SARTORIUS

常见问题

实验室超滤

技巧篇

1、蛋白截留不住?蛋白损失严重?该怎么选择选对截留分子量?

您是否苦于超滤管流速慢呢?很有可能是截留分子量选小了。

截留分子量是根据已知分子量(以道尔顿为单位)的溶质保持>90%的能力而给出的额定值。对于蛋白质,建议选择的截留分子量是需要截留的溶质分子质量的1/6-1/3。如果首先考虑流速的因素,则选择需要截留的溶质分子质量的1/3作为膜的截留分子量;如果截留效果作为主要考虑,则选择需要截留的溶质分子质量的1/6作为膜的截留分子量。另外,由于不同系列产品的工艺不一样,更换产品系列时,最适合的截留分子量有时候是会变化的。

2、浓缩后我发现浓缩液中没有目的蛋白,可能的原因是?

首先,超滤管的最低起始蛋白浓度为 0.1 mg/ml. 请确保您的样本的起始浓度大于这个浓度。
其次,如果问题仍然出现。请不要丢弃您的样本滤过液,以做下一步分析:

1)如果您的样本在滤过液中,那么请排查:

a) 您是否选择了合适截留分子量的超滤管(目的蛋白分子量的1/2或者1/3)?
b) 使用的离心力是否是在最高范围内?如果您使用的是rpm,请换算成相应的g离心
c) 离心机最近是否有校准过?
d)您是否首次尝试这个蛋白?如果能确保您用同样的超滤管对其他蛋白成功操作的话,那么有可能是您的目的蛋白的原因。有时蛋白会因其本身的一些特性(构象差异)而影响浓缩效果,建议选用上一分子量级别的超滤管(如原本选用 30 K,此时可以选择 10 K)。

2)如果您的样本也不在滤过液中:

a) 您的样本起始蛋白浓度是否大于 0.1 mg/ml?
b) 您用来确定样本浓度的方法是什么?是否可信?
c) 您的目的蛋白是不是沉淀了?如果是,具体解决方法请参考上面的关于蛋白沉淀的方法。

3、如何最大程度地实现蛋白质浓缩和蛋白质回收?

应优先根据样品调整工艺, 因为同一种膜、截留分子量和装置组合对于不同的蛋白质类别甚至物种而言可能并非最优之选。在选择过程中, 应首先执行以下步骤;1)考虑样品和分子特性;改变pH 可以增加构象重排风险, 而降低温度可能降低浓缩效率等。2)选择正确的膜;众所周知, 超滤没有太多的膜选项, 但您应对再生纤维素(RC)、Hydrosart® 和聚醚砜(PES)材料进行测试, 以确定哪种材料可为您的特定材料提供最低的非特异性结合和最优的回收率。3)选择合适的截留分子量, 通常是靶标1/3大小的截留分子量最适合;4)选择合适的装置;赛多利斯拥有适用于低浓度样品、DNA、蛋白质、病毒、过滤应用等广泛的装置选项;选择合适的装置可以有效改善结果。5)使用合适的装置处理方法;例如预冲洗以去除分析物或用非干扰蛋白冲洗以钝化结合位点并减少损失。最后, 6)考虑样品控制方法, 例如使用装置内的"死体积"移走所有截留物, 或预灌装滤液管以控制截留物的最终体积。

截留分子量	蛋白质分子量	分子大小	BPCO (dsDNA)	BPCO (ssDNA)	估计的孔径
1,000 K	>3000 kDa	300 – 600 nm	>5000 bp	>9000 sb	100 nm
300 K	900 – 1800 kDa	90 – 200 nm	>1500 bp	>2900 sb	30 nm
100 K	300 – 900 kDa	30 – 90 nm	>600 bp	>900 sb	10 nm
50 K	150 – 300 kDa	15 – 30 nm	>300 bp	>475 sb	7 nm
30 K	90 – 180 kDa	9 – 15 nm	>50 bp	>275 sb	4 nm
10 K	30 – 90 kDa	5 – 9 nm	>30 bp	>90 sb	2.5 nm
5 K	15 – 30 kDa	3 – 5 nm	>20 bp	>50 sb	1.5 nm
3 K	10 – 20 kDa	2.5 – 3.6 nm	>15 bp	>30 sb	1.2 nm
2 K	3 – 10 kDa	2 – 3 nm	>10 bp	>10 sb	1 nm

4、我的样品浓度很低, 有什么好的预处理方法吗?

