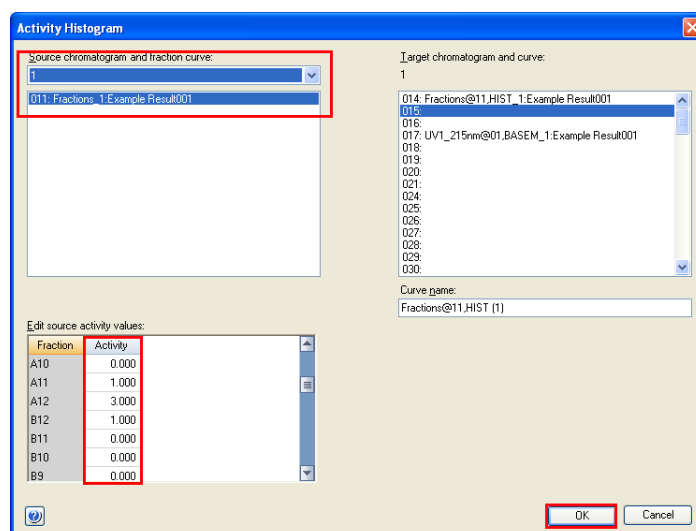


### 2.5.9.7 活性直方图

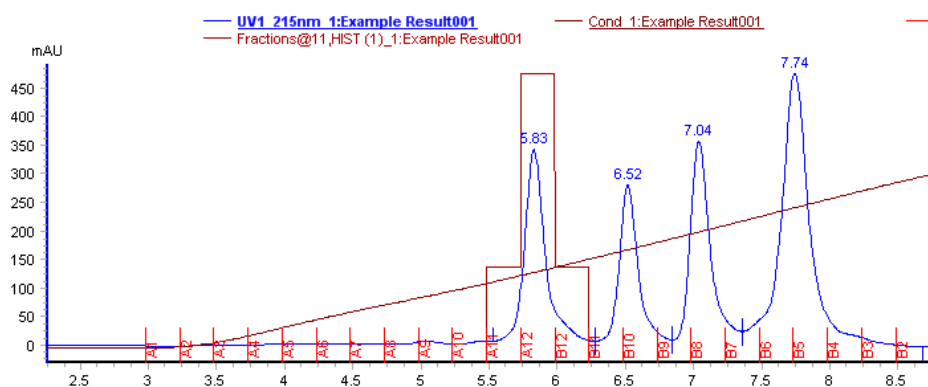
- 1) 如需将蛋白活性分析的结果数据（例如 ELISA）与 UV 曲线中峰进行对照，点击 Operations > Activity Histogram



- 2) 出现以下对话框，需要将每管的活性值输入到相对应的活性（Activity）对话框中，点击 ok

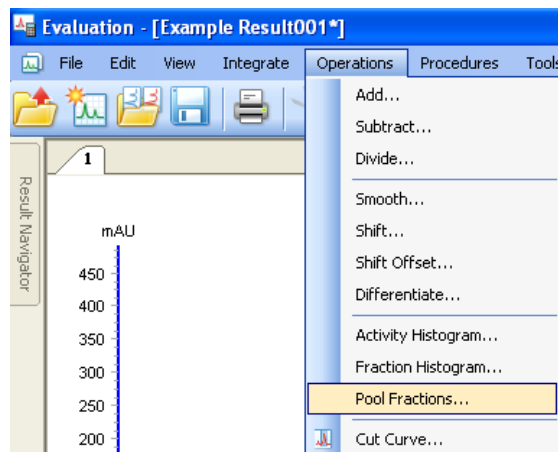


- 3) 色谱图中将出现一条蛋白活性的直方图曲线，曲线后缀为 HIST

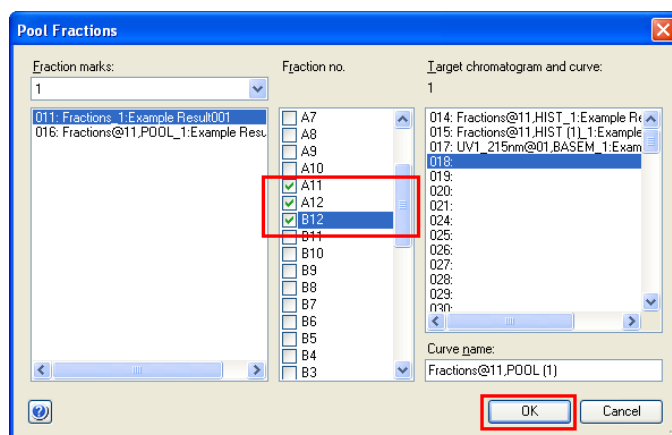


### 2.5.9.8 收集组分中的浓度计算

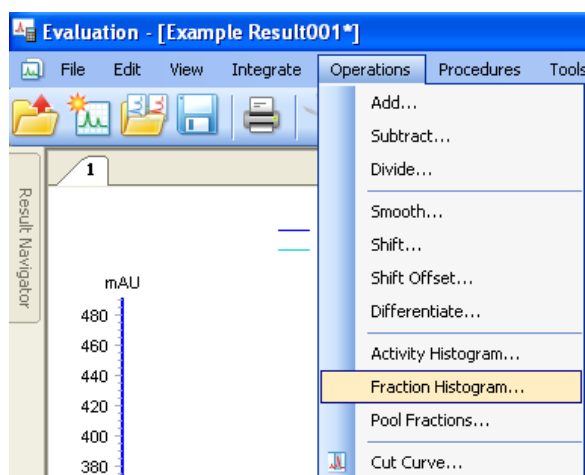
- 1) 在分离过程中，组分是按顺序收集的，首先需要将每个峰的不同收集管合并到一起，点击 Operations > Pool Fractions



- 2) 选择源曲线以及待合并的组分，点击 OK

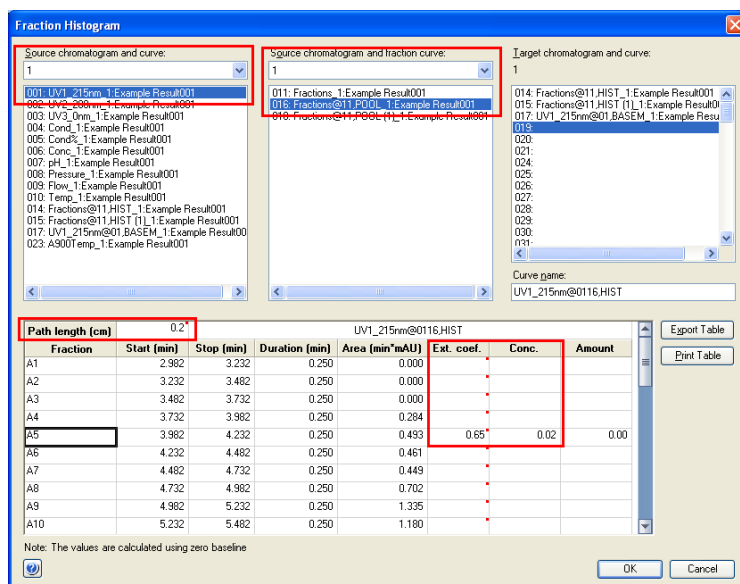


- 3) 点击 Operations > Fraction Histogram



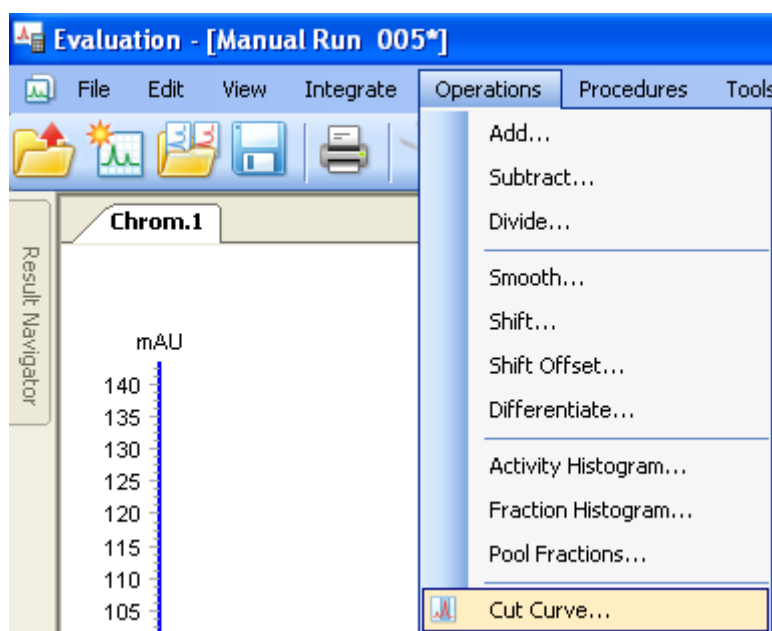


- 4) 在弹出的窗口中选中待处理的曲线和收集曲线，在 Path length 栏中输入紫外检测池的光径，并在 Ext. coef. 栏输入组分的消光系数，此时 Conc. 栏将会显示合并组分的蛋白浓度，Amount 栏将显示合并蛋白的总量

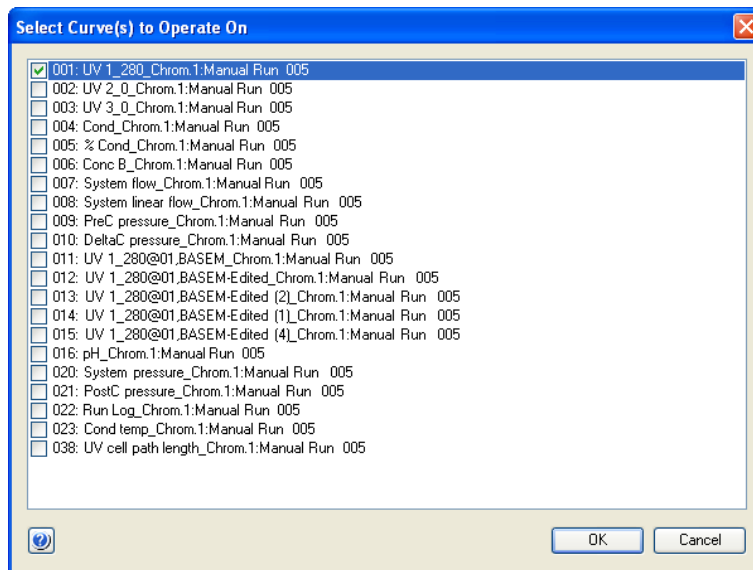


### 2.5.9.9 剪切曲线

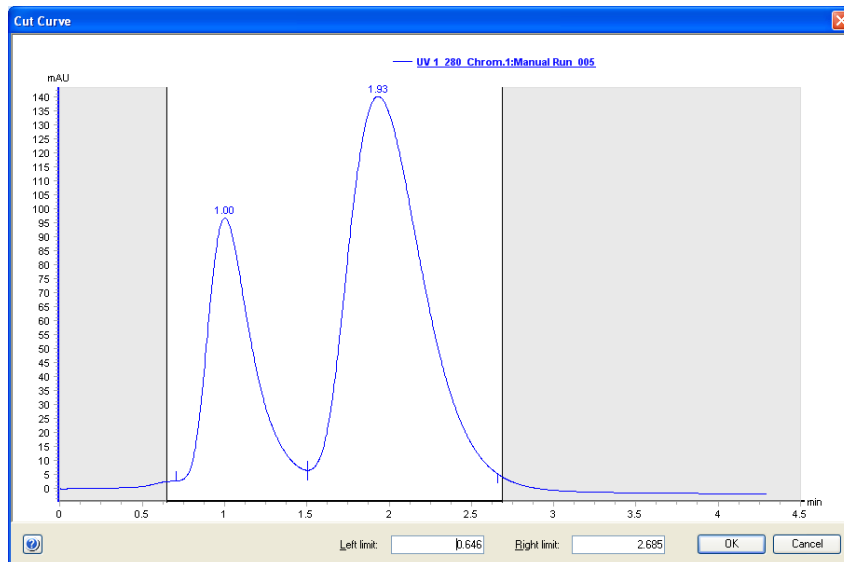
- 1) 如只需保留色谱曲线的一部分，在打开色谱图的情况下点击 Operations > Cut Curve



