



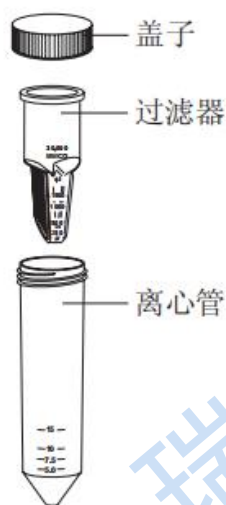
本说明仅供参考

## 超滤离心管

蛋白浓缩和换 Buffer 通常会使用到超滤管，有多种不同 MWCO 和处理量的型号可选，视目的蛋白的分子量与浓缩前体积、浓缩目标体积而定。

超滤离心管具有快速超滤功能，能够达到较高的浓缩系数，易于从稀释液和复杂的样本组合中进行浓缩回收。其竖式设计以及可用的滤膜表面积能提供快速的样本处理和较高的样本回收率（通常大于 90% 的初始溶液），并能进行多倍浓缩。竖式设计将溶质极化之后造成的滤膜结垢降至最低，过滤装置中的物理止滤点防止过滤器旋转过度使样本干燥和造成样本的损失。浓缩液用移液管从过滤器的样本槽中收集，而超滤出液则收集到所提供的离心管中。该装置可在离心机中进行。装置未经消毒，只供一次使用（但是国内众多科研院所及科研单位的老师，都在重复使用，毕竟使用一次就扔掉太浪费。）

超滤离心管储存在 15-30 °C 下，保质期自生产之日起 3 年。整套装置包括一个盖子、一个过滤器和一个离心管，如右图所示：



### 一、使用方法：

1 预清洗：超滤离心管的过滤薄膜含有微量甘油。如果此材料干扰分析，可用缓冲液或超纯水预清洗。如果干扰仍然存在，用 0.1 M NaOH 清洗，然后用缓冲液或超纯水再次清洗后甩干。

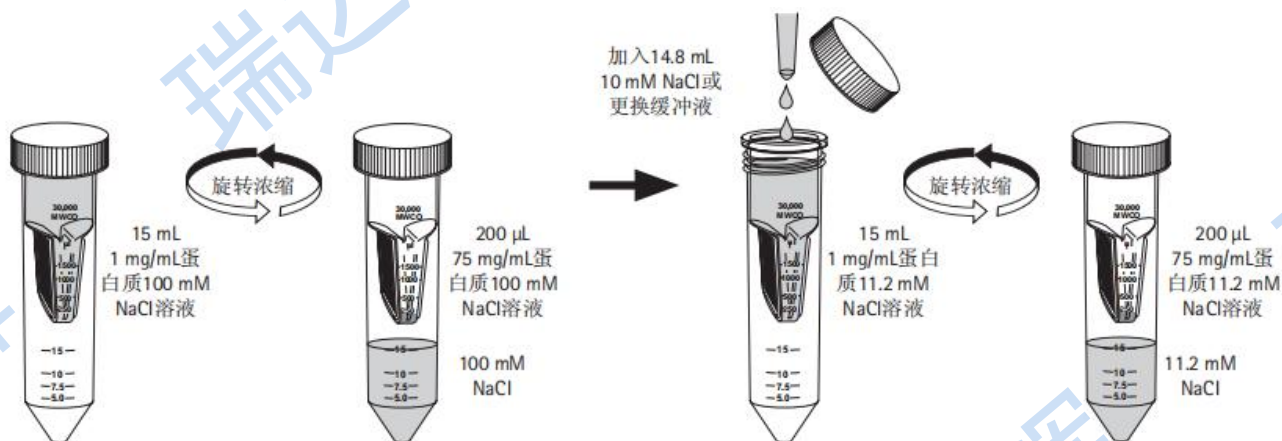
注意：Amicon® Ultra 超滤离心管中的滤膜一旦润湿后应避免重新干燥。若在预清洗后没有立即使用该装置，则应保持滤膜湿润，直到使用该装置为止。



