

User Guide

Centrifree® Ultrafiltration Device

4104A



Languages available

English	2	Lietuviškai	57
Français	7	Magyar	62
Italiano	12	Čeština	67
Deutsch	17	Polski	72
Español	22	日本語	77
Português	27	中文	82
Ελληνικά	32	한국어	87
Nederlands	37	Norsk	92
Dansk	42	Slovenčina	97
Svenska	47	Türkçe	102
Latviski	52		

Introduction

Centrifree® devices rapidly and efficiently separate free from protein-bound microsolutes in small volumes (0.15–1.0 mL) of serum, plasma, and other biological samples using a method called ultrafiltration. Accurate partitioning occurs in minutes without dilution, change in physiologic pH, ion composition, or unbound microsolutes concentration. These devices contain low-adsorptive hydrophilic membranes and O-rings without plasticizers to ensure excellent recovery. Hold-up volume is 10 µL or less.

In contrast to dialysis, gel filtration, or charcoal adsorption, ultrafiltration provides improved accuracy when measuring free ligand concentration, binding capacity, or affinity constants. It eliminates time-consuming methodology, the need for specialized equipment, dilution errors, and shifts in binding equilibrium.

Ultrafiltration does not change free microsolutes ligand concentration. Protein becomes selectively partitioned into a fraction of the sample volume (the concentrate), while free ligand passes essentially unhindered through the membrane along with solvent.

The laws of mass action and conservation of mass for ideal protein binding predict that free ligand concentration in the ultrafiltrate will remain constant, provided molar binding capacity and affinity are independent of total protein concentration. Results for several systems showing constant free ligand concentration in successive ultrafiltrate fractions support those predictions.

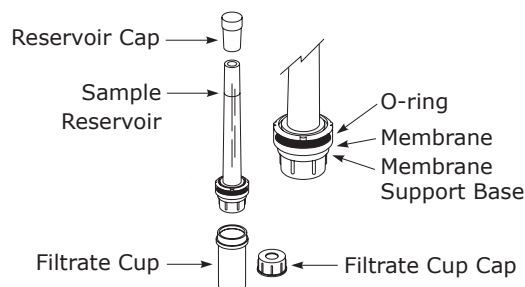
Changing free ligand concentration not caused by membrane retention or adsorption is evidence of altered capacity or affinity of binding proteins due to aggregation or other non-ideal protein-protein interactions. Depending upon the application, you can analyze the resulting filtrate for free ligand concentration either quantitatively or qualitatively.

Intended Use

Centrifree® devices are non-sterile, disposable ultrafiltration devices intended to separate free from protein-bound microsolutes in small volumes (0.15–1.0 mL) of biological samples e.g. serum, urine, cerebrospinal fluid and other body fluids. Device intended to be single-use and used by a laboratory professional.

Centrifree® Device Components

The Centrifree® ultrafiltration device provides maximum efficiency for multiple sample processing. Each unit consists of a membrane and O-ring permanently sealed between the sample reservoir and support base. A removable filtrate cup is attached to the base. The Centrifree® device is intended for single use only.



Materials Supplied

The following components are supplied with Centrifree® ultrafiltration devices.

- 50 ultrafiltration devices
- 50 reservoir caps
- 50 filtrate cups
- 50 filtrate cup caps

NOTE: The red reservoir caps are provided to prevent sample evaporation and pH change due to loss of CO₂.

Equipment Required

- Centrifuge with rotor adapter or carriers that can accept 17 × 100 mm tubes and is capable of 1,000–2,000 × g.

NOTE: For optimum solvent flow, use a fixed-angle centrifuge rotor.

- Pasteur or fixed-volume pipette for sample delivery.

Storage and Stability

Refer to product label for storage conditions.

Guidelines for Use

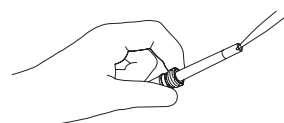
- Serum, plasma, or other biological fluids may be used with Centrifree® devices. For more efficient flow rates, remove fibrin by centrifuging sample before loading into reservoir.
- The recommended sample volume is 0.15–1.0 mL.
- For best results, use a fixed-angle rather than a swinging-bucket centrifuge rotor and spin at 1,000–2,000 × g.
CAUTION: Do not operate at relative centrifugal force above 2,000 × g.
- Conduct preliminary ligand adsorption and protein retention studies to ensure suitability of the system for the intended application.
- Centrifree® ultrafiltration devices are designed for use with biological fluids and aqueous solutions. Do not use devices with organic solvents.
- Determine the correct temperature for your application. Maintain the desired temperature by using a heated centrifuge or by prewarming the centrifuge rotor and chamber. In a fixed-angle rotor, the contents of the device reach thermal equilibrium with the rotor in 5–10 minutes. The rapid rate of ultrafiltration achieved by Centrifree® devices minimizes the effects of temperature on ligand binding.
- Do not use for concentration and recovery of macromolecules.
- Do not autoclave component parts.
- Do not reuse Centrifree® devices.
- Do not allow the membrane in the ultrafiltration devices to dry out once wet. If you are not using the device immediately after rinsing, leave fluid on the membrane until the device is used.
- The Ultracel® membrane in the device contains trace amounts of glycerine (~2 µL). If this substance interferes with analysis, rinse device with deionized water or 0.1 N NaOH until no more interference is noted. If 0.1 N NaOH is used for glycerine removal, rinse the device thoroughly with deionized water or buffer before use. Spin for at least 15 minutes to remove as much fluid as possible. To avoid dilution error caused by entrapped fluid (~10 µL) after rinsing, discard the first aliquot of ultrafiltrate.

How to Use Centrifree® Ultrafiltration Devices

Before using a Centrifree® device, remove the red reservoir cap.

1. Hold reservoir angled at approximately 45° with pipette tip touching reservoir wall. Add sample solution smoothly in one even flow to avoid air locking.

NOTE: Avoid touching membrane with pipette tip.



2. Cap sample reservoir, then place device in a centrifuge rotor with 17 × 100 mm adapters. Counterbalance centrifuge with a similar device.

NOTE: Red reservoir cap should extend no more than 3–4 mm down over reservoir top. Further compression can cause prefiltration, which could subsequently introduce analytical errors if sample is not at desired operating temperature.

NOTE: Check Centrifuge clearance before use.

3. Equilibrate device and sample to temperature required by your application.
4. Spin device at 1,000–2,000 × g for required time to obtain desired filtrate volume. For spin time guidelines, refer to the "Ultrafiltration Rate" section.
5. Carefully remove device from centrifuge rotor and disconnect filtrate cup containing the ultrafiltrate. Cover filtrate cup with supplied cap until ultrafiltrate can be analyzed.

WARNING: If discarding used components, be sure to follow precautions for disposal of items contaminated with potentially infectious or hazardous biological material.

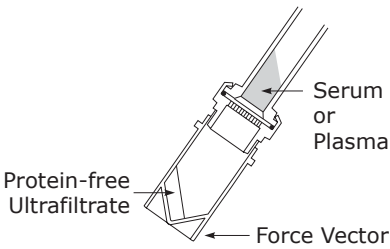
NOTE: Filter may not function correctly if allowed to dry out after wetting.

Performance

The following sections discuss various performance characteristics including polarization control, ultrafiltration rate, membrane performance, pH control, and nonspecific adsorption.

Polarization Control

Use of a fixed-angle rotor provides polarization control and minimizes the potential for artifacts due to protein-protein interactions. The angle counteracts buildup of retained protein at the membrane surface because this dense layer slides outward and accumulates at the edge of the membrane. In a swinging-bucket rotor, the polarization layer is compacted over the entire membrane surface, restricting solvent flow.



Ultrafiltration Rate

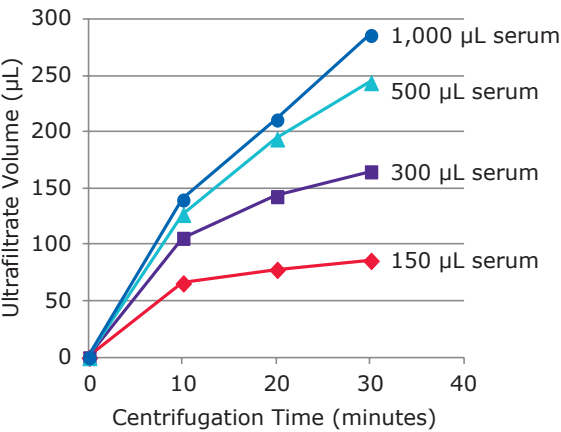
Flow rate depends on sample protein concentration, starting volume, relative centrifugal force (RCF), rotor type, and temperature. High flow rates result from maximal membrane surface area, polarization control, and optimal transmembrane pressure achieved with sample volumes of greater than 300 μL . Optimal filtration rates are achieved at 1,000–2,000 $\times g$. Higher centrifugal force does not significantly increase flow rate and is not recommended.

Comparison of Fixed-angle vs. Swinging-bucket Centrifuge Rotors

Rotor	RCF ($\times g$)	Typical Ultrafiltrate Volume (μL)
Fixed-angle (33°)	1,000	140–150
Swinging-bucket	1,000	115–120

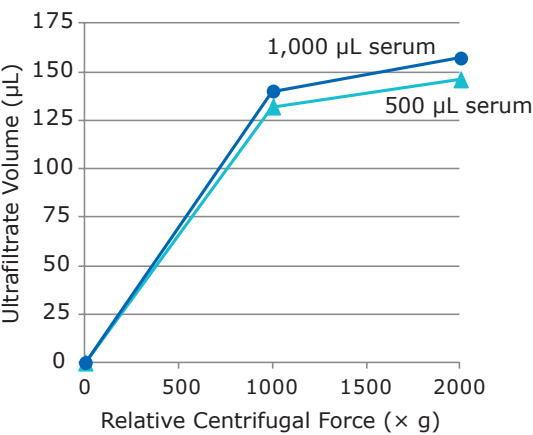
1 mL normal human serum, 10 minute spin

Typical Ultrafiltration Rates



Conditions: 33° fixed-angle rotor, 25°C , 1,000 $\times g$

Effect of Relative Centrifugal Force



Conditions: 33° fixed-angle rotor, 25°C , 10 minute spin

Membrane Performance

The high selective permeability of the anisotropic, hydrophilic Ultracel® ultrafiltration membrane is due to narrow pore size distribution. Typically, Centrifree® devices retain 99.9% of serum protein and <5% L-thyroxine (0.1 mg/mL in 0.1 N NaOH).

Protein retention requirements for each application depend on the degree of ligand binding. For a ligand that is 90% bound, 1% serum protein leakage would result in a 9% overestimate of free ligand concentration. For measurement of free thyroxine (>99.95% bound) in undiluted serum, protein retention of >99.995% is required for <10% error. Centrifree® devices are suggested for separation of ligands that are up to 99% bound.

Occasionally, serum leakage can occur due to a defect in the membrane or a mechanical defect. If the leakage is greater than 20%, the ultrafiltrate will be yellow colored. Determination of leakage less than 20% requires measurement of the protein concentration in the ultrafiltrate with a sensitive microprotein assay. If you need greater reliability but want to avoid routine protein assay, filter the sample in duplicate devices.

pH Control

Establish the acceptable limit of pH variation for each ligand-binding system. Experimentally, sample pH can be controlled by anaerobic specimen handling and transfer, gassing the sample with 5% CO₂, 95% O₂, or addition of a small volume of concentrated buffer, provided that the buffer ion does not alter ligand binding equilibria.

Nonspecific Adsorption

Adsorptive losses depend on the concentration of ligand, its ionic and hydrophobic nature, the temperature and time of contact with component surfaces, and sample matrix. Recovery of ligand that has been added to protein-free serum ultrafiltrate is generally greater than from buffer and more predictive of behavior with whole serum. Low-molecular-weight, free fatty and amino acids in protein-free ultrafiltrate interact with and passivate component surfaces, while serum proteins generally passivate surfaces encountered by whole serum. Low recovery from either protein-free ultrafiltrate or buffer may indicate adsorptive losses and/or membrane retention of ligand. Ligand recovery in Centrifree® devices is most accurate in the presence of binding protein and competing microsolute.

Specifications

Maximum sample volume	1.0 mL
Minimum sample volume	0.15 mL
Maximum relative centrifugal force	2,000 × g
Active membrane area	0.92 cm ²
Hold-up volume (membrane and support)	10 µL
Dimensions	
Length of capped device with filtrate cup	95 mm
Diameter	16 mm
Materials of Construction	
Membrane	Ultracel® regenerated cellulose
Sample reservoir	Polycarbonate
Membrane support base	Polycarbonate
Filtrate cup	Polyethylene
Filtrate cup cap	Polyethylene
O-ring	Ethylene propylene diene monomer (EPDM)

CAUTION: Centrifree® components are not autoclavable. Do not use with organic solvents.

Chemical Compatibility

Centrifree® devices are intended for use with biological fluids and aqueous solutions. Before use, check the sample for chemical compatibility with the device. Go to [SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility](https://www.sigmaaldrich.com/FilterChemicalCompatibility) for more information.

Product Ordering

Purchase products online at SigmaAldrich.com.

Symbol Definitions

Symbol	Definition	Symbol	Definition
	Catalogue number		Date of manufacture
	Do not reuse		Manufacturer
	Batch code		Non-sterile

Notice

We provide information and advice to our customers on application technologies and regulatory matters to the best of our knowledge and ability, but without obligation or liability. Existing laws and regulations are to be observed in all cases by our customers. This also applies in respect to any rights of third parties. Our information and advice do not relieve our customers of their own responsibility for checking the suitability of our products for the envisaged purpose.

Collection and Disposal

All samples must be clearly labelled. Suitable instruments must be used for obtaining and preparing samples.

NOTE: Follow precautions for disposal of items contaminated with potentially infectious or hazardous biological material according to all applicable international, federal, state, and local regulations.

Technical Assistance

Visit the tech service page on our web site at SigmaAldrich.com/techservice.

Any serious incident of this device should be reported to manufacturer and competent authority of country where user is established.

Standard Warranty

The applicable warranty for the products listed in this publication may be found at SigmaAldrich.com/terms.

Introduction

Les dispositifs Centrifree® permettent de séparer rapidement et efficacement les microsolutés libres des microsolutés liés aux protéines dans de petits volumes (0,15-1,0 mL) de sérum, de plasma et d'autres échantillons biologiques par ultrafiltration. Une répartition précise se produit en quelques minutes sans dilution, et sans modification du pH physiologique, de la composition ionique ou de la concentration du microsoluté non lié. Ces dispositifs contiennent des membranes hydrophiles à faible adsorption et des joints toriques sans plastifiants pour assurer une récupération excellente. Le volume mort est de 10 µL maximum.

Contrairement à la dialyse, à la filtration sur gel ou à l'adsorption sur charbon, l'ultrafiltration offre une meilleure précision lorsqu'il s'agit de mesurer la concentration du ligand libre, la capacité de liaison ou les constantes d'affinité. Avec l'ultrafiltration, fini les méthodologies chronophages, les équipements spécialisés, les erreurs de dilution et le déplacement des équilibres de liaison.

L'ultrafiltration ne modifie pas la concentration en ligand du microsoluté libre. La protéine se répartit de manière sélective dans une fraction du volume de l'échantillon (le concentrat), tandis que le ligand libre traverse globalement sans encombre la membrane avec le solvant.

La loi d'action de masse et la loi de conservation de la masse pour une liaison idéale des protéines prévoient que la concentration du ligand libre dans l'ultrafiltrat demeure constante, à condition que la capacité de liaison molaire et l'affinité soient indépendantes de la concentration totale en protéine. Ces prédictions sont confirmées par des résultats obtenus sur plusieurs systèmes qui montrent une concentration en ligand libre constante dans des fractions d'ultrafiltrat successives.

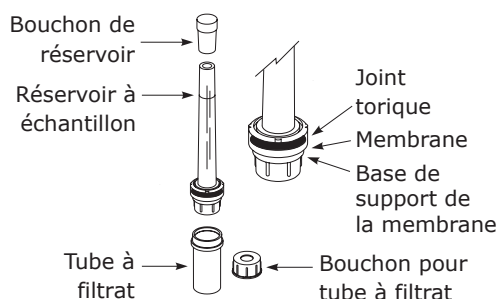
Une modification de la concentration en ligand libre non due à une adsorption ou à une rétention sur la membrane est la preuve de l'altération de l'affinité ou de la capacité à lier les protéines, causée par une aggrégation ou d'autres interactions protéine-protéine non idéales. En fonction de l'application, il est possible d'analyser le ligand libre présent dans le filtrat final de manière quantitative ou qualitative.

Utilisation prévue

Les dispositifs Centrifree® sont des dispositifs d'ultrafiltration jetables et non stériles permettant de séparer les microsolutés libres des microsolutés liés aux protéines dans de petits volumes (0,15–1,0 mL) d'échantillons biologiques comme le sérum, l'urine, le liquide cébrospinal et d'autres fluides corporels. Dispositif prévu pour un usage unique à destination des professionnels de laboratoire.

Composants du dispositif Centrifree®

Le dispositif d'ultrafiltration Centrifree® offre une efficacité maximale pour de nombreux traitements d'échantillons. Chaque unité comprend une membrane et un joint torique placés à demeure entre le réservoir à échantillon et la base de support. Un tube à filtrat amovible est fixé à la base. Le dispositif Centrifree® est exclusivement conçu pour un usage unique.



Matériel fourni

Les dispositifs d'ultrafiltration Centrifree® sont fournis avec les composants suivants :

- 50 dispositifs d'ultrafiltration
- 50 bouchons de réservoir
- 50 tubes à filtrat
- 50 bouchons pour tube à filtrat

REMARQUE : Les bouchons de réservoir rouges servent à éviter les variations de pH et l'évaporation des échantillons dues à la perte de CO₂.

Équipement requis

- Centrifugeuse avec adaptateur de rotor ou portoirs pouvant accueillir des tubes de 17 × 100 mm et pouvant atteindre 1 000–2 000 × g.

REMARQUE : Pour un débit de solvant optimal, utiliser une centrifugeuse à rotor à angle fixe.

- Pipette Pasteur ou pipette à volume fixe pour manipuler l'échantillon.

Stockage et stabilité

Se référer à l'étiquette du produit pour connaître les conditions de stockage.

Consignes d'utilisation

- Les dispositifs Centrifree® peuvent être utilisés avec du sérum, du plasma et d'autres fluides biologiques. Pour de meilleures vitesses d'écoulement, retirer la fibrine en centrifugeant l'échantillon avant de le charger dans le réservoir.
- Le volume d'échantillon recommandé est de 0,15-1,0 mL.
- Pour des résultats optimaux, utiliser une centrifugeuse avec rotor à angle fixe plutôt qu'à godets mobiles et centrifuger à 1 000–2 000 × g.

MISE EN GARDE: Ne pas utiliser avec une force centrifuge relative supérieure à 2 000 × g.

- Réaliser des études d'adsorption de ligand et de rétention protéique préliminaires pour garantir l'adéquation du système avec l'application envisagée.
- Les dispositifs d'ultrafiltration Centrifree® sont conçus pour être utilisés avec des fluides biologiques et des solutions aqueuses. Ne pas utiliser les dispositifs avec des solvants organiques.
- Déterminer la bonne température pour votre application. Maintenir la température souhaitée en utilisant une centrifugeuse chauffée ou en préchauffant le rotor et la chambre de la centrifugeuse. Dans le cas d'un rotor à angle fixe, le contenu du dispositif atteint l'équilibre thermique avec le rotor en 5–10 minutes. La grande vitesse d'ultrafiltration des dispositifs Centrifree® permet de réduire au minimum les effets de la température sur la liaison du ligand.
- Ne pas utiliser pour concentrer et récupérer des macromolécules.
- Ne pas autoclaver les composants du dispositif.
- Ne pas réutiliser les dispositifs Centrifree®.
- Ne pas laisser la membrane des dispositifs d'ultrafiltration s'assécher complètement une fois mouillée. Si le dispositif n'est pas utilisé immédiatement après le rinçage, laisser du fluide au contact de la membrane jusqu'à ce que le dispositif soit utilisé.
- La membrane Ultracel® présente dans le dispositif contient des traces de glycérine (~ 2 µL). Si cette substance interfère avec l'analyse, rincer le dispositif avec de l'eau désionisée ou du NaOH 0,1 N jusqu'à ce que les interférences disparaissent. Si la glycérine est éliminée avec du NaOH 0,1 N, rincer minutieusement le dispositif avec de l'eau désionisée ou du tampon avant utilisation. Centrifuger pendant au moins 15 minutes pour retirer autant de fluide que possible. Pour éviter les erreurs de dilution dues au fluide piégé (~ 10 µL) après le rinçage, jeter la première aliquote d'ultrafiltrat.

Comment utiliser les dispositifs d'ultrafiltration Centrifree®

Avant d'utiliser le dispositif Centrifree®, retirer le bouchon rouge du réservoir.

1. Tenir le réservoir selon un angle de 45° environ et placer l'embout de la pipette contre la paroi du réservoir. Verser doucement la solution d'échantillon en une fois pour éviter d'y piéger de l'air.



REMARQUE: Éviter de toucher la membrane avec l'embout de la pipette.

2. Reboucher le réservoir à échantillon, puis placer le dispositif sur un rotor de centrifugation muni d'adaptateurs pour tubes de 17 × 100 mm. Équilibrer avec un dispositif similaire.

REMARQUE: Le bouchon rouge du réservoir ne doit pas s'enfoncer de plus de 3–4 mm sur le haut du réservoir. Une compression plus forte peut provoquer une préfiltration, susceptible de générer des erreurs analytiques si l'échantillon n'est pas à la température d'utilisation souhaitée.

REMARQUE: Vérifier que tout est bien dégagé dans la centrifugeuse avant utilisation.

3. Amener le dispositif et l'échantillon à la température requise pour votre application.
4. Centrifuger le dispositif à 1 000–2 000 × g pendant le temps nécessaire à l'obtention du volume de filtrat recherché. Pour des recommandations sur le temps de centrifugation, se référer à la section "Vitesse d'ultrafiltration".
5. Retirer avec précaution le dispositif du rotor de la centrifugeuse et déconnecter le tube à filtrat contenant l'ultrafiltrat. Couvrir le tube à filtrat avec le bouchon fourni en attendant de pouvoir analyser l'ultrafiltrat.

AVERTISSEMENT: En cas de mise au rebut de composants usagés, veiller à prendre des précautions lors de l'élimination des articles contaminés par des substances biologiques potentiellement infectieuses ou dangereuses.

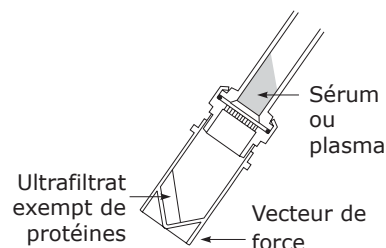
REMARQUE: Le filtre peut ne pas fonctionner correctement s'il a complètement séché après avoir été mouillé.

Performances

Les sections suivantes traitent de divers aspects liés aux performances, notamment le contrôle de la polarisation, la vitesse d'ultrafiltration, la performance de la membrane, la régulation du pH et l'adsorption non spécifique.

Contrôle de la polarisation

Utiliser un rotor à angle fixe permet de contrôler la polarisation et de réduire au minimum le risque d'artéfacts liés aux interactions protéine-protéine. L'angle compense l'accumulation des protéines retenues à la surface de la membrane, car cette couche dense glisse vers l'extérieur et se dépose au bord de la membrane. Dans un rotor à godets mobiles, la couche de polarisation est compactée sur l'ensemble de la surface de la membrane, ce qui restreint l'écoulement du solvant.



Vitesse d'ultrafiltration

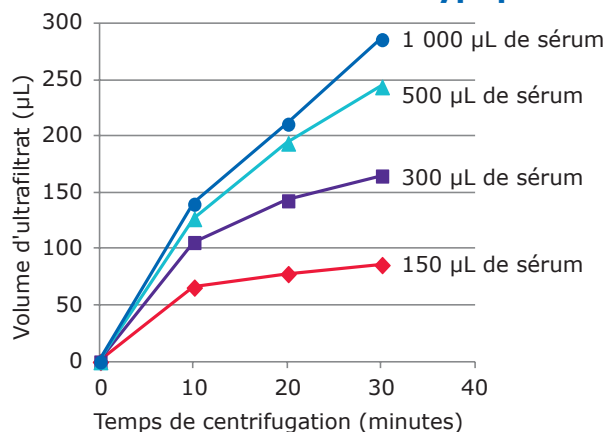
La vitesse d'écoulement dépend de la concentration en protéine de l'échantillon, du volume de départ, de la force centrifuge relative (FCR), du type de rotor et de la température. La vitesse d'écoulement est plus élevée avec une membrane de grande surface, lorsque l'on contrôle la polarisation, et avec une pression transmembranaire optimale qui est obtenue avec les volumes d'échantillon supérieurs à 300 µL. La vitesse de filtration est optimale à 1 000–2 000 × g. Il n'est pas recommandé d'appliquer une force centrifuge plus élevée, qui de toute façon n'augmente pas significativement la vitesse d'écoulement.

Comparaison entre le rotor à angle fixe et le rotor à godets mobiles

Rotor	FCR (× g)	Volume d'ultrafiltrat typique (µL)
à angle fixe (33°)	1 000	140–150
à godets mobiles	1 000	115–120

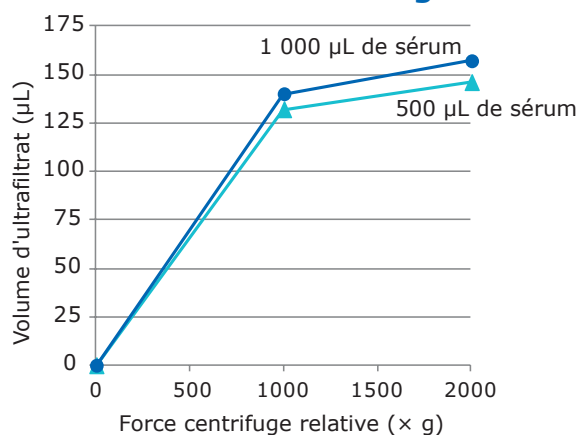
1 mL de sérum humain normal, 10 min de centrifugation

Vitesses d'ultrafiltration typiques



Conditions: rotor à angle fixe de 33°, 25 °C, 1 000 × g

Effet de la force centrifuge relative



Conditions: rotor à angle fixe de 33°, 25 °C, 10 minutes de centrifugation

Performance de la membrane

La grande perméabilité sélective de la membrane d'ultrafiltration anisotrope et hydrophile Ultracel® est due à la distribution étroite de la taille de ses pores. Les dispositifs Centrifree® retiennent typiquement 99,9% des protéines sériques et < 5% de la L-thyroxine (à 0,1 mg/mL dans du NaOH 0,1 N).

Les besoins en rétention protéique de chaque application dépendent du degré de liaison du ligand. Pour un ligand lié à 90%, une fuite de 1% de la protéine sérique engendrerait une surestimation de 9% de la concentration du ligand libre. Pour la mesure de la thyroxine libre (liée à > 99,95%) dans du sérum non dilué, il est nécessaire d'atteindre une rétention protéique > 99,995% pour garantir une erreur < 10%. Il est suggéré d'utiliser les dispositifs Centrifree® pour séparer les ligands liés à maximum 99%.

Une fuite de sérum peut parfois se produire. Celle-ci est due à un défaut de la membrane ou à une défaillance mécanique. Une fuite supérieure à 20% colore l'ultrafiltrat en jaune. La détermination des fuites inférieures à 20% se fait par mesure de la concentration en protéine de l'ultrafiltrat avec un dosage sensible des microprotéines. Pour une fiabilité accrue sans pour autant effectuer des tests protéiques en routine, filtrer l'échantillon avec deux dispositifs.

Régulation du pH

Établir la limite acceptable de la variation de pH pour chaque système de liaison de ligand. En conditions expérimentales, le pH de l'échantillon peut être contrôlé en manipulant et en transférant l'échantillon de manière anaérobie, en plaçant l'échantillon dans une atmosphère gazeuse contenant 5% de CO₂ et 95% d'O₂, ou en ajoutant un petit volume de tampon concentré, à condition que l'ion du tampon n'affecte pas les équilibres de liaison du ligand.

Adsorption non spécifique

Les pertes par adsorption dépendent de la concentration du ligand, de sa nature ionique et hydrophobe, de la température et du temps de contact avec les surfaces des composants, et de la matrice de l'échantillon. La récupération d'un ligand qui a été ajouté à un ultrafiltrat de sérum exempt de protéines est généralement plus importante qu'avec un tampon, et permet de prédire plus fidèlement le comportement avec du sérum total. Les acides aminés et les acides gras libres de faible poids moléculaire présents dans un ultrafiltrat exempt de protéines interagissent avec les surfaces des composants et les passivent, tandis que les protéines sériques passivent généralement les surfaces en contact avec du sérum total. Une faible récupération à partir d'un ultrafiltrat exempt de protéines ou d'un tampon peut indiquer des pertes par adsorption et/ou une rétention du ligand par la membrane. L'exactitude de la récupération du ligand dans les dispositifs Centrifree® est maximale en présence de protéines de liaison et de microsolutés de compétition.

Spécifications

Volume d'échantillon maximum	1,0 mL
Volume d'échantillon minimum	0,15 mL
Force centrifuge relative maximum	2 000 × g
Surface de filtration efficace	0,92 cm ²
Volume mort (membrane et support)	10 µL
Dimensions	
Longueur du dispositif bouché avec le tube à filtrat	95 mm
Diamètre	16 mm
Matériaux constitutifs	
Membrane	Cellulose régénérée Ultracel®
Réservoir à échantillon	Polycarbonate
Base de support de la membrane	Polycarbonate
Tube à filtrat	Polyéthylène
Bouchon pour tube à filtrat	Polyéthylène
Joint torique	Terpolymère éthylène-propylène-diène (EPDM)

MISE EN GARDE: Les composants Centrifree® ne sont pas autoclavables. Ne pas utiliser avec des solvants organiques.

Compatibilité chimique

Les dispositifs Centricon® sont prévus pour être utilisés avec des fluides biologiques et des solutions aqueuses. Avant utilisation, vérifier la compatibilité chimique de l'échantillon avec le dispositif. Rendez-vous sur SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility pour en savoir plus.

Commande de produits

Acheter les produits en ligne sur SigmaAldrich.com.

Définitions des symboles

Symbole	Définition	Symbole	Définition
	Référence		Date de fabrication
	Ne pas réutiliser		Fabricant
	Numéro de lot		Produit non stérile

Avis

Nous fournissons à nos clients des informations et des conseils relatifs aux technologies et aux questions réglementaires en lien avec leurs applications au mieux de nos connaissances et compétences, mais sans obligation ni responsabilité. Les lois et réglementations existantes doivent dans tous les cas être respectées par nos clients. Cela s'applique également au respect des droits des tiers. Nos informations et nos conseils ne dispensent pas nos clients de leur propre responsabilité de vérifier l'adéquation de nos produits avec l'utilisation envisagée.

Collecte et mise au rebut

Tous les échantillons doivent être clairement étiquetés. Des instruments adaptés doivent être utilisés pour le prélèvement et la préparation des échantillons.

REMARQUE: Prendre des précautions lors de la mise au rebut d'articles contaminés par des substances biologiques potentiellement infectieuses ou dangereuses, conformément à l'ensemble des réglementations internationales, nationales, régionales et locales.

Assistance technique

Consulter la page Internet de notre Service technique à l'adresse SigmaAldrich.com/techservice.

Tout incident grave survenu avec le dispositif doit faire l'objet d'une notification au fabricant et à l'autorité compétente du pays dans lequel l'utilisateur est établi.

Garantie

La garantie applicable aux produits figurant dans cette publication est disponible sur SigmaAldrich.com/terms.

Introduzione

I dispositivi Centrifree® separano rapidamente e in maniera efficiente il microsoluto libero da quello legati alle proteine in piccoli volumi (0,15–1,0 mL) di siero, plasma e altre tipologie di campioni biologici con il metodo detto dell'ultrafiltrazione. In alcuni minuti è possibile ottenere separazioni accurate senza alcuna diluizione, alterazione del pH fisiologico, della composizione ionica o della concentrazione del microsoluto non legato. Per assicurare eccellenti recuperi, questi dispositivi contengono membrane idrofile a ridotto adsorbimento e O-ring privi di plastificanti. Il volume morto è minore o uguale a 10 µL.

Rispetto alla dialisi, alla gel filtrazione o all'adsorbimento su carbone, l'ultrafiltrazione assicura maggiore accuratezza nelle determinazioni della concentrazione di ligando libero, della capacità di legame e delle costanti di affinità. Essa evita il ricorso a lunghe metodiche e ad attrezzature specializzate, errori di diluizione e spostamenti dell'equilibrio di legame.

L'ultrafiltrazione non modifica la concentrazione del ligando libero. Le proteine vengono separate selettivamente in una frazione del volume del campione (il concentrato), mentre il ligando libero attraversa la membrana con il solvente, sostanzialmente senza impedimenti.

Le leggi dell'azione di massa e della conservazione della massa per una reazione ideale di binding ligando-proteina prevedono che la concentrazione del ligando libero nell'ultrafiltrato resti costante, purché la capacità molare di binding e l'affinità siano indipendenti dalla concentrazione proteica totale. I risultati sperimentali con diversi sistemi mostrano concentrazioni costanti di ligando libero in frazioni di ultrafiltrato successive, confermando queste previsioni.

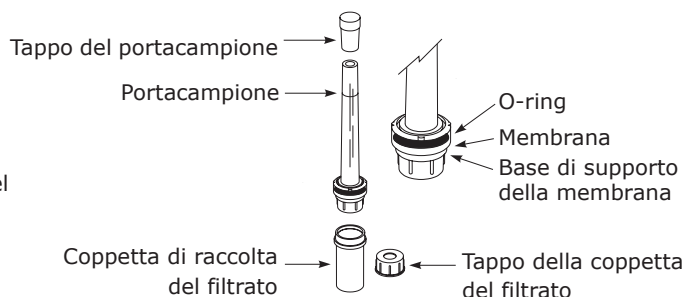
Variazioni della concentrazione del ligando libero, indipendenti da ritenzione o adsorbimento della membrana, sono indice di un'alterata capacità o affinità delle proteine leganti in seguito ad aggregazione o ad altre interazioni proteina-proteina non ideali. A seconda delle applicazioni, sul filtrato risultante è possibile condurre analisi qualitative o quantitative della concentrazione del ligando libero.

Uso previsto

I dispositivi Centrifree® sono ultrafiltri non sterili e monouso ideati per separare i microsoluti liberi da quelli legati alle proteine in piccoli volumi (0,15–1,0 mL) di campioni biologici, come siero, urine, liquido cefalorachidiano e altri fluidi corporei. Si tratta di unità utilizzabili una sola volta, destinate all'impiego da parte di personale di laboratorio.

Componenti delle unità Centrifree®

Gli ultrafiltri Centrifree® assicurano la massima efficienza nel processamento di numerosi campioni. Ogni unità è costituita da una membrana e da un O-ring definitivamente sigillata tra il portacampione e la base di supporto. Alla base è collegata una coppetta di raccolta del filtrato. Le unità Centrifree® possono essere utilizzate una sola volta.



Materiale incluso

Ogni confezione di unità Centrifree® contiene i seguenti componenti:

- 50 dispositivi da ultrafiltrazione
- 50 tappi per i portacampioni
- 50 coppette di raccolta del filtrato
- 50 tappi per le coppette di raccolta

N.B. I tappi rossi per i portacampioni servono a evitare l'evaporazione del campione e variazioni del pH indotte dalla perdita di CO₂.

Attrezzatura richiesta

- Centrifuga con alloggiamenti o cestelli del rotore per provette da 17 × 100 mm capace di raggiungere 1.000–2.000 × g

N.B. Per un flusso ottimale del solvente, preferire un rotore ad angolo fisso.

- Per l'introduzione del campione nell'unità, utilizzare una Pasteur o una pipetta a volume fisso.

Conservazione e stabilità

Per informazioni sulle condizioni di conservazione, consultare l'etichetta del prodotto.

Istruzioni per l'uso

- I dispositivi Centrifree® possono essere utilizzati con siero, plasma o con altri fluidi biologici. Per raggiungere maggiori portate, rimuovere la fibrina centrifugando il campione prima di caricarlo nel serbatoio.
- Si raccomanda di processare volumi di campione tra 0,15 e 1,0 mL.
- Per migliori risultati, preferire un rotore ad angolo fisso a uno basculante e centrifugare a $1.000\text{--}2.000 \times g$.
ATTENZIONE: non operare a una forza centrifuga superiore a $2.000 \times g$.
- Per essere certi dell'idoneità del sistema per la propria applicazione, condurre studi preliminari sull'adsorbimento del ligando e sulla ritenzione proteica.
- Gli ultrafiltri Centrifree® sono stati progettati per l'impiego con fluidi biologici e soluzioni acquose. Non utilizzarli con solventi organici.
- Determinare la temperatura corretta per la propria applicazione. Mantenere la temperatura desiderata utilizzando una centrifuga riscaldata o preriscaldando il rotore e la camera della centrifuga. In un rotore ad angolo fisso, il contenuto delle unità raggiunge l'equilibrio termico con il rotore in 5–10 minuti. La rapidità del processo di ultrafiltrazione assicurata dai dispositivi Centrifree® minimizza gli effetti della temperatura sul binding del ligando.
- Non utilizzare per la concentrazione e il recupero di macromolecole.
- Non autoclavare i componenti.
- Non riutilizzare i dispositivi Centrifree®.
- Una volta bagnata, non lasciare che la membrana dell'unità vada a secco. Se il dispositivo non verrà utilizzato immediatamente dopo il risciacquo, lasciare il fluido sulla membrana fino al momento dell'impiego.
- Le membrane da ultrafiltrazione dei dispositivi Ultracel® contengono tracce di glicerina ($\sim 2 \mu\text{L}$). Se essa interferisce con le analisi, prima dell'uso risciacquare con acqua deionizzata o con NaOH 0,1 N finché non si notano più interferenze. Nel caso per la rimozione della glicerina si utilizzi NaOH 0,1 N, prima dell'uso risciacquare accuratamente le unità con tampone o con acqua deionizzata. Centrifugare per almeno 15 minuti per rimuovere la maggior parte di fluido possibile. Per evitare errori di diluizione dovuti al fluido intrappolato ($\sim 10 \mu\text{L}$) dopo il risciacquo, eliminare la prima aliquota dell'ultrafiltrato.

Come utilizzare gli ultrafiltri Centrifree®

Prima di utilizzare un dispositivo Centrifree®, rimuovere il tappo rosso del portacampione.

1. Tenere il portacampione inclinato di un angolo di circa 45° e con la punta della pipetta toccare la parete. Aggiungere la soluzione del campione con un flusso uniforme, per evitare la formazione di bolle d'aria



N.B. Evitare di toccare la membrana con la punta della pipetta.

2. Chiudere il portacampione con il tappo, quindi collocare l'unità in un rotore con adattatori per provette da $17 \times 100 \text{ mm}$. Controbilanciare con una unità di pari peso.

N.B. Il tappo non deve scendere più di 3–4 mm rispetto al margine superiore del portacampione. Una maggiore compressione, potrebbe causare la prefiltrazione del campione con conseguenti errori analitici se il campione non si trova alla temperatura operativa desiderata.

N.B. Prima di centrifugare, controllare che lo spazio libero sia sufficiente perché i dispositivi non si danneggino durante la centrifugazione.

3. Lasciare che unità e campione raggiungano la temperatura richiesta dalla propria applicazione.
4. Centrifugare a $1.000\text{--}2.000 \times g$ per il tempo necessario per ottenere il volume di filtrato desiderato. Per indicazioni sui tempi di centrifugazione, consultare il paragrafo "Velocità di ultrafiltrazione".
5. Rimuovere con cautela l'unità dal rotore della centrifuga e staccare la coppetta contenente l'ultrafiltrato. Chiuderla con il tappo fornito fino al momento dell'analisi.

ATTENZIONE: per lo smaltimento delle unità usate, seguire le precauzioni per i materiali potenzialmente infetti o pericolosi.

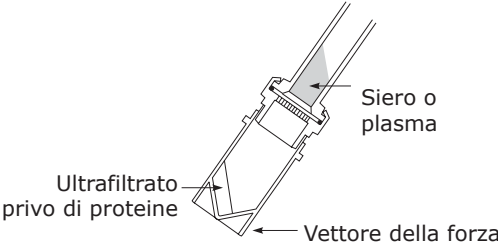
N.B. se, dopo il risciacquo preliminare, il filtro viene lasciato asciugare potrebbe non funzionare in modo appropriato.

Prestazioni

I seguenti paragrafi trattano delle varie caratteristiche prestazionali incluso il controllo della polarizzazione, la velocità di ultrafiltrazione, le prestazioni della membrana, il controllo del pH e l'adsorbimento aspecifico.

Controllo della polarizzazione

L'impiego di un rotore ad angolo fisso assicura il controllo della polarizzazione e minimizza la possibilità che si formino artefatti a causa delle interazioni tra proteina e proteina. L'angolo contrasta l'accumulo delle proteine trattenute sulla superficie della membrana, perché questo strato denso scivola verso l'esterno accumulandosi sul bordo della membrana. In un rotore basculante, lo strato di polarizzazione è compatto lungo l'intera superficie della membrana, limitando il flusso del solvente.



Velocità di ultrafiltrazione

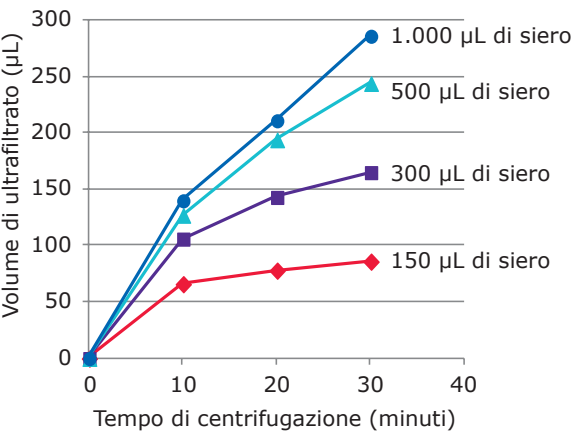
La portata dipende dalla concentrazione proteica e dal volume iniziale del campione, dalla forza centrifuga relativa (RCF), dal tipo di rotore e dalla temperatura. Queste unità assicurano alte portate grazie all'elevatissima area superficiale della membrana, al controllo della polarizzazione e all'ottima pressione di transmembrana raggiunta con volumi di campione maggiori di 300 μL . Velocità di filtrazione ottimali si raggiungono a $1.000\text{--}2.000 \times g$. Forze centrifughe maggiori non determinano un incremento di portata significativo e non sono raccomandate.

Confronto tra rotore ad angolo fisso e basculante

Rotore	RCF ($\times g$)	Volume di ultrafiltrato tipico (μL)
Angolo fisso (33°)	1.000	140–150
Basculante	1.000	115–120

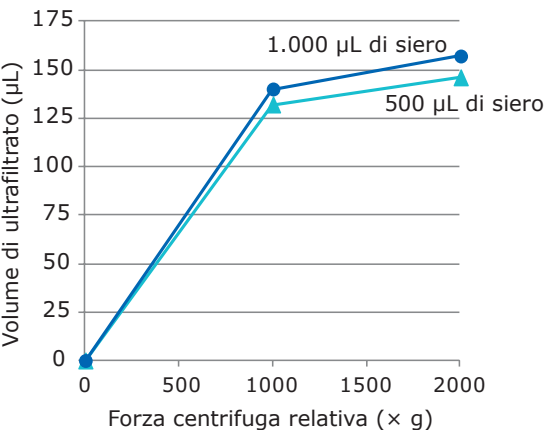
1 mL di siero umano normale, 10 minuti di centrifugazione

Velocità di ultrafiltrazione tipiche



Condizioni: rotore ad angolo fisso (33°), 25°C , $1.000 \times g$

Effetto della forza centrifuga relativa



Condizioni: rotore ad angolo fisso (33°), 25°C , 10 minuti di centrifugazione

Prestazioni della membrana

La permeabilità altamente selettiva della membrana da ultrafiltrazione anisotropa idrofila Ultracel® è dovuta a un ristretto intervallo di distribuzione dei pori. Normalmente le unità Centrifree® sono in grado di trattenere il 99,9% delle proteine del siero e < 5% di L-tiroxina (0,1 mg/mL in NaOH 0,1 N).

La ritenzione proteica richiesta da un'applicazione dipende dal grado di binding del ligando. Per un ligando legato al 90%, la perdita dell'1% delle proteine porterebbe alla determinazione di una concentrazione del ligando libero sovrastimata del 9%. Nelle determinazioni della tirosina libera (legata > 99,95%) in siero non diluito, è necessaria una ritenzione proteica > 99,995% per garantire un errore < 10%. I dispositivi Centrifree® sono consigliati per la separazione dei ligandi con una percentuale di legame fino del 99%.

Occasionalmente possono verificarsi perdite di siero a causa di difetti della membrana o meccanici. In caso di perdite superiori al 20%, l'ultrafiltrato si tinge di giallo. Per rilevare perdite inferiori al 20%, è necessario misurare la concentrazione proteica nell'ultrafiltrato con un saggio microproteico sensibile. Se si desidera una maggiore affidabilità evitando di effettuare saggi proteici di routine, filtrare i campioni in doppio.

Controllo del pH

Stabilire la variazione di pH massima accettabile per ogni sistema di binding di un ligando. Sperimentalmente, il pH del campione può essere controllato mediante trattamento e trasferimento del campione in anaerobiosi, gassando il campione con CO₂ al 5%, O₂ al 95%, oppure mediante l'aggiunta di un piccolo volume di tampone concentrato, purché i suoi ioni non alterino l'equilibrio di legame.

Adsorbimento specifico

Le perdite dovute all'adsorbimento specifico dipendono dalla concentrazione, dalle proprietà ioniche e dalla idrofobicità del ligando, dalla temperatura, dal tempo di contatto con le superfici dell'unità filtrante e dalla matrice del campione. Il recupero di un ligando aggiunto all'ultrafiltrato di siero deproteinizzato è generalmente maggiore che in tampone e più predittivo del comportamento con siero totale. Nell'ultrafiltrato privo di proteine, acidi a basso peso molecolare, acidi grassi liberi e amminoacidi interagiscono con le superfici dei componenti passivandole, mentre le proteine del siero generalmente passivano le superfici con cui viene a contatto il siero totale. Bassi recuperi da un ultrafiltrato privo di proteine o da tampone possono essere indice di perdite per adsorbimento e/o per ritenzione del ligando sulla membrana. Il recupero del ligando nei dispositivi Centrifree® è più accurato alla presenza di proteine leganti e di microsoluti in competizione.

Specifiche

Volume iniziale massimo del campione	1,0 mL
Volume iniziale minimo del campione	0,15 mL
Forza centrifuga relativa massima	2.000 × g
Superficie attiva della membrana	0,92 cm ²
Volume morto (membrana e supporto)	10 µL
Dimensioni	
Lunghezza del dispositivo con tappo e coppetta di raccolta	95 mm
Diametro	16 mm
Materiali di fabbricazione	
Membrana	Ultracel® in cellulosa rigenerata
Portacampione	Policarbonato
Base di supporto della membrana	Policarbonato
Coppetta del filtrato	Polietilene
Tappo della coppetta del filtrato	Polietilene
O-ring	Gomma etilene-propilene-diene monomero (EPDM)

ATTENZIONE: i componenti delle unità Centrifree® non sono autoclavabili. Non utilizzare con solventi organici.

