

SACLA-SFX実験マニュアル集抜粋&一部追記

インジェクター サンプル調製編（第二部）

岩田／南後グループ

210526—2

動画マニュアル一覧

番号	日本語タイトル
01	グリースサンプルの調製
02-1	Φ4mmカートリッジへのサンプル充填
02-2	Φ25mmカートリッジへのサンプル充填
02-3	サンプル充填治具の使い方
03	LCPインジェクターの組み立て
04	実験ハッチについて
05-1	インジェクターの取り付け（Heチャンバー）
05-2	インジェクターの取り付け（オープンチャンバー）
06	インジェクターの取り外し
07	インジェクターノズルの洗浄
08-1	バキュームノズルの交換
08-2	バキュームタンクの交換
09	嫌気条件時のインジェクター密閉方法

目次

第一部 オペレーション編

Video

第二部 インjekター サンプル調製編

Video

インjekターの構成と サンプルカートリッジについて	5
インjekターの組み立て方	6
プランジャー位置の調整と気泡の除去	7
サンプルの詰め方	8
インjekターの洗浄	11
補足資料（グリース&セルロース）	13

はじめに

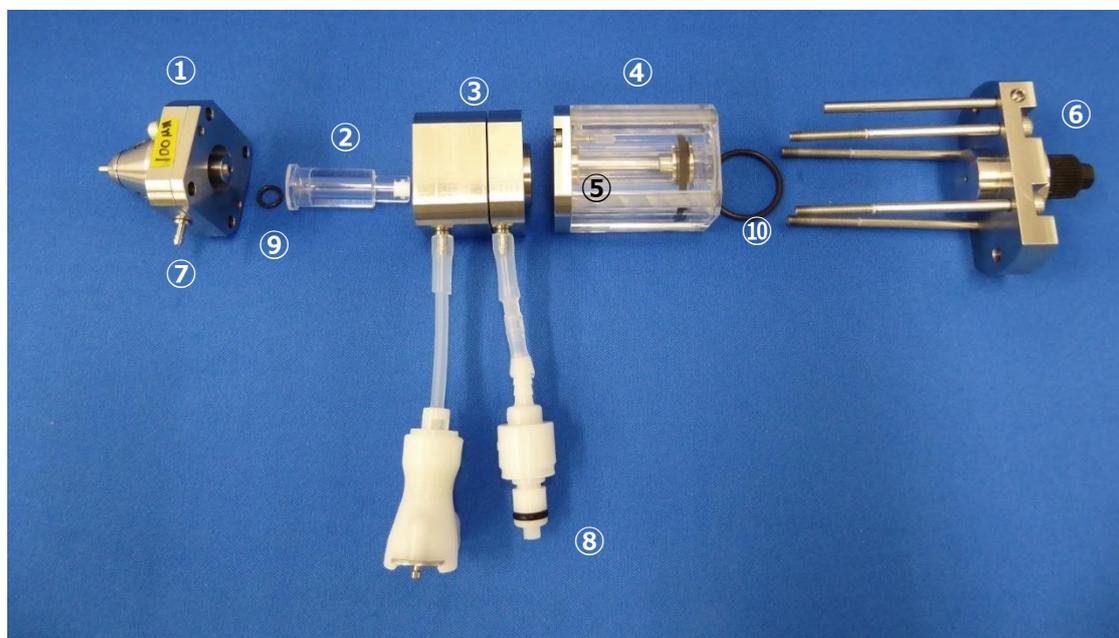
インジェクターの使用注意点

- **インジェクターのシリンダ内に気泡があるとストリーム乱れる**
(気泡の除去方法は03ページを参照)
- **カートリッジの取り違い**
(カートリッジは内径が2mmと4mmの2種ある。
取り違えると、インジェクターの破損や流速が不安定になる。
詳細は02ページを参照)
- **O-ring忘れるとサンプル漏れる**

**カートリッジへのサンプル充填方法は、
治具を使って充填する方法を推奨します。
特に時分割実験では①濁りを防ぐ、②塩の発生を防ぐ
ためにこの方法が望ましい。**
(詳細は04ページを参照)

インジェクターの構成と サンプルカートリッジについて

1. インジェクターの構成と各部の名称



- ①ノズル ②サンプルカートリッジ ③サンプルカートリッジホルダー（チラー水が循環し、サンプル温度を制御） ④シリンダー ⑤シリンダー内のプランジャー
⑥HPLCポンプにつなぐコネクタ ⑦ガスフォーカス用のHeガス流入口 ⑧チラーに接続 ⑨Oリング小 ⑩Oリング大

2. サンプルカートリッジについて

サンプルカートリッジには内径が2mmのものと4mmのものの2種がある。また、材質もアクリルとステンレスとあり、サンプル吐出にかかる圧力等に応じて選択する。サンプルカートリッジは遠心できる設計となっているので、卓上遠心機でサンプル中の気泡等を取り除くことができる。（サンプルの詰め方についてはp.22~23を参照）

