

SEC-SAXS システム マニュアル (HPLC (島津 Nexera/Prominence-i)版 2022.011.09)

内容

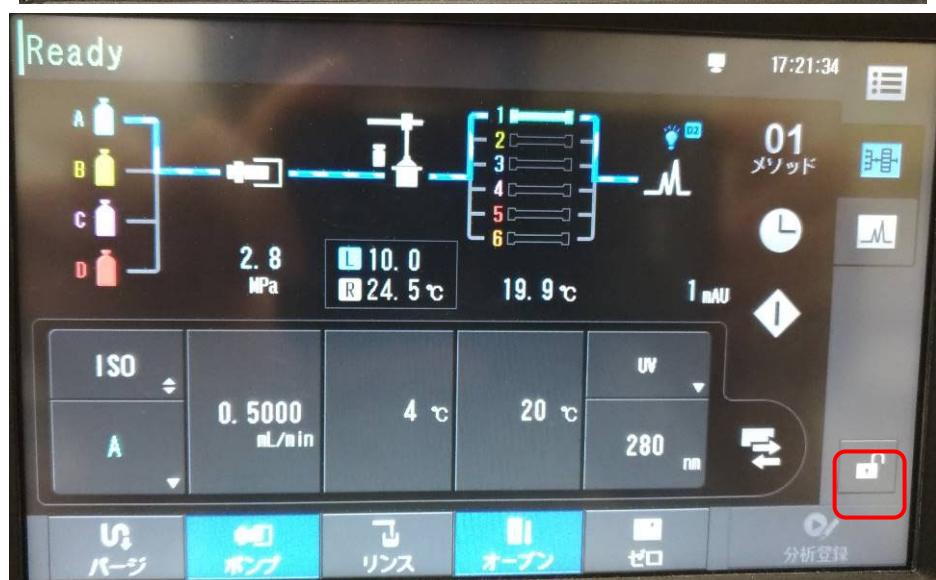
0 事前確認	2
1 buffer 交換・カラムの平衡化	9
1A 施設所有のカラムが既に接続されそれを利用する場合	9
1B 持ち込んだカラムをつなぎこむ場合	12
2 SAXS セル、サンプルバイアルのセット	17
3 SEC-SAXS 測定の設定	20
SAXS のバックグラウンドの測定	20
分光ソフトのレファレンス設定	23
PILATUS 測定ソフトの設定	24
分光ソフトの設定	26
HPLC 設定	29
SEC-SAXS 測定の実行	36
4 片付け	39
FAQ	40
付録 1 溶媒の取り込みライン	41
付録 2 分光光度計コントロールソフト(OPwave -EXT-K)の起動法	42

0 事前確認

0-1 HPLC 本体の確認

Lab Solutions (HPLC 制御用のソフトウェア)を立ち上げると、HPLC 本体の液晶からの操作がロックされる。

バッファー交換その他で、HPLC 本体の液晶からの操作をしたいときは、液晶のカギマーク①をタッチし、②パスワード:00000 を入力しロックを解除する。



0-2

液晶画面[分析メイン画面]の溶媒ボトル部を触ってパラメータ画面のポンプタブを開き、以下を確認する。

流量:1A-7で設定した値

圧力上限:**4.5** MPa (デフォルト:カラムによって変更) [4.0 ->4.5に設定変更(2021/02/01)]

圧力下限:**0.0** MPa (デフォルト:カラムによって変更)

ポート:A



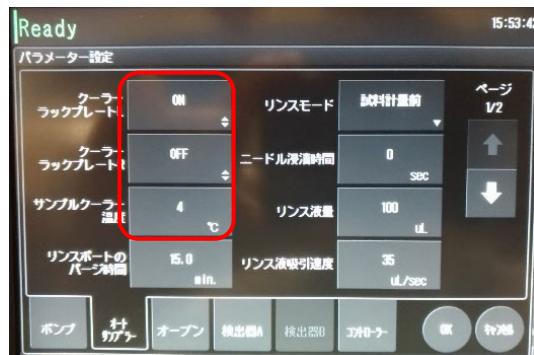
0-3

パラメータ画面のオートサンプルタブを開き、以下を確認する。

クーラーラックプレートL:ON

クーラーラックプレートR:OFF

サンプルクーラー温度:**4** °C (適切な値を入力する)



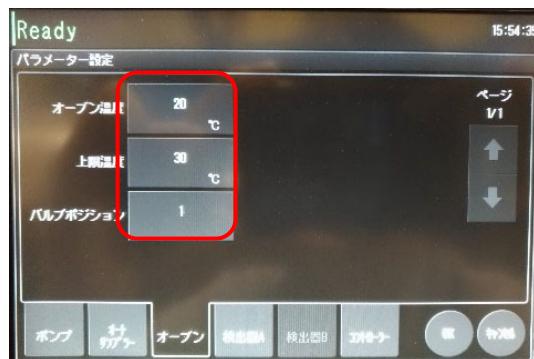
0-4

パラメータ画面のオープンタブを開き、以下を確認する。

オープン温度: **20°C** (適切な値を入力する)

上限温度: **30°C** (オープン温度 4~25°C の場合)

バルブポジション: **1**



0-5

パラメータ画面の検出器 A タブを開き、以下を確認する。

波長 1: **280 nm**

ランプ: **D2**

セル温調: **ON**

セル温度: **30°C [変更不可]**



0-6

OK をタッチする。OFF あつたら、オートサンプラーの温調と UV 検出器のランプが動き始め、ラック L の温度表示が水色に、水色の電球[D2]が点灯する。

0-7

画面下の「ポンプ」(流速は適切な値に変更)、「オープン」をそれぞれタッチしポンプ送液とカラムクーラーの温調を開始する。(動作中はボタンが青くなる)



0-8

流量を 0.5 ml/min 程度に設定し送液を開始し、圧力を確認する。

カラム無しで圧力が~1.5 MPa(MilliQ)、

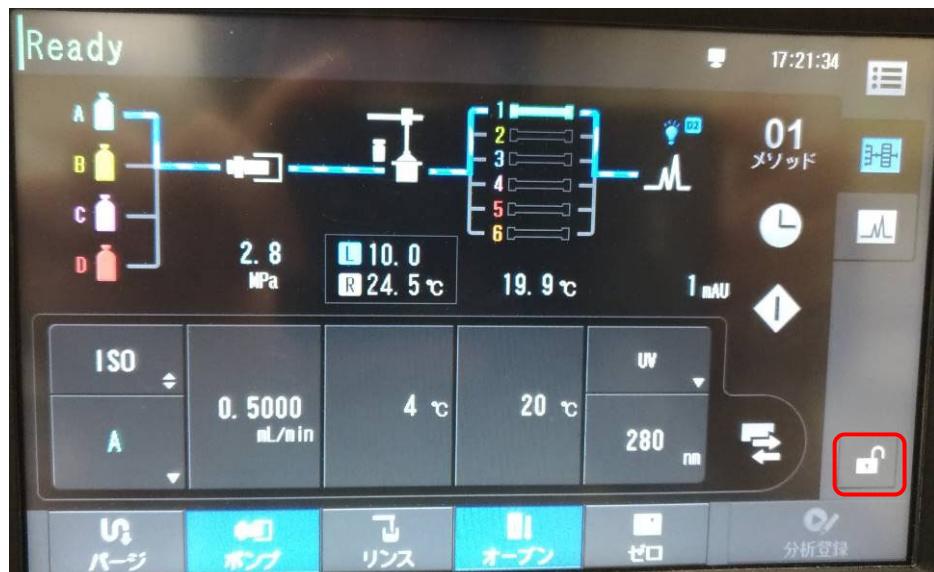
PF カラム(大)で圧力が~4.5 MPa 程度(MilliQ)であることを確認する。

0-9

流量を 0.05~0.1 ml/min 程度に戻す。

0-10

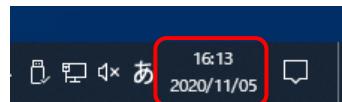
HPLC の設定確認が完了後、本体の液晶をロックする。



0-11 時刻の同期(HPLC コントロール PC)

Lab Solutions の動作している PC (制御もしくは測定 PC 上のリモートデスクトップ) の時刻と測定 PC の時刻が一致しているかを確認する。一致していれば 0-13 へ進む。一致していなければ、Lab Solutions の動作している PC

(制御 PC 上のリモートデスクトップ) のリモートウィンドウ右下の時計部分を右クリックし、“日付と時刻の調整”を選択する。



0-12

“時刻を同期する”にて「今すぐ同期」をクリックする。ビームラインごとのタイムサーバーの IP アドレスは、以下の通りです。問題なければすぐに同期されます(エラーが出た場合でも、1, 2 回繰り返してみる。IP アドレスの設定が下記の組み合わせ通りなら問題ない)。

BL-10C:	172.16.0.66
BL-15A2:	172.16.0.1

時刻を同期する
前回成功した時刻の同期:2020/11/05 16:44:15
タイム サーバー: 172.16.0.66
[今すぐ同期](#) ✓

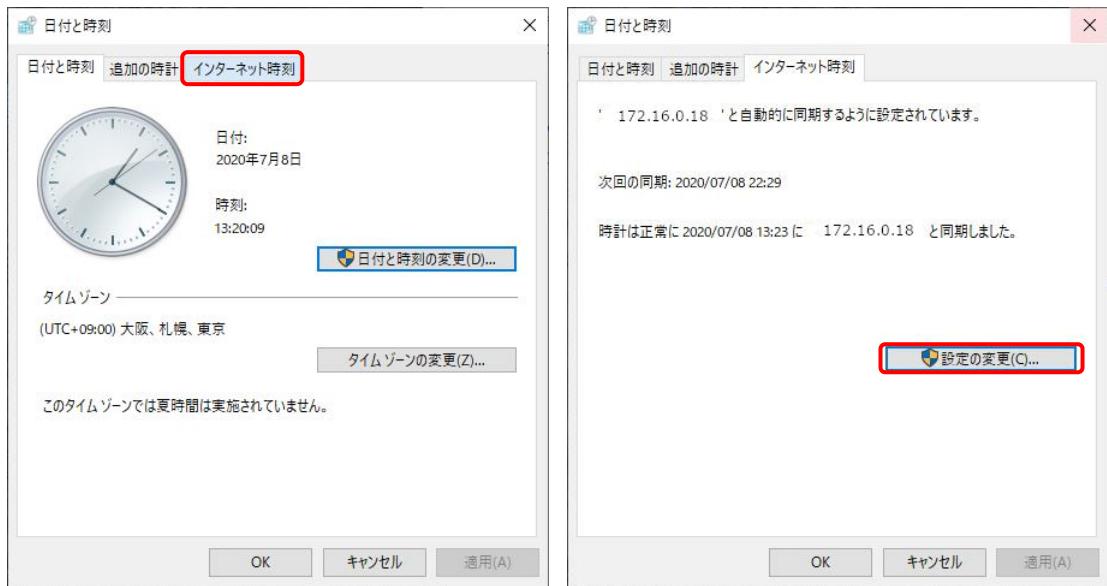
0-13

使用ビームラインと IP アドレスの組み合わせが違う場合(事情があって、BL-15A2 の HPLC を BL-10C で利用しているような場合)、ウィンドウ右側の“別のタイムゾーンの時計を追加する”をクリックする。

関連設定
[日付、時刻、地域の書式設定](#)
[別のタイムゾーンの時計を追加する](#)

0-14

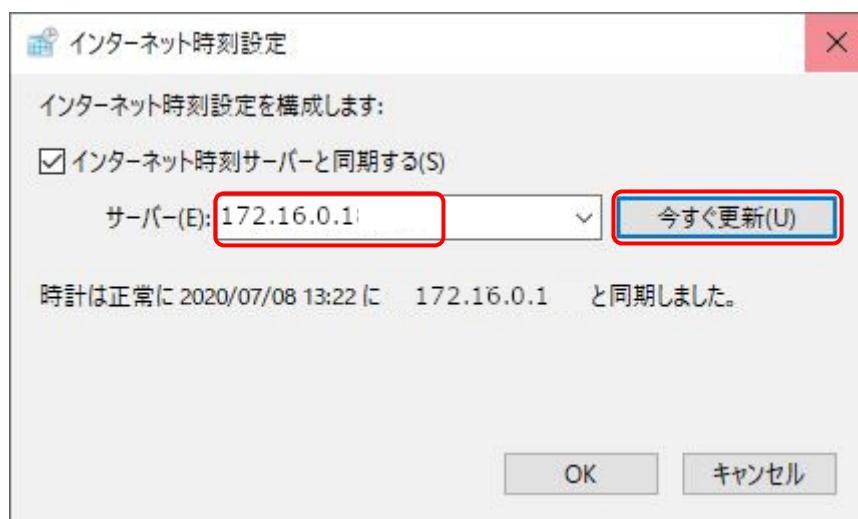
日付と時刻ウインドウ内でインターネット時刻タブをクリックし、タブ内の設定の変更をクリックする。