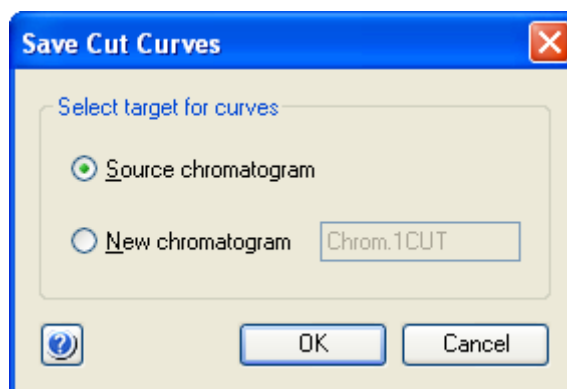
- 2) 选择待处理的曲线，点击 OK



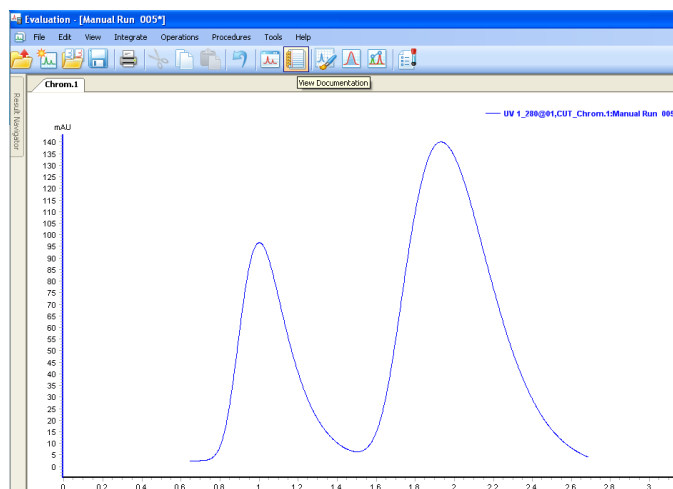
3) 用鼠标拖动左右两边的垂线限定剪切范围，点击 OK



4) 选择剪切后的曲线保存位置

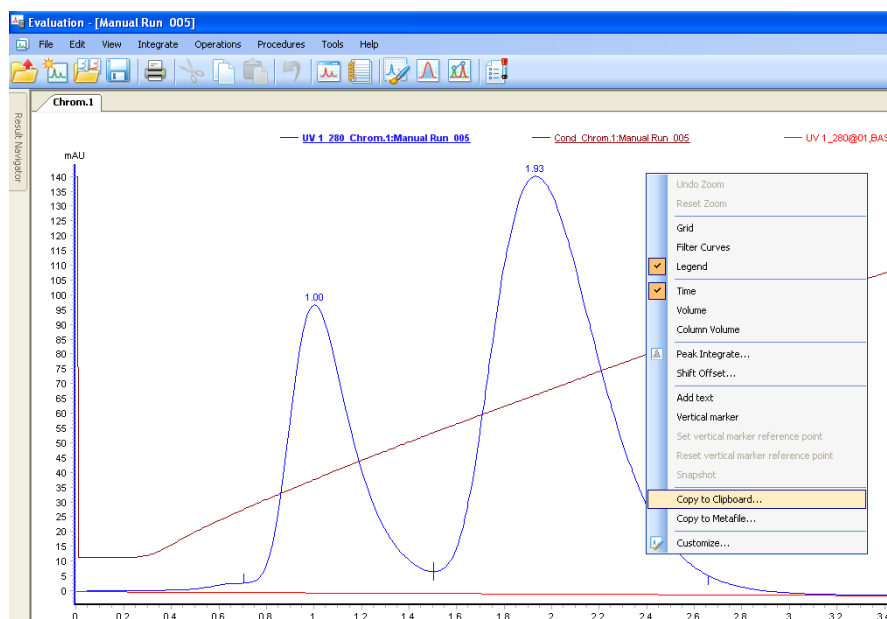


5) 点击 OK 保存



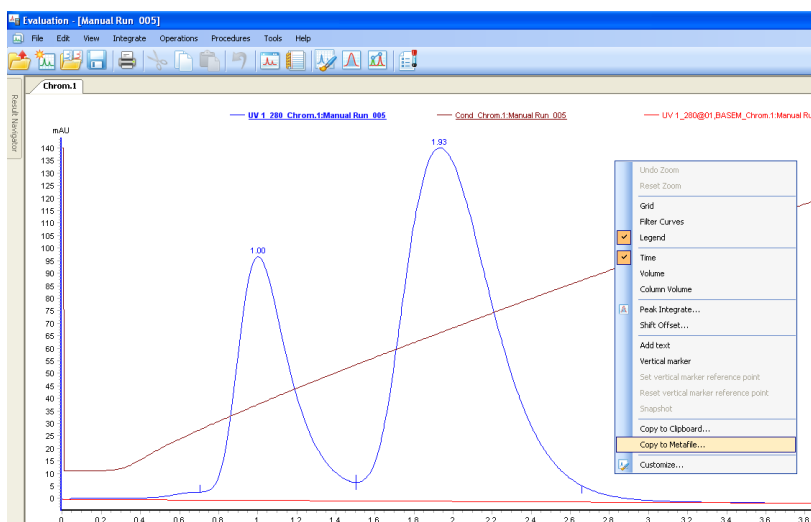
### 2.5.10 结果导出

1) 如需将分析结果的图片从软件中导出到 Office 中，在曲线窗口中点击右键，选择 Copy to Clipboard

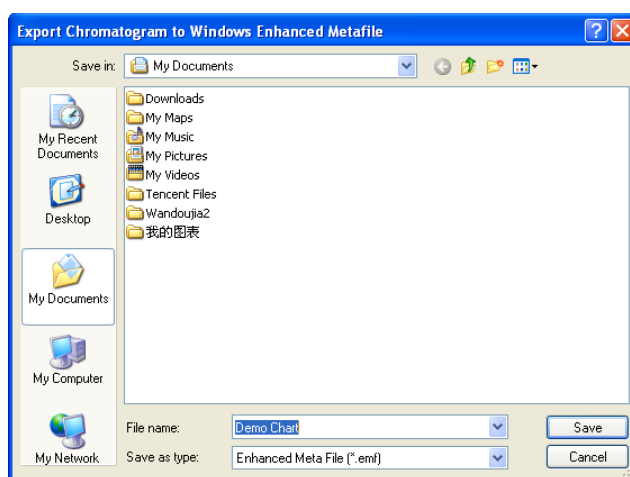


在 Office 文档或图片编辑软件中执行粘贴命令就可以将曲线复制到相应的文档中

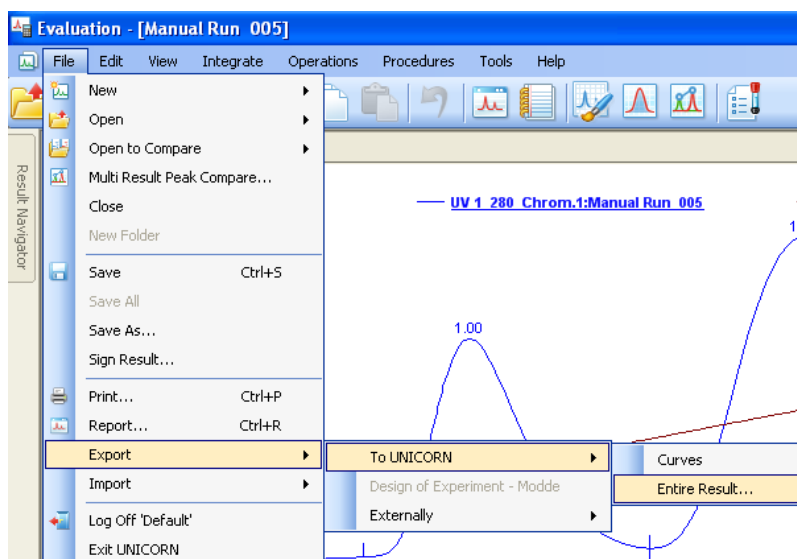
2) 如需将分析结果以图片形式导出，可在曲线窗口中点击右键，选择 Copy to Metafile



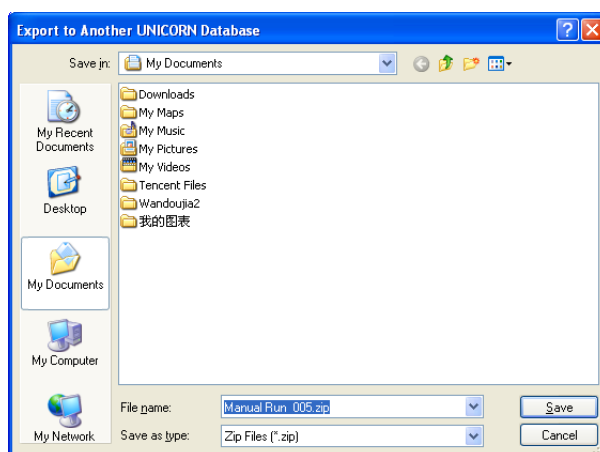
选择图片存储路径以及图片格式进行保存



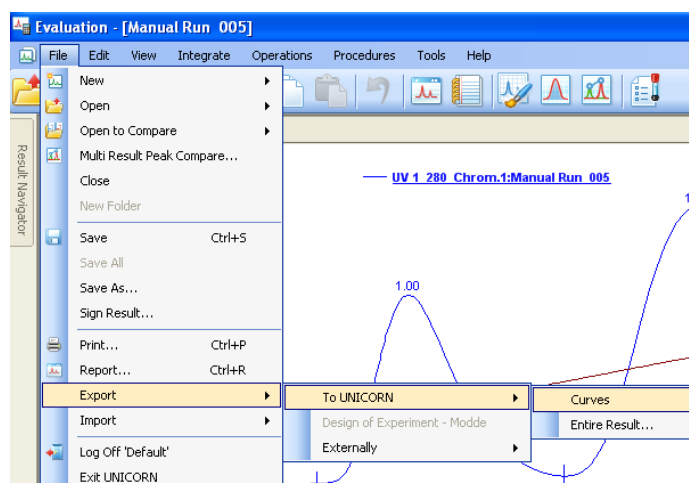
3) 如需将色谱图以原始数据形式导出，在 File 下拉菜单中选择 Export > To UNICORN > Entire Result



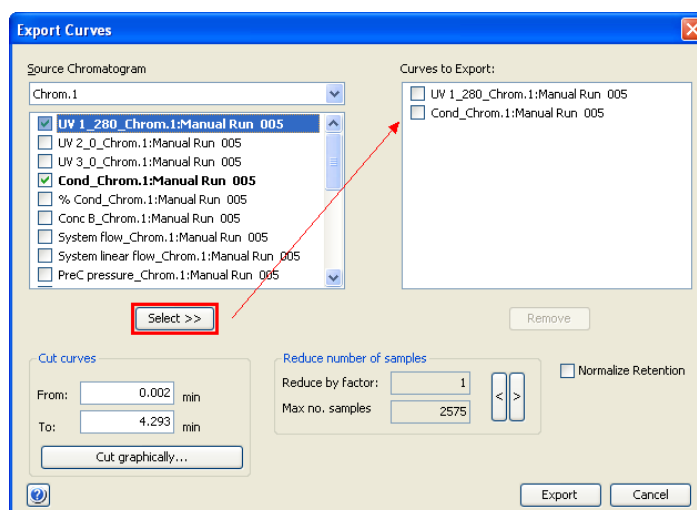
选择保存的位置，点击 Save 执行



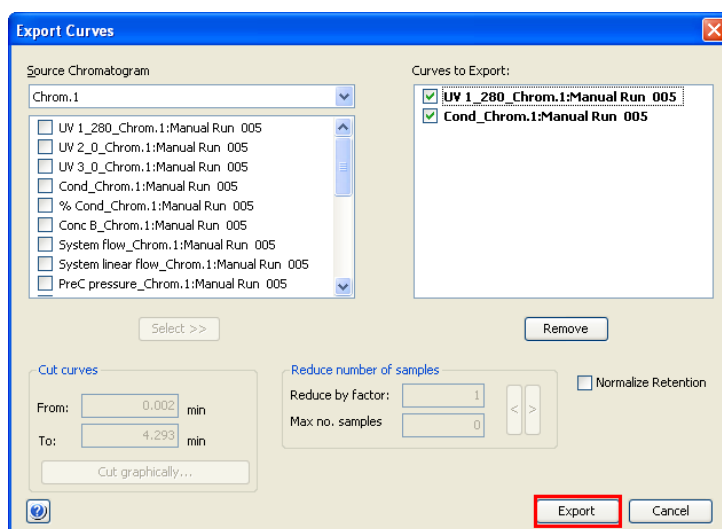
- 4) 如只需导出色谱结果中的部分曲线数据，可在 File 下拉菜单中选择 Export > To UNICORN > Curves



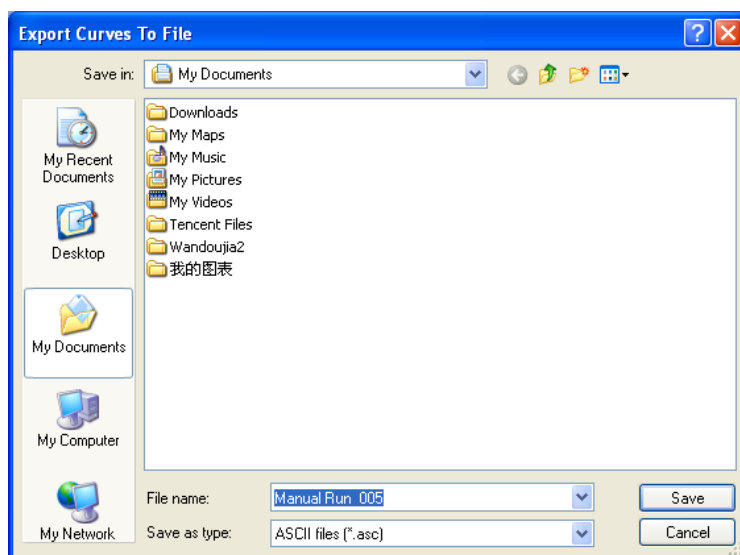
在弹出的窗口中选择需要导出的数据，点击 Select



再次勾选要导出的曲线，点击 Export



选择数据存储路径、文件名，点击 Save 导出



### 3. 实验操作

#### 3.1 使用脱盐柱进行蛋白缓冲液的置换

##### 3.1.1 实验目的

- 使用脱盐柱对细胞破碎后的表达上清液进行缓冲液置换，使样品能更有效地结合在离子交换柱上
- 学习使用手动命令进行实验

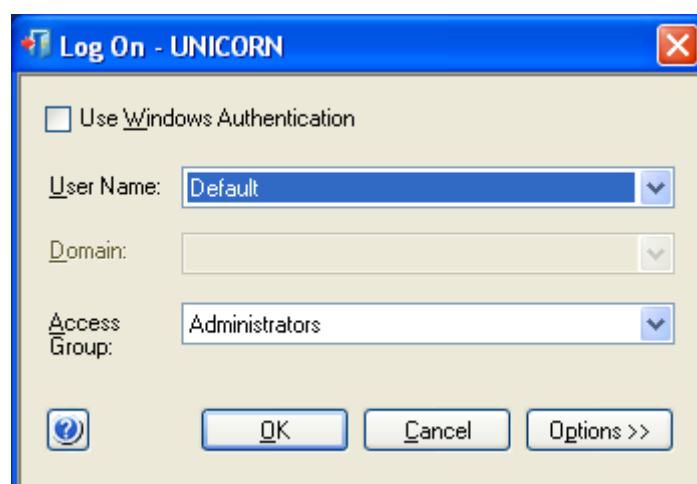
##### 3.1.2 实验材料

- 层析柱：5 ml Hitrap desalting column 2 根
- 缓冲液: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 其余溶液：去离子水；20% 乙醇水溶液（v : v）
- 实验耗材：5 ml 注射器，2 ml 样品环，15 ml 离心管
- 待分离蛋白样品：大肠杆菌表达的带 6 X His 标签的重组绿色荧光蛋白 GFP (His-GFP)，经 0.22  $\mu\text{m}$  针头滤器过滤

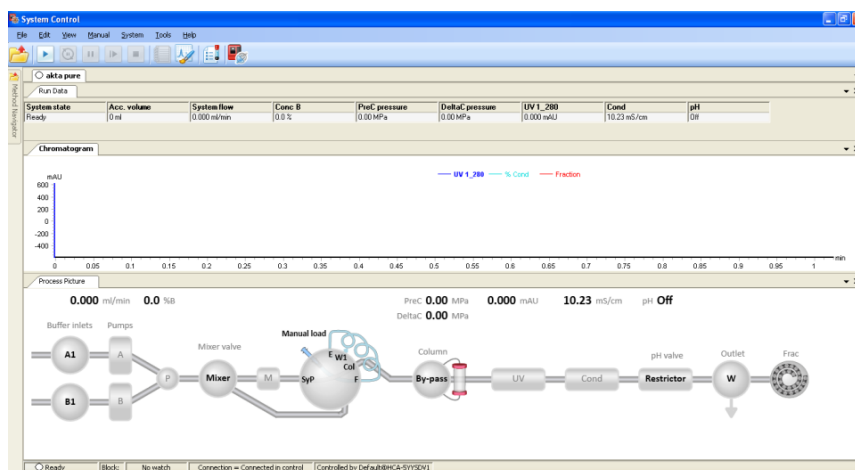
##### 3.1.3 实验准备

###### 3.1.3.1 开机

- 1) 先打开 ÄKTApure 电源，控制面板上的 power 灯稳定不再闪烁时，打开电脑，双击打开 UNICORN 6 软件

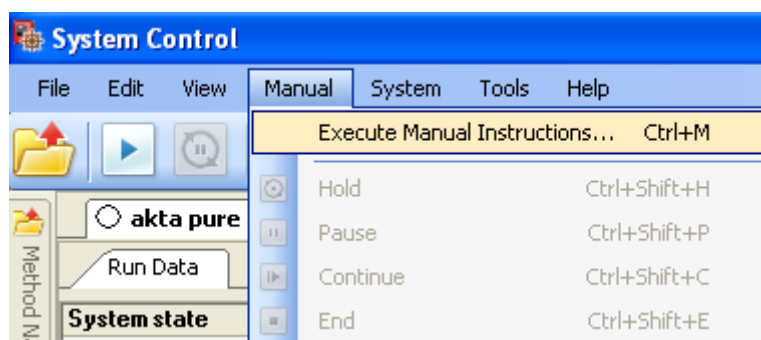


- 2) 点击 OK 进入软件，打开系统控制（System Control）窗口

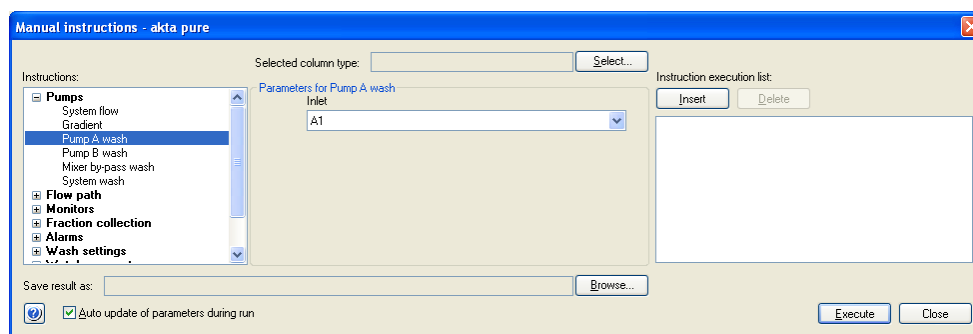


### 3.1.3.2 泵冲洗

- 1) 将缓冲液管 A1 插入到 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液中，在 System Control 窗口选择 Manual > Execute Manual Instructions



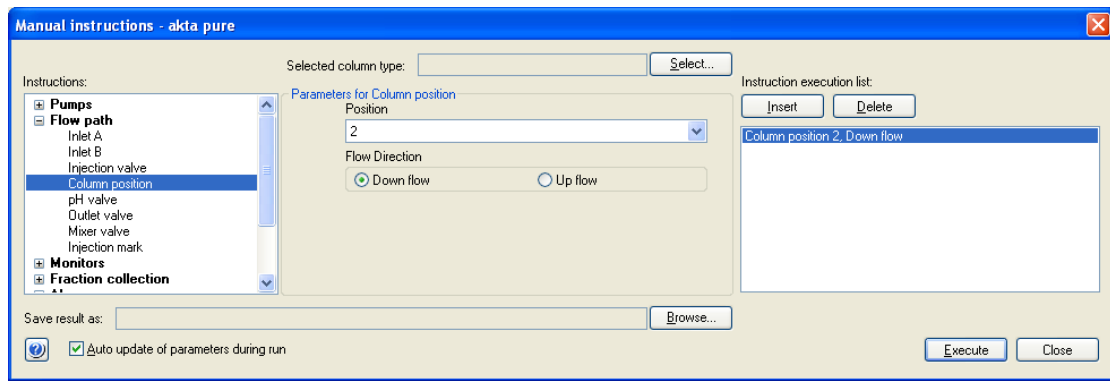
- 2) 在跳出的在 Manual instruction 窗口中选择 Pumps > Pump A wash，选择 Inlet 为 A1，点击 Execute，进行泵冲洗



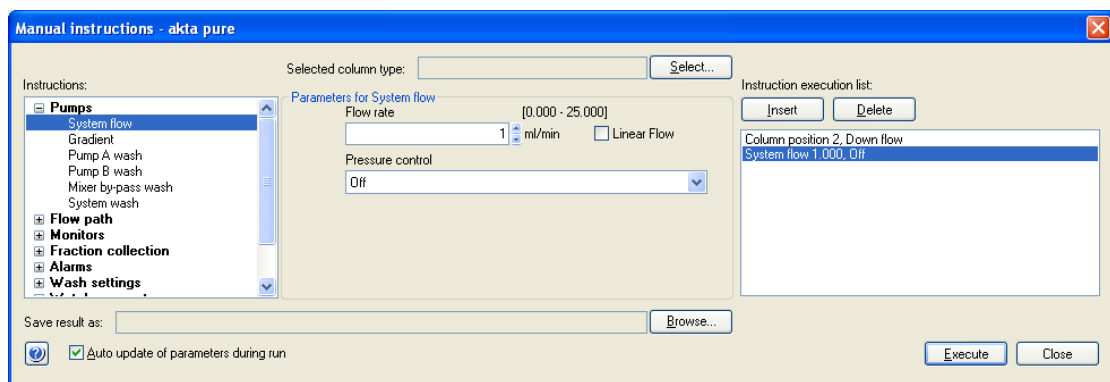
### 3.1.3.3 安装柱子

- 1) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Flow path > Column position，按连接需要选择柱位，例如选择 Position 2，选择溶液流向为 Down flow，点击 Insert