Φ2 mmカートリッジ

最大70 μ l程度のサンプルが入る。後方部には**テフロンボール（小）**を2個詰める。テフロンボールは使用後破棄、カートリッジは返却。



Φ4 mmカートリッジ

最大200 μ l程度のサンプルが入る。後方部にはOリングが付いた樽型のテフロンを詰める（通称：**タル**）。滑りをよくし、脈動を防ぐため、タルの側面にはグリースを塗って詰める。タル、カートリッジ共に使用後返却。



インジェクターの組み立て方

◆インジェクターの組み立て手順（動画資料有）



左写真の状態でケースに入っている。
シリンダーのサイズを確認する。
Φ2 mm用とΦ4 mm用があるので、間違えないように。



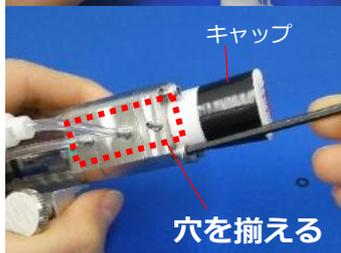
プランジャーが十分に上がっていることを確認する。
(サンプル量によって位置は調整可能、調節方法はP.3参照)
プランジャーが下がったままカートリッジを入れると、サンプルが飛び出すので注意。



サンプルの入ったカートリッジを入れる。
(サンプルの入れ方についてはp.4~6を参照)



Oリング (小) を入れる。



キャップ

穴を揃える

ノズルを取り付け、4つのネジで固定する。ガスフォーカスとチラーの3つの穴を揃える。
ノズルの先は脆いので、キャップは付けたまま！

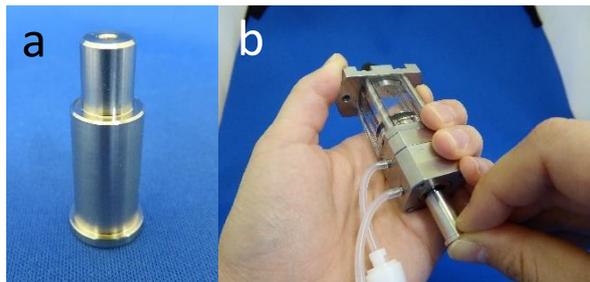


組み立て後、測定までに時間がある時は、この状態でインキュベータで保管する。

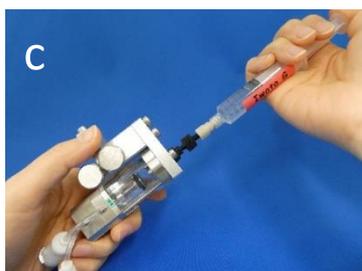
プランジャー位置の調整と気泡の除去

◆プランジャー位置を一番上まで戻したいとき

インジェクターの使用後はシリンダー内に水が入っているので、抜く必要がある。各カートリッジボックスの中に写真aのツールが入っているので、それを写真bのように使用する。水が勢いよく飛び出すので、周辺に注意する。