Compatibilità chimica

I dispositivi Centricon® sono stati progettati per l'impiego con fluidi biologici e soluzioni acquose. Prima di utilizzarli, verificare che i campioni da trattare siano con essi compatibili. Per maggiori informazioni sulla compatibilità, visitare la pagina [SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility](https://www.sigmaaldrich.com/FilterChemicalCompatibility).

Informazioni per gli ordini

Acquistare i prodotti online su SigmaAldrich.com.

Significato dei simboli

Simbolo	Definizione	Simbolo	Definizione
	Numero di catalogo		Data di fabbricazione
	Non riutilizzare		Produttore
	N° di lotto		Prodotto non sterile

Avvertenza

Ai nostri Clienti forniamo informazioni e consigli su tecnologie applicative e questioni legislative al meglio delle nostre conoscenze e capacità, senza che ciò comporti alcun obbligo o responsabilità da parte nostra. In ogni caso i Clienti sono tenuti all'osservanza delle leggi e delle norme in vigore, anche in relazione a eventuali diritti di terzi. Le informazioni e gli avvisi forniti non sollevano i Clienti dalla responsabilità di verificare l'idoneità dei nostri prodotti per lo scopo perseguito.

Raccolta dei campioni e smaltimento dei rifiuti

Tutti i campioni devono essere etichettati con chiarezza. Per ottenere e preparare i campioni, è necessario utilizzare gli strumenti appropriati.

N.B. Per lo smaltimento degli articoli che potrebbero essere contaminati da materiali infetti o da agenti biologici pericolosi, attenersi alle precauzioni previste dalle pertinenti normative internazionali, statali regionali e locali.

Assistenza tecnica

Visitare la pagina del Servizio Tecnico nel nostro sito internet all'indirizzo SigmaAldrich.com/techservice.

Qualunque incidente grave dovesse verificarsi utilizzando questi dispositivi dovrà essere denunciato da parte dell'utilizzatore al produttore e alle autorità competenti del paese in cui opera.

Condizioni generali di garanzia

Le condizioni di garanzia applicabili ai prodotti citati nella presente pubblicazione possono essere consultate alla pagina SigmaAldrich.com/terms.

Einleitung

Centrifree® Einheiten trennen schnell und effizient freie von proteingebundenen Mikrosoluten in kleinen Volumen (0,15-1,0 mL) von Serum, Plasma und anderen biologischen Proben mit Hilfe einer speziellen Methode - der Ultrafiltration. Die genaue Partitionierung erfolgt innerhalb von Minuten ohne Verdünnung, Veränderung des physiologischen pH-Werts, der Ionenzusammensetzung oder Konzentration ungebundener Mikrosolute. Diese Einheiten enthalten hydrophile Membranen mit geringem Adsorptionsvermögen und O-Ringe ohne Weichmacher, durch die eine hervorragende Rückgewinnung sichergestellt wird. Das Rückhaltevolumen beträgt 10 µL oder weniger.

Im Gegensatz zur Dialyse, Gelfiltration oder Aktivkohleadsorption bietet die Ultrafiltration eine höhere Genauigkeit bei der Messung der Konzentration des freien Liganden, der Bindungskapazität oder der Affinitätskonstanten. Damit entfallen zeitaufwändige Methoden, der Bedarf an Spezialgeräten, Verdünnungsfehler und Verschiebungen im Bindungsgleichgewicht.

Die Ultrafiltration verändert die Konzentration des freien Mikrosolut-Liganden nicht. Die Proteine werden selektiv in einem Teil des Probenvolumens (dem Konzentrat) verteilt, während der freie Ligand zusammen mit dem Lösungsmittel im Wesentlichen ungehindert durch die Membran gelangt.

Die Gesetze der Massenwirkung und der Massenerhaltung für die ideale Proteinbindung besagen, dass die Konzentration des freien Liganden im Ultrafiltrat konstant bleibt, sofern die molare Bindungskapazität und die Affinität unabhängig von der Gesamtproteinkonzentration sind. Dies wird durch Ergebnisse für mehrere Systeme, die eine konstante Konzentration des freien Liganden in aufeinanderfolgenden Ultrafiltratfraktionen zeigen, unterstützt.

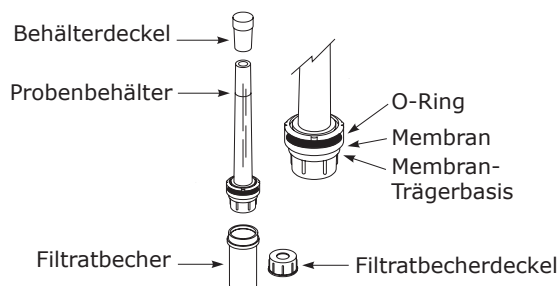
Eine veränderte Konzentration des freien Liganden, die nicht durch Membranrückhaltung oder -adsorption verursacht wird, ist ein Hinweis auf eine veränderte Kapazität oder Affinität der bindenden Proteine aufgrund von Aggregation oder anderen nicht idealen Protein-Protein-Wechselwirkungen. Je nach Anwendung kann das resultierende Filtrat entweder quantitativ oder qualitativ auf die Konzentration freier Liganden analysiert werden.

Verwendungszweck

Centrifree® Geräte sind nicht sterile Einweg-Ultrafiltrationseinheiten, die der Trennung von freien und proteingebundenen Mikrosoluten in kleinen Volumen (0,15–1,0 mL) biologischer Proben dienen, z. B. Serum, Urin, Zerebrospinalflüssigkeit und anderen Körperflüssigkeiten. Das Gerät ist für den einmaligen Gebrauch bestimmt und wird von Laborfachleuten verwendet.

Bestandteile der Centrifree® Einheit

Die Centrifree® Ultrafiltrationseinheit bietet maximale Effizienz für die Verarbeitung mehrerer Proben. Jede Einheit besteht aus einer Membran und einem O-Ring, die dauerhaft zwischen dem Probenbehälter und der Trägerbasis versiegelt sind. An der Basis ist ein abnehmbarer Filtratbecher angebracht. Die Centrifree® Einheit ist ausschließlich für den einmaligen Gebrauch bestimmt.



Lieferumfang

Die folgenden Bestandteile werden mit Centrifree® Ultrafiltrationseinheiten geliefert.

- 50 Ultrafiltrationseinheiten
- 50 Behälterdeckel
- 50 Filtratbecher
- 50 Filtratbecherdeckel

HINWEIS: Die roten Behälterdeckel verhindern die Verdunstung der Probe und die Veränderung des pH-Werts durch den Verlust von CO₂.

Erforderliche Geräte

- Zentrifuge mit Rotoradapter oder -träger, die 17 × 100 mm große Röhrchen aufnehmen kann und für 1000-2000 × g geeignet ist.

HINWEIS: Verwenden Sie für einen optimalen Lösungsmittelfluss einen Festwinkelrotor.

- Pasteurpipette oder Pipette mit festem Volumen für die Probenabgabe.

Lagerung und Haltbarkeit

Die Lagerungsbedingungen sind auf dem Produktetikett aufgeführt.

Gebrauchsanweisungen

- In Centrifree® Einheiten können Serum, Plasma oder andere biologische Flüssigkeiten eingesetzt werden. Um effizientere Fließraten zu erzielen, entfernen Sie das Fibrin durch Zentrifugieren der Probe vor dem Befüllen des Behälters.
 - Das empfohlene Probenvolumen beträgt 0,15-1,0 mL.
 - Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn ein Festwinkelrotor statt eines Ausschwingrotors verwendet und bei 1000-2000 × g geschleudert wird.
- ACHTUNG:** Nicht bei einer relativen Zentrifugalkraft über 2000 × g arbeiten.
- Führen Sie Vorstudien zur Ligandenadsorption und Proteinerückhaltung durch, um die Eignung des Systems für die vorgesehene Anwendung sicherzustellen.
 - Centricon® Filtereinheiten für die Ultrafiltration sind für die Verwendung mit biologischen Flüssigkeiten und wässrigen Lösungen vorgesehen. Es dürfen keine organischen Lösungsmittel in den Einheiten verwendet werden.
 - Bestimmen Sie die richtige Temperatur für Ihre Anwendung. Halten Sie die gewünschte Temperatur durch Verwendung einer beheizten Zentrifuge oder durch Vorwärmen des Zentrifugenrotors und der Kammer aufrecht. In einem Festwinkelrotor erreicht der Inhalt der Einheit mit dem Rotor in 5-10 Minuten ein thermisches Gleichgewicht. Durch die hohe Ultrafiltrationsrate, die mit Centrifree® Einheiten erreicht wird, werden die Auswirkungen der Temperatur auf die Ligandenbindung minimiert.
 - Nicht für die Konzentration und Rückgewinnung von Makromolekülen verwenden.
 - Die Teile der Einheit dürfen nicht autoklaviert werden.
 - Centrifree® Einheiten dürfen nicht wiederverwendet werden.
 - Die Membran in den Ultrafiltrationseinheiten darf nicht austrocknen, nachdem sie einmal angefeuchtet wurde. Wenn Sie die Einheit nicht sofort nach dem Spülen verwenden, lassen Sie Flüssigkeit auf der Membran stehen, bis die Einheit eingesetzt wird.
 - Die Ultracel® Membran in der Einheit enthält Spuren von Glycerin (~ 2 µL). Wenn die Analyse durch diese Substanz gestört wird, spülen Sie das Gerät mit entionisiertem Wasser oder 0,1 N NaOH, bis keine weitere Störung auftritt. Wenn 0,1 N NaOH zur Glycerinentfernung verwendet wird, spülen Sie das Gerät vor der Verwendung gründlich mit entionisiertem Wasser oder Puffer. Mindestens 15 Minuten lang schleudern, um so viel Flüssigkeit wie möglich zu entfernen. Verwerfen Sie das erste Aliquot des Ultrafiltrats, um Verdünnungsfehler durch eingeschlossene Flüssigkeit (~ 10 µL) nach dem Spülen zu vermeiden.

Verwendung der Centrifree® Ultrafiltrationseinheiten

Entfernen Sie vor dem Einsatz von Centrifree® Einheiten den roten Behälterdeckel.

1. Halten Sie den Behälter in einem Winkel von etwa 45°, sodass die Pipettenspitze die Behälterwand berührt. Pipettieren Sie die Probelösung vorsichtig und gleichmäßig, um Lufteinschlüsse zu vermeiden.



HINWEIS: Vermeiden Sie ein Berühren der Membran mit der Pipettenspitze.

2. Der Probenbehälter wird verschlossen und das Gerät in einen Zentrifugenrotor mit 17 × 100-mm-Adaptern eingesetzt. Zentrifuge mit einer ähnlichen Einheit ausgleichen.

HINWEIS: Der rote Behälterdeckel darf nicht mehr als 3-4 mm über die Oberkante des Behälters aufgeschoben werden. Eine weitere Komprimierung kann zu einer Vorfiltration führen, die wiederum Analysefehler verursachen kann, wenn die Probe nicht die gewünschte Betriebstemperatur hat.

HINWEIS: Vor der Verwendung prüfen, ob ausreichend Freiraum für das Ausschwingen vorhanden ist.

3. Stellen Sie das Gerät und die Probe auf die für Ihre Anwendung erforderliche Temperatur ein.
4. Das Gerät bei 1000-2000 × g für die erforderliche Zeit schleudern, um das gewünschte Filtratvolumen zu erhalten. Vorgaben für die Schleuderzeit finden Sie im Abschnitt "Ultrafiltrationsrate".
5. Entfernen Sie die Einheit vorsichtig vom Zentrifugenrotor und nehmen Sie den Filtratbecher ab, der das Ultrafiltrat enthält. Der Filtratbecher wird mit dem mitgelieferten Deckel abgedeckt, bis das Ultrafiltrat analysiert werden kann.

ACHTUNG: Wenn gebrauchte Komponenten entsorgt werden, sind unbedingt die Vorsichtsmaßnahmen für die Entsorgung von Gegenständen zu befolgen, die mit potenziell infektiösem oder gefährlichem biologischem Material kontaminiert sind.

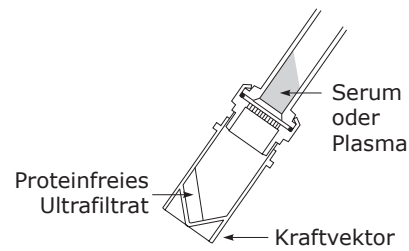
HINWEIS: Der Filter funktioniert möglicherweise nicht richtig, wenn er nach dem Befeuchten austrocknet.

Leistung

In den folgenden Abschnitten werden verschiedene Leistungsmerkmale wie Polarisationskontrolle, Ultrafiltrationsrate, Membranleistung, pH-Kontrolle und unspezifische Adsorption erörtert.

Polarisationskontrolle

Die Verwendung eines Festwinkelrotors ermöglicht eine Polarisationskontrolle und minimiert das Potenzial für Artefakte aufgrund von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Der Winkel wirkt der Anhäufung von zurückgehaltenem Protein an der Membranoberfläche entgegen, da diese dichte Schicht nach außen gleitet und sich am Rand der Membran ansammelt. In einem Ausschwingrotor wird die Polarisierungsschicht über die gesamte Membranoberfläche verdichtet, wodurch der Lösungsmittelfluss eingeschränkt wird.



Ultrafiltrationsrate

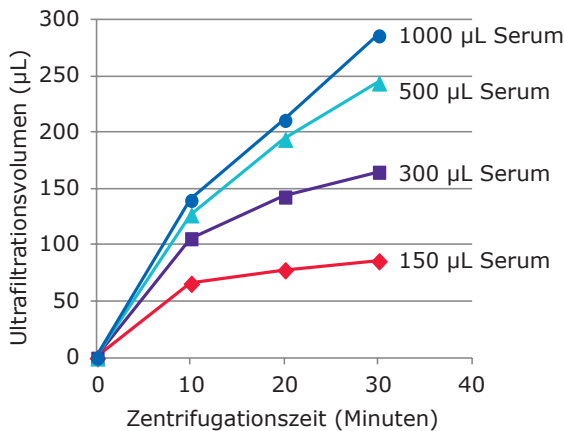
Die Fließrate hängt von der Proteinkonzentration der Probe, dem Ausgangsvolumen, der relativen Zentrifugalkraft (RCF), dem Rotortyp und der Temperatur ab. Hohe Fließraten ergeben sich aus der maximalen Membranoberfläche, der Polarisationskontrolle und dem optimalen Transmembrandruck, der bei Probenvolumen von mehr als 300 µL erreicht wird. Optimale Filtrationsraten werden bei 1000-2000 × g erreicht. Eine höhere Zentrifugalkraft erhöht die Fließrate nicht wesentlich und wird nicht empfohlen.

Vergleich von Festwinkel- und Ausschwingrotoren

Rotor	RCF (× g)	Typisches Ultrafiltrationsvolumen (µL)
Festwinkelrotor (33°)	1000	140–150
Ausschwingrotor	1000	115–120

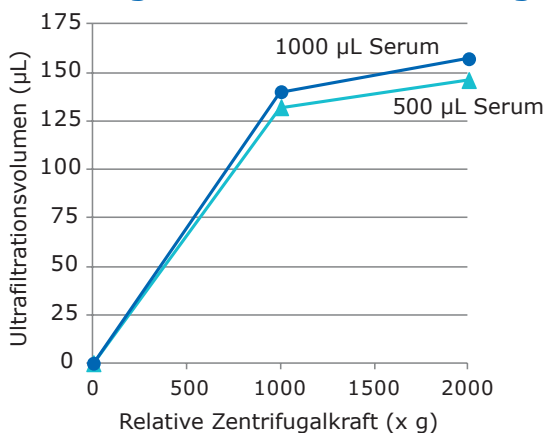
1 mL normales Humanserum, 10 Minuten Schleudern

Typische Ultrafiltrationsraten



Bedingungen: 33° Festwinkelrotor, 25 °C, 1000 × g

Wirkung der relativen Zentrifugalkraft



Bedingungen: 33° Festwinkelrotor, 25 °C, 10 Minuten Schleudern

Membranleistung

Die hohe selektive Durchlässigkeit der anisotropen, hydrophilen Ultracel® Ultrafiltrationsmembran ist auf die enge Porengrößenverteilung zurückzuführen. In der Regel halten Centrifree® Einheiten 99,9% des Serumproteins und < 5% L-Thyroxin (0,1 mg/mL in 0,1 N NaOH) zurück.

Die Anforderungen an die Proteinrückhaltung hängt in jeder Anwendung vom Grad der Ligandenbindung ab. Bei einem Liganden, der zu 90% gebunden ist, würde 1% Serumproteinverlust zu einer Überschätzung der Konzentration des freien Liganden um 9% führen. Für die Messung von freiem Thyroxin (> 99,95% gebunden) in unverdünntem Serum ist eine Proteinrückhaltung von > 99,995% für einen Fehler von < 10% erforderlich. Centrifree® Einheiten werden für die Trennung von Liganden empfohlen, die bis zu 99% gebunden sind.

Gelegentlich kann es aufgrund eines Defekts in der Membran oder eines mechanischen Defekts zu einem Verlust von Serum kommen. Wenn die Leckage mehr als 20% beträgt, ist das Ultrafiltrat gelb gefärbt. Die Bestimmung einer Leckage von weniger als 20% erfordert die Messung der Proteinkonzentration im Ultrafiltrat mit einem empfindlichen Mikroprotein-Assay. Wenn Sie eine höhere Zuverlässigkeit benötigen, aber einen routinemäßigen Proteinassay vermeiden wollen, filtrieren Sie die Probe in zwei Einheiten.

pH-Kontrolle

Legen Sie für jedes ligandenbindende System die akzeptable Grenze der pH-Schwankung fest. In einer Versuchsumgebung kann der pH-Wert der Probe durch anaerobe Probenhandhabung und -transfer, Begasung der Probe mit 5% CO₂, 95% O₂ oder Zugabe eines kleinen Volumens eines konzentrierten Puffers kontrolliert werden, sofern das Pufferion das Gleichgewicht der Ligandenbindung nicht verändert.

Nicht-spezifische Adsorption

Die Adsorptionsverluste hängen von der Ligandenkonzentration, der ionischen und hydrophoben Beschaffenheit des Liganden, der Temperatur und der Dauer des Kontakts mit den Oberflächen der Bestandteile sowie der Probenmatrix ab. Die Rückgewinnung von Liganden, die dem proteinfreien Serum-Ultrafiltrat zugesetzt wurden, ist im Allgemeinen größer als die aus Puffer und sagt mehr über das Verhalten mit Vollserum aus. Niedermolekulare, freie Fett- und Aminosäuren in proteinfreiem Ultrafiltrat interagieren mit den Oberflächen der Komponenten und passivieren diese, während Serumproteine im Allgemeinen die Oberflächen passivieren, auf die das gesamte Serum trifft. Eine geringe Rückgewinnung aus proteinfreiem Ultrafiltrat oder Puffer kann auf Adsorptionsverluste und/oder eine Membranretention des Liganden hinweisen. Die Ligandenrückgewinnung in Centrifree® Einheiten ist in Gegenwart von bindendem Protein und konkurrierenden Mikrosoluten am genauesten.

Spezifikationen

Maximales Probenvolumen	1,0 mL
Minimales Probenvolumen	0,15 mL
Maximale relative Zentrifugalkraft	2000 × g
Effektive Membranfläche	0,92 cm ²
Rückhaltevolumen (Membran und Träger)	10 µL
Abmessungen	
Länge der Einheit mit Deckel und Filtratbecher	95 mm
Durchmesser	16 mm
Konstruktionsmaterialien	
Membran	Ultracel® regenerierte Zellulose
Probenbehälter	Polycarbonat
Membran-Trägerbasis	Polycarbonat
Filtratbecher	Polyethylen
Filtratbecherdeckel	Polyethylen
O-Ring	Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM)

ACHTUNG: Centrifree® Komponenten sind nicht autoklavierbar. Nicht mit organischen Lösungsmitteln verwenden.

Chemische Kompatibilität

Centricon® Filtereinheiten sind für die Verwendung mit biologischen Flüssigkeiten und wässrigen Lösungen vorgesehen. Prüfen Sie vor Gebrauch die chemische Kompatibilität der jeweiligen Probe mit der Einheit. Weitere Informationen erhalten Sie auf [SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility](https://www.sigmaaldrich.com/FilterChemicalCompatibility).

Produktbestellung

Produkte online auf SigmaAldrich.com kaufen.

Symboldefinitionen

Symbol	Definition	Symbol	Definition
	Bestellnummer		Herstellungsdatum
	Nicht wiederverwenden		Hersteller
	Chargencode		Nicht steriles Produkt

Hinweis

Wir informieren und beraten unsere Kunden in Bezug auf Anwendungstechnologien und regulatorische Angelegenheiten nach bestem Wissen und Gewissen, jedoch unverbindlich und ohne Haftungsübernahme. Bestehende Gesetze und Vorschriften sind von unseren Kunden in jedem Fall zu beachten. Dies gilt auch im Hinblick auf etwaige Rechte Dritter. Unsere Auskünfte und Beratung entbinden unsere Kunden nicht von der eigenverantwortlichen Prüfung unserer Produkte auf ihre Eignung für den beabsichtigten Zweck.

Sammlung und Entsorgung

Alle Proben sind eindeutig zu kennzeichnen. Für die Probenentnahme und bei der Vorbereitung sind geeignete Geräte zu verwenden.

HINWEIS: Befolgen Sie die Vorsichtsmaßnahmen für die Entsorgung von Gegenständen, die mit potenziell infektiösem oder gefährlichem biologischem Material kontaminiert sind, gemäß allen geltenden internationalen, Bundes-, Länder- und lokalen Vorschriften.

Technische Unterstützung

Unser technischer Kundendienst ist über folgende Webseite erreichbar SigmaAldrich.com/techservice

Es ist wichtig, jedes schwerwiegende Ereignis mit diesem Gerät dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Landes zu melden, in dem der Benutzer ansässig ist.

Allgemeine Gewährleistung

Die anwendbare Gewährleistung für die Produkte in diesem Dokument finden Sie online unter SigmaAldrich.com/terms.

Introducción

Las unidades Centrifree® separan con rapidez y eficiencia los microsolutos libres de los ligados a proteínas en volúmenes pequeños (0,15–1,0 mL) de suero, plasma y otras muestras biológicas utilizando un método denominado ultrafiltración. En cuestión de minutos se produce una separación exacta sin dilución, cambio en el pH fisiológico, composición iónica ni concentración de los microsolutos no unidos. Estas unidades contienen membranas hidrófilas con poca capacidad de adsorción y juntas tóricas sin plastificantes para asegurar una recuperación excelente. El volumen de retención es de 10 µL o inferior.

Al contrario que la diálisis, la filtración en gel o la adsorción en carbón activado, la ultrafiltración permite medir con mayor precisión la concentración de ligando libre, la capacidad de unión o las constantes de afinidad. Elimina la necesidad de utilizar una metodología muy laboriosa o un equipo especializado, los errores de dilución y las desviaciones en el equilibrio de unión.

La ultrafiltración no cambia la concentración de ligando no unido al microsolutos. La proteína se separa selectivamente en una fracción del volumen de la muestra (el concentrado), mientras que el ligando libre atraviesa la membrana prácticamente inalterado junto con el disolvente.

Las leyes de acción y conservación de masas para la unión proteica ideal predicen que la concentración del ligando libre en el ultrafiltrado se mantendrá constante, siempre que la capacidad de unión molar y la afinidad sean independientes de la concentración proteica total. Los resultados de diversos sistemas que muestran una concentración constante de ligando libre en las sucesivas fracciones de ultrafiltrado respaldan estas predicciones.

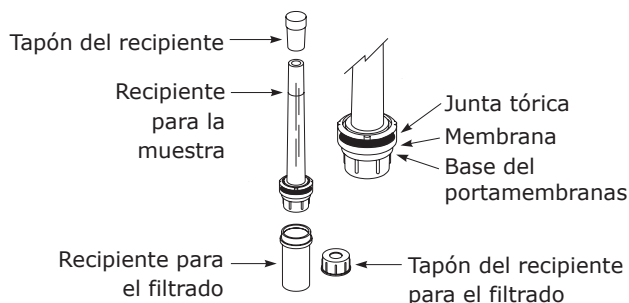
El cambio de la concentración de ligando libre no provocado por la retención o la adsorción a la membrana pone de manifiesto la alteración de la capacidad o la afinidad de las proteínas de unión debido a agregación o a otras interacciones proteico-proteicas no ideales. Dependiendo de la aplicación para la que se utilice, la concentración de ligando libre en el filtrado resultante puede analizarse cuantitativa o cualitativamente.

Indicaciones de uso

Los dispositivos Centrifree® son dispositivos de ultrafiltración no estériles y desechables indicados para separar el microsolutos libre del unido a proteínas en volúmenes pequeños (0,15 – 1,0 mL) de muestras biológicas, como suero, orina, líquido cefalorraquídeo y otros líquidos orgánicos. Dispositivo indicado para un solo uso y utilizado por un profesional de laboratorio.

Componentes de la unidad Centrifree®

El ultrafiltro Centrifree® proporciona una eficiencia máxima para el procesamiento de muestras múltiples. Cada unidad consiste en una membrana y una junta tórica sellada permanentemente entre el recipiente para la muestra y la base del portamembranas, a la que se fija un recolector de filtrado extraíble. La unidad Centrifree® está prevista para un solo uso.



Materiales suministrados

Con las unidades de ultrafiltración Centrifree® se suministran los siguientes componentes.

- 50 unidades de ultrafiltración
- 50 tapones de recipientes para muestra
- 50 recipientes para filtrado
- 50 tapones de recipientes para filtrado

NOTA: los tapones rojos para los recipientes de las muestras se suministran para evitar la evaporación de la muestra y el cambio del pH por pérdida de CO₂.

Equipo necesario

- Centrífuga con adaptador para el rotor o portamuestras que puedan aceptar 17 tubos de 100 mm y con capacidad para 1 000 – 2 000 x g.

NOTA: para conseguir un flujo óptimo del disolvente, utilice una centrífuga de rotor de ángulo fijo.

- Pipeta Pasteur o de volumen fijo para introducción de la muestra.

Almacenamiento y estabilidad

En la etiqueta del producto encontrará las condiciones de almacenamiento.

Directrices de uso

- En la unidad Centrifree® pueden utilizarse suero, plasma y otros líquidos biológicos. Para caudales más eficientes, extraiga la fibrina centrifugando la muestra antes de cargarla en el recipiente.
- El volumen de muestra recomendado es de 0,15–1,0 mL.
- Para obtener mejores resultados, utilice una centrífuga de rotor de ángulo fijo mejor que una de rotor oscilante y centrifugue a 1 000–2 000 x g.

PRECAUCIÓN: no utilice una fuerza centrífuga relativa superior a 2 000 x g.

- Realice estudios preliminares de retención de proteínas y de adsorción de ligandos con el fin de asegurar la idoneidad del sistema para la aplicación prevista.
- Las unidades de ultrafiltración Centrifree® están diseñadas para su uso con líquidos biológicos y disoluciones acuosas. No utilice las unidades con disolventes orgánicos.
- Determine la temperatura correcta para su aplicación. Mantenga la temperatura deseada utilizando una centrífuga atemperada o precalentando el rotor y la cámara de la centrífuga. En un rotor de ángulo fijo, el contenido de la unidad alcanza el equilibrio térmico con el rotor en 5–10 minutos. La rápida velocidad de ultrafiltración alcanzada por las unidades Centrifree® reduce al mínimo los efectos de la temperatura sobre la unión del ligando.
- No utilice la unidad para la concentración y la recuperación de macromoléculas.
- No esterilice en autoclave los componentes.
- No reutilice las unidades Centrifree®.
- No permita que se seque la membrana de las unidades de ultrafiltración una vez humedecidas. Si no va a utilizar la unidad inmediatamente después de enjuagarla, deje líquido en la membrana hasta que se utilice.
- La membrana Ultracel® del filtro contiene restos de glicerina (~ 2 µL). Si esta sustancia interfiere en el análisis, aclare el filtro con agua desionizada o NaOH 0,1 N hasta que no se observe más interferencia. Si utiliza NaOH 0,1N para quitar la glicerina, enjuague bien la unidad con agua desionizada o tampón antes de usarla. Centrifugue por lo menos durante 15 minutos para retirar la mayor cantidad posible de líquido. Para evitar un error de dilución causado por el atrapamiento de líquidos (~ 10 µL) después de aclarar, deseche la primera alícuota del ultrafiltrado.

Cómo utilizar los dispositivos de ultrafiltración Centrifree®

Antes de utilizar una unidad Centrifree®, retire el tapón rojo del recipiente para la muestra.

1. Sostenga el recipiente en un ángulo aproximado de 45° apoyando la punta de la pipeta en la pared del recipiente. Añada suavemente la disolución de la muestra a ritmo constante para evitar la formación de burbujas de aire.



NOTA: evite tocar la membrana con la punta de la pipeta.

2. Tape el recipiente de la muestra, coloque luego el ultrafiltro en un rotor de centrífuga con 17 adaptadores de 100 mm. Equilibre la centrífuga con una unidad similar.

NOTA: el tapón rojo del recipiente no debe bajar más de 3 - 4 mm del borde del recipiente. La compresión ulterior puede provocar prefiltración, que podría introducir luego errores analíticos si la muestra no está a la temperatura operativa deseada.

NOTA: compruebe la holgura de la centrífuga antes de utilizarla.

3. Equilibre la unidad y la muestra a la temperatura necesaria para su aplicación.
4. Centrifugue la unidad a 1 000 – 2 000 x g durante el tiempo necesario para obtener el volumen de filtrado deseado. Consulte las indicaciones sobre el tiempo de centrifugación en el apartado "Velocidad de ultrafiltración".
5. Retire con cuidado la unidad del rotor de la centrífuga y separe el recipiente de filtrado que contiene el ultrafiltrado. Cubra el recipiente de filtrado con el tapón proporcionado hasta que pueda analizarse el ultrafiltrado.

ADVERTENCIA: si desecha los componentes utilizados, asegúrese de seguir las precauciones para eliminación de elementos contaminados por material biológico peligroso o potencialmente infeccioso.

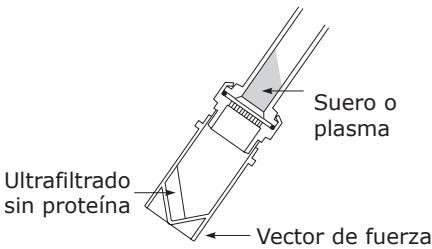
NOTA: es posible que el filtro no funcione correctamente si se deja secar después de humedecerlo.

Rendimiento

En los siguientes apartados se comentan varias características de rendimiento: control de la polarización, velocidad de ultrafiltración, rendimiento de la membrana, control del pH y adsorción inespecífica.

Control de la polarización

La utilización de un rotor de ángulo fijo permite el control de la polarización y reduce al mínimo la posibilidad de artefactos debido a interacciones proteína-proteína. El ángulo contrarresta la acumulación de la proteína retenida en la superficie de la membrana porque esta densa capa resbala hacia afuera y se acumula en el borde de la membrana. En un rotor oscilante, la capa de polarización se compacta sobre la superficie entera de la membrana, restringiendo el flujo del disolvente.



Velocidad de ultrafiltración

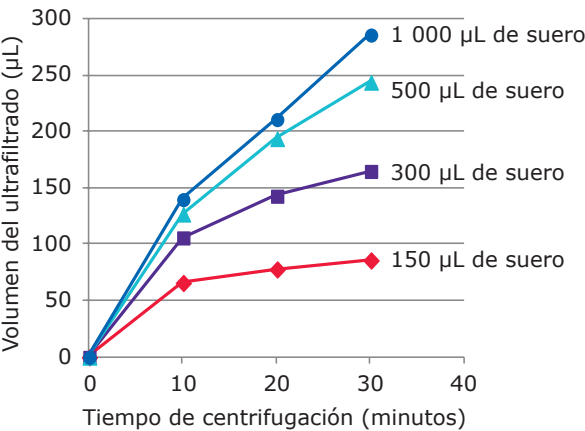
El caudal depende de la concentración proteica de la muestra, el volumen de partida, la fuerza centrífuga relativa (RCF), el tipo de rotor y la temperatura. Los caudales elevados son consecuencia del área de superficie máxima de la membrana, el control de la polarización y la presión transmembrana óptima lograda con volúmenes de muestra superiores a 300 µL. Se obtienen velocidades de filtración óptimas a 1 000–2 000 x g. Una fuerza centrífuga mayor no aumenta de manera significativa el caudal, y no se recomienda.

Comparación de rotores de centrífuga de ángulo fijo y de cubeta oscilante

Rotor	RCF (x g)	Volumen típico del ultrafiltrado (µL)
Ángulo fijo (33°)	1 000	140–150
Cubeta oscilante	1 000	115–120

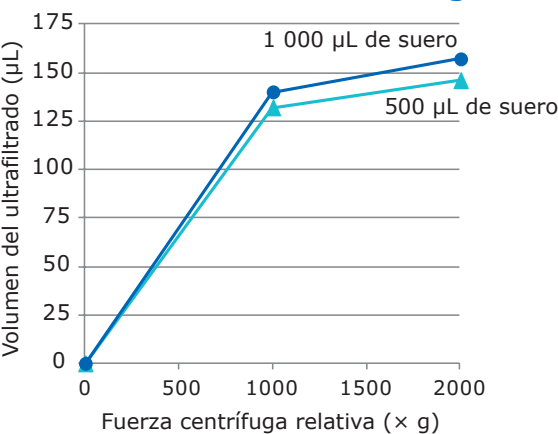
1 mL de suero humano normal, 10 minutos de centrifugación

Velocidades de ultrafiltración típicas



Condiciones: Rotor de ángulo fijo a 33°, 25 °C, 1 000 x g

Efecto de la fuerza centrífuga relativa



Condiciones: Rotor de ángulo fijo a 33°, 25 °C, 10 minuto de centrifugado

Rendimiento de la membrana

La permeabilidad tan selectiva de la membrana de ultrafiltración anisótropa e hidrófila Ultracel® se debe a la estrecha distribución del tamaño de los poros. Normalmente las unidades Centrifree® retienen el 99,9% de las proteínas del suero y < 5% de la L-tiroxina (0,1 mg/mL en NaOH 0,1 N).

Los requisitos de retención proteica para cada aplicación dependen del grado de unión de los ligandos. Para un ligando que esté unido un 90%, una fuga de un 1% de las proteínas séricas provocaría una sobreestimación del 9% de la concentración de ligando libre. Para determinar la tiroxina libre (> 99,95% de unión) en suero no diluido, se necesita una retención proteica superior al 99,995% para un error inferior al 10%. Se sugiere utilizar las unidades Centrifree® para la separación de ligandos unidos un máximo del 99%.

A veces puede producirse una fuga de suero debido a un defecto de la membrana o a un defecto mecánico. Si el escape es superior al 20%, el ultrafiltrado será de color amarillo. La determinación de una fuga inferior al 20% requiere la medición de la concentración de proteínas en el ultrafiltrado con un análisis microproteico sensible. Si se necesita mayor fiabilidad, pero quiere evitarse la realización de ensayos proteicos sistemáticos, puede filtrarse la muestra en ultrafiltros duplicados.

Control del pH

Establezca el límite aceptable de variación del pH para cada sistema de unión a ligandos. Experimentalmente el pH de la muestra puede controlarse mediante manejo y transferencia de muestras anaerobias, gaseando la muestra con CO₂ al 5% y O₂ al 95%, o añadiendo un pequeño volumen de tampón concentrado, siempre que los iones del tampón no alteren los equilibrios de unión de los ligandos.

Adsorción inespecífica

Las pérdidas por adsorción dependen de la concentración del ligando, su naturaleza iónica e hidrófoba, la temperatura y el tiempo de contacto con las superficies de los componentes, y la matriz de muestra. La recuperación del ligando que se ha añadido al ultrafiltrado sérico exento de proteínas suele ser mayor que la del tampón y de comportamiento más predictivo con el suero completo. Los aminoácidos y los ácidos grasos de bajo peso molecular presentes en el ultrafiltrado exento de proteínas interaccionan con las superficies de los componentes pasivos, mientras que las proteínas séricas generalmente chocan con las superficies encontradas por el suero completo. Una recuperación baja del ultrafiltrado exento de proteínas o del tampón puede indicar pérdidas por adsorción o retención del ligando en la membrana. La recuperación del ligando en las unidades Centrifree® es más precisa en presencia de proteínas de unión y microsolutos competidores.

Especificaciones

Volumen de muestra máximo	1,0 mL
Volumen de muestra mínimo	0,15 mL
Fuerza centrífuga relativa máxima	2 000 × g
Área de membrana activa	0,92 cm ²
Volumen de retención (membrana y portamembranas)	10 µL
Dimensiones	
Longitud de la unidad tapada y con el recipiente del filtrado	95 mm
Diámetro	16 mm
Materiales	
Membrana	Celulosa regenerada Ultracel®
Recipiente para la muestra	Policarbonato
Base del portamembranas	Policarbonato
Recipiente para el filtrado	Polietileno
Tapón del recipiente para el filtrado	Polietileno
Junta tórica	Monómero de etileno-propileno-dieno (EPDM)

PRECAUCIÓN: los componentes Centrifree® no son esterilizables en autoclave. No los utilice con disolventes orgánicos.

Compatibilidad química

Las unidades Centricon® están pensados para su uso con líquidos biológicos y disoluciones acuosas. Antes de utilizarlos, verifique que la muestra es compatible desde el punto de vista químico con el dispositivo. Vaya a SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility si desea más información.

Pedido de los productos

Compre productos en línea en SigmaAldrich.com.

Definiciones de los símbolos

Símbolo	Definición	Símbolo	Definición
	Número de referencia		Fecha de fabricación
	No reutilizar		Fabricante
	Código de lote		Producto no estéril

Aviso

Ofrecemos información y soporte a nuestros clientes sobre las tecnologías de las aplicaciones y temas normativos según nuestro conocimiento y experiencia, pero sin obligación ni responsabilidad alguna. Nuestros clientes deben respetar en todos los casos las normativas y leyes vigentes. Esto también se aplica con respecto a los derechos de terceros. Nuestra información y asesoramiento no exime a nuestros clientes de su responsabilidad de comprobar la idoneidad de nuestros productos para el propósito contemplado.

Recogida y eliminación

Todas las muestras deben estar claramente etiquetadas. Deben utilizarse instrumentos adecuados para obtener y preparar las muestras.

NOTA: siga las precauciones para la eliminación de los artículos contaminados con material biológico potencialmente infeccioso o peligroso de acuerdo con todas las normativas internacionales, federales, estatales y locales vigentes.

Asistencia técnica

Visite la página de servicio técnico en nuestra página web en SigmaAldrich.com/techservice.

Cualquier incidente grave de este dispositivo debe notificarse al fabricante y a la autoridad competente del país donde esté establecido el usuario.

Garantía estándar

La garantía aplicable a los productos indicados en esta publicación puede encontrarse en SigmaAldrich.com/terms.

Introdução

Os dispositivos Centrifree® separam de forma rápida e eficiente microssolutos livres de microssolutos ligados a proteínas em pequenos volumes (0,15 mL–1,0 mL) de soro, plasma e outras amostras biológicas, utilizando um método denominado ultrafiltração. A partição exata ocorre em minutos sem diluição, alteração no pH fisiológico, composição iônica ou concentração de microssolutos não ligados. Estes dispositivos contêm membranas hidrófilas de baixa adsorção e anéis vedantes sem plastificantes, de forma a assegurar uma excelente recuperação. O volume de retenção é igual ou inferior a 10 µL.

Ao contrário da diálise, filtração com gel ou adsorção em carvão, a ultrafiltração fornece uma melhor exatidão na medição da concentração de ligandos livres, da capacidade de ligação ou das constantes de afinidade. Elimina a metodologia morosa, a necessidade de equipamento especializado, os erros de diluição e os desvios no equilíbrio de ligação.

A ultrafiltração não altera a concentração dos ligandos dos microssolutos livres. A proteína é sujeita a partição seletiva numa fração do volume de amostra (o concentrado), enquanto o ligando livre passa, praticamente, de forma livre através da membrana juntamente com o solvente.

As leis de ação de massas e de conservação de massas para uma ligação a proteínas ideal preveem que a concentração do ligando livre no produto de ultrafiltração permaneça constante desde que a capacidade de ligação molar e a afinidade sejam independentes da concentração de proteínas totais. Os resultados para vários sistemas, que demonstram uma concentração constante dos ligandos livres em sucessivas frações de produto de ultrafiltração, suportam estas previsões.

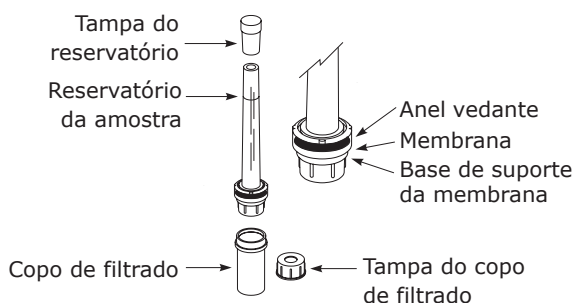
A alteração da concentração dos ligandos livres não causada pela retenção ou adsorção da membrana constitui uma evidência da capacidade ou afinidade alteradas das proteínas de ligação devido à agregação ou a outras interações não ideais entre proteínas. Dependendo da aplicação, pode analisar o filtrado resultante quanto à concentração de ligandos livres, quer quantitativamente quer qualitativamente.

Utilização pretendida

Os dispositivos Centrifree® são dispositivos de ultrafiltração não estéreis, descartáveis, que se destinam a separar microssolutos livres de outros microssolutos ligados a proteínas em pequenos volumes (0,15 mL–1,0 mL) de amostras biológicas como, por exemplo, soro, urina, líquido cefalorraquidiano (LCR) e outros fluidos biológicos. O dispositivo destina-se a uma única utilização e a ser utilizado por profissionais de laboratório.

Componentes do dispositivo Centrifree®

O dispositivo de ultrafiltração Centrifree® oferece eficiência máxima para o processamento de múltiplas amostras. Cada unidade consiste numa membrana e num anel vedante permanentemente selado entre o reservatório da amostra e a base do suporte. Um copo de filtrado amovível está fixado à base. O dispositivo Centrifree® destina-se apenas a uma única utilização.



Materiais fornecidos

Os seguintes componentes são fornecidos com os dispositivos de ultrafiltração Centrifree®.

- 50 dispositivos de filtração
- 50 tampas do reservatório
- 50 copos de filtrado
- 50 tampas dos copos de filtrado

NOTA: As tampas do reservatório vermelhas são fornecidas para prevenir a evaporação da amostra e a alteração do PH devido à perda de CO₂.

Equipamento necessário

- Centrifuge com adaptador ou transportadores do rotor com capacidade para tubos de 17 mm × 100 mm e de 1000–2000 × g.

NOTA: Para um fluxo de solvente ideal, utilize um rotor de centrífuga de ângulo fixo.

- Pipeta de Pasteur ou de volume fixo para fornecimento da amostra.

Armazenamento e estabilidade

Consulte as condições de armazenamento no rótulo do produto.

Orientações de utilização

- Podem ser utilizados com os dispositivos Centrifree® soro, plasma ou outros fluidos biológicos. Para débitos mais eficientes, remova a fibrina, centrifugando a amostra antes de a colocar no reservatório.
- O volume de amostra recomendado é de 0,15 mL–1,0 mL.
- Para melhores resultados, utilize uma centrífuga com rotor de ângulo fixo em vez de basculante, e centrifugue a 1000–2000 × g.

CUIDADO: Não opere numa força centrífuga relativa acima de 2000 × g.

- Realize estudos preliminares de adsorção de ligandos e de retenção de proteínas para assegurar a adequação do sistema para a aplicação prevista.
- Os dispositivos de ultrafiltração Centrifree® foram concebidos para utilização com fluidos biológicos e soluções aquosas. Não utilize os dispositivos com solventes orgânicos.
- Determine a temperatura certa para a sua aplicação. Mantenha a temperatura desejada, utilizando uma centrífuga aquecida ou pré-aquecendo o rotor da centrífuga e a câmara. Num rotor de ângulo fixo, o conteúdo do dispositivo alcança o equilíbrio térmico com o rotor em 5–10 minutos. A taxa de ultrafiltração rápida conseguida com os dispositivos Centrifree® minimiza os efeitos da temperatura na ligação do ligando.
- Não utilize para concentração e recuperação de macromoléculas.
- Não esterilize as partes componentes em autoclave.
- Não reutilize dispositivos Centrifree®.
- Não permita que a membrana dos dispositivos de filtração seque depois de molhada. Caso não utilize o dispositivo imediatamente após o enxaguamento, deixe líquido na membrana até o dispositivo ser utilizado.
- A membrana Ultracel® do dispositivo contém quantidades vestigiais de glicerina (~2 µL). Se esta substância interferir com a análise, enxague o dispositivo com água desionizada ou com NaOH 0,1 N até não observar mais interferência. Se o NaOH 0,1 N for utilizado para a remoção da glicerina, enxague minuciosamente o dispositivo com água desionizada ou tampão antes da utilização. Centrifugue durante, pelo menos, 15 minutos para remover o máximo de fluido possível. Para evitar erro de diluição devido a fluido aprisionado (~10 µL) após o enxaguamento, elimine a primeira alíquota de produto da ultrafiltração.

Como utilizar os dispositivos de ultrafiltração Centrifree®

Antes de utilizar um dispositivo Centrifree®, retire a tampa vermelha do reservatório.

1. Mantenha o reservatório num ângulo de aproximadamente 45°, com a ponta da pipeta a tocar na parede do reservatório. Adicione suavemente a solução de amostra, num fluxo homogêneo, para evitar o aprisionamento de ar.



NOTA: Evite tocar com a ponta da pipeta na membrana.

2. Tape o reservatório da amostra e, em seguida, coloque o dispositivo num rotor de centrífuga com adaptadores de 17 mm × 100 mm. Contrabalance a centrífuga com um dispositivo semelhante.

NOTA: A tampa vermelha do reservatório não deve ser avançada mais de 3 mm–4 mm para baixo sobre a parte de cima do reservatório. Mais compressão pode originar pré-filtração, o que pode originar a introdução de erros analíticos se a amostra não estiver na temperatura de funcionamento desejada.

NOTA: Antes da utilização, verifique o espaço livre à volta da centrífuga.

3. Equilibre o dispositivo e a amostra até à temperatura exigida pela sua aplicação.
4. Centrifugue o dispositivo a 1000–2000 × g durante o tempo necessário para obter o volume de filtrado desejado. Consulte as orientações do tempo de centrifugação na secção “Taxa de ultrafiltração”.
5. Remova cuidadosamente o dispositivo do rotor da centrífuga e desligue o copo de filtrado que contém o produto da ultrafiltração. Cubra o copo de filtrado até o produto com ultrafiltrado poder ser analisado.

ADVERTÊNCIA: Se eliminar os componentes usados, certifique-se de que segue as precauções relativas à eliminação de itens contaminados com material potencialmente infeccioso ou material com perigo biológico.

