**海水試料のアミノ酸分析マニュアル（東大大気海洋研）**

**文責：酒井・梅澤**

**27 Mar. 2014**

**HPLCの立ち上げ**

1) 電源OFFの状態で、親機の下部のつまみを左に回して開放し、シリンジを挿してゆっくりと吸引し、HPLC用のメタノールをチューブ内に満たす。

※メタノールがどこからきているかを確認する

※早く吸引すると、チューブ内に気泡が生じる可能性。

2) POWERをONにして10分待つ

3) 親機と子機両方のスイッチをいれる

4) 親機の**MODE**ボタンを押して、設定を10MPa（ゆっくりと流れるモード）にする。

シリンジを差し込んで　シリンジが勝手に引かれて泡がなくなることを確認する。

5) **Flow**ボタンを押して、親機のみに溶媒を流し、15分〜20分後に再度、**Flow**ボタンを押して動作を止める。

6) **MODE**ボタンを押して、200μlに戻す

**Flow**ボタンを押して、圧力が上がるかどうかを確認する



親機と同じように4)〜6)の作業を子機でも行う

(子機には、すりガラス栓のMeOH瓶)

7) カラムオーブン（内側にある）の電源をいれる

8) 子機を**Flow**ボタンで15分ほど回す

（**Flow**ボタンで止める）

9) 親機を**Flow**ボタンで15分ほど回す（**Flow**ボタンで止める）

10) **Flow**ボタンで止めて、圧力がゼロに戻ったことを確認後、子機の溶媒をMeOHからミリQにかえる。

※溶媒交換時は、採水口を空気中に出した後、シリンジで吸引して空気を少しかませた後、採水口をミリQで洗浄後、ミリQボトルに入れる。採水口にはバブルがないことを確認し、シリンジでチューブ内の空気を抜き取る。

11) 親機の**Start**ボタンを押して、親機子機の両方に一定の比率で溶媒を40分程流す。

　※このタイミングで、ノートにMeOHとミリQ使用時の圧力を記載する

12) **Clear** ボタンを押して止めた後、10)と同じ要領で、子機の溶媒をミリQから溶離液にかえる。

13) 親機の**Start**ボタンを押して、溶媒を流す。

14) サンプルボックスにはカラ瓶を並べて、OPA瓶は一番右端奥に入れておく。

15) 蛍光検出器、モニター、サンプル機の電源をいれ、20分ほどたって安定したら　蛍光検出器の**AZ**（オートゼロ）ボタンを押し、更に20分ほど流して安定性を見る。

　※このタイミングで、ノートに溶離液の使用時の圧力を記載する

16) 親機と子機の両方に溶媒が流れている状態で、もう１回、親機の**Start**ボタンを押して、溶媒にグラディエントをかける。

　※ディスプレイの表記がPROGから、01⇒02⇒03⇒04となり、PROGに戻ったら終了

17) この間にリンスとパージのアイコンをクリックしてリンスとパージを行う

18) サンプルボックスの右端手前にミリQバイアルをセットし、シングルでの分析を開始する。　日付（名前）、データファイル名をいれてOKを押す

19) ミリQバイアルを別のものに変えて、もう一回行う。

20) バッチ処理⇒バッチ開始（バッチファイルの作成は下記参照）

**バッチファイルの作成**

1. LCsolutionを立ち上げる
2. 左から2番目の分析器（装置―蛍光検出器）をクリック
3. ログインID:　admin
4. 左端のウィンドウで、バッチ処理のアイコンをクリックし、ファイル＞バッチファイルの新規作成を行う。これまでに分析した他のバッチファイルからコピペし、サンプルIDやデータファイル名を入力し直す。
5. 適当な場所にフォルダを作成し、保存する。

※あらかじめ、以前の分析時のフォルダ全体をコピーし、ファイル名を付け替えて、そのファイルを開いて使用しても良い。

**溶離液の作成**

※測りの電源をしようする15分前につけておく。

1) HPLCで使用する酢酸buffer瓶をミリQで3回洗浄する

2) 酢酸ナトリウム三水和物薬品庫2右上を3.4gを直接容器から測る

3) 酢酸ナトリウム三水和物の入ったビンにミリQを500ml入れ、混ぜる

4) パスツールピペットをつかって50％、10％のCH3COOH（冷蔵庫上2番目）を、50％の方から順に11滴ずつ加える（pH調整のため）。

※パスツールピペットはそれぞれ使い分ける。

5) 小ビーカーに移して（50mlほど）pHを測る　5.7～5.8がちょうどよい

（pH用メーターで先端を洗う→pH6.8で調整→pH4.0で調整→最後に先端を洗う）

ビニールの手袋をつける。

1. テトラヒドロフラン紫□右（界面活性剤の役割）を10ml入れる

（10mlメスシリンダーを使用し、使用する前は共洗いする）

使用済の廃液は465HPLCの下

**誘導化試薬の作成（分析の前日に行う）**

1. フタルアルデヒド0.1g（冷蔵庫左下）をガラスバイアルに入れる

※ 薬包紙を複数枚同時に折り畳み、内側の手で触っていない薬包紙を用いて秤量する)