0-15

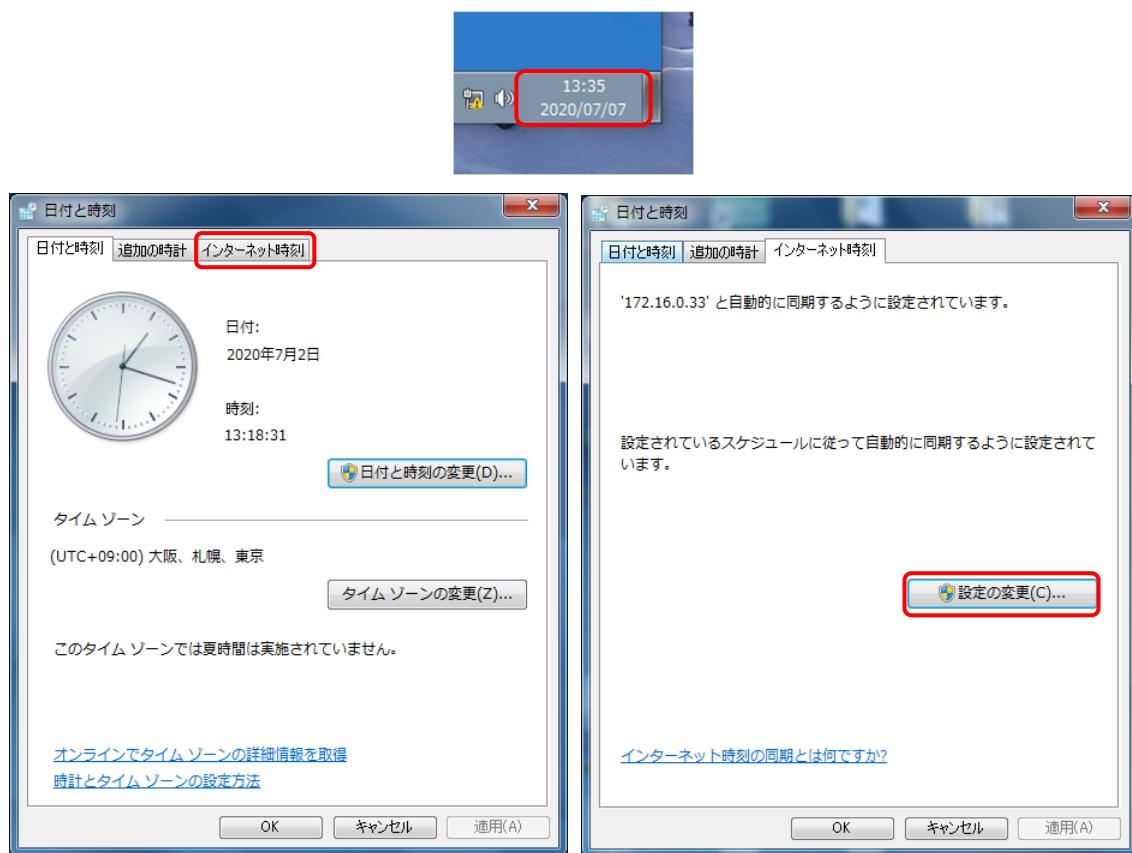
インターネット時刻設定タブ内のサーバーに、以下に示すビームラインごとのタイムサーバーの IP アドレスを入力して、今すぐ更新をクリックする。

BL-10C	172.16.0.66
BL-15A2	172.16.0.1



0-16 時刻の同期(分光コントロール PC)

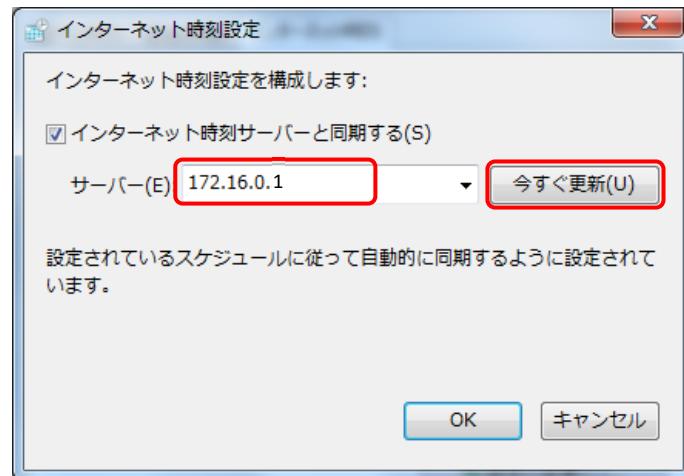
OPwave の動作している PC (測定 PC 上のリモートデスクトップ) の時刻と測定 PC の時刻が一致しているかを確認する。一致していれば 1 へ進む。一致していない場合は、OPwave の動作している PC (測定 PC 上のリモートデスクトップ) のリモートウィンドウ右下の時計部分を右クリックし、“日付と時刻の調整”を選択する。日付と時刻ウインドウ内でインターネット時刻タブをクリックし、タブ内の設定の変更をクリックする。



0-17

インターネット時刻設定サーバーに、以下に示すビームラインごとのタイムサーバーの IP アドレスを入力して、今すぐ更新をクリックする。

BL-10C	172.16.0.66
BL-15A2	172.16.0.1



1 buffer 交換・カラムの平衡化

1A 施設所有のカラムが既に接続されそれを利用する場合

1B 各ユーザーの持ち込んだカラムを接続する場合

1A 施設所有のカラムが既に接続されそれを利用する場合

前提

システム(HPLC、分光光度計、PILATUS)はすべて接続・起動済み

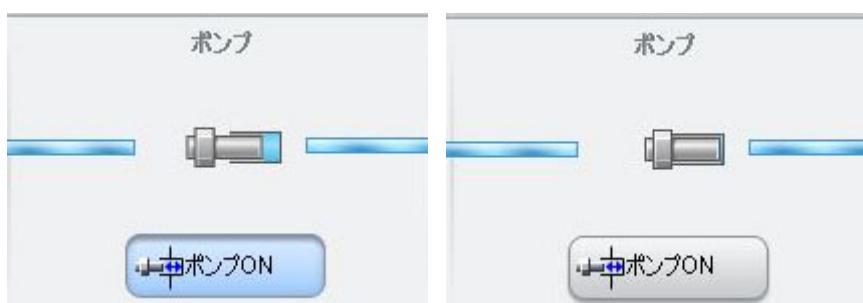
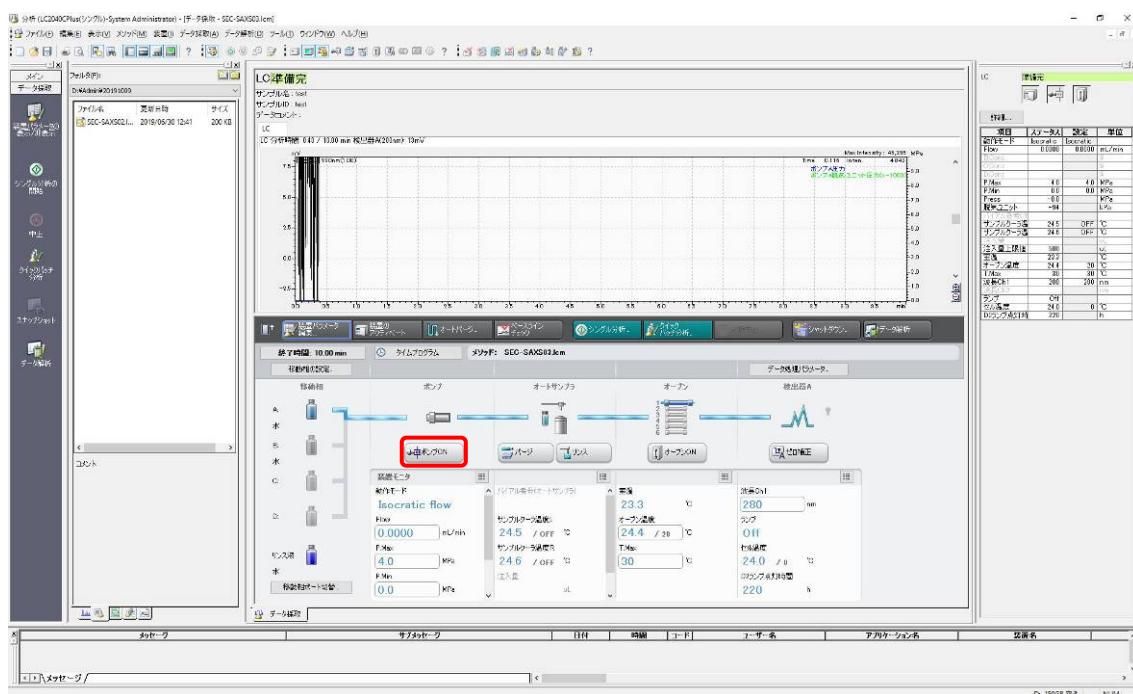
カラムは接続され、MilliQ で平衡化されている(低流速で流れている)。

各ユーザーの BT 引き渡し時には原則としてここまで状態になっている。

注意: フィルターろ過済みの buffer を使うこと。また buffer は PF(生理試料準備室)で再度脱気を行うことを推奨します。

1A-1

Lab Solutions 画面の下方のデータ採取タブ中のポンプ ON ボタンをクリックし、ポンプを停止させる。[動作中: 水色、停止中: グレー]



1A-2

画面右側の圧力(Press)ステータスが 0M Pa になるまで待つ。

項目	ステータス	設定	単位
動作モード	Isocratic	Isocratic	
Flow	0.0000	0.0000	mL/min
B.Conc			%
C.Conc			%
D.Conc			%
P.Max	4.5	4.5	MPa
P.Min	0.0	0.0	MPa
Press	-0.0		MPa
脱気ユニット	-94		kPa
サンプルクーラ温	24.5	OFF	°C
サンプルクーラ温	24.6	OFF	°C
注入量			uL
注入量上限値	500		uL
室温	23.3		°C
オープン温度	24.4	20	°C
T.Max	30	30	°C
波長Ch1	280	280	nm
波長Ch2			nm
ランプ	Off		
セル温度	24.0	0	°C
D2ランプ点灯時	220		h

1A-3

装置上部のトレイに新しい buffer のボトルをセットし、MilliQ のボトルに入っている Solvent A(シアン)を新しい buffer のボトルに入れ、ボトルの口をパラフィルムで覆う。

1A-4

0-1 に従って HPLC 本体の液晶画面のロックを解除、[分析メイン画面]の[ページ]をタッチし、[オートページ]画面を開く。

[1st]、[リンス液]を ON にする(青く色が変わった状態)。

ページ時間は[1st]:A, 3min, [リンス液]: 15min



1A-5

[ページ開始]をタッチしオートページを実行する。[実行中]画面が表示される。

1A-6

ページ終了後、[閉じる]をタッチし、[分析メイン画面]を表示に戻す。その後は 0-8 の手順に従って液晶画面を再度ロックし、PC の Lab Solutions から操作を行う。



1A-7

Lab Solutions 画面の下方のデータ採取タブ中で流速を適切な値に変更しポンプ ON ボタンをクリックし、ポンプ送液を開始させる。(例:Superdex200 increase 10/300 : 0.4 ~0.5 ml/分) カラム平衡化を開始。



※カラムが他の緩衝液で平衡化されていた場合、

1A-1~7までを A ラインを MilliQ で行い、1CV 程度カラムの平衡化をする。

再度、A ラインを新しい緩衝液に変えて 1A-1~7 を行う。

(実験中のリガンドなし緩衝液からリガンド入り緩衝液への交換ならいきなり 1A-1~7 を行ってもよい。)

1B 持ち込んだカラムをつなぎこむ場合

システム(UPLC, 分光光度計、PILATUS)はすべて接続・起動済み

システムは MilliQ で置換されている。

注意:持ち込んだカラムはラボで緩衝液に平衡化済み

※持ち込んだカラムが 20%エタノールなどで保存されている場合

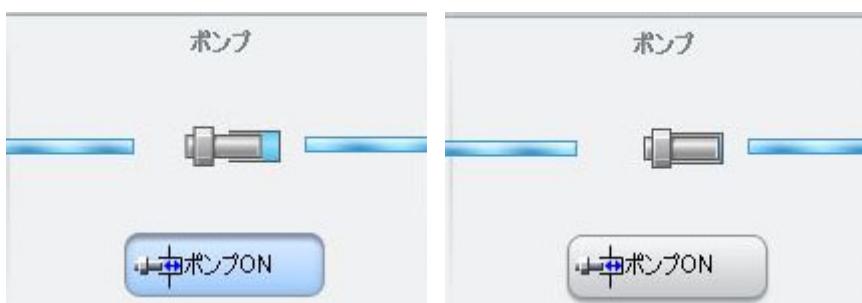
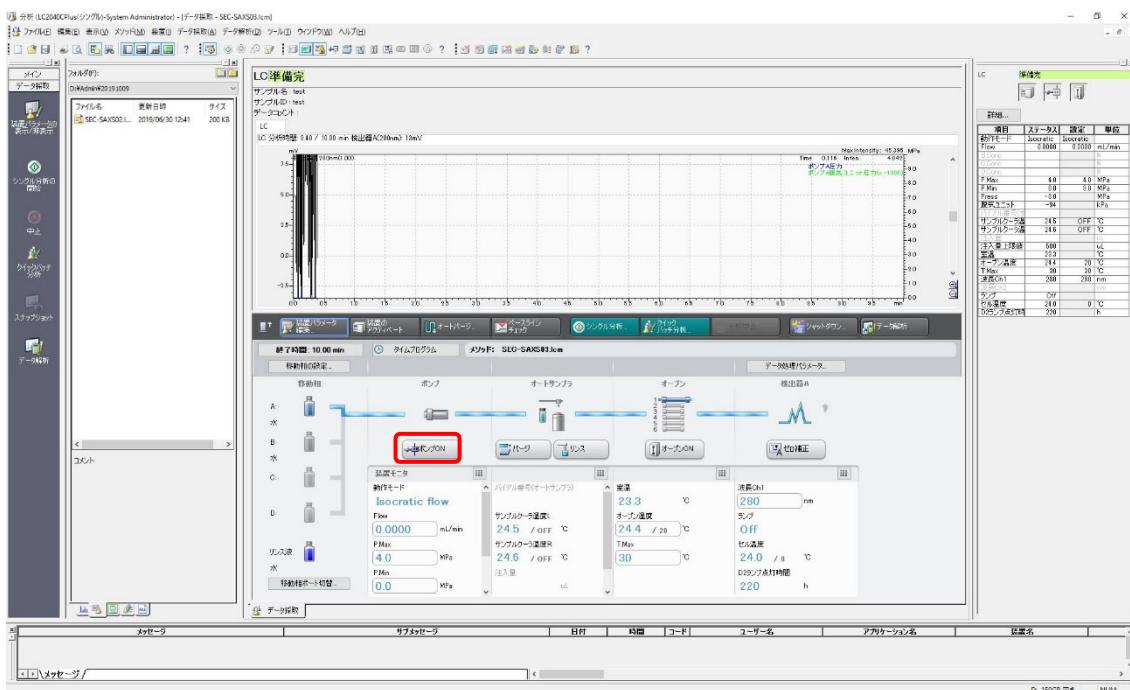
1B-1~13までを A ラインを MilliQ のまま実行し、1CV 以上流してエタノールを除く。