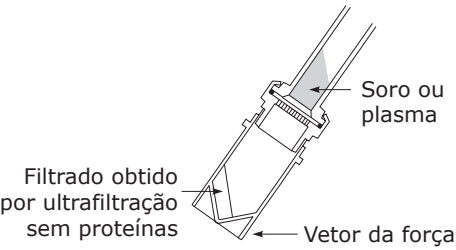
NOTA: O filtro pode não funcionar corretamente se, após o humedecimento, for deixado secar.

Desempenho

As secções seguintes abordam diversas características do desempenho, incluindo o controlo da polarização, o desempenho da membrana, o controlo do pH e a adsorção não específica.

Controlo da polarização

A utilização de um rotor de ângulo fixo fornece controlo da polarização e minimizar a possibilidade de artefactos devido a interações entre proteínas. O ângulo contraria a acumulação de proteína na superfície de membrana porque esta camada densa desliza para a parte externa e acumula-se no bordo da membrana. Num rotor basculante, a camada de polarização é compactada sobre toda a superfície da membrana, restringindo o fluxo de solvente.



Taxa de ultrafiltração

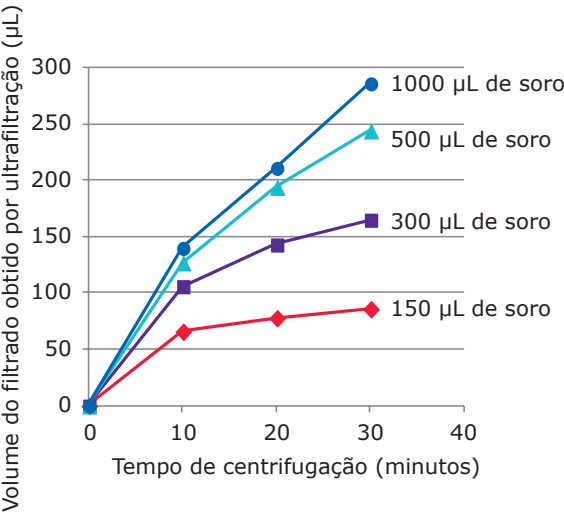
O débito depende da concentração de proteína da amostra, do volume inicial, da força centrífuga relativa (RCF), do tipo de rotor e da temperatura. As taxas de fluxo alto resultam da área de superfície de membrana máxima, do controlo da polarização e da pressão transmembranar ideal alcançada com volumes de amostra superiores a 300 µL. As taxas de filtração ideais são alcançadas a 1000–2000 × g. Uma força centrífuga mais elevada não aumenta significativamente o débito e não é recomendada.

Comparação de rotores de centrífuga de ângulo fixo vs. basculantes

Rotor	RCF (× g)	Volume típico do produto da ultrafiltração (µL)
Ângulo fixo (33°)	1000	140–150
Basculante	1000	115–120

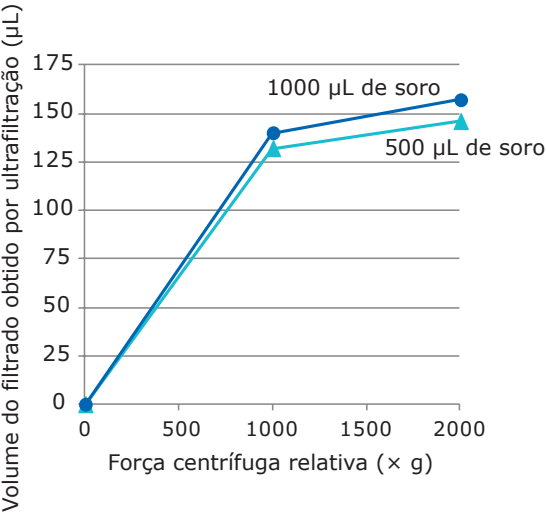
1 mL de soro humano normal, 10 minutos de centrifugação

Taxas de ultrafiltração típicas



Condições: Rotor de ângulo fixo de 33°, 25 °C, 1000 × g

Efeito da força centrífuga relativa



Condições: Rotor de ângulo fixo de 33°, 25 °C, 10 minutos de centrifugação

Desempenho da membrana

A alta permeabilidade seletiva da membrana de ultrafiltração Ultracel® hidrófila, anisotrópica, deve-se à distribuição estreita do tamanho dos poros. Tipicamente, os dispositivos Centrifree® retêm 99,9% das proteínas sérias e < 5% de L-tiroxina (0,1 mg/mL em NaOH 0,1 N).

Os requisitos da retenção de proteínas para cada aplicação depende do grau de ligação dos ligandos. Para um ligando que esteja 90% ligado, 1% de fuga de proteínas sérias resultaria numa sobre-estimativa de 9% da concentração de ligando livre. Para medição da tiroxina livre (> 99,95% ligada) em soro não diluído, é necessária uma retenção de proteínas > 99,995% para < 10% de erro. Os dispositivos Centrifree® são sugeridos para separação dos ligandos que estão até 99% ligados.

Por vezes, pode ocorrer fuga de soro devido a um defeito na membrana ou a um defeito mecânico. Se a fuga for superior a 20%, o produto de ultrafiltração terá uma coloração amarela. A determinação da fuga inferior a 20% requer a medição da concentração da proteína no produto da ultrafiltração com um ensaio sensível para microproteínas. Se necessitar de maior fiabilidade, mas quiser enviar ensaios de proteínas de rotina, filtre a amostra em dispositivos duplicados.

Controlo de pH

Estabeleça a variação do limite de pH aceitável para cada sistema de ligação ao ligando. Experimentalmente, o pH da amostra pode ser controlado por manuseamento e transferência de amostras anaeróbias, gaseificação da amostra com 5% de CO₂, 95% de O₂ ou adição de um pequeno volume de tampão concentrado, desde que os iões do tampão não alterem o equilíbrio de ligação do ligando.

Adsorção não específica

As perdas adsorptivas dependem da concentração do ligando, da sua natureza iónica e hidrófoba, da temperatura e do tempo de contacto com as superfícies dos componentes, e da matriz da amostra. A recuperação do ligando que foi adicionada ao produto da ultrafiltração sérico sem proteínas é, geralmente, maior que a do tampão e mais preditiva do comportamento com soro total. Gorduras e aminoácidos livres, de baixo peso molecular, em produto da ultrafiltração sem proteínas interagem com e tornam passivas as superfícies dos componentes enquanto as proteínas sérias geralmente tornam passivas as superfícies em contacto com soro total. A baixa recuperação do produto da ultrafiltração sem proteínas ou tampão podem indicar perdas adsorptivas e/ou retenção do ligando na membrana. A recuperação do ligando nos dispositivos Centrifree® é mais exata na presença de proteínas de ligação e microssolutos que compitam.

Especificações

Volume máximo de amostra	1,0 mL
Volume mínimo de amostra	0,15 mL
Força centrífuga relativa máxima	2000 × g
Área de membrana ativa	0,92 cm ²
Volume de retenção (membrana e suporte)	10 µL
Dimensões	
Comprimento do dispositivo tapado com copo de filtrado	95 mm
Diâmetro	16 mm
Materiais de construção	
Membrana	Celulose regenerada Ultracel®
Reservatório da amostra	Polycarbonato
Base de suporte da membrana	Polycarbonato
Copo de filtrado	Polietileno
Tampa do copo de filtrado	Polietileno
Anel vedante	Monómero etilenopropilenodieno (EPDM)

CAUIDADO: Os componentes Centrifree® não são autoclaváveis. Não utilize com solventes orgânicos.

Compatibilidade química

Os dispositivos Centricon® destinam-se a ser utilizados com fluidos biológicos e soluções aquosas.

Antes de utilizar, verifique a compatibilidade química entre a amostra e o dispositivo. Aceda a SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility para obter mais informações.

Encomenda do produto

Compre produtos on-line em SigmaAldrich.com.

Definições dos símbolos

Símbolo	Definição	Símbolo	Definição
	Número de referência		Data de fabrico
	Não reutilizar		Fabricante
	Código de lote		Produto não estéril

Aviso

Fornecemos informações e damos aconselhamento aos nossos clientes sobre tecnologias de aplicação e assuntos regulamentares tanto quanto é do nosso melhor conhecimento e capacidades, mas sem obrigação ou responsabilidade civil. Os nossos clientes devem sempre cumprir as leis e os regulamentos em vigor. Isto também se aplica aos direitos de terceiros. As informações de aconselhamento por nós fornecidas não isentam os nossos clientes da sua própria responsabilidade em verificar a adequação dos nossos produtos ao fim pretendido.

Recolha e eliminação

Todas as amostras têm de estar claramente identificadas. Para a obtenção e preparação das amostras, tem de se usar instrumentos adequados.

NOTA: Siga as precauções de eliminação de itens contaminados com materiais potencialmente infecciosos ou com risco biológico de acordo com todos os regulamentos internacionais, comunitários, nacionais e locais em vigor.

Assistência técnica

Visite a página de assistência técnica no nosso website em SigmaAldrich.com/techservice.

Qualquer incidente grave com este dispositivo deve ser notificado ao fabricante e à autoridade competente do país onde o utilizador se encontra estabelecido.

Garantia normal

A garantia aplicável aos produtos indicados nesta publicação pode ser encontrada em SigmaAldrich.com/terms.

Εισαγωγή

Οι συσκευές Centrifree® διαχωρίζουν γρήγορα και αποτελεσματικά ελεύθερες από πρωτεϊνική δέσμευση διαλυμένες μικρομοριακές ουσίες σε μικρούς όγκους (0,15–1,0 mL) ορού, πλάσματος και άλλων βιολογικών δειγμάτων με χρήση μιας μεθόδου που λέγεται υπερδιήθηση. Ακριβής διαχωρισμός συμβαίνει εντός λεπτών χωρίς αραίωση, αλλαγή σε φυσιολογικό pH, ιοντική σύνθεση ή συγκέντρωση αδέσμευτων διαλυμένων μικρομοριακών ουσιών. Αυτές οι συσκευές περιέχουν χαμηλής προσρόφησης υδρόφιλες μεμβράνες και στεγανωτικούς δακτυλίους χωρίς πλαστικοποιητές για τη διασφάλιση βέλτιστης ανάκτησης. Ο όγκος συγκράτησης είναι 10 µL ή λιγότερο.

Σε αντίθεση με τη διαπίδυση, διήθηση πηκτής ή προσρόφηση σε ξυλάνθρακα, η υπερδιήθηση παρέχει βελτιωμένη ακρίβεια κατά τη μέτρηση της συγκέντρωσης ελεύθερου συνδέτη, της δεσμευτικής ικανότητας ή των σταθερών συγγένειας. Απαλλάσσει από χρονοβόρα μεθοδολογία, ανάγκη για ειδικό εξοπλισμό, σφάλματα αραίωσης και μεταβολές στην ισορροπία δέσμευσης.

Η υπερδιήθηση δεν αλλάζει τη συγκέντρωση ελεύθερου συνδέτη διαλυμένων μικρομοριακών ουσιών. Η πρωτεΐνη διαχωρίζεται επιλεκτικά σε ένα κλάσμα του όγκου δείγματος (το συμπύκνωμα), ενώ ο ελεύθερος συνδέτης περνά ουσιαστικά ανεμπόδιστος μέσω της μεμβράνης μαζί με τον διαλύτη.

Οι νόμοι δράσης της μάζας και συντήρησης της μάζας για ιδανική πρωτεϊνική δέσμευση προβλέπουν ότι η συγκέντρωση ελεύθερου συνδέτη στο υπερδιήθημα θα παραμείνει σταθερή, εφόσον η ικανότητα και η συγγένεια μοριακής δέσμευσης είναι ανεξάρτητες από τη συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα για διάφορα συστήματα που παρουσιάζουν σταθερή συγκέντρωση ελεύθερου συνδέτη σε διαδοχικά κλάσματα υπερδιηθήματος υποστηρίζουν αυτές τις προβλέψεις.

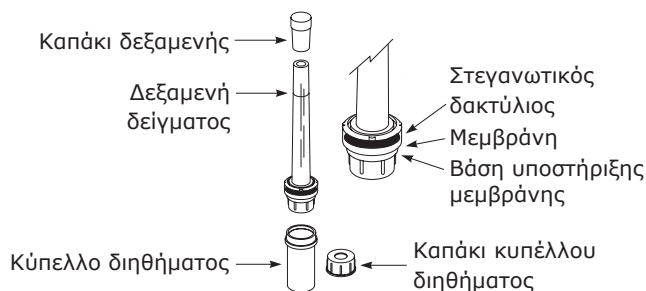
Η αλλαγή της συγκέντρωσης ελεύθερου συνδέτη που δεν προκαλείται από συγκράτηση από τη μεμβράνη ή προσρόφηση είναι ένδειξη αλλοιωμένης ικανότητας ή συγγένειας δέσμευσης πρωτεϊνών λόγω συσσωμάτωσης ή άλλων μη ιδανικών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Ανάλογα με την εφαρμογή, μπορείτε να αναλύσετε το προκύπτον διήθημα για συγκέντρωση ελεύθερου συνδέτη είτε ποσοτικά είτε ποιοτικά.

Προβλεπόμενη χρήση

Οι συσκευές Centrifree® είναι μη αποστειρωμένες, αναλώσιμες συσκευές υπερδιήθησης που προορίζονται για τον διαχωρισμό ελεύθερων από πρωτεϊνική δέσμευση διαλυμένων μικρομοριακών ουσιών σε μικρούς όγκους (0,15–1,0 mL) βιολογικών δειγμάτων, π.χ. ορού, ούρων, εγκεφαλονωτιαίου υγρού και άλλων βιολογικών υγρών. Η συσκευή προορίζεται για μία χρήση μόνο και πρέπει να χρησιμοποιείται από επαγγελματίες εργαστηρίου.

Μέρη συσκευής Centrifree®

Η συσκευή υπερδιήθησης Centrifree® παρέχει μέγιστη αποτελεσματικότητα για πολλαπλή επεξεργασία δειγμάτων. Κάθε μονάδα αποτελείται από μια μεμβράνη και στεγανωτικό δακτύλιο με μόνιμη σφράγιση μεταξύ της δεξαμενής δείγματος και της βάσης υποστήριξης. Ένα αποσπώμενο κύπελλο διηθήματος είναι προσαρτημένο στη βάση. Η συσκευή Centrifree® προορίζεται για μία μόνο χρήση.



Παρεχόμενα υλικά

Τα παρακάτω μέρη παρέχονται με τις συσκευές υπερδιήθησης Centrifree®.

- 50 συσκευές υπερδιήθησης
- 50 καπάκια δεξαμενής
- 50 κύπελλα διηθήματος
- 50 καπάκια κυπέλλων διηθήματος

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα ερυθρά καπάκια δεξαμενής παρέχονται για την αποφυγή της εξάτμισης του δείγματος και την αλλαγή του pH λόγω απώλειας CO₂.

Απαιτούμενος εξοπλισμός

- Φυγόκεντρος με προσαρμογέα στροφέα ή φορείς με δυνατότητα υποδοχής σωληναρίων 17 × 100 mm και ικανότητα 1.000–2.000 × g.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για βέλτιστη ροή διαλύτη, χρησιμοποιήστε έναν στροφέα φυγόκεντρου σταθερής γωνίας.

- Πιπέτα Pasteur ή σταθερού όγκου για παροχή δείγματος.

Αποθήκευση και σταθερότητα

Ανατρέξτε στην ετικέτα του προϊόντος για τις συνθήκες αποθήκευσης.

Οδηγίες χρήσης

- Με τις συσκευές Centrifree®, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ορός, πλάσμα ή άλλα βιολογικά υγρά. Για αποτελεσματικότερους ρυθμούς ροής, αφαιρέστε το ινώδες με φυγοκέντρηση του δείγματος πριν από την τοποθέτηση στη δεξαμενή.
- Ο συνιστώμενος όγκος δείγματος είναι 0,15–1,0 mL.
- Για βέλτιστα αποτελέσματα, χρησιμοποιήστε έναν τροφέα σταθερής γωνίας αντί για τροφέα φυγοκέντρου περιστρεφόμενου κάδου και κάντε περιδίνηση σε $1.000\text{--}2.000 \times g$.
ΠΡΟΣΟΧΗ: Η λειτουργία δεν πρέπει να γίνεται σε σχετική φυγοκεντρική δύναμη πάνω από $2.000 \times g$.
- Διεξάγετε προκαταρκτικές μελέτες προσρόφησης συνδέτη και συγκράτησης πρωτεϊνών για τη διασφάλιση της σταθερότητας του συστήματος για την προβλεπόμενη εφαρμογή.
- Οι συσκευές υπερδιήθησης Centrifree® έχουν σχεδιαστεί για χρήση με βιολογικά υγρά και υδατικά διαλύματα. Μην χρησιμοποιείτε τις συσκευές με οργανικούς διαλύτες.
- Προσδιορίστε τη σωστή θερμοκρασία για την εφαρμογή σας. Διατηρήστε την επιθυμητή θερμοκρασία με χρήση μιας θερμαινόμενης φυγοκέντρου ή με προθέρμανση του φυγοκεντρικού τροφέα και θαλάμου. Σε έναν τροφέα σταθερής γωνίας, τα περιεχόμενα της συσκευής φτάνουν σε θερμική ισορροπία με τον τροφέα σε 5–10 λεπτά. Ο ταχύς ρυθμός υπερδιήθησης που επιτυγχάνεται με τις συσκευές Centrifree® ελαχιστοποιεί τις επιδράσεις της θερμοκρασίας στη δέσμευση συνδέτη.
- Να μη χρησιμοποιείται για συμπύκνωση και ανάκτηση μακρομοριακών ουσιών.
- Μην θέτετε σε αυτόκαυστο τα μέρη των εξαρτημάτων.
- Μην επαναχρησιμοποιείτε τις συσκευές Centrifree®.
- Μην αφήνεται τη μεμβράνη στις συσκευές υπερδιήθησης να ξηρανθεί μετά από την ύγρανση. Εάν δεν χρησιμοποιήσετε τη συσκευή αμέσως μετά την έκλυση, αφήστε το υγρό στη μεμβράνη έως ότου χρησιμοποιηθεί η συσκευή.
- Η μεμβράνη Ultracel® στη συσκευή περιέχει ιχνοποσότητες γλυκερίνης (~2 μL). Εάν αυτή η ουσία επηρεάζει την ανάλυση, εκπλύνετε τη συσκευή με απιονισμένο νερό ή 0,1 N NaOH έως ότου δεν παρατηρείται πλέον παρεμβολή. Εάν 0,1 N NaOH χρησιμοποιείται για την αφαίρεση της γλυκερίνης, εκπλύνετε διεξοδικά τη συσκευή με απιονισμένο νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα πριν από τη χρήση. Κάντε περιδίνηση για τουλάχιστον 15 λεπτά για την αφαίρεση όσο περισσότερου υγρού είναι δυνατόν. Για την αποφυγή σφάλματος αραίωσης που προκαλείται από παγιδευμένο υγρό (~10 μL) μετά από την έκλυση, απορρίψτε το πρώτο κλάσμα υπερδιηθήματος.

Τρόπος χρήσης των συσκευών υπερδιήθησης Centrifree®

Πριν από τη χρήση μιας συσκευής Centrifree®, αφαιρέστε το ερυθρό καπάκι δεξαμενής.

1. Κρατήστε τη δεξαμενή σε γωνία περίπου 45° με το ρύγχος της πιπέτας να αγγίζει το τοίχωμα της δεξαμενής. Προσθέστε διάλυμα δείγματος απαλά σε μία ομοιογενή ροή για την αποφυγή της παγίδευσης αέρα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Αποφύγετε το άγγιγμα της μεμβράνης με το ρύγχος της πιπέτας.

2. Θέστε το καπάκι στη δεξαμενή δείγματος, και κατόπιν τοποθετήστε τη συσκευή σε έναν τροφέα φυγοκέντρου με προσαρμογείς 17×100 mm. Εξισορροπήστε τη φυγόκεντρο με όμοια συσκευή.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το ερυθρό καπάκι δεξαμενής δεν θα πρέπει να εκτείνεται πάνω από 3–4 mm κάτω από το άνω μέρος της δεξαμενής. Περαιτέρω συμπίεση μπορεί να προκαλέσει προδιήθηση, η οποία θα μπορούσε ακολούθως να προκαλέσει αναλυτικά σφάλματα εάν το δείγμα δεν είναι στην επιθυμητή λειτουργική θερμοκρασία.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Πριν από τη χρήση, ελέγξτε την καθαριότητα της φυγοκέντρου.

3. Εξισορροπήστε τη συσκευή και το δείγμα στη θερμοκρασία που απαιτείται από την εφαρμογή σας.
4. Κάντε περιδίνηση της συσκευής σε $1.000\text{--}2.000 \times g$ για τον χρόνο που απαιτείται για τη λήψη του επιθυμητού όγκου διηθήματος. Για οδηγίες σχετικά με τον χρόνο περιδίνησης, ανατρέξτε στην ενότητα «Ρυθμός υπερδιήθησης».

5. Αφαιρέστε προσεκτικά τη συσκευή από τον τροφέα φυγοκέντρου και αποσυνδέστε το κύπελλο διηθήματος που περιέχει το υπερδιήτημα. Καλύψτε το κύπελλο διηθήματος με το παρεχόμενο καπάκι έως ότου μπορεί να αναλυθεί το υπερδιήτημα.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Κατά τη διάθεση χρησιμοποιημένων μερών, φροντίστε να ακολουθήσετε τις προφυλάξεις για τη διάθεση των ειδών που έχουν μολυνθεί με δυνητικά μολυσματικό ή επικίνδυνο βιολογικό υλικό.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το φίλτρο μπορεί να μη λειτουργεί σωστά εάν αφαιρεθεί να ξηρανθεί μετά την ύγρανση.

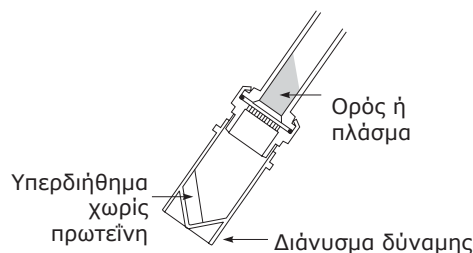
Απόδοση

Οι παρακάτω ενότητες περιγράφουν διάφορα χαρακτηριστικά απόδοσης, όπως έλεγχο πόλωσης, ρυθμό υπερδιήθησης, απόδοση μεμβράνης, έλεγχο pH και μη ειδική προσρόφηση.



Έλεγχος πόλωσης

Η χρήση ενός στροφέα σταθερής γωνίας παρέχει έλεγχο πόλωσης και ελαχιστοποιεί την πιθανότητα τεχνητών σφαλμάτων λόγω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η γωνία αντισταθμίζει τη συσσώρευση της συγκρατούμενης πρωτεΐνης στην επιφάνεια της μεμβράνης επειδή αυτό το πυκνό στρώμα ολισθαίνει προς τα έξω και συσσωρεύεται στην άκρη της μεμβράνης. Σε έναν στροφέα περιστρεφόμενου κάδου, το στρώμα πόλωσης γίνεται συμπαγές πάνω από ολόκληρη της επιφάνεια της μεμβράνης, περιορίζοντας τη ροή διαλύτη.



Ρυθμός υπερδιήθησης

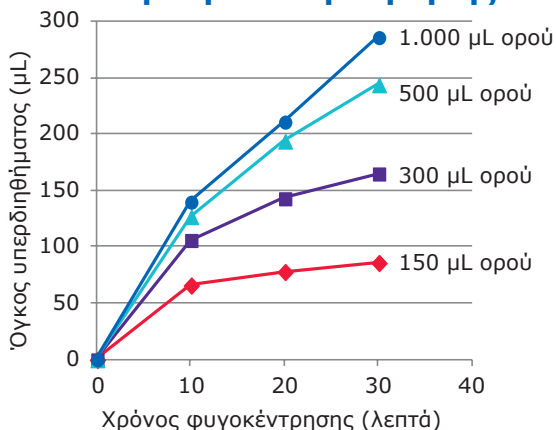
Ο ρυθμός ροής εξαρτάται από τη συγκέντρωση πρωτεΐνης δείγματος, τον όγκο έναρξης, τη σχετική φυγοκεντρική δύναμη (RCF), τον τύπο στροφέα και τη θερμοκρασία. Υψηλοί ρυθμοί ροής προκύπτουν από το μέγιστο εμβαδόν επιφάνειας της μεμβράνης, τον έλεγχο πόλωσης, και η βέλτιστη διαμεμβρανική πίεση επιτυγχάνεται με όγκους δείγματος πάνω από 300 μL . Βέλτιστοι ρυθμοί διήθησης επιτυγχάνονται σε $1.000\text{--}2.000 \times g$. Υψηλότερη φυγοκεντρική δύναμη δεν αυξάνει σημαντικά τον ρυθμό ροής και δεν συνιστάται.

Σύγκριση στροφέων φυγοκέντρου σταθερής γωνίας έναντι στροφέων φυγοκέντρου περιστρεφόμενου κάδου

Στροφέας	RCF ($\times g$)	Τυπικός όγκος υπερδιηθήματος (μL)
Σταθερής γωνίας (33°)	1.000	140–150
Περιστρεφόμενος κάδος	1.000	115–120

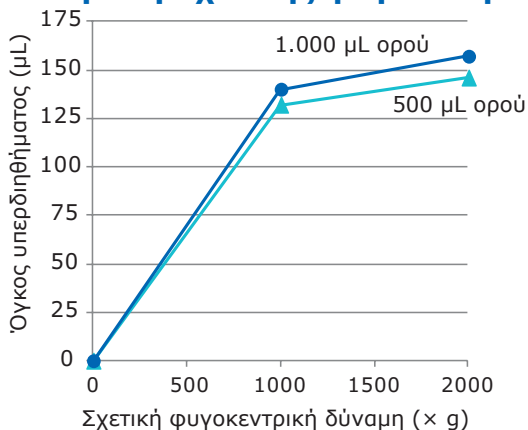
1 mL φυσιολογικού ανθρώπινου ορού, 10 λεπτά περιδίνηση

Τυπικοί ρυθμοί υπερδιήθησης



Συνθήκες: Στροφέας σταθερής γωνίας 33° , 25°C , $1.000 \times g$

Επίδραση σχετικής φυγοκεντρικής δύναμης



Συνθήκες: Στροφέας σταθερής γωνίας 33° , 25°C , 10 λεπτά περιδίνησης

Απόδοση μεμβράνης

Η υψηλά επιλεκτική διαπερατότητα της ανισοτροπικής, υδρόφιλης μεμβράνης υπερδιήθησης Ultracel® οφείλεται στην κατανομή στενού μεγέθους πόρων. Τυπικά, οι συσκευές Centrifree® συγκρατούν το 99,9% της πρωτεΐνης ορού και < 5% L-θυροξίνης (0,1 mg/mL σε 0,1 N NaOH).

Οι απαιτήσεις συγκράτησης πρωτεϊνών για κάθε εφαρμογή εξαρτώνται από τον βαθμό δέσμευσης συνδέτη. Για έναν συνδέτη που είναι δεσμευμένος κατά 90%, διαρροή πρωτεΐνης ορού 1% θα οδηγούσε σε υπερεκτίμηση 9% της συγκέντρωσης ελεύθερου συνδέτη. Για τη μέτρηση της ελεύθερης θυροξίνης (> 99,95% δέσμευση) σε αναρραίωτο ορό, απαιτείται συγκράτηση πρωτεΐνης > 99,995% για σφάλμα < 10%. Οι συσκευές Centrifree® προτείνονται για τον διαχωρισμό συνδετών που είναι δεσμευμένοι έως και 99%.

Περιστασιακά, μπορεί να συμβεί διαρροή ορού λόγω ενός ελαττώματος στη μεμβράνη ή ενός μηχανικού ελαττώματος. Εάν η διαρροή είναι μεγαλύτερη από 20%, το υπερδιήθημα θα έχει κίτρινο χρώμα. Ο προσδιορισμός διαρροής κάτω από 20% απαιτεί μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο υπερδιήθημα με έναν ευαίσθητο προσδιορισμό μικροπρωτεΐνης. Εάν χρειάζεστε μεγαλύτερη αξιοπιστία αλλά επιθυμείτε να αποφύγετε τον προσδιορισμό πρωτεϊνών ρουτίνας, διηθήστε το δείγμα σε διπλές συσκευές.

Έλεγχος pH

Προσδιορίστε το αποδεκτό όριο διακύμανσης pH για κάθε σύστημα δέσμευσης συνδέτη. Πειραματικά, το pH δείγματος μπορεί να ελεγχθεί με αναερόβιο χειρισμό και μεταφορά δείγματος, αερίωση δείγματος με 5% CO₂, 95% O₂ ή προσθήκη μικρού όγκου συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος εφόσον τα ιόντα ρυθμιστικού διαλύματος δεν αλλοιώνουν την ισορροπία δέσμευσης συνδέτη.

Μη ειδική προσρόφηση

Οι προσροφητικές απώλειες εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του συνδέτη, την ιοντική και υδρόφοβη φύση του, τη θερμοκρασία και τον χρόνο επαφής με τις επιφάνειες των μερών και τη μήτρα του δείγματος. Η ανάκτηση του συνδέτη που έχει προστεθεί σε ελεύθερο από πρωτεΐνη υπερδιήθημα ορού είναι γενικά μεγαλύτερη από εκείνη του ρυθμιστικού διαλύματος και πιο προβλεπτική της συμπεριφοράς με ολικό ορό. Χαμηλού μοριακού βάρους, ελεύθερα λιπαρά οξέα και αμινοξέα σε ελεύθερο από πρωτεΐνη υπερδιήθημα αλληλεπιδρούν με και αδρανοποιούν τις επιφάνειες των μερών, ενώ οι πρωτεΐνες ορού γενικά αδρανοποιούν τις επιφάνειες που συναντούνται από τον ολικό ορό. Χαμηλή ανάκτηση από είτε ελεύθερο από πρωτεΐνη υπερδιήθημα ή ρυθμιστικό διάλυμα ενδέχεται να υποδεικνύει προσροφητικές απώλειες και/ή συγκράτηση συνδέτη από τη μεμβράνη. Η ανάκτηση συνδέτη στις συσκευές Centrifree® είναι πιο ακριβής σε παρουσία πρωτεΐνης δέσμευσης και ανταγωνιστικών διαλυμένων μικρομοριακών ουσιών.

Προδιαγραφές

Μέγιστος όγκος δείγματος	1,0 mL
Ελάχιστος όγκος δείγματος	0,15 mL
Μέγιστη σχετική φυγοκεντρική δύναμη	2.000 × g
Ενεργό εμβαδόν μεμβράνης	0,92 cm ²
Όγκος συγκράτησης (μεμβράνη και υποστήριξη)	10 µL
Διαστάσεις	
Μήκος πωματισμένης συσκευής με κύπελλο διηθήματος	95 mm
Διάμετρος	16 mm
Υλικά κατασκευής	
Μεμβράνη	Ultracel® αναγεννημένη κυτταρίνη
Δεξαμενή δείγματος	Πολυανθρακικό
Βάση υποστήριξης μεμβράνης	Πολυανθρακικό
Κύπελλο διηθήματος	Πολυαιθυλένιο
Καπάκι κυπέλλου διηθήματος	Πολυαιθυλένιο
Στεγανωτικός δακτύλιος	Μονομερές αιθυλένιο-προπυλένιο-διένιο (EPDM)

ΠΡΟΣΟΧΗ: Τα μέρη Centrifree® δεν επιδέχονται επεξεργασία σε αυτόκαυστο. Να μη χρησιμοποιείται με οργανικούς διαλύτες.

Χημική συμβατότητα

Οι συσκευές Centricon® προορίζονται για χρήση με βιολογικά υγρά και υδατικά διαλύματα. Πριν από τη χρήση, ελέγξτε το δείγμα για χημική συμβατότητα με τη συσκευή. Μεταβείτε στη διεύθυνση SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility για περισσότερες πληροφορίες.

Παραγγελία προϊόντος

Μπορείτε να αγοράσετε αυτά τα προϊόντα διαδικτυακά στον ιστότοπο SigmaAldrich.com.

Ορισμοί συμβόλων

Σύμβολο	Ορισμός	Σύμβολο	Ορισμός
	Αριθμός καταλόγου		Ημερομηνία κατασκευής
	Να μην επαναχρησιμοποιείται		Κατασκευαστής
	Κωδικός παρτίδας		Μη αποστειρωμένο προϊόν

Σημείωση

Παρέχουμε πληροφορίες και συμβουλές στους πελάτες μας για τεχνολογικές εφαρμογές και κανονιστικά θέματα στο καλύτερο των γνώσεων και των δυνατοτήτων μας, αλλά χωρίς υποχρέωση ή ευθύνη. Οι ισχύοντες νόμοι και οι κανονισμοί θα πρέπει να τηρούνται σε όλες τις περιπτώσεις από τους πελάτες μας. Αυτό ισχύει επίσης όσον αφορά οποιαδήποτε δικαιώματα των τρίτων. Οι πληροφορίες και οι συμβουλές μας δεν απαλλάσσουν τους πελάτες μας της ευθύνης τους για τον έλεγχο της καταλληλότητας των προϊόντων μας για τον προβλεπόμενο σκοπό.

Συλλογή και διάθεση

Όλα τα δείγματα πρέπει να φέρουν σαφή σήμανση. Για τη λήψη και την προετοιμασία των δειγμάτων πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα όργανα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Ακολουθήστε τις προφυλάξεις για τη διάθεση των ειδών που έχουν μολυνθεί με δυνητικά μολυσματικό ή επικίνδυνο βιολογικό υλικό σύμφωνα με όλους τους ισχύοντες διεθνείς, κρατικούς και τοπικούς κανονισμούς.

Τεχνική υποστήριξη

Μπορείτε να επισκεφτείτε τη σελίδα τεχνικής υποστήριξης στον δικτυακό μας τόπο στο SigmaAldrich.com/techservice.

Κάθε σοβαρό συμβάν που σχετίζεται με αυτό το προϊόν θα πρέπει να αναφέρεται στον κατασκευαστή και στις αρμόδιες αρχές του κράτους όπου βρίσκεται η έδρα του χρήστη.

Τυπική εγγύηση

Η ισχύουσα εγγύηση για τα προϊόντα που αναγράφονται σε αυτή τη δημοσίευση ανευρίσκεται στη διεύθυνση SigmaAldrich.com/terms.

Inleiding

Centrifree®-hulpmiddelen scheiden snel en efficiënt ongebonden en eiwitgebonden opgeloste microstof in kleine volumes (0,15–1,0 mL) serum, plasma en andere biologische monsters met een methode die ultrafiltratie wordt genoemd. Nauwkeurige partitionering treedt binnen enkele minuten op zonder verdunning, verandering in fysiologisch pH, ionsamenstelling of concentratie van ongebonden opgeloste microstof. Deze hulpmiddelen bevatten laag-adsorptieve hydrofiele membranen en O-ringen zonder plastificeerders voor een excellente opbrengst. Laag volume is 10 µL of minder.

In tegenstelling tot dialyse, gelfiltratie of houtskooladsorptie biedt ultrafiltratie verbeterde nauwkeurigheid bij het meten van ongebonden ligandconcentratie, bindingscapaciteit of affiniteitconstanten. Het elimineert tijdrovende methoden, de noodzaak van gespecialiseerde apparatuur, verdunningsfouten en verschuivingen in het bindingsequilibrium.

Ultrafiltratie wijzigt de vrije-molecuul-ligandconcentratie van opgeloste microstoffen niet. Eiwit wordt selectief gepartitioneerd in een fractie van het monstervolume (het concentraat), terwijl ongebonden ligand in wezen ongehinderd door het membraan passeert met oplosmiddel.

De wetten van massa-actie en behoud van massa voor ideale eiwitbinding voorspellen dat de ongebonden ligandconcentratie in het ultraftraat constant blijft, mits de molaire bindingscapaciteit en affiniteit onafhankelijk zijn van de totale eiwitconcentratie. Deze voorspellingen worden ondersteund door resultaten voor verschillende systemen met een constante ongebonden ligandconcentratie in opeenvolgende ultraftraatfracties.

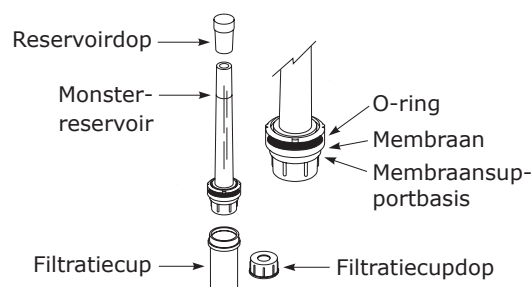
Veranderende ongebonden ligandconcentraties die niet veroorzaakt worden door membraanretentie of -adsorptie duiden op een veranderde capaciteit of affiniteit van bindende eiwitten als gevolg van aggregatie of andere niet-ideale eiwit-eiwitinteracties. Afhankelijk van de toepassing kan het resulterende ftraat kwantitatief of kwalitatief worden geanalyseerd op ongebonden ligandconcentratie.

Beoogd gebruik

Centrifree®-hulpmiddelen zijn niet-steriele, ultrafiltratiehulpmiddelen. Ze zijn bedoeld om ongebonden en eiwitgebonden opgeloste microstof te scheiden in kleine volumes (0,15–1,0 mL) van biologische monsters zoals serum, urine, cerebrospinale vloeistof en andere lichaamsvloeistoffen. Hulpmiddel voor eenmalig gebruik door laboratoriumanalist.

Centrifree®-hulpmiddelonderdelen

Het Centrifree® ultrafiltratiehulpmiddel biedt maximale efficiëntie voor meervoudige monsterverwerking. Elke eenheid bestaat uit een membraan en een permanent afgedichte O-ring tussen het monsterreservoir en de ondersteunende basis. Aan de basis bevindt zich een verwijderbare filtratiecup. Het Centrifree®-hulpmiddel is bedoeld voor eenmalig gebruik.



Geleverde materialen

De volgende onderdelen worden geleverd bij de Centrifree®-ultrafiltratiehulpmiddelen.

- 50 ultrafiltratiehulpmiddelen
- 50 reservoirdoppen
- 50 filtratiecups
- 50 filtratiecupdoppen

LET OP: De rode reservoirkapjes zijn bedoeld om verdamping van het monster en verandering van de pH-waarde door verlies van CO₂ te voorkomen.

Benodigde apparatuur

- Centrifuge met rotorinzet of dragers die geschikt zijn voor buizen van 17 × 100 mm, die kan draaien met 1000–2000 × g.

LET OP: Gebruik een centrifugerotor met vaste hoek voor optimale stroming van oplosmiddel.

- Pasteurpipet of pipet met vast volume voor aanbrengen van het monster.

Opslag en stabiliteit

Raadpleeg het productlabel voor opslagomstandigheden.

Richtlijnen voor gebruik

- Serum, plasma of andere biologische vloeistoffen kunnen worden gebruikt met Centrifree®-hulpmiddelen. Verwijder fibrine voor een efficiëntere stromingssnelheid door het monster te centrifugeren voordat het in het reservoir wordt geladen.
- Het aanbevolen monstervolume is 0,15-1,0 mL.
- Gebruik voor het beste resultaat een centrifuge met vaste hoek in plaats van een centrifuge met bucket en centrifugeer bij 1000-2000 × g.
LET OP: Gebruik niet bij een relatieve centrifugale kracht van meer dan 2000 × g.
- Voer voorbereidende ligandadsorptie- en eiwitretentiestudies uit om zeker te weten dat het systeem geschikt is voor de beoogde toepassing.
- Centricon®-hulpmiddelen zijn bedoeld voor gebruik met biologische vloeistoffen en waterige oplossingen. Gebruik hulpmiddelen niet samen met organische oplosmiddelen.
- Bepaal de juiste temperatuur voor uw toepassing. Behoud de gewenste temperatuur door een verwarmde centrifuge te gebruiken of door de centrifugerotor en -kamer voor te verwarmen. In een rotor met vaste hoek bereikt de inhoud van het hulpmiddel in 5-10 minuten een thermisch evenwicht met de rotor. Door de snelle ultrafiltratiesnelheid van Centrifree®-hulpmiddelen worden temperatureffecten op de ligandbinding geminimaliseerd.
- Gebruik niet voor concentreren en recovery van macromoleculen.
- Autoclaveer onderdelen niet.
- Gebruik Centrifree®-hulpmiddelen niet opnieuw.
- Laat het membraan in de ultrafiltratiehulpmiddelen niet uitdrogen als het nat is. Als u het hulpmiddel niet onmiddellijk na voorspoelen gebruikt, laat u vloeistof op het membraan totdat het hulpmiddel wordt gebruikt.
- Het Ultracel®-membraan in het hulpmiddel bevat sporen van glycerine (~ 2 µL). Als dit materiaal de analyse stoort, moet het hulpmiddel voorafgaand aan het gebruik worden gespoeld met gedeïoniseerd water of 0,1 N NaOH totdat er geen merkbare interferentie meer is. Gebruikt u 0,1 N NaOH om glycerine te verwijderen, spoel het hulpmiddel dan vóór gebruik grondig met gedeïoniseerd water of buffer. Centrifugeer minstens 15 minuten om zoveel mogelijk vloeistof te verwijderen. Gooi het eerste deel van het ultrafiltraat weg om verdunningsfouten als gevolg van ingesloten vloeistof (~ 10 µL) na het spoelen te voorkomen.

Aanwijzingen voor gebruik van Centrifree®-ultrafiltratiehulpmiddelen

Verwijder de rode reservoirkap voor gebruik van een Centrifree®-hulpmiddel.

1. Houd het reservoir onder een hoek van ongeveer 45°, waarbij de pipetpunt de wand van het reservoir raakt. Voeg de monsteroplossing in één gelijkmatige stroom toe om luchtinsluiting te voorkomen.



LET OP: Raak het membraan niet aan met de pipetpunt.

2. Sluit het monsterreservoir af en plaats het hulpmiddel vervolgens in een centrifugerotor met 17 × 100 mm-adapters. Bied tegengewicht met een gelijksoortig item.

LET OP: De rode reservoirkap mag niet meer dan 3-4 mm naar beneden uitsteken aan de bovenkant van het reservoir. Verdere compressie kan leiden tot prefiltratie, waardoor vervolgens analytische fouten kunnen ontstaan als het monster niet op de gewenste gebruikstemperatuur is.

LET OP: Controleer de vrije ruimte in de centrifuge voor gebruik.

3. Breng het hulpmiddel en het monster op de temperatuur die nodig is voor uw toepassing.
4. Centrifugeer het hulpmiddel bij 1000-2000 × g gedurende de tijd die nodig is om het gewenste filtraatvolume te verkrijgen. Zie het hoofdstuk "Ultrafiltratiesnelheid" voor richtlijnen over centrifugeertijden.
5. Haal het hulpmiddel voorzichtig uit de centrifugerotor en maak de filtratiecup met het ultrafiltraat los. Dek de filtratiecup af met de bijgeleverde dop totdat het ultrafiltraat kan worden geanalyseerd.

WAARSCHUWING: Volg bij het afvoeren na gebruik de voorzorgsmaatregelen voor het afvoeren van onderdelen die vervuild zijn met mogelijk besmettelijk of gevaarlijk biologisch materiaal.

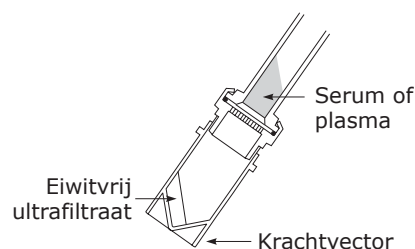
LET OP: Het filter werkt mogelijk niet goed als het na het natmaken uitdroogt.

Prestatie

In de volgende hoofdstukken komen verschillende prestatiekenmerken aan bod, onder andere polarisatiecontrole, ultrafiltratiesnelheid, membraanprestaties, pH-controle en niet-specifieke adsorptie.

Polarisatiecontrole

Het gebruik van een rotor met vaste hoek biedt polarisatiecontrole en geeft een zo klein mogelijke kans op artefacten als gevolg van eiwit-eiwitinteracties. Door de hoek wordt verstopping van het membraanoppervlak door vastgehouden eiwit tegengegaan. Deze laag glijdt door zijn hoge dichtheid naar buiten, waar hij zich ophoopt aan de rand van het membraan. In een bucketrotor wordt de polarisatielaag over het gehele membraanoppervlak samengedrukt, waardoor de stroming van het oplosmiddel wordt beperkt.



Ultrafiltratiesnelheid

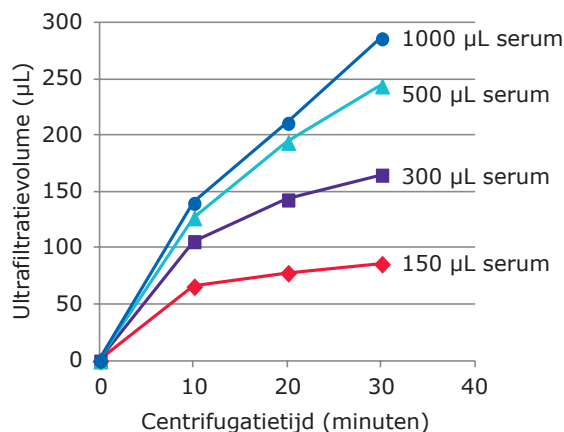
De stromingssnelheid hangt af van de eiwitconcentratie van het monster, het startvolume, de relatieve centrifugale kracht (RCF), het type rotor en de temperatuur. Een hoge stromingssnelheid is het resultaat van een zo groot mogelijk membraanoppervlak, polarisatiecontrole en een optimale druk op het membraan, die wordt bereikt bij monstervolumes van meer dan 300 µL. Een optimale filtratiesnelheid wordt bereikt bij 1000–2000 × g. Een grotere centrifugale kracht levert geen significant hogere stroming op en wordt niet aanbevolen.

Vergelijking van rotoren met vaste hoek vs. bucket-centrifugerotoren

Rotor	RCF (× g)	Typisch ultrafiltratievolume (µL)
Met vaste hoek (33°)	1000	140–150
Bucket	1000	115–120

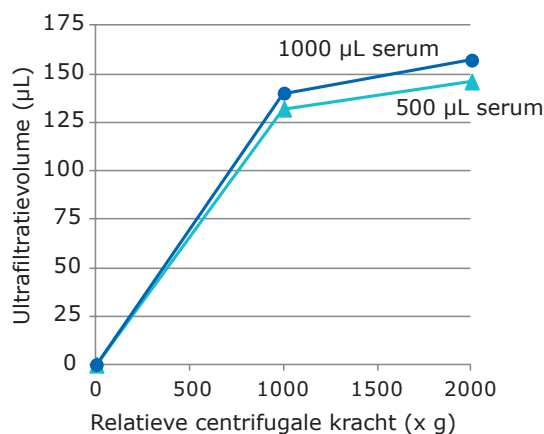
1 mL normaal humaan serum, centrifugeertijd 10 minuten

Typische ultrafiltratiesnelheid



Voorwaarden: 33° rotor met vaste hoek, 25 °C, 1000 × g

Effect van relatieve centrifugale kracht



Voorwaarden: 33° rotor met vaste hoek, 25 °C, 10 minuten centrifugeren

Membraanprestatie

De hoge selectieve permeabiliteit van het anisotrope, hydrofiele Ultracel®-ultrafiltratiemembraan is te danken aan de smalle poriegrootteverdeling. Centrifree®-hulpmiddelen houden 99,9% van de serumeiwitten en < 5% L-thyroxine (0,1 mg/mL in 0,1 N NaOH) vast.