1. 洗浄用メタノール、アミノ酸用メタノール（薬品庫8有機溶媒（大瓶）上段の上）を準備し、500lシリンジを洗浄用メタノールで10回、アミノ酸用メタノールで3回、共洗いする。

3. メタノール2ml (500lシリンジ4回分)をガラスバイアルにいれて、小型超音波洗浄機を使ってフタルアルデヒドを溶かす

4. メルカプトエタノール（冷蔵庫上から2番目の左の箱の褐色アンプル: 100ml）をパスツールピペットを使ってガラスバイアルに入れる

※ 小アンプルの中にガラスバイアルの中の液を少し入れて、洗い、また戻す

1. ミリQは共洗いをピペットマン（共洗い3回）で行い1.5ml入れる。
2. 新しいパスツールで混ぜる→ホウ酸クエン酸buffer（冷蔵庫左下:0.5ml）加える。
3. テフロンの内フタをつけ、黒キャップで蓋をし、翌日まで冷蔵保存する。



**スタンダードの作成**

1. 100ml、50mlメスフラスコ、三角フラスコ×2は10％HClで満タンにしておいたものを使用し、ミリQで3回洗浄する。使用前にミリQを満タンにしておき、酸を抜く。
2. 使用する前に、再度ミリQで3回ほど洗う。線の少し前までミリQをいれる。

作成済みのスタンダード試料（冷蔵庫上真ん中スタンダード10μM青い箱）を入れてメスアップする。

5 nM：100mlメスフラスコ にスタンダード50μl入れる

10 nM：50mlメスフラスコにスタンダード50μl入れる

15 nM：50mlメスフラスコにスタンダード75μl入れる

線までメスアップする

1. バイアル瓶に、サンプル水とスタンダードをそれぞれ2000μl（1000×2回）注入。
2. ホウ酸クエン酸buffer（冷蔵庫左下2mlアンプル（透明））を20μl入れる
3. フタをする→液クロのサンプルボックスの指定の番号に並べる。