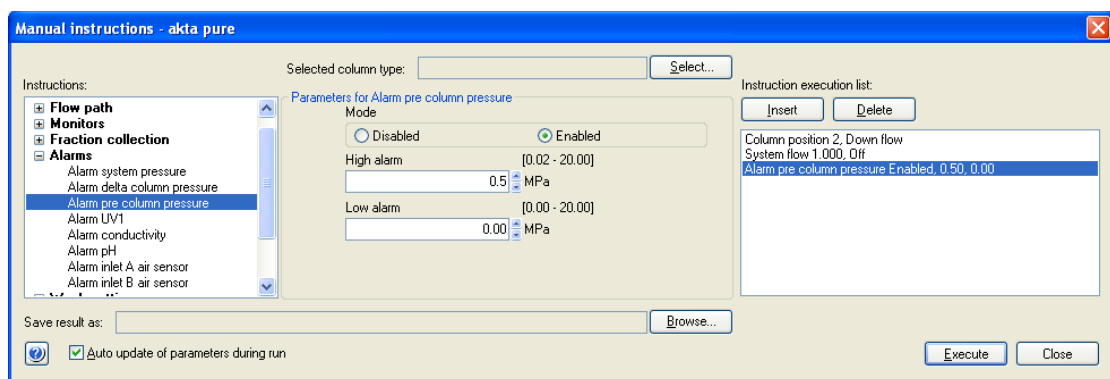




- 2) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Pumps > System flow, 设置 Flow rate 为 0.5-1 ml/min，点击 Insert

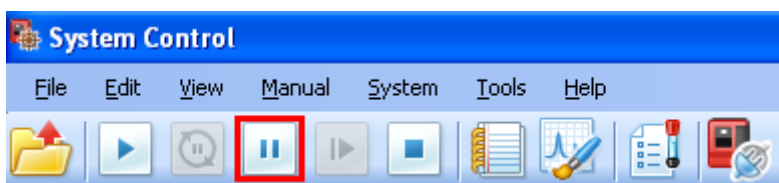


- 3) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Alarms > Alarm pre column pressure，设置 High alarm 为 0.3 MPa，点击 Insert，然后点击 Execute 执行



- 4) 在柱位阀 2A 口连接上一根 PEEK 连接管
- 5) 待连接管的出口有持续的液体流出且无气泡的情况下，除去层析柱的上堵头，将层析柱柱头与连接管出口相连，但不要拧紧

- 6) 除去层析柱下堵头，待层析柱出口有持续的液体流出，且无气泡的情况下，将层析柱出口连接到柱位阀的 2B 口上
- 7) 拧紧上接头，将流速调整为 5 ml/min，对层析柱进行平衡至少 5 个柱体积
- 8) 平衡完毕后，单击 Pause 暂停



### 3.1.3.4 样品环的安装与清洗

在上样阀的 LoopF 与 LoopE 口连接上 2 ml 的样品环，用注射器抽取缓冲液，连接到上样阀的 Syr 口上，推入缓冲液以清洗样品环，可重复几次

### 3.1.3.5 上样

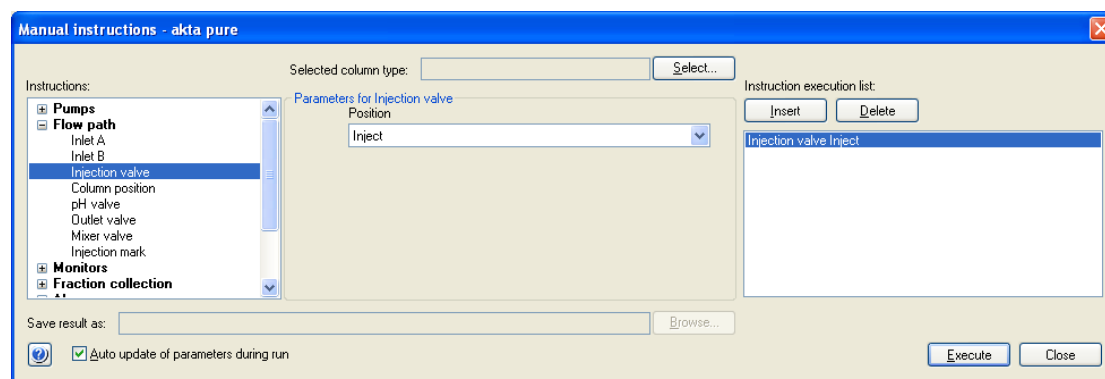
用注射器吸取约 2.5 ml 的样品，排除气泡后，连接到上样阀的 Syr 口上，将注射器内的样品推入，并将注射器保留在上样阀上

### 3.1.4 准备收集器

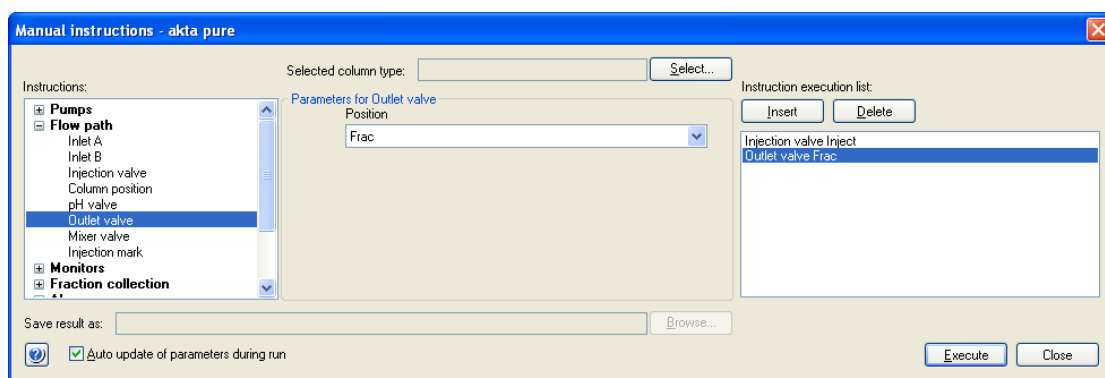
在收集器内按顺序放入一定数量的 15 ml 收集管，调整悬臂到 1 号位

### 3.1.5 运行实验

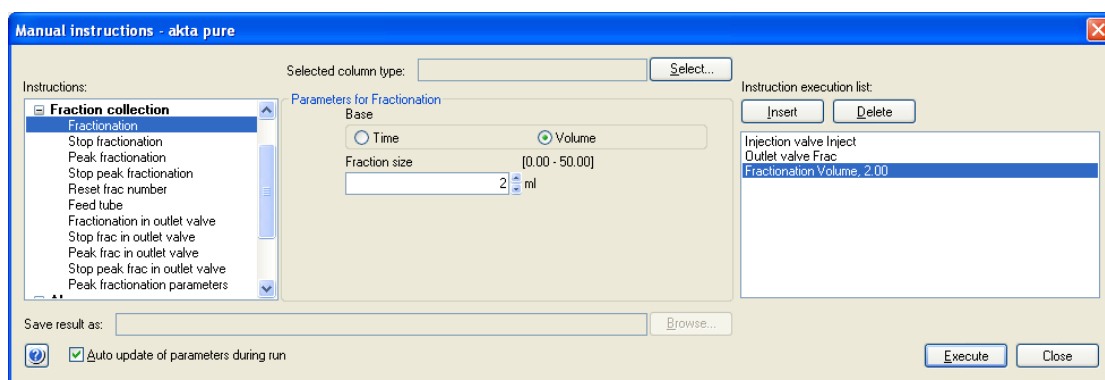
- 1) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Flow path > Injection valve，上样阀选择为 Inject 状态，点击 Insert



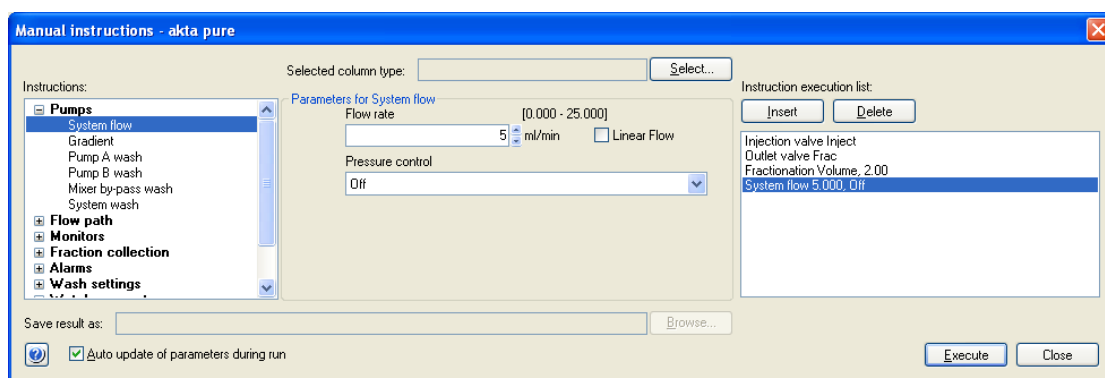
- 2) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Flow path > Outlet valve，选择出口阀位为 Frac



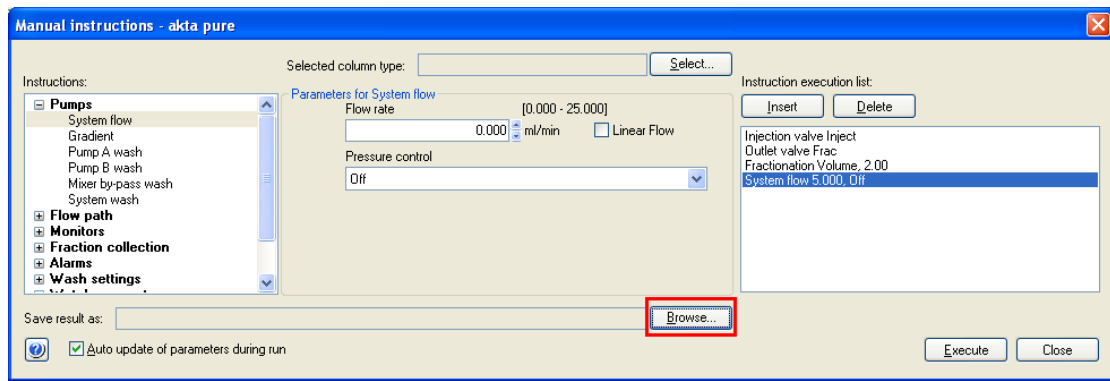
- 3) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Fraction collection > Fractionation，设置 Fraction size 为 2 ml，点击 Insert



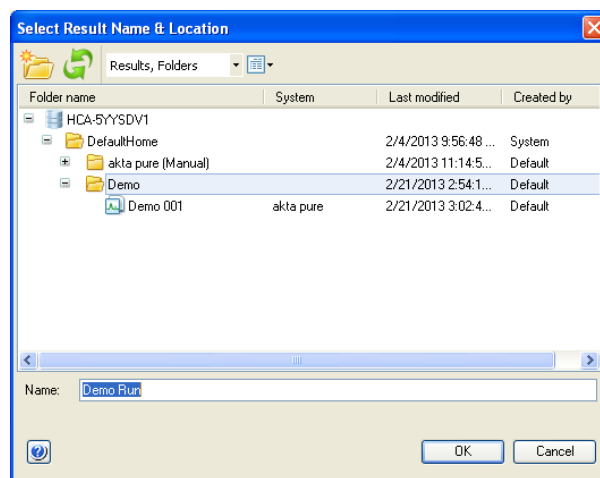
- 4) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Pumps > System flow, 设置 Flow rate 为 5 ml/min，点击 Insert



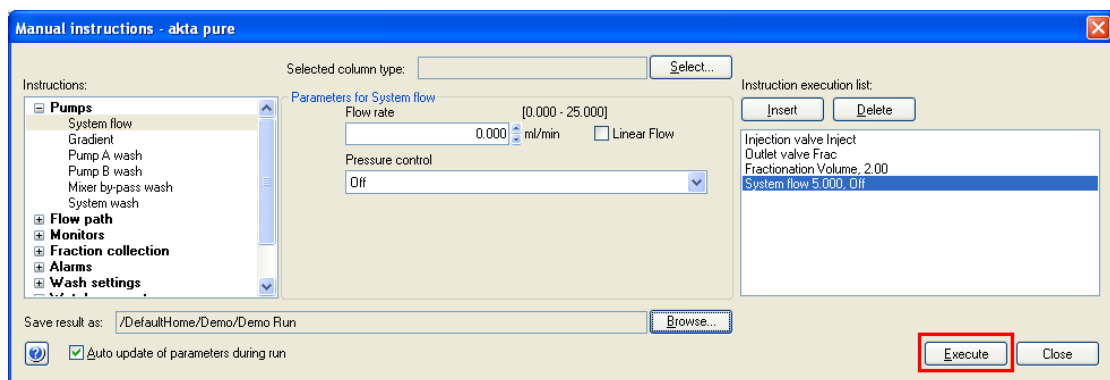
- 5) 在 Manual instruction 窗口中，点击 Save result as 后面的 Browse



6) 在弹出的对话框中选择结果存储位置，输入文件名，点击 OK



7) 点击 Execute 执行上述命令

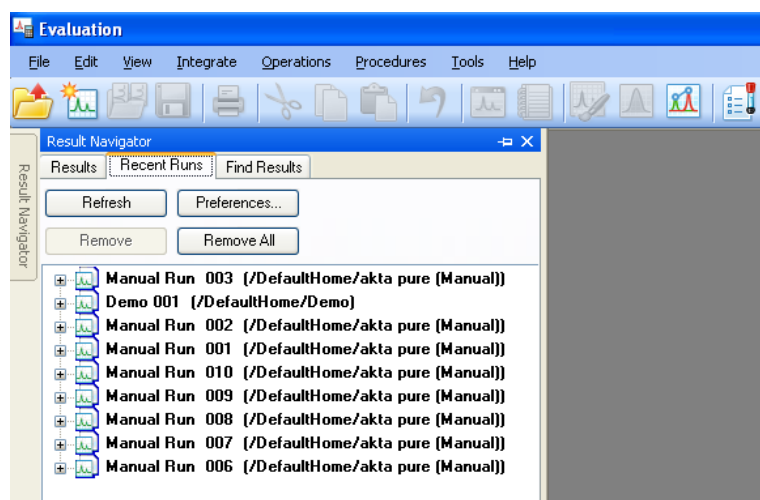


8) 约 3 min 后，待紫外与电导峰均出现后，点击工具栏中的 End，停止实验



### 3.1.6 结果分析与讨论

1) 切换到 Evaluation 窗口中，选择保存的结果并打开



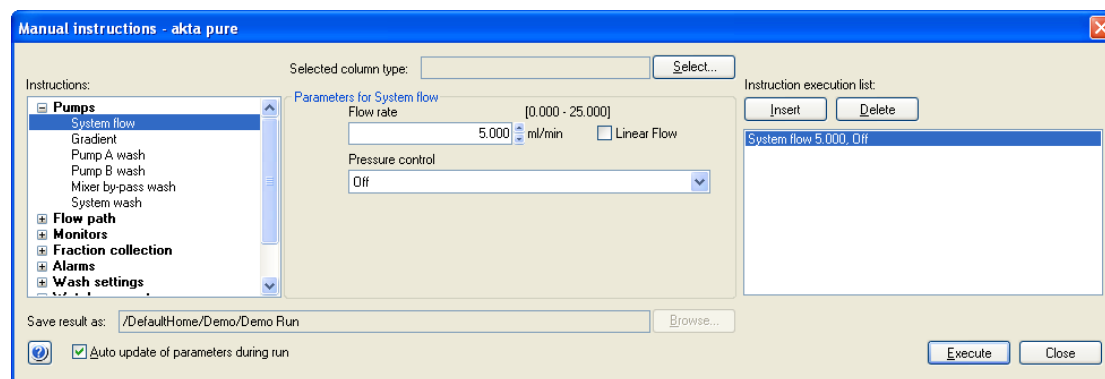
2) 现场讨论：

- 紫外与电导峰分别代表什么？
- 哪些收集管中包含样品？

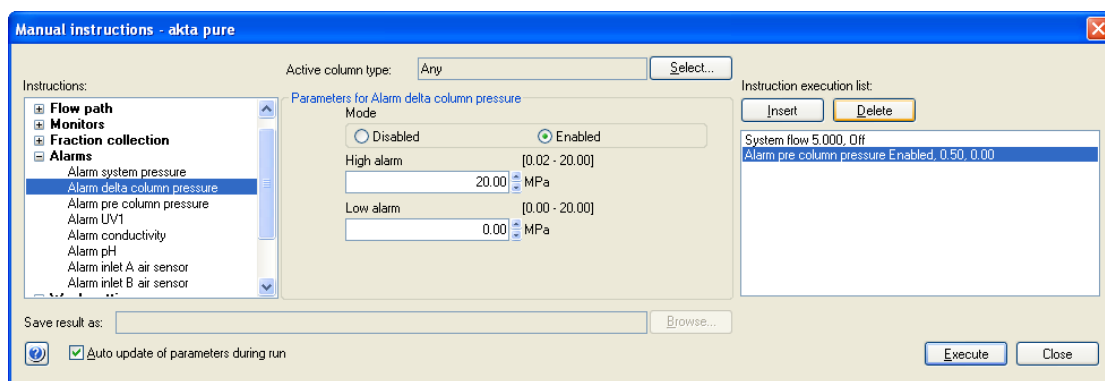
### 3.1.7 清洗与储存

程序运行结束后需要手动清洗系统和层析柱并保存将二者保存在 20% 乙醇中。

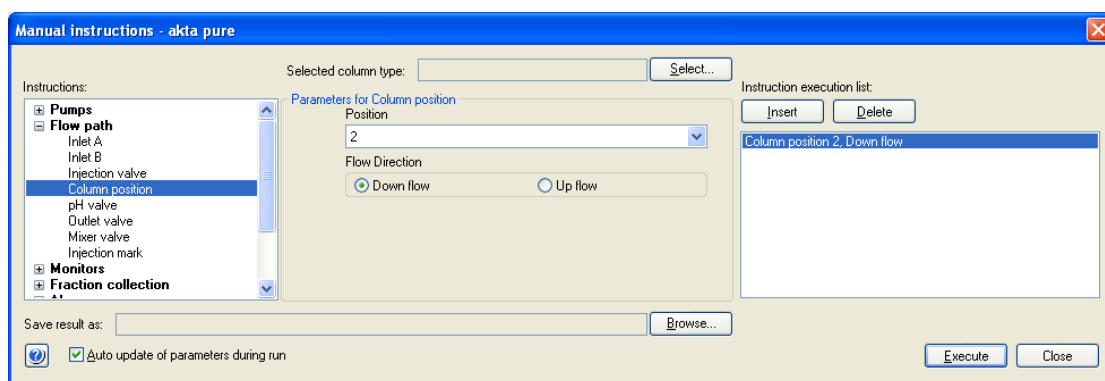
1) 将缓冲液 A1 的入口放入经脱气的去离子水中，进行泵清洗（见 2.2.3），待泵清洗结束后，用去离子水清洗柱子：在 Manual instruction 窗口中，选择 Pump > System flow，设置 Flow rate 为 5 ml/min，点击 Insert