再度、新しい緩衝液で 1B-1~7 を行いカラムの平衡化を開始する。

注意:フィルターろ過済みの buffer を使うこと。また buffer は PF(生理試料準備室)で再度脱気を行うことを推奨します。

1B-1

Lab Solutions 画面の下方のデータ採取タブ中のポンプ ON ボタンをクリックし、ポンプを停止させる。[動作中:水色、停止中:グレー]



1B-2

画面右側の圧力(Press)ステータスが 0M Paまで待つ。

項目	ステータス	設定	単位
動作モード	Isocratic	Isocratic	
Flow	0.0000	0.0000	mL/min
B.Conc			%
C.Conc			%
D.Conc			%
P.Max	4.5	4.5	MPa
P.Min	0.0	0.0	MPa
Press	-0.0		MPa
脱気ユニット	-94		kPa
サンプルクーラ温	24.5	OFF	°C
サンプルクーラ温	24.6	OFF	°C
注入量			uL
注入量上限値	500		uL
室温	23.3		°C
オープン温度	24.4	20	°C
T.Max	30	30	°C
波長Ch1	280	280	nm
波長Ch2			nm
ランプ	Off		
セル温度	24.0	0	°C
D2ランプ点灯時	220		h

1B-3

装置上部のトレイに新しい buffer のボトルをセットし、MilliQ のボトルに入っている Solvent A(シアン)を新しい buffer のボトルに入れ、ボトルの口をパラフィルムで覆う。

1B-4

0-1 に従って HPLC 本体の液晶画面のロックを解除、[分析メイン画面]の[ページ]をタッチし、[オートページ]画面を開く。

[1st]、[リンス液]を ON にする(青く色が変わった状態)。

ページ時間は[1st] : A, 3min, [リンス液] : 15min



1B-5

[ページ開始]をタッチしオートページを実行する。[実行中]画面が表示される。

1B-6

ページ終了後、[閉じる]をタッチし、[分析メイン画面]を表示に戻す。その後は 0-8 の手順に従って液晶画面を再度ロックし、PC の Lab Solutions から操作を行う。



1B-7

Lab Solutions 画面の下方のデータ採取タブ中で流速を 0.5ml/min 程度に変更しポンプ ON ボタンをクリックし、2~3min くらい送液し流路を buffer に置換する。(既にカラムを付けて平衡化を行う場合は 1C.V.以上流す。)



1B-8

約 2~3min 後、流量を 0.2 ml/min 程度に設定し、流量を変更する。

1B-9

HPLC 本体右側のカラムオープンを開き、HPLC ライン 1 のユニオンを外す。

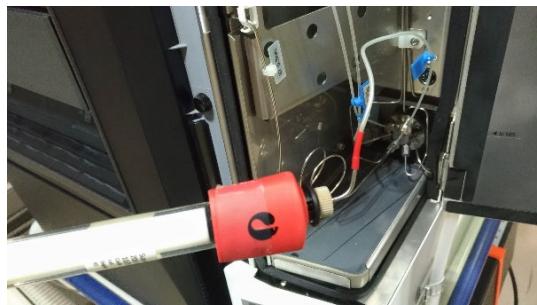
(接続部は 1/16 インチコネクター(No.10-32UNF、GE 社 Tricorn カラムなど直接接続可能)

1B-10

カラム inlet にメタルの HPLC ライン(下側の 1:上流)から buffer を滴下して接続部分を満たす。

1B-11

カラム inlet とメタルの HPLC ラインを接続する。チューブを軽く押し付けながら締め、締めたらチューブを引っ張って外れないか確認する。



1B-12

同様にカラム outlet の接続部に溶液が満たされるまで待ち、カラム outlet と HPLC ラインを接続する。チューブを軽く押し付けながら締める。締めたらチューブを引っ張って外れないか確認する。

1B-13

カラムクーラーにカラムを収める。下から上に流れるように取り付ける。取り付け金具はないので養生テープで固定する。



1B-14

inlet outlet 付近をキムワイプでふき取り、観察し漏れがないかを確認する。

カラムクーラーの扉を閉める際に、チューブを噛みこまないようにチューブを押し込んでおくこと



接続後に、流速を元に戻してカラム平衡化を開始。

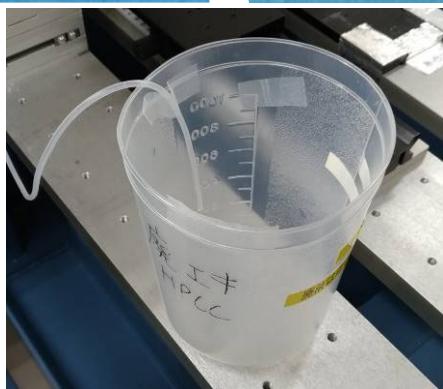
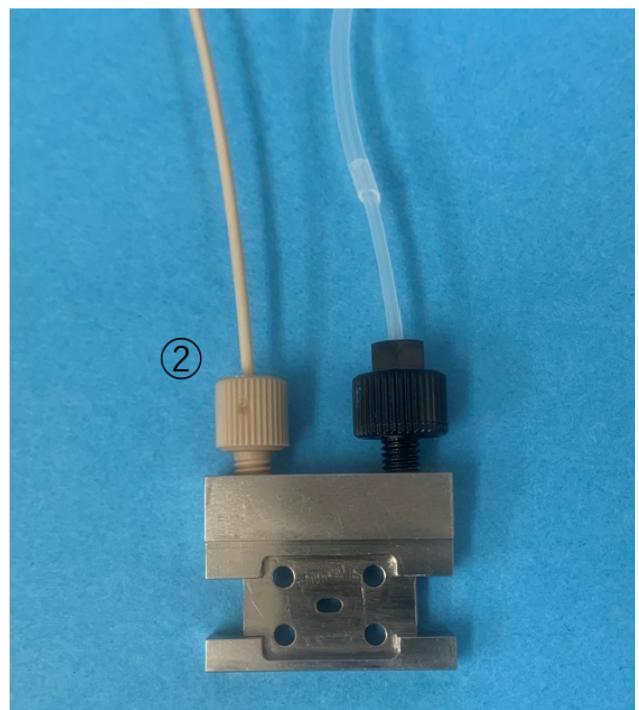
2 SAXS セル、サンプルバイアルのセット

2-1

MilliQ を用いて絶対散乱強度への規格化を行う場合は必要な測定(ダーク、空気、空セル、MilliQ 水)を実施し、その後、ペリスタポンプ・エアポンプを用いてセルを洗浄・乾燥させる。

2-2

セルは下の写真の様にフィッティングが両側にさせる様になっている。先にセルの出口側にシリコンチューブをとりつけ(フィッティングの黒色)、シリコンチューブは廃液容器(ポリビーカー)で廃液を受けられるようにする。シリコンチューブを廃液容器に、廃液容器は実験定盤に養生テープなどで固定し、実験中にこぼれないようすること。



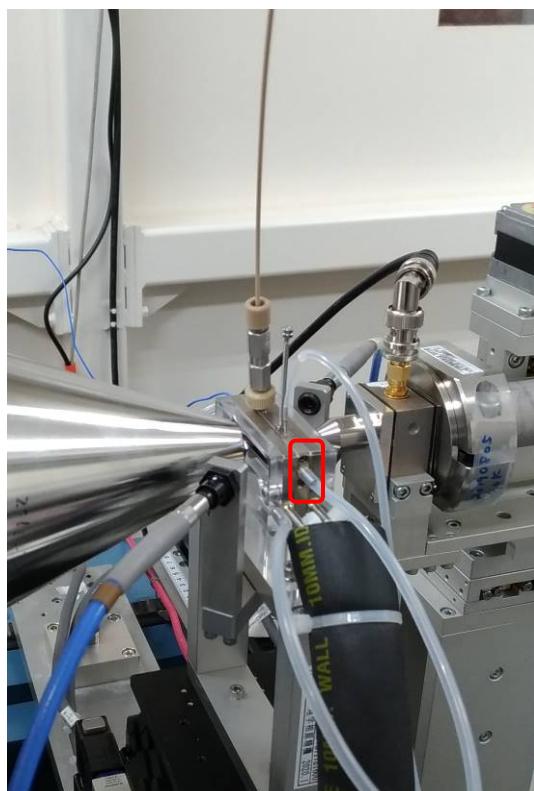
2-3

HPLC の PEEK チューブ(クリーム色)にフィッティング(クリーム色)を使って SEC-SAXS 用のセルに接続する。(P14 ページの写真②)

(注意) セルの窓部に圧力がかかり、窓剤が割れてしまうため 2-2 と 2-3 の順番を逆にしない。

2-4

セル、流路の中に気泡がないのを確認後、セルホルダにセルを置き、軽く押さえながらセルホルダのセル固定用イモネジ(2 か所)を締める。また PEEK チューブに過大なテンションがかからないように注意すること。



2-5 サンプルをバイアルに分注

サンプルは遠心後の上澄あるいは、フィルターにかけておくこと

インジェクト量 + 10ul 以上を専用のガラスバイアル(waters Total Recovery (P/N:186000385c))に入れる。(最大インジェクト量は 500ul)

底面から数 mm 上から吸い上げるので細くなった部分に泡を入れないようにすること。

イエローチップを使用したほうが簡単、泡が入った場合は振って追い出すことも可能



2-6 バイアルをオートサンプラーに置く

オートサンプラーのラック A(左側)を引き出し。手前のプレート 1 の 1 番にバイアルをセットする。(手前の左側が 1)[ラック B は使用しないこと]



3 SEC-SAXS 測定の設定

SEC-SAXS 測定のためには、システム(HPLC, 分光光度計、PILATUS)を開始する必要がある。

現在、本システムを利用する場合は HPLC の開始を実験者自身で確認後、マニュアル操作で PILATUS の測定と、分光測定を同期して開始する。

なお、PILATUS は、BL の測定 PC から操作し、HPLC、分光光度計は実験ハッチ内のそれぞれの PC をリモートデスクトップによって実験ハッチの外から操作する。

一例として以下のような測定を行う。[条件追加(2021/02/28)]

[BL-15A2(@1.5 Å)の場合、BL-15A2(@1 Å)、BL-10C は下表を参照して読み替える]

Superdex200 increased 10/300 を使用

0~14 ml(0~28 min)までは flow rate 0.5ml/min、14~16.5 ml(28~53min)までは flow rate 0.1ml/min
(測定したいピーク部分で flow rate を落として測定する。)

このとき、X 線測定は (expose 10sec/image, exp period 10.01sec)、

分光測定の回数は X 線の 2 倍 5sec 間隔としている。[BL-15A2(@1 Å)は X 線と同間隔の 3 sec]

トータルの測定回数は

(No. images: X 線) $53 \times 60 / 10.01 = 318$

(分光計測回数) $53 \times 60 / 5 + 1 = 637$

	BL-15A2(@1.5 Å)	BL-15A2(@1 Å)	BL-10C
Flow rate (0~14ml)	0.5 ml/min [0~28 min]	0.5 ml/min [0~28 min]	0.5 ml/min [0~28 min]
Flow rate (14~16.5ml)	0.1 ml/min [28~53 min]	0.3 ml/min [28~36.34min]	0.05 ml/min [28~78 min]
expose	10 sec	3 sec	20 sec
Exp period	10.01 sec	3.01 sec	20.01 sec
分光保存間隔	5 sec	3 sec	10 sec
No. images	$53 \times 60 / 10.01 = 318$	$36.34 \times 60 / 3.01 = 725$	$78 \times 60 / 20.01 = 234$
分光計測回数	$53 \times 60 / 5 + 1 = 637$	$36.34 \times 60 / 3 + 1 = 727$	$78 \times 60 / 10 + 1 = 469$