◆プランジャー位置を調節したいとき、シリンダー内の気泡を除去したいとき



サンプル量が少ない時など、プランジャーをあらかじめ少し下げおきたいときに左写真cのシリンジを使用してシリンダー内の水の量を調節する。



左写真dのような大きな気泡はサンプル吐出の際の脈動の原因となるので、上記写真cのように水の入ったシリンジを使って取り除く。

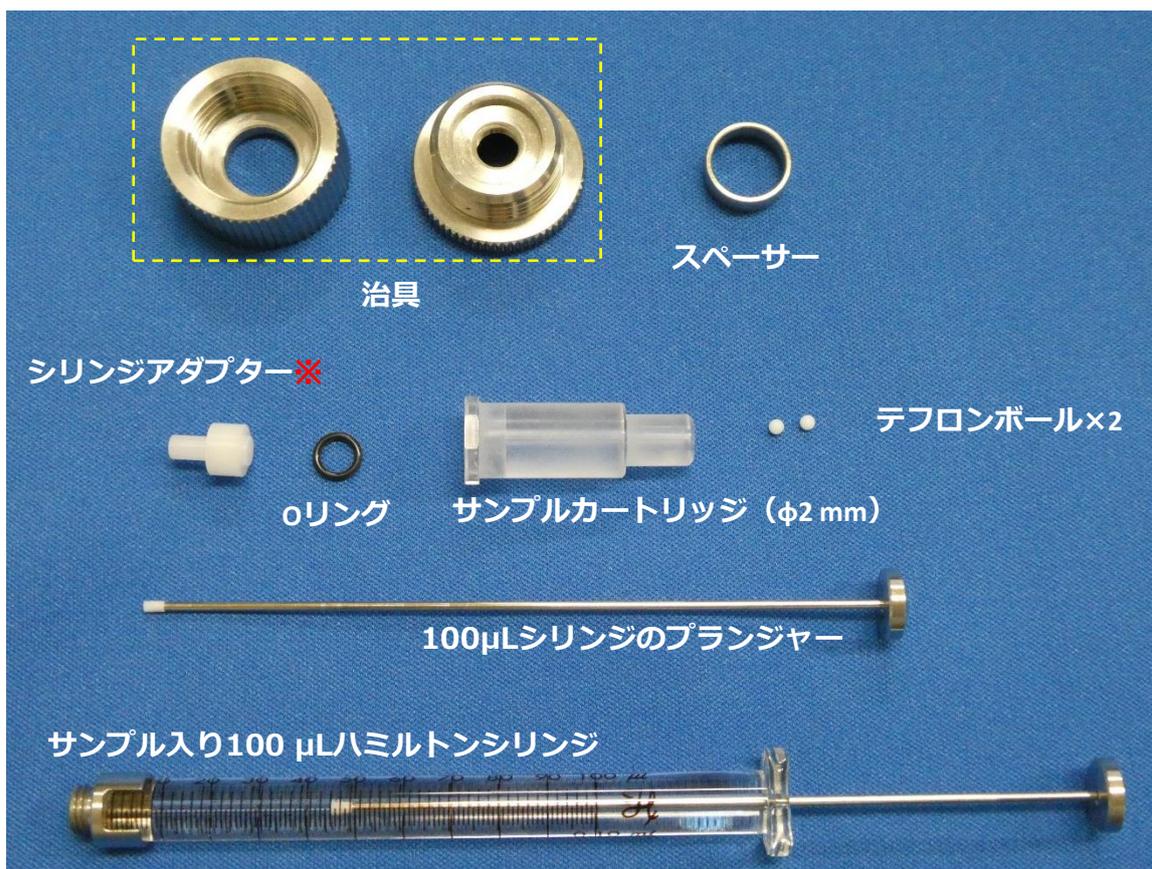


上記の方法でも気泡が気になる時はハッチへ取り付けのためのアダプターを外し（ネジ二つ）、更にHPLCポンプのコネクターが付いたパーツの4つのネジを外す。左写真eのように洗瓶から直接、水をたっぷり入れ、あふれさせながら再び組み立てていく。

サンプルの詰め方 充填治具使用方法 (Φ2・Φ4 同様)

ハミルトンシリンジに保存されたサンプルは治具を使ってサンプルカートリッジに移すことができる。

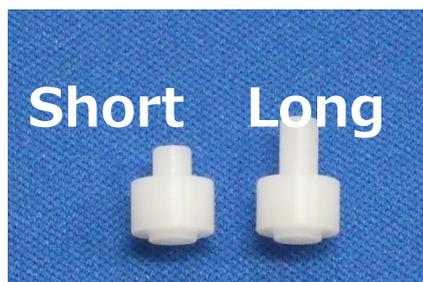
◆サンプル充填治具使用に必要なもの (Φ2の場合)



* 250 μL ハミルトンシリンジもあり

※ シリンジアダプターについて

サンプルが入ったハミルトンシリンジに付属のテフロンフェルールがついているかどうかで使用するアダプターのサイズが異なる



シリンジアダプター

(100μLシリンジ用と
250 μLシリンジ用がある)

Shortタイプ:

ハミルトンシリンジにテフロンフェルールが付いている場合に使用

Longタイプ

ハミルトンシリンジにテフロンフェルールが付いていない場合に使用

◆ 治具を使用してカートリッジにサンプルを入れる手順



カートリッジにテフロンボール（小）を2つ詰め、スペーサーとOリングを付ける。



治具の片方（メス）に挿し込み、シリンジアダプターをのせる。



治具のもう片方（オス）を付ける



プランジャーでテフロンボールを押し上げておく。



サンプルの入ったシリンジを取り付ける。

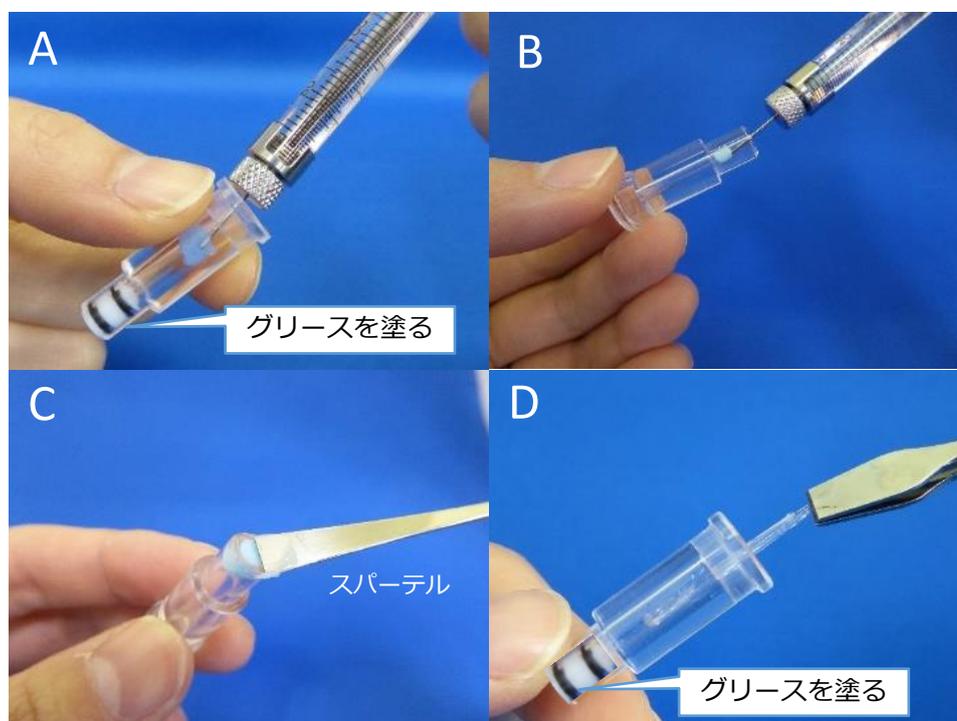


サンプルの入ったシリンジのプランジャーを押し、シリンジ内のサンプルをカートリッジに移す。治具を外してカートリッジを取り出す。

サンプルの詰め方 充填治具を使用しない方法

◆サンプル充填治具を使用しない方法

ハミルトンシリンジ等を使ってニードルで注入する方法は2通りあり、Aはあらかじめテフロンを詰めておき、前方から注入する。Bは後方から注入し、後からテフロンを詰める。グリースサンプルではプレートで混合した後、スパーテルを使って $\phi 4$ mm ($\phi 2$ mmでは難しいので注意)のカートリッジの後方から押し込む方法がある(C)。また、ワイヤー式LCPサンプルでは予めテフロンを詰めているカートリッジにワイヤーごと差し込み、ワイヤーだけを引き抜く方法がある(D)。 **$\phi 4$ mmのカートリッジを使用するときは、テフロンタルに必ずグリースを塗ること。**



カートリッジに詰められたサンプルはカートリッジごと遠心機にかけられるため、混入してしまったサンプル内の気泡を抜くことができる。



インジェクターの洗浄

必ず保護メガネを装着して洗浄を行う！ グリースとセルロースは洗浄液が異なるので注意！ セルロースサンプルで使用したノズルは、使用后すぐに洗浄または水につけておかなければ、固まってしまい使用できなくなる！

洗浄前に洗浄液を確認！

グリースまたはLCPサンプル：エタノール

セルロースサンプル：Milli-Q水

◆ インジェクター洗浄の手順（動画[07]）



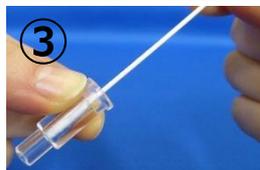
①

ノズルの破損を防ぐため、キャップを取り付けたままインジェクターを解体する。



②

サンプルカートリッジを取り出し、テフロンパーツを外す。テフロンボールは破棄し、テフロンタル（Φ4mm用Oリング付きテフロン）は洗浄して返却する。Oリング（小）も返却する。



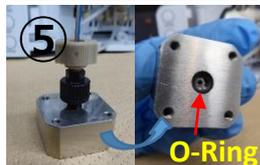
③

カートリッジ内部は洗浄液を付けた綿棒やキムワイプで丁寧に拭き取る。



④

ノズルの基部に付着したサンプルを綿棒等でよく拭き取る。



⑤

洗浄用ブロックにOリングを入れる。



⑥

洗浄用ブロックにねじで取り付け、ノズルのキャップをはずす。HPLCポンプの流速を0.5 mL/min程度に設定し、ノズル内に洗浄液を流す。洗浄液が線形に飛び出すまで、徐々に流速を上げる。線形になってから1分程度洗浄し続ける。



ガスフォーカス用の穴に洗浄液の入ったディスプレイシリンジを取り付け、5 mL程度、勢いよく注入する。
 (グリースの場合：エタノール、セルロースの場合：水)



ガスフォーカス用の穴にエアダスターを付け、パーツ内部に残っている洗浄液を吹き飛ばす。
 顕微鏡で確認しながら、きれいになるまで⑦⑧を繰り返す。

◆ 洗浄のトラブル

ノズルが詰まっていて洗浄液が流れない場合、以下の操作を試す。

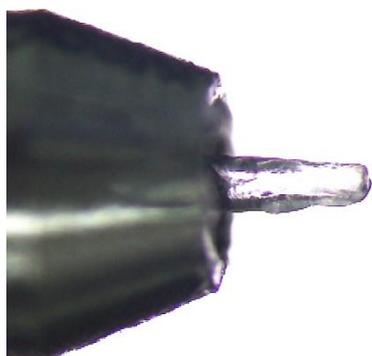
- HPLCポンプの圧力が上がり、エラーになったらポンプを止め、ドレインコックを回して圧力を解放させる。再びポンプをONにし、圧力をかける。この操作を繰り返す。
- HPLCポンプの圧力が上がり、エラーになったら、そのままの状態数十秒待ってみる。
- 洗浄用ブロックから外し、ノズルの基部を拭く操作を丁寧に行う。
- 洗浄用ブロックから外し、ノズルの基部を下にして洗浄液に浸しておく。
- お湯を用意し、洗浄用ブロックに取り付けたままのノズルの先端をお湯につけ（破損に注意）温めながらHPLCポンプで洗浄液を送液する。