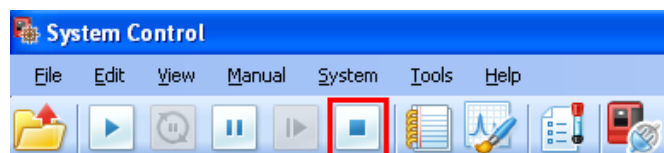
2) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Alarms > Alarm pre column pressure，设置 High alarm 为 0.3 MPa，点击 Insert，然后点 Execute



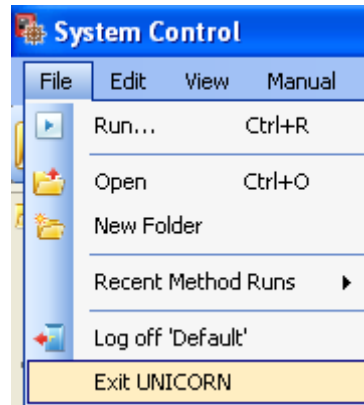
- 3) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Flow path > Column position，选择 Position 2，选择溶液流向为 Down flow，点击 Execute



- 4) 运行 5 倍柱体积后，暂停
- 5) 将缓冲液 A1 的入口放入经脱气的 20% 乙醇水溶液中，进行泵清洗（见 2.2.3）
- 6) 待泵冲洗结束后，机器会自动继续之前 5 ml/min 的流速，用 20% 乙醇水溶液清洗柱子
- 7) 待运行 5 倍柱体积后，先拧松柱子上接头，将下接头从柱位阀上拧下，并拧上柱子的下堵头
- 8) 拧下柱子上面的接头并拧上柱子的上堵头
- 9) 在 System Control 界面命令栏中点击 End，结束清洗



10) 在任一 UNICORN 6 软件窗口中点击 File > Exit UNICORN 退出软件



11) 关闭 ÄKTApure 电源

## 3.2 离子交换层析实验

### 3.2.1 实验目的

- 使用阴离子交换实现蛋白的分离纯化
- 学会使用 Method Editor 进行实验方法的编程
- 学会使用 Scouting 功能进行层析柱的筛选

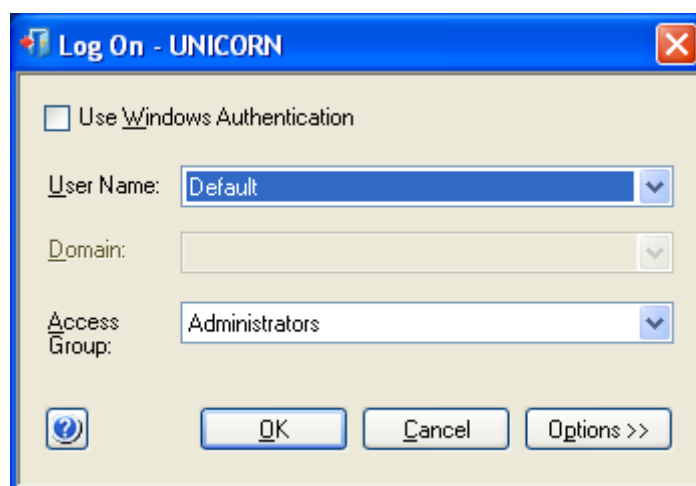
### 3.2.2 实验材料

- 层析柱：Hitrap Canto Q 1 ml，Hitrap Q FF 1 ml，Hitrap DEAE FF 1 ml
- 缓冲液 A: 20 mM Tris, pH 8.0
- 缓冲液 B: 20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.0
- 其余溶液：去离子水；20% 乙醇水溶液 (v : v)
- 实验耗材：5 ml 注射器，5 ml 样品环，15 ml 离心管
- 待分离蛋白样品：经过缓冲液置换后表达有 His-GFP 的大肠杆菌发酵液样品

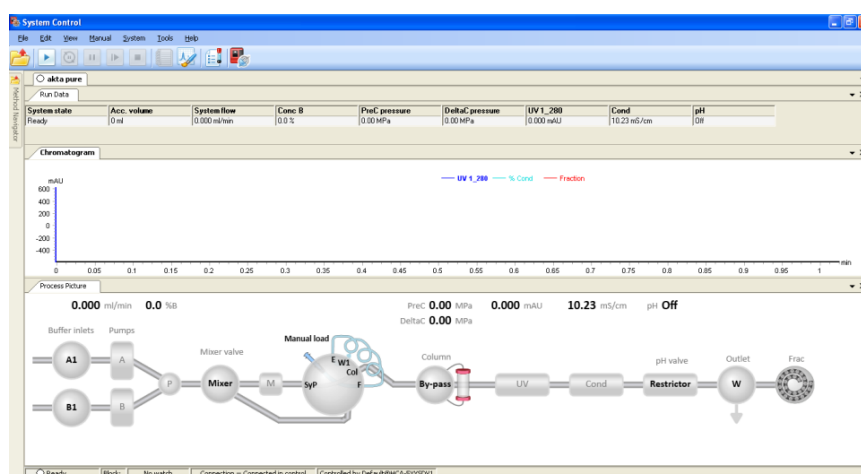
### 3.2.3 实验准备

#### 3.2.3.1 开机

- 1) 先打开 ÄKTApure 电源，控制面板上的 power 灯稳定不再闪烁时，打开电脑，双击打开 UNICORN 6 软件

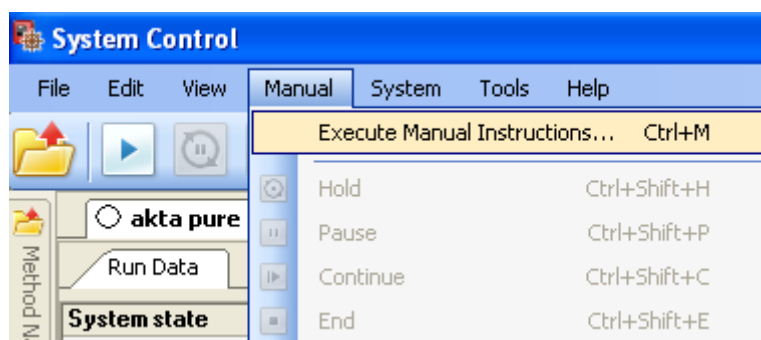


2) 点击 OK 进入软件，打开系统控制（System Control）窗口



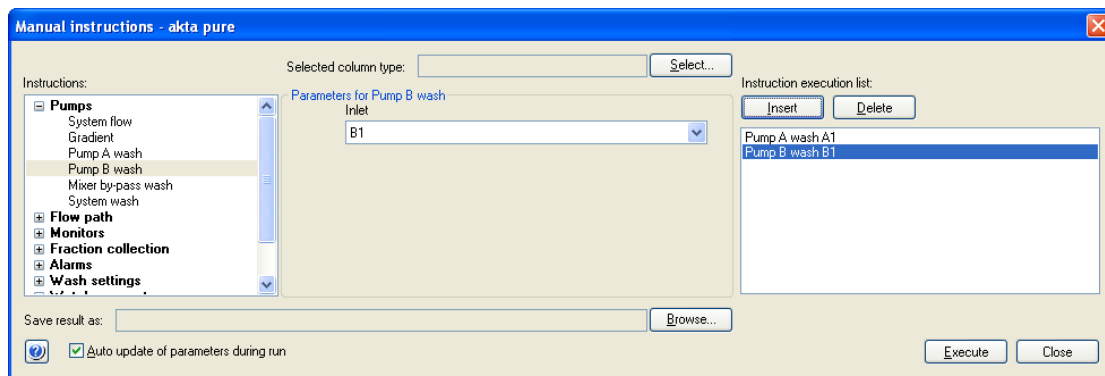
### 3.2.3.2 泵冲洗

1) 将缓冲液管 A1 插入到缓冲液 A 中，将缓冲液管 B1 插入到缓冲液 B 中，在 UNICORN 6 软件的 System Control 界面选择 Manual > Execute manual Instructions



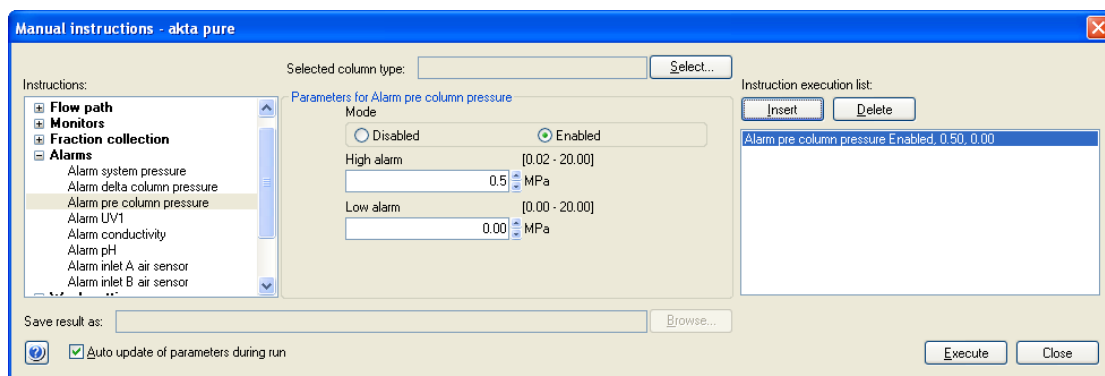


- 在跳出的 Manual instructions 窗口中，选择 Pumps > Pump A wash，选择 Inlet 为 A1，点击 Insert；再选择 Pumps > Pump B wash，选择 Inlet 为 B1，点击 Insert，选择 Execute 进行泵冲洗

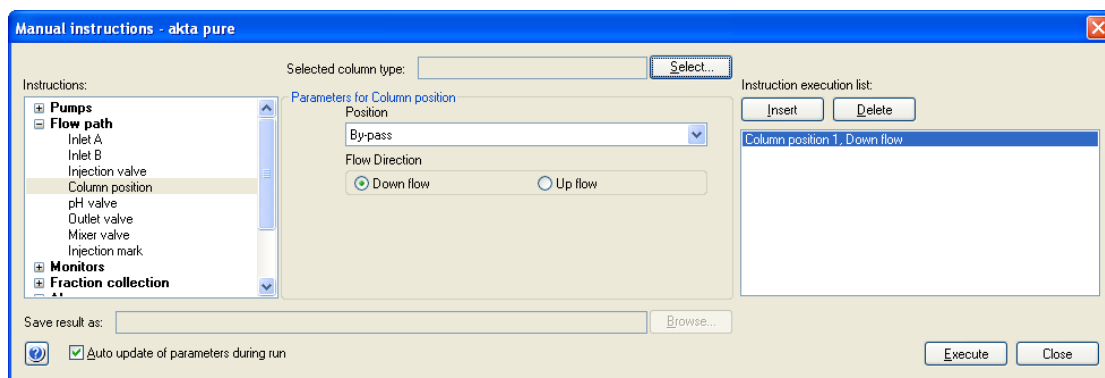


### 3.2.3.3 安装柱子

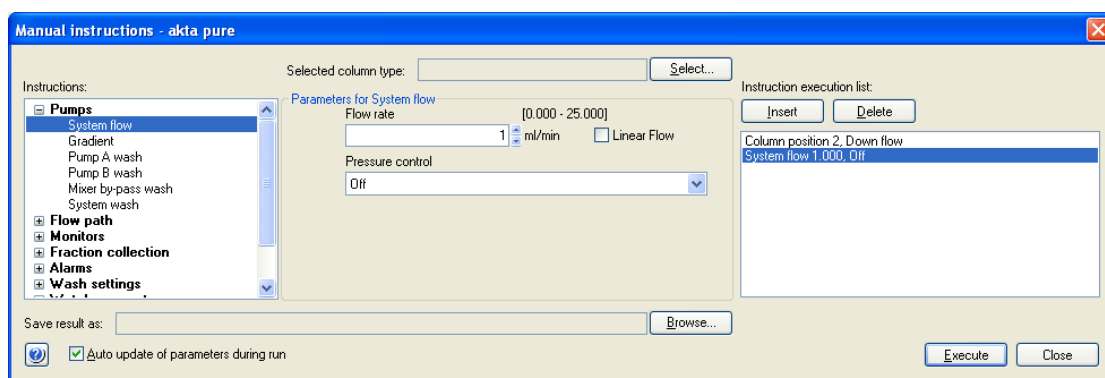
- 在 Manual instruction 窗口中，选择 Alarms > Alarm pre column pressure，设置 High alarm 为 0.3 MPa，点击 Insert，然后点 Execute



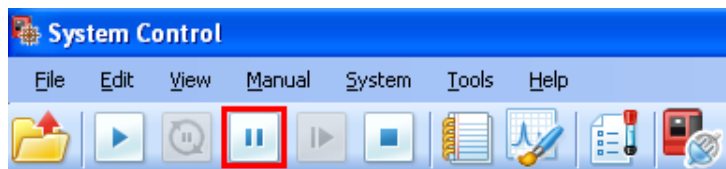
- 在 Manual instructions 窗口中，选择 Flow path > Column position，按连接需要选择柱位，如选择 Position 1，点击 Insert



- 3) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Pumps > System flow, 设置 Flow rate 为 0.5-1 ml/min，点击 Insert 并执行



- 4) 在柱位阀 1A 口连接上一根 PEEK 连接管
- 5) 待连接管的出口有持续的液体流出且无气泡的情况下，除去层析柱的上堵头，将层析柱柱头与连接管出口相连，但不要拧紧
- 6) 除去层析柱下堵头，待层析柱出口有持续的液体流出，且无气泡的情况下，将层析柱出口连接到柱位阀的 1B 口上
- 7) 拧紧上接头，单击 Pause 暂停



- 8) 重复执行步骤 2)-7)，在柱位阀 2 号位、3 号位上连接好另外两根层析柱

### 3.2.3.4 样品环的安装与清洗

在上样阀的 LoopF 与 LoopE 口连接上 5 ml 的样品环，用注射器抽取缓冲液，连接到上样阀的 Syr 口上，推入缓冲液以清洗样品环，可重复几次

### 3.2.3.5 上样

用注射器吸取稍大于 5 ml 的样品，排除气泡后，连接到样品阀的 Syr 口上，将注射器内的样品推入，并将注射器保留在样品阀上

### 3.2.3.6 收集器准备

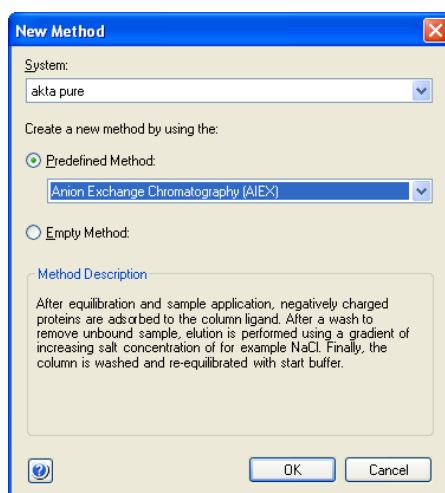
在收集器内按顺序放入一定数量的 15 ml 离心管，调整悬臂到 1 号位

### 3.2.4 方法编辑

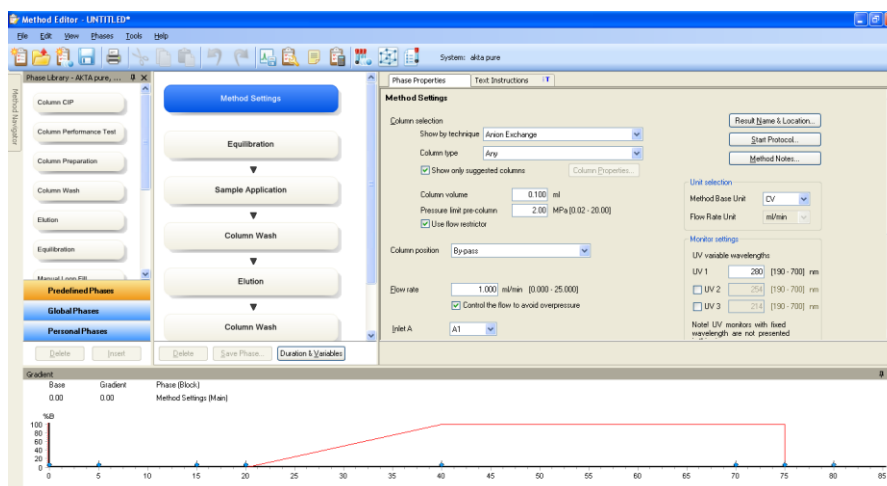
- 1) 打开 UNICORN 6 软件的 Method Editor 窗口，点击命令栏中的 Create a new method 图标



