

ЦЕНТРИФУЖНЫЕ ФИЛЬТРУЮЩИЕ УСТРОЙСТВА ДЛЯ ОБЪЕМОВ ДО 500 МКЛ

UFC501096, Amicon® Ultra-0.5

Каталог. № : **UFC501096**
Производитель: **Millipore Corporation (Ирландия)**

Методика от **11-2011**
Версия **A**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Для исследовательских работ, не для диагностических процедур

ВВЕДЕНИЕ

Millipore's Amicon® Ultra-0.5 - центрифужные фильтрующие устройства, обеспечивающие быструю ультрафильтрацию, с возможностью факторов высокой концентрации и легким восстановлением концентрата из разведенных и комплексных образцов. Вертикальный дизайн и доступность площади поверхности мембраны обеспечивают быструю обработку образца, высокое извлечение образцов (в основном больше 90% исходного раствора) и возможность 30-кратной концентрации. Типичное время обработки от 10 до 30 минут в зависимости от Предела Номинального Молекулярного Веса (NMWL). Поляризация вещества и последующее загрязнение мембраны были сведены к минимуму с помощью вертикального дизайна, а также физическая мертвая точка фильтрующего устройства предотвращает откручивание до сухости и потенциальную потерю образца. Эффективное восстановление концентрированного образца достигается за счет удобного шага обратного откручивания после сбора фильтрата. Устройства Amicon® Ultra-0.5 поставляются нестерильными и предназначены для одноразового использования.

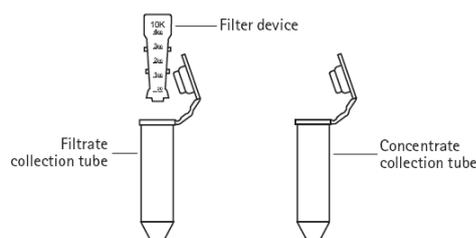
Линейка продуктов Amicon® Ultra-0.5 включает в себя 5 различных уровней cut-off (Предел Номинального Молекулярного Веса, NMWL). Эти устройства предназначены для исследовательских целей, а не для использования в диагностических процедурах.

- Устройство Amicon® Ultra 3K - 3,000 NMWL
- Устройство Amicon® Ultra 10K - 10,000 NMWL
- Устройство Amicon® Ultra 30K - 30,000 NMWL
- Устройство Amicon® Ultra 50K - 50,000 NMWL
- Устройство Amicon® Ultra 100K - 100,000 NMWL

ПРИМЕНЕНИЕ

- Концентрация биологических образцов, содержащих антигены, антитела, ферменты, нуклеиновые кислоты (образцы ДНК и РНК, одно- или двуспиральные), микроорганизмы, элюаты из колонок и очищенные образцы.
- Очистка макромолекулярных компонентов, найденных в экстрактах культур тканей и клеточных лизатах, выделение праймеров, линкеров или молекулярных меток из реакционной смеси, и удаление белка до HPLC
- Обессоливание, обмен буферов или диафильтрация

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ



Filter device – фильтрующее устройство
Filtrate Collection tube – пробирка для сбора фильтрата
Concentrate collection tube - пробирка для сбора концентрата

Устройство Amicon® Ultra-0.5 поставляется с двумя микроцентрифужными пробирками. Во время работы одна трубка используется для сбора фильтрата, другая для восстановления концентрированного образца.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Центрифуга с ротором с фиксированным углом, который может вместить 1.5 мл микроцентрифужные пробирки.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Во избежание повреждения устройства во время центрифугирования, проверьте клиренс до центрифугирования.

ПРИГОДНОСТЬ

Убедитесь в пригодности для предполагаемого использования. См. раздел «Как рассчитать извлечение».

ХРАНЕНИЕ

Хранить при комнатной температуре.