ノズルのつまりが解消しない場合

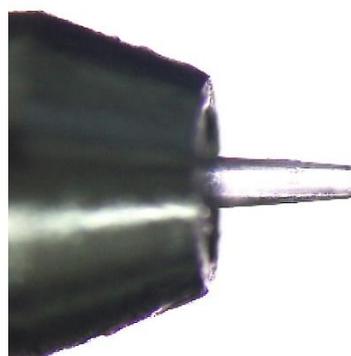
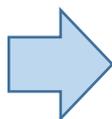
キャップに「詰まり」とわかるようにラベルをして破損ノズル専用コンテナに返却する。

◆ ノズルの汚れ、破損の確認

側室のOLYMPUSの顕微鏡で汚れ、破損がないか確認して返却する。
 破損している場合は破損ノズル専用コンテナに返却する。



グリースサンプル使用後



洗浄後

補足資料 (グリーンズ&セルロース)

フィルターの使用

結晶のサイズをそろえるため、不純物を取り除くため、結晶サイズをそろえるため適宜フィルター処理を行う。

フィルター処理によるサンプルロスがあるので注意

◆フィルター：Partec CellTrics (Sysmex)



◆処理の手順

- ①顕微鏡で結晶を観察し、サイズ・形からフィルターを選択する
↓
- ②15mLチューブにセットし、結晶懸濁液を少しずつのせていく (a)
フィルターを通りにくい場合は、フィルター内で軽くピペッティングを行う
↓
- ③ハーベストバッファーをさらにのせて、フィルターを洗う
↓
- ④必要な場合、1.5mLチューブにフィルターを付け替えて (b)、遠心してフィルターに残った結晶を回収する (c)
(TOMYの遠心機で500 rpm程度の低速で)



結晶密度の調整

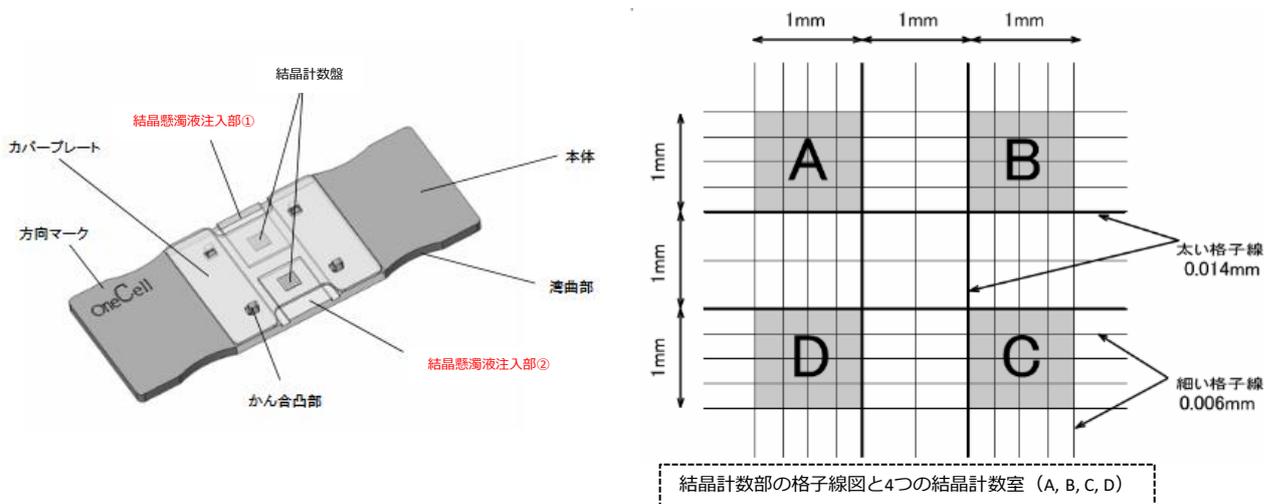
1. 結晶密度調整の目的

効率的にデータコレクションをするために、結晶密度の調整をする。密度の目安は $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ 個/mL。

