



# BioLogic LP

层析系统简明使用教程



# BioLogic LP 层析系统

- 一、 仪器名称: BioLogic LP 层析系统
- 二、 规格型号: BioLogic LP
- 三、 生产厂家: Bio-Rad Laboratories, Inc
- 四、 产品简介

随着生命科学研究进入后基因组时代,以蛋白质为主要对象的研究成为各实验室研究的主题,其中,对单个蛋白质的分离纯化是蛋白质研究的基础工作,也是非常重要的工作。对纯度均一蛋白质的研究是揭示生命规律的重要手段,也是新药研发的必要途径,因为只有获得一定量的蛋白质纯品,才能满足结构和功能的分析、物理化学参数测定、生物活性、毒理和药理实验等等,乃至大量制备用于诊断和治疗。

蛋白质分离纯化的重要问题是如何在纯化过程中保持温和的条件,从而保证在此过程中蛋白质的结构和活性不受影响。层析技术(Chromatography)为蛋白质纯化提供了这样的条件,大都在室温或低温下操作,所用的流动相可以是与生理液相似的具有一定 pH 值、离子强度的缓冲水溶液,所用的填料表面修饰各种基团,可与蛋白质分子温和接触,从而保持了蛋白质分子的原有构象和生物活性。层析系统以及各种分离纯化所需的填料和层析柱是保证该纯化过程的稳定性、重现性和自动化进行所必需的设备。

## 五、 技术原理

将一种混合物分成单个组份是一个熵减的过程,故外界必须要给此过程提供能量。如下图所示,完整的层析系统主要包含泵、各种阀门、层析柱、各种在位检测器和收集器。

其主要过程是:由蠕动泵推动溶液;各种阀门控制溶液流向,或者进样,或者洗脱层析柱;样品经过层析柱并洗脱后,以样品各组分在流动相和固定相(层析介质)中的分配系数不同而保留不同,从而分开;不同组分经过各种在位检测器,如紫外检测器、电导检测器、pH 检测器等确定各组分的位置和浓度;最后各组分由收集器自动收集。

其中,泵是层析系统的核心,用以推动溶液流动,LP 的泵是双通道蠕动泵,可提供精确稳定,双向变速可调的液流,可配不同直径蠕动管,流速范围为 0.01-40mL/min。检测器是层析系统的眼睛,必须具有足够的灵敏度。在层析中需要检测的指标主要有离子强度,紫外/可见光吸收值,折光度,荧光值等。

层析系统为层析技术及其过程提供了稳定、准确、可靠的自动化平台,而各种层析介质和层析柱则是层析技术的核心。各种层析技术简介如下:

- 1、离子交换(ion exchange chromatography, IEC):利用蛋白质在一定缓冲液和 pH 条件下不同蛋白质具有彼此不同的电荷数目,从而与离子交换层析介质上的配基的相互作用不同,以不同离子强度或连续离子强度梯度的盐溶液将结合能力不同的蛋白质依次洗脱下来。蛋白质与离子交换介质之间的相互作用方式是多种多样的,不仅与蛋白质所带的净电荷有关,而且与蛋白质分子的空间结构和电荷分布等因素有关,每一种蛋白质具有其独特的性质,因此,在分离制备蛋白质时要选择不同的介质和不同的条件,主要有层析介质及其孔径和载量,如 UNOsphere Q/S, MacroPrep High Q/S, DEAE 和 CM 等,层析条件主要有缓冲液、pH 值、离子强度等等。
- 2、凝胶过滤(Gel Filtration Chromatography, GFC):一种纯粹按蛋白质分子在溶液中的体积大小分离的层析方法,层析介质具有一定范围的孔尺寸,大分子进不去而先流出层析柱,小分子后流出。
- 3、羟基磷灰石层析(CHT):具有独特的分离机理,是唯一直接用于蛋白质和核酸纯化的无机层析填料,高度耐碱,生物安全性最高。其中 $\text{PO}_4^{3-}$ 离子与带正电的蛋白质以离子键结合,具有离子交换特性,可由NaCl浓度梯度或磷酸钠浓度梯度洗脱,其中的 $\text{Ca}^{2+}$ 离子与带负电蛋白质的自由羧基以金属螯合方式结合,这种结合方式对NaCl不敏感,可由磷酸钠浓度梯度洗脱。因此该填料既可以用磷酸钠单梯度洗脱,也可以采用NaCl梯度洗脱后以低浓度磷酸钠缓冲液平衡,再以磷酸钠