De vereiste eiwitretentie voor elke toepassing is afhankelijk van de mate van ligandbinding. Bij een ligand dat voor 90% gebonden is, zou 1% serumeiwitlekage resulteren in een overschatting van 9% van de ongebonden ligandconcentratie. Voor de meting van vrij thyroxine (> 99,95% gebonden) in onverdund serum is een eiwitretentie van > 99,995% vereist voor een fout van < 10%. Centrifree®-hulpmiddelen kunnen worden gebruikt voor de scheiding van liganden die voor maximaal 99% gebonden zijn.

Soms kan er serumlekage optreden als gevolg van een defect in het membraan of een mechanisch defect. Bij meer dan 20% lekkage zal het ultrafiltraat geel kleuren. Voor bepaling van lekkage van minder dan 20% moet de eiwitconcentratie in het ultrafiltraat worden gemeten met een gevoelige micro-eiwitbepaling. Als u een grotere betrouwbaarheid nodig hebt maar routine-eiwitbepaling wilt vermijden, gebruik dan een tweede filterhulpmiddel voor het monster.

pH-controle

Stel bij elk ligandbindend systeem de aanvaardbare grens voor pH-variatie vast. Experimenteel kan de pH van het monster worden gecontroleerd door anaerobe monsterbehandeling en -overbrenging, door gasbehandeling van het monster met 5% CO₂ en 95% O₂ of door toevoeging van een klein volume geconcentreerde buffer, op voorwaarde dat het bufferion geen invloed heeft op de ligandbindingsevenwichten.

Aspecifieke adsorptie

Adsorptieverliezen hangen af van de ligandconcentratie, de ionische en hydrofobe aard van het ligand, de temperatuur en de contacttijd met de componentoppervlakken, en de monstermatrix. De recovery van ligand dat aan eiwitvrij serumultrafiltraat is toegevoegd, is in het algemeen hoger dan van buffer en voorspelt beter het gedrag met volledig serum. Laagmoleculaire ongebonden vetzuren en aminozuren in eiwitvrij ultrafiltraat hebben een wisselwerking met componentoppervlakken en passiveren die, terwijl serumeiwitten in het algemeen oppervlakken passiveren die in aanraking komen met volledig serum. Een geringe recovery uit eiwitvrij ultrafiltraat of buffer kan duiden op adsorptieverliezen en/of membraanretentie van ligand. Ligandrecovery in Centrifree®-hulpmiddelen is het nauwkeurigst in aanwezigheid van bindend eiwit en concurrerende opgeloste microstoffen.

Specificaties

Maximaal monstervolume	1,0 mL
Minimaal monstervolume	0,15 mL
Maximale relatieve centrifugale kracht	2000 × g
Actief membraanoppervlak	0,92 cm ²
Vastgehouden volume (membraan en basis)	10 µL
Afmetingen	
Lengte van hulpmiddel met filtratiecup en dop	95 mm
Diameter	16 mm
Constructiematerialen	
Membraan	Ultracel® geregeneerde cellulose
Monsterreservoir	Polycarbonaat
Membraansupportbasis	Polycarbonaat
Filtratiecup	Polyethyleen
Filtratiecupdop	Polyethyleen
O-ring	Ethyleenpropyleendieenmonomeer (EPDM)

LET OP: Centrifree®-onderdelen zijn niet autoclaveerbaar. Niet gebruiken samen met organische oplosmiddelen.

Chemische compatibiliteit

Centricon®-hulpmiddelen zijn bedoeld voor gebruik met biologische vloeistoffen en waterige oplossingen. Controleer voor gebruik het monster op chemische compatibiliteit met het hulpmiddel. Ga naar [SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility](https://www.sigmaaldrich.com/FilterChemicalCompatibility) voor meer informatie.

Bestellen product

Koop producten online via SigmaAldrich.com.

Betekenis symbolen

Symbol	Definitie	Symbol	Definitie
	Catalogusnummer		Fabricagedatum
	Niet voor hergebruik		Fabrikant
	Batchcode		Niet-steriel product

Kennisgeving

Wij bieden naar ons beste weten en vermogen informatie en advies aan onze klanten over applicatietechnologieën en bepalingen, echter zonder enige verplichting of aansprakelijkheid. Bestaande wet- en regelgeving dient in alle gevallen door onze klanten te worden nageleefd. Dit is tevens van toepassing wat betreft eventuele rechten van derde partijen. Onze informatie en adviezen ontheffen klanten niet van hun eigen verantwoordelijkheid om de geschiktheid van onze producten voor het beoogde doel te controleren.

Inzameling en afvoer

Alle monsters moeten duidelijk worden geëtiketteerd. Voor het verkrijgen en prepareren van monsters dienen daarvoor geschikte instrumenten worden gebruikt.

LET OP: Volg de aanwijzingen voor het afvoeren van items die verontreinigd zijn met mogelijk infectieuze of gevaarlijke biologisch materiaal volgens alle toepasselijke internationale, federale, provinciale en plaatselijke regelgeving.

Technische assistentie

Bezoek de techservicepagina op onze website op SigmaAldrich.com/techservice.

Elk ernstig incident met dit hulpmiddel dient gemeld te worden aan de fabrikant en de bevoegde instantie van het land waar de gebruiker is gevestigd.

Standaardgarantie

De toepasselijke garantie voor de producten die in deze publicatie worden genoemd vindt u op SigmaAldrich.com/terms.

Introduktion

Centrifree® anordninger adskiller hurtigt og effektivt bundne mikropartikler, der er fri for protein, i små mængder (0,15–1,0 mL) serum, plasma og andre biologiske prøver ved brug af en metode, der kaldes ultrafiltrering. Der finder nøjagtig adskillelse sted på få minutter uden fortynding, ændring i den fysiologiske pH-værdi, ionsammensætningen eller koncentrationen af ubundne mikropartikler. Disse anordninger indeholder hydrofile membraner med lav adsorption og o-ringe uden blødgøringsmidler for at sikre fremragende genvinding. Den tilbageholdte volumen er 10 µL eller derunder.

I modsætning til dialyse, gelfiltrering eller kuladsorption giver ultrafiltrering forbedret nøjagtighed ved måling af fri ligandkoncentration, bindeevne eller konstante affinitetsværdier. Den fjerner behovet for tidskrævende metoder og specialudstyr, og den forebygger fortyndingsfejl og skift i bindeevnens balance.

Ultrafiltrering ændrer ikke ligandkoncentrationen i de fri mikropartikler. Protein partitioneres selektivt til en fraktion af prøvevolumenen (koncentratet), og frit ligand passerer næsten uhindret igennem membranen sammen med opløsningsmidlet.

I henhold til principperne om masseaktivitet og massekonservering for ideel proteinbinding vil den frie ligandkoncentration i ultrafiltratet forblive konstant, under forudsætning af at molekylebindingsevnen og affiniteten er uafhængige af den samlede proteinkoncentration. Resultater fra flere systemer, der påviser en konstant fri ligandkoncentration i på hinanden følgende ultrafiltratfraktioner, understøtter dette udsagn.

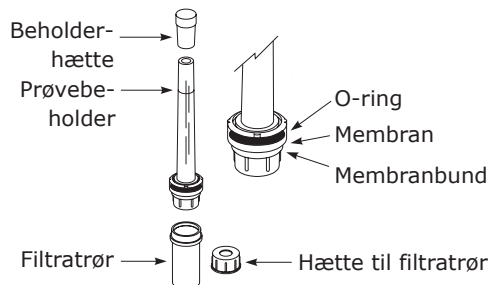
Variationer i den frie ligandkoncentration, som ikke skyldes membranretention eller -adsorption, er tegn på en ændret kapacitet eller affinitet for proteinbinding på grund af akkumulering eller andre ikke-ideelle protein-protein-interaktioner. Afhængigt af anvendelsen kan du analysere det endelige filtrat for fri ligandkoncentration enten kvantitativt eller kvalitativt.

Tilsigtet brug

Centrifree® enheder er ikke-sterile ultrafiltreringsenheder til engangsbrug, der er beregnet til at adskille bundne mikropartikler, der er fri for protein, i små mængder (0,15–1,0 mL) fra biologiske prøver, f.eks. serum, urin, cerebrospinalvæske og andre kropsvæsker. Udstyr til engangsbrug, som er beregnet til at blive anvendt af faguddannet laboratoriepersonale.

Centrifree® anordningens komponenter

Centrifree® ultrafiltreringsanordningen giver maksimal effektivitet ved behandling af flere prøver. Hver enhed består af en membran og en o-ring, som er forseglet permanent mellem prøvebeholderen og støttedelen. Et aftageligt filtratrør er fastgjort på bunden. Centrifree® anordningen er kun beregnet til engangsbrug.



Medfølgende materialer

Følgende komponenter leveres med Centrifree® ultrafiltreringsanordninger.

- 50 ultrafiltreringsanordninger
- 50 beholderhætter
- 50 filtratrør
- 50 hætter til filtratrør

BEMÆRK: De røde beholderhætter medfølger til forebyggelse af fordampning af prøverne og ændringer af pH-værdien på grund af tab af CO₂.

Påkrævet udstyr

- Centrifuge med rotoradapter eller -holdere med kapacitet til rør på 17 × 100 mm og en ydeevne på 1.000–2.000 × g.

BEMÆRK: Brug en vinkelrotor for at opnå optimal gennemstrømning af opløsningsmidlet.

- Pasteurpipette eller pipette med fast volumen til prøvetilsætning.

Opbevaring og stabilitet

Se produktmærkningen vedrørende opbevaringsforhold.

Brugsanvisning

- Serum, plasma eller andre biologiske væsker kan anvendes med Centrifree® anordninger. Fjern fibrin ved centrifugering af prøven, inden den tilsættes beholderen, for at opnå mere effektive flowhastigheder.
- Den anbefalede prøvevolumen er 0,15-1,0 mL.
- Brug en vinkelrotor i stedet for en udsvingsrotor, og centrifuger ved $1.000-2.000 \times g$, for at opnå de bedste resultater.

FORSIGTIG: Anvend ikke en relativ centrifugalkraft på over $2.000 \times g$.

- Udfør indledende ligandadsorptions- og proteinretentionsundersøgelser for at sikre, at systemet egner sig til den tilsigtede anvendelse.
- Centrifree® ultrafiltreringsanordninger er beregnede til at blive anvendt med biologiske væsker og vandige opløsninger. Anordningerne må ikke anvendes med organiske opløsningsmidler.
- Fastslå den korrekte temperatur til den pågældende anvendelse. Oprethold den ønskede temperatur ved brug af en opvarmet centrifuge eller ved at forvarme centrifugens rotor og kammer. I en vinkelrotor når anordningens indhold termisk ligevægt med rotoren efter 5-10 minutter. Den hurtige ultrafiltreringshastighed, som opnås med Centrifree® anordninger, mindsker effekten af temperaturen på ligandbinding.
- Må ikke bruges til koncentration og genvinding af makromolekyler.
- Komponenterne må ikke autoklaveres.
- Centrifree® anordninger må ikke genanvendes.
- Membranen i ultrafiltreringsanordningerne må ikke tørre ud, efter de er blevet vædet. Hvis anordningen ikke anvendes umiddelbart efter skylning, skal der blive væske tilbage på membranen, indtil anordningen skal anvendes.
- Ultracel® membranen i anordningen indeholder spor af glycerin ($\sim 2 \mu\text{L}$). Hvis dette stof forårsager interferens i forbindelse med analysen, skal anordningen skylles med demineraliseret vand eller 0,1 N NaOH, indtil der ikke længere observeres nogen interferens. Hvis der anvendes 0,1 N NaOH til fjernelse af glycerin, skal anordningen skylles grundigt med demineraliseret vand eller buffer før brug. Centrifuger i mindst 15 minutter for at fjerne så meget væske som muligt. For at undgå fortyndingsfejl på grund af tilbageværende væske ($\sim 10 \mu\text{L}$) efter skyllingen, skal det første alikvot af ultrafiltratet bortskaffes.

Sådan anvendes Centrifree® ultrafiltreringsanordninger

Tag den røde hætte af beholderen, inden Centrifree® anordningen tages i brug.

1. Hold beholderen i en vinkel på ca. 45° . Pipettens spids skal berøre siden af beholderen. Tilsæt prøveopløsningen i en jævn strøm for at undgå indtrængning af luft.



BEMÆRK: Undgå at berøre membranen med pipettens spids.

2. Sæt hættten på prøvebeholderen, og anbring derefter anordningen i en centrifugerotor med adaptere på $17 \times 100 \text{ mm}$. Dan modvægt i centrifugen med en tilsvarende anordning.

BEMÆRK: Beholderens røde hætte må ikke rage mere end 3-4 mm ned over toppen af beholderen. Yderligere komprimering kan forårsage præfiltrering, hvilket kan medføre analysefejl, hvis prøven ikke har den ønskede driftstemperatur.

BEMÆRK: Kontrollér frirummet i centrifugen før brug.

3. Bring anordningen og prøven op på den samme temperatur, som er påkrævet til anvendelsen.
4. Centrifuger ved $1.000-2.000 \times g$ i den påkrævede tid for at opnå den ønskede filtratvolumen. Retningslinjer for centrifugeringstiden kan findes i afsnittet "Ultrafiltreringshastighed".
5. Tag forsigtigt anordningen ud af centrifugerotoren, og frakobl filtratrøret med ultrafiltratet. Luk filtratrøret med den medfølgende hætte, indtil ultrafiltratet kan analyseres.

ADVARSEL: Sørg ved bortskaffelse af brugte komponenter for at følge forholdsreglerne for bortskaffelse af genstande, der er kontamineret med potentielt smittefarligt eller farligt biologisk materiale.

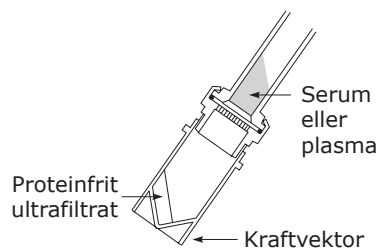
BEMÆRK: Filteret fungerer muligvis ikke efter hensigten, hvis det tørrer ud, efter det er blevet vædet.

Ydelse

De følgende afsnit indeholder en beskrivelse af forskellige ydeevnekaraktistika, herunder polariseringskontrol, ultrafiltreringshastighed, membranydelse, pH-kontrol og uspecifik adsorption.

Polariseringskontrol

Brug af en vinkelrotor giver polariseringskontrol og mindsker potentialet for artefakter på grund af protein-protein-interaktioner. Vinklen modvirker opbygning af tilbageholdt protein på membranoverfladen, fordi dette tykke lag glider udad og samles ved kanten af membranen. I en udsvingsrotor komprimeres polariseringslaget over hele membranoverfladen, hvilket begrænser gennemstrømningen af opløsningsmiddel.



Ultrafiltreringshastighed

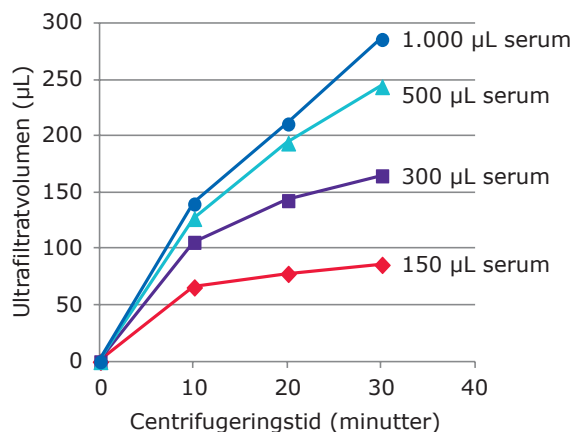
Flowhastigheden afhænger af proteinkoncentrationen i prøven, startvolumen, relativ centrifugalkraft (RCF), rotortype og temperatur. Høje flowhastigheder er resultatet af maksimalt membranoverfladeareal, polariseringskontrol og optimalt transmembrantryk, som opnås med prøvevolumener på over 300 µL. Optimale filtreringshastigheder opnås ved 1.000-2.000 × g. En højere centrifugalkraft øger ikke flowhastigheden betydeligt og anbefales ikke.

Sammenligning af vinkelrotorer og udsvingsrotorer

Rotor	RCF (× g)	Typisk ultrafiltratvolumen (µL)
Vinkelrotor (33°)	1.000	140-150
Udsvingsrotor	1.000	115-120

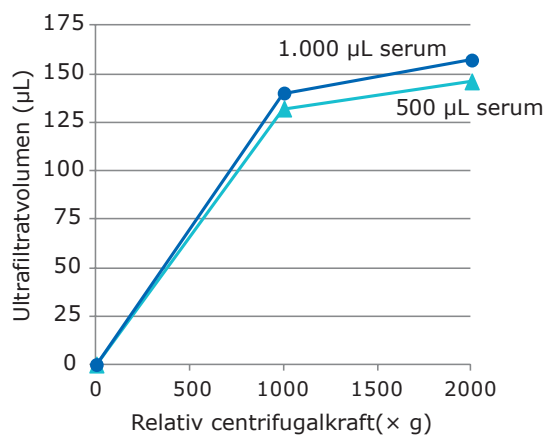
1 mL normalt humant serum, centrifugering i 10 minutter

Typiske ultrafiltreringshastigheder



Betingelser: 33° vinkelrotor, 25 °C, 1.000 × g

Virkning af relativ centrifugalkraft



Betingelser: 33° vinkelrotor, 25 °C, centrifugering i 10 minutter

Membranydelse

Den høje selektive gennemtrængelighed af den anisotrope, hydrofile Ultracel® ultrafiltreringsmembran skyldes den tætte porespredning. Centrifree® anordninger tilbageholder 99,9% serumprotein og < 5% L-thyroxin (0,1 mg/mL i 0,1 N NaOH).

Proteinretentionkrav for hver anvendelse afhænger af graden af ligandbinding. For en ligand, som er 90% bundet, resulterer 1% serumproteinlækage i en overvurdering af den frie ligandkoncentration på 9%. Ved måling af fri thyroxin (> 99,95% bundet) i ufortyndet serum er proteinretention på > 99,995% påkrævet for < 10% fejl. Centrifree® anordninger anbefales til adskillelse af ligander, som er bundet op til 99%.

Lejlighedsvist kan der forekomme serumlækage på grund af en defekt i membranen eller en mekanisk defekt. Hvis lækagen er større end 20%, farves ultrafiltratet gult. Bestemmelse af en lækage på under 20% kræver måling af proteinkoncentrationen i ultrafiltratet med en følsom mikroproteinanalyse. Hvis du har brug for en større pålidelighed, men ønsker at undgå rutinemæssig proteinanalyse, skal prøven filtreres på to anordninger.

pH-kontrol

Fastslå den acceptable grænse for pH-variation for hvert ligandbindende system. Forsøgsvist kan prøvens pH-værdi kontrolleres ved anaerob prøvehåndtering og -overførsel, gasning af prøven med 5% CO₂, 95% O₂ eller tilsætning af en lille mængde koncentreret buffer, hvis bufferens ion ikke ændrer ligevægten med henblik på ligandbindingen.

Uspecifik adsorption

Adsorptionstab afhænger af ligandkoncentrationen, dens ioniske og hydrofobe sammensætning, temperaturen og kontakttiden på komponentoverfladerne samt prøvematrixen. Genvinding af ligand, som er blevet tilsat til proteinfrit serumultrafiltrat er normalt større end fra buffer og mere forudsigeligt med henblik på fuldt serums adfærd. Lav molekylvægt, frie fedtsyrer og aminosyrer i proteinfrit ultrafiltrat interagerer med og passiverer komponentoverflader, og serumproteiner passiverer normalt overflader, som fuldt serum kommer i berøring med. Lav genvinding fra enten proteinfrit ultrafiltrat eller buffer kan være tegn på adsorptionstab og/eller membranretention af ligand. Ligandgenvinding i Centrifree® anordninger er mest nøjagtig ved tilstedeværelse af bindende protein og konkurrerende mikropartikler.

Specifikationer

Maksimal prøvevolumen	1,0 mL
Minimal prøvevolumen	0,15 mL
Maksimal relativ centrifugalkraft	2.000 × g
Aktivt membranareal	0,92 cm ²
Tilbageholdt volumen (membran og bund)	10 µL
Dimensioner	
Længde på anordning med hætte og filtratrør	95 mm
Diameter	16 mm
Fremstillingsmaterialer	
Membran	Ultracel® regenereret cellulose
Prøvebeholder	Polycarbonat
Membranbund	Polycarbonat
Filtratrør	Polyethylen
Hætte til filtratrør	Polyethylen
O-ring	Ethylenpropylenmonomer (EPDM)

FORSIGTIG: Centrifree® komponenterne kan ikke autoklaveres. Må ikke anvendes med organiske opløsningsmidler.

Kemisk kompatibilitet

Centricon® anordninger er beregnede til at blive anvendt med biologiske væsker og vandige opløsninger. Inden brug skal det kontrolleres, at prøven er kemisk kompatibel med anordningen. Gå til SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility for nærmere.

Produktbestilling

Produkter kan bestilles på internettet på SigmaAldrich.com.

Symbolforklaring

Symbol	Definition	Symbol	Definition
	Katalognummer		Fremstillingsdato
	Må ikke genbruges		Producent
	Batchkode		Ikke-sterilt produkt

Bemærkning

Vi informerer og rådgiver vores kunder om applikationsteknologi og juridiske forhold efter bedste viden og evne, men uden forpligtelse eller ansvar. Vores kunder skal under alle omstændigheder overholde de gældende love og bestemmelser. Dette gælder også med henblik på eventuelle tredjeparter. Oplysninger og rådgivning fra os fratager ikke kunderne deres ansvar for at kontrollere, at vores produkter egner sig til det tilsigtede formål.

Prøveudtagning og bortskaffelse

Alle prøver skal forsynes med tydelige etiketter. Der skal anvendes egnede instrumenter til udtagning og klargøring af prøverne.

BEMÆRK: Følg forholdsreglerne for bortskaffelse af genstande, der er forurenet med potentielt smittefarlige eller farlige biologiske materialer i henhold til alle gældende internationale, nationale og lokale bestemmelser.

Teknisk assistance

Tag et kig på siden med teknisk service på vores websted på adressen SigmaAldrich.com/techservice.

Alle alvorlige hændelser med tilknytning til denne anordning skal indberettes til producenten og den kompetente myndighed i det land, hvor brugeren er registreret.

Standardgaranti

Den gældende garanti for de produkter, der er anført i dette dokument, kan findes på adressen SigmaAldrich.com/terms.

Introduktion

Genom en metod som kallas ultrafiltrering kan Centrifree®-enheterna snabbt och effektivt separera fria från proteinbundna lågmolekylära ämnen i små volymer (0,15–1,0 mL) av serum, plasma och andra biologiska prover. En tillförlitlig separation uppnås inom några minuter utan någon spädning eller förändring av koncentrationen av de obundna lågmolekylära ämnena, fysiologiskt pH eller jonsammansättning. Enheterna innehåller lågadsorberande hydrofila membran och O-ringar utan mjukgörare för att säkerställa ett utmärkt utbyte. Stoppvolymen är 10 µL eller mindre.

Till skillnad från dialys, gelfiltrering och koladsorption ger ultrafiltrering en förbättrad noggrannhet när man mäter koncentrationen av fri ligand, bindningskapacitet eller affinitetskonstanter. Det eliminerar tidskrävande metoder, krav på specialiserade instrument, spädningsfel och förskjutning av bindningsjämvikten.

Ultrafiltrering förändrar inte koncentrationen av lågmolekylär fri ligand. Proteiner fördelas selektivt till en fraktion av provvolymen (koncentratet), medan fri ligand passerar i stort sett obehindrat genom membranet tillsammans med lösningsmedlet.

Vid perfekt proteinbindning kommer, enligt massverkans lag och lagen om massans bevarande, koncentrationen av fri ligand förbli konstant i ultrafiltratet förutsatt att den molära bindningskapaciteten och affiniteten är oberoende av den totala proteinkoncentrationen. Denna uppfattning stöds av resultat från ett flertal system där successiva ultrafiltratsfraktioner har en konstant koncentration av fri ligand.

En förändring av koncentrationen av fri ligand, som inte orsakats av membranets retention eller adsorption, visar på förändrad kapacitet eller affinitet för bindningsproteinerna p.g.a. aggregation eller icke-önskade protein-proteininteraktioner. Beroende på tillämpningen kan du av det resulterande filtratet göra en kvantitativ eller kvalitativ analys för att mäta koncentrationen av fri ligand.

Avsedd användning

Centrifree®-enheterna är icke-sterila ultrafiltreringsenheter för engångsbruk som används för att separera fria från proteinbundna lågmolekylära ämnen i små volymer (0,15–1,0 mL) av biologiska prover såsom serum, urin cerebrospinalvätska och andra kroppsvätskor. Enheten är avsedd för engångsbruk och för användning av laboratoriepersonal.

Centrifree®-komponenter

Ultrafiltreringsenheten Centrifree® ger maximal effektivitet när många prover ska behandlas samtidigt. Varje enhet består av ett membran och en O-ring som sitter fast mellan provkärlet och stöddelen. En avtagbar filtratbehållare sätts fast på stöddelen. Centrifree®-enheten är endast avsedd för engångsbruk.

Tillhandahållet materiel

Följande komponenter levereras tillsammans med ultrafiltreringsenheterna Centrifree®.

- 50 ultrafiltreringsenheter
- 50 lock till provkärlet
- 50 filtratbehållare
- 50 lock till filtratbehållare

OBS: De röda locken för provkärlet tillhandahålls för att förhindra provavdunstning och pH-förändring p.g.a. CO₂-förlust.

Nödvändig utrustning

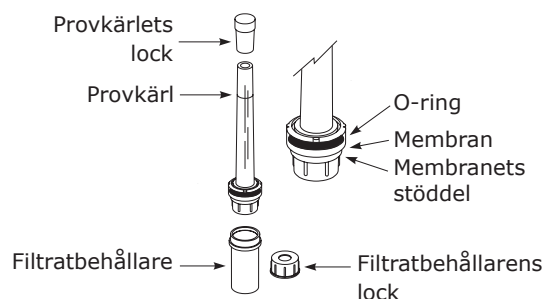
- Centrifug med rotoradapter eller hållare som rymmer 17 × 100 mm-rör och har en kapacitet på 1 000–2 000 × g.

OBS: För optimalt flöde av lösningsmedlet, använd en centrifug rotor med fast vinkel.

- Pasteurpipett eller pipett med fast volym för att tillsätta prover.

Förvaring och stabilitet

Se produktmärkningen för förvaringsförhållanden.



Riktlinjer för användning

- Serum, plasma eller andra biologiska vätskor kan användas med Centrifree®-enheter. För effektivare flödes hastighet, avlägsna fibrin genom att centrifugera provet innan du håller det i provkärlet.
- Den rekommenderade provvolymen är 0,15–1,0 mL.
- Använd en rotor med fast vinkel snarare än en "swinging-bucket"-centrifug rotor för bästa resultat och centrifugera vid 1 000–2 000 × g.

FÖRSIKTIGHET: Använd inte en relativ centrifugalkraft på över 2 000 × g.

- Gör preliminära studier av ligandadsorption och proteinretention för att säkerställa att systemet passar din tillämpning.
- Ultrafiltreringsenheterna Centrifree® är avsedda att användas för biologiska vätskor och vattenlösningar. Enheterna får inte användas med organiska lösningsmedel.
- Bestäm lämplig temperatur för din tillämpning. Upprätthåll den önskade temperaturen med en värmecentrifug eller genom att förvärma centrifugkammaren och rotorn. I en rotor med fast vinkel når enhetens innehåll värmejämvikt med rotorn inom 5–10 minuter. Tack vare att ultrafiltreringen kan göras snabbt med Centrifree®-enheterna minimeras temperaturens effekt på ligandbindning.
- Får inte användas för att koncentrera eller återvinna makromolekyler.
- Komponenterna får inte autoklaveras.
- Centrifree®-enheterna får inte återanvändas.
- Låt inte membranet i ultrafiltreringsenheterna torka ut efter att det har vätsats. Om du inte tänker använda enheten direkt efter sköljningen, lämna vätska på membranet tills enheten ska användas.
- Ultracel®-membranet i enheten innehåller spårmängder av glycerin (~ 2 µL). Om detta ämne interfererar med analysen, skölj enheten med avjoniserat vatten eller 0,1 N NaOH tills det inte längre finns någon interferens. Om 0,1 N NaOH används för att tvätta bort glycerin, skölj enheten noggrant med avjoniserat vatten eller buffert före användning. Centrifugera i minst 15 minuter för att avlägsna så mycket vätska som möjligt. För att undvika spädningssfel p.g.a. att vätska har fastnat (~ 10 µL) efter sköljningen, släng den första alikvoten av ultrafiltratet.

Hur ultrafiltreringsenheterna Centrifree® ska användas

Innan du använder en Centrifree®-enhet ska du avlägsna det röda locket på provkärlet.

1. Håll provkärlet i en vinkel på ungefär 45° med pipettspetsen mot provkärlets vägg. Pipettera provlösningen i ett jämnt flöde för att undvika luftbubblor.

OBS: Undvik att röra vid membranet med pipettspetsen.

2. Sätt på locket på provkärlet och sätt ned enheten i en centrifug rotor med 17 × 100 mm adaptrar. Sätt ned en liknande enhet som motvikt för att balansera centrifugen.

OBS: Provkärlets röda lock får inte täcka mer än 3–4 mm av provkärlets övre kant. Om locket trycks ned ytterligare kan detta orsaka förfiltrering, vilket kan leda till analysfel om provet inte har rätt temperatur.

OBS: Kontrollera centrifugen för lämplig frigång innan den används.

3. Se till att både enheten och provet når den temperatur som krävs för din tillämpning.
4. Centrifugera enheten vid 1 000–2 000 × g tills du fått ut önskad filtratvolym. För riktlinjer om centrifugeringstid, se avsnitt "Ultrafiltreringshastighet".
5. Ta försiktigt ut enheten ur centrifug rotorn och frigör filtratbehållaren som innehåller ultrafiltratet. Sätt på locket på filtratbehållaren tills ultrafiltratet ska analyseras.

VARNING: Vid kassering av använda komponenter, följ försiktighetsåtgärderna för kassering av föremål som kontaminerats med potentiellt smittförande och farliga biologiska ämnen.

OBS: Filtret kanske inte fungerar som det ska om det torkar ut före vätningen.

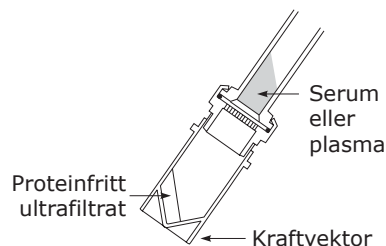


Prestanda

Följande avsnitt beskriver olika prestandaegenskaper som polariseringskontroll, ultrafiltreringshastighet, membranets prestanda, pH-kontroll och icke-specifik adsorption.

Polariseringskontroll

Användning av en rotor med fast vinkel möjliggör polariseringskontroll och minimerar risken för artefakter orsakade av protein-proteininteraktioner. Vinkeln motverkar ansamling av protein på membranytan eftersom dess täta skikt glider utåt, sidledes och ackumuleras vid membranets kant. I en "swinging-bucket"-rotor kompakteras polariseringsskiktet över hela membranytan och begränsar därmed lösningsmedlets flöde.



Ultrafiltreringshastighet

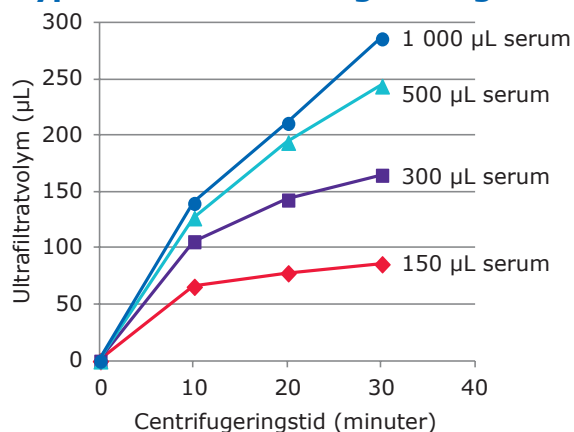
Flödes hastigheten beror på provets proteinkoncentration, startvolym, relativ centrifugalkraft (RCF), rotortyp och temperatur. Höga flödes hastigheter fås vid maximal membranyta, polariseringskontroll och optimalt transmembrant tryck, vilket uppnås genom att använda provvolym på över 300 µL. Optimala filtrerings hastigheter uppnås vid 1 000–2 000 × g. Större centrifugalkraft ger ingen signifikant ökning av flödes hastigheten och rekommenderas inte.

Jämförelse mellan centrifugrotorer med fast vinkel och "swinging-bucket"

Rotor	RCF (× g)	Typisk ultrafiltratvolym (µL)
Fast vinkel (33°)	1 000	140–150
"Swinging bucket"	1 000	115–120

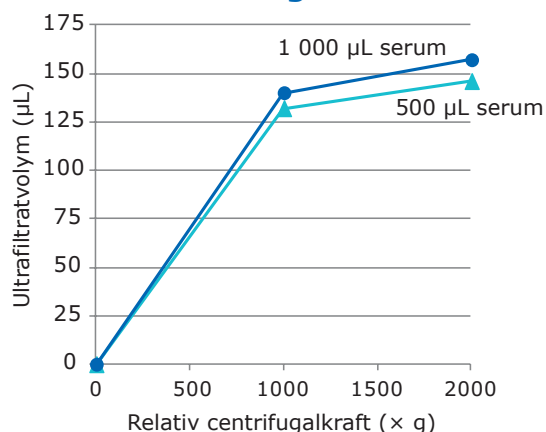
1 mL normalt humant serum, 10 minuters centrifugering

Typiska ultrafiltreringshastigheter



Förhållanden: Rotor med 33° fast vinkel, 25 °C, 1 000×g

Relativa centrifugalkraftens effekt



Förhållanden: Rotor med 33° fast vinkel, 25 °C, 10 minuters centrifugering

Membranets prestanda

Tack vare låg spridning i porstorlek har det anisotropa, hydrofila ultrafiltreringsmembranet Ultracel® en högselektiv permeabilitet. Vanligtvis ger Centrifree®-enheterna en retention av 99,9% serumprotein och < 5% L-tyroxin (0,1 mg/mL i 0,1 N NaOH).

Beroende på graden av ligandbindning förändras kraven för proteinretention i varje tillämpning. För en ligand som är bunden till 90% skulle 1% läckage av serumprotein resultera i en 9% överskattning av koncentrationen av fri ligand. För att mäta fritt tyroxin (> 99,95% bundet) i ospätt serum krävs en proteinretention på > 99,995% för < 10% fel. Centrifree®-enheter rekommenderas för separation av ligander som är bundna upp till 99%.

Emellanåt kan serum läcka igenom om membranet är defekt eller om det föreligger en mekanisk defekt. Om läckaget är större än 20% blir filtratet guldfärgat. För att påvisa läckage på mindre än 20% måste proteinkoncentrationen i ultrafiltratet bestämmas med en känslig analys för lågmolekylära proteiner. Om du behöver en större tillförlitlighet men vill undvika rutinmässiga proteinanalyser, filtrera provet i två enheter.

pH-kontroll

Fastställ en acceptabel gräns för pH-variation i varje system med ligandbindning. Provets pH kan kontrolleras experimentellt genom anaerob hantering och överföring av provet genom att gasa provet med 5% CO₂, 95% O₂ eller genom att tillsätta en liten volym koncentrerad buffert, förutsatt att buffertjonerna inte påverkar jämvikten för ligandbindningen.

Icke-specifik adsorption

Förluster som orsakas av adsorption beror på ligandens koncentration, dess joniska och hydrofoba egenskaper, temperaturen och hur lång tid den har varit i kontakt med komponentytorna och provets matris. Det är vanligtvis ett bättre utbyte för ligander som tillsätts till ett proteinfritt serum än om det renas fram ur en buffert. Utbytet är dessutom mer förutsägbart i helserum. Lågmolekylära, fria fett- och aminosyror i proteinfria ultrafiltrat interagerar med och passiviserar komponentytorna, medan ytor som kommit i kontakt med helserum generellt sett passiviserar av serumproteiner. Lågt utbyte från antingen proteinfria ultrafiltrat eller buffertar kan vara ett tecken på förlust genom adsorption och/eller retention av liganden i membranet. Med Centrifree®-enheter fås det bästa ligandutbytet i närvaro av bindande proteiner och konkurrerande lågmolekylära ämnen.

Specifikationer

Största provvolym	1,0 mL
Minsta provvolym	0,15 mL
Maximal relativ centrifugalkraft	2 000 × g
Aktiv membranyta	0,92 cm ²
Stoppvolym (membran och stöd)	10 µL
Dimensioner	
Längd på enheten med lock och filtratbehållare	95 mm
Diameter	16 mm
Konstruktionsmaterial	
Membran	Ultracel® regenererad cellulosa
Provkärl	Polykarbonat
Membranets stöddel	Polykarbonat
Filtratbehållare	Polyetylen
Filtratbehållarens lock	Polyetylen
O-ring	Etenpropengummi (EPDM)

FÖRSIKTIGHET: Komponenterna för Centrifree® är inte autoklaverbara. Får inte användas med organiska lösningsmedel!

Kemisk kompatibilitet

Centriprep®-enheter är avsedda att användas för biologiska vätskor och vattenlösningar. Kontrollera om provet är kemiskt kompatibelt med enheten före användning. Mer information finns på SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility.

Produktbeställning

Köp produkterna online på SigmaAldrich.com.

Symbolförklaringar

Symbol	Definition	Symbol	Definition
	Katalognummer		Tillverkningsdatum
	Får ej återanvändas		Tillverkare
	Satskod		Icke-steril produkt

Meddelande

Vi tillhandahåller information och råd till våra kunder om applikationsteknologier och regulatoriska frågor efter bästa förmåga, men utan ansvar och skyldigheter. Befintliga lagar och förordningar ska i samtliga fall iakttas av våra kunder. Detta gäller även med avseende på eventuella rättigheter för tredje part. Information och råd från oss befriar inte våra kunder från deras eget ansvar att kontrollera våra produkters lämplighet för det avsedda ändamålet.

Insamling och avfallshantering

Alla prover måste föras med tydlig märkning. Lämpliga instrument ska användas för provtagning och provberedning.

OBS: Följ försiktighetsåtgärderna för kassering av föremål som kontaminerats med potentiellt smittförande och farliga biologiska ämnen enligt alla tillämpliga internationella, federala, statliga och lokala förordningar.

Teknisk hjälp

Gå in på vår tekniska servicesida på SigmaAldrich.com/techservice.

Eventuella allvarliga tillbud med denna enhet ska rapporteras till tillverkaren och behörig tillsynsmyndighet i det land där användaren är etablerad.

Standardgaranti

Den giltiga garantin för produkterna i denna publikation finns på SigmaAldrich.com/terms.

Ievads

Centrifree® ierīces ātri un efektīvi atdala nelielu proteīnus nesaturošu, saistītu mikrovielu daudzumu (0,15–1,0 mL) no seruma, plazmas un citiem bioloģiskajiem paraugiem, izmantojot ultrafiltrēšanas metodi. Precīza atdalīšana notiek minūšu laikā, neizmantojot atšķaidīšanu, neizmainot fizioloģisko pH līmeni, jonu sastāvu vai nesaistītu mikrovielu koncentrāciju. Šīm ierīcēm ir zemas adsorbcijas hidrofilās membrānas un blīves bez plastifikatoriem, lai nodrošinātu izcilu uztvērumu. Aiztures tilpums ir 10 µL vai mazāks.

Atšķirībā no dialīzes, gelfiltrācijas vai adsorbcijas ar kokogli ultrafiltrēšana nodrošina lielāku precizitāti attiecībā uz brīvo ligandu koncentrācijas, saistīšanās spējas vai tieksmes konstantes noteikšanu. Tā ļauj izvairīties no laikietilpīgas metodoloģijas, īpaša aprīkojuma izmantošanas, atšķaidīšanas kļūdām un saistīšanās līdzsvara svārstībām.

Ultrafiltrēšana nemaina mikrovielas brīvo ligandu koncentrāciju. Proteīns tiek atsevišķi atdalīts parauga tilpuma daļā (koncentrātā), bet brīvie ligandi būtībā netraucēti izkļūst caur membrānu kopā ar šķīdinātāju.

Masas darbības likumi un masas nezūdamības likums ideālai saistīšanai ar proteīniem paredz, ka brīvo ligandu koncentrācija ultrafiltrātā paliks nemainīga, pieņemot, ka molārā saistīšanās spēja un saderība ir neatkarīgas no kopējās proteīnu koncentrācijas. Šo prognozi kā patiesu pierāda rezultāti no vairākām sistēmām ar konstantu brīvo ligandu koncentrāciju secīgās ultrafiltrāta daļās.

Brīvo ligandu koncentrācijas izmaiņas, kuras neizraisa membrānas aizture vai adsorbcija, norāda uz saistošo proteīnu izmainīto spēju vai saderību apkopošanas vai citu neideālu proteīnu savstarpējo mijiedarbību dēļ. Atkarībā no izmantojuma varat kvantitatīvi vai kvalitatīvi analizēt brīvo ligandu koncentrāciju iegūtajā filtrātā.

Paredzētais lietojums

Centrifree® ierīces ir nesterilas vienreizējas lietošanas ultrafiltrēšanas ierīces, kas paredzētas bioloģisko paraugu, piemēram, seruma, urīna, cerebrospinalā šķidruma un citu ķermeņa šķidrumu (nelielos daudzumos) (0,15–1,0 mL) atdalīšanai no olbaltumvielām piesaistītās mikrovielas. Ierīce paredzēta vienreizējai lietošanai, un tā jāizmanto laboratorijas profesionāļiem.

Centrifree® ierīces komponenti

Centrifree® ultrafiltrēšanas ierīce nodrošina maksimālo efektivitāti vairāku paraugu apstrādei. Katra ierīce ir aprīkota ar membrānu un blīvi, kas pastāvīgi atrodas starp parauga rezervuāru un balsta pamatni. Pamatnei ir pievienota noņemama filtrāta mēģene. Centrifree® ierīce ir paredzēta tikai vienreizējai lietošanai.

Komplektā iekļautie piederumi

Centrifree® ultrafiltrēšanas ierīču komplektā ir ietverti tālāk minētie komponenti.

- 50 ultrafiltrēšanas ierīces
- 50 rezervuāra vāciņi
- 50 filtrāta mēģenes
- 50 filtrāta mēģenes vāciņi

PIEZĪME: Sarkanie rezervuāra vāciņi tiek nodrošināti, lai novērstu parauga iztvaikošanu un pH līmeņa izmaiņas CO₂ daudzuma mazināšanās dēļ.

Nepieciešamais aprīkojums

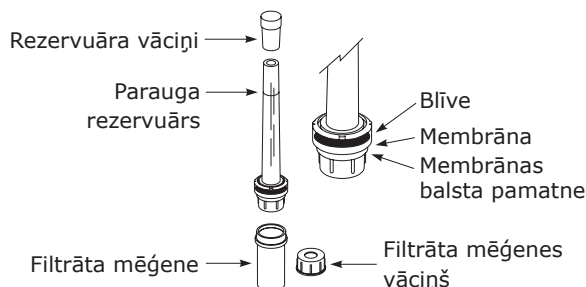
- Centrifūga ar rotora adapteri vai ligzdām, kurās ir vieta 17 × 100 mm mēģenēm un kas spēj sasniegt 1000–2000 × g.

PIEZĪME: Lai panāktu optimālu šķīdinātāja plūsmu, izmantojiet centrifūgu ar leņķa rotoru.

- Pastēra vai fiksēta tilpuma pipete paraugu ievietošanai.

Uzglabāšana un stabilitāte

Uzglabāšanas apstākļu informāciju skatiet izstrādājuma uzlīmē.



Lietošanas vadlīnijas

- Ar Centrifree® ierīcēm var izmantot serumu, plazmu vai citus bioloģiskos šķīdumus. Lai panāktu efektīvāku plūsmas ātrumu, atbrīvojieties no fibrīna, centrifugējot paraugu pirms tā ielikšanas rezervuārā.
- Ieteicamais parauga tilpums ir 0,15–1,0 mL.
- Lai iegūtu vislabākos rezultātus, izmantojiet centrifūgu ar leņķa, nevis piekares rotoru, un centrifugējiet pie ne vairāk kā 1000–2000 × g.

UZMANĪBU: Neizmantojiet ar relatīvo centrālās spēku, kas pārsniedz 2000 × g.

- Lai nodrošinātu sistēmas piemērotību paredzētajai izmantošanai, veiciet sākotnējos ligandu adsorbcijas un proteīnu aiztures pētījumus.
- Centrifree® ultrafiltrēšanas ierīces ir izstrādātas izmantošanai ar bioloģiskiem šķīdumiem un ūdens šķīdumiem. Neizmantojiet ierīces ar organiskajiem šķīdinātājiem.
- Nosakiet pareizo temperatūru jūsu izmantojumam. Saglabājiet vēlamo temperatūru, izmantojot uzsildītu centrifūgu vai iepriekš uzsildot centrifūgas rotoru un kameru. Leņķa rotora gadījumā ierīces saturs 5–10 minūtēs sasniedz termisko līdzsvaru ar rotoru. Centrifree® ierīču panāktā straujā ultrafiltrēšana samazina temperatūras ietekmi uz ligandu saistīšanos.
- Neizmantojiet makromolekulu koncentrāta veidošanai un uztvērūmam.
- Neveiciet komponentu daļu karsēšanu autoklāvā.
- Neizmantojiet Centrifree® ierīces atkārtoti.
- Pēc ultrafiltrēšanas ierīču membrānas sasalpināšanas neļaujiet tai izžūt. Ja ierīci nav paredzēts lietot uzreiz pēc skalošanas, atstājiet uz membrānas nelielu šķidruma daudzumu.
- Ierīces Ultracel® membrānā ir neliels daudzums (~ 2 µL) glicerīna. Ja šī viela traucē veikt analīzi, izskalojiet ierīci ar dejonizētu ūdeni vai 0,1 N NaOH, līdz traucējumi vairs nav novērojami. Ja glicerīna noņemšanai tiek izmantots 0,1 N NaOH, pirms izmantošanas rūpīgi izskalojiet ierīci ar dejonizētu ūdeni vai bufera šķīdumu. Centrifugējiet vismaz 15 minūtes, lai atbrīvotos no pēc iespējas vairāk šķidruma. Lai novērstu atšķaidīšanas kļūdu, kuru izraisa iesprūdis šķidrums (~ 10 µL), pēc skalošanas izmetiet pirmo ultrafiltrāta alikvoto daļu.

Centrifree® ultrafiltrēšanas ierīču izmantošana

Pirms Centrifree® ierīces izmantošanas noņemiet sarkano rezervuāra vāciņu.

1. Turiet rezervuāru apmēram 45° leņķī, ar pipeti pieskaroties rezervuāra sienai. Ievietojiet parauga šķīdumu vienmērīgi, ar vienu nepārtrauktu plūsmu, lai neradītu gaisa burbulus.