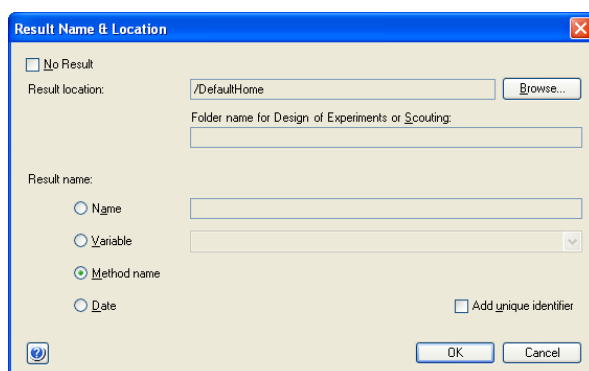
- 2) 在跳出的 New Method 对话框中 Predefined Method 下选择 Anion Exchange Chromatography (AIEX)，点击 OK



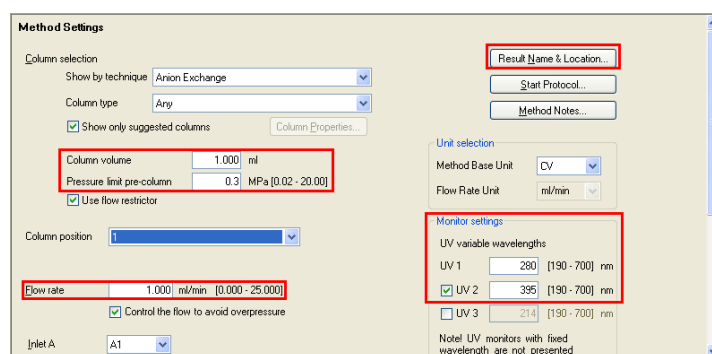
进入方法编辑界面



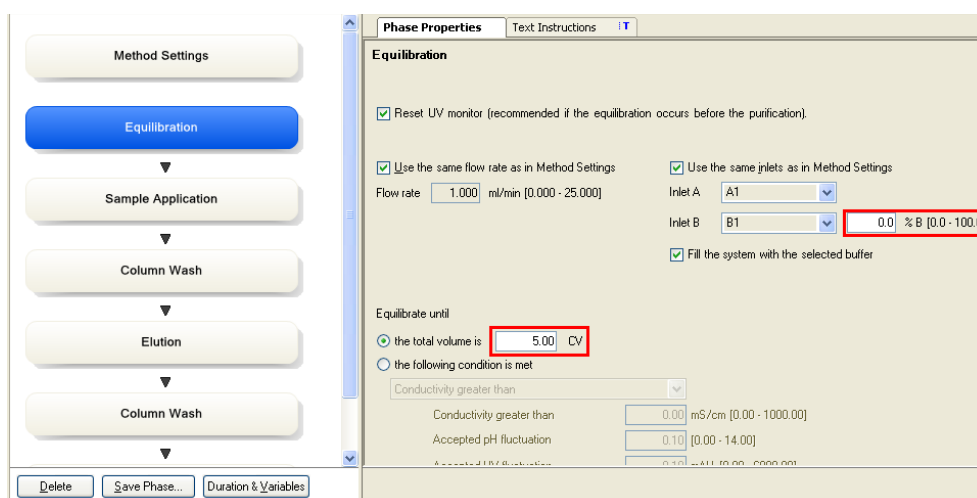
- 3) 在 Method Settings 编辑界面中，选择 Result name & Location 设置结果名称及存贮位置



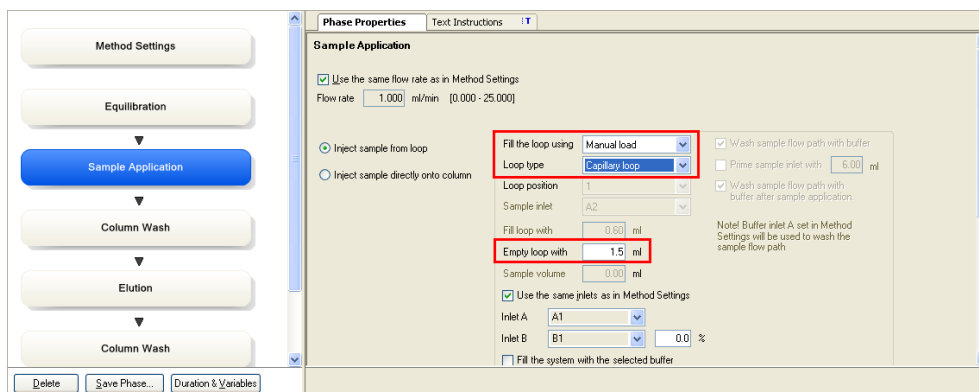
选择 Column type 为 Any，Column volume 为 1 ml，Pressure limit pre-column 为 0.3 MPa，Column position 为 1，Flow rate 1 ml/min，激活紫外检测 UV2，设置为 395 nm



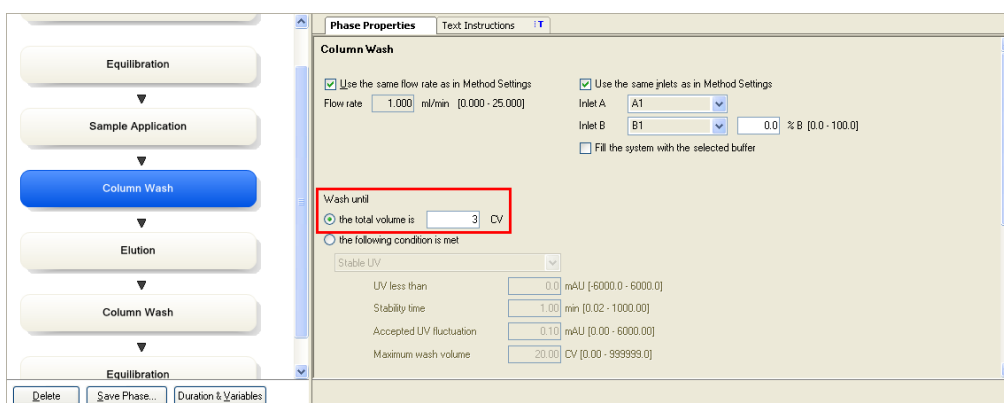
- 4) 点击 Equilibration 进入平衡阶段设置，平衡流速、缓冲液入口不变，平衡时缓冲液 B 所占的比例为 0%，输入平衡体积 5 CV



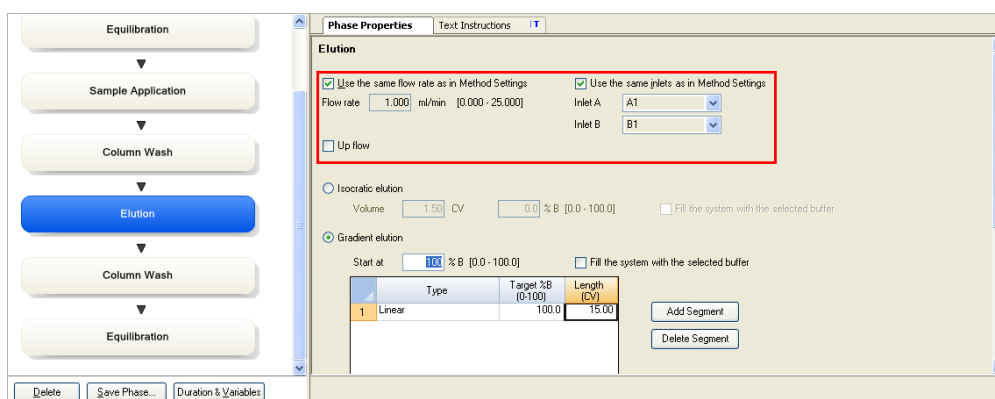
- 5) 点击 Sample Application 进入上样阶段设置，仍然使用方法设置流速 1 ml/min，选择上样的方式为 Manual load，Loop type 为 Capillary loop，输入清空样品环的体积 1.5 ml



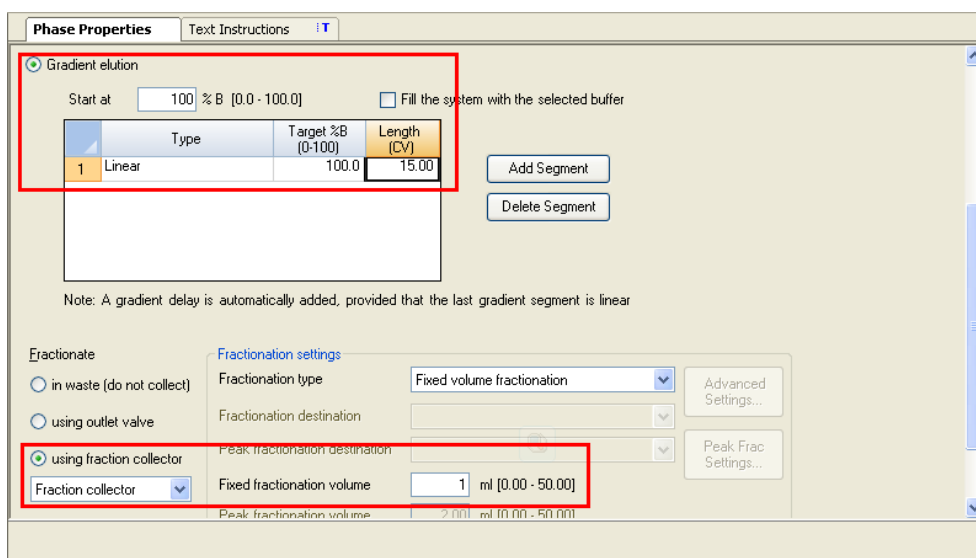
- 6) 点击 Column Wash 进入柱冲洗阶段设置，选择冲洗使用 B 液浓度 0%，冲洗的溶液体积为 3 CV



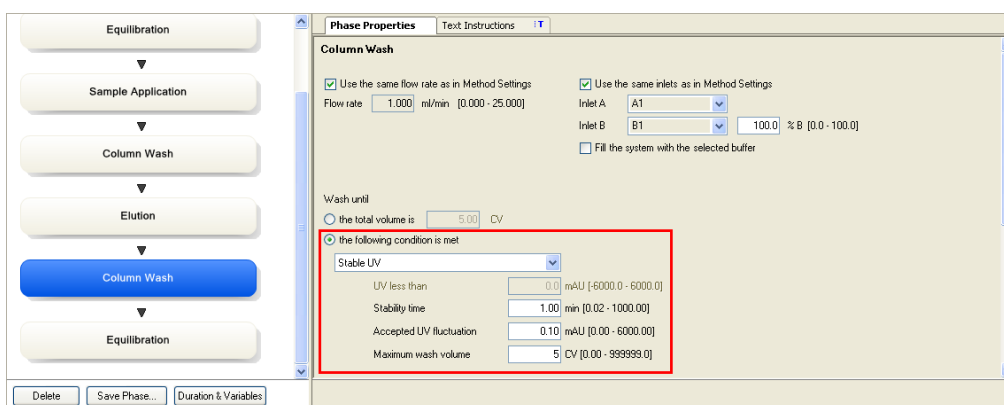
- 7) 点击 Elution 进入洗脱设置，保持洗脱流速、缓冲液入口以及缓冲液流向不变



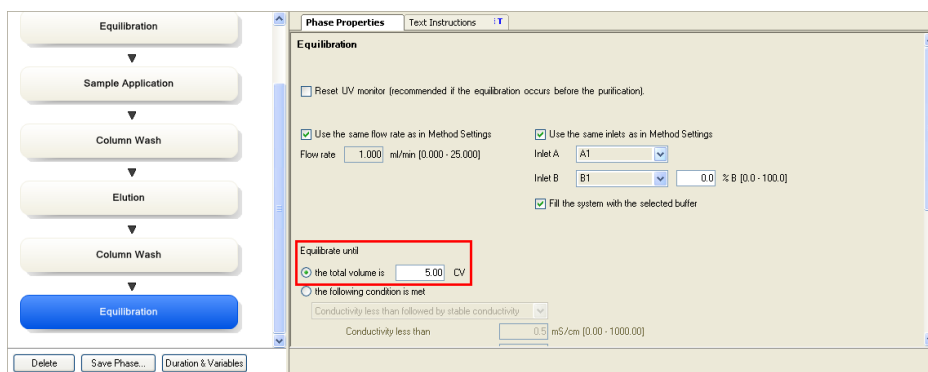
- 8) 设置使用线性洗脱，在 15 CV 之内 B 浓度升至 100%，采用收集器进行固定体积收集，每管收集 1 ml



- 9) 点击 Column Wash 进入下一步柱冲洗阶段设置，此阶段目的是对层析柱进行再生。设置再生缓冲液为 100% B，启用 Watch 功能，选择 the following condition is met 为 Stable UV，参数设置为 1 min 内 UV 变化小于 0.1 mAU，最大冲洗体积为 5 CV



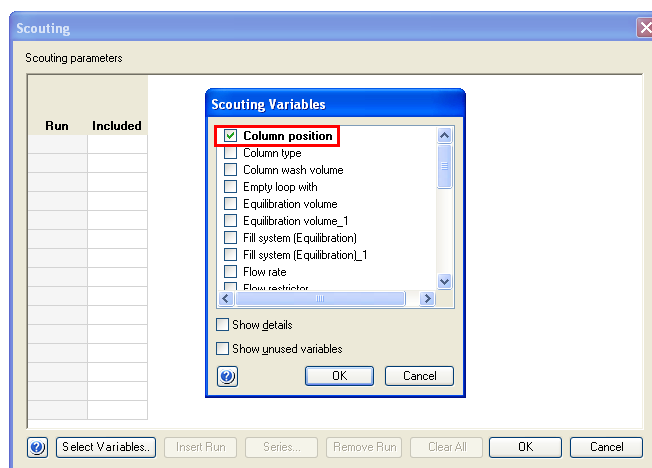
- 10) 点击 Equilibration 进入层析柱再平衡阶段设置，此阶段目的是将层析柱中的缓冲液置换为平衡缓冲液。设置平衡体积为 5 CV



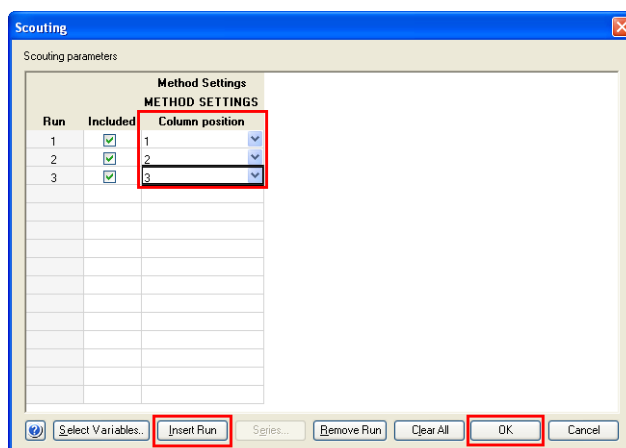
11) 点击工具栏上 Scouting 按钮，进行层析柱筛选设置



选定需要探索的参数为 Column position，点击 OK



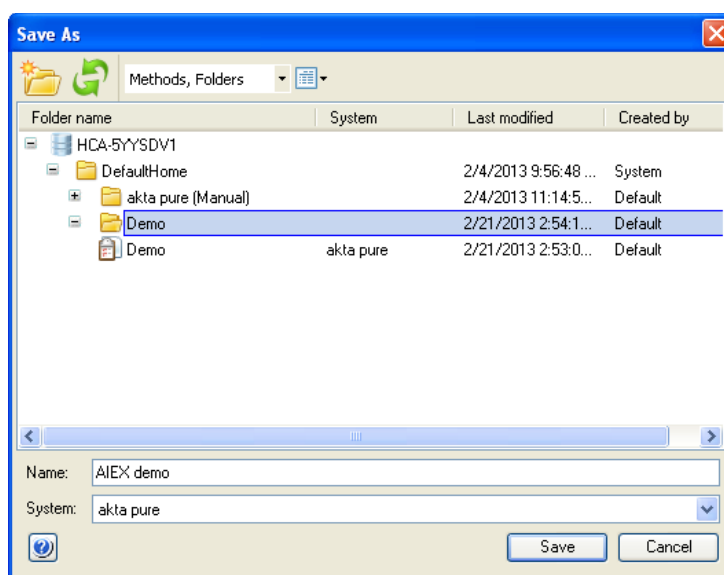
点击 Insert Run，添加两次实验，在 Method Setting 中 Column position 一栏中选择三次实验采用的柱位分别为 1、2、3 号位，点击 OK 确认