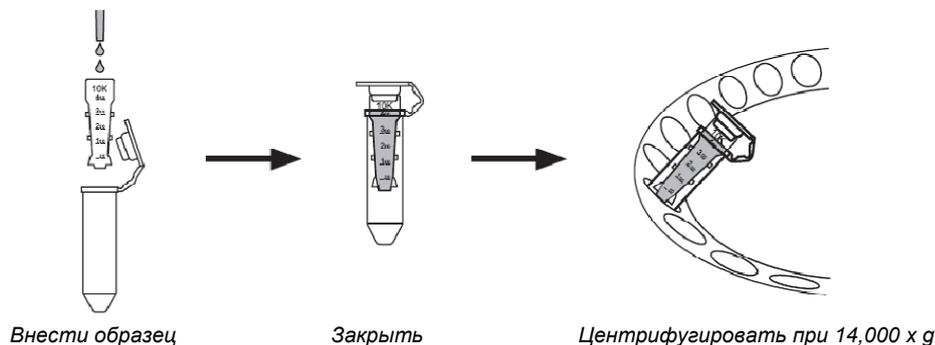
ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПРОМЫВКА

В мембранах для ультрафильтрации в Устройстве Amicon® Ультра-0.5 содержатся следовые количества глицерина. Если этот материал мешает анализу, предварительно промыть устройство с буфером или Milli-Q® водой. Если интерференция продолжается, промыть раствором 0.1 N NaOH с последующей второй промывкой буфером или Milli-Q® водой.

ВНИМАНИЕ: Не допускайте высыхания мембраны в Устройстве Amicon® Ультра фильтр после того, как она была увлажнена. Если вы не сразу используете устройство после предварительной промывки, оставьте жидкость на мембране до использования устройства.

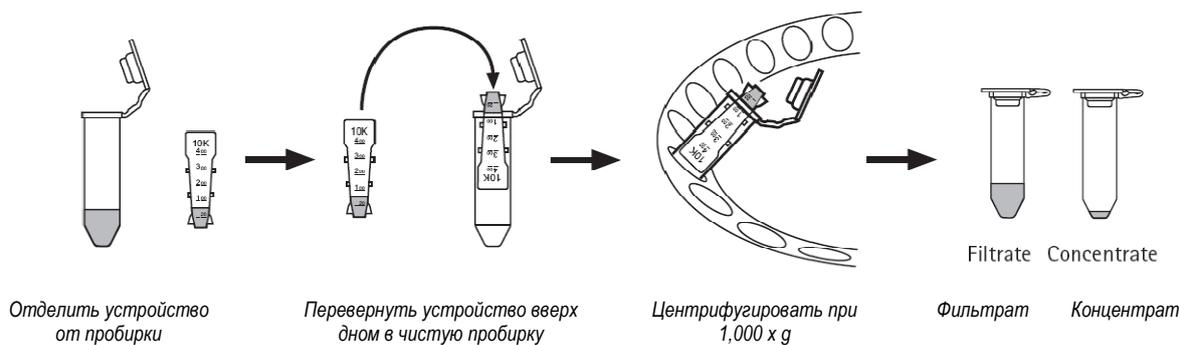
КАК ИСПОЛЬЗОВАТЬ ЦЕНТРИФУЖНЫЕ ФИЛЬТРУЮЩИЕ УСТРОЙСТВА AMICON® ULTRA-0.5

1. Вложите устройство Amicon® Ultra-0.5 в одну из поставляемых микроцентрифужных пробирок.
2. Внесите образец объемом до 500 мкл в фильтрующее устройство Amicon® Ultra и закройте его.
3. Поместите закрытое устройство в ротор центрифуги закрытой стороной с крышечкой к центру ротора; сбалансируйте ротор аналогичным устройством.
4. Центрифугируйте устройство при 14,000 x g на протяжении 10-30 минут в зависимости от NMWL используемого устройства. См. Рис.1 и Таблицу 3 для типичного времени центрифугирования.