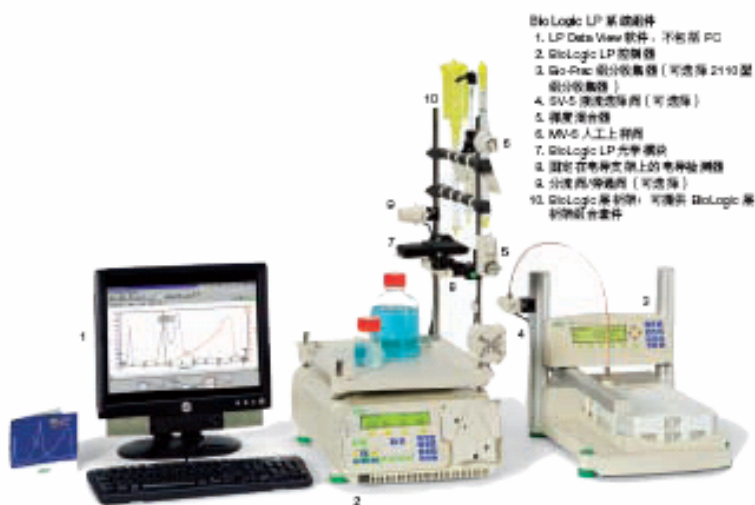
浓度梯度洗脱的双梯度洗脱模型，以达到更高的分辨率。

4、亲和层析 (Affinity Chromatography): 利用生物大分子和层析介质表面存在的某种特异性吸附而进行选择分离的层析技术。层析介质表面预先连接上配基, 如 Protein A、IDA、酶、抗原、激素等等, 具有和配基有生物特性吸附的生物大分子与配基相互作用而被保留, 没有这种相互作用的分子不能保留而先流出层析柱, 再改变洗脱液的条件, 如 pH 值、组成等, 把吸附在层析柱上的蛋白质分子以纯品或较纯的形态洗脱下来。

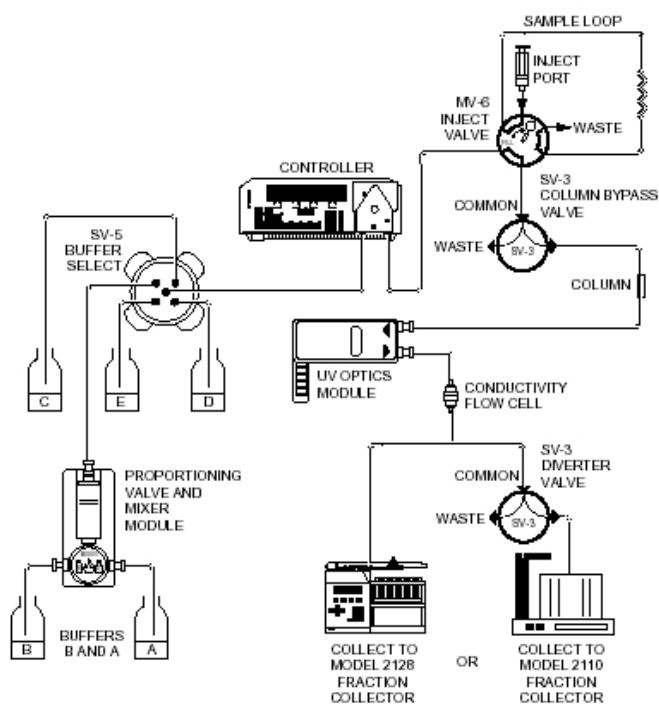
5、疏水作用层析 (hydrophobic interaction chromatography, HIC): 蛋白质分子时一个外部有一亲水层包围、内部有疏水核并具有高级结构的复杂体系。尽管蛋白质表面亲水性很强, 但也存在一些非极性的疏水基团或疏水区域, 特别在高浓度盐溶液条件下, 这些疏水基团向外伸展, 可以和层析介质上的疏水配基相互作用, 不同蛋白质的疏水特性不同, 从而可以在不同盐溶液下实现不同的保留而被分离。通常疏水层析以高浓度盐溶液平衡上样, 洗脱过程中盐浓度下降, 蛋白质与层析介质上的配基的吸附力变为排斥力, 从而蛋白质被洗脱。