12) 点击工具栏上保存按钮

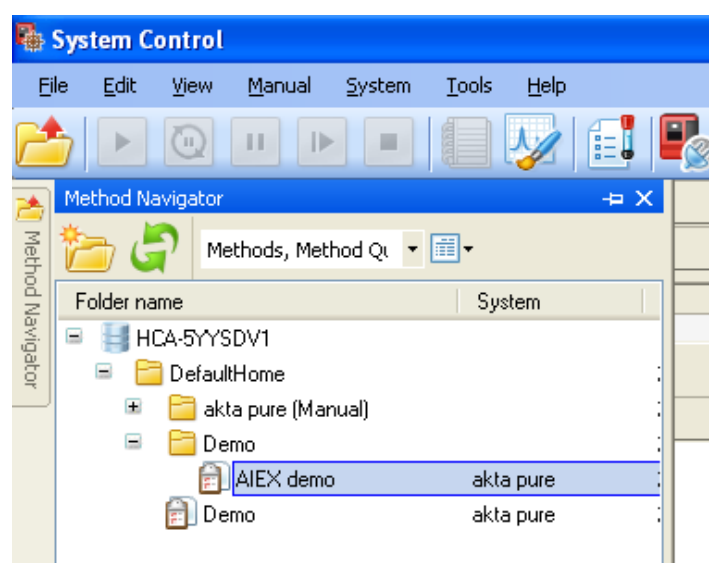


在弹出的窗口中选择存储位置，输入方法名称，点击 Save 保存



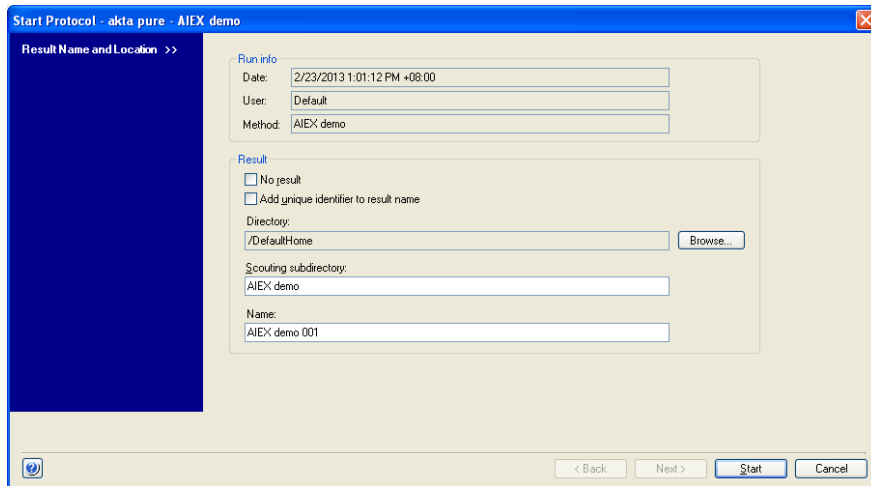
### 3.2.5 运行实验

- 1) 重新切换到 System Control 窗口，在 Method Navigator 窗口中双击已保存的方法 AIEX demo





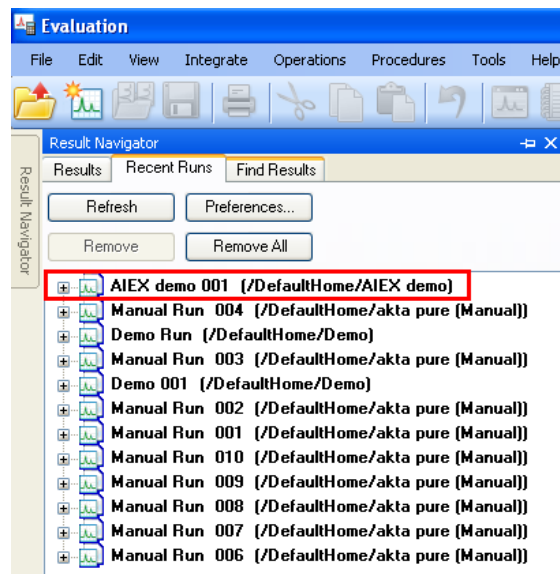
- 2) 在跳出的对话框中再次确认结果保存的位置及结果名称，点击 Start 开始运行



- 3) 实验一直按照程序运行，并自动结束

### 3.2.6 结果分析与讨论

- 1) 切换到 Evaluation 窗口中，选择保存的结果并打开



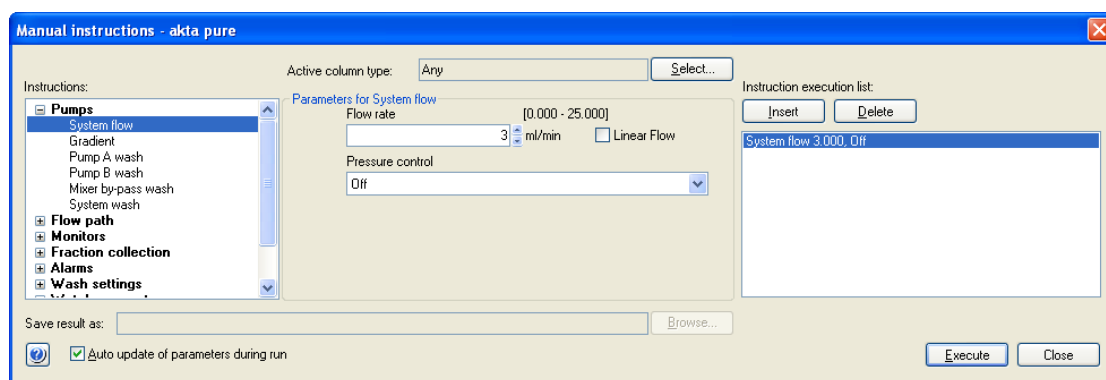
- 2) 现场讨论：

- 目标蛋白在什么盐浓度下被洗脱？
- 如何对实验进行优化？

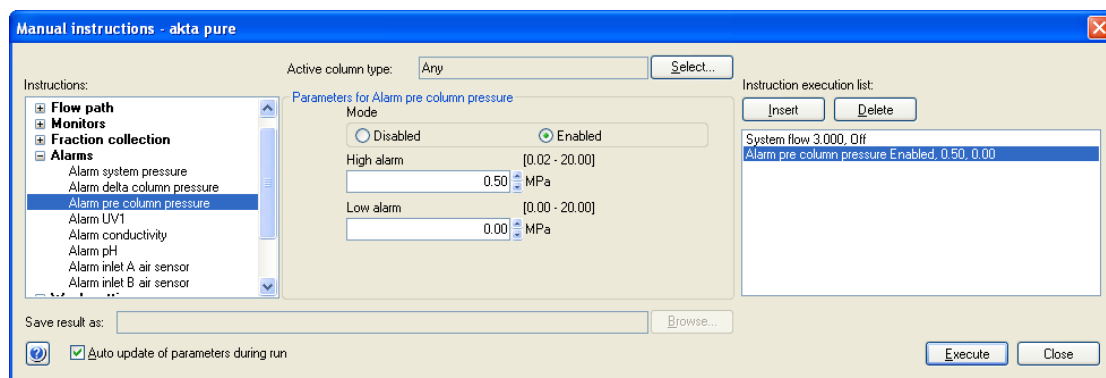
### 3.2.7 清洗与储存

程序运行结束后需要手动清洗并保存系统和层析柱

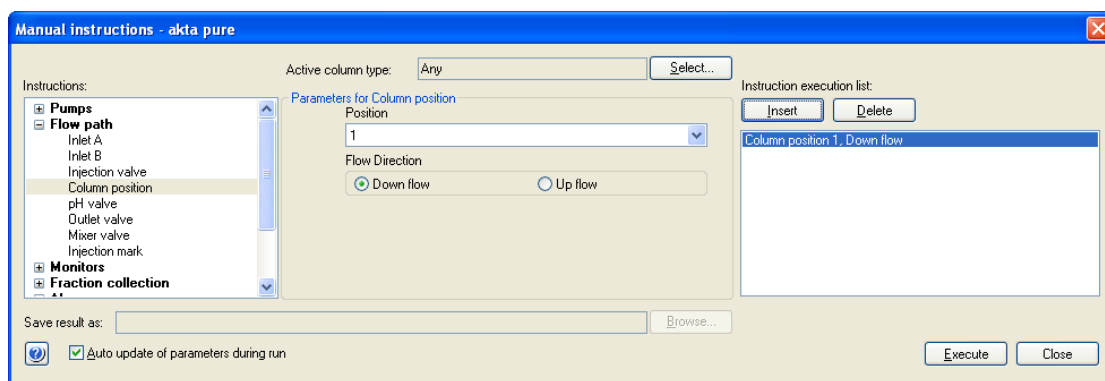
- 1) 将缓冲液 A1, B1 的入口放入经脱气的去离子水中, 分别进行泵清洗 (见 2.2.3)
- 2) 待泵清洗结束后, 用去离子水清洗柱子: 在 Manual instruction 窗口中, 选择 Pump > System flow, 设置 Flow rate 为 3 ml/min, 点击 Insert



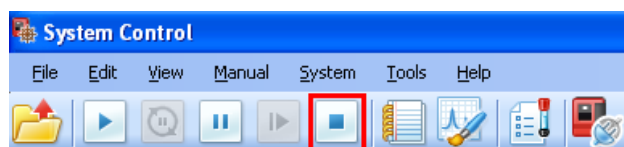
- 3) 在 Manual instruction 窗口中, 选择 Alarms > Alarm pre column pressure, 设置 High alarm 为 0.3 MPa, 点击 Insert, 然后点 Execute



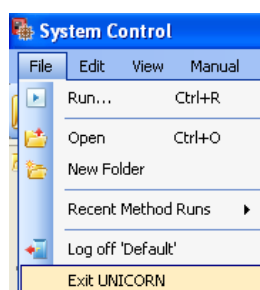
- 4) 在 Manual instruction 窗口中, 选择 Flow path > Column position, 选择 Position 1, 选择溶液流向为 Down flow, 点击 Execute



- 5) 运行 5 倍柱体积后，暂停
- 6) 将缓冲液 A1 的入口放入经脱气的 20% 乙醇水溶液中，进行泵清洗（见 2.2.3）
- 7) 待泵冲洗结束后，机器会自动继续之前 3 ml/min 的流速，用 20% 乙醇水溶液清洗柱子
- 8) 待运行 5 倍柱体积后，先拧松柱子上接头，将下接头从柱位阀上拧下，并拧上柱子的下堵头
- 9) 拧下柱子上面的接头并拧上柱子的上堵头
- 10) 重复步骤 4)-9)，将柱位分别选择为 2、3 号位，冲洗另外两根层析柱后将柱子保存起来
- 11) 在 System Control 界面命令栏中点击 End，结束清洗



- 12) 在任一 UNICORN 6 软件窗口中点击 File > Exit UNICORN 退出软件



13) 关闭 ÄKTApure 电源

### 3.3 应用亲和层析纯化 His 标签蛋白

#### 3.3.1 实验目的

- 对大肠杆菌表达的 His-GFP 上清进行亲和纯化
- 学会使用 Method Editor 进行亲和实验程序的编程
- 通过编程对层析柱进行在位清洗 ( CIP )

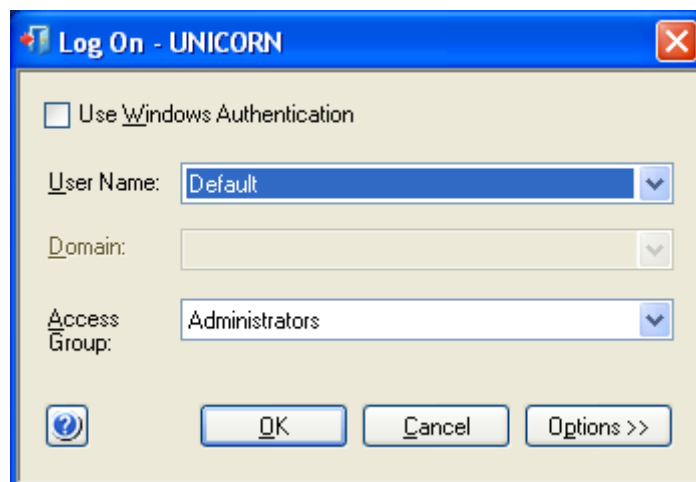
#### 3.3.2 实验材料

- 层析柱 : HisTrap excel 1 ml column
- 缓冲液 A: 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8.0
- 缓冲液 B: 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 500 mM 咪唑, pH 8.0
- 其余溶液 : 去离子水 ; 0.1 M NaOH ; 20% 乙醇水溶液 ( v : v )
- 实验耗材 : 5 ml 注射器 , 2 ml 样品环 , 15 ml 离心管
- 待分离蛋白样品 : 大肠杆菌表达的 6X His 标签重组绿色荧光蛋白 GFP 的预处理样品

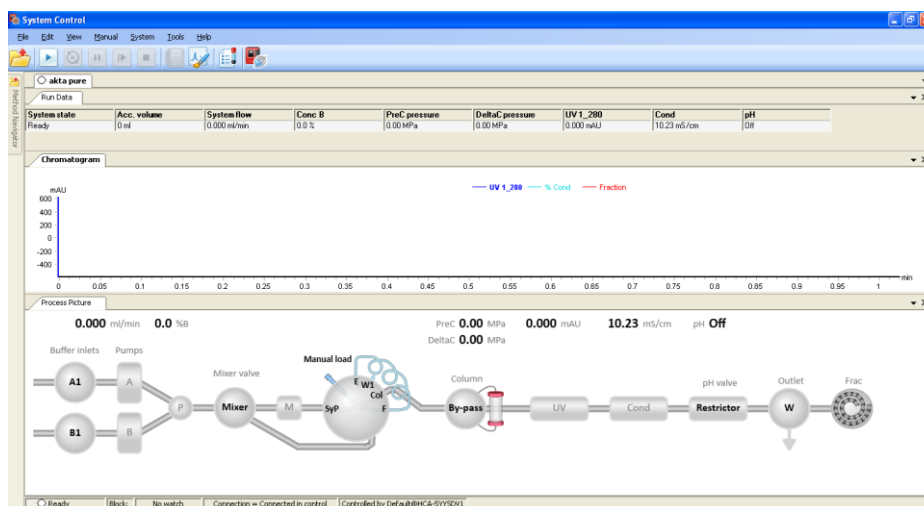
#### 3.3.3 实验准备

##### 3.3.3.1 开机

- 1) 先打开 ÄKTApure 电源 , 控制面板上的 power 灯稳定不再闪烁时 , 打开电脑 , 双击打开 UNICORN 6 软件

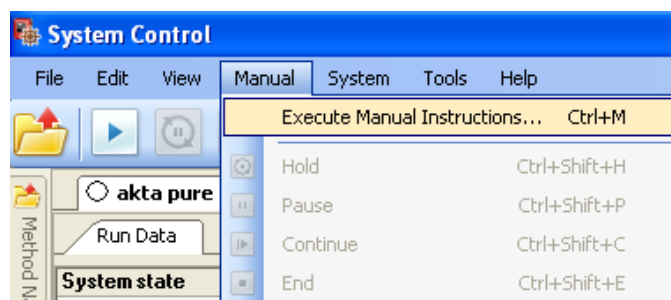


- 2) 点击 OK 进入软件 , 打开系统控制 ( System Control ) 窗口

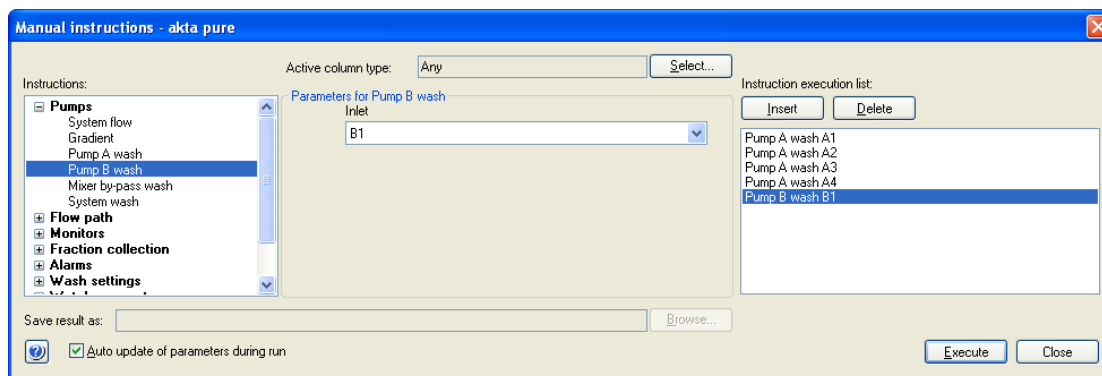


### 3.3.3.2 泵冲洗

- 1) 将缓冲液管 A1 插入到缓冲液 A 中，A2 插入去离子水中，A3 插入 0.1 M NaOH 中，A4 插入 20%乙醇中，B1 插入到缓冲液 B 中，在 UNICORN 6 软件的 System Control 界面选择 Manual > Execute manual Instructions