PIEZĪME: Nepieskarieties ar pipetes galu membrānai.

2. Uzlieciet parauga rezervuāram vāciņu un tad ievietojiet ierīci centrifūgas rotorā ar 17 × 100 mm adapteriem. Līdzsvaro jiet centrifūgu ar līdzīgu ierīci.

PIEZĪME: Sarkanajam rezervuāra vāciņam jānosēd ne vairāk kā 3–4 mm no rezervuāra augšpusē. Spēcīgāk uzspiests vāciņš var radīt priekšfiltrāciju, kas attiecīgi var izraisīt analītiskās kļūdas, ja paraugs nav vajadzīgajā darba temperatūrā.

PIEZĪME: Pirms izmantošanas pārbaudiet, vai ir ievērota centrifugēšanai nepieciešamā atstarpe.

3. Līdzsvaro jiet ierīci un paraugu, līdz tiek sasniegta jūsu izmantojumam vajadzīgā temperatūra.
4. Centrifugējiet ierīci pie ne vairāk kā 1000–2000 × g tik ilgi, cik nepieciešams vajadzīgā filtrāta tilpuma iegūšanai. Centrifugēšanas ilguma vadlīnijas skatiet sadaļā "Ultrafiltrēšanas ātrums".
5. Uzmanīgi izņemiet ierīci no centrifūgas rotora un atvienojiet filtrāta mēģeni, kas satur ultrafiltrātu. Uzlieciet filtrāta mēģeni komplektā ietvertā vāciņu un noņemiet to tad, kad ultrafiltrātu var analizēt.

BRĪDINĀJUMS: Izmetot lietotus komponentus, ievērojiet tādu objektu, kas piesārņoti ar potenciāli infekciozu vai bīstamu bioloģisku materiālu, utilizācijas piesardzības pasākumus.

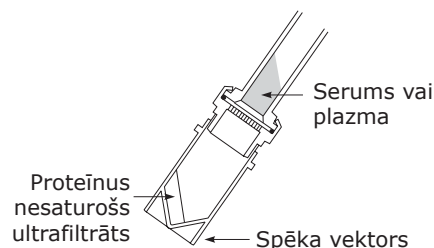
PIEZĪME: Filtrs var nedarboties pareizi, ja tam pēc sasalpināšanas ļauj izžūt.

Darbība

Nākamajās sadaļās pārrunāti dažādas darbības īpatnības, tostarp polarizācijas kontrole, ultrafiltrēšanas ātrums, membrānas darbība, pH līmeņa kontrole un nespecifiska adsorbcija.

Polarizācijas kontrole

Izmantojot leņķa rotoru, tiek nodrošināta polarizācijas kontrole un mazināta proteīnu savstarpējās mijiedarbības radītu artefaktu iespējamība. Leņķis novērš aizturēto proteīnu uzkrāšanos uz membrānas virsmas, jo šis biežais slānis aizslīd uz ārpusi un uzkrājas membrānas malā. Ar piekares rotoru polarizācijas slānis tiek sablīvēts uz visas membrānas virsmas, ierobežojot šķīdinātāja plūsmu.



Ultrafiltrēšanas ātrums

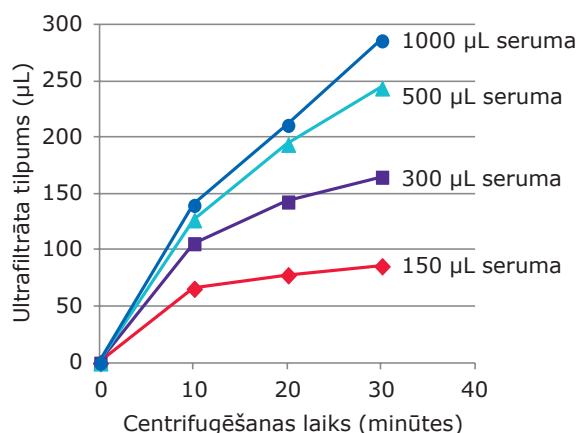
Plūsmas ātrums ir atkarīgs no parauga proteīnu koncentrācijas, sākuma tilpuma, relatīvā centrālās spēka (RCS), rotora veida un temperatūras. Liels plūsmas ātrums rodas no maksimāla membrānas virsmas laukuma, polarizācijas kontroles un transmembrānā spiediena, kuru panāk ar parauga tilpumu, kas pārsniedz 300 μL . Optimālu filtrēšanas ātrumu panāk ar 1000–2000 $\times g$. Lielāks centrālās spēks nenodrošina ievērojamu plūsmas ātruma palielinājumu, tāpēc to nav ieteicams izmantot.

Leņķa un piekares centrifūgas rotora salīdzinājums

Rotors	RCS ($\times g$)	Standarta ultrafiltrāta tilpums (μL)
Leņķis (33°)	1000	140–150
Piekare	1000	115–120

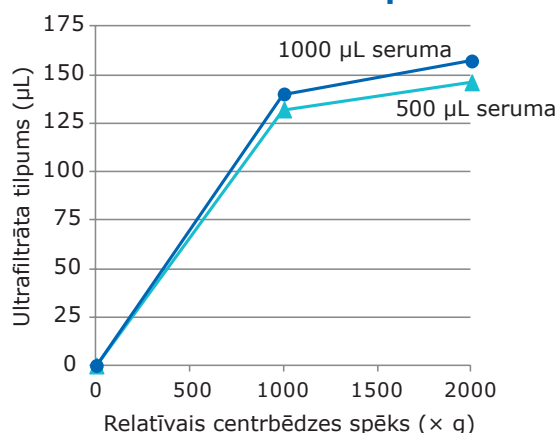
1 mL normāla cilvēka seruma, centrifugēšana 10 minūtes

Standarta ultrafiltrēšanas ātrums



Nosacījumi: 33° leņķa rotors, 25°C , 1000 $\times g$

Relatīvā centrālās spēka ietekme



Nosacījumi: 33° leņķa rotors, 25°C , centrifugēšana 10 minūtes

Membrānas darbība

Ultracel® anizotropās, hidrofilās ultrafiltrēšanas membrānas augsto selektīvo caurlaidību nodrošina šauru poru izmēra izkļūdi. Parasti Centrifree® ierīces aiztur 99,9% seruma proteīna un < 5% L-tiroksīna (0,1 mg/mL no 0,1 N NaOH).

Proteīna aiztures prasības katram izmantojumam ir atkarīgas no ligandu saistīšanas apmēra. Ja ligandi ir 90% saistīti, 1% seruma noplūde radītu 9% brīvo ligandu koncentrācijas pārvērtējumu. Lai izmērītu brīvā tiroksīna (> 99,95% saistīts) daudzumu neatšķaidītā serumā, nepieciešama > 99,995% proteīnu aizture, lai panāktu < 10% kļūdu. Centrifree® ierīces ieteicams izmantot tādu ligandu atdalīšanai, kas ir līdz 99% saistīti.

Reizēm membrānas vai mehāniska defekta dēļ var rasties seruma noplūde. Ja noplūdes apmērs pārsniedz 20%, ultrafiltrāts būs dzeltenā krāsā. Lai konstatētu noplūdi, kas nesasniedz 20%, ar jutīgu mikroproteīnu analīzes ierīci jāizmēra proteīnu koncentrācijas ultrafiltrātā. Ja vēlaties lielāku ticamību, bet nevēlaties regulāri veikt proteīnu analīzi, filtrējiet paraugu divās ierīcēs.

pH līmeņa kontrole

Katrai ligandu saistīšanas sistēmai nosakiet pieļaujamo pH svārstību robežvērtību. Eksperimentāli parauga pH līmeni var kontrolēt, izmantojot anaerobo paraugu apstrādi un pārvietošanu, parauga apstrādi ar 5% CO₂, 95% O₂ gāzi vai neliela koncentrēta bufera šķīduma daudzuma pievienošanu, pieņemot, ka bufera šķīduma joni nemaina ligandu saistīšanās līdzsvaru.

Nespecifiska adsorbcija

Adsorbcijas zudumi ir atkarīgi no ligandu koncentrācijas, to jonu un hidrofobijām īpatnībām, temperatūras un kontakta ar komponentu virsmām ilguma un parauga matricas. No proteīnus nesaturoša seruma ultrafiltrāta iegūtais ligandu uztvērums parasti ir lielāks par no bufera šķīduma iegūto, un no tā uzvedības var labāk prognozēt nesadalīta seruma uzvedību. Mazas molekulmasas brīvās taukskābes un aminoskābes proteīnus nesaturošā ultrafiltrātā mijiedarbojas ar komponentu virsmām un pasivē tās, savukārt seruma proteīni parasti pasivē virsmas, ar kurām saskaras nesadalīts serums. Zems uztvērums gan no proteīnus nesaturoša ultrafiltrāta, gan no bufera šķīduma var norādīt uz adsorbcijas zudumiem un/vai ligandu aizturi membrānā. Ligandu uztvērums Centrifree® ierīcēs precīzāks ir saistošo proteīnu un konkurējošo mikrovielu klātbūtnē.

Specifikācijas

Maksimālais parauga tilpums	1,0 mL
Minimālais parauga tilpums	0,15 mL
Maksimālais relatīvais centrbēdzes spēks	2000 × g
Aktīvais membrānas laukums	0,92 cm ²
Aiztures tilpums (membrāna un balsts)	10 µL
Izmēri	
Garums ierīcei ar vāciņu un filtrāta mēģeni	95 mm
Diametrs	16 mm
Materiālu sastāvs	
Membrāna	Ultracel® reģenerēta celuloze
Parauga rezervuārs	Polikarbonāts
Membrānas balsta pamatne	Polikarbonāts
Filtrāta mēģene	Polietilēns
Filtrāta mēģenes vāciņš	Polietilēns
Blīve	Etilēnpropilēndiēna monomērs (EPDM)

UZMANĪBU: Centrifree® komponenti nav piemēroti autoklāvam. Neizmantojiet ar organiskajiem šķīdinātājiem.

Ķīmiskā saderība

Centricon® ierīces paredzētas izmantošanai ar bioloģiskiem šķīdumiem un ūdens šķīdumiem. Pirms lietošanas pārbaudiet, vai paraugs ir ķīmiski saderīgs ar ierīci. Lai uzzinātu vairāk, apmeklējiet vietni SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility.

Izstrādājuma pasūtīšana

Iegādājieties izstrādājumus tiešsaistē, vietnē SigmaAldrich.com.

Simbolu definīcijas

Simbols	Definīcija	Simbols	Definīcija
	Kataloga numurs		Ražošanas datums
	Nelietot atkārtoti		Ražotājs
	Sērijas kods		Nesterils izstrādājums

Paziņojums

Mēs sniedzam informāciju un padomus mūsu klientiem par lietojumprogrammu tehnoloģijām un normatīvajiem jautājumiem, cik vien labi zinām un spējam, bet bez pienākumiem vai atbildības. Mūsu klienti visos gadījumos ievēro spēkā esošos normatīvos aktus. Tas attiecas arī uz trešo pušu tiesībām. Mūsu informācija un ieteikumi neatbrīvo mūsu klientus no atbildības par to, lai tiktu pārbaudīta mūsu produktu piemērotība paredzētajam mērķim.

Savākšana un utilizācija

Visiem paraugiem jābūt ar skaidri redzamu marķējumu. Lai iegūtu un sagatavotu paraugus, jāizmanto piemēroti instrumenti.

PIEZĪME: Ievērojiet tādu objektu, kas piesārņoti ar potenciāli infekciozu vai bīstamu bioloģisku materiālu, utilizācijas piesardzības pasākumus un veiciet to atbilstoši visiem spēkā esošajiem starptautiskajiem, pavalsts, reģiona un vietējiem noteikumiem.

Tehniskais atbalsts

Apmeklējiet tehnoloģiju pakalpojuma lapu mūsu tīmekļa vietnē SigmaAldrich.com/techservice.

Par jebkādiem nopietniem negadījumiem ar šo ierīci jāziņo ražotājam un kompetentajai iestādei valstī, kurā atrodas lietotājs.

Standarta garantija

Šajā publikācijā norādīto izstrādājumu garantiju varat skatīt tīmekļa vietnē SigmaAldrich.com/terms.

Įvadas

„Centrifree®“ prietaisai greitai ir efektyviai atskiria nedidelį kiekį (0,15–1,0 mL) serumo, plazmos ir kitų biologinių mėginių nuo su baltymais susietų mikrotirpių medžiagų, kai naudojamas metodas, vadinamas ultrafiltravimu. Tikslus pasiskirstymas įvyksta per kelias minutes be praskiedimo, fiziologinio pH, jonų sudėties ar nesusietų mikrotirpių medžiagų koncentracijos pokyčių. Šiuose prietaisuose yra mažai adsorbuojančių hidrofilinių membranų ir sandarinimo žiedų be plastifikatorių, skirtų užtikrinti puikiai regeneracijai. Laikymo tūris yra 10 µL arba mažesnis.

Priešingai nei dializė, gelio filtravimas ar anglies adsorbicija, ultrafiltracija užtikrina didesnę tikslumą matuojant laisvo ligando koncentraciją, surišimo pajėgumą arba afiniteto konstantas. Ji pašalina daug laiko užimančią metodiką, specializuotos įrangos poreikį, skiedimo klaidas ir jungimosi pusiausvyros pokyčius.

Ultrafiltracija nekeičia laisvųjų mikrotirpių medžiagų ligandų koncentracijos. Baltymai selektyviai pasiskirsto į dalį mėginio tūrio (koncentrato), o laisvas ligandas iš esmės netrukdomai praeina per membraną kartu su tirpikliu.

Masės veikimo ir masės išsaugojimo dėsniai idealiam baltymų surišimui numato, kad laisvųjų ligandų koncentracija ultrafiltrate išliks pastovi, jei molinis surišimo pajėgumas ir afinitetas nepriklauso nuo bendros baltymų koncentracijos. Kelių sistemų, rodančių pastovią laisvųjų ligandų koncentraciją iš eilės einančiose ultrafiltrato frakcijose, rezultatai patvirtina šias prognozes.

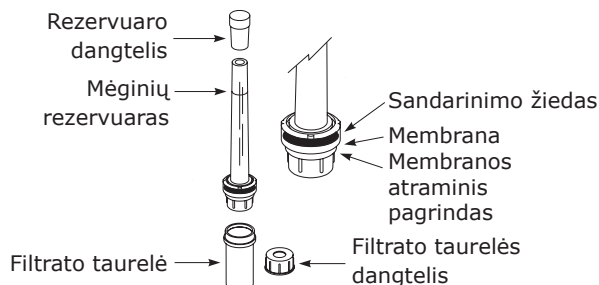
Laisvųjų ligandų koncentracijos keitimas, nesukeltas membranos sulaikymo ar adsorbicijos, rodo, kad dėl agregacijos ar kitos neidealios baltymų sąveikos su baltymais pakito jungiamųjų baltymų pajėgumas arba afinitetas. Priklausomai nuo naudojimo, gautame filtrate galite kiekybiškai arba kokybiškai išanalizuoti laisvųjų ligandų koncentraciją.

Paskirtis

„Centrifree®“ prietaisai yra nesterilūs, vienkartiniai ultrafiltravimo prietaisai, skirti atskirti nuo su baltymais susietų mikrotirpių nedideliuose kiekiuose (0,15–1,0 mL) biologinių mėginių, pvz., serumo, šlapimo, smegenų skysčio ir kitų kūno skysčių. Prietaisas yra vienkartinis ir skirtas naudoti laboratorijos specialistui.

„Centrifree®“ prietaiso komponentai

„Centrifree®“ ultrafiltravimo prietaisas užtikrina maksimalų kelių mėginių apdorojimo efektyvumą. Kiekvieną prietaisą sudaro membrana ir sandarinimo žiedas, užsandarintas tarp mėginio rezervuaro ir atraminio pagrindo. Prie pagrindo pritvirtinta nuimama filtrato taurelė. „Centrifree®“ prietaisą naudoti galima tik vieną kartą.



Tiekiamos medžiagos

Su „Centrifree®“ ultrafiltravimo prietaisais tiekiami toliau nurodyti komponentai.

- 50 ultrafiltravimo prietaisų
- 50 rezervuaro dangtelių
- 50 filtrato taurelių
- 50 filtrato taurelių dangtelių

PASTABA: Raudoni rezervuaro dangteliai skirti apsaugoti, kad mėginys neišgaruotų ir neįvyktų pH pokyčių praradus CO₂.

Reikalinga įranga

- Centrifuga su rotoriaus adapteriu arba laikikliais, kurie gali priimti 17 × 100 mm mėgintuvėlius ir pasiekti 1 000–2 000 × g.

PASTABA: Norėdami užtikrinti optimalų tirpiklio srautą, naudokite fiksuotojo kampo centrifugos rotorių.

- „Pasteur“ arba fiksuotojo tūrio pipetė mėginiui įvesti.

Laikymas ir stabilumas

Laikymo sąlygas žiūrėkite gaminio etiketėje.

Naudojimo gairės

- Su „Centrifree[®]“ prietaisais galima naudoti serumą, plazmą ar kitus biologinius skysčius. Kad srautas būtų efektyvesnis, pašalinkite fibriną centrifuguodami mėginį prieš įdėdami į rezervuarą.
- Rekomenduojamas mėginio tūris yra 0,15–1,0 mL.
- Norėdami gauti geriausius rezultatus, naudokite fiksuotojo kampo, o ne atverčiamojo krepšelio centrifugos rotorių ir sukite 1 000–2 000 × g greičiu.

PERSPĖJIMAS: Nenaudokite, jei santykinė išcentrinė jėga viršija 2 000 × g.

- Atlikite preliminarinius ligandų adsorbcijos ir baltymų sulaikymo tyrimus, kad įsitikintumėte, jog sistema tinka naudoti, kaip numatyta.
- „Centrifree[®]“ ultrafiltravimo prietaisai skirti naudoti su biologiniais skysčiais ir vandeniniais tirpalais. Nenaudokite prietaisų su organiniais tirpikliais.
- Nustatykite tinkamą naudojimo temperatūrą. Palaikykite norimą temperatūrą naudodami šildomą centrifugą arba iš anksto pašildydami centrifugos rotorių ir kamerą. Fiksuotojo kampo rotoriuje prietaiso turinys šiluminę pusiausvyrą su rotoriumi pasiekia per 5–10 minučių. „Centrifree[®]“ prietaisų didelis ultrafiltravimo greitis sumažina temperatūros poveikį ligandų susiejimui.
- Nenaudokite makromolekulių koncentruoti ir regeneruoti.
- Neautoklavuokite sudedamųjų dalių.
- Nenaudokite „Centrifree[®]“ prietaisų pakartotinai.
- Neleiskite ultrafiltravimo prietaisų membranai išdžiūti. Jeigu prietaiso nenaudojate iš karto po plovimo, membranoje palikite skysčio, iki prietaisas vėl bus naudojamas.
- „Ultracel[®]“ prietaiso membranoje yra nedidelis kiekis glicerino (~2 µL). Jei ši medžiaga trukdo analizei, nuplaukite prietaisą dejonizuotu vandeniu arba 0,1 N NaOH, kol nebepastebėsite jokių trukdžių. Jei glicerinui pašalinti naudojama 0,1 N NaOH, prieš naudodami prietaisą gerai nuplaukite dejonizuotu vandeniu arba buferiniu tirpalu. Sukite bent 15 minučių, kad pašalintumėte kuo daugiau skysčių. Kad po plovimo išvengtumėte praskiedimo klaidos dėl įstrigusio skysčio (~10 µL), išmeskite pirmąją ultrafiltrato alikvotinę dalį.

Kaip naudotis „Centrifree[®]“ ultrafiltravimo prietaisais

Prieš naudodami „Centrifree[®]“ prietaisą, nuimkite raudoną rezervuaro dangtelį.

1. Rezervuarą laikykite pakreiptą maždaug 45° kampu, pipetės antgaliu liesdami rezervuaro sienelę. Įpilkite mėginio tirpalą sklandžiai vienu tolygiu srautu, kad nesusidarytų oro burbulų.



PASTABA: Nelieskite membranos pipetės antgaliu.

2. Uždenkite mėginio rezervuarą, tada įdėkite prietaisą į centrifugos rotorių su 17 × 100 mm adapteriais. Atsvaros centrifuga su panašiu prietaisu.

PASTABA: Raudonas rezervuaro dangtelis turi būti ne daugiau kaip 3–4 mm žemiau virš rezervuaro viršaus. Tolesnis suspaudimas gali sukelti išankstinį filtravimą, dėl kurio vėliau gali atsirasti analizės klaidų, jei mėginys nepasiekia norimos darbinės temperatūros.

PASTABA: Prieš naudodami patikrinkite centrifugos tarpą.

3. Subalansuokite įrenginį ir mėginį iki temperatūros, reikalingos jūsų taikymo būdui.
4. Sukite prietaisą 1 000–2 000 × g greičiu tiek, kiek reikia, kad pasiektumėte norimą filtrato tūrį. Sukimo laiko gaires rasite skyriuje „Ultrafiltravimo greitis“.
5. Atsargiai nuimkite prietaisą nuo centrifugos rotoriaus ir atjunkite filtrato taurelę, kurioje yra ultrafiltratas. Uždenkite filtrato taurelę pateiktu dangteliu, kol bus galima analizuoti ultrafiltratą.

ĮSPĖJIMAS: Išmesdami panaudotus komponentus, būtinai laikykitės atsargumo priemonių, taikomų potencialiai užkrečiama ar pavojinga biologine medžiaga užterštiems daiktams.

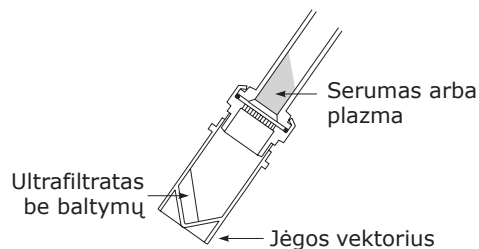
PASTABA: Filtras gali tinkamai neveikti, jei po sudrėkinimo jam leidžiama išdžiūti.

Veikimas

Tolesniuose skyriuose aptariamos įvairios veikimo charakteristikos, įskaitant poliarizacijos kontrolę, ultrafiltravimo greitį, membranos veikimą, pH kontrolę ir nespecifinę adsorbciją.

Poliarizacijos valdymas

Fiksuotojo kampo rotoriaus naudojimas užtikrina poliarizacijos valdymą ir sumažina artefaktų galimybę dėl baltymų sąveikos su baltymais. Kampas neutralizuoja sulaikyto baltymo kaupimąsi membranos paviršiuje, nes šis tankus sluoksnis slenka į išorę ir kaupiasi membranos krašte. Svyruojančiame kaušo rotoriuje poliarizacijos sluoksnis sutankinamas per visą membranos paviršių, ribodamas tirpiklio srautą.



Ultrafiltravimo greitis

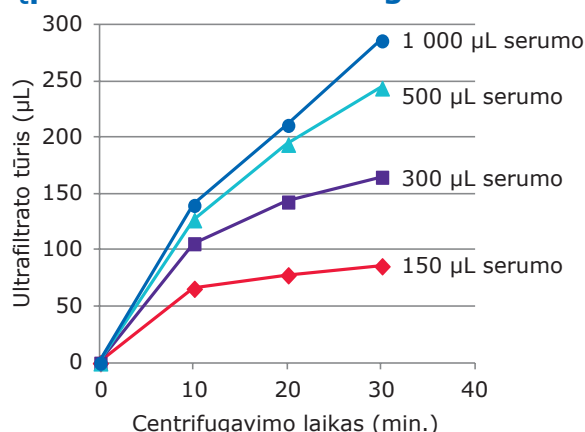
Srauto greitis priklauso nuo mėginio baltymų koncentracijos, pradinio tūrio, santykinės išcentrinės jėgos (RCF), rotoriaus tipo ir temperatūros. Dideli srautai atsiranda dėl maksimalaus membranos paviršiaus ploto, poliarizacijos kontrolės ir optimalaus transmembraninio slėgio, pasiekiamo, kai mėginio tūris yra didesnis nei 300 µL. Optimalus filtravimo greitis pasiekiamas esant 1 000–2 000 × g. Didesnė išcentrinė jėga nepadidina srauto greičio ir nerekomenduojama.

Fiksuotojo kampo ir atverčiamojo krepšelio centrifugos rotorų palyginimas

Rotorius	RCF (× g)	Tipinis ultrafiltrato tūris (µL)
Fiksuotojo kampo (33°)	1 000	140–150
Atverčiamasis krepšelis	1 000	115–120

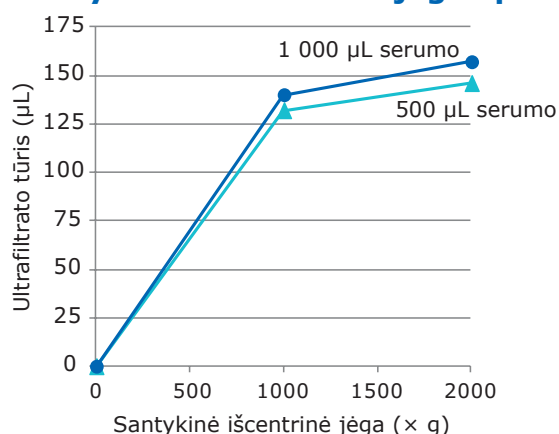
1 mL normalaus žmogaus serumo, 10 minučių sukimas

Įprasti ultrafiltravimo greičiai



Sąlygos: 33° fiksuotojo kampo rotorius, 25 °C, 1 000 × g

Santykinės išcentrinės jėgos poveikis



Sąlygos: 33° fiksuotojo kampo rotorius, 25 °C, 10 minučių sukimas

Membranos veikimas

Didelis selektyvus anizotropinio, hidrofilinio „Ultracel[®]“ ultrafiltravimo membranos pralaidumas yra dėl siauro porų dydžio pasiskirstymo. Paprastai „Centrifree[®]“ prietaisai sulaiko 99,9% serumo baltymų ir <5% L-tiroksino (0,1 mg/mL 0,1 N NaOH).

Baltymų sulaikymo reikalavimai kiekvienam naudojamam atvejui priklauso nuo ligandų susiejimo laipsnio. Ligandui, kuris yra susietas 90%, 1% serumo baltymų nutekėjimas lemtų 9% pervertintą laisvojo ligando koncentraciją. Norint išmatuoti laisvojo tiroksino (susieto >99,95%) kiekį neskiestame serume, reikalingas >99,995% baltymų sulaikymas, kad paklaida būtų <10%. „Centrifree[®]“ prietaisai siūlo ligandams, kurie yra susieti iki 99%, atskirti.

Kartais serumo nutekėjimas gali atsirasti dėl membranos arba mechaninio defekto. Jei nuotėkis yra didesnis nei 20%, ultrafiltratas bus geltonos spalvos. Norint nustatyti mažesnę nei 20% nuotėkį, reikia išmatuoti baltymų koncentraciją ultrafiltrate naudojant jautrų mikrobaltymų tyrimą. Jei reikia didesnio patikimumo, bet norite išvengti įprastinio baltymų tyrimo, filtruokite mėginį dubliuotuose prietaisuose.

pH valdikliai

Nustatykite kiekvienos ligandų surišančios sistemos priimtina pH kitimo ribą. Eksperimentiškai mėginio pH gali būti kontroliuojamas anaerobiniu mėginio apdorojimu ir perkėlimu, dujomis paduodant mėginį 5% CO₂, 95% O₂ arba pridėdam nedidelį kiekį koncentruoto buferinio tirpalo, su sąlyga, kad buferinis jonas nekeičia ligandų surišimo pusiausvyros.

Nespecifinė adsorbcija

Adsorbciniai nuostoliai priklauso nuo ligando koncentracijos, jo joninio ir hidrofobinio pobūdžio, temperatūros ir sąlyčio su komponentų paviršiais laiko bei mėginio matricos. Ligando, kuris buvo pridėtas į serumą be baltymų ultrafiltratą, regeneravimas paprastai yra didesnis nei buferinio tirpalo ir geriau nuspėja elgesį su visu serumu. Mažos molekulinės masės laisvosios riebalų ir amino rūgštys ultrafiltrate be baltymų sąveikauja su komponentų paviršiais ir juos pasyvina, o serumo baltymai paprastai pasyvina paviršius, su kuriais susiduria visas serumas. Mažas regeneravimas iš ultrafiltrato be baltymų arba buferinio tirpalo gali reikšti adsorbcijos nuostolius ir (arba) ligando išlaikymą membranoje. Ligandai „Centrifree[®]“ prietaisuose tiksliausiai regeneruojami, kai yra surišančių baltymų ir konkuruojančių mikrotirpių medžiagų.

Specifikacijos

Didžiausias mėginio tūris	1,0 mL
Mažiausias mėginio tūris	0,15 mL
Didžiausia santykinė centrifugos jėga	2 000 × g
Aktyvus membranos plotas	0,92 cm ²
Laikymo tūris (membrana ir atrama)	10 µL
Matmenys	
Uždengto prietaiso su filtrato taurele ilgis	95 mm
Skersmuo	16 mm
Konstrukcijos medžiagos	
Membrana	„Ultracel [®] “ regeneruota celiuliozė
Mėginių rezervuaras	Polikarbonatas
Membranos atraminis pagrindas	Polikarbonatas
Filtrato taurelė	polietilenas
Filtrato taurelės dangtelis	polietilenas
Sandarinimo žiedas	Etileno propileno dieno monomeras (EPDM)

PERSPĖJIMAS: „Centrifree[®]“ komponentai nėra autoklavuojami. Nenaudokite su organiniais tirpikliais.

Cheminiis suderinamumas

„Centrifree[®]“ prietaisai skirti naudoti su biologiniais skysčiais ir vandeniniais tirpalais. Prieš naudodami patikrinkite mėginio cheminį suderinamumą su prietaisu. Daugiau informacijos rasite adresu SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility.

Gaminio užsakymas

Išigykite gaminius internetu adresu SigmaAldrich.com.

Simbolių apibrėžimai

Simbolis	Apibūdinimas	Simbolis	Apibūdinimas
	Katalogo numeris		Pagaminimo data
	Nenaudoti pakartotinai		Gamintojas
	Partijos kodas		Nesterilus gaminys

Pastaba

Mes tiekiamo informaciją ir patarimus savo klientams taikomųjų technologijų ir teisiniais klausimais remdamiesi savo geriausiomis žiniomis ir gebėjimais, tačiau nepriimame įsipareigojimų ir atsakomybės. Visais atvejais mūsų klientai turi laikytis galiojančių įstatymų ir taisyklių. Tai taip pat taikoma trečiųjų šalių teisėms. Mūsų informacija ir patarimai neatleidžia mūsų klientų nuo atsakomybės tikrinti mūsų produktų tinkamumą numatytam tikslui.

Rinkimas ir šalinimas

Visi mėginiai turi būti aiškiai pažymėti. Mėginiams imti ir paruošti turi būti naudojamos tinkamos priemonės.

PASTABA: Laikykites atsargumo priemonių šalindami daiktus, užterštus potencialiai užkrečiama arba pavojinga biologine medžiaga, vadovaukitės visais galiojančiais tarptautiniais, federaliniais, valstijų ir vietos reglamentais.

Techninė pagalba

Apsilankykite mūsų interneto svetainės techninės priežiūros puslapyje adresu SigmaAldrich.com/techservice.

Apie rimtus incidentus, susijusius su šiuo prietaisu, reikia pranešti gamintojui ir šalies, kurioje įsisteigęs naudotojas, kompetentingajai institucijai.

Standartinė garantija

Šiame leidinyje išvardytų gaminių garantiją galima rasti adresu SigmaAldrich.com/terms.

Bevezetés

A Centrifree® eszközök gyorsan és hatékonyan választják ki a fehérjékhez kötött mikroanyagokat kis térfogatú (0,15–1,0 mL) szérumból, plazmából és más biológiai mintákból az ultraszűrésnek nevezett módszerrel. A pontos szétválasztás percek alatt történik hígítás nélkül, valamint a fiziológiai pH, az ionösszetétel vagy a nem kötött mikroanyagok koncentrációjának megváltozása nélkül. Ezek az eszközök a kiváló visszanyerés érdekében alacsony adszorpciós képességű hidrophil membránokat és lágyítószerektől mentes O-gyűrűket tartalmaznak. A visszatartott folyadékmennyiség térfogat 10 µL vagy annál kevesebb.

A dialízissal, géliszűréssel vagy faszén-adszorpcióval ellentétben az ultraszűrés nagyobb pontosságot biztosít a szabad ligandum-koncentráció, a kötési kapacitás vagy az affinitásállandók mérésekor. Elkerülhetővé teszi az időigényes metodikát, a speciális berendezések szükségességét, a hígítási hibákat és a kötési egyensúly változásait.

Az ultraszűrés nem változtatja meg a szabad mikroanyagok ligandum-koncentrációját. A fehérje szelektíven a mintatérfogat egy részébe (a koncentrártumba) kerül, míg a szabad ligandum az oldószerezrel együtt lényegében akadálytalanul áthalad a membránon.

A tömeghatás és a tömegmegmaradás törvényei az ideális fehérjekötődésre azt mondják ki, hogy a szabad ligandum koncentrációja az ultraszűrletben állandó marad, feltéve, hogy a moláris kötési kapacitás és az affinitás független a teljes fehérjekoncentrációtól. Az egymást követő ultraszűrlet-frakciókban állandó szabad ligandum-koncentrációt mutató, több rendszerre vonatkozó eredmények alátámasztják ezeket az előrejelzéseket.

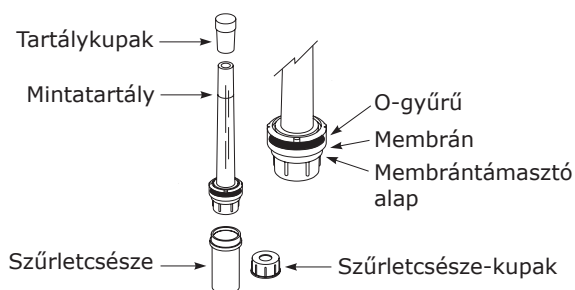
A nem membránvisszatartás vagy adszorpció által okozott szabad ligandumkoncentráció-változás megváltozott kapacitására vagy affinitására utal a kötőfehérjék aggregációja vagy egyéb nem ideális fehérje-fehérje kölcsönhatások miatt. Az alkalmazástól függően a kapott filtrátum a szabad ligandum-koncentrációjára vonatkozóan kvantitatív vagy kvalitatív módon elemezhető.

Javasolt felhasználás

A Centrifree® eszközök nem steril, eldobható ultraszűrő eszközök, amelyek célja, hogy kis térfogatú (0,15–1,0-mL) biológiai mintákban, pl. szérumban, vizeletben, agy-gerincvelői folyadékban és más testnedvekben elválasszák a fehérjékhez kötött mikroanyagokat. Egyszer használatos eszköz, amelyet laboratóriumi szakemberek általi használatra terveztek.

A Centrifree® eszközök alkatrészei

A Centrifree® ultraszűrő eszköz maximális hatékonyságot biztosít több minta feldolgozásához. Mindegyik egység egy membránból és egy, a mintatartály és az alap közé rögzített O-gyűrűből áll. Az alaphoz egy levehető szűrletcsésze van rögzítve. A Centrifree® eszköz egyszeri használatra szolgál.



Szállított anyagok

A Centrifree® ultraszűrő eszközöket az alábbi alkatrészekkel szállítják.

- 50 ultraszűrő eszköz
- 50 tartálykupak
- 50 szűrletcsésze
- 50 szűrletcsésze-kupak

MEGJEGYZÉS: A piros tartálykupakok a minta elpárolgásának és a CO₂-vesztesség miatti pH-változásnak a megakadályozására szolgálnak.

Szükséges eszközök

- Centrifuga rotoradapterrel vagy hordozóval, amely 17 × 100 mm-es csövek befogadására alkalmas, és 1000–2000 × g teljesítményre képes.

MEGJEGYZÉS: Az optimális oldószerez-áramlás érdekében használjon rögzített szögű centrifuga rotorokat.

- Pasteur- vagy fix térfogatú pipetta a minta beadásához.

Tárolás és stabilitás

A tárolási körülményeket lásd a termék címkéjén.

Használati útmutató

- A Centrifree® eszközök szérummal, plazmával vagy más biológiai folyadékokkal is használhatók. A hatékonyabb áramlási sebesség érdekében a mintából centrifugálással távolítsa el a fibrint, mielőtt a tartályba töltené.
- Az ajánlott mintatérfogat 0,15–1,0 mL.
- A legjobb eredmény elérése érdekében lengőkosaras centrifuga rotor helyett használjon inkább rögzített szögűt, és centrifugálja 1000–2000 × g sebességgel.

VIGYÁZAT: Ne üzemeltesse 2000 × g feletti relatív centrifugális erővel.

- Végezzen előzetes ligandumadszorpciós és fehérje-visszatartási vizsgálatokat a rendszer tervezett alkalmazásra való alkalmasságának biztosítása érdekében.
- A Centrifree® ultraszűrő eszközöket biológiai folyadékokkal és vizes oldatokkal való használatra tervezték. Ne használja az eszközöket szerves oldószerekkel.
- Határozza meg az alkalmazásnak megfelelő hőmérsékletet. Tartsa fenn a kívánt hőmérsékletet fűtött centrifuga használatával vagy a centrifuga rotorjának és kamrájának előmelegítésével. Rögzített szögű rotorban az eszköz tartalma 5–10 perc alatt éri el a termikus egyensúlyt a rotorral. A Centrifree® eszközök által elért gyors ultraszűrési sebesség minimalizálja a hőmérséklet ligandumkötésre gyakorolt hatását.
- Ne használja makromolekulák koncentrálására és visszanyerésére.
- Ne autoklávozza az alkatrészeket.
- A Centrifree® eszközöket ne használja újra.
- Ne hagyja, hogy az ultraszűrő eszközökben lévő membrán kiszáradjon, ha már nedves. Ha az öblítést követően nem használja fel azonnal az eszközt, hagyjon folyadékot a membránon az eszköz használatáig.
- A eszközben lévő Ultracel® membrán nyomokban glicerint tartalmaz (~ 2 µL). Ha ez az anyag zavarja az elemzést, öblítse ki az eszközt ionmentesített vízzel vagy 0,1 N NaOH-val, amíg az interferencia meg nem szűnik. Ha a glicerint eltávolításához 0,1 N NaOH-t használ, használat előtt alaposan öblítse ki az eszközt ionmentesített vízzel vagy pufferrel. Centrifugálja legalább 15 percig, hogy a lehető legtöbb folyadékot eltávolítsa. Az öblítés után visszamaradt folyadék (~ 10 µL) okozta hígítási hibák elkerülése érdekében távolítsa el az ultraszűrlet első aliquot részét.

A Centrifree® ultraszűrő eszközök használata

A Centrifree® eszköz használata előtt távolítsa el a piros tartálykupakot.

1. Tartsa a tartályt körülbelül 45°-os szögben úgy, hogy a pipetta hegye a tartály falához érjen. A mintaoldatot egyenletesen, folyamatos áramlással adja hozzá a légelezárodás elkerülése érdekében.



MEGJEGYZÉS: Kerülje a membrán érintkezését a pipetta hegyével.

2. Fedje le a mintatartályt, majd helyezze az eszközt egy 17 × 100 mm-es adapterrel ellátott centrifuga rotorba. Ellensúlyozza a centrifugát egy hasonló eszközzel.

MEGJEGYZÉS: A piros tartálykupak legfeljebb 3-4 mm-rel nyúlhat túl a tartály tetején. A további kompresszió előszűrődést okozhat, ami később analitikai hibákhoz vezethet, ha a minta nem a kívánt üzemi hőmérsékleten van.

MEGJEGYZÉS: Használat előtt ellenőrizze a centrifuga mozgásterét.

3. Állítsa be az eszközt és a mintát az alkalmazáshoz szükséges hőmérsékletre.
4. Az eszközt 1000-2000 × g sebességgel kell centrifugálni a kívánt szűrletmennyiség eléréséhez szükséges ideig. A centrifugálási időre vonatkozó irányelveket lásd az „Ultraszűrési sebesség” szakaszban.
5. Óvatosan vegye le az eszközt a centrifuga rotorjáról, és csatlakoztassa le az ultraszűrletet tartalmazó szűrletcsészét. Fedje le a szűrletcsészét a mellékelt kupakkal, amíg sor nem kerül az ultraszűrlet elemzésére.

FIGYELMEZTETÉS: A használt alkatrészek hulladékkezelése során kövesse a potenciálisan fertőző vagy veszélyes biológiai anyaggal szennyezett tárgyak ártalmatlanítására vonatkozó óvintézkedéseket.

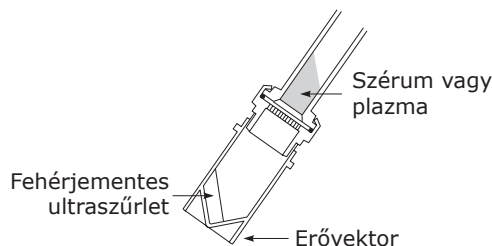
MEGJEGYZÉS: Előfordulhat, hogy a szűrő nem működik megfelelően, ha nedvesítés után hagyja kiszáradni.

Teljesítmény

A következő szakaszok különböző teljesítményjellemzőket ismertetnek, beleértve a polarizációs szabályozást, az ultraszűrési sebességet, a membránteljesítményt, a pH-szabályozást és a nem specifikus adszorpciót.

Polarizációs szabályozás

A rögzített szögű rotor használata biztosítja a polarizáció szabályozását, és minimalizálja a fehérje-fehérje kölcsönhatásokból eredő műtermékek előfordulását. A szög ellensúlyozza a visszanyert fehérje felhalmozódását a membránfelszínen, mivel ez a sűrű réteg kifelé csúszik és a membrán szélén halmozódik fel. A lengőkosaras rotorban a polarizációs réteg a teljes membránfelületen tömörül, korlátozva az oldószer áramlását.



Ultrafiltrációs sebesség

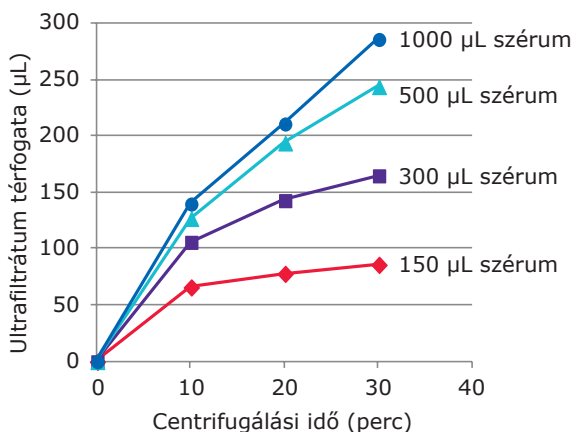
Az áramlási sebesség függ a minta fehérjekoncentrációjától, a kiindulási térfogattól, a relatív centrifugális erőtől (RCF), a rotor típusától és a hőmérséklettől. A nagy áramlási sebesség a maximális membránfelületnek, a polarizáció szabályozásának és a 300 µL-nél nagyobb mintatérfogatnál elért optimális transzmembrán nyomásnak köszönhető. Az optimális szűrési sebesség 1000-2000 × g-nél érhető el. A nagyobb centrifugális erő nem növeli jelentősen az áramlási sebességet, ezért nem ajánlott.

A rögzített szögű és a lengőkosaras centrifugarotor összehasonlítása

Rotor	RCF (× g)	Ultrafiltrátum tipikus térfogata (µL)
Rögzített szögű (33°)	1000	140–150
Lengőkosaras	1000	115–120

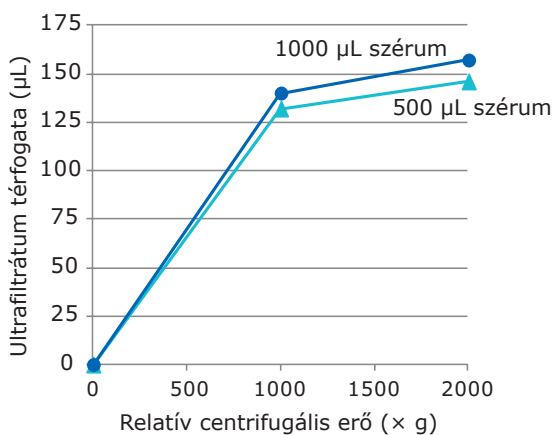
1 mL normál humán szérum, 10 perces centrifugálás

Tipikus ultrafiltrációs sebességek



Feltételek: 33°-os rögzített szögű rotor, 25 °C, 1000 × g

A relatív centrifugális erő hatása



Feltételek: 33°-os rögzített szögű rotor, 25 °C, 10 perc centrifugálás

Membránteljesítmény

Az anizotróp, hidrofil Ultracel® ultraszűrő membrán nagy szelektív áteresztőképessége a szűk pórusméret-eloszlásnak köszönhető. A Centrifree® eszközök jellemzően visszatartják a szérumfehérje 99,9%-át és < 5% L-tiroxint (0,1 mg/mL 0,1 N NaOH-ban).

Az egyes alkalmazások fehérje-visszatartási követelményei a ligandumkötés mértékétől függenek. Egy 90%-ban kötött ligandum esetében az 1%-os szérumfehérje-szivárgás a szabad ligandum koncentrációjának 9%-os túlbecslését eredményezné. A szabad tiroxin (> 99,95%-ban kötött) hígítatlan szérumban történő mérése esetén > 99,995%-os fehérje-visszatartás szükséges < 10%-os hibaarányhoz. A Centrifree® eszközök legfeljebb 99%-ban kötött ligandumok elválasztására javasoltak.

Esetenként előfordulhat szérumszivárgás a membrán hibája vagy mechanikai hiba miatt. Ha a szivárgás nagyobb, mint 20%, az ultraszűrlet sárga színű lesz. A 20%-nál kisebb szivárgás meghatározásához az ultraszűrlet fehérjekoncentrációjának mérése szükséges érzékeny mikrofehérje-méréssel. Ha nagyobb megbízhatóságra van szüksége, de el szeretné kerülni a rutinszerű fehérjemérést, szűrje a mintát duplikált eszközökben.

pH-szabályozás

Határozza meg a pH-ingadozás elfogadható határértékét az egyes ligandum-kötő rendszerek esetében. Kísérleti úton a minta pH-ja szabályozható anaerob mintakezeléssel és -átadással, a minta 5% CO₂-dal és 95% O₂-nel való gázosításával vagy kis mennyiségű koncentrált puffer hozzáadásával, feltéve, hogy a pufferion nem változtatja meg a ligandumkötési egyensúlyt.

Nem specifikus adszorpció

Az adszorpció veszteségek a ligandum koncentrációjától, ionos és hidrofób jellegétől, a komponensek felületével való érintkezés hőmérsékletétől és idejétől, valamint a minta mátrixától függenek. A ligandum visszanyerése a fehérjementes szérumszűrletéből általában nagyobb, mint a pufferből, és jobban tükrözi a teljes szérummal történő viselkedést. A fehérjementes ultraszűrletben lévő alacsony molekulatömegű, szabad zsír- és aminosavak kölcsönhatásba lépnek a komponensek felületeivel és passzíválják azokat, míg a szérumfehérjék általában passzíválják a teljes szérum által érintett felületeket. A fehérjementes ultraszűrletből vagy pufferből történő alacsony visszanyerés adszorpció veszteségekre és/vagy a ligandum membránvisszatartására utalhat. A ligandum visszanyerése a Centrifree® eszközökben a kötőfehérje és a konkurens mikroanyagok jelenlétében a legpontosabb.