2. 向超滤离心管加入不超过处理量的样品。
3. 将盖好盖子的超滤离心管放入离心转子中。
4. 适当转速离心。（关于旋转时间，请参见图 1 和图 2 以及表 1 和表 2）
5. 如要回收浓缩后的样品，在超滤离心管底部插入一个移液管，然后左右摇摆着吸取样本，以确保完全回收。超滤液可以保存在离心管中。

## 二、除盐或渗滤举例：

除盐、更换缓冲液或渗滤是去除含有生物分子的溶液中的盐分或溶剂的重要方法。可以在超滤离心管中，通过浓缩样本、然后向浓缩液加入任何所需溶剂复原至样本原始体积的方式，去除盐分或更换缓冲液。可重复“洗出”过程，直到污染微溶质的浓度充分降低为止。请参见下文举例。



## 三、性能

### 1 流速

影响流速的因素包括样本的浓度、起始体积、溶质的化学性质、相对离心力、离心转子的角度、滤膜类型以及温度。图 1 和图 2 以及表 1 和表 2 可用来估计对各种蛋白质分子量标准达到给定的滤出液体积或浓度所需的时间。15 mL 样本旋转时间一般约需 15 至 60 分钟（取决于装置的标称分子量限值）。尽管大部分样本在离心过程的前 15 至 30 分钟滤过，但一般在旋转 15 至 60 分钟之后才能达到最低浓缩液体积（150–300 µL）。

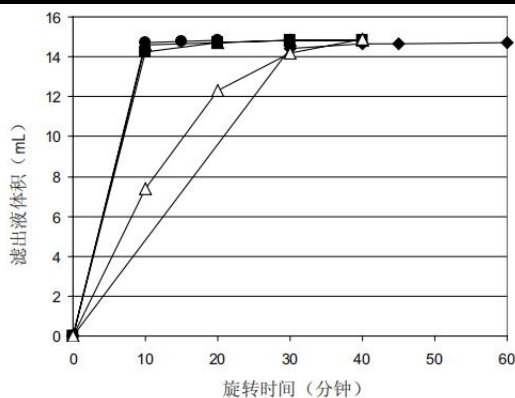


图 1

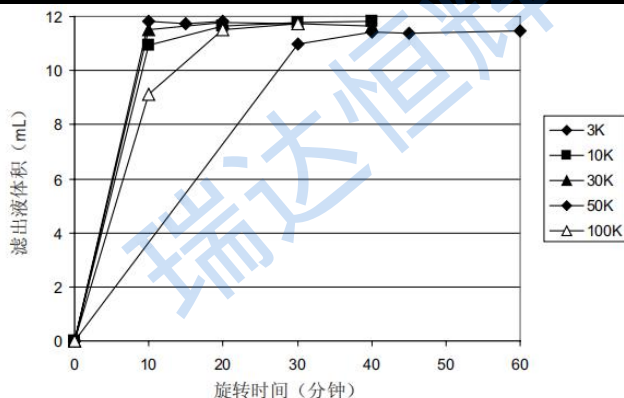


图 2

图 1. 典型的滤出液体积与旋转时间（摆桶式转子），旋转条件：4,000 g 室温 15 mL 起始体积。所使用的蛋白质分子量标准：对 3K 和 10K 使用细胞色素 c，对 30K 和 50K 使用 BSA，对 100K 使用 IgG，n=6。  
图 2. 典型的滤出液体积与旋转时间（定角转子），旋转条件：5,000 g 室温 12 mL 起始体积。所使用的蛋白质分子量标准：对 3K 和 10K 使用细胞色素 c，对 30K 和 50K 使用 BSA，对 100K 使用 IgG，n=6。

表 1. 典型的浓缩液体积与旋转时间（摆桶式转子）

| 旋转时间/分钟 | 浓缩液体积 (uL) |         |         |         |          |
|---------|------------|---------|---------|---------|----------|
|         | 3K 透析管     | 10K 透析管 | 30K 透析管 | 50K 透析管 | 100K 透析管 |
| 10      | --         | 668     | 361     | 249     | 7420     |
| 15      | --         | --      | --      | 201     | --       |
| 20      | --         | 219     | 206     | 175     | 2216     |
| 30      | 537        | 145     | 155     | --      | 244      |
| 40      | 331        | 146     | 135     | --      | 141      |
| 45      | 299        | --      | --      | --      | --       |
| 60      | 209        | --      | --      | --      | --       |