密度が高すぎるとマルチヒットの原因になる。密度が低すぎるとデータコレクションに時間がかかる。

2. 結晶密度の測定

結晶密度の測定にはoneCellカウンターを用いる。onecellカウンターはディスプレイな細胞計数盤。

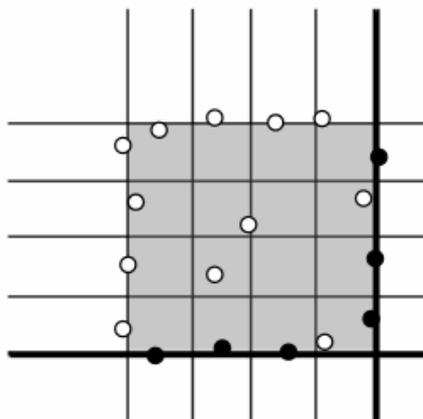


使用方法

- ① 結晶懸濁液を細胞注入部に10 μ L注入する
- ② 顕微鏡の対物ステージにセットし、結晶が沈降するのを1-2分待つ
- ③ 4つの計数室内の結晶を順次、A→B→C→Dの順にカウンターで数えて加算していく（境界線での係数の班的基準は下記を参照）
- ④ 4つの計数室での加算数をNとして、結晶密度を求める

$$\text{（結晶密度）} = (N/4) \times 10^4 \text{ 個/mL}$$

（※結晶懸濁液をあらかじめ希釈した場合には希釈倍数をさらに乗じる）



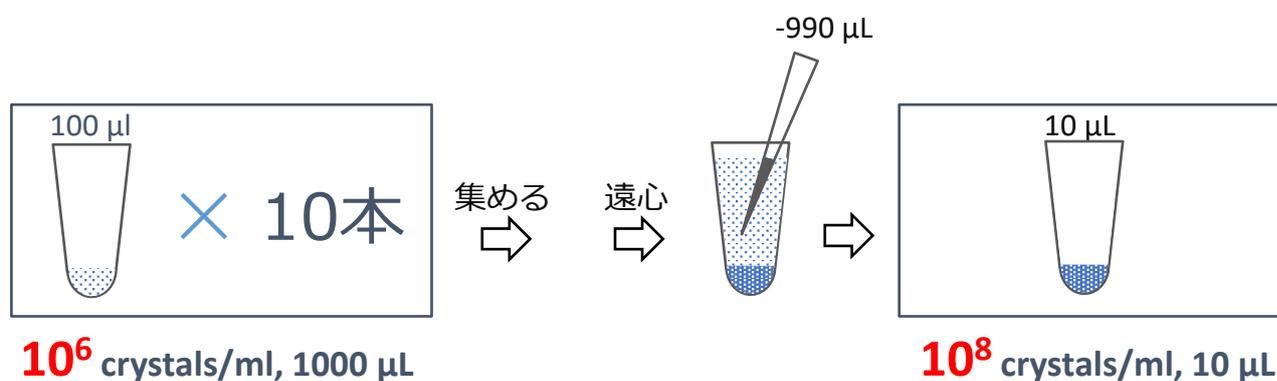
結晶計数室の計数判定基準
○印のものは数える ●印のものは数えない

3. 結晶密度の調整

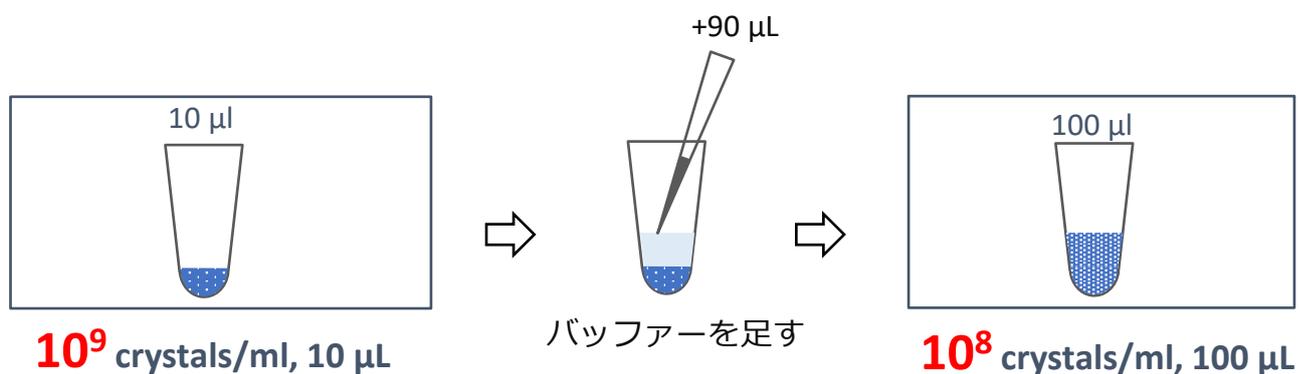
- ・結晶密度が高すぎる場合
Harvestバッファー等で適切な密度になるまで希釈する。
- ・結晶密度が低すぎる場合
遠心または静置で結晶を沈降させた後、適切な密度になるように上清を取り除く。

◆結晶密度調製の例

例1. 結晶密度の低いサンプルをみつめて、適切な密度にする



例2. 結晶密度の高すぎるサンプルを薄めて、適切な密度にする



グリースを媒体に用いる場合

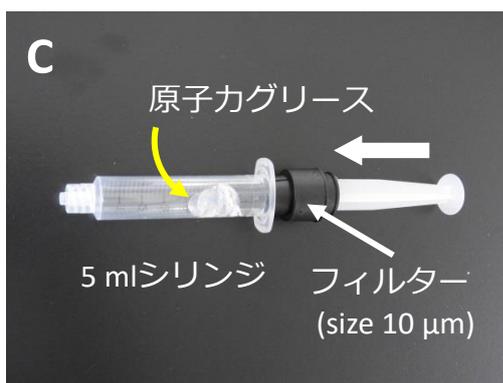
1. グリースの事前準備（フィルター処理）

◆用意するもの

- 原子カグリース（写真A）
- 10 μ mフィルター（Celltrics）
- 5 mLディスポーザルシリンジ
- スパーテル
- パラフィルム
- 200 μ L用チップ

