蛍光分光光度計 (JASCO FP-8600 spectorometer) 操作マニュアル

Akari Yamagami

2018/09/30 Ayame Torii

本体(側面)、クールエース、水冷ペルチェ、電源 ON。パソコン電源 ON。



注意 ! クールエースはきちんと動いているか時々確認する (℃ が点滅していたら OK)。 光源ランプの寿命は 1000 時間なので必要ないときは消すこと。

デスクトップのスペクトルマネージャーを開く。 スペクトルマネージャーのスペクトル測定を選ぶ。





光源が安定するまでしばらく待つ。だいたい30分くらい。

○セルの準備

四面透過セルを用いる。セル表面にはできるだけ触れないこと!

(UV と蛍光の測定を連続して行う場合は、UV 測定から四面透過セルを用いればよい)

○試料測定



セルに測定したいサンプルを入れてセットし、ふた(2 つ)をする。 10 mm セルを使う場合 サンプル量は 2.5 mL 以上にする事。



パラメーターを選び、測定条件を設定する。

「基本」のページで測定波長などを設定できる。

- ・ 測定モード; 蛍光
- ・励起バンド幅、蛍光バンド幅;5nm、10nm、20nm
 のいずれかを選択(補正データを作成しているため)。
 ・感度は発光強度に応じて設定する。
- ・基本は「開始波長」=「励起波長+10 nm」
- ・「走査速度」×「レスポンス」<「蛍光バンド幅」 になるように設定する。

試料測定をクリック。→ 試料測定開始。

参考

オススメの設定

- 励起バンド幅 10 nm
- 蛍光バンド幅 5 nm
- レスポンス 0.5 sec

感度 Very Low / Low / Medium / High (頭打ちしないように設定)

データ取込間隔 1nm

走查速度 200 nm/min

Den	Azuma F		😹 2 パカトルマネー・		7 w		
	🔠 スペクト	ル解析					
トル港	ファイル(E)	編集(E)	表示⊙	データ処理(<u>D</u>)	ņ.	心ドウ₩	£(
) 測測	開(@)			Ctrl+0	1		
7(重ね書き	(L)					
	上書き保	存⑤		CtrI+S	F.		34
3	名前を付	けて保存は	Ŋ		٨N	- Дү 🔎	• /
けて <mark>(保</mark> 行	インポート	Φ					
	エクスポー	ト(<u>E</u>)			x	-	
ut.	ビューを開	K (<u>₩</u>)			F	W View	11
	ビューの(系	存①				0.	3
-650	印刷(P)			Ctrl+P			
易シリア	ゴル刺ノレロ	11~(V)… 設定(R)					- 14
副測定	1 MN178	SC 5×10-	6 M +codi				Н
	2 MN178	SC 5x10-	6 M +cad.j	WS			<u>_</u> '
E/	3 MN179 SC+cad+spd30.jws					0.	2
主/Pへ。 こしつの	4 MN179 SC+cad+spd27.jws 5 MN179 SC+cad+spd24 iws						
2003- 08.em.	6 MN179 SC+cad+spd21.jws					Abs	-
./m/g	7 MN179 SC+cad+spd18.jws						
τルダ	8 MN1 /9 SC+cad+spd15.jws					0.	1
1408	アプリケー	ションの終う	7 ∞				
5/67/29							-
.mm)	, 128		1	山空	~		٦L
				1 A R A			ž00

測定したデータは自動的にスペクトル解析画面に転送される。

○データの保存 スペクトル解析画面で保存したいデータを選ぶ。 ファイルから名前を付けて保存をクリック。 データ名を入力して保存する。

(例) AT999_Ex350_DMSO AT999_Ex350_DMSO_Low_10-5



○データの補正
 補正したいファイルをアクティブにした状態で、「デ
 ータ処理」→「FP オプション」→「スペクトル補正」。
 最新の「励起補正データ・蛍光補正データ」を選択し
 て OK をクリック。
 新しいウインドウがでてくるのでこれも保存する。

- (例) cor.AT999_Ex350_DMSO
 cor.AT999_Ex350_DMSO_Low_10-5 (cor. = correction; 補正)
- 注意;補正データは測定したバンド幅に合うもの、かつ最新のデータを選択する
- (例)励起;Ex_10_Fin_200-850_20180827、蛍光;Em_5_Fin_200-1010_20180827