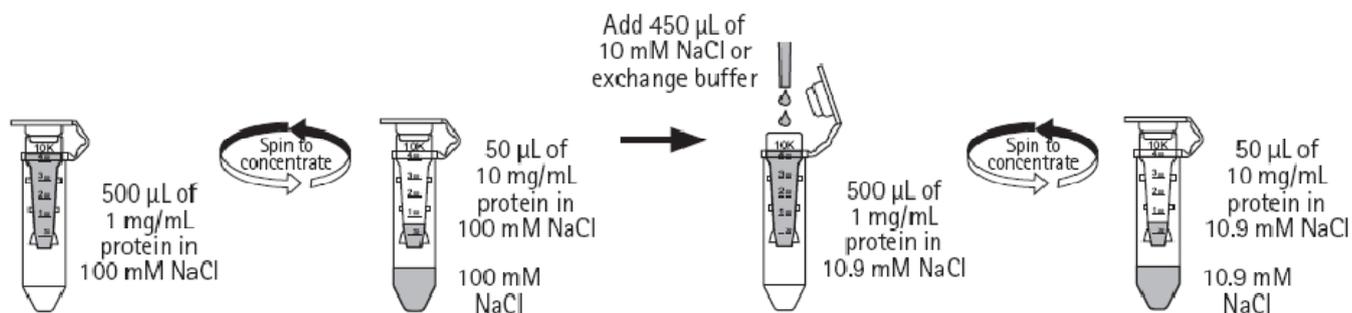
5. Выньте собранное устройство из центрифуги и отделите фильтрующее устройство Amicon® Ultra от микроцентрифужной пробирки.
6. Для восстановления концентрированного раствора поместите фильтрующее устройство Amicon® Ultra вверх дном в чистую микроцентрифужную пробирку. Поместите в центрифугу, разместив концом с открытой крышкой к центру ротора; сбалансируйте ротор аналогичным устройством. Вращайте 2 минуты при 1,000 x g для переноса концентрированного образца из устройства в пробирку. Ультрафильтрат может храниться в центрифужной пробирке.

ЗАМЕЧАНИЕ: Для оптимального восстановления провести реверсное центрифугирование немедленно.



ОПРЕСНЕНИЕ ИЛИ ДИАФИЛЬТРАЦИЯ

Обессоливание, обмен буфера или диафильтрация являются важными методами для удаления солей или растворителей в растворах, содержащих биомолекулы. Удаление солей или обмен буферов могут быть выполнены в устройстве Amicon® Ultra-0.5 путем концентрации образца с последующим восстановлением концентрата до первоначального объема образца с любым желаемым растворителем. Процесс "вымывания" можно повторять, пока концентрация загрязняющих веществ будет в достаточной степени сокращена. См. пример ниже.



МЕТОДИКА КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК

Устройство Amicon® Ultra-0.5 30K обеспечивает лучший баланс между извлечением и временем центрифугирования для двухцепочечной ДНК для пар оснований в диапазоне от 137 до 1159. Для достижения максимального извлечения продукта ПЦР и выделения праймеров больше, чем 20 оснований, рекомендуется одно или два дополнительных центрифугирования с Tris-ЭДТА (TE) буфером.

Таблица 1. Типичное извлечение нуклеотидов на устройстве Amicon® Ultra-0.5

Продукт ПЦР (пары оснований)	Праймер ПЦР (основания)	Восстановление ПЦР (%)	Праймер ПЦР Удаление (%)	ТЕ Промывки (количество)
137	10	> 95	> 90	0
	20	> 90	> 85	1
	48	> 90	> 75	2
301	10	> 90	> 90	0
	20	> 85	> 90	1
	48	> 90	> 80	2
648	10	> 95	> 90	0
	20	> 90	> 90	1
	48	> 95	> 90	2
1159	10	> 90	>90	0
	20	> 90	> 95	1
	48	> 95	> 95	2

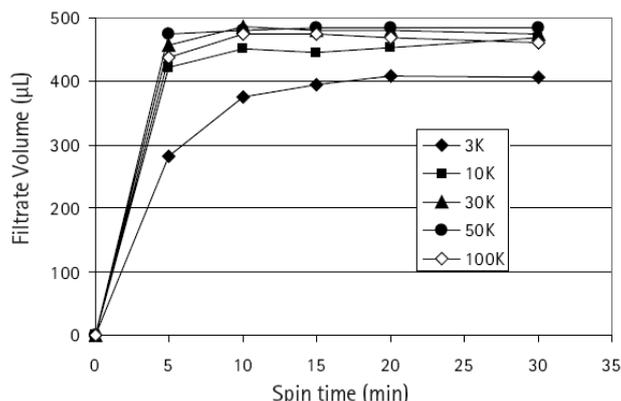
Условия центрифугирования: ротор с фиксированным углом 40°, 14,000 x g, комнатная температура, 100 мкл ПЦР и 400 мкл Буфера ТЕ для стартового объема 500 мкл, финальный объем 20-30 мкл, центрифугирование 10 минут, n=12.