◆手順

1. スパーテルでセルロースをすくい取り、フィルターに詰める（写真B）。
2. 5 mLディスポーザルシリンジのピストンを使ってグリースをシリンダー内に押し出していく。少量ずつ入れて押し出すのを繰り返す（写真C）。
3. ディスポーザルシリンジの先には200 μ L用のチップを付け、パラフィルムでシールする。



2. 結晶サンプルとグリースの混合 (動画[01])

フィルター処理済みのグリースを100 μ Lのハミルトンシリンジに移す。
(シリンジ後方から入れると良い)

ハミルトンシリンジにニードルを取り付け、グリースを90 μ L量り取る。

結晶サンプルの密度の調整をする。
グリース：結晶サンプル= 9 : 1
で混合するため、混合前の密度を10倍に濃縮しておく。

(e.g.) 10^7 crystals/ml $\xrightarrow{\text{centrifuge}}$ 10^8 crystals/ml

Mixing method I
グリースと結晶サンプルをプレート上に出し、スパーテル等で混合する。

Matrix 90 μ L
Crystals 10 μ L

Mixing

Mixing method II
結晶サンプルをハミルトンシリンジにいれ、グリースが入ったシリンジとカップラーでつなぐ。プランジャーを往復して混合させる。

Matrix 90 μ L
Crystals 10 μ L
Coupler

セルロースを媒体に用いる場合

1. セルロースの事前準備（粉末の溶解）

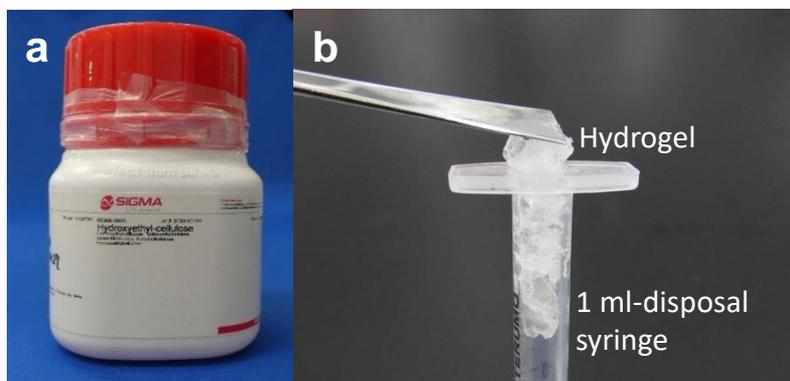
セルロースを媒体として用いる場合、ハーベストバッファーに溶かして使用する。一般的には32%で調製し、結晶と混合するときに最終濃度16%程度になるように希釈する。ただし、Mg²⁺のような二価イオンを多く含むバッファーは緩くなる傾向があるので、最終濃度20%前後で混合するとよい。

◆ 用意するもの

- セルロース (Hydroxyethyl-cellulose, SHIGMA, 09368)
- 結晶のハーベストバッファー
- 1 mLディスポーザルシリンジ
- ミクロスパーテル
- パラフィルム
- 200 μ L用チップ

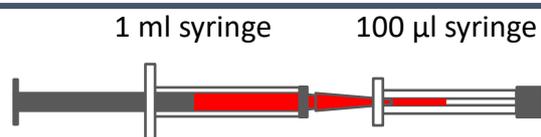
◆ 32%セルロースを1mL作る手順

1. 320 mgのセルロースを1.5mLチューブに計り取る
2. セルロースに結晶のハーベストバッファーを1mL加える
3. ミクロスパーテルでかき混ぜる
4. 半日～1日置き膨潤させる
5. ミクロスパーテルで少量ずつすくい取り、1 mLのディスポーザルシリンジの後方から詰めていく
6. ディスポーザルシリンジの先に200 μ L用のチップを付け、パラフィルムでシールする