SAXS のバックグラウンドの測定

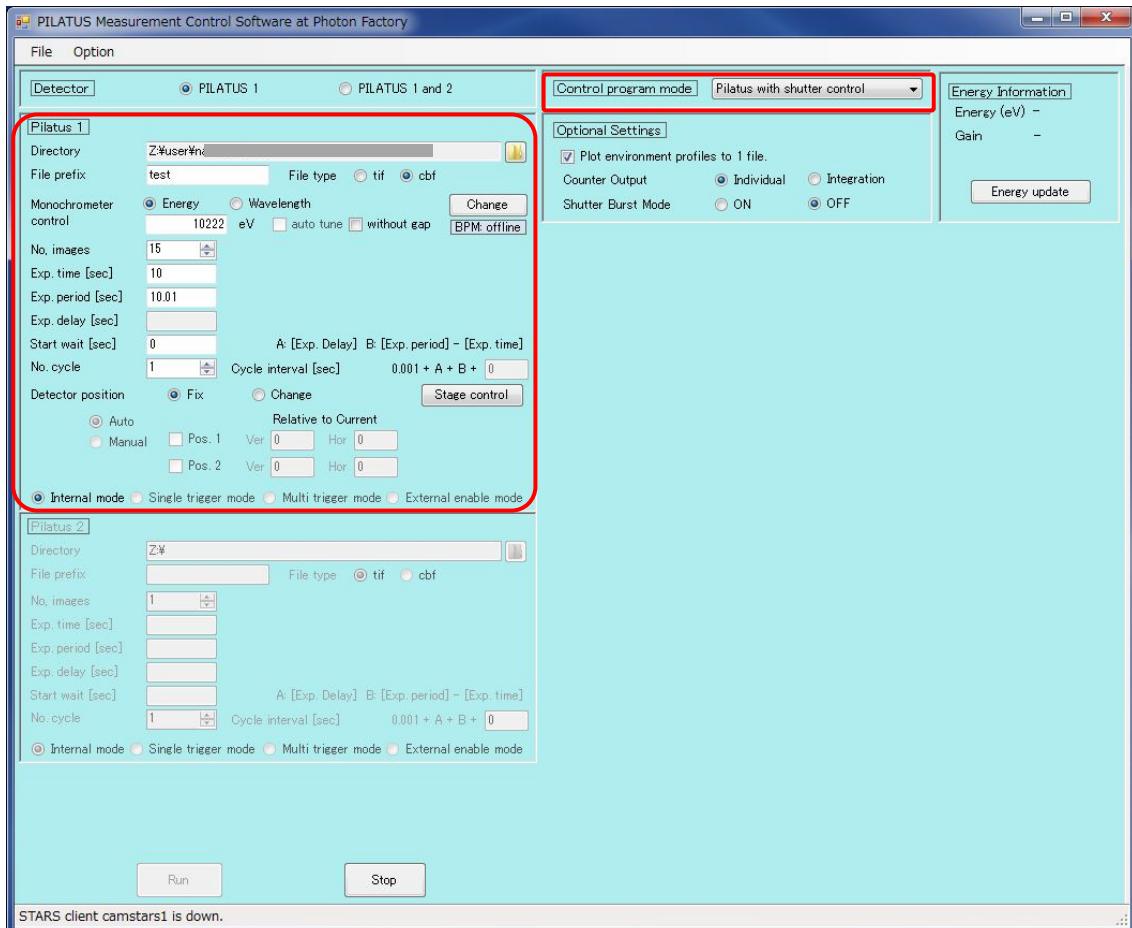
3-1 流速を下げる

HPLC の流速をピーク測定時(0.1ml/min)に下げ圧力が安定するまで(2~3 分)待つ。

(0.3ml/min @BL-15A2(@1 Å)、 0.05 ml/min @BL-10C と読みかえること)

3-2

PILATUS 測定ソフトの "Control program mode" を "Pilatus with shutter control" にする。



3-3 バックグラウンドの SAXS データを測定する。(15 枚程度)

PILATUS Measurement Control Software at Photon Factory (PILATUS 測定ソフト)の設定は以下のよう

Directory 要設定

File Prefix 要入力

Monochrometer control Energy / Wavelength どちらか選択、カラム内に数値を入力
(波長変更の必要がなければ調整後の値そのまま)

File type cbf を選択(SAngler 以外でも処理する場合は tif)

No.images 15

Exp. Time 10 (3@BL-15A2(@1 Å)、 20@BL-10C)

Exp.period 10.01(3.01@BL-15A2(@1 Å)、 20.01@BL-10C)

Exp. delay : "PILATUS with shutter control"では入力不可

Start wait 0:(SEC-SAXS では 0)

No.cycle 1:サイクル数 (SEC-SAXS では 1)

internal mode にチェックする。

(開始前に SAXS セルが正しくセットされているか確認後、実験ハッチを閉じ X 線を出せるようしておくこと)

Run をクリックし測定開始する。

3-4

測定終了後、PILATUS 測定ソフトの“Control program mode”を“SEC-SAXS-UV measurement”にする。これにより、PILATUS 測定と分光光度計の測定を同期させることができる。



分光ソフトのレファレンス設定

3-5

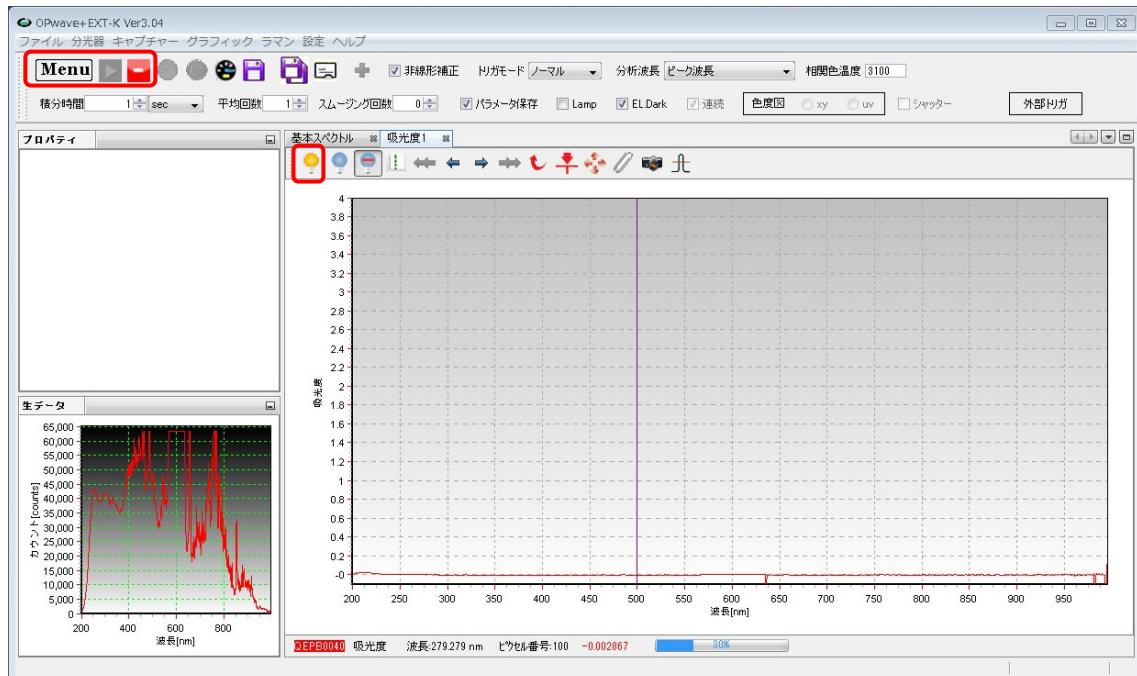
OPwave+EXT-K (分光のソフト) ウィンドウ内の積分時間が 1sec であることを確認。

(なってなければ、分光装置の再調整が必要->付録 2 あるいは OPwave マニュアル p.5 参照)

OPwave+EXT-K でライブモードになっていることを確認する。

Menu の隣のアイコンがグレーになりスペクトルが更新されていればライブモード

Menu の隣のアイコンが緑の時はアイコンをクリックしライブモードを開始する。



3-6

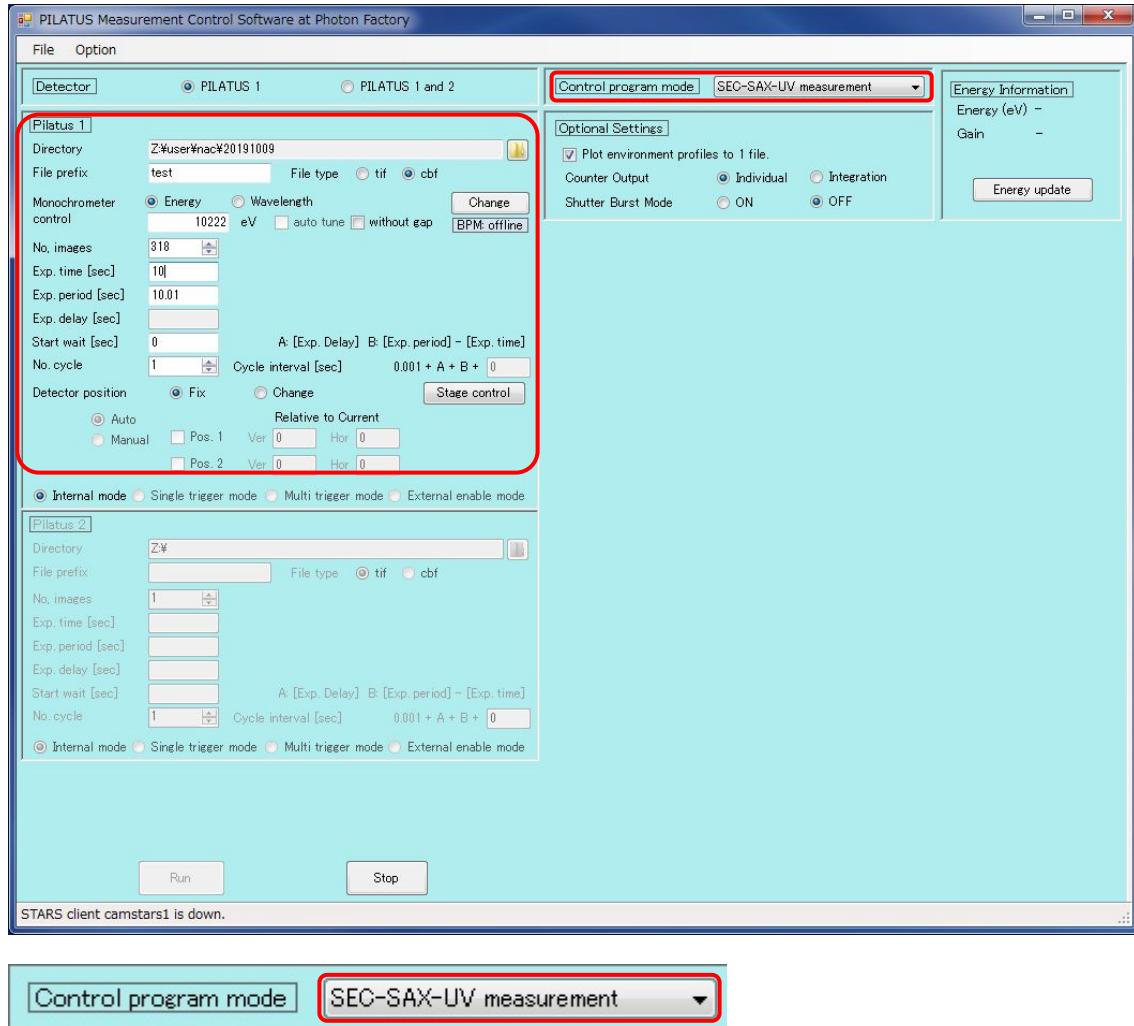
SAXS が正しくセルホルダーに入り buffer が流れていること、流速が 0.1ml/min (0.3ml/min @BL-15A2(@1Å)、
0.05 ml/min @BL-10C) であるのを、確認したのちにレファレンス取得(黄色の電球)アイコンをクリックし分光の
ベースラインを取得する。



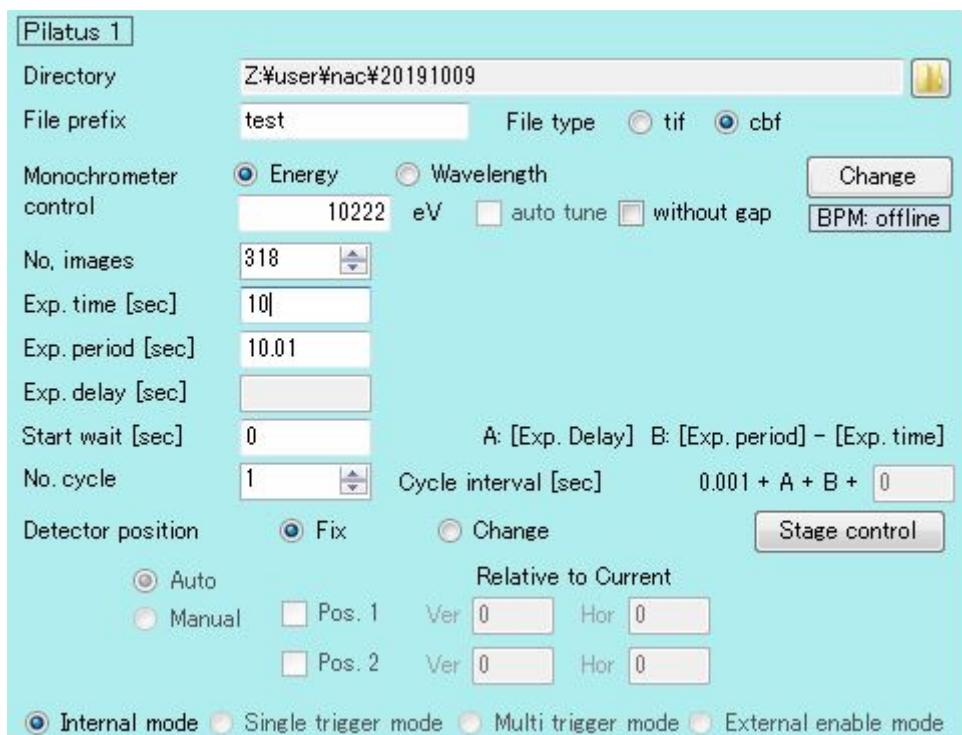
PILATUS 測定ソフトの設定

3-7

PILATUS 測定ソフトの"Control program mode"が"SEC-SAXS-UV measurement"であることを確認する。



PILATUS Measurement Control Software at Photon Factory (PILATUS 測定ソフト)の設定は以下のよう



Directory 要設定: データの保存先

File Prefix 要入力: ファイル名

File type cbf を選択(SAngler 以外で処理する場合は tif)