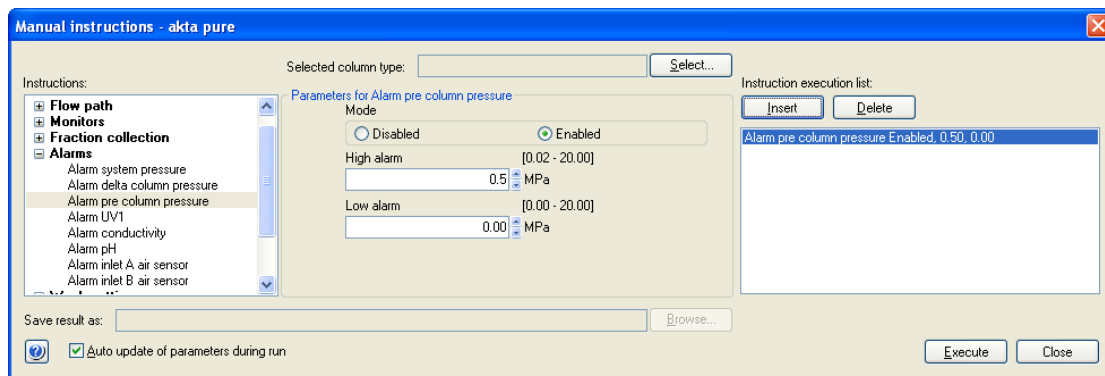


- 2) 在跳出的 Manual instructions 窗口中，选择 Pumps > Pump A wash，选择 Inlet 为 A1，点击 Insert，并重复插入 A2、A3、A4 泵洗；再选择 Pumps > Pump B wash，选择 Inlet 为 B1，点击 Insert，选择 Execute 执行

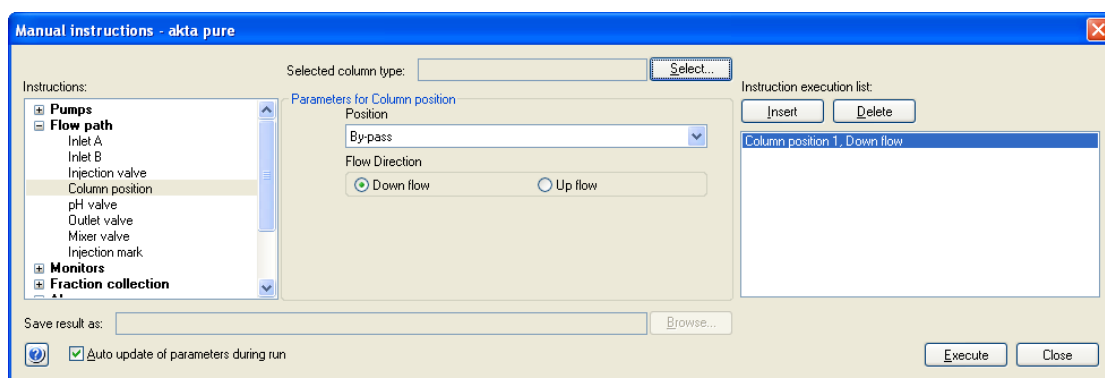


### 3.3.3.3 安装柱子

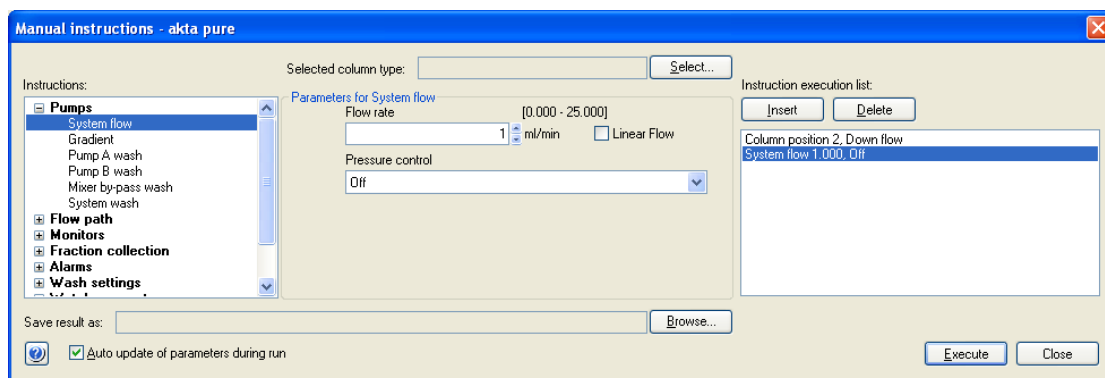
- 1) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Alarms > Alarm pre column pressure，设置 High alarm 为 0.3 MPa，点击 Execute



- 2) 在 Manual instructions 窗口中，选择 Flow path > Column position，按连接需要选择柱位，如选择 Position 1，点击 Insert

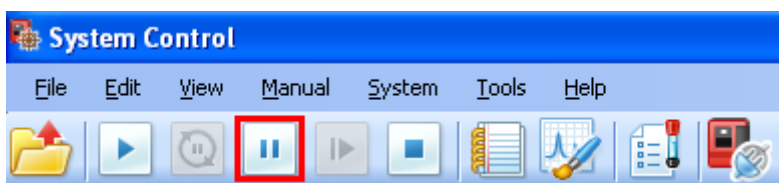


- 3) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Pumps > System flow，设置 Flow rate 为 0.5-1 ml/min，点击 Insert 并执行



- 4) 在柱位阀 1A 口连接上一根 PEEK 连接管

- 5) 待连接管的出口有持续的液体流出且无气泡的情况下，除去层析柱的上堵头，将层析柱柱头与连接管出口相连，但不要拧紧
- 6) 除去层析柱下堵头，待层析柱出口有持续的液体流出，且无气泡的情况下，将层析柱出口连接到柱位阀的 1B 口上
- 7) 拧紧上接头，单击 Pause 暂停



#### 3.3.3.4 样品环的安装与清洗

在上样阀的 LoopF 与 LoopE 口连接上 2 ml 的样品环，用注射器抽取缓冲液，连接到上样阀的 Syr 口上，推入缓冲液以清洗样品环，可重复几次

#### 3.3.3.5 上样

用注射器吸取稍大于 2 ml 的样品，排除气泡后，连接到样品阀的 Syr 口上，将注射器内的样品推入，并将注射器保留在样品阀上

#### 3.3.3.6 收集器准备

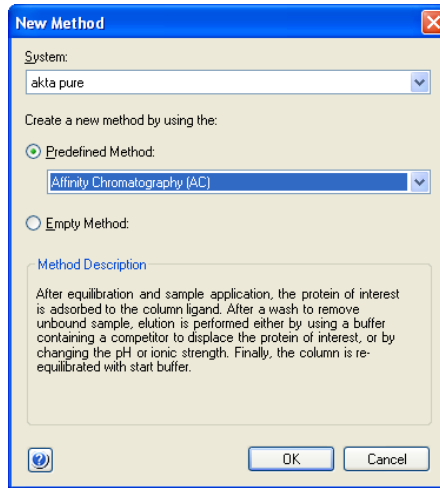
在收集器内按顺序放入一定数量的 15 ml 离心管，调整悬臂到 1 号位

#### 3.3.4 方法编辑

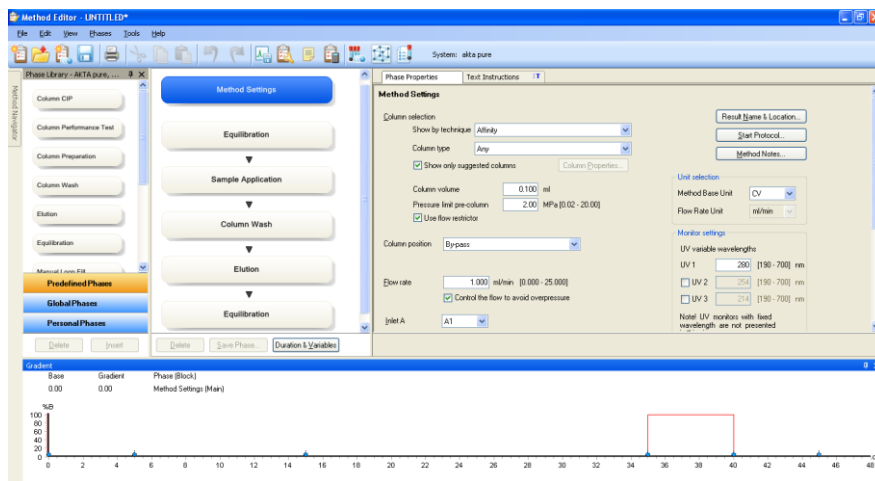
- 1) 打开 UNICORN 6 软件的 Method Editor 窗口，点击命令栏中的 Create a new method 图标



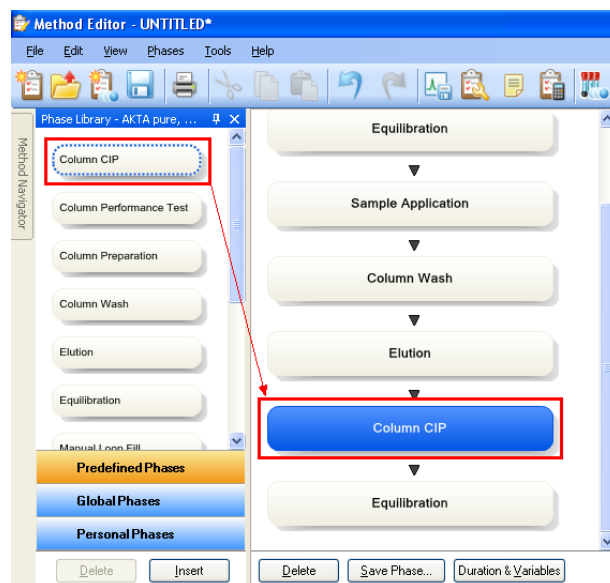
- 2) 在跳出的 New Method 对话框中 Predefined Method 下选择 Affinity Chromatography (AC)，点击 OK



### 3) 进入方法编辑界面

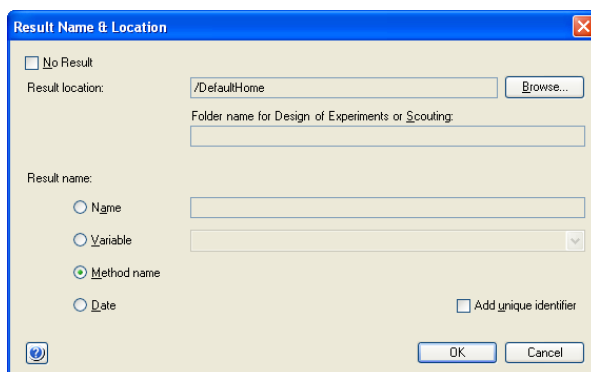


### 4) 首先编辑实验阶段，由于实验后要对层析柱进行在位清洗，在 Predefined Phases 中找到 Column CIP 模块并拖动 Elution 阶段后

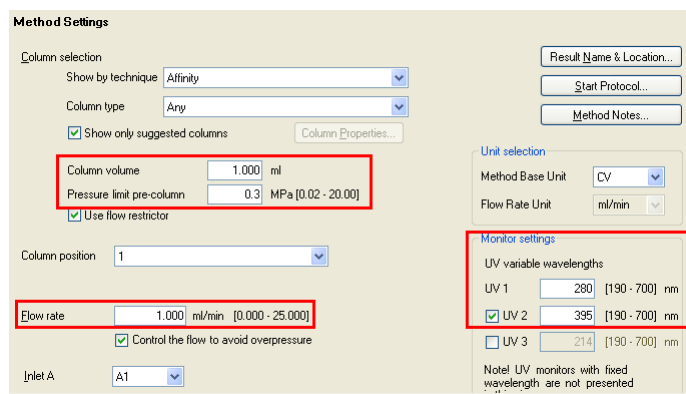




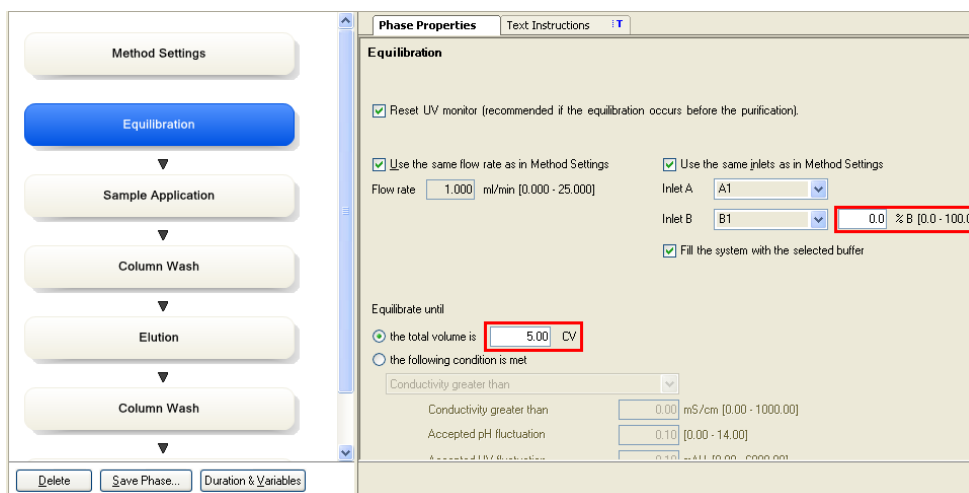
- 5) 在 Method Settings 编辑界面中，选择 Result name & Location 设置结果名称及存贮位置



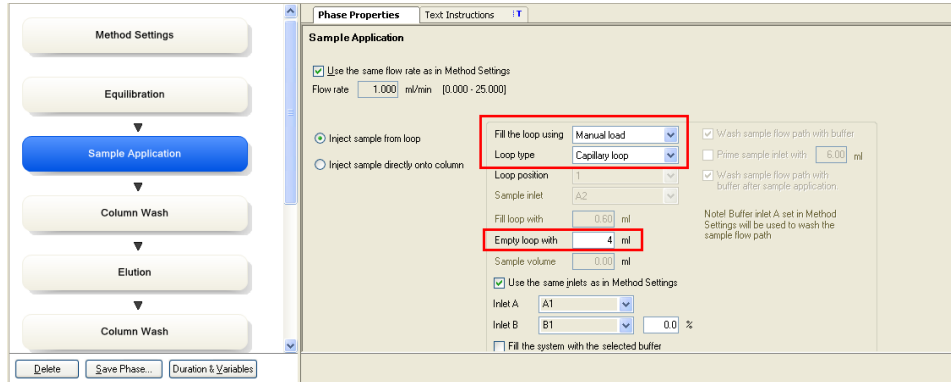
选择 Column type 为 Any，Column volume 为 1 ml，Pressure limit pre-column 为 0.3 MPa，Column position 为 1，Flow rate 1 ml/min，激活紫外检测 UV2，设置为 395 nm



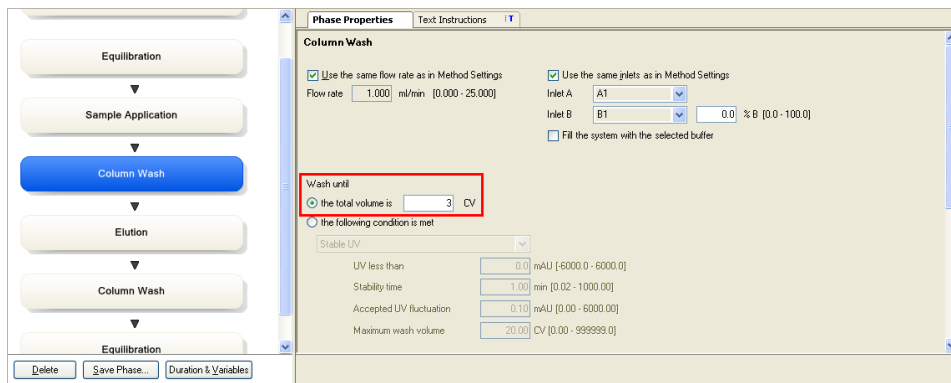
- 6) 点击 Equilibration 进入平衡阶段设置，平衡流速、缓冲液入口不变，平衡时缓冲液 B 所占的比例为 0%，输入平衡体积 5 CV



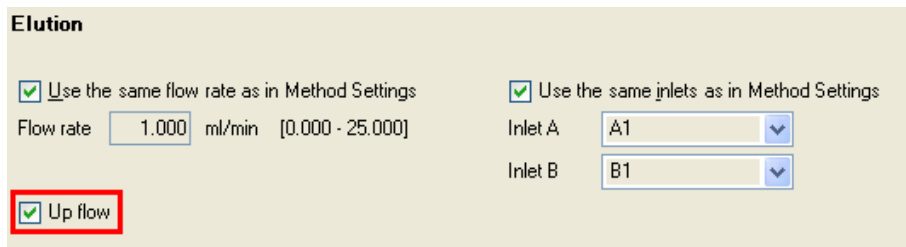
- 7) 点击 Sample Application 进入上样阶段设置，仍然使用方法设置流速 1 ml/min，选择上样的方式为 Manual load，Loop type 为 Capillary loop，输入清空样品环的体积 4 ml



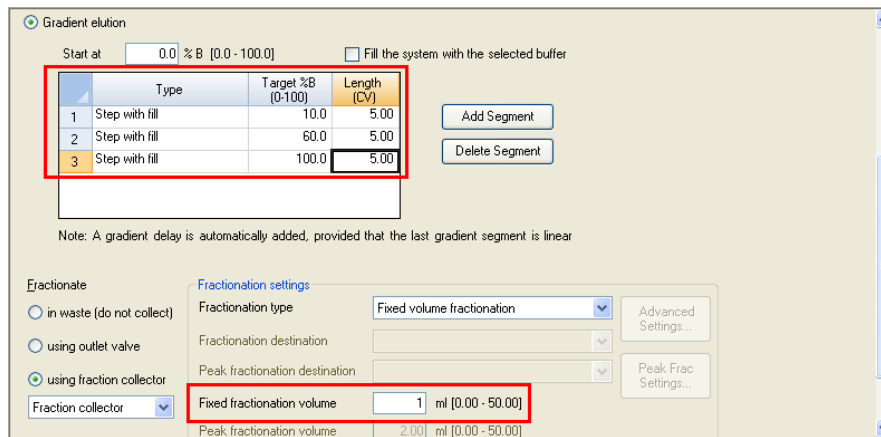
- 8) 点击 Column Wash 进入柱冲洗阶段设置，选择冲洗使用 B 液浓度 0%，冲洗的溶液体积为 3 CV