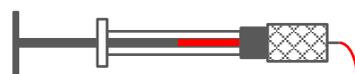
2. 結晶サンプルとセルロースの混合（セルロース最終濃度16%の場合）

ハーベストバッファーで溶解したセルロースを100 μ Lのハミルトンシリンジに移す。（シリンジ後方から入れると良い）

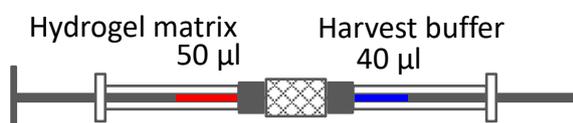


ハミルトンシリンジにカップラーを取り付け、セルロースを50 μ L量り取る。

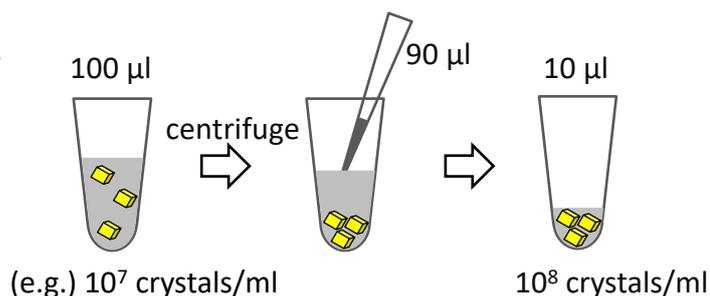
(e.g.) 32% hydrogel matrix 50 μ L



上記シリンジにハーベストバッファー40 μ Lを入れたシリンジを接続し、よく混合する。

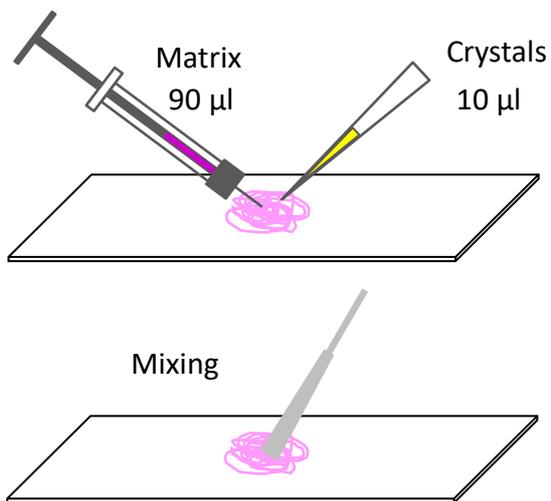


結晶サンプルの密度の調整をする。セルロース：結晶サンプル=9：1で混合するため、混合前の密度を10倍に濃縮しておく。



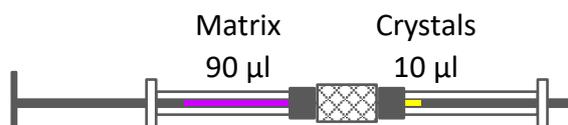
Mixing method I

セルロースと結晶サンプルをプレート上に出し、スパーテル等で混合する。



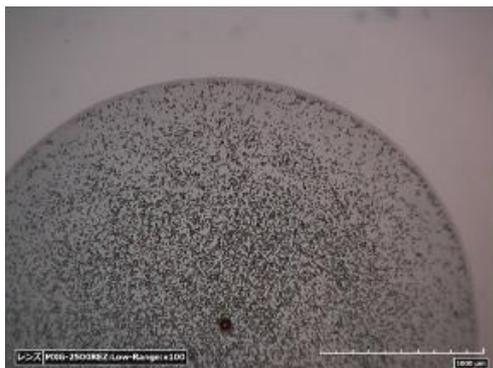
Mixing method II

結晶サンプルをハミルトンシリンジにいれ、セルロースが入ったシリンジとカップラーでつなぐ。プランジャーを往復して混合させる。



リゾチーム微結晶の顕微鏡観察

Lysozyme微結晶 : 10um (倍率 x 100 : 1ul カバー無し)



7.2×10^7 個/ml

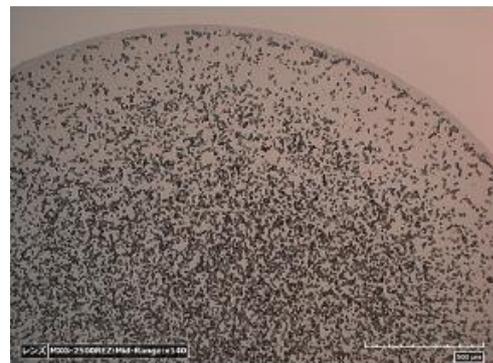


7.2×10^6 個/ml



7.2×10^5 個/ml

Lysozyme微結晶 : 10um (倍率 x 140 : 1ul カバー無し)



7.2×10^7 個/ml



7.2×10^6 個/ml



7.2×10^5 個/ml

Lysozyme + Greaseの調製 (SFXキャリブレーション用)

- ① Lysozyme微結晶(密度 10^8 個/mL程度)を150 μ Lをチューブに秤量し、遠心(3,000 g x 1 min)後、上清を取り除き、10 μ Lに濃縮
- ② 10 μ mフィルター済みGreaseを 200 μ Lシリンジで秤量
- ③ プレート上で①+②をスパーテルを使用して混合
- ④ スパーテルで4 Φ カートリッジに充填、テフロンタルを装填し、サンプル漏出防止にカートリッジ下部をパラフィルムで覆う (右図参照)
- ⑤ 4 Φ カートリッジを遠心(3,000 g x 1 min) して、エアを除去、パラフィルムを取り外す
- ⑥ インジェクターの組み立て (通常、ノズルサイズ:75 μ m)