如果样品浓度很低, 无法做后续分析, 这样就需要通过超滤来浓缩样品。Vivaspin® 采用超低吸附的PES 和RC 材质滤膜, 蛋白回收率高达 95 %, 另外我们还有**吸附极低的Hydrosart® 膜**可以选择。对于有些样品含量非常少的情况, 除了选择我们吸附量很低的膜, 我们还有如下**超滤前处理技巧推荐:**

a) 尽量选择较小的截留分子量的膜
b) 使用水平转子优于角转子
c) 浓缩完用缓冲液清洗多次回收
d) 使用前可以先对膜进行"封闭钝化"

钝化步骤: 先用Arium 水(Arium 水机生产的超纯水或去离子水)清洗, 用移液器去除残留水分。选择下面推荐的其中一种钝化液室温至少 2 小时或过夜浸泡(除了Triton X-100不推荐过夜), 去除钝化液, 用Arium 水冲洗 3 - 4 遍。直接使用或 4 度Arium 水保存。

钝化液类型

奶粉	1% 加入Arium 水中
BSA	1% 加入PBS 中
Tween 20	5% 加入Arium 水中
SDS	5% 加入Arium 水中
Triton X-100	5% 加入Arium 水中
PEG 3000	5% 加入Arium 水中

5、在浓缩过程中如何减少蛋白质降解?

在浓缩过程中, 不均衡的蛋白质、pH/样品缓冲液条件以及高剪切应力通常会导致降解产生。同样的, 蛋白质的形状越呈线性, 高离心力对结构的不利影响就越大。如果蛋白质呈线性、浓缩时间较慢, 且离心力低于建议的最大值(约 50 % 较好), 则影响会较小。对于更多的球状分子, 建议使用最接近最小样品量的装置, 这样可确保更大的表面积、减少堵塞概率并增加样品上的力。尽管如此, 您还应注意:如果您的蛋白质超滤膜材质选择不合适, 或者您的蛋白质具有"粘性", 则表面积越大, 非特异性结合的比率就会越高。诸如**Vivaflow®** 膜包等实验室用切向流膜包可为样品提供真正的平行流路, 能够进一步确保最小的剪切应力。应注意的是, 一般的搅拌细胞容器会施加相对较大的剪切应力。对于pH/缓冲液条件, 一旦选择了最优的缓冲液pH 条件, 就应该在整个浓缩置换过程中维持这个条件。使用**Vivaflow®** 装置和离心式**Vivaspin® 20** 可以轻松进行缓冲液置换, 即使浓度增加也可以保持正确的缓冲液平衡, 您也可以在需要时添加新的缓冲液。

6、可以用超滤管控制浓缩倍数吗?

首先, Vivaspin® 超滤管有最小回收体积, 保证至少回收 30 µl的样本, 并且不会让过长的离心时间导致样品干燥。另外, Vivaspin® Turbo 系列的尖角死体积回收器可以让小体积样品得到最大的回收。另外, 如果需要浓缩一定的倍数, 使用超滤管也可以直接完成, 不需要额外的步骤。首先, 预先计算外管液体达到滤过孔的刻度线的位置需要的体积, 然后减去样品要滤出的体积, 就是需要预先加入外管的缓冲液的体积。先在外管中加入计算得到的缓冲液, 待滤出液的体积流入外管缓冲液中, 使液面达到滤出孔, 则样品不再浓缩, 浓缩倍数得到了固定, 样品浓缩就是那么简单。

7、用浓缩后的蛋白做下游分析时发现有干扰, 可能的原因是?

超过滤薄膜含有微量甘油和叠氮化钠。如果此材料干扰分析, 可用缓冲液或去离子水预清洗。如果干扰仍然存在, **用0.1 N NaOH 清洗**, 然后用缓冲液或去离子水再次清洗后甩干。

8、我的蛋白在浓缩时出现了沉淀是为什么?

蛋白如果浓缩过快或者过度浓缩都有可能引起蛋白沉淀。我们建议蛋白浓缩后的**最终浓度不超过 20 mg/ml**。对于对浓缩速度敏感而容易沉淀的蛋白, 我们建议的改进方法是:

1)离心力降为推荐离心力的 30 % - 50 %

2)改选择下一级过滤装置(如原本选用 10 K, 此时可以选择 30 K)

3)在浓缩过程中, 取出超滤管, 用枪头反复吹吸几次

选型篇

1、如何一次性浓缩大量样品?