Monochrometer control Energy / Wavelength どちらか選択、カラム内に数値を入力
(波長変更の必要がなければ調整後の値そのまま)

No.images 318: 測定回数を入力 [725@BL-15A2(@1 Å)、 234@BL-10C]

Exp. Time 10: 測定時間 [3@BL-15A2(@1 Å)、 20@BL-10C]

Exp.period 10.01: 測定間隔 [3.01@BL-15A2(@1 Å)、 20.01@BL-10C]

Exp. delay: "SEC-SAXS-UV measurement"では入力不可

Start wait 0: (SEC-SAXS では 0)

No.cycle 1: サイクル数 (SEC-SAXS では 1)

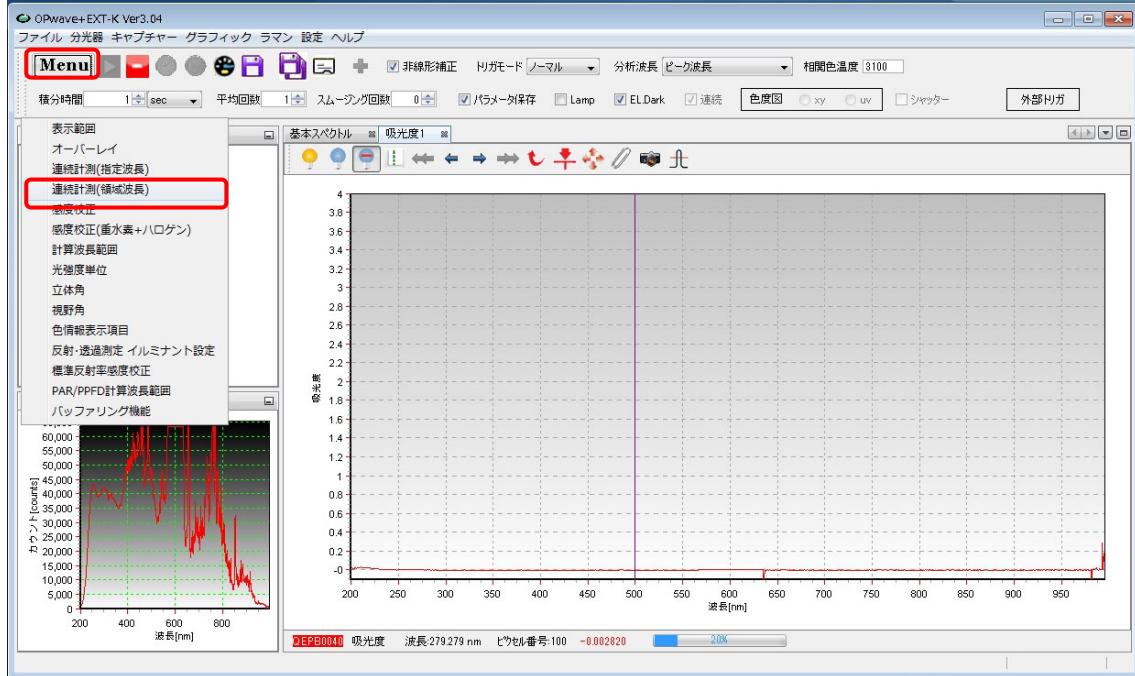
internal mode にチェックする。

(補足)この測定モードでは、SAXS 測定の開始と同時に分光測定もスタートするように設定できるが、SAXS と分光を別々にスタートさせたい場合は、バックグラウンド測定と同じように、"Control program mode" を"Pilatus with shutter control"に設定する。

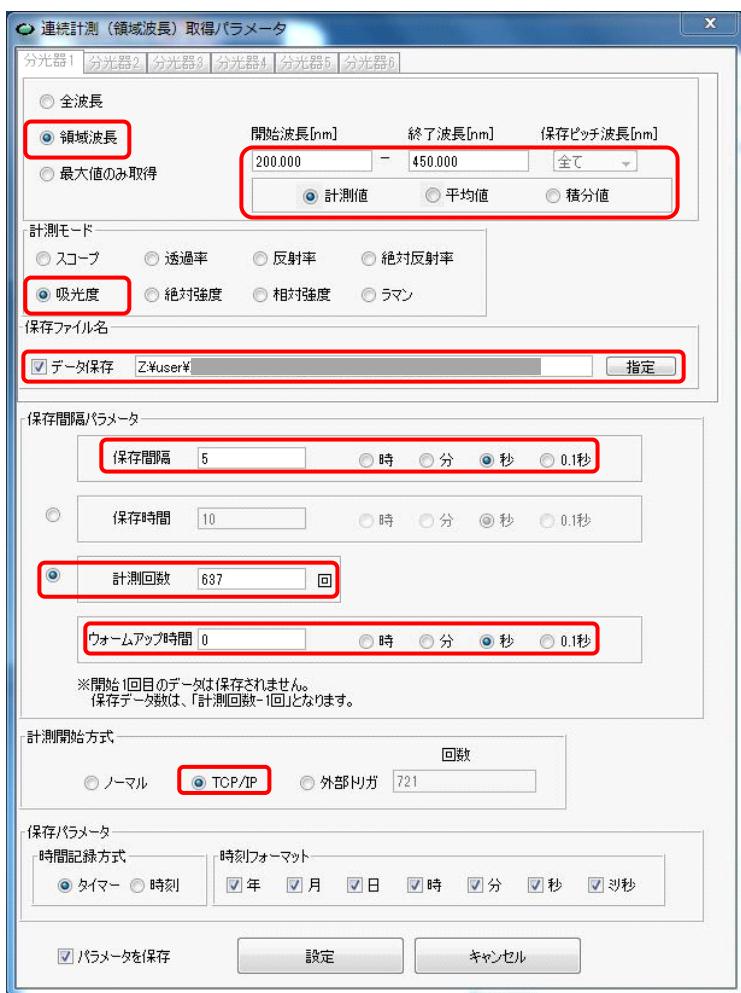
分光ソフトの設定

3-9

OPwave+EXT-K の Menu アイコンをクリックし、連続計測(領域波長)を選択



パラメータを以下のように設定する。



領域波長 200 – 450 nm, 保存ピッチ: 全て、計測値にチェック

[計測モード]: 吸光度

保存ファイル名: データ保存にチェックを入れ、保存ファイル名を入力

[保存間隔パラメータ]

保存間隔: 5 秒 (単位のチェックボックスに注意) [3@BL-15A2(@1Å)、 10@BL-10C]

計測回数にチェックを入れ 637 回を入力 [727@BL-15A2(@1Å)、 469@BL-10C]

ウォームアップ時間: 0 秒

[計測開始方式]: TCP/IP にチェックを入れる

[保存パラメータ]

時間記録方式はタイマーにチェックを入れる

時刻フォーマットは全てのチェックボックスにチェック

パラメータを保存にチェックを入れ設定アイコンをクリックする。注意を促すウインドウが出るが OK をクリックする。

測定開始待ちにするのは次のページ

3-10

分光測定ソフトは、通常「緑の三角マーク=Live モード」が ON の状態で Live 動作しているが、測定をスタートするためには、Live モードを停止する必要がある。

停止アイコン(赤いアイコン)をクリックしライブモードを一時停止させる。



3-11

連続時間計測のアイコン(時計のアイコン)をクリックし、SAXS 測定ソフトからの開始命令待ち状態にする。



(補足)分光測定を SAXS 測定と独立にスタートさせたい場合は、[計測開始方式]を“ノーマル”に設定する。その場合は、「設定」ボタンを押した後、ライブモードを停止させてから、以下の「測定スタート」ボタンを押せば、測定がすぐに開始される。



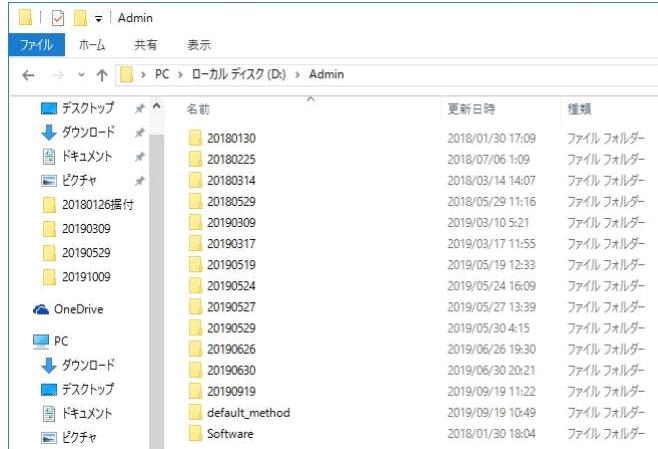
HPLC 設定

3-11 (ビームタイムの最初の一回のみ)

Windows 上で D:\Admin\YYYYMMDD" フォルダを新規作成し、

D:\Admin\default_method\SEC_SAXS04.lcm を新しい"YYYYMMDD" フォルダにコピーする。

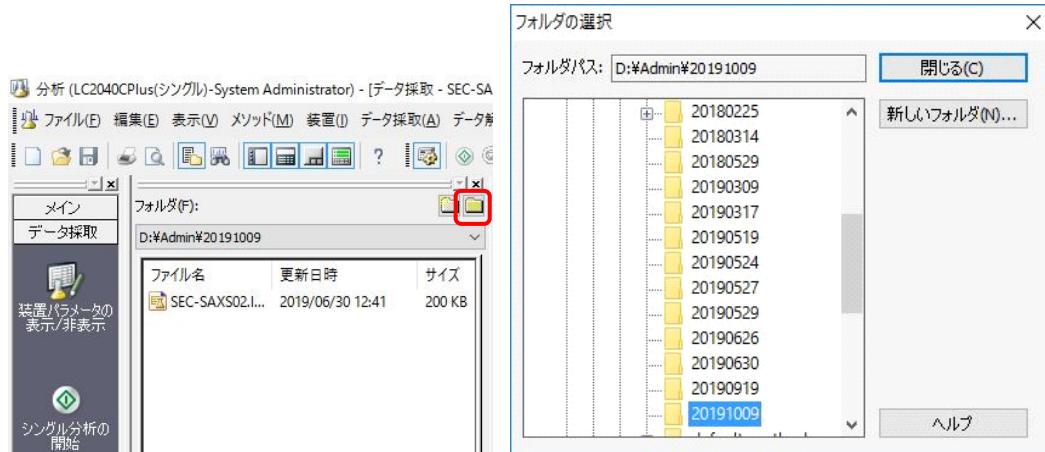
[SEC_SAXS02 -> SEC_SAXS04 に設定変更(2021/02/01)]



3-12 (ビームタイムの最初の一回のみ)

Lab Solutions 画面左側のフォルダアイコンをクリックし、フォルダ選択画面を開き、3-11 で作成したフォルダを選択する。その後フォルダ内の SEC-SAXS04.lcm をダブルクリックする。

[SEC_SAXS02 -> SEC_SAXS04 に設定変更(2021/02/01)]