## 六、结构组成

### 1、外观组件

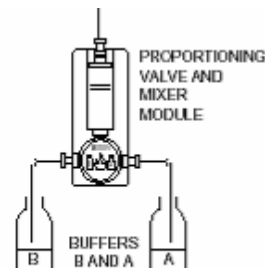


### 2、管路连接



## 七、仪器操作

- 1、 将仪器电源打开，预热。
- 2、 缓冲液配制：根据所用层析方法和条件配置溶液，如果方法中要用到梯度洗脱，需配置 A 液和 B 液，分别将混合器的 A、B 管浸入到相应的溶液中，如图：



- 3、 冲洗管道系统：

在做实验之前，必须采取合适的步骤以排除导管中的气泡。

将 A 液及 B 液按右图放置到位。

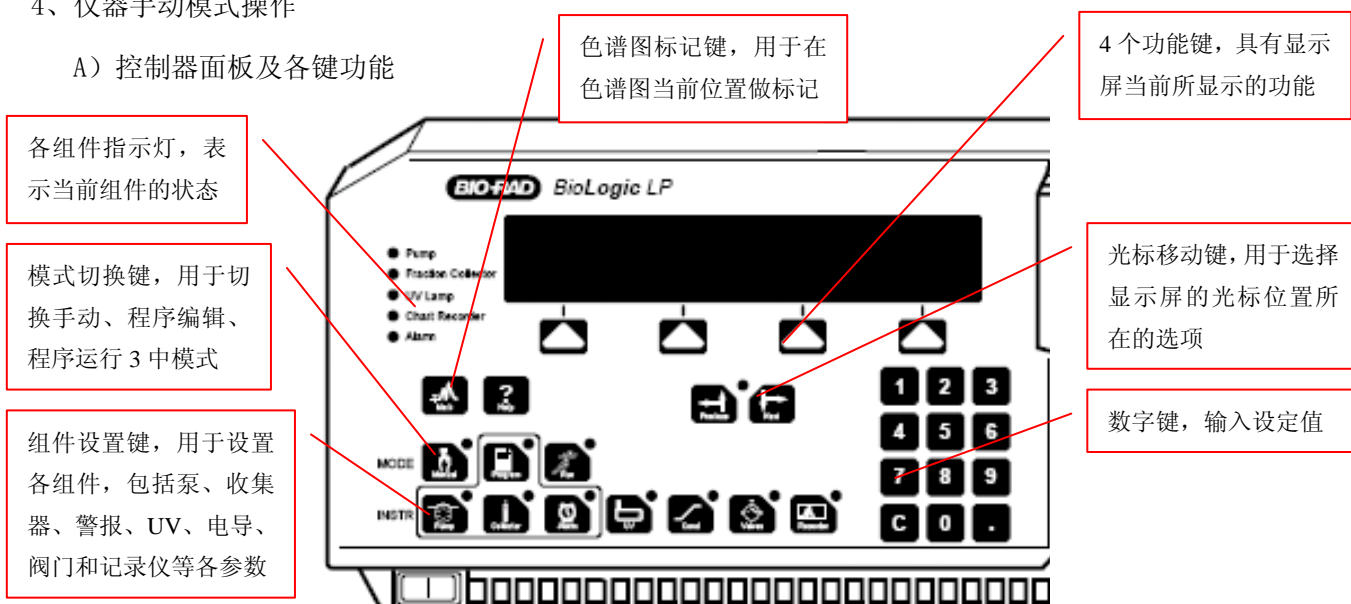
- A) 确认未接层析柱。并将层析柱进口管与出口管对接。按下“Purge”按键，泵将以最大流速冲洗整个管道系统。