旋转条件：4,000 × g，室温，15 mL 起始体积。所使用的蛋白质分子量标准：对 3K 和 10K 使用细胞色素 c，对 30K 和 50K 使用 BSA，对 100K 使用 IgG，n=6（3 批滤膜的平均值）。灰色的体积是用来计算表 4 中蛋白质回收量的体积。

表 2. 典型的浓缩液体积与旋转时间（定角转子）

| 旋转时间/分钟 | 浓缩液体积 (uL) |         |         |         |          |
|---------|------------|---------|---------|---------|----------|
|         | 3K 透析管     | 10K 透析管 | 30K 透析管 | 50K 透析管 | 100K 透析管 |
| 10      | --         | 994     | 411     | 136     | 2760     |
| 15      | --         | --      | --      | 113     | --       |
| 20      | --         | 273     | 140     | 91      | 400      |
| 30      | 947        | 159     | 111     | --      | 166      |
| 40      | 529        | 101     | 90      | --      | --       |
| 45      | 462        | --      | --      | --      | --       |
| 60      | 268        | --      | --      | --      | --       |



旋转条件：5,000 × g，室温，12 mL 起始体积。所使用的蛋白质分子量标准：对 3K 和 10K 使用细胞色素 c，对 30K 和 50K 使用 BSA，对 100K 使用 IgG，n=6（3 批滤膜的平均值）。灰色的体积是用来计算表 4 中蛋白质回收量的体积。

## 2、蛋白质截留率

Amicon® Ultra 超滤离心管的特征由标称分子量限值（NMWL）描述，即它们截留超过一定分子量的分子的能力。分子量接近 NMWL 的溶质可能只有部分被截留。滤膜的截留率取决于溶质的分子大小和形状。在大多数应用中，分子量是用来评估截留特性的一个方便的参数。建议在浓缩应用中使用 NMWL 至少比蛋白质分子量小两倍的滤膜。请参见表 3。

表 3. 蛋白质分子量标准的典型截留率

| 分子量标准/浓度             | 分子量     | 装置 NMWL | 截留率% 摆桶 | 截留率% 定角 | 旋转时间 (分钟) |
|----------------------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| α-胰凝乳蛋白酶原(1 mg/mL)   | 25,000  | 3K      | >95     | >95     | 60        |
| 细胞色素 c (0.25 mg/mL)  | 12,400  |         | >95     | >95     | 60        |
| 维他命 B-12 (0.2 mg/mL) | 1,350   |         | <25     | <25     | 60        |
| α-胰凝乳蛋白酶原(1 mg/mL)   | 25,000  | 10K     | >95     | >95     | 30        |
| 细胞色素 c (0.25 mg/mL)  | 12,400  |         | >95     | >95     | 30        |
| 维他命 B-12 (0.2 mg/mL) | 1,350   |         | <5      | <5      | 30        |
| BSA (1 mg/mL)        | 67,000  | 30K     | >95     | >95     | 20        |
| 卵清蛋白 (1 mg/mL)       | 45,000  |         | >95     | >95     | 20        |
| 细胞色素 c (0.25 mg/mL)  | 12,400  |         | <10     | <10     | 20        |
| 维他命 B-12 (0.2 mg/mL) | 1,350   |         | <5      | <5      | 20        |
| BSA (1 mg/mL)        | 67,000  | 50K     | >90     | >90     | 10        |
| 卵清蛋白 (1 mg/mL)       | 45,000  |         | ~65     | ~55     | 10        |
| 细胞色素 c (0.25 mg/mL)  | 12,400  |         | <5      | <5      | 10        |
| 甲状腺球蛋白 (0.5 mg/mL)   | 677,000 | 100K    | >90     | >90     | 20        |
| IgG (1 mg/mL)        | 156,000 |         | >90     | >90     | 20        |
| 卵清蛋白 (1 mg/mL)       | 45,000  |         | <25     | <15     | 20        |