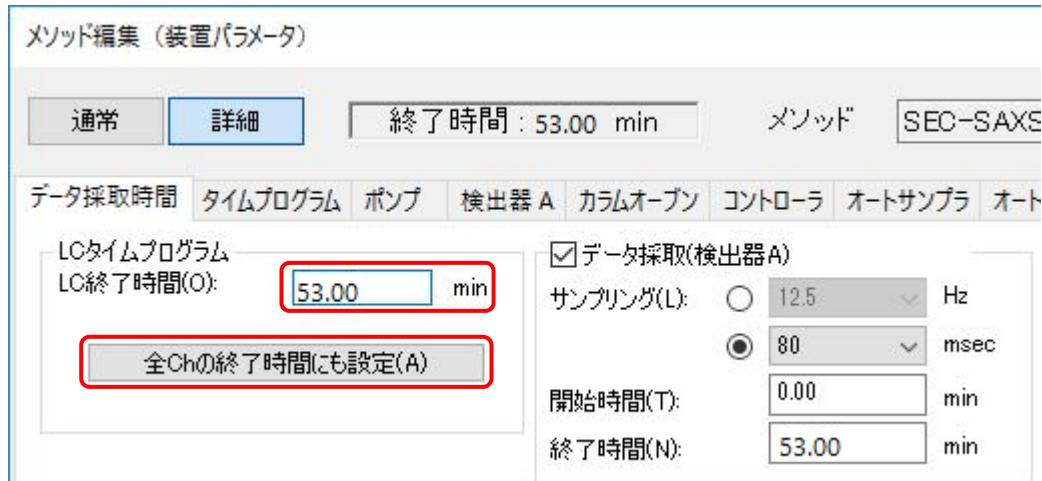
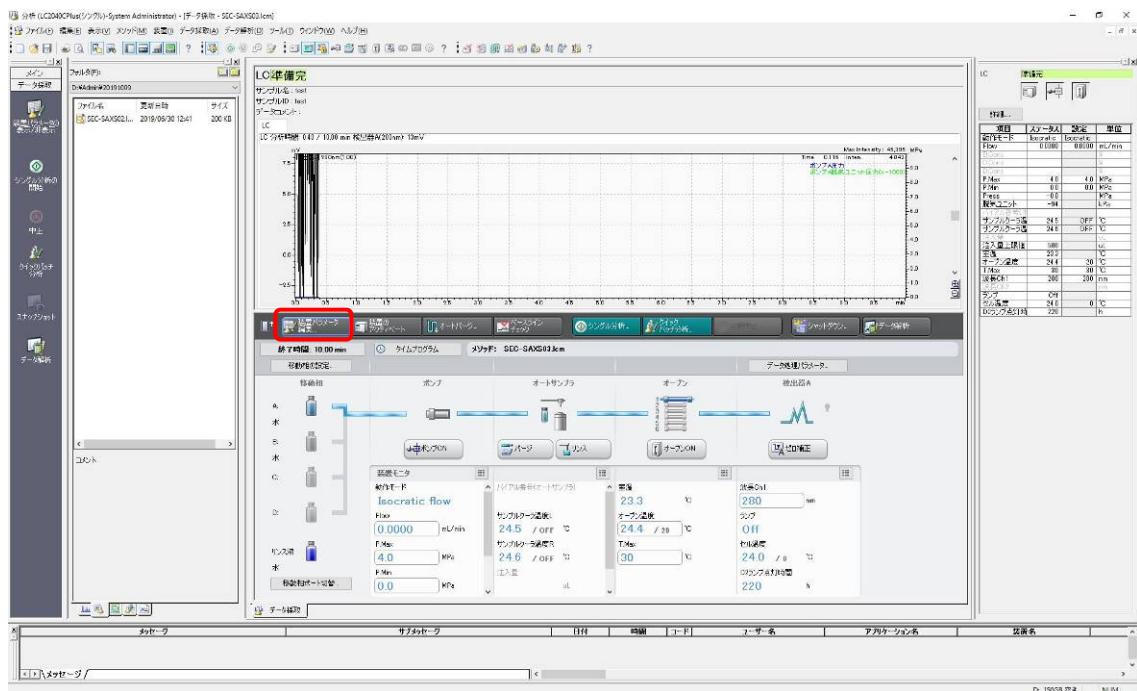


3-13

Lab Solutions 画面中央の装置パラメータ編集をクリックし、メソッド編集画面を開く
データ採取時間タブをクリックする。

LC 終了時間: 53 min [36.34@BL-15A2(@1 Å)、 78@BL-10C]

を入力後、“全 Ch の終了時間にも設定”アイコンをクリックする。

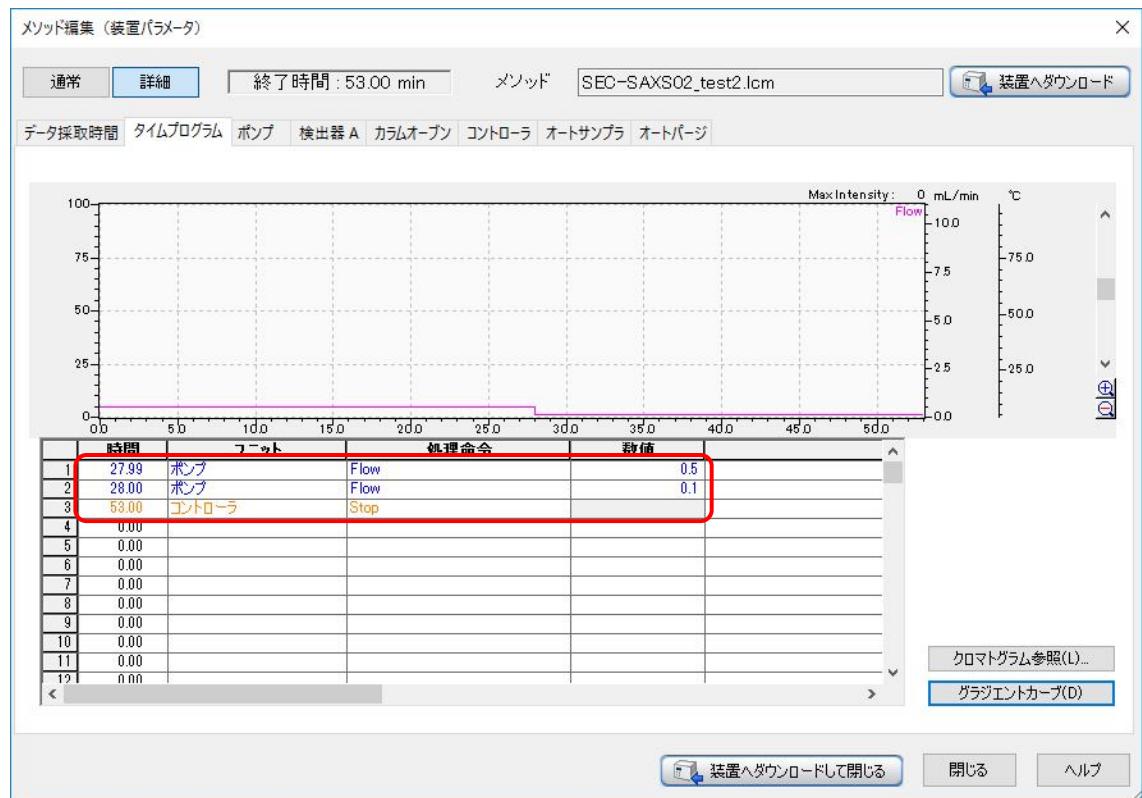


※Prominence-i の場合は、サンプリングレートは、10Hz,
100msec。

3-14

メソッド編集画面のタイムプログラムタブをクリックし、流速変更プログラムを記入する。

	時間	ユニット	処理命令	数値
1	27.99	ポンプ	Flow	0.5
2	28.00	ポンプ	Flow	0.1
3	53	コントローラ	Stop	



3-15

メソッド編集画面のポンプタブをクリックする。

モード: Isocratic flow

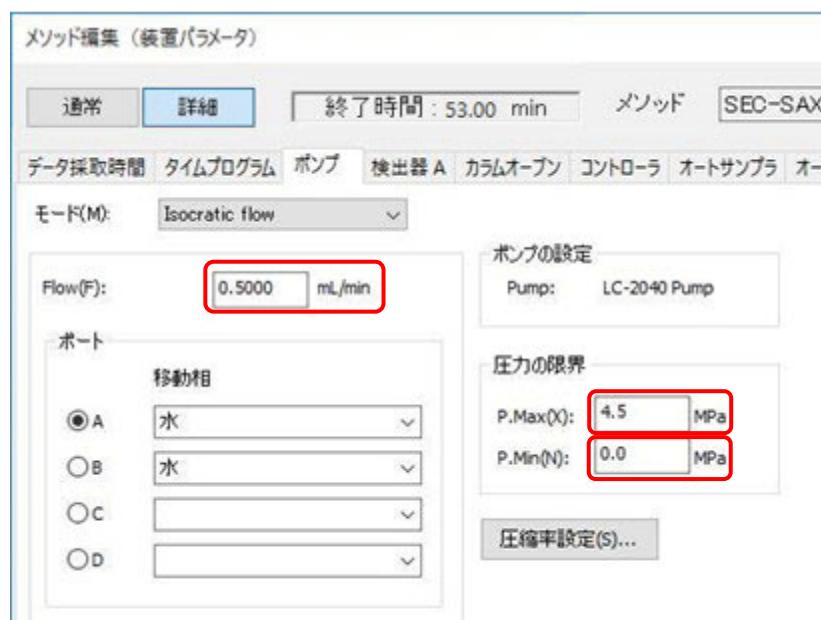
Flow: 0.5 mL/min [イニシャルの流速]

ポート:A

移動相: 水

P.Max: 4.5 MPa [カラムのマニュアルに記載] [4.0 -> 4.5 に設定変更(2021/02/01)]

P.Min: 0.0 MPa [カラムのマニュアルに記載]

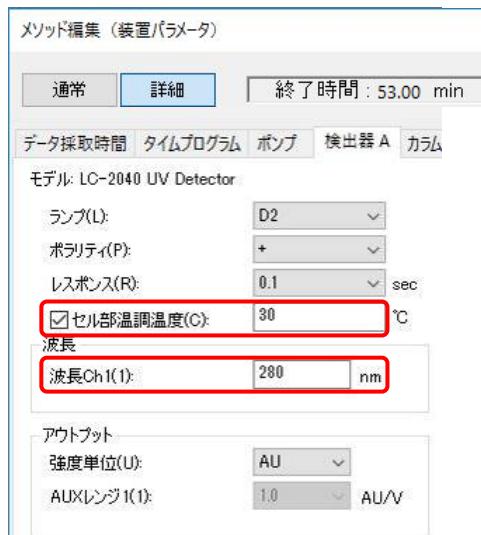


3-16

メソッド編集画面の検出器 A タブをクリックする。

セル部温調温度: 30°C [チェックされているのを確認]

波長 Ch1: 280 nm



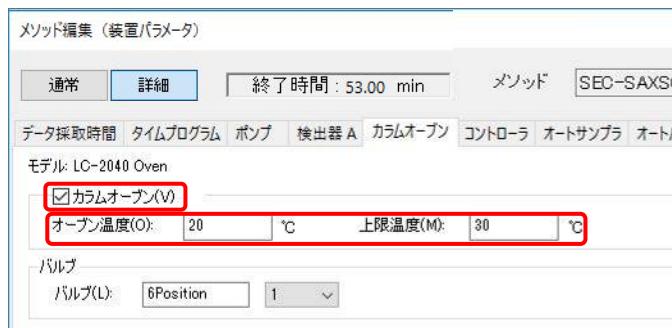
3-17

メソッド編集画面のカラムオーブンタブをクリックする。

カラムオーブンにチェックが入っているのを確認

オーブン温度: 20 °C [適当な値を入力]

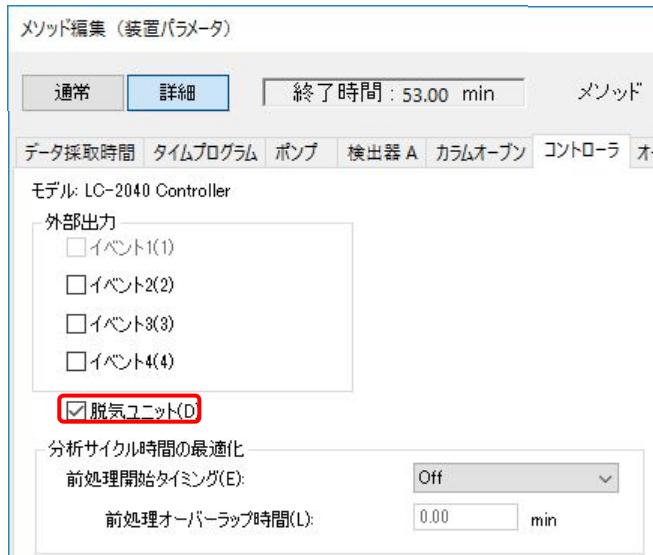
上限温度: 30 °C [オーブン温度 4~25°Cの場合]