МЕТОДИКА КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВ

Расход

Факторы, влияющие на расход, включают концентрацию образца, начальный объем, химическую природу раствора, относительную центробежную силу, угол ротора центрифуги, типа мембраны и температуры. Рисунок 1 и таблица 3 могут быть использованы для оценки времени, необходимого для достижения заданного объема фильтрата или концентрата для различных белковых маркеров. Типичное время центрифугирования для 500 мкл образца при фиксированном угле ротора примерно 10-30 минут (в зависимости от NMWL). Хотя большинство образцов фильтруется в первые 5-10 минут центрифугирования, низкие объемы концентрата (15-20 мкл) достигаются после центрифугирования в течение 10-30 минут.

Рисунок 1. Типичный объем фильтрата в зависимости от времени центрифугирования



Условия: ротор с фиксированным углом 40°, 14,000 x g, комнатная температура, стартовый объем 500 мкл. И использованные белковые Маркеры: Cytochrome C для 3K и 10K, BSA для 30K и 50K, и IgG для 100K, n=8

Таблица 2. Типичный объем концентрата/Коэффициента Концентрации в зависимости от времени центрифугирования

Время центрифугирования (мин.)	Устройство 3K		Устройство 10K		Устройство 30K		Устройство 50K		Устройство 100K	
	Объем Концентрата, мкл	Козф. Концентрации (x)								
5	215	2	66	7	42	12	28	18	58	9
10	114	4	35	14	23	22	20	25	19	26
15	80	6	22	22	19	27	17	30	15	33
20	62	8	20	24	17	30	15	33	13	36
30	48	10	15	31	15	32	15	36	11	41

Условия: ротор с фиксированным углом 40°, 14,000 x g, комнатная температура, стартовый объем 500 мкл. И использованные белковые маркеры: Cytochrome C для 3K и 10K, BSA для 30K и 50K, и IgG для 100K, n=12. Заштрихованные объемы были использованы для расчета извлечения белка в таблице 4.

ЗАДЕРЖКА БЕЛКОВ И ИЗВЛЕЧЕНИЕ КОНЦЕНТРАТА

Мембраны, использованные в устройствах Amicon® Ultra, характеризуются номинальным пределом молекулярного веса (NMWL), то есть способностью задерживать молекулы выше указанного молекулярного веса. Растворенные вещества с молекулярным весом около NMWL могут задерживаться лишь частично. Задержка мембраной зависит от размера и формы молекулы вещества. Для большинства приложений молекулярный вес является удобным параметром для использования при оценке характеристик. Millipore рекомендует использовать мембрану с NMWL, по крайней мере, в два раза меньшим, чем молекулярный вес белка, который намереваетесь концентрировать. См. таблицу 3 "Типичная задержка белковых маркеров".

Table 3: Типичная задержка белковых маркеров

Маркер/концентрация	Молекулярный вес	NMWL устройства	% задержания	Время центрифугирования (мин.)
a-Chymotrypsinogen (1 мг/мл)	25,000	3K	> 95	30
Cytochrome C (0.25 мг/мл)	12,400		> 95	30
Vitamin B-12 (0.2 мг/мл)	1,350		< 42	30
a-Chymotrypsinogen (1 мг/мл)	25,000	10K	> 95	15
Cytochrome c (0.25 мг/мл)	12,400		> 95	15
Vitamin B-12 (0.2 мг/мл)	1,350		< 42	15
BSA (1 мг/мл)	67,000	30K	> 95	10
Ovalbumin (1 мг/мл)	45,000		> 95	10
Cytochrome c (0.25 мг/мл)	12,400		< 35	10
BSA (1 мг/мл)	67,000	50K	> 95	10
Ovalbumin (1 мг/мл)	45,000		~ 40	10
Cytochrome c (0.25 мг/мл)	12,400		< 20	10
Thyroglobulin (0.5 мг/мл)	677,000	100K	> 95	10
IgG (1 мг/мл)	156,000		> 95	10
Ovalbumin (1 мг/мл)	45,000		< 30	10