在实验室浓缩大量的样品既耗时又耗费成本。令人欣喜的是, Vivaflow® 切向流膜包可以在实验室浓缩高达 5 L 的样品, 您无需投入大量成本, 也无需配备造价高昂、占用空间的大工艺规模系统就能实现这一方法。**Vivaflow®** 切向流膜包坚固耐用, 专为实验室规模设计, 具有PES和Hydrosart®(获得专利的再生纤维素膜)两种膜选项。提供一次性(**Vivaflow® 50**)和重复使用(**Vivaflow® 50R and Vivaflow® 200**)两种选择, 同时满足经济性和防止污染要求。采用大表面积、细通道、回旋流再循环设计, 仅需 30 分钟即可将1L样品浓缩至 50 倍;还可以在 75 分钟内浓缩更大的样品量(例如 5 L)。只需一次最终冲洗即可实现浓缩物的完全回收。

了解更多

2、赛多利斯超滤系列可以使用哪些膜?

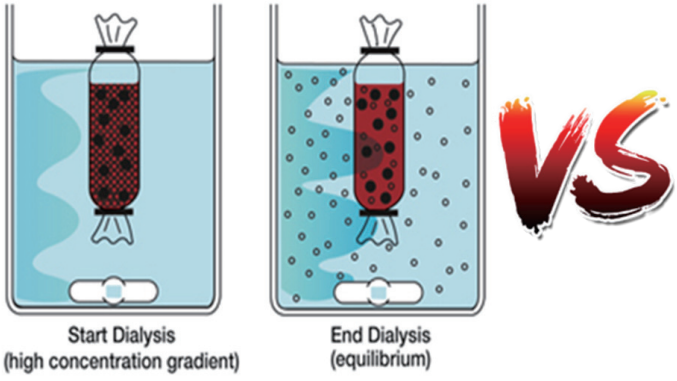
我们提供四种独特的超滤膜。再生纤维素(RC)膜用于一般应用;对于某些样品类型, 聚醚砜(PES)膜可以最大程度地提高回收率;三醋酸纤维素(CTA)通常用于渗透/滤液应用;我们的专利Hydrosart® 膜是一种化学性能更强的再生纤维素膜。

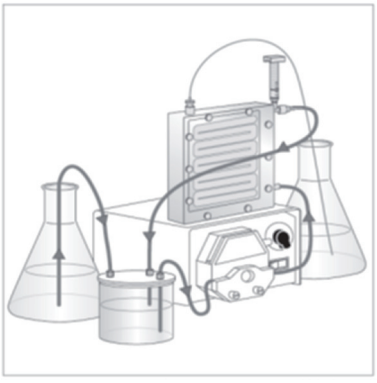
3、装置提供的体积范围是多少?

实验室装置可浓缩 100 µl 至 5 L 的样品量。具体来说, Vivaspin® 500 为100-500µl;Vivaspin® 2 为0.4-2mL;Vivaspin® Turbo 4 为 2 - 4 mL;Vivaspin® 为 2 - 6 mL;Vivaspin® 15 R 为 4 - 15 mL;Vivaspin® Turbo 15 为 4 - 15 mL;Vivaspin® 20为5-20mL;Vivacell® 100 为 20 - 100 mL;Vivaflow® 50 为 50 mL - 3 L;Vivaflow® 50 R 为 50 mL - 1 L;Vivaflow® 200 为 0.5 - 5 L。

4、我习惯用半透膜或是透析来做脱盐浓缩,超滤的方法是否可以让我实验更加高效?

浓缩用超滤管, 脱盐用透析袋或脱盐柱, 这是很多实验室一直沿用的实验操作。其实, 超滤管做“脱盐+浓缩”, 也是很多蛋白操作高手的小诀窍。而如果您的样品量有几十毫升甚至几升, 选择赛多利斯的超滤膜包会在一**小时之内完成自动换液**, 非常方便。





5、用超滤管来分离两种蛋白可以吗?

因为超滤膜的孔径不是规则的结构, 所以不能进行精确的分离, 所以按照经验, 我们推荐两个蛋白的分子量要**相差一个数量级(10 倍)**以上才可以进行分离。**赛多利斯专有的 300 k、1000 k 和 0.2 µm 的孔径, 方便实验样品蛋白粗分离处理**。

6、哪种超滤方法是病毒浓缩的理想之选?