Specifikációk

Maximális mintatérfogat	1,0 mL
Minimális mintatérfogat	0,15 mL
Maximális relatív centrifugális erő	2000 × g
Aktív membránfelület	0,92 cm ²
Visszatartott térfogat (membrán és támasz)	10 µL
Méret	
A lezárt eszköz hossza a szűrletcsészével	95 mm
Átmérő	16 mm
Felhasznált anyagok	
Membrán	Ultracel® regenerált cellulóz
Mintatartály	Polikarbonát
Membrántámasztó alap	Polikarbonát
Szűrletcsésze	Polietilén
Szűrletcsésze-kupak	Polietilén
O-gyűrű	Etilén-propilén-dién-monomer (EPDM)

VIGYÁZAT: A Centrifree® alkatrészei nem autoklávozhatók. Ne használja szerves oldószerekkel.

Kémiai kompatibilitás

A Centricon® eszközök biológiai folyadékokkal és vizes oldatokkal való használatra szolgálnak. Használat előtt ellenőrizze a minta és az eszköz kémiai kompatibilitását. Az elérhetőségekért látogasson el a SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility oldalra.

Termék rendelése

A termékek online, a SigmaAldrich.com oldalon vásárolhatók meg.

Jelölésmeghatározó

Szimbólum	Definíció	Szimbólum	Definíció
	Katalógusszám		Gyártási időpont
	Ne használja újra		Gyártó
	Tételkód		Nem steril termék

Figyelmeztetés

Vevőinknek alkalmazási technológiákról és jogszabályi ügyekről legjobb tudásunk és képességünk szerint, de elkötelezettség és felelősségvállalás nélkül adunk információt és tanácsot. A meglevő törvényeket és jogszabályokat vevőinknek minden esetben figyelembe kell venniük. Ez érvényes a harmadik fél bármilyen jogaira is. Információnk és tanácsaink nem mentik fel vevőinket a felelősség alól, hogy ellenőrizték termékeink alkalmasságát az adott célra.

Gyűjtés és hulladékkezelés

Minden mintát egyértelműen jelölni kell. A minták kinyeréséhez és előkészítéséhez megfelelő eszközöket kell használni.

MEGJEGYZÉS: Kövesse a potenciálisan fertőző vagy veszélyes biológiai anyaggal szennyezett tárgyak ártalmatlanítására vonatkozó óvintézkedéseket a vonatkozó nemzetközi, szövetségi, állami és helyi előírásoknak megfelelően.

Műszaki támogatás

Látogassa meg a műszaki szerviz oldalunkat a honlapunkon SigmaAldrich.com/techservice.

A készülékkel kapcsolatos bármilyen súlyos eseményt jelenteni kell a gyártónak és a felhasználó tartózkodási helye szerinti ország illetékes hatóságának.

Általános garancia

A jelen közleményben felsorolt termékekre vonatkozó garanciáról a SigmaAldrich.com/terms oldalon tájékozódhat.

Úvod

Prostředky Centrifree® metodou ultrafiltrace rychle a účinně oddělují volnou frakci mikrosolutu od mikrosolutu vázaného na protein v malých objemech (0,15–1,0 mL) séra, plazmy a jiných biologických vzorků. K přesnému oddělení dochází během minut bez jakéhokoli naředění, změny fyziologického pH, iontového složení nebo koncentrace nenavázaného mikrosolutu. Tyto prostředky obsahují hydrofilní membrány s nízkou absorpcí a O-kroužky bez plastifikátorů. Díky tomu je výtěžnost procesu vynikající. Zadržný objem je 10 µL nebo méně.

Oproti dialýze, gelové filtraci či adsorpci na aktivní uhlí je ultrafiltrace při měření koncentrace volného ligandu, vazebné kapacity či afinitní konstanty přesnější. Není zapotřebí časově náročných postupů, specializovaného vybavení, nevznikají chyby při naředování a nedochází k posunu vazebné rovnováhy.

Ultrafiltrace nemění koncentraci volného ligandu mikrosolutu. Protein se selektivně rozdělí do frakce objemu vzorku (koncentrátu) a volný ligand v podstatě bez překážek prochází membránou společně s rozpouštědlem.

Zákon působících hmot a zákon zachování hmotnosti pro vazbu ideálního proteinu říkají, že koncentrace volného ligandu v ultrafiltrátu bude konstantní za předpokladu, že molární vazebná kapacita a afinita nezávisí na celkové koncentraci proteinu. Tyto předpoklady podporují výsledky u několika systémů, které ukazují konstantní koncentraci volného ligandu v následných frakcích ultrafiltrátu.

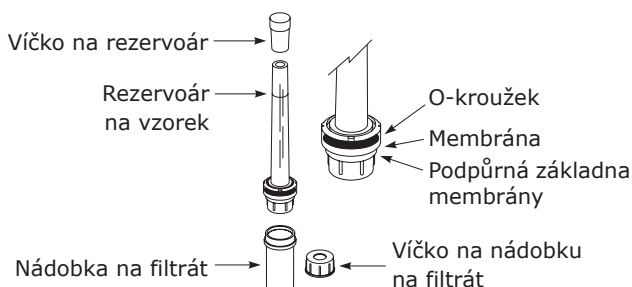
Mění se koncentrace volného ligandu, která není způsobena retencí či adsorpcí membránou, je důkazem pozměněné kapacity či afinity vazebných proteinů v důsledku agregace či jiných neideálních interakcí protein-protein. V závislosti na aplikaci můžete výsledný filtrát analyzovat na koncentraci volného ligandu buď kvantitativně, nebo kvalitativně.

Určené použití

Prostředky Centrifree® jsou nesterilní, jednorázové ultrafiltrační prostředky určené k separaci volné frakce mikrosolutu od mikrosolutu vázaného na protein v malých objemech (0,15–1,0 mL) biologických vzorků, jako je sérum, moč, mozkomíšní mok (CSF) nebo jiné tělesné tekutiny. Prostředek je určen k jednorázovému použití a profesionálnímu použití v laboratoři.

Součásti prostředku Centrifree®

Ultrafiltrační prostředek Centrifree® přináší maximální účinnost při zpracování více vzorků. Jednotka sestává z membrány a O-kroužku, který je permanentně utěsněn mezi rezervoárem na vzorek a podpůrnou základnou. K základně je uchycena odnímatelná nádobka na filtrát. Prostředek Centrifree® je určen pouze k jednorázovému použití.



Dodávané materiály

S ultrafiltračními prostředky Centrifree® jsou dodávány následující součásti:

- 50 ultrafiltračních prostředků
- 50 víček na rezervoár
- 50 nádobek na filtrát
- 50 víček na nádobky na filtrát

POZNÁMKA: Dodávaná červená víčka mají zabránit odpařování vzorku a změnám pH v důsledku ztrát CO₂.

Potřebné vybavení

- Centrifuga s adaptéry rotoru na zkumavky o rozměrech 17 × 100 mm, která je schopná zrychlení 1 000–2 000 × g.

POZNÁMKA: Pro optimální průtok rozpouštědla se doporučuje rotor s fixním úhlem.

- Pasteurovy pipety nebo pipety s neměnným objemem pro nanášení vzorku.

Uchovávání a stabilita

Podmínky uchovávání viz štítek produktu.

Návod k použití

- Prostředky Centrifree® je možné používat pro vzorky séra, plazmy nebo jiných biologických tekutin. Účinnějšího průtoku se dosáhne odstraněním fibrinu ze vzorku odstředěním před tím, než je vzorek nanesen do rezervoáru.
- Doporučený objem vzorku je 0,15–1,0 mL.
- Nejlepších výsledků je dosaženo spíše při použití rotoru centrifugy s fixním úhlem (v porovnání s výkyvným rotorem) a odstředěním při 1 000–2 000 × g.
UPOZORNĚNÍ: Nepoužívejte vyšší relativní odstředivé síly než 2 000 × g.
- Abyste ověřili, že je pro zamýšlenou aplikaci systém vhodný, proveďte nejprve předběžné studie adsorpce ligandu a retence proteinů.
- Ultrafiltrační prostředky Centrifree® jsou určeny pro použití s biologickými tekutinami a vodnými roztoky. Prostředky nepoužívejte s organickými rozpouštědly.
- Stanovte správnou teplotu pro danou aplikaci. Požadovanou teplotu udržujte použitím vyhřívané centrifugy nebo předehřátím rotoru a komory centrifugy. V případě rotoru s fixním úhlem dosáhne obsah prostředku tepelné rovnováhy s rotorem během 5–10 minut. Díky vysoké rychlosti ultrafiltrace v prostředcích Centrifree® se minimalizují účinky teploty na vazbu ligandu.
- Nepoužívejte pro zakoncentrování a získání makromolekul.
- Součásti prostředku nesterilizujte v autoklávu.
- Prostředky Centrifree® nepoužívejte opakovaně.
- Po navlhčení nenechte membránu v ultrafiltračních prostředcích vyschnout. Pokud nebudete prostředek ihned po propláchnutí používat, tekutinu ponechte na membráně až do doby, kdy bude prostředek použit.
- Membrána Ultracel® v prostředku obsahuje stopová množství glycerinu (~ 2 µL). Pokud tato látka s analýzou interferuje, před použitím prostředek proplachujte deionizovanou vodou nebo 0,1N NaOH tak dlouho, dokud již nebude interference pozorována. Pokud pro odstranění glycerinu použijete 0,1N NaOH, před použitím prostředek důkladně propláchněte deionizovanou vodou nebo puftrem. Prostředek odstřeďte po dobu alespoň 15 minut, aby došlo k odstranění co největšího množství tekutiny. Abyste zabránili chybě v důsledku naředění zbytkovou tekutinou (~ 10 µL) po proplachování, první alikvotu ultrafiltrátu zlikvidujte.

Jak ultrafiltrační prostředky Centrifree® používat

Před použitím prostředku Centrifree® sejměte červené víčko rezervoáru.

1. Rezervoár držte nakloněný v úhlu 45° a špičkou pipety se dotýkejte stěny rezervoáru. Vzorek přidejte plynule v jednom rovnoměrném proudu, aby nedošlo ke vniknutí vzduchu.



POZNÁMKA: Nedotýkejte se membrány špičkou pipety.

2. Rezervoár vzorku uzavřete víčkem, poté prostředek umístěte do rotoru centrifugy s adaptéry o velikosti 17 × 100 mm. Centrifugu vyvažte obdobným prostředkem.

POZNÁMKA: Červené víčko rezervoáru by vršek rezervoáru nemělo přesahovat o více než 3–4 mm. Větší stlačení může vyvolat předfiltraci, což pak následně, nemá-li vzorek požadovanou provozní teplotu, může způsobit analytické chyby.

POZNÁMKA: Před použitím zkontrolujte okolí centrifugy.

3. Prostředek a vzorek nechte ustálit na teplotě, která je pro danou aplikaci potřeba.
4. Pro získání požadovaného objemu filtrátu prostředek odstřeďte při 1 000–2 000 × g po potřebnou dobu. Pokyny k době odstředění naleznete v oddílu „Rychlost ultrafiltrace“.
5. Prostředek opatrně vyjměte z rotoru centrifugy a odpojte nádobku na filtrát obsahující ultrafiltrát. Nádobku na filtrát uzavřete dodaným víčkem do doby, než bude ultrafiltrát analyzován.

VAROVÁNÍ: Při likvidaci použitých částí postupujte dle bezpečnostních opatření pro likvidaci položek kontaminovaných potenciálně infekčním a nebezpečným biologickým materiálem.

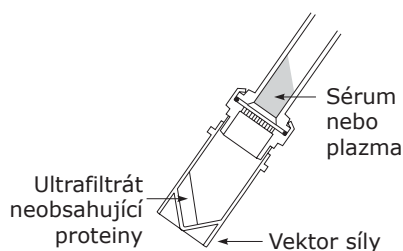
POZNÁMKA: Pokud filtr necháte po navlhčení vyschnout, nemusí fungovat správně.

Funkčnost

V následujících oddílech jsou diskutovány různé aspekty funkční způsobilosti, včetně kontroly polarizace, rychlosti ultrafiltrace, funkčnosti membrány, kontroly pH a nespecifické adsorpce.

Kontrola polarizace

Použití rotoru s fixním úhlem umožňuje kontrolu polarizace a minimalizuje vznik potenciálních artefaktů v důsledku interakcí protein-protein. Náklon působí proti hromadění zachycených proteinů na povrchu membrány, neboť se tato hustá vrstva posouvá směrem ven a hromadí se na kraji membrány. Ve výkyvném rotoru se polarizační vrstva usazuje po celém povrchu membrány a brání toku rozpouštědla.



Rychlost ultrafiltrace

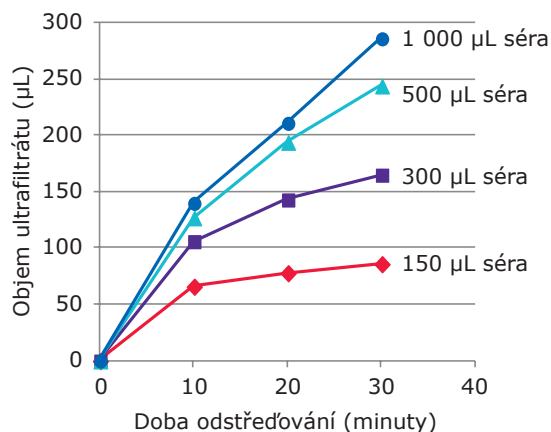
Rychlost toku závisí na koncentraci proteinu ve vzorku, počátečním objemu, relativním odstředivém zrychlení (RCF), typu rotoru a teplotě. K vysoké rychlosti průtoku dochází při maximálním využití plochy povrchu membrány, kontrole polarizace a dosažení optimálního transmembránového tlaku při objemech vzorku vyšších než 300 μL . Optimální rychlosti filtrace je dosaženo při 1 000–2 000 $\times g$. Vyšší odstředivá síla významně nezvyšuje rychlost průtoku a nedoporučuje se.

Porovnání rotoru s fixním úhlem a výkyvného rotoru

Rotor	RCF ($\times g$)	Typický objem ultrafiltrátu (μL)
S fixním úhlem (33°)	1 000	140–150
Výkyvný rotor	1 000	115–120

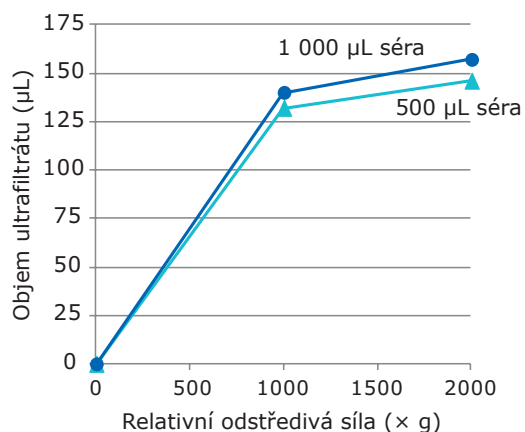
1 mL normálního lidského séra, 10 minut odstředění

Typická rychlost ultrafiltrace



Podmínky: Rotor s fixním úhlem 33° , 25°C , 1 000 $\times g$

Účinek relativní odstředivé síly



Podmínky: Rotor s fixním úhlem 33° , 25°C , 10 minut odstředění

Funkčnost membrány

Vysoká selektivní permeabilita anizotropní, hydrofilní ultrafiltrační membrány Ultracel® je způsobena úzkou distribucí velikosti pórů. Typicky prostředky Centrifree® zadrží 99,9% sérových proteinů a < 5% L-thyroxinu (0,1 mg/mL v 0,1N NaOH).

Požadavky na retenci proteinů dané aplikace závisí na stupni vazby ligandu. V případě ligandu, který je z 90% vázaný, by při úniku 1% sérových proteinů došlo k 9% nadhodnocení koncentrace volné frakce ligandu. Při stanovení volného thyroxinu (> 99,95% vázaný) v neředěném séru, je pro < 10% chybu vyžadována retence proteinů > 99,995%. Prostředky Centrifree® jsou doporučeny pro separaci ligandů, které jsou vázány až do 99%.

Výjimečně může dojít v důsledku defektu v membráně nebo mechanického defektu k úniku séra. Je-li únik větší než 20%, ultrafiltrát se zbarví žlutě. Pro stanovení úniku nižšího, než je 20%, je zapotřebí změřit koncentraci proteinů v ultrafiltrátu citlivou analýzou na mikroproteiny. Pokud potřebujete větší spolehlivost, ale nechcete používat rutinní proteinové analýzy, vzorek přefiltrujte duplikátně ve více prostředcích.

Kontrola pH

Pro každý vazebný systém ligandu je zapotřebí stanovit přijatelnou mez proměnlivosti pH. Experimentálně je možné pH vzorku kontrolovat anaerobním zacházením a přenosem vzorku, vystavením vzorku atmosféře o složení 5% CO₂ a 95% O₂ nebo přidáním malého objemu koncentrovaného pufru za předpokladu, že ionty obsažené v pufru nemění vazebnou rovnováhu ligandu.

Nespecifická adsorpce

Ztráty adsorpcí závisí na koncentraci ligandu, jeho iontové a hydrofobní povaze, teplotě a době styku s povrchem částí prostředku a na matrici vzorku. Výťažnost ligandu, který byl přidán do ultrafiltrátu séra neobsahujícího proteiny, je obecně vyšší než z pufru, a na jejím základě je možné lépe předvídat chování v případě plného séra. Nízkomolekulární, volné mastné kyseliny a aminokyseliny v ultrafiltrátu neobsahujícím proteiny interagují s povrchy součástí prostředku a pasivují je, zatímco sérové proteiny obecně pasivují povrchy v kontaktu s plným sérem. Nízká výťažnost jak z ultrafiltrátu neobsahujícího proteiny, tak pufru, může naznačovat adsorpční ztráty nebo membránovou retenci ligandu. Výťažnost ligandu v prostředcích Centrifree® je nejpřesnější v přítomnosti vazebného proteinu a kompetujících mikrosolutů.

Specifikace

Maximální objem vzorku	1,0 mL
Minimální objem vzorku	0,15 mL
Maximální relativní odstředivá síla	2 000 × g
Aktivní plocha membrány	0,92 cm ²
Zadržný objem (membrána a základna)	10 µL
Rozměry	
Délka zavřeného prostředku s nádobkou na filtrát	95 mm
Průměr	16 mm
Konstrukční materiály	
Membrána	Regenerovaná celulóza Ultracel®
Rezervoár na vzorek	Polykarbonát
Podpůrná základna membrány	Polykarbonát
Nádobka na filtrát	Polyethylen
Víčko na nádobku na filtrát	Polyethylen
O-kroužek	Ethylen-propylen-dienový monomer (EPDM)

UPOZORNĚNÍ: Součásti Centrifree® nelze sterilizovat v autoklávu. Nepoužívejte s organickými rozpouštědly.

Chemická kompatibilita

Prostředky Centrifree® jsou určeny pro použití s biologickými tekutinami a vodnými roztoky. Před použitím prostředku zkontrolujte, zda je s ním vzorek chemicky kompatibilní. Více informací naleznete na

SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility.

Objednání výrobku

Výrobky je možné zakoupit online na adrese SigmaAldrich.com.

Definice značek

Značka	Definice	Značka	Definice
	Katalogové číslo		Datum výroby
	Nepoužívat opětovně		Výrobce
	Kód dávky		Nesterilní výrobek

Poznámka

Naším zákazníkům poskytujeme informace a rady týkající se aplikačních technologií a právních předpisů na základě našich nejlepších vědomostí a schopností, nepřebíráme ale žádné závazky nebo odpovědnost. Naši zákazníci musí ve všech případech brát v úvahu platné zákony a předpisy a dodržovat je. Uvedené platí i pro případná práva třetích stran. Naše informace a rady nezbavují naše zákazníky jejich vlastní odpovědnosti za kontrolu vhodnosti našich produktů k předpokládanému účelu.

Sběr a likvidace

Všechny vzorky musí být jasně označeny. K odběru vzorků a jejich přípravě je nutné použít vhodné nástroje.

POZNÁMKA: Při likvidaci položek kontaminovaných potenciálně infekčním či nebezpečným biologickým materiálem dodržujte bezpečnostní opatření a postupujte dle všech platných mezinárodních, federálních, státních a lokálních nařízení.

Technická podpora

Informace najdete na naší stránce technické podpory SigmaAldrich.com/techservice.

Všechny závažné příhody související s tímto prostředkem musí být hlášeny výrobci a příslušnému orgánu v zemi uživatele.

Standardní záruka

Informace o platné záruce na výrobky uvedené v tomto dokumentu lze najít na stránce SigmaAldrich.com/terms.

Wprowadzenie

Urządzenia Centrifree® szybko i skutecznie oddzielają próbki surowicy, osocza i inne próbki biologiczne w małych objętościach (0,15–1,0 mL) od związanych z białkiem mikrosubstancji rozpuszczonych przy użyciu metody zwanej ultrafiltracją. Dokładny podział następuje w ciągu kilku minut bez rozcieńczania, zmiany fizjologicznego pH, składu jonowego lub stężenia niezwiązanej mikrosubstancji rozpuszczonej. Urządzenia te zawierają membrany hydrofilowe o niskiej adsorpcyjności i pierścienie O-ring bez plastifikatorów, aby zapewnić doskonałe odzyskiwanie. Objętość zatrzymania wynosi nie więcej niż 10 µL.

W przeciwieństwie do dializy, filtracji żelowej czy adsorpcji na węglu drzewnym, ultrafiltracja zapewnia lepszą dokładność pomiaru stężenia wolnego ligandu, zdolności wiązania lub stałych powinowactwa. Eliminuje to czasochłonną metodologię, konieczność użycia specjalistycznego sprzętu, błędy rozcieńczania i przesunięcia w równowadze wiązania.

Ultrafiltracja nie zmienia stężenia wolnego ligandu mikrosubstancji rozpuszczonej. Białko zostaje selektywnie podzielone na frakcje objętości próbki (koncentrat), podczas gdy wolny ligand przechodzi przez membranę w zasadzie bez przeszkód wraz z rozpuszczalnikiem.

Prawa działania masy i zachowania masy dla idealnego wiązania białka przewidują, że stężenie wolnego ligandu w ultrafiltracie pozostanie stałe, pod warunkiem, że molowa zdolność wiązania i powinowactwo są niezależne od całkowitego stężenia białka. Wyniki dla kilku systemów wykazujących stałe stężenie wolnego ligandu w kolejnych frakcjach ultrafiltratu potwierdzają te przewidywania.

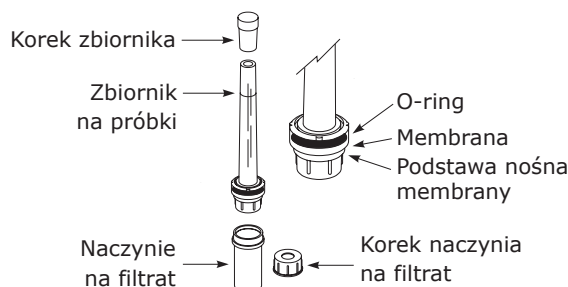
Zmieniające się stężenie wolnego ligandu, które nie jest spowodowane retencją lub adsorpcją na membranie, jest dowodem na zmienioną zdolność lub powinowactwo białek wiążących z powodu agregacji lub innych nieidealnych interakcji białko-białko. W zależności od zastosowania uzyskany filtrat można poddać analizie ilościowej lub jakościowej pod kątem stężenia wolnego ligandu.

Przeznaczenie

Urządzenia Centrifree® są niejadalnymi, jednorazowymi urządzeniami ultrafiltracyjnymi, które są przeznaczone do oddzielania wolnych od związanych z białkiem mikrosubstancji rozpuszczonych w małych objętościach (0,15–1,0 mL) próbek biologicznych, np. surowicy, moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego i innych płynów ustrojowych. Urządzenie przeznaczone do jednorazowego użytku i stosowania przez specjalistę laboratoryjnego.

Elementy urządzenia Centrifree®

Urządzenie ultrafiltracyjne Centrifree® zapewnia maksymalną wydajność przy przetwarzaniu wielu próbek. Każda jednostka składa się z membrany i pierścienia O-ring zapewniającego stałe uszczelnienie pomiędzy zbiornikiem na próbkę a podstawą nośną. Do podstawy przymocowane jest zdejmowane naczynie na filtrat. Urządzenie Centrifree® jest przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.



Dostarczane materiały

Następujące komponenty są dostarczane z urządzeniami ultrafiltracyjnymi Centrifree®.

- 50 urządzeń ultrafiltracyjnych
- 50 korków na zbiornik
- 50 pojemników na filtrat
- 50 korków na pojemniki na filtrat

UWAGA: Czerwone korki na zbiornik mają na celu zapobieganie parowaniu próbki i zmianie pH w wyniku utraty CO₂.

Wymagane wyposażenie

- Wirówka z adapterem rotora lub nośnikami, które mogą pomieścić probówki 17 × 100 mm i są zdolne do wirowania z prędkością 1000–2000 × g.

UWAGA: Aby uzyskać optymalny przepływ rozpuszczalnika, należy użyć rotora wirówki o stałym kącie.

- Pipeta Pasteura lub pipeta o stałej objętości do dostarczania próbek.

Przechowywanie i stabilność

Sprawdzić warunki przechowywania na etykiecie produktu.

Wskazówki dotyczące użytkowania

- Z urządzeniami Centrifree® można używać surowicy, osocza lub innych płynów biologicznych. Aby uzyskać bardziej wydajne natężenia przepływu, należy usunąć fibrynę przez odwirowanie próbki przed załadowaniem do zbiornika.
- Zalecana objętość próbki to 0,15–1,0 mL.
- Aby uzyskać najlepsze wyniki, należy użyć rotora wirówki o stałym kącie zamiast rotora z wychylnym koszem i wirować z prędkością 1000–2000 × g.

PRZESTROGA: Nie używać przy względnej sile odśrodkowej powyżej 2000 × g.

- Przeprowadzić wstępne badania adsorpcji ligandów i retencji białek, aby zapewnić przydatność systemu do zamierzonego zastosowania.
- Urządzenia ultrafiltracyjne Centrifree® są przeznaczone do stosowania z płynami biologicznymi i roztworami wodnymi. Nie używać urządzeń z rozpuszczalnikami organicznymi.
- Określić odpowiednią temperaturę dla danego zastosowania. Utrzymywać pożądaną temperaturę, używając podgrzewanej wirówki lub podgrzewając wstępnie rotor i komorę wirówki. W rotorze z koszem o stałym nachyleniu zawartość urządzenia osiąga równowagę termiczną z rotorem w ciągu 5–10 minut. Szybkie tempo ultrafiltracji osiągane przez urządzenia Centrifree® minimalizuje wpływ temperatury na wiązanie ligandów.
- Nie stosować do zatężania i odzyskiwania makrocząsteczek.
- Nie autoklawować elementów urządzenia.
- Nie używać urządzeń Centrifree® ponownie.
- Nie dopuścić do wyschnięcia membrany w urządzeniach ultrafiltracyjnych po zamoczeniu. Jeżeli urządzenie nie jest używane niezwłocznie po płukaniu, na membranie należy pozostawić płyn do momentu użycia urządzenia.
- Membrana Ultracel® w urządzeniu zawiera śladowe ilości gliceryny (ok. 2 µL). Jeśli ta substancja zakłóca analizę, należy przepłukać urządzenie wodą dejonizowaną lub 0,1 N NaOH aż do ustąpienia zakłóceń. Jeśli do usuwania gliceryny używany jest 0,1 N NaOH, przed użyciem należy dokładnie wypłukać urządzenie wodą dejonizowaną lub buforem. Wirować przez co najmniej 15 minut, aby usunąć jak najwięcej płynu. Aby uniknąć błędów rozcieńczenia spowodowanego przez uwięziony płyn (ok. 10 µL) po płukaniu, pierwszą porcję ultrafiltratu należy wyrzucić.

Sposób korzystania z urządzeń ultrafiltracyjnych Centrifree®

Przed użyciem urządzenia Centrifree® należy zdjąć czerwony korek ze zbiornika.

1. Trzymać zbiornik pod kątem mniej więcej 45° tak, aby końcówka pipety dotykała ścianki zbiornika. Płynnie, jednym równomiernym przepływem dodać roztwór próbki, aby uniknąć zablokowania powietrza.



UWAGA: Unikać dotykania membrany końcówką pipety.

2. Zamknąć zbiornik na próbkę, a następnie umieścić urządzenie w rotorze wirówki z adapterami 17 × 100 mm. Zrównoważyć wirówkę podobnym urządzeniem.

UWAGA: Czerwony korek zbiornika powinien wystawać nie więcej niż 3–4 mm w dół nad górną część zbiornika. Dalsze ściskanie może spowodować filtrację wstępną, która może następnie spowodować błędy analityczne, jeśli próbka nie osiągnie pożądanego temperatury roboczej.

UWAGA: Sprawdzić swobodę ruchu wirówki przed użyciem.

3. Zrównoważyć urządzenie i próbkę do temperatury wymaganej dla danego zastosowania.
4. Wirować urządzenie z prędkością 1000–2000 × g przez wymagany czas, aby uzyskać pożądaną objętość filtratu. Wskazówki dotyczące czasu wirowania można znaleźć w części „Szybkość ultrafiltracji”.
5. Ostrożnie wyjąć urządzenie z rotora wirówki i odłączyć pojemnik z filtrem zawierającym ultrafiltrat. Osłonić pojemnik z filtrem dostarczonym korkiem do czasu, aż ultrafiltrat będzie mógł zostać poddany analizie.

OSTRZEŻENIE: W przypadku wyrzucania zużytych elementów należy przestrzegać środków ostrożności dotyczących usuwania elementów skażonych materiałem potencjalnie zakaźnym lub materiałem stanowiącym zagrożenie biologiczne.

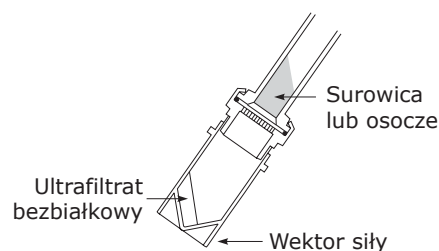
UWAGA: Filtr może nie działać prawidłowo, jeśli wyschnie po zmoczeniu.

Wydajność

W poniższych punktach omówiono różne parametry działania, w tym kontrolę polaryzacji, szybkość ultrafiltracji, wydajność membrany, kontrolę pH i niespecyficzną adsorpcję.

Kontrola polaryzacji

Zastosowanie rotora z koszem o stałym nachyleniu zapewnia kontrolę polaryzacji i minimalizuje potencjalne artefakty spowodowane interakcjami białko-białko. Nachylenie przeciwdziała gromadzeniu się zatrzymanego białka na powierzchni membrany, ponieważ ta gęsta warstwa przesuwana się na zewnątrz i gromadzi na krawędzi membrany. W rotorze z koszem wychylnym warstwa polaryzacyjna jest zatężana na całej powierzchni membrany, co ogranicza przepływ rozpuszczalnika.



Szybkość ultrafiltracji

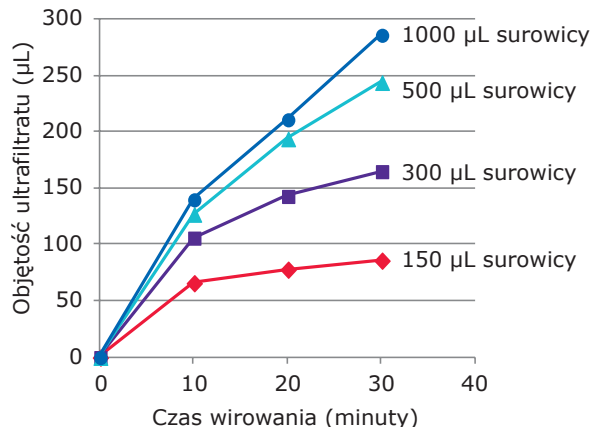
Natężenie przepływu zależy od stężenia białka w próbce, objętości początkowej, względnej siły odśrodkowej (RCF), typu rotora i temperatury. Wysokie natężenia przepływu wynikają z maksymalnej powierzchni membrany, kontroli polaryzacji i optymalnego ciśnienia transmembranowego osiąganego przy objętości próbki większej niż 300 µL. Optymalne szybkości filtracji osiąga się przy prędkości 1000–2000 × g. Większa siła odśrodkowa nie zwiększa znacząco natężenia przepływu i nie jest zalecana.

Porównanie rotorów o stałym nachyleniu i z koszem wychylnym

Rotor	RCF (× g)	Typowa objętość ultrafiltratu (µL)
Rotor o stałym nachyleniu (33°)	1000	140–150
Rotor z koszem wychylnym	1000	115–120

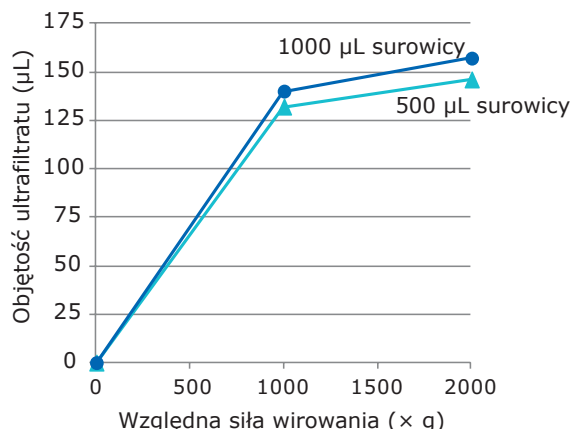
1 mL normalnej ludzkiej surowicy, 10 minut wirowania

Typowe szybkości ultrafiltracji



Warunki: Rotor o stałym nachyleniu 33°, 25°C, 1000 × g

Wpływ względnej siły wirowania



Warunki: Rotor z koszem o stałym nachyleniu 33°, 25°C, 10 minut wirowania

Działanie membrany

Wysoka selektywna przepuszczalność anizotropowej, hydrofilowej membrany ultrafiltracyjnej Ultracel® wynika z wąskiego rozkładu wielkości porów. Zazwyczaj urządzenia Centrifree® zatrzymują 99,9% białka surowicy i < 5% L-tyroksyny (0,1 mg/mL w 0,1 N NaOH).

Wymagania dotyczące retencji białka dla każdego zastosowania zależą od stopnia wiązania ligandu. Dla ligandu, który jest związany w 90%, 1% wyciek białka z surowicy spowoduje 9% zawyżenie stężenia wolnego ligandu. Do pomiaru wolnej tyroksyny (> 99,95% związanej) w nierozcieńczonej surowicy, dla błędu < 10% wymagana jest retencja białka na poziomie > 99,995%. Urządzenia Centrifree® są sugerowane do rozdzielania ligandów, które są związane do 99%

Czasami wyciek surowicy może wystąpić z powodu defektu membrany lub uszkodzenia mechanicznego. Jeśli wyciek jest większy niż 20%, ultrafiltrat będzie miał kolor żółty. Określenie wycieku mniejszego niż 20% wymaga pomiaru stężenia białka w ultrafiltracie czułym testem mikrobiałkowym. Jeśli użytkownik potrzebuje większej niezawodności, ale chce uniknąć rutynowego oznaczania białka, należy przefiltrować próbkę na dwóch urządzeniach.

Kontrola pH

Należy ustalić dopuszczalny limit zmienności pH dla każdego układu wiążącego ligand. Eksperymentalnie, pH próbki może być kontrolowane przez przetwarzanie i przenoszenie próbki w warunkach beztlenowych, gazowanie próbki 5% CO₂, 95% O₂ lub dodanie małej objętości stężonego buforu, pod warunkiem, że jon buforowy nie zmienia równowagi wiązania ligandu.

Adsorpcja niespecyficzna

Straty adsorpcyjne zależą od stężenia ligandu, jego jonowego i hydrofobowego charakteru, temperatury i czasu kontaktu z powierzchniami elementu oraz matrycy próbki. Odzysk ligandu, który został dodany do ultrafiltratu surowicy bez białka, jest na ogół większy niż z buforu i bardziej przewidywalny pod względem zachowania z całą surowicą. Wolne tłuszcze i aminokwasy o niskiej masie cząsteczkowej w bezbiałkowym ultrafiltracie oddziałują i pasywną powierzchnię elementu, podczas gdy białka surowicy na ogół pasywną powierzchnię, na jakie natrafia cała surowica. Niski odzysk z ultrafiltratu niezawierającego białka lub z buforu może wskazywać na utratę adsorpcji i/lub retencji ligandu w membranie. Odzyskiwanie ligandów w urządzeniach Centrifree® jest najdokładniejsze w obecności białka wiążącego i konkurencyjnych substancji rozpuszczonych.

Charakterystyka techniczna

Maksymalna objętość próbki	1,0 mL
Minimalna objętość próbki	0,15 mL
Maksymalna względna siła wirowania	2000 × g
Obszar aktywny membrany	0,92 cm ²
Objętość zatrzymania (membrana i podstawa nośna)	10 µL
Wymiary	
Długość urządzenia zamkniętego z korkiem z naczyniem na filtrat	95 mm
Średnica	16 mm
Materiały zastosowane w konstrukcji	
Membrana	Regenerowana celuloza Ultracel®
Zbiornik na próbki	Poliwęglan
Podstawa nośna membrany	Poliwęglan
Naczynie na filtrat	Polietylen
Korek naczynia na filtrat	Polietylen
O-ring	Monomer etylenowo-propylenowo-dienowy (EPDM)

PRZESTROGA: Elementy Centrifree® nie nadają się do sterylizacji w autoklawie. Nie stosować z rozpuszczalnikami organicznymi.

Kompatybilność chemiczna

Urządzenia Centricon® są przeznaczone do stosowania z płynami biologicznymi i roztworami wodnymi. Przed użyciem należy sprawdzić kompatybilność chemiczną próbki z urządzeniem. Szczegółowe informacje można znaleźć na stronie SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility.

Zamawianie produktów

Kupuj produkty online na stronie SigmaAldrich.com.

Definicje symboli

Symbol	Definicja	Symbol	Definicja
	Numer katalogowy		Data produkcji
	Nie używać ponownie		Producent
	Kod serii		Urządzenie niejałowe

Uwaga

Przekazujemy naszym klientom informacje i porady dotyczące zastosowań technologicznych i kwestii regulacyjnych zgodnie z naszą aktualną wiedzą i możliwościami, jednak bez zobowiązań i odpowiedzialności. Nasi klienci powinni zawsze stosować się do obowiązujących przepisów i regulacji prawnych. Dotyczy to również wszelkich praw stron trzecich. Nasze informacje i porady nie zwalniają naszych klientów z odpowiedzialności za sprawdzenie przydatności naszych produktów do określonych celów.

Odbiór i utylizacja

Wszystkie próbki muszą być wyraźnie oznaczone. Do pobierania i przygotowania próbek należy użyć odpowiednich instrumentów.

UWAGA: Należy przestrzegać środków ostrożności dotyczących usuwania elementów skażonych z materiałami potencjalnie zakaźnymi lub stanowiącymi zagrożenie biologiczne zgodnie ze wszystkimi obowiązującymi przepisami międzynarodowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi.

Wsparcie techniczne

Zapraszamy na stronę serwisu technicznego w naszej witrynie internetowej pod adresem SigmaAldrich.com/techservice.

Każdy poważny incydent dotyczący tego urządzenia powinien zostać zgłoszony producentowi i właściwemu organowi kraju, w którym użytkownik ma siedzibę.

Standardowa gwarancja

Gwarancja dla produktów wskazanych w niniejszej publikacji znajduje się pod adresem SigmaAldrich.com/terms.

はじめに

Centrifree® デバイスは、限外ろ過と呼ばれる手法により、小容量 (0.15～1.0 mL) の血清、血漿、その他の生物サンプル中のタンパク質結合した微小溶質から、迅速かつ効率よく分離します。希釈や生理学的 pH、イオン組成、非結合微小溶質の濃度を変えずに、数分で正確に分離/分画することができます。セントリフリーデバイスは低吸着の疎水性メンブレンおよび可塑剤を使用しない O-リングを採用し、優れた回収率を実現します。ホールドアップ量は 1μL 未満です。

透析、ゲルろ過、木炭吸着とは異なり、限外ろ過は遊離リガンド濃度、結合容量、親和定数の測定精度を向上します。限外ろ過は、時間のかかる方法、特殊な装置の必要性、希釈の誤差、結合平衡のずれを排除できます。

限外濾過は、遊離微小溶質リガンド濃度を変化させません。タンパク質はサンプル容積の一部 (濃縮物) に選択的に分配されますが、遊離リガンドは溶媒とともに本質的に妨げられずにメンブレンを通過します。

理想的なタンパク質結合に関する質量作用と質量保存の法則によると、モル結合能と親和性が全タンパク質濃度に依存しない場合、限外ろ過液中の遊離リガンド濃度が一定であることを予測します。連続する限外ろ過液の遊離リガンド濃度が一定であるはいくつかの系で示されており、こうした予測を支持するものです。

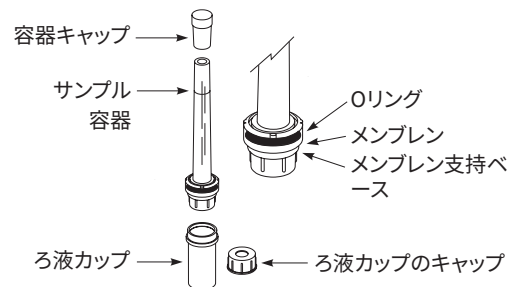
メンブレンでの捕捉や吸着によらない遊離リガンド濃度の変化は、凝集やその他の理想的ではないタンパク質間の相互作用のために、結合タンパク質の容量や親和性が変化していることを示します。アプリケーションに応じて、得られたろ液中の遊離リガンド濃度を定量的または定性的に分析できます。

用途

Centrifree® デバイスは、非滅菌、使い捨ての限外ろ過デバイスであり、血清、尿、脳脊髄液、その他の生体液などの小容量 (0.15～1.0-mL) のサンプル中のタンパク質結合した微小溶質から分離します。この製品はシングルユースで、ラボの専門職員による使用を意図しています。

Centrifree® デバイスのコンポーネント

Centrifree® 限外ろ過デバイスは、複数のサンプル処理を高い効率を発揮します。ひとつひとつのデバイスにはメンブレンと O-リングがサンプル容器とサポートベースの間に恒久的にシールされた状態で配されています。取り外し可能なフィルターカップはベースに取り付けられています。Centrifree® デバイスはシングルユースのみにお使いください。



供給品

Centrifree® 限外ろ過デバイスのパッケージには次のコンポーネントが入っています。

- 限外ろ過デバイス (50個)
- 容器カップ (50個)
- ろ液カップ (50個)
- ろ液カップのキャップ (50個)

注: 赤い容器カップは、二酸化炭素の消失に伴うサンプルの蒸発と pH の変化を防ぐものです。

必要な器具

- 100 mm の試験管 17 本を収めるローターアダプターまたはキャリアを備え、1,000～2,000 × g の性能のある遠心分離機。

注: 溶液の流れを良くするため、固定角の遠心ローターをお使いください。

- サンプル注入用の、パスツールピペットまたは固定容量ピペット。

保管および安定性

保管条件については、製品ラベルをご覧ください。

使用上のガイドライン

- Centrifree® デバイスでは、血清、血漿、その他の生体液を扱えます。流速の効率を上げるには、サンプルを容器に注入する前に遠心分離にかけ、フィブリンを除去してください。
- 推奨するサンプル容量は0.15～1.0 mLです。
- 遠心ローターにはスイングバケットではなく固定角のローターを用い、1,000～2,000 × gで遠心すると良好な結果が得られます。
注意: 相対遠心力2,000 × gを超えては動作させないでください。
- 事前にリガンド吸着とタンパク質保持の試験を行い、目的とするアプリケーションにシステムが適切であることを確認してください。
- Centrifree® 限外ろ過デバイスは、生体液および水溶液用に設計されています。有機溶剤には使用しないでください。
- アプリケーションに適した温度を見つけてください。遠心分離機を暖めるか、遠心ローターとチェンバーをあらかじめ暖めて、目的とする温度を維持してください。固定角ローターの場合、デバイスの内容物は5～10分間にローターと熱平衡状態になります。Centrifree® デバイスでは急速に限外ろ過が行われますので、リガンドの結合に与える温度の影響はわずかです。
- 巨大分子の濃縮と回収にはお使いいただけません。
- コンポーネント部品のオートクレーブはしないでください。
- Centrifree® デバイスは再使用しないでください。
- 限外ろ過デバイスのメンブレンは、一度濡らしたら乾燥させないでください。予洗の直後にデバイスを使わない場合は、デバイスを使用するまでメンブレン上に液体を放置しておいてください。
- デバイス中のUltracel® メンブレンには微量のグリセリン(約2 µL)が含まれています。この物質が分析を妨げる場合は、脱イオン水または0.1 N NaOHで干渉が起これなくなるまでデバイスを洗浄してください。0.1 N NaOHを用いてグリセリンを除去する場合、出液使用前に脱イオン水またはバッファーでよく洗浄してください。少なくとも15分間回転して、液体をできるだけ取り除いてください。洗浄後に残った液体(約10 µL)による希釈誤差を避けるため、限外ろ液の最初のアリコートは廃棄してください。

Centrifree® 限外ろ過デバイスの使用方法

Centrifree® デバイスを使う前には、容器の赤いキャップを取り外してください。

1. 容器を約45°に傾けて持ち、ピペットの先が容器の壁に触れるようにしてください。サンプル溶液を滑らかな流れで一度に注入し、エアロックが起これないようにしてください。
注: ピペットの先でメンブレンに触れないようにしてください。
2. サンプル容器にキャップをはめ、デバイスを17 × 100 mmのアダプターと共に遠心ローターに配置します。同様のデバイスで遠心分離機のバランスをとります。
注: 容器の赤いキャップは容器の上から3～4 mm以上は下に行かないようにしてください。これを超えて押し込むと前ろ過が起こり、そのためサンプルの温度が適切でなければ、後で分析誤差が起こる恐れがあります。
注: 使用前に遠心分離のすき間を確認してください。
3. アプリケーションに必要な温度にデバイスとサンプルが熱平衡状態となるようにします。
4. デバイスを1,000–2,000 × gで、必要な時間遠心して、求めるろ液容量を得ます。遠心時間のガイドラインについては、「限外ろ過流束」のセクションをご覧ください。
5. 遠心ローターから注意深くデバイスを取り外し、限外ろ液を収めたろ液カップを切り離します。限外ろ液を分析するまで、ろ液カップに同梱のキャップをかぶせます。

警告: 使用済みのコンポーネントを廃棄する場合、感染の恐れのある、または危険な生物資材で汚染された物品に対する注意事項に従うようにしてください。

注: 濡らしたフィルターがその後乾燥してしまうと、フィルターが正しく機能しない恐れがあります。

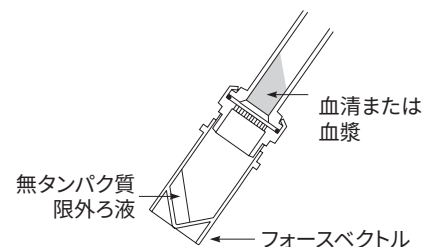


性能

以下のセクションでは、分極制御、限外ろ過流束、メンブレンの性能、pH制御、非特異的吸着などの様々な性能特性について解説します。

分極制御

固定角ローターを使うと分極が制御でき、タンパク質間の相互作用によるアーティファクトの生成を抑えます。角度のためにメンブレン表面に捕捉されたタンパク質が堆積しないようになります。これはこの密な層が外側にスライドして、メンブレンの端に集まるからです。スイングバケットローターでは、分極層はメンブレン表面全体にわたって押しつけられ、溶剤の流れを妨げます。