表 3 和表 4 的旋转条件：摆桶转子（4,000 × g，15 mL 起始体积），或者定角转子（5,000 × g，12 mL 起始体积），室温，n=6（3 批滤膜的平均值）。

表 4. 典型的浓缩液回收率



| 分子量标准/<br>浓度           | 装置<br>NMWL | 旋转时间<br>(分钟) | 浓缩液体积<br>( $\mu\text{L}$ ) |     | 浓缩系数<br>( $\times$ ) |       | 浓缩液回收率<br>(%) |      |
|------------------------|------------|--------------|----------------------------|-----|----------------------|-------|---------------|------|
|                        |            |              | 摆桶式                        | 定角式 | 摆桶式                  | 定角式   | 摆桶式           | 定角式  |
| 细胞色素 c<br>(0.25 mg/mL) | 3K         | 60           | 209                        | 268 | 73.8                 | 44.6  | 93.8          | 94.4 |
| 细胞色素 c<br>(0.25 mg/mL) | 10K        | 20           | 219                        | 273 | 71.4                 | 44.8  | 95.9          | 95.1 |
| BSA (1 mg/mL)          | 30K        | 20           | 206                        | 140 | 72.8                 | 85.5  | 96.2          | 95.5 |
| BSA (1 mg/mL)          | 50K        | 15           | 201                        | 113 | 77.7                 | 106.8 | 90.7          | 92.0 |
| IgG (1 mg/mL)          | 100K       | 30           | 244                        | 166 | 67.6                 | 71.9  | 81.0          | 82.9 |

灰色列取自表1和表2。

### 3 浓缩液回收率

浓缩液中的样本回收率低可能由于吸附损失、过度浓缩、或者样本穿过滤膜造成。

- 吸附损失取决于溶质浓度、其疏水性、温度、与过滤装置表面的接触时间、样本成分及 pH 值。为最大限度地降低损失，离心后请立即取走浓缩后样本。
- 如果样本起始浓度高，请监视离心过程，以免使样本过度浓缩。过度浓缩可导致沉淀和样本损失。
- 如果样本看起来渗过了滤膜，请选用较低 NMWL 的超滤离心管。

### 4 化学相容性

Amicon® Ultra 超滤离心管适用于生物液体及水溶液。使用前，请检查样本与装置的化学相容性。

表 5. Amicon® Ultra 超过滤器的化学相容性



| 酸    | 浓度    |            | 浓度      |
|------|-------|------------|---------|
| 氨基磺酸 | ≤ 3%  | 三氟乙酸 (TFA) | ≤ 30%*  |
| 甲酸   | ≤ 5%* | 三氯乙酸 (TCA) | ≤ 10%*  |
| 磷酸   | ≤ 30% | 硝酸         | ≤ 10%   |
| 硫酸   | ≤ 3%  | 盐酸         | ≤ 1.0 M |
| 乳酸   | ≤ 50% | 乙酸         | ≤ 50%*  |

#### 碱

|      |       |      |         |
|------|-------|------|---------|
| 氢氧化铵 | ≤ 10% | 氢氧化钠 | ≤ 0.5 M |
|------|-------|------|---------|

#### 醇

|    |       |     |       |
|----|-------|-----|-------|
| 甲醇 | ≤ 60% | 异丙醇 | ≤ 70% |
| 乙醇 | ≤ 70% | 正丁醇 | ≤ 70% |

#### 洗涤剂

|                    |        |                    |        |
|--------------------|--------|--------------------|--------|
| Alconox®洗涤剂        | ≤ 1%   | Triton® X-100表面活性剂 | ≤ 0.1% |
| CHAPS洗涤剂           | ≤ 0.1% | Tween® 20表面活性剂     | ≤ 0.1% |
| Lubrol® PX洗涤剂      | ≤ 0.1% | 十二烷基硫酸钠 (SDS)      | ≤ 0.1% |
| Nonidet™-P 40表面活性剂 | ≤ 2%   | 脱氧胆酸钠              | ≤ 5%   |
| Tergazyme®洗涤剂      | ≤ 1%   |                    |        |