Условия: ротор с фиксированным углом 40°, 14,000 x g, комнатная температура, стартовый объем 500 мкл, n=12

Факторы, определяющие извлечение образца, включают: природу растворенного белка в зависимости от NMWL выбранного устройства, стартовую концентрацию и фактор концентрации. В таблице 4 указаны типичные извлечения для устройств Amicon® Ultra-0.5.

Таблица 4. Типичные извлечения концентрата

Маркер/Концентрация	Молекулярный вес	NMWL устройства	Время центрифугирования (мин.)	Объем концентрата мкл	Фактор концентрации(х)	Извлечение концентрата (%)
Cytochrome C (0.25 мг/мл)	12,400	3K	30	48	10	98
Cytochrome C (0.25 мг/мл)	12,400	10K	15	22	22	93
BSA(1 мг/мл)	67,000	30K	10	23	22	97
BSA(1 мг/мл)	67,000	50K	10	20	25	92
IgG (1 мг/мл)	156,000	100K	10	19	26	92

Условия: ротор с фиксированным углом 40°, 14,000 x g, комнатная температура, стартовый объем 500 мкл, n=12

МАКСИМИЗАЦИЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ОБРАЗЦА

Низкое извлечение образца в концентрате может быть связано с адсорбционными потерями, чрезмерной концентрацией, или прохождением образца через мембрану.

- Адсорбционные потери зависят от концентрации вещества, его гидрофобной природы, температуры и времени контакта с поверхностью фильтра, состава образцов и pH. Чтобы минимизировать потери, извлекайте концентрированные образцы сразу после центрифугирования.
- Если в исходном образце концентрация высокая, контролируйте процесс центрифугирования, с тем, чтобы избежать чрезмерной концентрации образца. Чрезмерная концентрация может привести к осадку и потенциальной потере образца.
- Если образец, как представляется, проходит через мембрану, выбирайте устройство Amicon® Ultra-0.5 с меньшим NMWL.

КАК ПОДСЧИТАТЬ ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Подсчитайте общее извлечение, процент концентрата, процент фильтрата, используя методику, приведенную ниже. Процедура предусматривает максимальное приближение в расчетах извлечения для случаев с концентрацией до примерно 20 мг/мл.

ЗАМЕЧАНИЕ: Соответствующие методы анализа включают спектрофотометрию, показатель преломления и проводимость.

ПРОЦЕДУРА ПРЯМОГО ВЗВЕШИВАНИЯ

Плотность большинства белковых растворов приблизительно равна плотности воды (т.е., 1 г/мл). Используя это свойство, извлечение концентрата и фильтрата могут быть подсчитаны путем их взвешивания и преобразования единиц из граммов в миллилитры. Эта методика является действительной только для растворов с концентрацией около 20 мг/мл или меньше.

- Отдельно взвесьте перед использованием пустое фильтрующее устройство, пробирку для сбора фильтрата и пробирку для сбора концентрата.
- Заполните фильтрующее устройство раствором и повторно взвесьте.
- Поместите устройство в пробирку для фильтрата и центрифугируйте согласно инструкции.
- Соберите концентрат при обратном центрифугировании в предварительно взвешенную пробирку для сбора концентрата.
- Выньте устройство из пробирки для сбора концентрата и взвесьте пробирку для сбора фильтрата и пробирку для сбора концентрата.
- Вычтите вес пустых устройств/пробирок для расчета веса исходного материала, фильтрата и концентрата.
- Используйте данные фильтрата и концентрата для определения концентрации.
- Рассчитайте извлечения, используя данные веса/объема и измеренные концентрации следующим образом:

$$\% \text{ извлечения концентрата} = 100 \times (W_c \times C_c / W_0 \times C_0)$$

$$\% \text{ извлечения фильтрата} = 100 \times (W_f \times C_f / W_0 \times C_0)$$

$$\% \text{ общего извлечения} = \% \text{ извлечения концентрата} + \% \text{ извлечения фильтрата}$$