限外ろ過流束

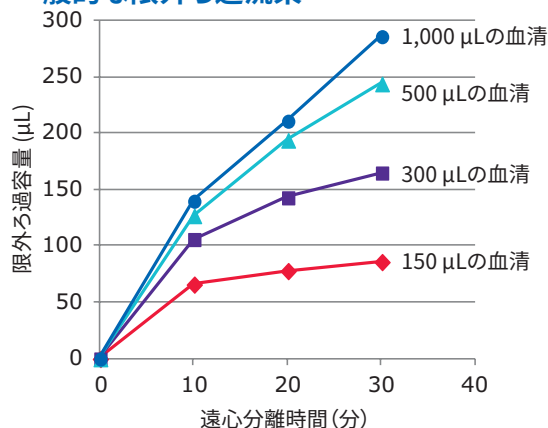
流束はサンプルのタンパク質濃度、開始容量、相対遠心力 (RCF)、ロータータイプ、温度の影響を受けます。高い流束は、メンブレン表面積を最大に使い、分極を制御し、300 μL を超すサンプル容量でメンブレンを通る圧力を最適にすることで得られます。最適なる過流束は1,000~2,000 $\times g$ で得られます。遠心力を上げても流束は大きくは上がり、これは推奨しません。

固定角とスイングバケット遠心ローターの比較

ローター	RCF ($\times g$)	一般的な限外ろ過流束 (μL)
固定角ローター(33°)	1,000	140-150
スイングバケット	1,000	115-120

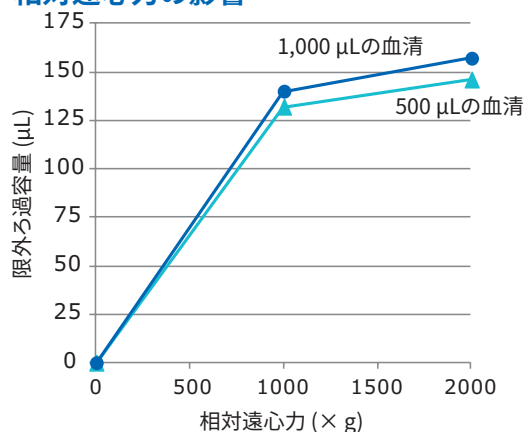
1 mL 規定ヒト血清、10 分間遠心

一般的な限外ろ過流束



条件: 33° 固定角ローター、25 °C、1,000 $\times g$

相対遠心力の影響



条件: 33° 固定角ローター、25 °C、10 分間遠心

メンブレンの性能

異方性、親水性のUltracel®限外ろ過メンブレンの孔経は狭い範囲に分布しており、高度に選択的な浸透性を実現しています。通常、Centrifree® デバイスは血清タンパク質の99.9%、L-サイロキシンを5%未満 (0.1 N NaOH中に0.1 mg/mL) を捕捉します。

各アプリケーションでのタンパク質捕捉要件はリガンド結合の程度によります。90%結合されているリガンドについては、血清タンパク質の漏れが1%あると、遊離リガンド濃度の見積もり値が9%高くなりすぎます。不希釈血清中の遊離サイロキシン (99.95%以上が結合) の測定では、誤差を10%未満に収めるにはタンパク質捕捉が99.995%を超えている必要があります。99%結合されているリガンドの分離には、Centrifree® デバイスを推奨します。

血清の漏れは、メンブレンの欠陥や、機械的欠陥のためにまれに起こることがあります。漏れが20%を超す場合、限外ろ液は黄色い色をしています。20%未満の漏れの検出には、高感度の微量タンパクアッセイを用いた限外ろ液中のタンパク濃度の測定が必要です。より高い信頼性が必要だが、タンパクアッセイを常に行いたくない場合は、サンプルをもう一つのデバイスでろ過してください。

pH制御

各リガンド結合システムに対して、許容できるpH変動の限度を確定してください。実験的には、サンプルのpHは嫌気性サンプル取り扱いにより、またはサンプルに5%の二酸化炭素と95%の酸素を供給することにより、または少量の濃縮バッファー (バッファーのイオンがリガンドの結合平衡を変化させないこと) を加えることによって許容限度内に収められます。

非特異性吸着

吸着損失は、リガンドの濃度、リガンドのイオン性と親水性、温度、コンポーネント表面との接触時間、サンプルマトリックスの影響を受けます。タンパク質のない血清限外ろ液に加えられたリガンドの回収は、一般的にバッファーからのものよりも多く、血清全体を用いた場合に比べて予測可能です。無タンパク限外ろ液に含まれる低分子量の遊離脂肪酸やアミノ酸は、成分の表面と相互作用して不動態化しますが、血清タンパク質は一般的に血清全体が遭遇する表面を不動態化します。タンパク質を含まない限外ろ液またはバッファーからの回収率が低い場合は、リガンドの吸着損失やメンブレンでの捕捉がある可能性があります。Centrifree® デバイスでのリガンド回収は、結合タンパク質と、競合する微小溶質が存在する場合に最も正確です。

仕様

最大サンプル容量	1.0 mL
最小サンプル容量	0.15 mL
最大相対遠心力	2,000 × g
活性メンブレン面積	0.92 cm ²
ホールドアップ量 (メンブレンと支持)	10 µL
寸法	
キャップをはめた長さ (ろ液カップ付き)	95 mm
直径	16 mm
構成素材	
メンブレン	Ultracel®再生セルロース
サンプル容器	ポリカーボネート
メンブレン支持ベース	ポリカーボネート
ろ液カップ	ポリエチレン
ろ液カップのキャップ	ポリエチレン
Oリング	エチレンプロピレンジエンモノマー (EPDM)

注意: Centrifree® 構成部品はオートクレーブ滅菌できません。有機溶剤には使用しないでください。

化学適合性

Centricon® デバイスは、生体液および水溶液用に設計されています。使用前に、デバイスとサンプルの化学適合性を調べてください。連絡先は [SigmaAldrich.com/offices](https://www.sigmaaldrich.com/offices) をご覧ください。

製品注文情報

言いご購入はオンラインで SigmaAldrich.com。

記号の意味

記号	定義	記号	定義
	カタログ番号		製造日
	再使用不可		製造会社
	バッチコード		非滅菌製品

注意事項

お客様に提供される技術情報および法規情報の内容につきましては可能な限り最善を尽くしておりますが、何らの義務または責任を負うものではありません。お客様は法律と規制を遵守してください。これは第三者の権利に関しても同様です。当社提供の情報と助言は、当社製品の想定使用目的に対する適切性をお客様自身が確認する責任を解くものではありません。

回収と廃棄方法

サンプルは明瞭にラベル付けされているようにしてください。サンプルの取得と調整には適切な装置を使用してください。

注: 感染の恐れのある、または危険な生体物質は、該当する国際、国、地方自治体の規制に従って回収、廃棄してください。

技術サポート

弊社ウェブサイトの技術サービスのページはこちらです SigmaAldrich.com/techservice

この機器に関する重大な事故はすべて、製造者と、ユーザーの所在国の該当局に報告してください。

標準保証

本文書記載の製品に適用される保証については、SigmaAldrich.com/termsをご覧ください。

引言

Centrifree® 设备通过超滤技术快速、有效地分离少量 (0.15–1.0 mL) 血清、血浆和其他生物样品中的游离蛋白质结合的小分子溶质。不经稀释, 且不发生生理 pH 值、离子组成、或游离小分子溶质浓度的变化, 几分钟内即可完成精准分离。这些设备采用低吸附亲水性滤膜和无增塑剂的 O 型环, 以确保极高的回收率。滞留量为 10 μ L 或更少。

与透析、凝胶过滤或炭吸附相比, 超滤在测量游离配体浓度、结合能力或亲和常数时具有更高的准确性。它不需要费时费力的方法, 亦不需专用设备, 而且没有稀释错误和结合平衡的变化。

超滤不改变游离微溶质配体浓度。蛋白质被选择性地保留在样品 (浓缩物) 中, 而游离配体则与溶剂一起基本上不受阻碍地通过滤膜。

根据理想蛋白质结合的质量作用定律和质量守恒定律, 可以预测超滤液中的游离配体浓度将保持恒定, 前提是摩尔结合能力及亲和力与总蛋白质浓度无关。几个系统的结果显示, 连续的超滤液等分中的游离配体浓度恒定, 支持这些预测。

并非由滤膜截留或吸附造成的游离配体浓度变化, 正是证明由于聚集或其他非理想蛋白质-蛋白质相互作用, 造成结合蛋白质的容量或亲和力改变的证据。取决于应用, 您可以定量或定性分析所得滤液的游离配体浓度。

预期用途

Centrifree® 设备是一种非无菌一次性超滤设备, 其用途是分离小体积 (0.15–1.0 mL) 生物样品中的游离蛋白质结合微溶质, 适用的样品包括: 血清、尿液、脑脊液和其他体液。是供实验室专业人员使用的一次性设备。

Centrifree® 设备组件

Centrifree® 超滤装置以最高效率进行多个样品处理。每个单元由一个滤膜和 O 形环组成, 它们永久地密封在样品储液管与支撑底座之间。底座上附有一个可移除的滤液杯。Centrifree® 设备仅供一次性使用。

所提供的材料

Centrifree® 超滤装置随附以下组件。

- 50 个超滤装置
- 50 个储液管盖
- 50 个滤液杯
- 50 个滤液杯盖

说明:所提供的红色储液管盖用来以防止样品蒸发以及由于 CO₂ 损失而导致的 pH 值变化。

所需设备

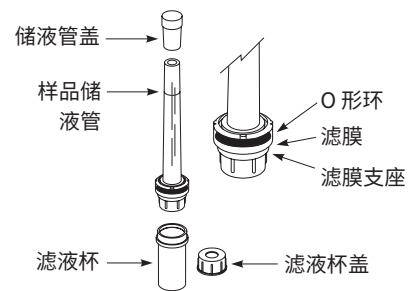
- 带有转子适配器或载体的离心机, 可以容纳 17 × 100 mm 的试管, 转速为 1,000–2,000 × g。

说明:为获得最佳溶剂流量, 请使用定角离心转子。

- 巴斯德或固定容量移液器, 用于转移样品。

储存和稳定性

有关储存条件请参见产品标签。



使用指南

- Centrifree® 设备用来处理血清、血浆或其他生物体液。为了获得更高效的流速,在加入到储液管中之前,通过离心样品去除纤维蛋白。
- 建议的样品体积为 0.15 - 1.0 mL。
- 为获得最佳效果,请使用定角而非摆桶式离心转子,并以 1,000–2,000 × g 的速度旋转。
注意:请勿在 2,000 × g 以上的相对离心力下操作。
- 请进行初步配体吸附和蛋白质截留实验,以确保系统适用于预期应用。
- Centrifree® 超滤装置设计用于生物体液和水溶液。请勿用该设备处理有机溶剂。
- 为您的应用确定正确的温度。通过加热离心机或预热离心转子和腔室来保持所需的温度。在定角转子中,设备的内容物在 5-10 分钟内与转子达到热平衡。Centrifree® 设备的快速超滤能力可将温度对配体结合的影响降至最低。
- 请勿用来浓缩和回收大分子。
- 请勿对组件进行高温高压灭菌。
- 请勿重复使用 Centrifree® 设备。
- 超滤装置中的滤膜一旦润湿后,应避免干燥。若在冲洗后没有立即使用该装置,则让液体保留在滤膜上,直到使用该装置为止。
- 设备中的 Ultracel® 滤膜含有微量甘油 (~ 2 µL)。如果该物质干扰分析,请用去离子水或 0.1 N NaOH 冲洗设备,直至不再观察到干扰为止。如果使用 0.1 N NaOH 去除甘油,请在使用前用去离子水或缓冲液彻底冲洗设备。旋转至少 15 分钟以尽可能多地去除液体。为避免冲洗后因滞留液体 (~ 10 µL) 引起的稀释错误,请丢弃第一等分超滤液。

如何使用 Centrifree® 超滤设备

在使用 Centrifree® 设备之前,请取下红色的储液管盖。

1. 将储液管保持在大约 45° 的角度,将移液器尖端接触储液管壁。均匀加入样品溶液,避免气锁。

说明:避免移液器尖接触到滤膜。

2. 盖上样品储液管的盖子,然后将设备放入具有 17 × 100 mm 适配器的离心转子中。用一个类似装置来平衡离心机。

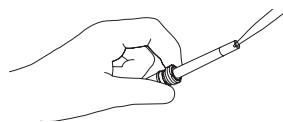
说明:红色储液管盖的盖紧程度应该不超过储液管顶部向下 3-4 mm。更进一步的压缩会导致提前过滤,在这种情况下,如果样品未处于所需的操作温度,则随后可能会引起分析错误。

说明:使用前检查离心机间隙。

3. 使设备和样品平衡到您的应用所需的温度。
4. 以 1,000–2,000 × g 的转速旋转装置,以获得所需的滤液体积。有关旋转时间,请参阅“超滤速率”部分。
5. 小心地从离心转子上取下设备,并取下含有超滤液的滤液杯。用随附的盖子盖住滤液杯,直到要分析超滤液时才打开。

警告:在丢弃使用过的组件时,请务必遵循关于如何处理被潜在传染性或危害性生物材料污染之物品的预防措施。

说明:如果在润湿后干燥,过滤器可能无法正常工作。



性能

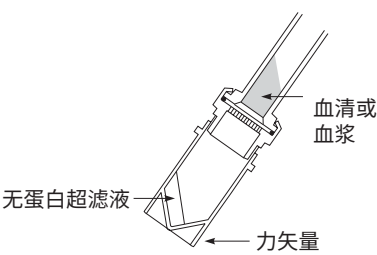
以下各节将讨论各种性能特征,包括极化控制、超滤速率、滤膜性能、pH 值控制以及非特异性吸附。

极化控制

使用定角转子可以控制极化,并最大限度地减少由于蛋白质-蛋白质相互作用而产生的伪影。倾角可以避免截留蛋白质积聚在滤膜表面,因为倾角使稠密的截留物质向外滑脱到滤膜边缘。而在摆桶转子中,极化层积聚在整个膜表面,因而限制了溶剂流动。

超滤速率

流速取决于样品蛋白质浓度、起始体积、相对离心力(RCF)、转子类型和温度。大流速来自于最大的滤膜面积、极化控制和最佳跨膜压力,而且样品体积大于300 μL。在1,000-2,000 × g 时可实现最佳过滤速率。较高的离心力不会显著增加流速,因此不推荐使用。

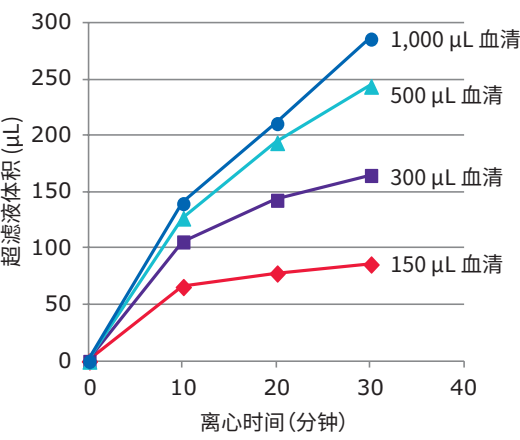


定角与摆桶式离心转子的比较

转子	RCF (× g)	典型的超滤液体积 (μL)
定角 (33°)	1,000	140-150
摆桶式	1,000	115-120

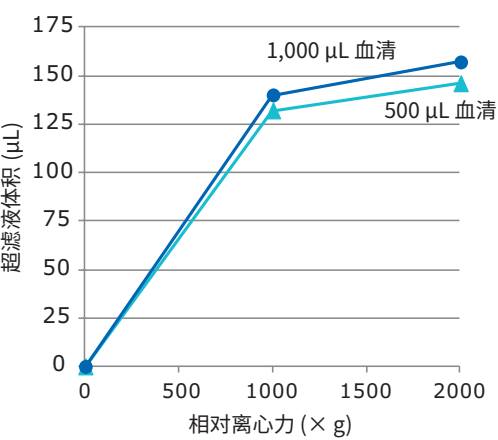
1 mL 正常人血清, 10 分钟旋转

典型的超滤速率



条件: 33°定角转子, 25°C, 1,000 × g

相对离心力的影响



条件: 33°定角转子, 25°C, 10分钟旋转

滤膜性能

各向异性、亲水性 Ultracel® 超滤膜的高选择性渗透性是由于狭窄的孔径分布。通常, Centrifree® 装置可截留 99.9% 的血清蛋白和 < 5% 的 L-甲状腺素 (0.1 mg/mL 溶于 0.1 N NaOH)。

每种应用的蛋白质截留要求取决于配体结合的程度。对于 90% 结合的配体, 1% 的血清蛋白泄漏将导致游离配体浓度被高估 9%。对于未稀释血清中游离甲状腺素 (结合 > 99.95%) 的测量, 要想获得 < 10% 的误差, 需要 > 99.995% 的蛋白质截留率。建议使用 Centrifree® 设备分离结合率高达 99% 的配体。

有时, 滤膜缺陷或机械缺陷会导致血清渗漏。如果渗漏量大于 20%, 超滤液将呈黄色。如要测定小于 20% 的渗漏, 需要使用灵敏的微生物蛋白测定法测量超滤液中的蛋白质浓度。如果您需要更高的可靠性, 但又想避免常规蛋白质测定, 则请用多重设备过滤样品。

pH 控制

为每个配体结合系统制定可接受的 pH 值变化限值。在实验中, 样品 pH 值可以通过处理和转移厌氧样品、用 5% CO₂、95% O₂ 给样品充气、或添加少量浓缩缓冲液加以控制, 前提是缓冲液离子不会改变配体结合平衡。

非特异吸附性

吸附损失取决于配体的浓度、其离子性质和疏水性、与组件表面接触的温度和时间以及样品基质。已添加到无蛋白血清超滤液中的配体的回收率, 通常高于从缓冲液中回收的回收率, 并且更能预测全血清的行为。不含蛋白质的超滤液中的低分子量、游离脂肪酸和氨基酸与组件表面相互作用并使其钝化, 而血清蛋白通常会钝化全血清接触到的表面。如果从不含蛋白质的超滤液或缓冲液中回收的回收率低, 可能表明存在吸附损失和/或部分配体被滤膜截留。在存在结合蛋白和竞争性微溶质的情况下, Centrifree® 装置中的配体回收率最为准确。

规格

最大样品体积	1.0 mL
最小样品体积	0.15 mL
最大相对离心力	2,000 × g
有效膜面积	0.92 cm ²
滞留体积 (滤膜和支架)	10 µL
尺寸	
带有滤液杯且盖着盖子的设备长度	95 mm
直径	16 mm
制造材料	
滤膜	Ultracel® 再生纤维素
样品储液管	聚碳酸酯
滤膜支座	聚碳酸酯
滤液杯	聚乙烯
滤液杯盖	聚乙烯
O 形环	三元乙丙橡胶 (EPDM)

注意: Centrifree® 组件不可高温高压灭菌。请勿用来处理有机溶剂。

化学相容性

Centricon® 设备适用于生物液体及水溶液。使用前, 请检查样品与设备的化学相容性。欲悉详情, 请访问 [SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility](https://www.sigmaaldrich.com/FilterChemicalCompatibility)。

产品订购信息

如需订购产品, 请前往 SigmaAldrich.com.

符号定义

符号	定义	符号	定义
	货号		生产日期
	请勿重复使用		制造商
	批号		非无菌产品

声明

我们尽我们的所知与所能, 向客户提供关于应用技术与法规问题的信息和建议, 但恕不承担任何责任和义务。我们的客户在任何情况下都须遵守现行法律和法规。这也同样适用于任何第三方权利。我们的信息和咨询意见并不解除我们客户对于检查我们的产品是否符合其自身需求的责任。

收集和处置

所有样品都必须清楚地标记。必须使用合适的仪器来获取和制备样品。

说明: 根据所有适用的国际、联邦、州和地方法规, 遵守关于如何处置被潜在传染性或危害性生物材料污染之物品的预防措施。

技术支持

您可访问我们网站上的技术服务页面 SigmaAldrich.com/techservice。

本设备的任何严重事故均应报告给制造商和用户所在国家的主管机构。

标准保修

可在SigmaAldrich.com/terms上找到本出版物所列产品的现行保修条款。

소개

Centrifree® 장치는 한외여과라는 방법을 사용하여 소량(0.15-1.0mL)의 혈청, 혈장 및 기타 생물학적 검체에서 단백질 결합 미세용질을 빠르고 효율적으로 분리합니다. 정확한 분할은 희석, 생리학적 pH, 이온 조성 또는 결합되지 않은 미세용질 농도의 변화 없이 수 분 안에 발생합니다. 이러한 기기는 저흡착 친수성 멤브레인 및 가스제가 없는 O-링을 포함하여 우수한 회수율을 보장합니다. 보류 용적은 10 µL 이하입니다.

투석, 겔 여과 또는 목탄 흡착과 달리 한외여과는 유리 리간드 농도, 결합 능력 또는 친화도 상수를 측정할 때 향상된 정확성을 제공합니다. 시간이 많이 걸리는 방법론, 전문 장비의 필요성, 희석 오류 및 결합 평형 변화를 제거합니다.

한외여과는 유리 미세용질 리간드 농도를 변화시키지 않습니다. 단백질은 샘플 용적의 일부(농축액)로 선택적으로 분할되는 반면, 유리 리간드는 본질적으로 방해받지 않고 용매와 함께 멤브레인을 통과합니다.

이상적인 단백질 결합에 대한 질량 작용 및 질량 보존의 법칙은 몰 결합 능력 및 친화도가 총 단백질 농도와 무관하다면 한외여과물의 유리 리간드 농도는 일정하게 유지될 것으로 예측합니다. 연속적인 한외여과 분획에서 일정한 자유 리간드 농도를 보여주는 여러 시스템에 대한 결과는 이러한 예측을 뒷받침합니다.

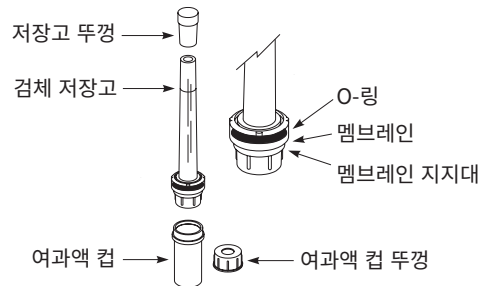
멤브레인 잔류 또는 흡착으로 인한 것이 아닌 유리 리간드 농도의 변화는 응집 또는 기타 비이상적인 단백질-단백질 상호작용으로 인한 결합 단백질의 용량 또는 친화도가 변경된 증거입니다. 애플리케이션에 따라 유리 리간드 농도에 대해 결과 여과액을 정량적 또는 정성적으로 분석할 수 있습니다.

사용 용도

Centrifree® 장치는 혈청, 소변, 뇌척수액 및 기타 체액과 같은 생물학적 검체의 소량 용적(0.15-1.0 mL)에서 단백질 결합 미세용질을 분리하기 위한 용도의 비멸균, 일회용 한외여과 장치입니다. 장치는 일회용이며 실험실 전문가가 사용합니다.

Centrifree® 장치 구성품

Centrifree® 한외여과 장치는 다중 검체 처리에 최대 효율을 제공합니다. 각 장치는 검체 저장고와 지지대 사이에 영구적으로 밀봉된 멤브레인 및 O-링으로 구성됩니다. 분리 가능한 여과액 컵이 지지대에 부착되어 있습니다. Centrifree® 장치는 일회용입니다.



공급 재료

다음과 같은 구성품이 Centrifree® 한외여과 장치와 함께 공급됩니다.

- 50개 한외여과 장치
- 50개 저장고 뚜껑
- 50개 여과액 컵
- 50개 여과액 컵 뚜껑

참고사항: 적색 저장고 뚜껑은 CO₂ 손실로 인한 검체 증발 및 pH 변화를 방지하기 위해 제공됩니다.

필요한 장비

- Centrifuge with rotor adapter or carriers that can accept 17 × 100 mm 튜브를 수용할 수 있는 회전자 어댑터 또는 캐리어가 있으며 1,000-2,000 × g의 용량을 가진 원심분리기.

참고사항: 최상의 용매 유동성을 위해, 고정각 원심분리기 회전자를 사용하십시오.

- 검체 전달용 파스퇴르 또는 고정 용적 피펫.

저장 및 안정성

저장 조건을 위해 제품 라벨을 참조하십시오.

사용 지침

- 혈청, 혈장 또는 기타 생물학적 유체를 Centrifree® 장치와 함께 사용할 수 있습니다. 보다 효율적인 유속을 위해 저장소에 적재하기 이전에 검체를 원심분리하여 섬유소를 제거합니다.
- 추천 검체 용적은 0.15–1.0 mL입니다.
- 최상의 결과를 위해, 날개 회전자 원심분리기 대신 고정각 회전자를 사용하여 $1,000\text{--}2,000 \times g$ 에서 회전시킵니다.
주의사항: $2,000 \times g$ 를 초과하는 상대 원심력에서 운영하지 마십시오.
- 해당 시스템이 의도한 용도에 적합하도록 보장하기 위해 예비 리간드 흡착 및 단백질 잔류 연구를 수행하십시오.
- Centrifree® 한외여과 장치는 생물학적 체액 및 수용액과 함께 사용하도록 설계되었습니다. 이 장치를 유기 용매와 함께 사용하지 마십시오.
- 귀하의 애플리케이션을 위해 올바른 온도를 결정하십시오. 가열식 원심분리기를 사용하거나 원심분리기 회전자 및 챔버를 예열하여 원하는 온도를 유지하십시오. 고정각 회전자에서, 장치의 내용물은 5–10분 이내에 회전자와 열적 평형에 도달합니다. Centrifree® 장치가 달성한 한외여과의 빠른 속도는 온도가 리간드 결합에 미치는 영향을 최소화합니다.
- 거대분자의 농축 및 회수를 위해 사용하지 마십시오.
- 구성품을 고압멸균하지 마십시오.
- Centrifree® 장치를 재사용하지 마십시오.
- 한외여과 장치의 멤브레인을 일단 적신 후에는 마르지 않도록 하십시오. 세척 후 해당 장치를 즉시 사용하지 않을 경우, 장치를 사용할 때까지 멤브레인에 액체를 남겨 두십시오.
- 해당 장치의 Ultracel® 멤브레인은 미량의 글리세린을 포함합니다(약 $2 \mu\text{L}$). 이 물질이 분석에 간섭을 주는 경우, 간섭이 더 이상 관찰되지 않을 때까지 장치를 탈이온수 또는 0.1 N NaOH 로 세정하십시오. 글리세린 제거를 위해 0.1 N NaOH 를 사용하는 경우, 사용하기 이전에 탈이온수 또는 완충액으로 완전히 세정합니다. 최대한 많은 액체를 제거하기 위해 최소 15분 동안 회전시킵니다. 세정후 남겨진 액체(약 $10 \mu\text{L}$)로 인한 희석 오류를 방지하도록, 한외여과액의 처음 분주액을 폐기하십시오.

Centrifree® 한외여과 장치 사용법

Centrifree® 장치를 사용하기 이전에, 적색 저장고 뚜껑을 제거합니다.

1. 피펫 팁이 저장고 벽에 닿도록 하여 저장고를 약 45° 각도로 잡으십시오. 공기가 잠기지 않도록 검체 용액을 균일하게 한 번에 부드럽게 추가합니다.
참고사항: 피펫 팁으로 멤브레인을 접촉하지 마십시오.
2. 검체 저장고 뚜껑을 닫고, $17 \times 100 \text{ mm}$ 어댑터가 있는 원심분리기 회전자에 장치를 위치시키십시오. 비슷한 장치로 균형을 맞추십시오.
참고사항: 적색 저장고 뚜껑은 저장고 상단 위로 $3\text{--}4\text{mm}$ 를 초과하여 도출되지 않아야 합니다. 추가 압축은 사전여과를 유발할 수 있으며, 이는 검체가 원하는 작동 온도에 있지 않는 경우 분석 오류를 초래할 수 있습니다.
참고사항: 사용 이전에 원심분리기의 유격을 확인하십시오.
3. 귀하의 애플리케이션에서 요구되는 온도에 기기 및 검체가 평형이 되도록 합니다.
4. 원하는 여과액 용적을 얻기 위해 필요한 시간 동안 기기를 $1,000\text{--}2,000 \times g$ 에서 회전시킵니다. 회전 시간 지침은 “한외여과 비율” 섹션을 참조하십시오.
5. 원심 분리기 회전자에서 장치를 조심스럽게 제거하고 한외여과액 들어 있는 여과액 컵을 분리합니다. 한외여과액을 분석할 수 있을 때까지 제공된 뚜껑으로 여과액 컵을 덮습니다.
경고사항: 사용한 구성품을 폐기하는 경우 감염 가능성이 있거나 위해한 생물학적 물질로 오염된 품목 폐기에 대한 예방 조치를 따르십시오.
참고사항: 필터는 적신 후 마르게 되면 올바르게 작동하지 않을 수 있습니다.

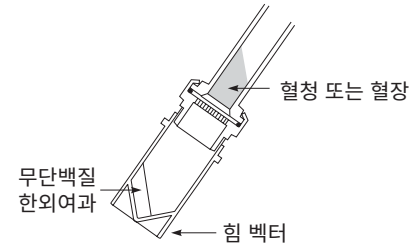


성능

다음 섹션에서는 편극화 제어, 한외여과율, 멤브레인 성능, pH 제어 및 비특이적 흡착을 포함한 다양한 성능 특성에 대해 토의합니다.

편극화 제어

고정각 회전자를 사용하면 편극화 제어를 제공하고 단백질-단백질 상호작용으로 인한 인공물의 가능성을 최소화합니다. 이 밀집된 층이 바깥쪽으로 미끄러져 막의 가장자리에 축적되기 때문에 해당 각도는 멤브레인 표면에 있는 잔류 단백질의 축적을 상쇄합니다. 날개 회전자에서 편극층이 전체 멤브레인 표면에 걸쳐 압축되어 용매 흐름을 제한합니다.



한외여과율

유속은 검체 단백질 농도, 시작 용적, 상대 원심력(RCF), 회전자 유형 및 온도에 따라 상이합니다.

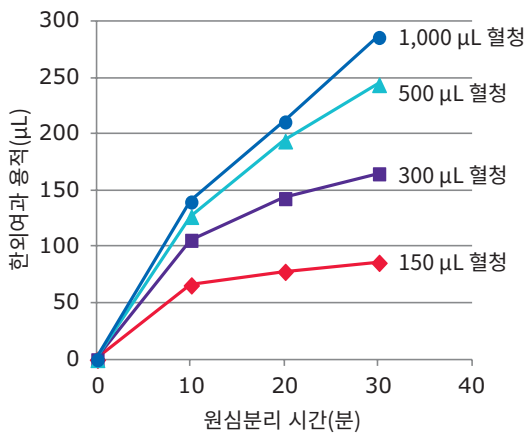
높은 유속은 최대 멤브레인 표면적, 편극화 제어, 300 μ L를 초과하는 검체 용적으로 달성된 최적의 막통과 압력으로 인해 발생합니다. 최적의 여과 속도는 1,000–2,000 $\times$ g에서 달성됩니다. 높은 원심력은 유량을 크게 증가시키지 않으므로 권장되지 않습니다.

고정각 대비 날개 원심분리기 회전자의 비교

회전자	RCF ($\times$ g)	통상적인 한외여과 용적(μ L)
고정각(33°)	1,000	140–150
날개 회전자	1,000	115–120

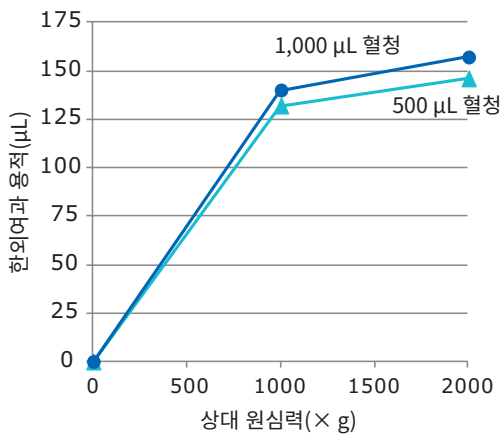
1 mL 정산 인간 혈청, 10분 회전

통산적인 한외여과율



조건: 33° 고정각 회전자, 25 °C, 1,000 $\times$ g

상대 원심력의 효과



조건: 33° 고정각 회전자, 25 °C, 10분

멤브레인 성능

비등방성, 친수성 Ultracel® 한외여과 멤브레인의 높은 선택적 투과성은 좁은 공극 크기 분포 때문입니다. 일반적으로 Centrifree® 장치는 99.9%의 혈청 단백질과 < 5% L-티록신(0.1N NaOH 중 0.1mg/mL)을 유지합니다.

각 애플리케이션에 대한 단백질 잔류 요구 사항은 리간드 결합 정도에 따라 다릅니다. 90% 결합 리간드의 경우 혈청 단백질 1% 누출로 인해 유리 리간드 농도가 9% 과대 평가됩니다. 비희석 혈청에서 유리 티록신(> 99.95% 결합)의 측정을 위해서 < 10% 오차에 대해 > 99.995%의 단백질 잔류가 필요합니다. 최대 99% 결합한 리간드를 분리하려면 Centrifree® 장치가 권장됩니다.

때때로 멤브레인의 결합이나 기계적 결합으로 인해 혈청 누출이 발생할 수 있습니다. 누출이 20%를 초과하는 경우 한외여과액은 황색이 됩니다. 20% 미만의 누출을 측정하려면 민감한 미세단백질 분석을 통해 한외여과액의 단백질 농도를 측정해야 합니다. 더 높은 신뢰성이 필요하지만 일상적인 단백질 분석을 피하려면 중복 장치에서 검체를 여과하십시오.

pH 제어

각 리간드 결합 시스템에 대해 허용 가능한 pH 변동 한계를 설정합니다. 실험적으로, 완충용액 이온이 리간드 결합 평형을 변경하지 않는 한, 검체에 5% CO₂, 95% O₂ 가스를 첨가하거나 또는 소량의 농축 완충액을 추가하여 혐기성 검체 취급 및 이송으로 검체 pH를 제어할 수 있습니다.

비특이적 흡착

흡착에 의한 소실은 리간드의 농도, 이온 및 소수성 특성, 구성성분 표면과 접촉 온도와 시간, 검체 매트릭스의 영향을 받습니다. 무단백질 혈청 한외여과액에 첨가된 리간드의 회수는 일반적으로 완충액보다 더 크고 전혈청의 행동을 더 잘 예측합니다. 무단백질 한외여과물의 저분자량 유리 지방산 및 아미노산은 구성성분 표면과 상호작용하고 부동태화하는 반면, 혈청 단백질은 일반적으로 전혈청에서 접하는 표면을 부동태화합니다. 무단백질 한외여과액 또는 완충액에서 낮은 회수율은 리간드의 흡착 손실 및/또는 멤브레인 잔류를 나타낼 수 있습니다. Centrifree® 장치의 리간드 회수는 결합 단백질과 경쟁적인 미세용질이 존재하는 경우 가장 정확합니다.

사양

최대 검체 용적	1.0 mL
최소 검체 용적	0.15 mL
최대 상대 원심력	2,000 × g
활성 멤브레인 면적	0.92 cm ²
잔류 용적(멤브레인 및 지지체)	10 µL
치수	
여과액 컵이 장착된 뚜껑이 있는 장치의 길이	95 mm
직경	16 mm
구성 재질	
멤브레인	Ultracel® 재생 셀룰로오스
검체 저장고	폴리카보네이트
멤브레인 지지대	폴리카보네이트
여과액 컵	폴리에틸렌
여과액 컵 뚜껑	폴리에틸렌
O-링	에틸렌 프로필렌 디엔 모노머(Ethylene Propylene Diene Monomer, EPDM)

주의사항: Centrifree® 구성품은 가압멸균할 수 없습니다. 유기 용매와 함께 사용하지 마십시오.

화학적 적합성

Centricon® 장치는 생물학적 체액 및 수용액과 함께 사용하도록 제작되었습니다. 사용 전, 본 장치와 시료에 대한 화학적 적합성을 확인하십시오. 자세한 정보를 위해 SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility를 방문하십시오.

제품 주문

SigmaAldrich.com에서 제품을 온라인으로 주문하십시오.

기호 정의

기호	정의	기호	정의
	카탈로그 번호		제조일자
	재사용 금지		제조사
	배치 코드		비멸균 제품

공지사항

자사는 최선의 지식과 능력에 따라서 애플리케이션 기술과 규제 사안에 관한 정보 및 권고사항을 자사의 고객에게 제공하지만, 의무 또는 책무를 보장하지 않습니다. 자사의 고객은 모든 경우에 기존의 법규를 지켜야 합니다. 이는 제삼자의 모든 권리에 대해서도 또한 적용됩니다. 자사의 정보 및 권고사항은 예상된 목적을 위해 자사 제품의 적합성을 확인해야 하는 자사 고객 자신의 책임을 면제하지는 않습니다.

수집 및 폐기

모든 시료에는 명확한 라벨이 부착되어야 합니다. 시료를 채취하고 준비하기 위해 적합한 기기를 사용해야 합니다.

참고사항: 적용되는 모든 국제적, 연방, 주 및 지역 규정에 따라서 감염성 또는 유해성 생물학적 물질로 오염된 가능성이 있는 품목의 폐기에 대한 주의 사항을 따르십시오.

기술적 지원

자사 웹사이트의 기술 서비스 페이지 SigmaAldrich.com/techservice를 방문하십시오.

이 장치의 심각한 사고는 사용자가 위치한 국가의 제조업체 및 관할 기관에 보고해야 합니다.

표준 보증

본 출판물에 수록된 해당 제품에 적용되는 보증 내용은 SigmaAldrich.com/terms에 실려 있습니다.

Introduksjon

Centrifree®-enheter separerer raskt og effektivt proteinbundet mikroløst stoff i små volum (0,15–1,0 mL) av serum, plasma og andre biologiske prøver ved å bruke en metode som kalles ultrafiltrering. Nøyaktig fordeling skjer i løpet av minutter uten fortynning, endring i fysiologisk pH, ionesammensetning eller ubundet konsentrasjon av oppløste stoffer. Disse enhetene inneholder lav-adsorptive hydrofile membraner og O-ringer uten myknere for å sikre utmerket utvinning. Oppholdsvolumet er 10 µL eller mindre.

I motsetning til dialyse, gelfiltrering eller kulladsorpsjon, gir ultrafiltrering bedre nøyaktighet ved måling av fri ligandkonsentrasjon, bindingskapasitet eller affinitetskonstanter. Det eliminerer tidkrevende metodikk, behovet for spesialutstyr, fortynningsfeil og endringer i bindingsbalanse.

Ultrafiltrering endrer ikke konsentrasjonen av fri mikrooppløst ligand. Protein blir selektivt delt inn i en fraksjon av prøvolumet (konsentratet), mens fri ligand passerer uhindret gjennom membranen sammen med løsemiddel.

Massevirkningsloven og massens bevarelse for ideell proteinbinding forutsier at fri ligandkonsentrasjon i ultrafiltratet forblir konstant, forutsatt at molar bindingskapasitet og affinitet er uavhengig av fullstendig proteinkonsentrasjon. Resultater fra flere systemer som viser konstant fri ligandkonsentrasjon i påfølgende ultrafiltratfraksjoner støtter disse forutsigelsene.

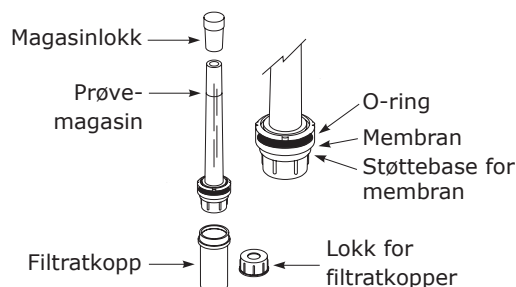
Endring av fri ligandkonsentrasjon som ikke er forårsaket av membranbevaring eller adsorpsjon, er bevis på endret kapasitet eller affinitet til bindingsproteiner på grunn av aggregering eller andre ikke-ideelle protein-protein-interaksjoner. Avhengig av bruken, kan du analysere det endelige filtratet for fri ligandkonsentrasjon, enten kvantitativt eller kvalitativt.

Tiltenkt bruk

Centrifree®-enheter er ikke-sterile ultrafiltreringsenheter for engangsbruk som skal separere materialet fritt fra proteinbundet mikroløsning i små volum (0,15–1,0 mL) av biologiske prøver, som serum, urin, cerebrospinalvæske og andre kroppsvæsker. Enheten er beregnet for engangsbruk, og brukes av fagfolk ved laboratorier.

Komponenter for Centrifree®-enhet

Ultrafiltreringsenheten fra Centrifree® gir maksimal effekt for prosessering av flere prøver. Hver enhet består av en membran og en O-ring som er permanent forseglet mellom prøvemagasinet og støttebasen. En avtagbar filtratkopp er festet til basen. Centrifree®-enheten er kun beregnet for engangsbruk.



Medfølgende materialer

Følgende komponenter følger med ultrafiltreringsenheter fra Centrifree®.

- 50 ultrafiltreringsenheter
- 50 magasinlokk
- 50 filtratkopper
- 50 lokk for filtratkopper

MERK: De røde magasinlokkene følger med for å forhindre prøvefordampning og pH-endring på grunn av tap av CO₂.

Nødvendig utstyr

- Sentrifuge med rotoradapter eller holdere som passer med rør på 17 × 100 mm og som håndterer 1000–2000 × g.

MERK: Bruk en sentrifugerotor med fast vinkel for optimal flyt av løsemiddel.

- Pasteur-pipette eller pipette med fast volum for prøvedistribusjon.

Lagring og stabilitet

Se produktetiketten for informasjon om lagringsforhold.

Retningslinjer for bruk

- Serum, plasma eller andre biologiske væsker kan brukes med Centrifree®-enheter. Fjern fibrin ved å sentrifugere prøven før den fylles i magasinet for å få en mer effektiv gjennomstrømning.
- Anbefalt prøvevolum er 0.15–1.0 mL.
- For best resultat anbefales det at du bruker en sentrifugerotor med fast vinkel i stedet for med svingbeholder, og sentrifugerer ved 1000–2000 × g.

FORSIKTIGHETSREGLER: Ikke bruk med relativ sentrifugalkraft over 2000 × g.

- Gjennomfør innledende undersøkelser av ligandadsorpsjon og proteinbevaring for å sikre at systemet er egnet for den tiltenkte bruken.
- Ultrafiltreringsenheter fra Centrifree® er utformet for bruk med biologiske væsker og vandige løsninger. Ikke bruk enheten med organiske løsemidler.
- Finn korrekt temperatur for ditt bruk. Oppretthold ønsket temperatur ved å bruke en oppvarmet sentrifuge eller ved å forvarme sentrifugerotoren og kammeret. I en rotor med fast vinkel oppnår innholdet i enheten termisk likevekt med rotoren på 5–10 minutter. Den raske ultrafiltreringen som oppnås av Centrifree®-enheter minimerer effekten av temperatur på ligandbinding.
- Må ikke brukes til konsentrasjon og utvinning av makromolekyler.
- Komponentdeler må ikke autoklaveres.
- Centrifree®-enheter skal ikke brukes om igjen.
- Membranen i ultrafiltreringsenheten må ikke tørkes ut når den først har blitt våt. Hvis du ikke bruker enheten umiddelbart etter skylling, må du sørge for at membranen er dekket med væske til enheten skal brukes.
- Ultracel®-membranen i enheten inneholder spor av glyserin (~2 µL). Hvis substansen forstyrrer analysen, kan du skylle enheten med avionisert vann eller 0,1 N NaOH til du ikke lenger observerer forstyrrelser. Hvis du bruker 0,1 N NaOH til å fjerne glyserin, må du skylle enheten grundig med avionisert vann eller buffer før bruk. Sentrifuger i minst 15 minutter for å fjerne så mye væske som mulig. Kast den første alikvoten av ultrafiltratet for å unngå fortynningsfeil forårsaket av innestengt væske (~10 µL) etter skylling.

Slik bruker du ultrafiltreringsenheter fra Centrifree®

Fjern det røde lokket på magasinet før du tar i bruk en Centrifree®-enhet.

1. Hold magasinet i en vinkel på ca. 45° med pipettespissen i kontakt med magasinveggen. Tilsett prøveløsning jevnt i én strøm for å unngå luftsperre.

MERK: Unngå å være borti membranen med pipettespissen.

2. Sett lokk på prøvemagasinet og plasser deretter enheten i en sentrifugerotor med adaptere på 17 × 100 mm. Balanser sentrifugen med en lignende enhet.

MERK: De røde magasinlokkene skal ikke strekke seg mer enn 3–4 mm ned over toppen av magasinet. Ytterligere komprimering kan forårsake prefiltrering, som senere kan medføre analysefeil hvis prøven ikke har ønsket driftstemperatur.

MERK: Kontroller sentrifugeklaring før bruk.

3. Balanser enheten og prøven til temperaturen som kreves for ditt bruk.
4. Sentrifuger enheten ved 1000–2000 × g så lenge det kreves for å oppnå ønsket filtratvolum. Se avsnittet «Ultrafiltreringshastighet» for retningslinjer for filtrering.
5. Fjern enheten forsiktig fra sentrifugerotoren og koble fra filtratkoppen som inneholder ultrafiltratet. Dekk til filtratkoppen med medfølgende lokk til ultrafiltratet skal analyseres.

ADVARSEL: Dersom du skal kaste brukte komponenter, må du sørge for å følge forholdsreglene for avhending av gjenstander som er forurensset med potensielt smittsomt eller farlig biologisk materiale.

MERK: Hvis filteret tørkes ut etter væting, kan det føre til at det ikke fungerer korrekt.

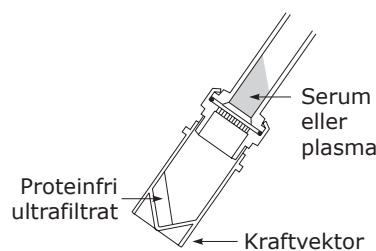


Ytelse

Følgende avsnitt forklarer ulike ytelsesegenskaper, inkludert polarisasjonskontroll, ultrafiltreringshastighet, membranytelse, pH-kontroll og uspesifikk adsorpsjon.

Polarisasjonskontroll

Bruk av en rotor med fast vinkel gir polarisasjonskontroll og minimerer potensialet for artefakter som følge av protein-protein-interaksjoner. Vinkelen motvirker oppbygging av bevart protein på membranoverflaten, da dette tette laget glir utover og samler seg ved kanten av membranen. I en rotor med svingbeholder komprimeres polarisasjonslaget over hele membranoverflaten og begrenser dermed strømmen av løsemiddel.