#### 有机溶剂

|             |       |      |       |
|-------------|-------|------|-------|
| 苯           | 不建议使用 | 三氯甲烷 | 不建议使用 |
| 吡啶          | 不建议使用 | 四氯化碳 | 不建议使用 |
| 丙酮          | 不建议使用 | 四氢呋喃 | 不建议使用 |
| 二甲亚砜 (DMSO) | ≤ 5%* | 乙腈   | ≤ 20% |
| 甲苯          | 不建议使用 | 乙酸乙酯 | 不建议使用 |
| 甲醛          | ≤ 5%  |      |       |

#### 其他

|                 |         |                      |          |
|-----------------|---------|----------------------|----------|
| 苯酚              | ≤ 1%    | 咪唑                   | ≤ 100 mM |
| 丙三醇             | ≤ 70%   | 尿素                   | ≤ 8 M    |
| 二硫苏糖醇 (DTT)     | ≤ 0.1 M | 巯基乙醇                 | ≤ 0.1 M  |
| 焦碳酸二乙酯          | ≤ 0.2%  | 三羟甲基氨基甲烷缓冲剂 (pH 8.2) | ≤ 1 M    |
| 聚乙二醇            | ≤ 10%   | 碳酸钠                  | ≤ 20%    |
| 磷酸盐缓冲剂 (pH 8.2) | ≤ 1 M   | 盐酸胍                  | ≤ 6 M    |
| 硫酸铵             | 饱和的     |                      |          |

\* 与此化学物接触可能会造成部件的材料析出。建议使用空白溶剂确定析出物是否可能干扰化验。

#### 四、注意事项：

1. 超滤管滤膜一旦湿润后不可再次干燥。
2. 使用后的超滤管保存在 20%的乙醇中 4°C保存。

#### 五、产品订购信息



| 初始体积 (mL)            | 最终浓缩液体积 (μL) | 产品                    | 数量/包 | 3K          | 10K         | 30K         | 50K         | 100K        |
|----------------------|--------------|-----------------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 0.5                  | 15-20        | Amicon® Ultra-0.5 装置  | 8    | UFC500308   | UFC501008   | UFC503008   | UFC505008   | UFC510008   |
|                      |              |                       | 24   | UFC500324   | UFC501024   | UFC503024   | UFC505024   | UFC510024   |
|                      |              |                       | 96   | UFC500396   | UFC501096   | UFC503096   | UFC505096   | UFC510096   |
|                      |              |                       | 500  | UFC5003BK   | UFC5010BK   | UFC5030BK   | UFC5050BK   | UFC5100BK   |
| Amicon® Ultra-0.5集液管 |              |                       | 96   | UFC50VL96   |             |             |             |             |
| 2                    | 15-70        | Amicon® Ultra-2 试生产装置 | 24   | UFC200324PL | UFC201024PL | UFC203024PL | UFC205024PL | UFC210024PL |
| 4                    | 50-100       | Amicon® Ultra-4 装置    | 8    | UFC800308   | UFC801008*  | UFC803008   | UFC805008   | UFC810008   |
|                      |              |                       | 24   | UFC800324   | UFC801024*  | UFC803024   | UFC805024   | UFC810024   |
|                      |              |                       | 96   | UFC800396   | UFC801096*  | UFC803096   | UFC805096   | UFC810096   |
| 15                   | 150-300      | Amicon® Ultra-15 装置   | 8    | UFC900308   | UFC901008*  | UFC903008   | UFC905008   | UFC910008   |
|                      |              |                       | 24   | UFC900324   | UFC901024*  | UFC903024   | UFC905024   | UFC910024   |
|                      |              |                       | 96   | UFC900396   | UFC901096*  | UFC903096   | UFC905096   | UFC910096   |