3-18

メソッド編集画面のコントローラタブをクリックする。

脱気ユニットにチェックが入っているのを確認



3-19

メソッド編集画面のオートサンプラタブをクリックする。

サンプルクーラの温度に適切な値を入力

ラックプレート L にチェックが入っているのを確認



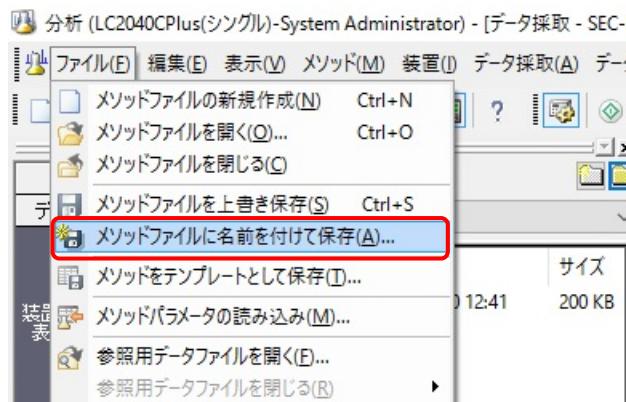
3-20

メソッド編集画面の”装置へダウンロードして閉じる”をクリックし、編集したメソッドを HPLC 本体に読み込ませる。



3-21

Lab Solutions のメニューbaru ファイル→メソッドファイルに名前をつけて保存を選択し、編集したメソッドを別名保存する。



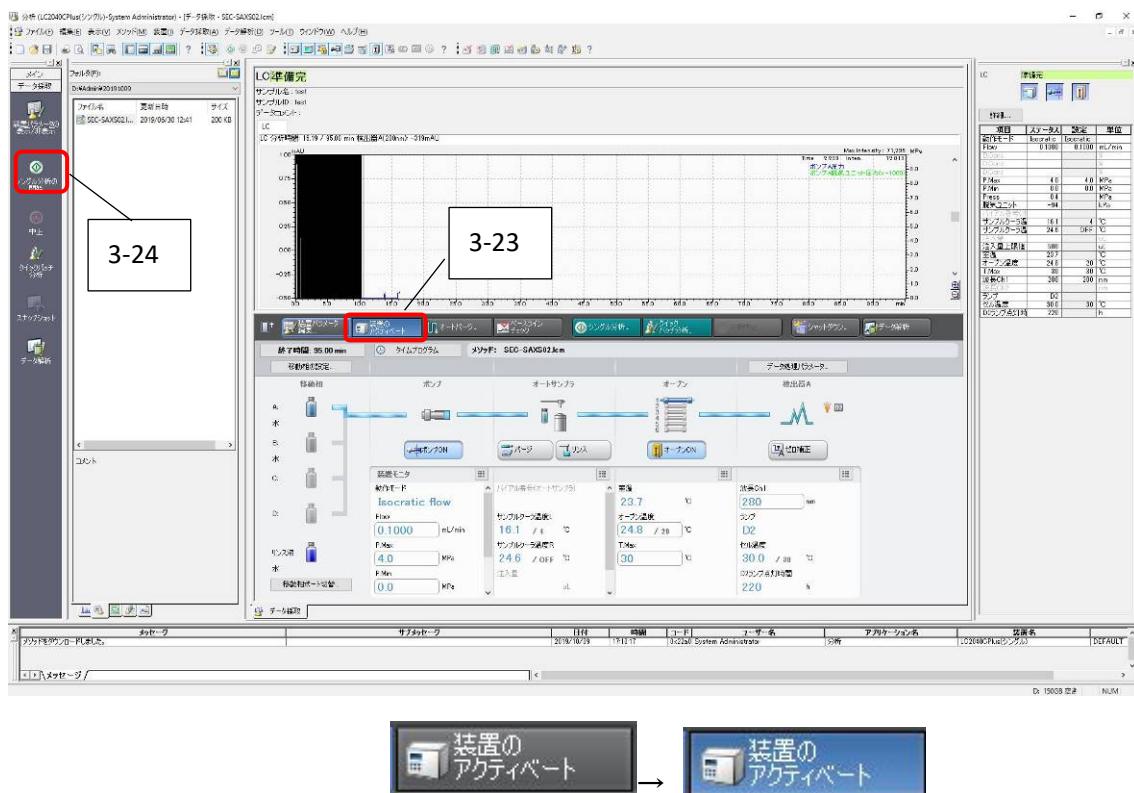
SEC-SAXS 測定の実行

3-22

SAXS セル、サンプルバイアルのセットの再確認を行い、実験ハッチを閉じ、DSS を開く。

3-23

Lab Solutions 画面中央の装置のアクティベートをクリックし、HPLC をメソッド初期条件で動作を開始させる。動作開始するとボタンが青く変化する。



3-24

Lab Solutions 画面左のシングル分析の開始をクリックし、シングル分析ウィンドウを開き、各パラメータを入力

サンプル名: 適当な名称を入力

サンプル ID: 適当な名称を入力(サンプル名と同じでもよい)

メソッドファイル: 3-20 で保存したものか確認

データファイル: 保存先が自分のフォルダ[D:\Admin\yyyymmdd]

ファイル名[xxxxx.lcd]を入力

バイアル: 1 [バイアル番号を入力、原則 1]

トレイ: 1 [原則 1]

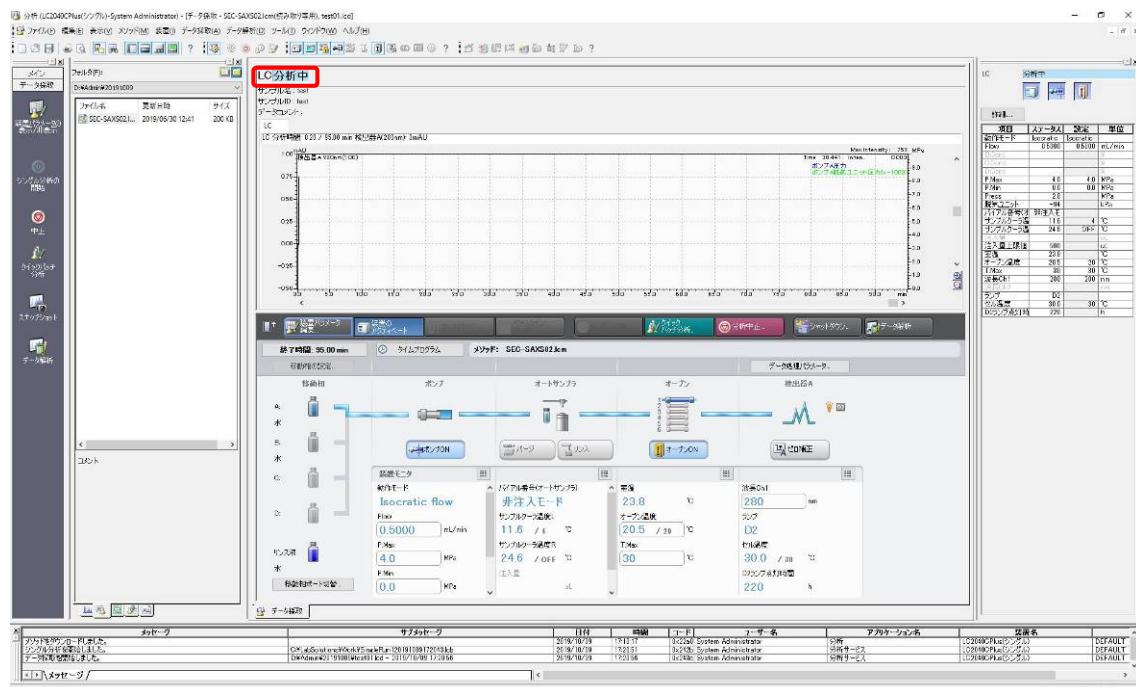
注入量: 200 ul [最大 500 ul]



3-25

シングル分析ウィンドウの OK をクリックすると HPLC のインジェクションがスタートする。

インジェクション開始すると Lab Solutions 画面に LC 分析中と表示される。



3-24

HPLC インジェクション開始後すぐに、PILATUS 測定ソフトの Run アイコンをクリック、測定中はウインドウの一部がピンク色になり、PILATUS のビューワーソフトで測定イメージが更新される(measurement mode)。

3-25

PILATUS の測定開始と同期して OPwave+EXT-K の測定を開始していることを確認する。測定中はプログレスバーが進み、スペクトルも更新される。



3-26

測定終了後、初期条件の流速でポンプは動き続けるため、流速を適当な値に戻して洗浄・再平衡化をする。

3-27

OPwave+EXT-K 終了のウインドウが出るので“OK”をクリック、その後、緑のアイコンをクリックして、ライブモードを再開させておく。

3-28

別の buffer に平衡化する際には 1. へ戻る。同一の buffer で測定を繰り返す場合は、2-4 へと戻り、それ以降のプロセスを繰り返す。

4 片付け

4-1

A ラインを MilliQ に交換する。[1A-1~7 参照]

その後、低流速(0.05ml/min 程度 Superdex200 increase10/300 の場合)で MilliQ を流す。

持ち込みのカラムの場合は、流速 0.2mL/min 程度に設定してカラムを取り外す。(下流側を外して栓をした後、上流側を栓する)

* MilliQ の残量に注意

4-2 廃液(ポリビーカー、ガロン瓶)、チップ、バイアルの廃棄

廃液(ポリビーカー、ガロン瓶)、チップ、バイアルは実験者の責任で廃棄してください。

廃液は化学試料準備室、チップ・バイアルは生理試料準備室に廃棄場所があります。

廃液は 2 次洗浄液までは回収、その後、容器は水道水ですすぎ生理試料準備室流しの隣においてください。

4-3

セルを HPLC から外し、ペリスタポンプを使用して洗浄・乾燥させてください。

ユニオン、フェラルなども塩などが析出してこないよう MilliQ で軽く洗浄してください。

セルが破損したり、窓に汚れが見られる場合は、その旨をログノートなどに記入しておいてください。

FAQ

1) 分光のドリフトが大きい

流速によってベースラインは変化します。

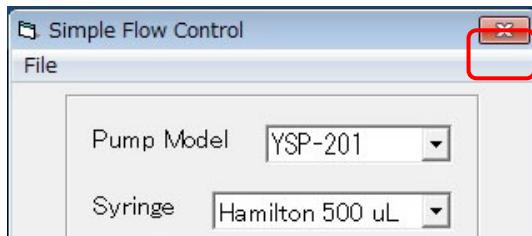
一定流速で流していてもドリフトが大きく安定しない場合は SAXS のセルを交換して下さい。

2) OPWave-EXT-K がフリーズした。

付録 2 を参照して OPWave-EXT-K の立ち上げと初期設定を行う。

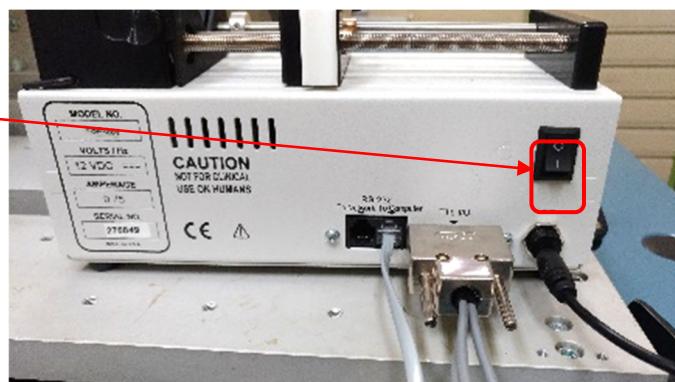
3) OPWave-EXT-K と PILATUS 測定ソフトが同期しない。

OPwave が動作しているパソコンから、Flow のソフトを切ってください。

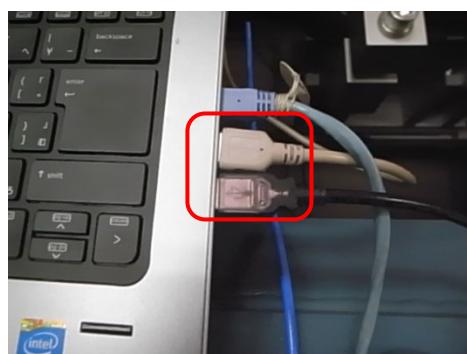


Flow 本体の電源を切ります。

・電源スイッチ



Flow 及び分光光度計が接続されている、ハッч内 のノート PC から、Flow に繋がっている USB を抜きます。分光光度計に繋がっている USB ケーブルは抜かないでください。以下の写真でどちらかの USB ケーブルになります。



付録 1 溶媒の取り込みライン

溶媒の取り込みラインは 5 本存在。

Solvent A(シアン)、B、C、D:溶媒ライン→B、C、D は使用しない(常時 50%エタノール)

RINSE(黒):リンス

装置使用中は以下のようにしてください。

※取り込みラインのボトルを移す際は、送液停止後に行ってください。

(1)保管時

20%Et-OH:A(シアン)、RINSE(黒)

(2)水の時

Milli Q Water:A(シアン)、RINSE(黒)

(3)バッファーの時

Milli Q Water:RINSE(黒)

バッファー:A(シアン)

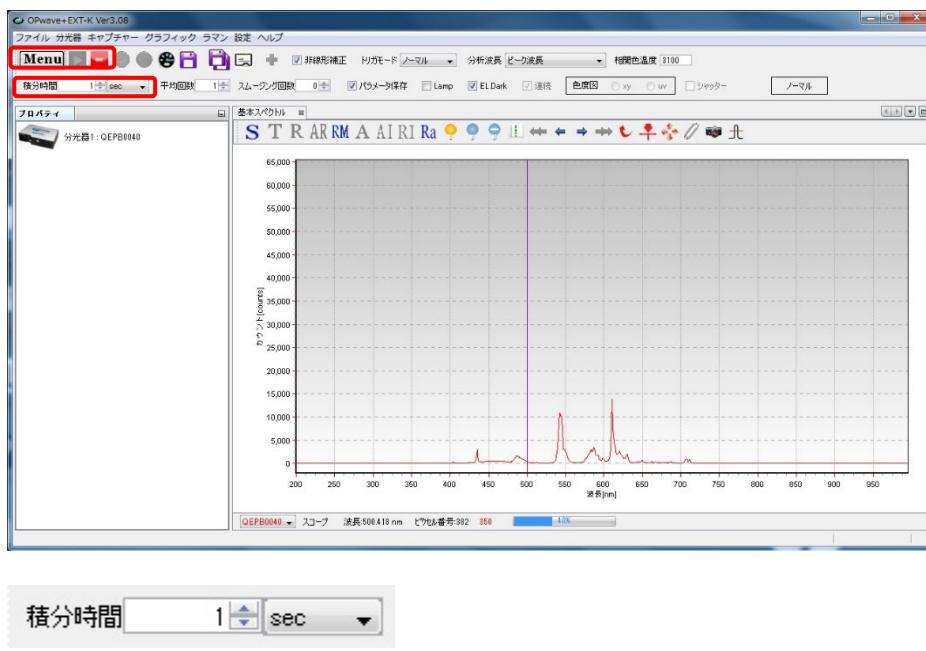
	A(シアン)	RINSE(黒)	B、C、D
保管時	20%エタノール	20%エタノール	50%エタノール
水の時	Milli Q	Milli Q	50%エタノール
バッファーの時	バッファー	Milli Q	50%エタノール