Ultrafiltreringshastigheter

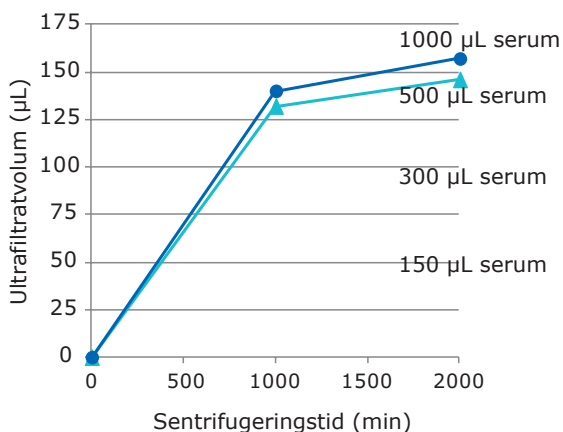
Strømningshastigheten kommer an på konsentrasjonen av protein i prøven, startvolum, relativ sentrifugalkraft (RCF), rotortype og temperatur. Høy strømningshastighet er et resultat av maksimalt overflateareal på membranen, polarisasjonskontroll og optimalt transmembrantrykk som oppnås ved prøvevolum på over 300 μL . Optimale filtreringshastigheter oppnås ved 1000–2000 $\times g$. Høyere sentrifugalkraft øker ikke strømningshastigheten betydelig, og anbefales derfor ikke.

Sammenligning av sentrifugerotorer med fast vinkel kontra svingbeholder

Rotor	RCF ($\times g$)	Typisk ultrafiltratvolum (μL)
Fast vinkel (33°)	1000	140–150
Svingbeholder	1000	115–120

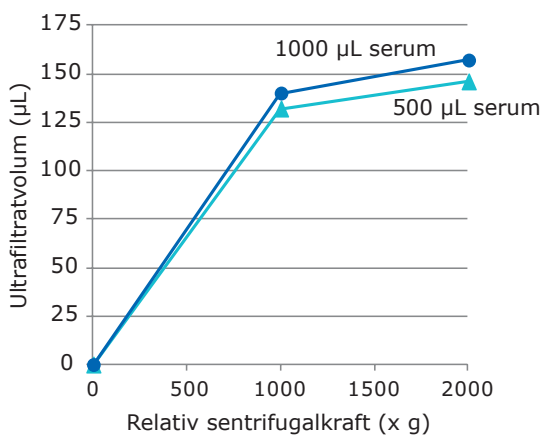
1 mL normalt humant serum, 10 minutters sentrifugering

Typiske ultrafiltreringshastigheter



Forhold: Rotor med fast vinkel på 33°, 25 °C, 1000 $\times g$

Effekt av relativ sentrifugalkraft



Forhold: Rotor med fast vinkel på 33°, 25 °C, 10 min sentrifugering

Membranytelse

Den høye selektive gjennomtrengeligheten til den anisotrope, hydrofile ultrafiltreringsmembranen til Ultracel® skyldes smal porestørrelsesfordeling. Vanligvis bevarer Centrifree®-enheter 99,9% av serumproteinet og < 5% L-tyrosin (0,1 mg/mL i 0,1 N NaOH).

Krav til proteinbevaring for ulikt bruk kommer an på graden av ligandbinding. For en ligand som er 90% bundet, vil 1% serumproteinlekkasje resultere i en 9% overestimert fri ligandkonsentrasjon. Ved måling av fritt tyrosin (> 99,95% bundet) i ufortynnet serum, kreves proteinbevaring på > 99,995% for < 10% feil. Centrifree®-enheter foreslås for separasjon av ligander som er opptil 99% bundet.

Noen ganger kan det oppstå serumlekkasje på grunn av en feil i membranen eller en mekanisk feil. Dersom lekkasjen er større enn 20%, blir ultrafiltratet gult på farge. Å avgjøre en lekkasje mindre enn 20%, krever måling av proteinkonsentrasjonen i ultrafiltratet med en sensitiv mikroproteinanalyse. Hvis du trenger større pålitelighet, men ønsker å unngå rutinemessig proteinanalyse, kan du filtrer prøven i dupliserte enheter.

pH-kontroll

Opprett den akseptable grensen for pH-variasjon for hvert ligandbindende system. Eksperimentelt kan du kontrollere prøvens pH ved anaerob prøvehåndtering og -overføring, gase prøven med 5% CO₂, 95% O₂ eller tilsette av et lite volum konsentrert buffer, forutsatt at bufferionet ikke endrer ligandbindingslikevekter.

Uspesifikk adsorpsjon

Adsorberende tap avhenger av konsentrasjonen av ligand, den ioniske og hydrofobe naturen, temperatur og kontaktid med komponentoverflater og prøvematrikse. Utvinning av ligand som er tilsatt proteinfritt serumultrafiltrat er generelt større enn fra buffer og mer forutsigende for oppførsel med hel-serum. Frie fett- og aminosyrer med lav molekylvekt i proteinfritt ultrafiltrat samhandler med og passiviserer komponentoverflater, mens serumproteiner generelt passiviserer overflater som hele serum møter på. Lav utvinning fra enten proteinfritt ultrafiltrat eller buffer, kan indikere adsorptive tap og/eller membranbevaring av ligand. Ligandutvinning i Centrifree®-enheter er mest nøyaktig i nærvær av bindende proteiner og konkurrerende mikroløsninger.

Spesifikasjoner

Maksimalt prøvevolum	1,0 mL
Minimum prøvevolum	0,15 mL
Maksimal relativ sentrifugalkraft	2000 × g
Aktivt membranområde	0,92 cm ²
Oppholdsvolum (membran og støtte)	10 µL
Dimensjoner	
Lengde på enhet med lokk og filtratkopp	95 mm
Diameter	16 mm
Konstruksjonsmaterialer	
Membran	Regenerert cellulose fra Ultracel®
Prøvemagasin	Polykarbonat
Støttebase for membran	Polykarbonat
Filtratkopp	Polyeten
Lokk for filtratkopper	Polyeten
O-ring	Etylenpropyldienmonomer (EPDM)

FORSIKTIGHETSREGLER: Centrifree®-komponenter kan ikke autoklaveres. Må ikke brukes med organiske løsemidler.

Kjemisk kompatibilitet

Centricon®-enheter er beregnet for bruk med biologiske væsker og vandige løsninger. Kontroller prøven for kjemisk kompatibilitet med enheten før bruk. Gå til [SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility](https://www.sigmaaldrich.com/FilterChemicalCompatibility) for mer informasjon.

Produktbestilling

Kjøp produkter på nettet på SigmaAldrich.com.

Symboldefinisjoner

Symbol	Definisjon	Symbol	Definisjon
	Katalognummer		Produksjonsdato
	Ikke til gjenbruk		Produsent
	Partikode		Ikke-sterilt produkt

Merknad

Vi gir informasjon og råd til kundene våre om applikasjonsteknologier og forskriftsmessige forhold etter beste kunnskap og evne, men uten forpliktelser eller ansvar. Eksisterende lover og regler skal overholdes i alle tilfeller av våre kunder. Dette gjelder også i henhold til eventuelle rettigheter fra en tredjepart. Informasjon og råd vi gir fritar ikke våre kunder for sitt eget ansvar for å sjekke egnetheten til våre produkter til det påtenkte formålet.

Innsamling og avhending

Alle prøver må merkes tydelig. Egnede instrumenter må benyttes for innhenting og klargjøring av prøver.

MERK: Følg forholdsregler for avhending av gjenstander som er forurensset med potensielt smittefarlig eller farlig biologisk materiale i henhold til alle gjeldende internasjonale, nasjonale og lokale forskrifter.

Teknisk støtte

Besøk siden for tekniske tjenester på nettstedet vårt på SigmaAldrich.com/techservice.

Enhver alvorlig hendelse med denne enheten må rapporteres til produsenten og den kompetente myndigheten i landet brukeren holder til.

Standardgaranti

Gjeldende garanti for de oppførte produktene i denne publikasjonen finner du på SigmaAldrich.com/terms.

Úvod

Pomôcky Centrifree® rýchlo a účinne oddeľujú voľné mikromolekulové solúty od tých, ktoré sú naviazané na proteíny, a to v malých objemoch (0,15 – 1,0 mL) séra, plazmy a iných biologických vzoriek metódou nazývanou ultrafiltrácia. K presnému oddeľovaniu častíc dochádza v priebehu minút bez zriedenia, zmeny fyziologického pH, iónového zloženia alebo koncentrácie mikromolekulového solútu. Tieto pomôcky obsahujú nízkoabsorpčné hydrofilné membrány a O-kružky bez zmäkčovadiel, čím sa zabezpečí vynikajúca výťažnosť. Zadržaný objem je 10 µL alebo menej.

Na rozdiel od dialýzy, gélovej filtrácie alebo adsorpcie na drevenom uhlí poskytuje ultrafiltrácia lepšiu presnosť pri meraní koncentrácie voľných ligandov, väzobnej kapacity alebo konštant afinity. Eliminuje časovo náročnú metodiku, nutnosť špeciálneho vybavenia, chyby pri riedení a posuny väzobnej rovnováhy.

Ultrafiltrácia nemení koncentráciu voľných ligandov mikromolekulového solútu. Proteín sa selektívne rozdelí do časti objemu vzorky (koncentrátu), zatiaľ čo voľný ligand prejde v podstate bez prekážok cez membránu spolu s rozpúšťadlom.

Na základe zákonov pôsobenia hmoty a zachovania hmoty pri ideálnom viazaní proteínov sa predpokladá, že koncentrácia voľných ligandov v ultrafiltráte zostane konštantná, za predpokladu, že molárna väzobná kapacita a afinita sú nezávislé od celkovej koncentrácie proteínov. Tieto predpoklady podporujú výsledky z niekoľkých systémov, na základe ktorých sa vo frakciách ultrafiltrátu nasledujúcich po sebe ukazuje konštantná koncentrácia voľných ligandov.

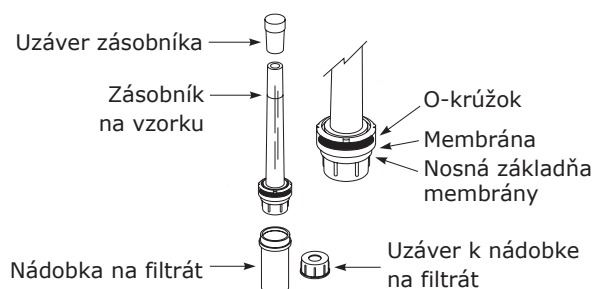
Zmena koncentrácie voľných ligandov, ktorá nie je spôsobená membránovou retenciou alebo adsorpciou, je dôkazom zmenenej kapacity alebo afinity väzobných proteínov v dôsledku agregácie alebo iných neideálnych interakcií medzi proteínmi. V závislosti od použitia môžete analyzovať koncentráciu voľných ligandov vo výslednom filtráte, a to buď kvantitatívne alebo kvalitatívne.

Určené použitie

Pomôcky Centrifree® sú nesterilné jednorazové ultrafiltračné pomôcky, ktoré sú určené na oddelenie voľných mikromolekulových solútov od tých, ktoré sú viazané na proteíny, a to v malých objemoch biologických vzoriek (0,15 – 1,0 mL), napr. séra, moču, mozgovomiechového moku a iných telových tekutín. Pomôcka je určená na jednorazové použitie odborníkom v laboratóriu.

Časti pomôcky Centrifree®

Ultrafiltračná pomôcka Centrifree® poskytuje maximálnu účinnosť pri spracovaní viacerých vzoriek. Každá jednotka pozostáva z membrány a O-kružku trvalo utesneného medzi zásobníkom na vzorku a nosnou základňou. K základni je pripojená odnímateľná nádobka na filtrát. Pomôcka Centrifree® je určená len na jednorazové použitie.



Dodané materiály

Spolu s ultrafiltračnou pomôckou Centrifree® sú dodávané nasledujúce súčasti.

- 50 ultrafiltračných pomôcok
- 50 uzáverov zásobníkov
- 50 nádobiek na filtrát
- 50 uzáverov k nádobkám na filtrát

POZNÁMKA: Dodávané sú červené uzávery zásobníkov na zabránenie odparovaniu vzorky a zmene pH v dôsledku straty CO₂.

Potrebné zariadenie

- Centrifúga s adaptérom rotora alebo nosičmi, ktoré môžu prijať skúmavky s veľkosťou 17 × 100 mm a môžu dosiahnuť zrýchlenie 1 000 – 2 000 × g.

POZNÁMKA: Kvôli optimálnemu prietoku rozpúšťadla používajte rotor centrifúgy s fixným uhlom.

- Pasteurove pipety alebo pipety s fixným objemom na dodanie vzoriek.

Skladovanie a stabilita

Podmienky skladovania nájdete na štítku výrobku.

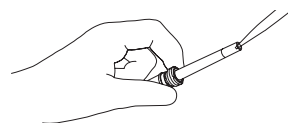
Návod na použitie

- S pomôckami Centrifree® možno použiť sérum, plazma alebo iné biologické tekutiny. Pred vložením vzorky do zásobníka odstráňte fibrín odstrednením vzorky, aby ste dosiahli účinnejšie prietokové rýchlosti.
- Odporúčaný objem vzorky je 0,15 – 1,0 mL.
- Na dosiahnutie najlepších výsledkov použite radšej rotor centrifúgy s fixným uhlom ako výkyvný rotor a odstredujte pri zrýchlení 1 000 – 2 000 × g.
UPOZORNENIE: Nepoužívajte relatívnu odstredivú silu vyššiu ako 2 000 × g.
- Vykonajte predbežné štúdie adsorpcie ligandov a retencie proteínov, aby ste zabezpečili vhodnosť systému na zamýšľané použitie.
- Ultrafiltračné pomôcky Centrifree® sú navrhnuté na použitie s biologickými tekutinami a vodnými roztokmi. Nepoužívajte pomôcky s organickými rozpúšťadlami.
- Určte správnu teplotu pre príslušnú aplikáciu. Požadovanú teplotu udržiavajte pomocou vyhrievanej centrifúgy alebo predhriatím rotora a komory centrifúgy. V rotore s fixným uhlom dosiahne obsah pomôcky tepelnú rovnováhu s rotorom za 5 – 10 minút. Veľká rýchlosť ultrafiltrácie dosiahnutá pomôckami Centrifree® minimalizuje účinky teploty na viazanie ligandov.
- Nepoužívajte na koncentráciu a získavanie makromolekúl.
- Súčasti neautoklávuajte.
- Pomôcky Centrifree® nepoužívajte opakovane.
- Membránu v ultrafiltračných pomôckach nenechajte po namočení vyschnúť. Ak pomôcku nepoužívate okamžite po opláchnutí, nechajte tekutinu na membráne až do použitia pomôcky.
- Membrána Ultracel® v pomôcke obsahuje stopové množstvá glycerínu (~2 µL). Ak táto látka zasahuje do analýzy, prepláchnite pomôcku deionizovanou vodou alebo 0,1 N NaOH, kým už nezaznamenáte žiadnu interferenciu. Ak sa na odstránenie glycerínu použije 0,1 N NaOH, pomôcku pred použitím dôkladne prepláchnite deionizovanou vodou alebo tlmivým roztokom. Odstredujte aspoň 15 minút, aby sa odstránilo čo najviac tekutiny. Ak chcete predísť chybe riedenia spôsobenej zachytenou tekutinou (~10 µL) po prepláchnutí, odhodte prvú alikvotnú časť ultrafiltrátu.

Ako používať ultrafiltračné pomôcky Centrifree®

Skôr než pomôcku Centrifree® použijete, odstráňte červený uzáver zásobníka.

1. Zásobník držte pod uhlom približne 45°, aby sa špička pipety dotýkala steny zásobníka. Roztok so vzorkou pridávajte plynule jedným rovnomerným prúdom, aby ste zabránili zablokovaniu kvôli vzduchu.



POZNÁMKA: Nedotýkajte sa membrány špičkou pipety.

2. Zásobník na vzorku uzatvorte uzáverom a potom umiestnite pomôcku v rotore centrifúgy s adaptérom 17 × 100 mm. Vyvážite centrifúgu podobnou pomôckou.

POZNÁMKA: Červený uzáver na zásobník by nemal presahovať viac ako 3 – 4 mm smerom nadol cez vrch zásobníka. Ďalšia kompresia môže spôsobiť predfiltráciu, ktorá môže následne zapríčiniť analytické chyby, ak vzorka nemá požadovanú prevádzkovú teplotu.

POZNÁMKA: Pred použitím skontrolujte priestor okolo centrifúgy.

3. Teplotu pomôcky a vzorky vyrovnajte na teplotu, ktorá sa vyžaduje pre príslušné použitie.
4. Odstredujte v prístroji pri otáčkach 1 000 – 2 000 × g požadovaný čas, aby ste získali požadovaný objem filtrátu. Pokyny k času odstredovania nájdete v časti „Rýchlosť ultrafiltrácie“.
5. Opatrne vyberte pomôcku z rotora centrifúgy a odpojte nádobku na filtrát obsahujúcu ultrafiltrát. Nádobku na filtrát zakryte dodaným uzáverom, kým nebude možné analyzovať ultrafiltrát.

VAROVANIE: Pri likvidácii použitých častí sa uistite, že dodržiavate opatrenia na likvidáciu predmetov kontaminovaných potenciálne infekčným alebo nebezpečným biologickým materiálom.

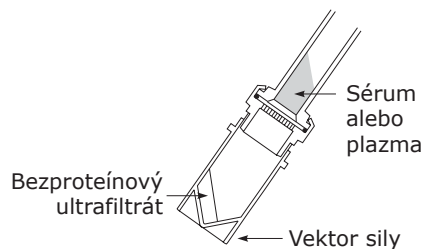
POZNÁMKA: Ak sa filter po namočení nechá vyschnúť, nemusí fungovať správne.

Výkonnostné charakteristiky

V nasledujúcej časti sú uvedené rôzne výkonnostné charakteristiky, vrátane kontroly polarizácie, rýchlosti ultrafiltrácie, výkonu membrány, kontroly pH a nešpecifickej adsorpcie.

Kontrola polarizácie

Rotor s fixným uhlom poskytuje kontrolu polarizácie a minimalizuje možnosť vzniku artefaktov, ktoré by mohli vzniknúť kvôli interakciám medzi proteínmi. Uhol pôsobí proti hromadeniu zadržaného proteínu na povrchu membrány, pretože táto hustá vrstva sa posúva smerom von a hromadí sa na okraji membrány. Vo výkyvnom rotore sa polarizačná vrstva nahromadí po celom povrchu membrány, čím sa obmedzí prietok rozpúšťadla.



Rýchlosť ultrafiltrácie

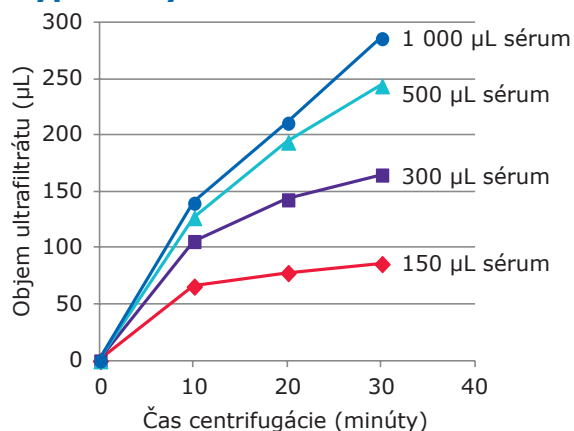
Rýchlosť ultrafiltrácie závisí od koncentrácie proteínu vo vzorke, štartovacieho objemu, relatívnej odstredivej sily (RCF), typu rotora a teploty. Vysoké rýchlosti prietoku sú výsledkom maximálnej povrchovej plochy membrány, kontroly polarizácie a optimálneho transmembránového tlaku dosiahnutého pri použití objemov vzoriek väčších ako 300 µL. Optimálne rýchlosti filtrácie sa dosahujú pri otáčkach 1 000 – 2 000 × g. Vyššia odstredivá sila významne nezvyšuje rýchlosť prietoku a neodporúča sa.

Porovnanie rotorov s fixným uhlom a výkyvných rotorov

Rotor	RCF (× g)	Typický objem ultrafiltrátu (µL)
Fixný uhol (33°)	1 000	140 – 150
Výkyvný rotor	1 000	115 – 120

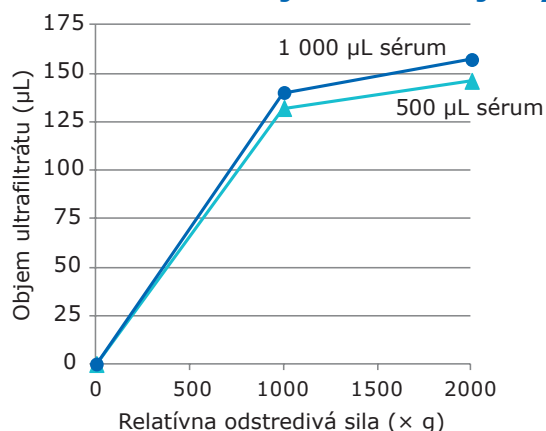
1 mL normálne ľudské sérum, odstredovanie 10 minút

Typické rýchlosti ultrafiltrácie



Podmienky: rotor s fixným uhlom 33°, 25 °C, 1 000 × g

Účinok relatívnej odstredivej sily



Podmienky: rotor s fixným uhlom 33°, 25 °C, odstredovanie 10 minút

Výkon membrány

Vysoko selektívna permeabilita anizotropnej hydrofilnej ultrafiltračnej membrány Ultracel® je spôsobená úzkou distribúciou veľkostí pórov. Pomôcky Centrifree® obvykle zachovávajú 99,9% sérových proteínov a < 5% L-tyroxínu (0,1 mg/mL v 0,1 N NaOH).

Požiadavky na retenciu proteínov pri každom konkrétnom použití závisí od stupňa viazania ligandov. V prípade ligandu, ktorý je naviazaný na 90%, by únik 1% sérových proteínov spôsobil 9% nadhodnotenie koncentrácie voľných ligandov. Pri meraní voľného tyroxínu (naviazaného na > 99,95%) v nezriedenom sére je potrebná retencia > 99,995% na dosiahnutie < 10% chyby. Pomôcky Centrifree® sa odporúčajú na separáciu ligandov, ktoré sú naviazané maximálne na 99%.

Zriedkavo sa môže vyskytnúť únik séra kvôli poškodeniu membrány alebo mechanickému defektu. Ak je únik vyšší ako 20%, bude ultrafiltrát sfarbený na žlté. Na stanovenie úniku menšieho ako 20% je potrebné meranie koncentrácie proteínov v ultrafiltráte pomocou citlivej mikroproteínovej analýzy. Ak je potrebná väčšia spoľahlivosť, ale nechcete použiť rutinnú proteínovú analýzu, filtrujte vzorku vo viacerých pomôckach.

Kontrola pH

Stanovte prijateľný limit variácie pH pre každý systém viazania ligandov. Experimentálne je možné kontrolovať pH vzorky anaeróbnou manipuláciou a prenosom vzorky, plynovaním vzorky s 5% CO₂, 95% O₂ alebo pridaním malého objemu koncentrovaného tlmivého roztoku, za predpokladu, že ióny tlmivého roztoku nemenia rovnováhu viazania ligandov.

Nešpecifická adsorpcia

Adsorpčné straty závisia od koncentrácie ligandu, jeho iónovej a hydrofóbnej povahy, teploty a trvania kontaktu s povrchmi komponentu, ako aj od matrice vzorky. Výťažnosť ligandu, ktorý bol pridaný do bezproteínového ultrafiltrátu séra je vo všeobecnosti väčšia ako z tlmivého roztoku a viac predpovedá správanie s plným sérom. Nízkomolekulové voľné mastné kyseliny a aminokyseliny v bezproteínovom ultrafiltráte interagujú s povrchmi komponentov a pasivujú ich, zatiaľ čo sérové proteíny vo všeobecnosti pasivujú povrchy, s ktorými sa stretáva celé sérum. Nízka výťažnosť z bezproteínového ultrafiltrátu alebo tlmivého roztoku môže poukazovať na adsorpčné straty alebo membránovú retenciu ligandu. Výťažnosť ligandu v pomôckach Centrifree® je najpresnejšia v prítomnosti väzobného proteínu a súťažiacich mikromolekulových solútov.

Špecifikácie

Maximálny objem vzorky	1,0 mL
Minimálny objem vzorky	0,15 mL
Maximálna relatívna odstredivá sila	2 000 × g
Aktívna plocha membrány	0,92 cm ²
Zadržaný objem (membrána a základňa)	10 µL
Rozmery	
Dĺžka uzatvorenej pomôcky s nádobkou na filtrát	95 mm
Priemer	16 mm
Materiály konštrukcie	
Membrána	Regenerovaná celulóza Ultracel®
Zásobník na vzorku	Polykarbonát
Nosná základňa membrány	Polykarbonát
Nádobka na filtrát	Polyetylén
Uzáver k nádobke na filtrát	Polyetylén
O-kružok	Etylén-propylén-diénový monomér (EPDM)

UPOZORNENIE: Časti pomôcky Centrifree® nie je možné autoklávovať. Nepoužívajte s organickými rozpúšťadlami.

Chemická kompatibilita

Pomôcky Centrifree® sú určené na použitie s biologickými tekutinami a vodnými roztokmi. Pred použitím skontrolujte, či je vzorka chemicky kompatibilná s pomôckou. Ďalšie informácie nájdete na stránke SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility.

Objednávanie výrobkov

Výrobky môžete zakúpiť online na webovej stránke SigmaAldrich.com.

Definície symbolov

Symbol	Definícia	Symbol	Definícia
	Katalógové číslo		Dátum výroby
	Nepoužívajte opakovane		Výrobca
	Kód šarže		Nesterilný výrobok

Poznámka

Informácie pre aplikačné technológie a regulačné záležitosti poskytujeme našim zákazníkom na základe našich najlepších vedomostí a schopností, ale bez ďalšej povinnosti alebo záväzku. Naši zákazníci sú v každom prípade povinní dodržiavať existujúce zákony a predpisy. To platí rovnako aj vo vzťahu k tretím stranám. Naše informácie a rady nezabavujú našich zákazníkov ich vlastnej zodpovednosti za kontrolu vhodnosti našich výrobkov pre nimi zamýšľané využitie.

Zber a likvidácia

Všetky vzorky musia byť zreteľne označené. Na získanie a prípravu vzoriek je nutné použiť vhodné nástroje.

POZNÁMKA: Dodržiavajte opatrenia na likvidáciu predmetov kontaminovaných potenciálne infekčným alebo nebezpečným biologickým materiálom podľa všetkých medzinárodných, federálnych, štátnych a miestnych predpisov.

Technická pomoc

Navštívte stránku technického servisu na našej webovej lokalite SigmaAldrich.com/techservice.

Každú závažnú udalosť s touto pomôckou je potrebné hlásiť výrobcovi a príslušnému orgánu v krajine, v ktorej sídli používateľ.

Štandardná záruka

Informácie o platnej záruke na výrobky uvedené v tomto dokumente možno nájsť na stránke SigmaAldrich.com/terms.

Giriş

Centrifree® cihazları ultrafiltrasyon yöntemini kullanarak hızlı ve verimli bir biçimde proteine bağlanmış mikroçözünmüş maddeleri 0,15-1,0 mL gibi küçük hacimli serum, plazma ve diğer biyolojik örneklerden çıkarır. Tutarlı bölümlenme dakikalar içinde bir seyreltme, fizyolojik pH değişimi, iyon bileşimi, ya da serbest mikroçözünmüş madde derişimi etkilenmeden gerçekleşir. Bu cihazlar mükemmel geri kazanımı garanti altına almak için düşük tutucu kapasiteli hidrofilik zarlar ve O-ringler içermektedir. Tuttuğu hacim 10 µL ya da daha azdır.

Diyaliz, jel filtreleme ya da odun kömürü yüzeye yapıştırma yöntemlerine kıyaslandığında, ultrafiltrasyon daha yüksek tutarlılıkla serbest ligand derişimi, bağlanma kapasitesi ya da çekme sabitleri ölçer. Bu yöntem sayesinde çok zaman alan metodolojiler, özelleştirilmiş ekipman ihtiyacı, seyreltme alakalı hatalar ve bağlanma dengesindeki değişimlerle ilgili karışıklıklar ortadan kalkar.

Ultrafiltrasyon serbest mikroçözünmüş ligand derişimini değiştirmez. Protein seçici olarak örnek hacminin bir bölümünde derişirken (deriştirilmiş madde) serbest ligandlar çözücü ile neredeyse hiç engellenmeden membrandan geçer.

Molar bağlanma kapasitesi ve çekicilik toplam protein derişiminden bağımsız olduğu sürece kütle eylem kanunu ve kütle korunumu kanunun tahminine göre ultrafiltre edilmiş malzemedeki serbest ligand derişimi sabit kalmaktadır. Bu tahminleri bir kaç farklı sistemde yapılan farklı ultrafiltrasyon kesitlerinde aynı serbest ligandın görülmesi durumu desteklemektedir.

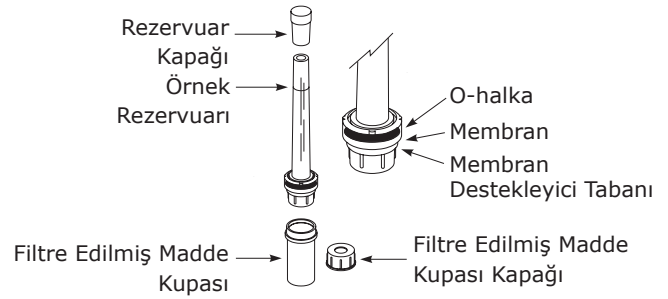
Membrandan kaynaklanmayan serbest ligand derişimindeki değişimler proteinlerdeki bağlayıcılığın kapasite ya da çekiciliğinin değişmesi ya da ideal olmayan protein-protein ilişkisinin bir kanıtıdır. Uygulamanın çeşidine göre filtre edilmiş çözeltide serbest ligand derişimi hem kalitatif hem kantitatif olarak analiz edilebilir.

Kullanım Amacı

Centrifree® cihazlar; küçük hacimli (0,15–1,0 mL) biyolojik örneklerdeki (ör. serum, idrar, beyin-omurilik sıvısı ve diğer vücut sıvıları) proteine bağlanmış mikroçözünmüş maddeleri ayırmak için tasarlanmış steril olmayan, tek kullanımlık ultrafiltrasyon cihazlarıdır. Cihaz tek kullanımlıktır ve laboratuvar uzmanları tarafından kullanılır.

Centrifree® Cihaz Bileşenleri

Centrifree® ultrafiltrasyon cihazı çoklu örnek işleme için maksimum verimi sağlamaktadır. Her bir birim örnek rezervuarı ve destekleyici taban arasında mühürlenmiş bir membran ve O-halkadan oluşmaktadır. Tabana tutturulmuş takılıp çıkarılabilir bir filtre edilmiş malzeme kupası vardır. Centrifree® cihazı tek kullanımlık olacak şekilde yapılmıştır.



Sağlanan Malzemeler

Aşağıda belirtilen malzemeler Centrifree® ultrafiltrasyon cihazla birlikte sağlanmıştır.

- 50 ultrafiltrasyon cihazı
- 50 rezervuar kupası
- 50 filtre edilmiş madde kupası
- 50 filtre edilmiş madde kupası kapağı

NOT: Kırmızı rezervuar kapakları örnek buharlaşmasını ve karbondioksit kaybı dolayısıyla olacak pH dalgalanmalarını önlemek için sağlanmaktadır.

Gereken Ekipmanlar

- Çark adaptörü olan ya da 17 x 100 mm tüpleri kabul edebilen, aynı zamanda 1.000-2.000 g ile çalışabilen sentrifüj

NOT: Optimum çözücü akışı için sabit açılı sentrifüj çarkı kullanın.

- Örnek taşınması ve aktarılması için pastör ya da sabit hacimli pipetler kullanın.

Saklama ve Stabilité

Saklama koşulları için ürün etiketine bakın.

Kullanım Rehberi

- Centrifree® cihazları ile serum, plazma ya da diğer biyolojik akışkanlar işlenebilir. Daha verimli akım hızları için örneği rezervuara koymadan önce fibrini çıkarmak için sentrifüjleyin.
- Önerilen örnek hacmi 0,15-1,0 mL arasındadır.
- En iyi sonuçları almak için sallanan kovalı sentrifüj çarkı yerine sabit açılı çark ve 1.000-2.000 g li sentrifüj seçilmelidir.
DİKKAT: 2.000 g üstündeki merkezci kuvvetlerde çalışmayın.
- İstenen uygulama için sistemin uygunluğunu anlamak amacıyla ligand yüzeye tutunma ve protein tutma ön çalışmaları yapın.
- Centrifree® sentrifüj cihazları biyolojik akışkanlar ve sulu çözeltilerle kullanımı göz önünde bulunularak üretilmiştir. Organik çözücülü örnekleri bu cihazla kullanmayın.
- Uygulamanız için doğru sıcaklık düzeyine karar verin. Bu belirlenen sıcaklığı ısıtılmış sentrifüj ile ya da çarkı ve örnek bölmesini önden ısıtarak koruyun. Sabit açılı çarkta cihazın içerikleri 5-10 dk içinde termal dengeye ulaşmaktadır. Centrifree® hızlı bir şekilde ultrafiltrasyon yapması sıcaklığın ligand bağlanmasına olan etkisini minimize eder.
- Makromoleküllerin geri kazanımı ya da deriştirilmesi için kullanmayın.
- Bileşen bölümlerini otoklavlamayın.
- Centrifree® cihazlarını birden fazla kez kullanmayın.
- Ultra filtreleme cihazındaki membranların bir kere ıslandıktan sonra kurumalarına izin vermeyin. Eğer durulama işleminden hemen sonra cihazı kullanmayacaksanız bu sıvıyı membranın üstünde cihazı yeniden kullanıncaya dek bırakın.
- Cihazdaki Ultracel® membranı eser miktarda gliserin içermektedir (~2 µL). Eğer bu kimyasal analizlerinize müdahale ediyorsa, cihazı deiyonize su ile ya da 0,1 N NaOH ile hiç bir karışım gözlemlenmeyinceye kadar durulayın. Eğer bu durulama için 0,1 N NaOH kullanılmışsa, kullanım öncesi cihazı iyi bir şekilde deiyonize su ya da tampon çözeltiyle yıkayın. Mümkün olduğunca çok akışkanı temizleyebilmek için en az 15 dakika boyunca döndürün. Tuzaklanmış akışkan tarafından (~10 µL) olabilecek seyreltme hatalarından kaçınmak için ultrafiltrasyonun ilk çekimini atın.

Centrifree® Ultrafiltrasyon Cihazları Nasıl Kullanılır?

Kullanmadan önce Centrifree® cihazındaki kırmızı rezervuar kapağını çıkarın.

- Rezervuarı yaklaşık olarak pipetle 45° açı yapacak şekilde tutup pipeti rezervuar duvarına değdirin. Hava karışmasını önlemek için örnek çözeltiyi sakın bir biçimde tek seferde aktarın.
NOT: Pipetin ucuyla zara değmekten kaçının.
- Örnek rezervuarını kapayın ve 17 x 100 mm tüp adaptörleri olan bir sentrifüj çarkına yerleştirin. Hiza olarak sentrifüjdeki yerine tam karşısında benzer bir cihazı karşı kütle olarak koyun.
NOT: Kırmızı rezervuar kapağı rezervuar tepesinin 3-4 mm den daha fazla altında bulunmamalıdır. Daha fazla sıkıştırma ön filtrelemeye, bu durum da özellikle örnek istenen sıcaklıkla işlenmiyorsa analitik hatalara neden olabilir.
NOT: Kullanmadan önce sentrifüj ağırlıklarını kontrol edin.
- Cihazı ve örneğinizi uygulamanız için gereken sıcaklıkta dengeye getirin.
- İstenen filtre edilmiş malzeme hacmine ulaşmak için cihazı 1.000-2.000 x g ile döndürün. Döndürme zamanı rehberleri için "Ultrafiltrasyon Hızı" bölümüne göz atın.
- Cihazı sentrifüj çarkından dikkatli bir şekilde çekip ultrafiltre edilmiş malzemeyi içeren kupayı sökün. Ultrafiltre edilmiş malzeme analize sokulana kadar filtre edilmiş malzeme kupasını sağlanmış kapak ile kapayın.
UYARI: Eğer kullanılmış bileşenleri atacaksanız, potansiyel olarak bulaşıcı ya da tehlikeli biyolojik malzemeyle kontamine olmuş nesnelerin bertarafı için gerekli önlemleri alın.
NOT: Eğer ıslandıktan sonra kuruması engellenmezse filtreler doğru bir şekilde çalışmayabilir.

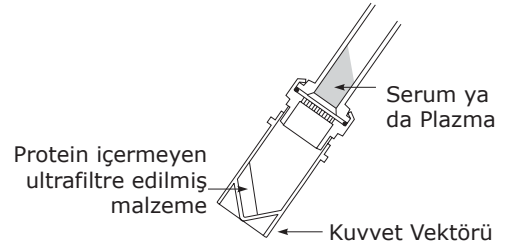


Performans

Takip eden bölümler çeşitli performans karakteristiklerini içermektedir: polarizasyon kontrolü, ultrafiltrasyon hızı, membran performansı, pH kontrolü ve spesifik olmak yüzeye tutunma.

Polarizasyon Kontrolü

Sabit açılı çark kullanımı polarizasyon kontrolüne olanak sağlar ve protein-protein etkileşimi kaynaklı kalıntıları minimize eder. Açı sayesinde membran üzerinde protein birikimi karşıtlanmıştır çünkü bu yoğun katman dışarıya doğru kayar ve membranın kenarına itilir. Sallanan kovalı çarkta polarizasyon katmanı bütün membran yüzeyine sıkışmış olur ve çözücü akışını zorlaştırır.



Ultrafiltrasyon Hızı

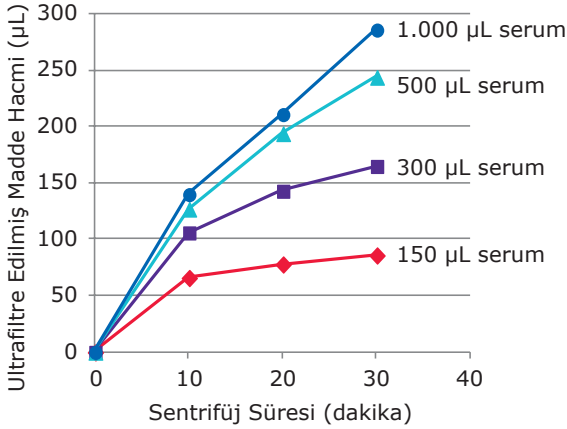
Akış hızı örnekteki protein derişimine, başlangıç hacmine, görelî sentrifüj kuvvetine (RCF), çark tipine ve sıcaklığa bağlıdır. Maksimum membran yüzey alanı yüksek akış hızlarına sonuç verir, polarizasyon kontrol ve optimum membran geçişi basınçları 300 µL'den daha yüksek hacimlerle elde edilir. Optimum filtrasyon hızları 1.000-2.000 x g ile elde edilir. Daha yüksek sentrifüj kuvvetleri pek önemli ölçüde akış hızını etkilemez ve önerilmez.

Sabit Açılı ve Sallan Kovalı Sentrifüj Çarklarının Karşılaştırılması

Çark	RCF (x g)	Tipik Ultrafiltre Edilmiş Malzeme Hacmi (µL)
Sabit açılı çark (33°)	1.000	140-150
Sallanan kovalı	1.000	115-120

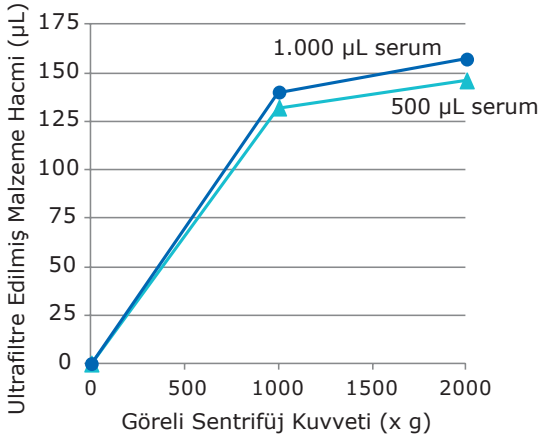
1 mL normal insan serumu, 10 dakika dönüş

Tipik Ultrafiltrasyon Hızları



Koşullar: 33° Sabit açılı çark, 25 °C, 1000 x g

Görelî Sentrifüj Kuvvetinin Etkisi



Koşullar: 33° sabit açılı çark, 25 °C, 10 dakika dönüş

Membran Performansı

Anizotropik, Hidrofilik Ultracel® ultrafiltrasyon membranının yüksek seçicilikteki geçirgenliği dar delik boyutu dağılımından kaynaklanmaktadır. Tipik olarak, Centrifree® cihazları serum proteininin%99.9'unu ve L-tiroksinin < %5'ini (0,1 mg/mL - 0,1 N NaOH) tutar.

Protein tutma gereklilikleri ligandın bağlanma derecesine bağlıdır. Yüzde 90% proteine bağlı olan ligand, % 1 serum proteini sızıntısı sonucunda%9 daha fazla serbest ligand derişimi tahmin edilmesiyle sonuçlanacaktır. Seyreltilmemiş serumdaki serbest tiroksin ölçümü için (%99,95'i bağlı)%10'dan daha küçük hata payına ulaşmak protein tutunumunun%99,995'ten daha iyi olmasını gerektirir. Centrifree® cihazları% 99'a kadar proteine bağlı olan ligandların ayrıştırılması için önerilir.

Bazen membrandaki bir defo ya da mekanik bir hata dolayısıyla serum sızıntısıyla karşılaşılabilir. Eğer sızıntı %20'den fazlaysa ultrafiltre edilmiş malzeme sarı renkli olacaktır. Yüzde 20'den daha küçük düzeyde bir sızıntının tespit edilmesi ultrafiltre edilmiş malzemedeki protein derişiminin hassas mikroprotein analiziyle ölçülmesini gerektirmektedir. Eğer daha güvenilir bir deney fakat daha az rutin protein analizleri istiyorsanız örneği iki farklı cihazda tekrarlı olarak ölçün.

pH Kontrolü

Her bir ligand bağlanma sistemi için kabul edilebilir pH varyasyonunu belirleyin. Deneysel olarak örnek pH'sı anaerobik örnek yönetimi ve taşınımı, örneği%5 karbondioksit ve% 95 oksijen atmosferiyle gazlama ya da küçük hacimli derişik fakat ligand bağlanma dengesini etkilemeyen tampon çözeltisiyle sağlanabilir.

Spesifik Olmayan Yüzeye Yapışma

Tutunma kayıpları ligandın derişimine, iyonik ve hidrofobik doğasına, sıcaklığa ve bileşen yüzeyleriyle temas süresine ve örnek matrisine bağlıdır. Protein olmayan ultrafiltre çözeltiye eklenen ligandın geri kazanımı genel olarak tampona eklenmiş olandan daha fazladır ve bütün serumda gözlenecek davranışın daha benzeri bir durum sergiler. Protein olmayan ultrafiltre edilmiş malzemedeki düşük moleküler ağırlıklı serbest yağ ve amino asitler bileşen yüzeyleriyle etkileşip pasifize ederler, bir diğer yandan serum proteinleri bütün serum tarafından temas edilen yüzeyleri pasifize ederler. Hem protein olmayan ultrafiltre edilmiş malzemeden hem de tampon çözeltiden düşük miktarda geri kazanım yüzeye yapışma kaynaklı kayba ya da ligandın membran tarafından tutulmasına işaret edebilir. Centrifree® cihazlarındaki ligand geri kazanımı, bağlayıcı protein ve rekabet eden mikroçözünmüş kimyasalların varlığında en yüksek tutarlılıktadır.

Özellikler

Örneğin maksimum hacmi	1,0 mL
Örneğin minimum hacmi	0,15 mL
Maksimum görelî sentrifüj kuvveti	2.000 × g
Aktif membran alanı	0,92 cm ²
Membran ve Destek Tabanın Tuttuğu Hacim	10 µL
Boyutlar	
Kapaklanmış cihazın filtre edilmiş malzeme kupasıyla birlikte toplam uzunluğu	95 mm
Çap	16 mm

Yapım malzemeleri

Membran	Ultracel®'in yenilenebilen selülozu
Örnek rezervuarı	Polikarbonat
Membran destekleyici tabanı	Polikarbonat
Filtre edilmiş kupa	Polietilen
Filtre edilmiş kupa kapağı	Polietilen
O-halka	Etilen propilen dien monomer (EPDM)

DİKKAT: Centrifree® bileşenleri otoklavlanamaz Organik çözücülerle kullanmayın.

Kimyasal Uygunluk

Centricon® cihazlar biyolojik akışkanlar ve sulu çözeltilerle kullanım için üretilmiştir. Kullanımdan önce örneğin cihazla kimyasal olarak uyumluluğunu kontrol edin. İletişim bilgileri için SigmaAldrich.com/FilterChemicalCompatibility adresine gidin.

Ürün Siparişi

Ürünleri çevrimiçi olarak şuradan satın alabilirsiniz SigmaAldrich.com.

Sembol Tanımları

Sembol	Tanım	Sembol	Tanım
	Katalog numarası		Üretim tarihi
	Birden fazla kez kullanmayın		İmalatçı
	Sıra numarası		Steril olmayan ürün

Uyarı

Müşterilerimize uygulama teknolojileri ve düzenleyici konular hakkında bilgimiz ve yeteneğimiz dâhilinde ancak herhangi bir yükümlülük veya sorumluluk olmaksızın bilgi ve tavsiye veriyoruz. Müşterilerimiz her durumda mevcut yasalara ve yönetmeliklere uymalıdır. Bu, aynı zamanda üçüncü şahısların hakları için de geçerlidir. Sağladığımız bilgi ve tavsiyelerimiz müşterilerimizin, ürünlerimizin öngörülen amaca uygunluğunu kontrol etme sorumluluklarını ortadan kaldırmaz.

Toplama ve Bertaraf

Bütün örnekler net bir şekilde etiketlenmelidir. Örnekleri toplamak ve hazırlamak için uygun cihazlar kullanılmalıdır.

NOT: Potansiyel olarak bulaşıcı ya da tehlikeli biyolojik malzemeyle kontamine olan maddenin bertaraf edilmesi için bütün uygulanabilir uluslararası, federal, devlet ya da yerel yönetmeliklere göre düzenlenmiş önlemleri takip edin.

Teknik Destek

SigmaAldrich.com/techservice adresindeki web sitemizdeki teknik servis sayfasını ziyaret edin.

Cihazla ilgili her türlü ciddi kaza üretici firmaya ve kullanıcının bulunduğu ülkenin ilgili yetki sahibi kişiliğine rapor edilmelidir.

Standart Garanti

Bu belgede listelenen ürünlerin geçerli garantisi SigmaAldrich.com/terms adresinde bulunabilir.



Made in Ireland

Merck Millipore Ltd.
Tullagreen, Carrigtwohill,
Co. Cork, Ireland
T45 KD29

an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany

UK Responsible Person:

Millipore (UK) Ltd.
Kirkton Campus
Fleming Road,
Livingston, UK
EH54 7BN

MilliporeSigma, Millipore, Centrifree, Ultracel, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.
© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Millipore
Sigma