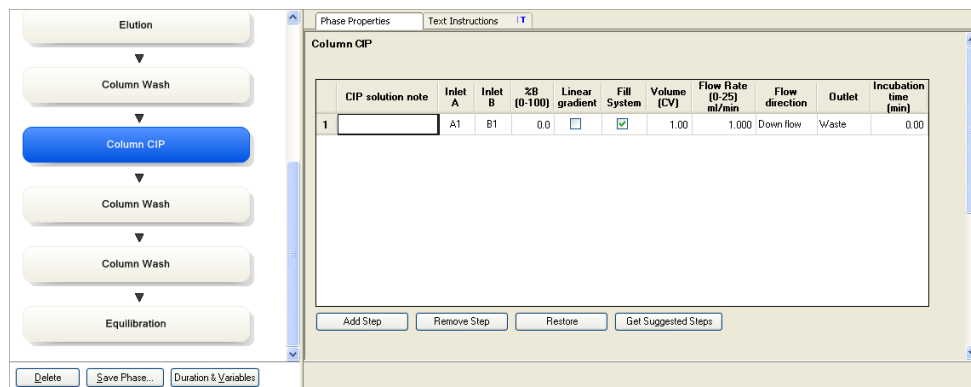
- 9) 点击 Elution 进入洗脱设置，保持洗脱流速、缓冲液入口不变，选择缓冲液流向为 Up flow，反向洗脱有利于得到高浓度的样品



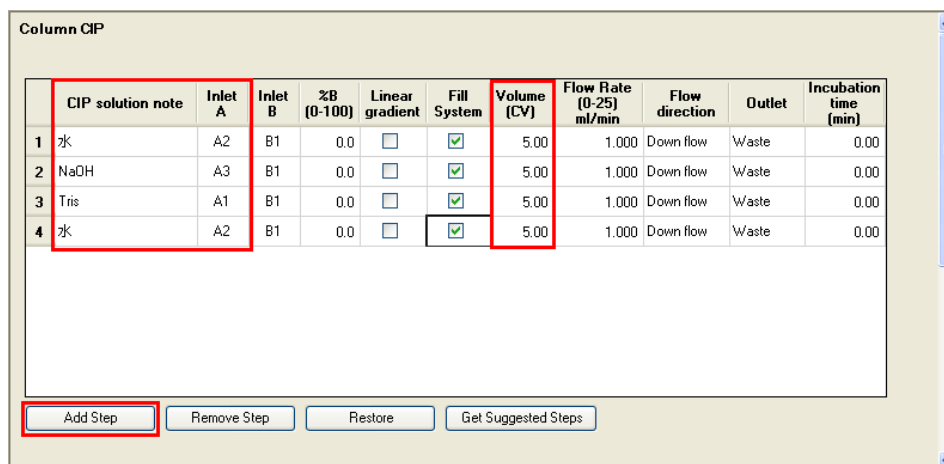
设置使用三步阶段洗脱，首先使用 10% B 洗脱 5 CV，第二步使用 60% B 洗脱 5 CV，第三步使用 100% B 洗脱 5 CV，采用收集器进行固定体积收集，每管收集 1 ml



10) 点击 Column CIP 进入层析柱再生阶段设置，此阶段目的是使用 NaOH 将层析柱上残留的顽固污染物清除



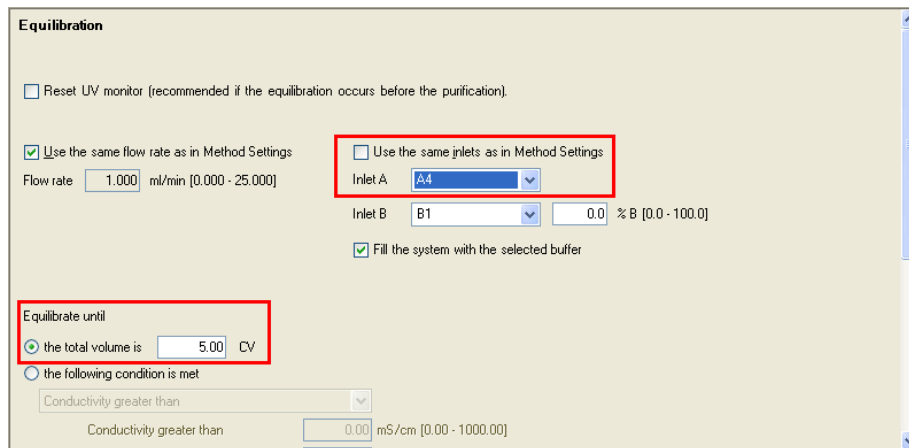
通过点击 Add Step 共设置 4 步 CIP



- 第一步选用 A2 入口去离子水清洗层析柱，目的是替换掉柱子中的缓冲液，为 NaOH 清洗做准备
- 第二步选用 A3 入口 0.1 M NaOH 清洗层析柱，清除顽固污染物

- 第三步选用 A1 入口 Tris 缓冲液替换掉 NaOH 溶液，这是因为如果用水替换 NaOH 很难快速使柱中溶液 pH 降至中性
- 第四步选用 A2 入口去离子水清洗层析柱，目的是替换掉柱子中的缓冲液

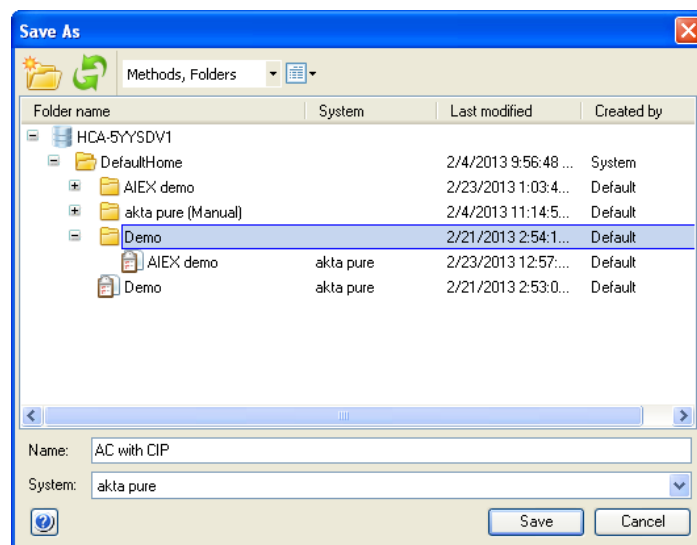
11) 点击 Equilibration 进入层析柱再平衡阶段设置，此阶段目的是将层析柱中的水替换为 20%乙醇保护液，选择 A 缓冲液入口为 A4 (20%乙醇)，设置平衡体积为 5 CV



12) 点击工具栏上保存按钮

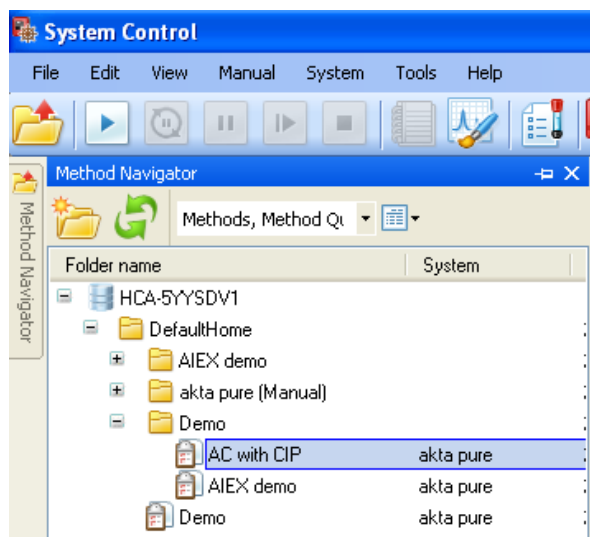


在弹出的窗口中选择存储位置，输入方法名称，点击 Save 保存

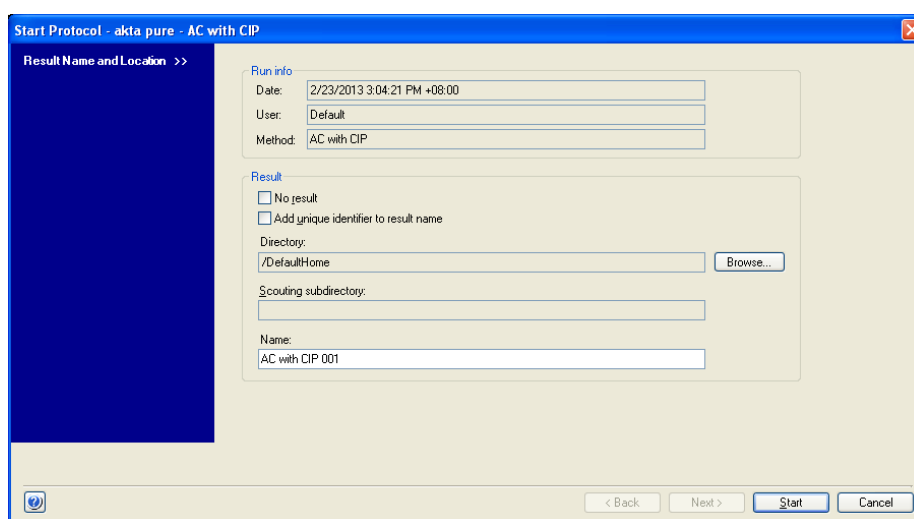


### 3.3.5 运行实验

- 1) 重新切换到 System Control 窗口，在 Method Navigator 窗口中双击已保存的方法 AC with CIP



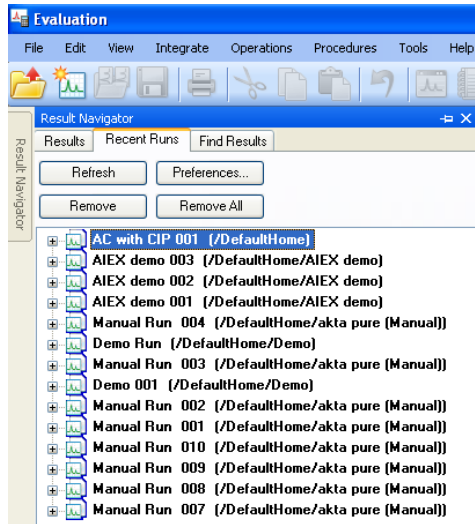
- 2) 在跳出的对话框中再次确认结果保存的位置及结果名称，点击 Start 开始运行



- 3) 实验一直按照程序运行，并自动结束

### 3.3.6 结果分析与讨论

- 1) 切换到 Evaluation 窗口中，选择保存的结果并打开



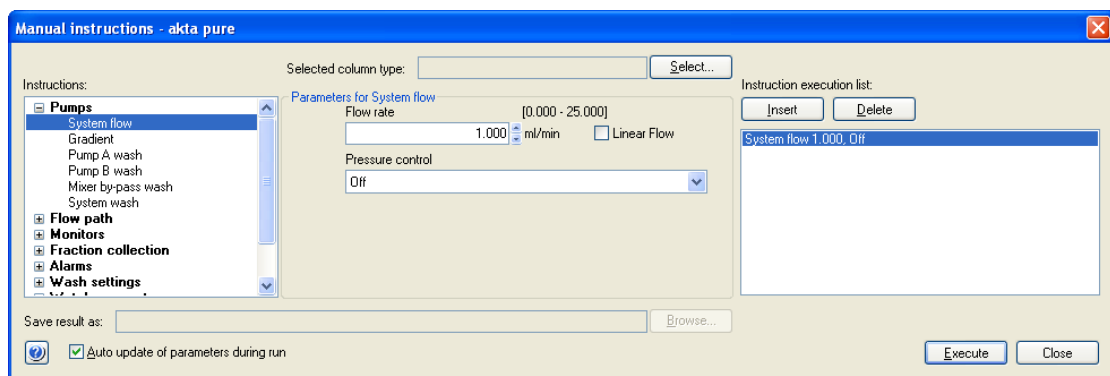
## 2) 现场讨论：

- 目标蛋白在什么咪唑浓度下被洗脱？
- 如何进行峰积分？

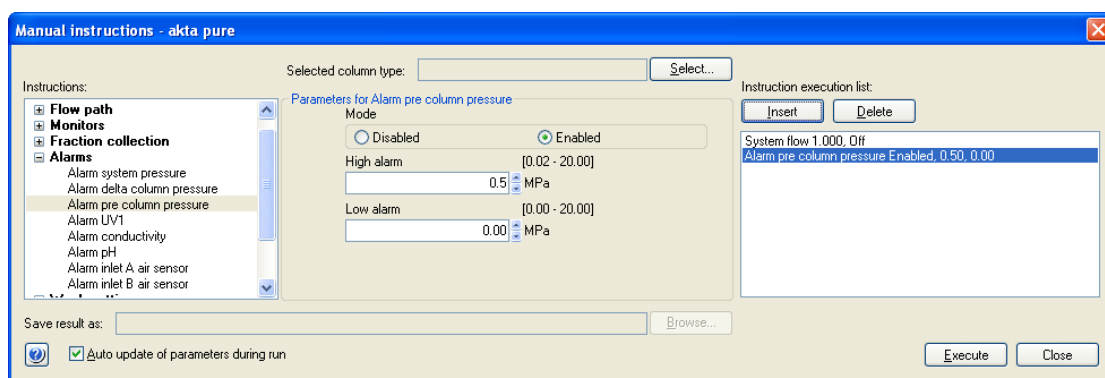
### 3.3.7 清洗与储存

程序运行结束后需要手动清洗并保存系统和层析柱，层析柱中

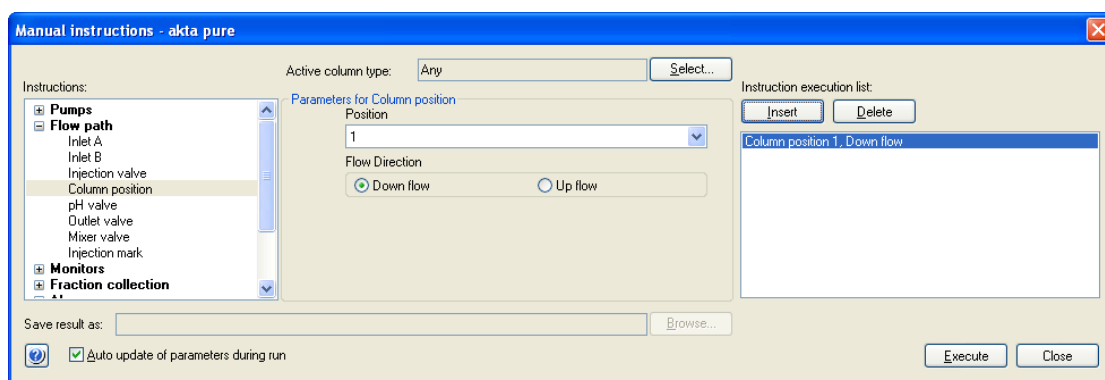
- 1) 将缓冲液 A1、A2、A3、A4、B1 的入口都放入经脱气的去离子水中，分别进行泵清洗（见 2.2.3）
- 2) 将缓冲液 A1、A2、A3、A4、B1 的入口都放入 20%乙醇中，分别进行泵清洗（见 2.2.3）
- 3) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Pump > System flow，设置 Flow rate 为 1 ml/min, 点击 Insert



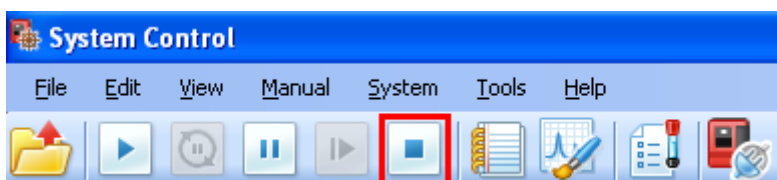
- 4) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Alarms > Alarm pre column pressure，设置 High alarm 为 0.3 MPa，点击 Insert，然后点 Execute



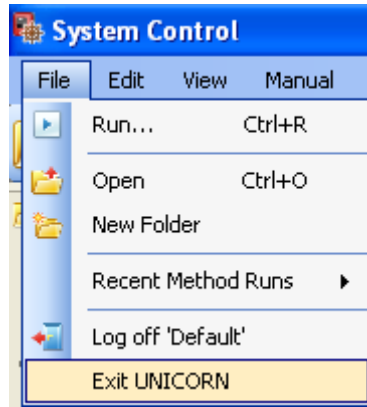
- 5) 在 Manual instruction 窗口中，选择 Flow path > Column position，选择 Position 1，选择溶液流向为 Down flow，点击 Execute



- 6) 待液体流出后，先拧松柱子上接头，将下接头从柱位阀上拧下，并拧上柱子的下堵头
- 7) 拧下柱子上面的接头并拧上柱子的上堵头
- 8) 在 System Control 界面命令栏中点击 End，结束清洗



- 9) 在任一 UNICORN 6 软件窗口中点击 File > Exit UNICORN 退出软件



10) 关闭 ÄKTApure 电源