

Version 2.00
January 2017
Part No 900021

LD1/2

酸素電極チャンバー



日本総代理店
旭光通商株式会社
www.kyokko.com

Hansatech
Instruments

LD1/2 酸素電極チャンバー

Hansatech Instruments Ltd

本書の無断転載を禁じます。この著作物のいかなる部分も、出版社の書面による許可なく、複写、録音、録画、情報記憶・検索システムを含むグラフィック、電子、機械的ないかなる形式または手段によっても複製することを禁じます。

目次

パート1 LD1/2 酸素電極チャンバー	4
1 概要	5
LD1/2概要	5
LD1/2特長	5
2 LD1/2設定	6
S1電極ディスクのチャンバー取付け	6
漏れのチェック	6
サンプルの準備	8
リーフチャンバー内の二酸化炭素の維持	9
温度制御	11
温度制御概要	11
液相試料の温度効果	13
電極ディスクの温度影響	13
3 手入れとメンテナンス	14
LD1/2分解	14
LD1/2スペアパーツ	15

LD1/2 酸素電極チャンバー



1 LD1/2 酸素電極チャンバー

1.1 概要

1.1.1 LD1/2 概要

LD1/2型リーフディスク電極チャンバーは、 10cm^2 のリーフディスクを気密チャンバー内に設置し、酸素交換量を測定するためのシンプルな装置です。LD1/2はブラックアセタール製で、アクリル製のトップウィンドウがあり、LH36/2R LED光源(Oxylab電極コントロールユニットに接続した場合)またはLS2高強度白色光源を使って光合成測定用にサンプルを均一に照明することが可能です。

この装置は、主に飽和二酸化炭素での光合成を測定するために設計されました。5%の二酸化炭素では気孔は通常閉じますが、拡散勾配が非常に大きいため、閉じた気孔は二酸化炭素の侵入に対して賢明なバリアとなりません。5%以上の二酸化炭素濃度では、様々な細胞プロセスが阻害される可能性が高くなります。それ以下の濃度では、閉じた気孔が重要になります。アルカリバッファは、気孔閉鎖を引き起こすには低すぎる二酸化炭素の濃度を生成するために使用できますが、ディスクの切断はしばしばこの効果をもたらし、気孔の反応が「正常」になるまでに時間がかかる場合があることに注意ください。

1.1.2 LD1/2 特長



- A: キャストアクリルトップウィンドウ
- B: ウォータージャケット
- C: ウォータージャケットコネクター
- D: リーフチャンバー
- E: S1電極ディスク
- F: ベースリング
- G: 固定用留め具
- H: ガスポート

1.2 LD1/2のセットアップ

1.2.1 電極チャンバーへのS1電極ディスクインストール

電極ディスクをチャンバーに取り付ける前に、電極ディスクは電極の準備セクションに記載されたガイドラインに従って正しく準備されなければなりません。

ディスクが準備され、適切にテストされると、電極チャンバーに設置する準備が整います。

電極チャンバーからベースリングを取り外し、準備した電極ディスクを上部に置きます。

ベースリングとディスクを電極チャンバー本体の下側に差し込み、電極ケーブルの接続部が電極チャンバーのベーススレッドの溝に合うようにします。ベースリングを電極チャンバーにねじ込みながら、ベースを静かに保持し、少しきつい程度に締め込みます。

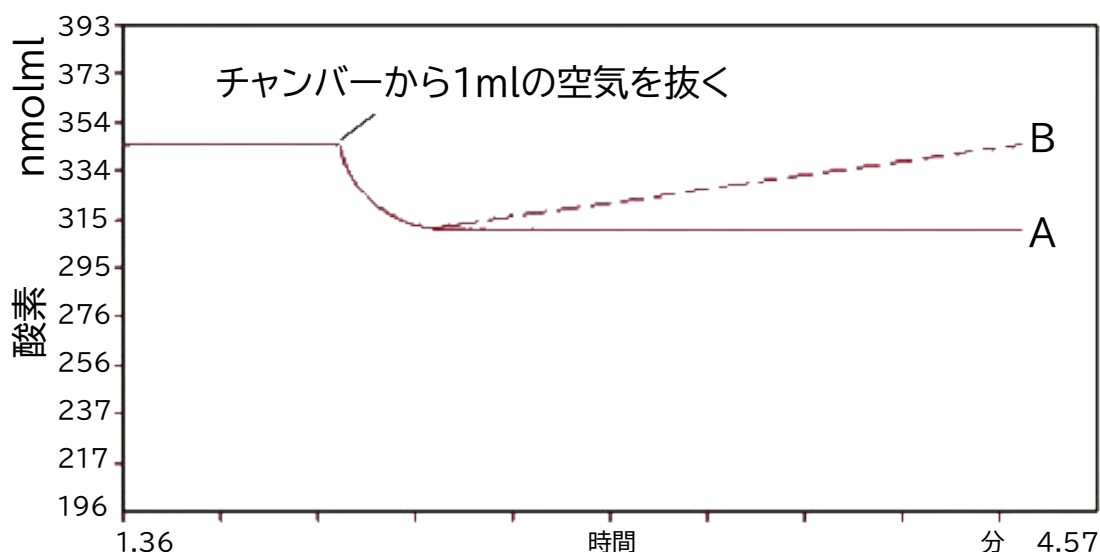
ベースリングを締めすぎると、メンブレンが電極ドームの上に伸びてしまうので、締め過ぎないことが重要です。測定中、膜が緩み始めると、測定信号はドリフトします。