病毒载体和疫苗在再生医学领域的需求日益增长。通常, 装置、膜以及截留分子量的选择标准与蛋白质和其他生物子分相同, 除非针对病毒有特殊的考虑。根据经验, 一般会选择接近靶标分子量三分之一的截留分子量(MWCO)。对于分子量与直径无关的病毒, 会有一个针对直径和DNA 长度的最佳截留分子量比较表(参见表A)。例如, 对于直径约 90 nm 的慢病毒, 我们发现 300 K MWCO膜效果最佳, 而 100 K MWCO 膜也能提供良好的效果, 但速度略慢。此外, 膜的性质也会对此产生影响。Hydrosart® 和再生纤维素在pH 值为 7 时具有中性电荷, 而PES 则具有轻微的负电荷, 这一点应予以考虑。总之, 应始终以测试和鉴定为准。例如, 最近的一项研究表明, 对于最佳浓度的 15 ml 慢病毒样品, 采用 300 K MWCO Hydrosart® 膜的切向流系统(Ambr® Crossflow)是理想的回收装置, 其次是 100 K MWCO PES 膜。以下链接提供了病毒浓缩最佳方法的回顾和更多示例。

了解更多

7. Vivaspin®、Vivacell® 和Vivaflow® 装置可以用于DNA 吗?

所有装置都可以根据链长浓缩双链和单链DNA。为了获得最佳回收率, 请使用赛多利斯Vivacon® 系列。该系列专门针对稀释DNA 样品而采用了水平Hydrosart® 膜。并且提供反向离心和PCR级装置。

8、可以用超滤管分离外泌体吗?

答案是可以的, 除此之外核酸、纳米微球颗粒、多糖、病毒都可以用超滤的方法, 而且超滤不会破坏外泌体的结构。对于外泌体, 我们推荐使用我们的过滤设备进行杂质去除, 然后用超滤设备进行外泌体的浓缩。**具体步骤如下:**

a) 收集培养液, 离心去除细胞和细胞碎片后, 使用 0.2 µm针头式滤器(适合 1 - 100 mL 样品)或正压/负压过滤器(适合100 - 15,000 mL 样品)过滤去除囊泡等大颗粒物质

b) 样品使用超滤管(< 20 mL), 超滤杯(50 - 250 mL), 或Vivaflow® 膜包(100 mL - 5 L)超滤制备外泌小体

使用篇

1、Vivaspin® 装置可以旋转脱水至干燥状态吗?

不可以, 所有Vivaspin® 装置均内置了"死体积"区, 范围为 5 µl 到 100 µl。因此, 请确保为您的样品选择具有正确"死体积"的装置。此外, Vivaspin® Turbo 系列具有尖角"死体积", 可确保吸出最后每一微升。

2、Viva 系列的化学相容性如何?

赛多利斯实验室超滤装置主要用于生物样品, 但也可用于环境和工业样品。外壳和膜材料的相容性是必不可少的考虑因素。请参考特定装置使用说明或咨询赛多利斯技术支持。通常, 采用聚丙烯的装置(例如Vivaspin® Turbo 系列)可提供优异的化学兼容性。

3、超滤膜一次使用就碎了是怎么回事?可能和我们的离心机有关系

超滤管使用如果转速太高, 离心力肯定会更大!这样不断用力磨损, 很容易第一次就碎了, 也可能使用几次碎了!离心机的转速与离心机的半径以及离心力都有关系, 不同半径的离心机, 相同转速出来的离心力也不一样, 可以公式换算!**说明书中明确指出使用超滤管的最大转速和离心力, 做实验时要根据不同品牌的超滤管调整到离心力的承受范围内**。另外, 超滤管在离心机中的摆放也是有讲究的, 使用角转子时, 超滤管放置方式要求印有刻度一侧朝上|朝外; 不然也会发生破裂。在浓缩管中加入样品, 不得超过最大体积。(以Vivaspin® Turbo 15 为例, 若使用水平转子不得超过 15 ml 样品, 若角转子则 9 ml)

4、我想重复使用超滤管, 超滤管怎么重复使用和清洗呢?