\* Amicon® Ultra-4和-15 10K装置供体外诊断用。所有其他装置仅用于研究。

## 六、超滤离心管使用过程中的几个问题：

1、如何选择合适的超滤管：这主要是由截留分子量 MWCO 和处理体积来决定的。到底选择多大截留分子量比较合适呢？3kDa、10kDa、30kDa、50kDa、还是 100kDa？通常应截留分子量不应大于目的蛋白分子量的 1/3，比如目的蛋白分子量为 35kDa，就可以选择 10kDa 截留分子量的超滤管。若目的蛋白分子量为 10kD 左右，则可以用截留分子量 3kD 的超滤管。认真阅读使用说明书，注意超滤膜对各种化学物质的耐受程度有所不同。

2、注意转速和加速度不可太快，否则直接损坏超滤膜。开始离心超滤（离心机预冷至 4 度）。不同离心机的转速 rpm 换算成 g 之后，有所不同。离心机的加速度调至最低档，减小对膜的压力。注意，一定要等离心机达到目的转速之后，方可离开离心机，否则离心机出问题，无法第一时间处理，后果不可预测！在实际使用中，一般转速开的比说明书里的要低，这样可以延长离心管的使用寿命。

3、当浓缩到剩下 1ml 时，【取 50ul 国产 Bradford 溶液，加入 10ul 流穿，看有没变蓝色，以此判断超滤管是否漏掉蛋白。如果管漏了，将上层和流穿重新倒入新管中开始超滤。要精确判断是否漏管，用 5mg/ml 的 BSA 离心 10min，再取流穿，跑蛋白胶或 Bradford 粗测】，继续加入剩下的蛋白液浓缩（在冰上操作，防止蛋白受热），直到所有浓缩液都加



完为止。离心过程中注意是否发生蛋白沉淀，导致堵管。若发生沉淀，要确定沉淀的具体原因，是蛋白浓度过高还是 Buffer 不合适；前者可用多根超滤管同时超滤，降低浓度的办法解决，后者的方法是换不同的 Buffer，直到蛋白不发生沉淀为止。

4、前面几步用以浓缩蛋白，如果要换 Buffer，在总蛋白液浓缩至 1ml 左右的时候，轻轻加入新的 Buffer（经 0.22um 超滤膜超滤），再浓缩至 1ml 左右，连续三次，最后一次的浓缩终体积根据需要的蛋白浓度而定，一般不多于 500ul，也有浓缩至 200ul 以内的情况。按照每次至少 10 倍左右的体积浓缩算，三次达到 1000 倍以上，基本上可以达到换 buffer 的目的。

5、取出最终蛋白浓缩液的操作在冰上操作，用黄枪头（200ul）取，轻轻顺着边缘插入枪头，轻轻吹打、混匀蛋白液，注意不要碰到超滤膜，然后吸取浓缩液，每次吸接近 200ul，直到吸完。管底剩下的最后一点浓缩液不必吸取，否则难度太大，有可能损坏超滤膜。最后加入超纯水到超滤管中，没过超滤膜，防止膜失水变干。

6、以下是处理超滤管，重复利用超滤管的步骤。

7、倒出超滤管里的水，用超纯水轻轻润洗几次，【若管底有可见的蛋白沉淀，可以先加入水，然后用枪头吹打，注意不要碰到膜，吹打至沉淀悬起，然后倒掉，不可用自来水猛冲】然后加入 0.1M 的 NaOH 溶液，室温放置 20min，期间平衡超滤管。再离心 10min。倒出残留的 NaOH 溶液，将管芯浸入超纯水的烧杯（1 或 2L）中，放置几个小时，再换新的水，放置几个小时，不断稀释 NaOH 浓度。50ml 管和盖子用自来水洗，内壁再用超纯水洗干净。

8、取出浸没的管芯，加至接近满的超纯水，50ml 管也加满超纯水，将管芯慢慢放入 50ml 离心管，排出部分水，然后盖上盖子，放 4 度保存，直到下次使用。