W_c = общий вес концентрата перед исследованием

W_0 = вес оригинальных стартовых материалов

W_f = вес фильтрата

C_c = концентрация концентрата

C_0 = концентрация оригинальных стартовых материалов

C_f = концентрация фильтрата

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Максимальный начальный объем образца	500 мкл
Типичный конечный объем концентрата	15-20 мкл
Рекомендуемая относительная центробежная сила	14,000 x g для концентрации 1,000 x g для обратного центрифугирования
Максимальная относительная центробежная сила	15,000 x g
Активная площадь мембраны	1 см ²
Остаточный объем	< 5 мкл

Размеры

Фильтр и пробирка

Длина (для концентрации, устройство в пробирке): 49.9 мм.

Длина (обратное центрифугирование; устройство вверх дном в пробирке): 47.4 мм

Пробирка (крышка закрыта)

Диаметр: 10.8 мм

Длина: 42.1 мм

Фильтр

Диаметр: 9.4 мм

Длина: 29.5 мм

Материалы

Фильтр	Сополимер стирен/бутадиен
Мембрана	Millipore Ultracel® регенерированная целлюлоза с низким связыванием
Пробирка	Полипропилен

ХИМИЧЕСКАЯ СОВМЕСТИМОСТЬ

Центрифужные устройства Amicon® Ultra предназначены для использования с биологическими жидкостями и водными растворами. Перед использованием нижеприведенных реагентов проверьте совместимость с устройством.

Таблица 5. Химическая совместимость Amicon® Ultra Фильтрующих Устройств

Кислоты	Концентрация		Концентрация
Acetic acid	≤ 50 %*	Phosphoric acid	≤ 30 %
Formic acid	≤ 5 %*	Sulfamic acid	≤ 3 %
Hydrochloric acid	≤ 1.0 M	Sulfuric acid	≤ 3 %
Lactic acid	≤ 50 %	Trichloroacetic acid (TCA)	≤ 10%*
Nitric acid	≤ 10 %	Trifluoroacetic acid (TFA)	≤ 30 %*

Основания

Ammonium hydroxide	≤ 10%	Sodium hydroxide	≤ 0.5 M
--------------------	-------	------------------	---------

Спирты

n-Butanol	≤ 70 %	Isopropanol	≤ 70 %
Ethanol	≤ 70 %	Methanol	≤ 60 %

Детергенты

Alconox® detergent	≤ 1 %	Lubrol® PX detergent	≤ 0.1 %
CHAPS detergent	≤ 0.1 %	Nonidet™ P-40 surfactant	≤ 2 %
Sodium deoxycholate	≤ 5 %	Triton® X-100 surfactant	≤ 0.1 %
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	≤ 0.1 %	Tween®20 surfactant	≤ 0.1%
Terg-A-Zyme®detergent	≤ 1 %		

Органические растворители

Acetone	не рекомендуется	Ethyl acetate	не рекомендуется
Acetonitrile	≤ 20%	Formaldehyde	≤ 5 %
Benzene	не рекомендуется	Pyridine	не рекомендуется
Carbon tetrachloride	не рекомендуется	Tetrahydrofuran	не рекомендуется
Chloroform	не рекомендуется	Toluene	не рекомендуется
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	≤ 5 %*		

Другие

Ammonium sulfate	Saturated	Phenol	≤ 1 %
Diethyl pyrocarbonate	≤ 0.2 %	Phosphate buffer (pH 8.2)	≤ 1 M
Dithiothreitol (DTT)	≤ 0.1 M	Polyethylene glycol	≤ 10 %
Glycerine	≤ 70%	Sodium carbonate	≤ 20 %
Guanidine HCl	≤ 6 M	Tris buffer (pH 8.2)	≤ 1 M
Imidazole	≤ 100 mM	Urea	≤ 8 M
Mercaptoethanol	≤ 0.1 M		

* Контакт с этими химикатами может привести к выделению составляющих частей. Образцы растворителей рекомендуется проверить на выщелачивание и потенциальное влияние на анализ.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com