首先, 超滤管都是推荐一次性使用的。虽然有的人可以用几次, 但是过滤效果已经严重受影响了, 后续实验可信度会降低。但是, 如果不得不重复使用, 需要自行验证, 所以, 滤出液一定要保留。另外, **重复使用要注意如下事项:**

a)操作时吸头尖端不要戳在超滤膜上, 防止膜损伤

b)如果暂时不用, 要保持试管中的液面浸没超滤膜

c)需要清洗和保存, 使用 70 % 乙醇洗涤, 使用 10 % 乙醇或去离子水保存。液面要完全浸没超滤膜

5、超滤管如何进行灭菌?

70 % 乙醇灭菌, 不可以用高压高温灭菌。所有超滤管都可以用 70 % 乙醇和环氧乙烷(EtO)处理, 以进行灭菌。但请注意, 尚未对处理后灭菌进行任何研究。对于DNA 研究, 已对Vivacon® PCR 等级系列进行了EtO 处理, 以失活任何干扰的痕量DNA。

6、我的实验需要无热源，怎么处理超滤管呢？

建议用Vivaspin® Turbo 系列，用1N NaOH 溶液室温浸泡 1 小时，3000 g 离心，弃去剩余溶液。再使用无热源水 3000 g 离心力冲洗两次，注意，RC膜不太耐碱，使用NaOH处理时最好选择PES膜材质超滤管，防止滤膜污染。

7、超滤管是否不含RNA酶呢？

我们不保证超滤管不包含RNA 酶，建议您可以用 0.1 % DEPC 在 37 度浸泡 2 小时，以完全灭活RNA 酶。残留的DEPC 可以用超纯水洗涤除去。

8、有时候我用超滤离心管连水都离不下来，可能的原因是什么呢？

超过滤薄膜含有微量甘油。如果出现这种情况，先用0.1 N NaOH 清洗再离心。最后用缓冲液或去离子水水再次清洗后甩干。清洗后的滤膜应立即使用，如暂时不用，请保持润湿状态，避免重新干燥。另外，有些水的水质本身杂质较多，或是不同水机对水的处理效果有差异，这个时候可以检查是否水机工作正常，然后用 0.2 μm 的针头滤器过滤水，然后在进行超滤，效果可能会好很多！

9、样品离心不下来?是不是滤膜污染？

对于有些样品，可以造成滤膜污染，从而大大降低样品的超滤效率。**滤膜污染是指料液中某些成分在膜表面或膜孔中沉积，导致膜渗透流率下降的现象。如果出现此种情况，我们建议使用强亲水性、强疏水性膜、同电性的膜材质，可改善超滤效果。**

我们的超滤管Vivaspin® 系列具有专利的尖角死体积样品安全保护技术，防意外甩干，给珍贵的样品更多一道保障！另外，根据蛋白的分子量和体积的不同，Vivaspin® 系列有多达 24 种不同选择。样品处理体积包括从 100 µl 到 20 ml，截留分子量也涵盖了2 KDa 到 0.2 µm。

最后要补充的是，**超滤是大分子脱盐、浓缩最方便的方法。**它重复性好，已经在蛋白、抗体、病毒、外泌体、核酸、囊泡等样品制备中建立标准操作。

10、是否可以针对特定需求提供应用指南？

赛多利斯实验室超滤提供丰富的实验室超滤应用指南。您可以通过下面的链接寻找，更多指南可通过联系赛多利斯技术支持获得：

了解更多

与您所在地区的赛多利斯代表联系，以了解各种技巧、诀窍、应用和产品的详细信息。

销售与服务联系方式

更多联系信息，请访问

www.sartorius.com.cn

赛多利斯（上海）贸易有限公司
邮箱 lab.cn@sartorius.com
服务热线 400 920 9889 | 800 820 9889

上海
上海市浦东新区张江高科技园区金科路 4560 号 1 号楼北楼三层，201210
电话 +86 21 6878 2300

北京
北京市顺义区空港工业区 B 区裕安路 33 号，101300
电话 +86 10 8042 6300

广州
广州市越秀区水荫路 117 号 1105 单元，510075
电话 +86 20 3761 7284

苏州
苏州市虎丘区科技城锦峰路 158 号 101park-28 幢 201，215163
电话 +86 512 6616 0490

成都
成都市上东大街 246 号新良大厦 2406 室，610012
电话 +86 28 8666 6877

西安
西安市和平路 118 号和平银座 1107 室，710001
电话 +86 29 8751 2305

技术规格如有变更，恕不另行通知。
赛多利斯保留最终解释权和修改权。

版本 09 | 2020

关注赛多利斯实验室