B) 在泵运行时轮换按下“Buffer”键，让所有缓冲液进口管道都充满缓冲液然后将泵停下。

- C) 将流速调节到相对层析柱为安全的流速，接入层析柱，按下“Run”键，将可能进入柱子的气泡排除。

### 4、 仪器手动模式操作

- A) 控制器面板及各键功能



- B) 手动模式平衡层析柱：按模式键的 Manual，再按组件设置键的 Pump，则显示屏显示泵主界面如下：

Method: <<name>>	Manual Operation
-> Flow: 1.00 ml/min	UV: 0.0111 AU
Buffer: A	Cond: 0.000 mS
START PURGE	FLOW BUFFER

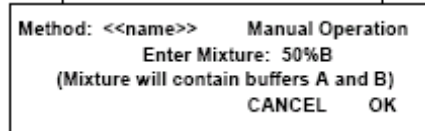
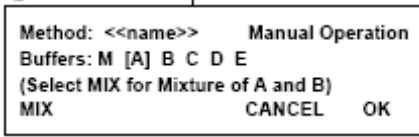
按 Flow 下的功能键进入流速设置界面，如下图：

Method: <<name>>	Manual Operation
-> Flow: 1.00 ml/min	UV: 0.0111 AU
Buffer: A	Cond: 0.000 mS
CALIBRATE FORWARD	CANCEL OK

用数字键输入制定流速，按 OK 确定回到泵主界面，

再按 Start 下的功能键开始以所设定的流速平衡层析柱，检查电脑软件中色谱图的 UV 基线。

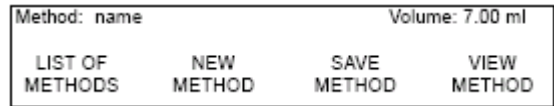
如果要以 A、B 两种溶液以一定配比平衡或冲洗层析柱，则在上述泵主界面按 Buffer 下的功能键进入溶液混合界面：



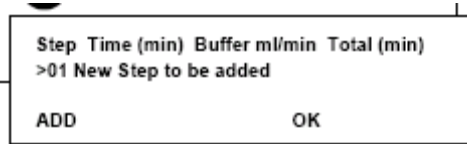
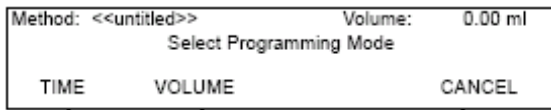
按 Mix 下的功能键进入界面，光标移至 Enter mixture 后，输入 B 液的百分比，按 OK 下功能键确定并回到泵主界面，按 Start 下功能键开始冲洗或平衡层析柱。

5、方法编辑：一个完整的 LP 层析方法由 3 部分组成：泵步骤表、收集器表和警报器表，3 个表各自编辑，保存后仪器自动将 3 个表按时间顺序整合到一个完整的方法中。具体如下：

A) 泵步骤表编辑：



按 Program 模式键进入方法编辑界面，如图：选择 New Method，进入方法步骤编辑界面并选择时间模式：



进入步骤编辑界面：，按 ADD 下的功能键增加泵步骤，根据具体的层析方法编辑各个步骤，例如该仪器的 Startkit，用标准样品走 High Q 强阴离子交换柱，用 Previous/Next 键选择 Buffer A，按 OK，输入步骤长度为 3min，按 OK 确定，输入流速为 1.5mL/min，按 OK 确定，这时已经编好了泵步骤的第一步，再按 ADD 依次继续编辑泵步骤表如下：