○励起スペクトルの測定

パラメータで測定モードを「励起」にして、「発光波長」を励起スペクトルを知りたい発光 の波長にする。「終了波長」は「発光波長」より短波長側(−10 nm など)に設定する。 励起スペクトルの補正後の保存の例) cor.AT999_Em430_DMSO

最大吸収波長や最大励起波長で励起すると、短波長側の発光スペクトルの端が切れてしま う場合には、もっと短波長側の光で励起して全体が見られる発光スペクトルも測定すると よい。 注意1: 蛍光測定は非常に高感度であるため、コンタミネーションには十分注意する。用 いるサンプル管などはすべて新品を用い、溶媒は分光分析用のものを用いる。

注意2: 蛍光測定装置の励起光は非常に強いため、光に弱いサンプルは、測定中に退色してしまうことがある。そのため、同じ励起光で繰り返し測定して発光強度に変化がないか、 蛍光測定終了後に再度吸収スペクトルを測定して変化がないか、などに注意を払う。

注意3: 蛍光強度は装置の電源を一旦切るとその前後での比較はできないので、比較した いサンプルをすべて測定し終えるまで電源は切らない。

○測定終了

Ex シャッターと Em シャッターを閉じる。 スペクトル解析及びスペクトル測定画面を閉じる。 スペクトルマネージャーを閉じる。 パソコン電源 OFF 本体電源 OFF 水冷ペルチェ、クールエース OFF 使用記録簿に記入

○データ処理

KaleidaGraph 等で処理するために<u>テキスト形式</u>でデータを取り出す方法 スペクトル解析画面で取り出したいデータを開く ↓ ファイルからエキスポートを選ぶ ↓ 保存先を選択 ↓

取り出したい形式 (テキストやアスキーなど)を選んで、名前をつけて保存。

【エラーメッセージ】

「キセノンランプが発熱しています」

→装置の下にキムワイプなどが入り込んでしまっている可能性あり。取り出す。

相対蛍光量子収率測定法

(「日本分光学会 測定法シリーズ 3 蛍光測定 生物学への応用」p71 を参照)

相対量子収率を求めるには、測定したいサンプルと同じ波長で励起できる蛍光量子収率が 既知の化合物が必要。その際、両化合物(サンプルとリファレンス)とも両端がきれてい ない蛍光スペクトルを得られることが条件。

1. サンプルの吸収スペクトルを測定する(吸光度は 0.5 くらいが望ましい)。

2. 吸光度が 0.05 以下になるようにサンプルを希釈し、吸収スペクトルを測定する。次い で、蛍光スペクトルを測定し、補正をかける。このとき、きれいな山(山の両端がきれて いない)の蛍光スペクトルが得られる波長で励起する。

3. 補正した蛍光スペクトルについて、ツールバーの 「データ処理」→「ピーク処理」→ 「ピーク面積」を開く。バーをスペクトルの山の両端に合わせ、蛍光の面積を求める (P1 欄に表示されている)。





4. 1. で測定した吸収スペクトルから、2. の励起波長の Abs. の値をメモする。ここ までがサンプルに対して行う操作。

5. ここからリファレンス色素の話。リファレンス色素の吸収スペクトルを測定する(吸 光度は 0.5 くらい。溶媒を変更した場合はダーク測定から)。

6. サンプルと同じ希釈率で希釈して、吸収スペクトルを測定する。次いで、サンプルと 同じ波長で励起し、蛍光スペクトルを測定する(測定条件をすべてサンプルと同じにする)。 補正をかける。

7.3.と同様にしてピーク面積を求める。

8. 励起波長の Abs. の値をメモする。

9.式 (1) にあてはめ、相対蛍光量子収率 ϕ_x を計算する (サンプル; x、リファレンス; st)。

$$\phi_x = \phi_{st} \cdot \left(\frac{FA_x}{FA_{st}}\right) \cdot \left(\frac{A_{st}}{A_x}\right) \cdot \left(\frac{I_{ex,st}}{I_{ex,x}}\right) \cdot \left(\frac{n_x^2}{n_{st}^2}\right) \qquad \cdots \quad (1)$$

FA; 蛍光面積、A; 励起波長での吸光度、n; 溶媒の屈折率 Iex; 励起波長での励起光の強度 (サンプルとリファレンスを同じ波長で励起した場合、この 項は 1 とみなせる)