**サンプルの分注**

DFAA

Buffer 20μｌ 液クロへ

サンプル水2000μｌ

DCAA(加水分解) 用の試料

サンプルを溶かす

小アンプル3

サンプル400μl

真空乾燥機へ入れて2時間



アンプルを閉じて　アルミホイル、をして冷凍保存

**DCAA分析のため、結合体アミノ酸の加水分解を行う。**

POWER　ON

VACCOUNTをLOWの方向へ最後まで（初めはゆっくり）

N２ガスの元栓→栓を開く（値は５０くらい）

ドラフト横のヒーティングブロックの電源をいれる。

パスツールピペットで7希定HCLをトリフルオロ酢酸冷上2左に入れる　混ぜる

3回共洗い（液が少ないので少しとって空気を入れる）後、175μlをピペットマンで入れる

小アンプルのラベルを張り替えて　ピンセットをつかって中にいれる

フタのリングの部分にグリセリンを塗って　つける

すべて完成したら

N2を流す（50）1分

5本とりつける　5本目をつけた後にN2をSHUTする

1分間　引圧にする　OFF縦→ON横

30秒N２ガスをいれる　N２をON→OFF

1分間　　　　　　　　　ON→N2をOFF

30秒N２ガスをいれる　N２をON→OFF

1分間　　　　　　　　　ON→N2をOFF

30秒N２ガスをいれる　N２をON→OFF

1分間　　　　　　　　　ON→N2をOFF

1分後フタをする　ほんの少しN２をON→OFF

外す　1つ外したら　N２を止める

VACCOUNTをHIGHTの方向へ

POWER　OFF

**ホットプレートをしたに引いて酸を抜く**

その後　アルミ、パラフィンをまいて冷凍保存

**乾固したサンプルの測定**

シリンジは2本使用する

シリンジをそれぞれメタノールで10回洗う

**シリンジ**を洗ミリＱで10回洗う

シリンジをミリＱで2回洗う

シリンジで500μｌアンプルに入れて　超音波にかける

**シリンジ**でアンプルからバイアルに入れる

シリンジで500μｌアンプルに入れて　超音波にかける

**シリンジ**でアンプルからバイアルに入れる

シリンジで1000μｌアンプルに入れて　超音波にかける

**シリンジ**でアンプルからバイアルに入れる

**シリンジ**を洗ミリＱで3回洗う

最後はメタノールでシリンジをそれぞれ10回洗う

DFAAと同じように液クロへ

**測定の終了**

1. 蛍光検出器の▼でHVとLighting-Hの値を探し、ノートに記載する。
2. 分析完了後、親機のClearボタンを押して、圧力が下がるのを待つ。
3. 開始時と逆の手順・要領で、子機の溶媒を、酢酸BufferからミリQへと置き換える（**Start**ボタンを押し、30分程度、流す）
4. クーラー、蛍光検出器、本体の電源をOFFにする。
5. ミリQを、MeOHに置き換える

（子機の**Flow**ボタンを押し、10分程度、MeOHを流した後、**Flow**ボタンで止めて、今度は、親機の**Flow**ボタンを押して、HPLC用メタノールを20分ほど流す。）。

1. Ovenのスイッチ、親機、子機の電源をOFFにする（デガッサーはそのまま）

**再解析を行う**

1. LC-solutionを立ち上げる。
2. 再解析をクリック　（ログインID:　admin）
3. 対象とする分析データファイルを開く
4. LCデータ比較画面で、対象とする分析データファイルに加えて、スタンダードのデータファイルをクリックすると、ピークの同定ができる。雑ピークが多い試料の場合、きれいな試料も重ねてみて判別する。
5. LCデータ解析画面で、右クリックして、手動波形処理バーを指定する。
6. 「複数ピーク除去」、「ピーク分割」、「ピーク追加」、「始点・終点 の移動」などを利用してピーク編集を行う。
7. 誤ってピークを消してしまった場合、手動波形処理バーで、処理履歴から行った作業番号のチェックを外して、解析ボタンを押すか、新たにピークを追加する。
8. データファイルを上書き保存する。

**ピークの同定方法**

1. ○○○

**全てのデータをテキストファイルとして出力する方法**

1. バッチテーブルのシートを選ぶ
2. 左のウィンドウのプロジェクトフォルダから、解析したいデータファイルを選択してクリックして、右側ウィンドウに表示する。
3. データファイル中のメソッドファイル（ローカルディスクC>Lab Solution> Data>Projet1フォルダにあるPhile3\_5を、コピーして他の専用フォルダにコピーして、そのファイルを、全ての試料のメソッドファイルに入れる。
4. データファイルの内容が間違えていないのか確認し、必要に応じて変更する。
5. 下の灰色のところで右クリックして、設定を押す

ASCII変換では、ASCIIファイルの出力で、バッチ終了時に出力に☑し、出力項目では、データファイルプロパティとピークテーブルに☑する。また、出力ファイルも適当な場所をしてOKする。

1. 左ウィンドウで、バッチ開始ボタンを押す。
2. 得られたテキストファイルから必要な個所をExcelにコピーして解析する。

**分析レポートの作成と印刷**

1. 画面下のレポート作成シートを開く（最初は白紙画面のはず）。
2. ファイルから、”レポートフォーマットファイルを開く”を選択
3. ローカルディスクC>Lab Solution> Data>Projet1フォルダにあるAA trial 20090701を選択する。
4. ファイルから、”データファイルの読み込み”で、全てのデータファイルを順番に印刷していく。（印刷先は、共通職員室プリンタ）

**アミノ酸の同定に関わる判断基準**

* AspとGluは、多くの場合、スタンダードよりも後に出てくるが、他は逆転する。
* Hisは、蛍光収量が低いのでピークが出にくい（Standardは出る）。
* Serは、前後に雑ピークが、被ることがあるので注意。

（ふたコブ山の前がSerで、その前にHisがあるのか、HisとSerの山か難しい）

* Argと双子（Gly, Thr)もセットとしてみる。
* 次の4兄弟（β-Ala, Tyr, Ala, γ-Aba）の中では、3男のAlaが大きい
	+ （未知試料では4兄弟の直前に大きなゴミピークが出ることがある？）
	+ （4兄弟の最後のγ-Abaはピークがないことがある？）。
* α-Abuとそのテーリングはアミノ酸分析では考慮しなくてよい
* PheとIleの間の小ピークも無視する。
* Pheと重なるように小ピークがあるが、ミリQにも含まれるものなので、ミリQに含まれる小ピークは見逃さず、補正に用いる。
* LysよりもOrnが高くなることは少ないので、ゴミピーク