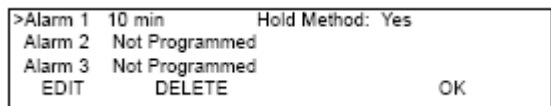
第二步：0%-50%B 的梯度，10min，流速 1.5mL/min；

第三步：Buffer B，6min，流速 1.5mL/min；

第四步：Buffer A，6min，流速 1.5mL/min；

第四步编辑完毕后按 OK 确定，回到方法主界面。

B) 警报表编辑：



按 Alarm 下的功能键，按 ADD，进入界面 Alarm 1 输入时间为 3min，Hold 设置为 No。按 2 次 OK 确定。

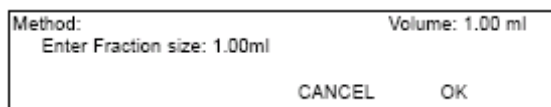
设置该步后，方法运行后 3 分钟警报器响，这提醒你必须将手动进样阀切换到 Load 位，使梯度步骤的缓冲液直接流到层析柱中，而不是流到进样环里。

C) 收集器表编辑：

在方法编辑主界面按 Frac Coll 下的功能键，进入



界面，选择 All，进入



，输入收集体积为 2mL，按 2 次 OK，确定并回到方

法列表界面，选择 DONE，再按 Save 键，输入方法名为 Demo1，按 DONE 确定。

## 6、方法运行

1) 将 MV-6 手动进样阀按逆时针方向转动到底

2) 用针筒吸取 2mL 标准蛋白样品，插入到 MV-6 手动进样阀顶部的进样口，将样品打入到进样环中，并将针筒留在进样口，不得拔出，否则样品将从废液管流出。

3) 运行前检查：

A) 检查手动状态下平衡柱子的情况，基线是否平衡，系统管道各处是否有气泡，如果有，必须对管道进行 Purge；

B) 按组件设置键设置检测器：按 UV，设置 Range 为 0.05AUFs，ReZero 基线调零；电导检测器的最大和最小值应满足 B 液和 A 液的电导值，可设置最小值为 0，最大值为 200mS/cm；

C) 按 Program 模式键，选择 View Method 检查所编辑的方法步骤是否与所设计的一致；

D) 检查组分收集器是否连接，并将收集器的第一管对准滴头下方。

4) 运行方法：

A) 按 Run 模式键，系统倒计时 10 秒后开始运行方法；同时点击软件工具栏的 Log On 按钮开始记录。

**B) 方法一开始，将手动进样阀转到最右边，开始进样，当警报响时，进样结束，将手动进样阀转到最左边。**

## 7、运行后数据处理

## 八、注意事项

### 九、仪器部分组件校正

泵的校正：注意，校正泵流速前必须确保管道无任何气泡，并将泵进水管浸没到溶液或水中，用干净精确的小量筒接出水管泵出的溶液或水。

按模式键的 Manual，再按组件设置键的 Pump，则显示屏显示泵主界面如下：

Method: <<name>>		Manual Operation	
-> Flow: 1.00 ml/min		UV: 0.0111 AU	
Buffer: A		Cond: 0.000 mS	
START	PURGE	FLOW	BUFFER

按 Flow 下的功能键进入流速设置界面，如下图：

Method: <<name>>		Manual Operation	
-> Flow: 1.00 ml/min		UV: 0.0111 AU	
Buffer: A		Cond: 0.000 mS	
CALIBRATE	FORWARD	CANCEL	OK

按 Calibrate 下的功能键，进入泵校准界面，

Method: <<name>>		Manual Operation	
Current Tubing Diameter: 3.2 mm			
Press "PUMP" to CANCEL			
0.8 mm	1.6 mm	3.2 mm	OTHER

选择泵蠕动管直径，标准管可直接按各自直径下的功能键，

Method: <<name>> Manual Operation  
Nominal Pump Calibration complete.  
Calibrate pump at desired flow rate?  
NOMINAL SET FLOW CANCEL

泵开始倒计时流动，倒计时结束时出现 界面，如果流速正常，

Method: <<name>> Manual Operation  
Pump Calibration  
Flow Rate: 1.00 ml/min Time: 5.00min  
START FLOW RATE TIME CANCEL

按 Nominal，如果有偏差，则按 Set Flow 进入 ，输入泵出的正确体积，按 OK 确认。

## 十、常见故障与保养