付録2 分光光度計コントロールソフト(OPwave -EXT-K)の起動法

1.1. OPwave+EXT-K アイコンをダブルクリックして測定用ソフトを起動する。



1.2. OPwave+EXT-K (分光のソフト)ウインドウ内の積分時間が 1sec であることを確認し、なっていなければ 1sec に変更する。

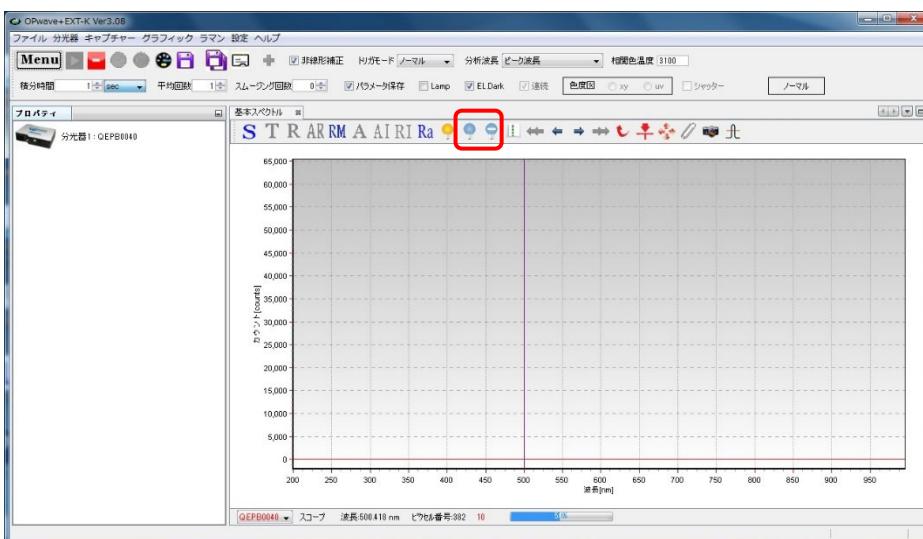
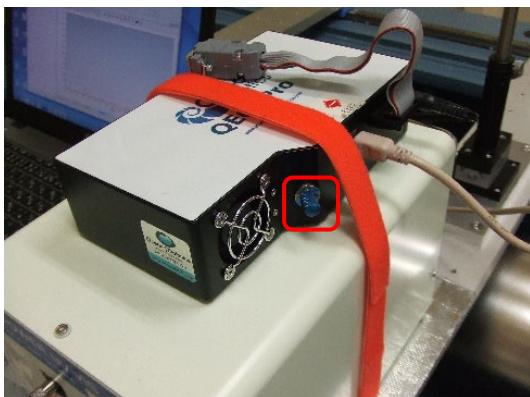


1.3. OPwave+EXT-K でライブモードになっていることを確認する。Menu の隣のアイコンがグレーになりスペクトルが更新されていればライブモード Menu の隣のアイコンが緑の時はアイコンをクリックしライブモードを開始する。



1.4. 分光光度計を遮光した状態(分光器につながっている光ファイバーを外し、保管用のキャップをする)でダーク保存アイコン(青い電球)をクリックし、ダークシグナルを保存し、マイナスダークアイコン(青い電球に白い横線)をクリックしダークシグナルを差し引く。マイナスダークした状態ではマイナスダークアイコン(青い電球に赤い横線)になる。

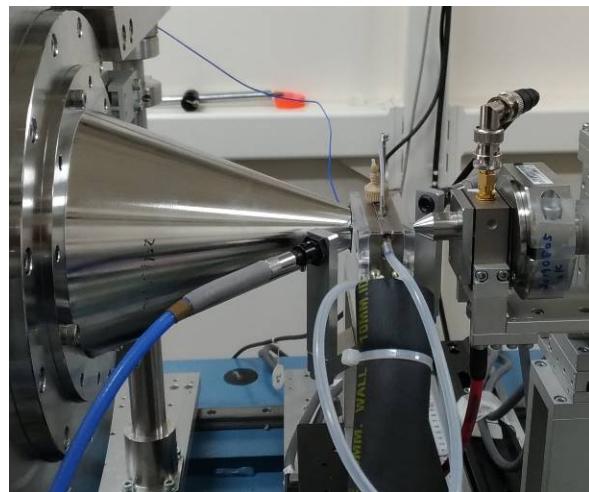
やり直す場合はマイナスダークアイコンをクリックしてからやり直す。



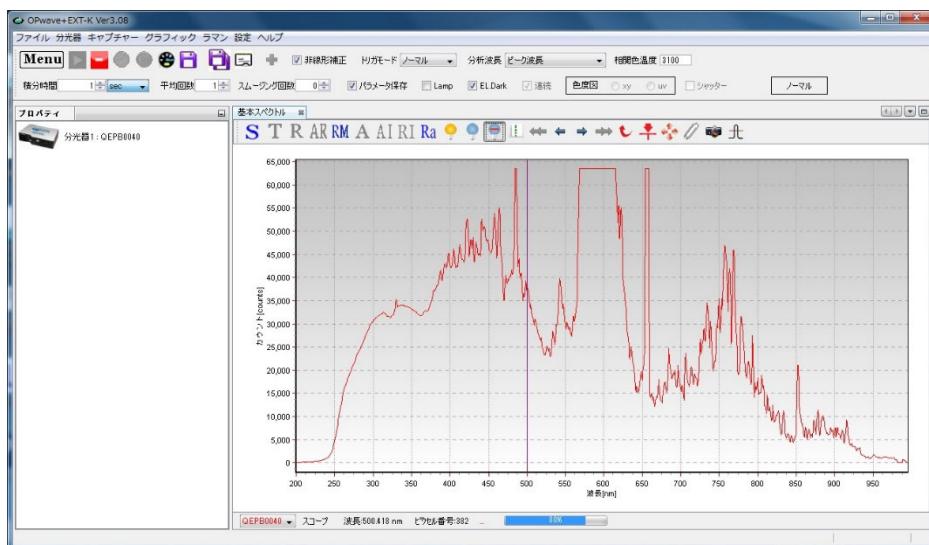
1.5. 再度光ファイバーを接続し、光源のシャッターボタンを押しシャッターを開く。



1.6. X線の調整終了後(セルの位置合わせ)に、使用するセルにMilliQ(吸収が多い場合は緩衝液)を入れてセルホルダに設置する。



1.7. OPwave+EXT-K 内で基本スペクトルタブを表示させる。

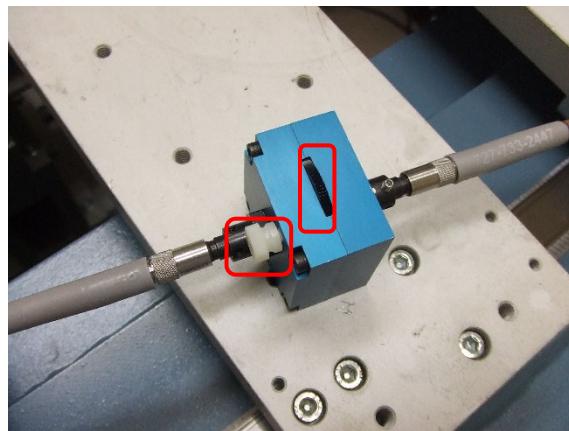


1.8. シグナルが飽和しないようピークで最大値の 7~8 割程度以下に(QE65Pro:16bit、QEpro:18bit)になるよう アッテネータで光量を調節する。[使用中に OP-wave だけフリーズした場合は、光量の変化はないはずなのでスキップ可能]

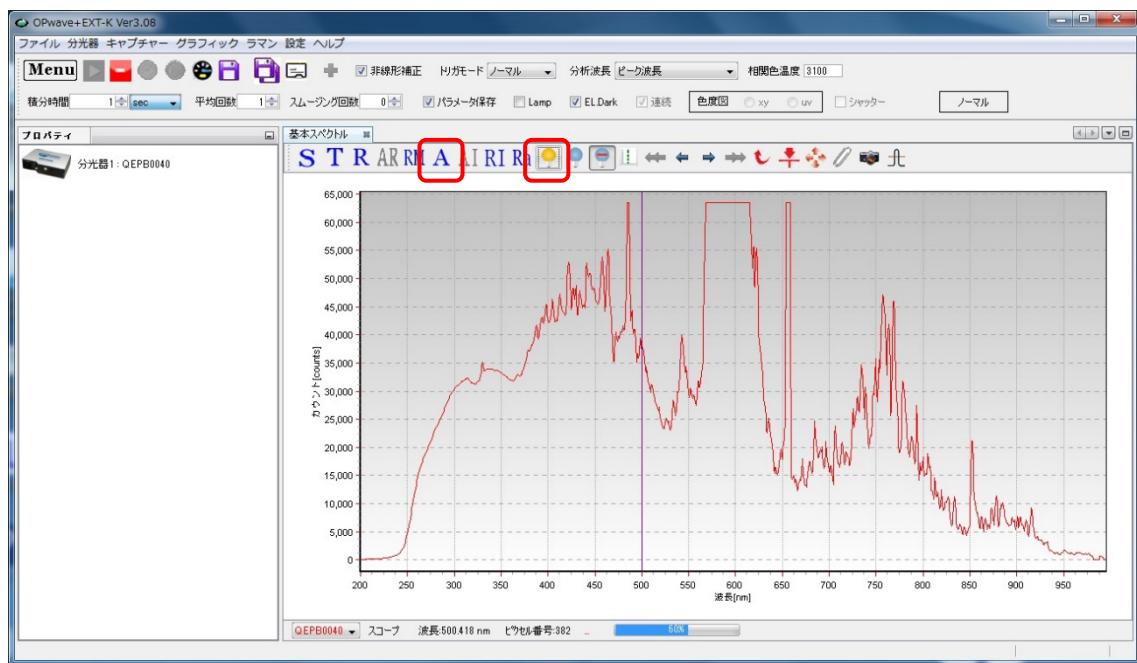
(例:無色のタンパクで 220-400nm を測定時、QE65Pro で 280nm が 30000 カウント前後、QEpro で 120000 カウント前後に調節、400nm で最大値の 7 割くらいの強度)

アッテネータの調節法

白いロックねじを緩め、黒いホイールで光量を調節し、再度ロックねじを締める。(ロックねじを締める際にも光量が変化するので注意)



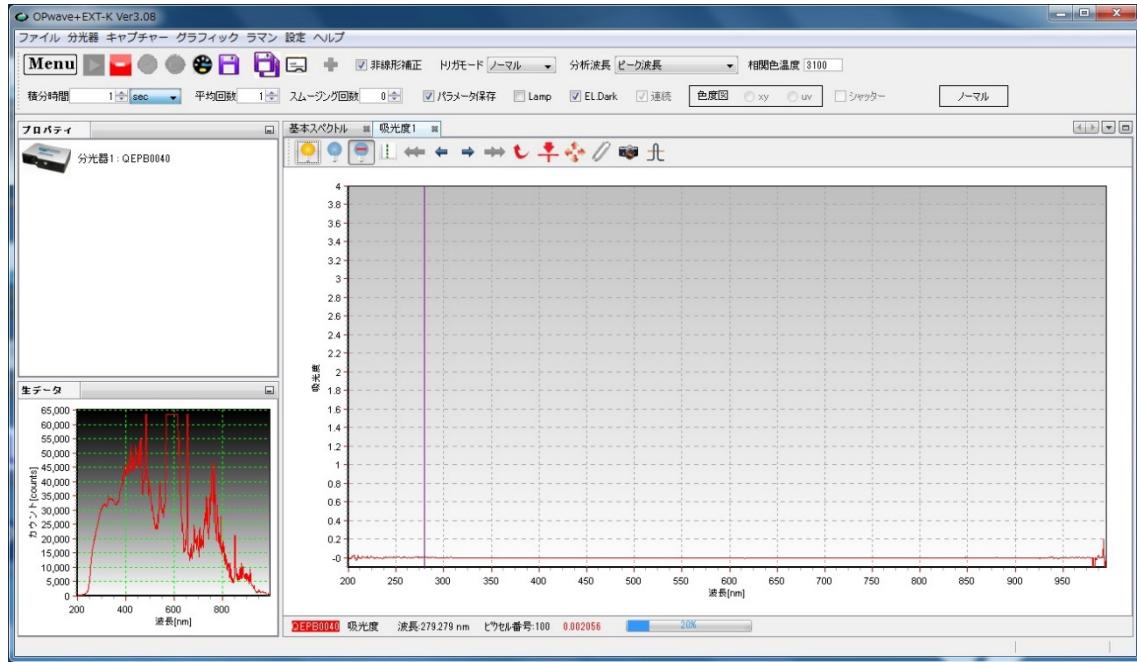
- 1.9. レファレンス取得(黄色の電球)アイコンをクリックし分光のベースラインを取得する。レファレンスを取得し、A(吸光度モード)アイコンをクリックすると吸光度タブができるのでそちらをクリックして表示させる。
最終的には、測定時の流速で緩衝液が流れている状態でレファレンスを取得するが、起動時にはこれで動作確認とする。



レファレンス取得 A(吸光度モード)



A



- 1.10. ハッチ外の measurement PC のデスクトップ上にある分光光度計用リモートデスクトップのアイコンをクリックしてハッチ外から Opwave-EXT-K を操作できるようにする。各 BL でのアイコンの名前は
- ・Flow&QE65pro Remote Desktop@10C
 - ・UV for HPLC & Solution Flow@15A2