測定前に他の準備をする間、電極の乾燥を防ぐために、電極が分極されたままであることを確認します。

1.2.2 漏れの確認

電極ディスクが安定した信号を出したら、電極の反応を利用して、漏れをテストすることができます。上記のように、電極ディスクを電極チャンバーの底部にはめ込みます。2番目のガスタップが閉じた位置にあることを確認しながら、ガスタイトシリンジを1つのガスタップに挿入してください。シリンジを使用して、チャンバーから空気(通常1ml)を注入または除去します。いずれにせよ、迅速なプラスまたはマイナスの反応が観察され、それ以上のドリフトは検出されないはずです。タップが開いている場合、電極の信号は非常に安定しているはずです。もし、タップが開いているときに過度のドリフトが発生したら、電極はまだ安定していません(最初に電位差電圧を印加したときは、常に多少の下方ドリフトが発生しますが、これが30分以内に無視できる割合に減少しない場合、電極自体の問題を疑う必要があります)。

チャンバーから1mlの空気を抜くと、電極の信号に急速なマイナスの反応が起こります。信号が再び安定すると、それ以上のドリフトは起こりません(下図のA)。徐々に上昇するドリフト(下図のB)は、チャンバー内のリークにより外気が侵入している可能性があります。



タップを閉じた場合、ゲインを上げると必ず多少の下降ドリフトが発生しますが、通常の使用、通常のゲインでは無視できる程度と思われます。これはカソードでの酸素消費に起因するものです。増幅率を下げることで減少させることができますが、感度が低下することはありません (Delieu & Walker, New Phytol. 71, 201-225 (1972))。

電極チャンバーから漏れる場合、唯一考えられる可能性は、電極チャンバーを密閉するための1つ以上のOリングに問題があることです。リングが正しく装着されていないか、または摩耗している可能性があります。また、ガス タップとポートの間のルアー フィットが適切に行われ、気密性があることを確認します。これは、疑わしいタップを取り外し、シリンジをガスポートに直接取り付け漏れのテストを繰り返すことで確認できます。

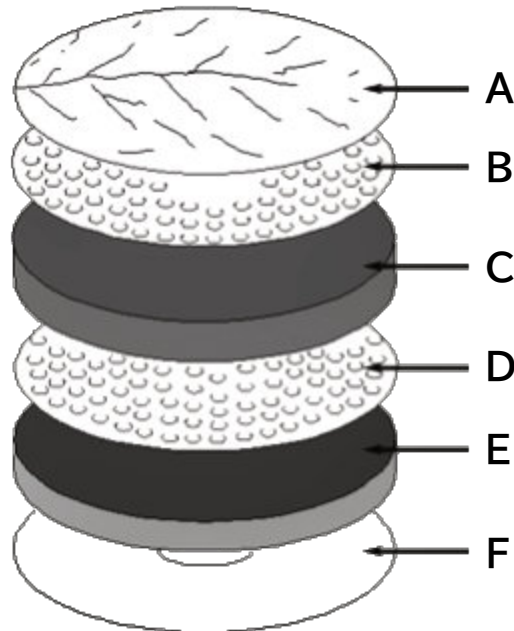
準備された電極ディスクの2つのOリングが所定の位置にあることを確認することも重要です。Oリングをすべて交換してもリークが検出されない場合は、以下の手順で漏れのテストを行ってください。ただし、この方法は最後の手段として使用する必要があることに注意してください。

チャンバー内に数mlの空気を注入し、ガスタップを閉めます。電極接続ケーブルを外し、電極チャンバー全体を水の入ったボウルに沈めます。泡が出ている箇所が漏れの場所を示します。

電極ディスクのコネクタに液体が付着したまま測定するとショートするため、測定前に十分に乾燥させることが重要です。

1.2.3 測定サンプルの準備

通常、10cm² のリーフディスクを付属の円形切断機で切断し、下図のように挟みます。



LD1/2電極チャンバーでは、リーフディスク(A)はサンドイッチ状の材料で支持されています。葉の下には、中央が穴の開いていないステンレスグリッド(B)、キャピラリーマットの層(C)、中央が開いているステンレスグリッド(D)、スポンジスペーサー(E)、電極ディスクに近い位置にあるステンレスワッシャー(F)などがあります。

このため、チャンバーの床から電極ディスクの陰極に発生した酸素を十分に拡散させることができます。中央に穴のあいたステンレス製のワッシャーは、陰極の周囲に配置され、他の層の土台となります。この層は、スポンジスペーサーと重炭酸塩処理されたキャピラリーマット(チャンバー内の二酸化炭素の維持の項を参照)からなり、ステンレス製のグリッドで仕切られています。中心が閉じたステンレス製グリッドは、葉によるガス交換を可能にするため、キャピラリーマットの上に葉のサンプルを支えます。スチールグリッドの中心が閉じられているため、葉を透過した光によって陰極で起こる電気化学反応が阻害されることはありません。

サンドイッチ状のサンプルは、設置ツールを使ってチャンバーに装填されます。層をツールの中心から順番にゆっくりと下ろします。

ステンレス製のディスクカッターを付属しています。葉の裏に柔らかいゴムパッドを当てて使用し、切れ味が悪くならないようにします。カットしたディスクの面積は 10cm^2 です。このディスクの大きさにより、切断された細胞と無傷の細胞の割合は無視できるようになります。サンプルをセットした後、設置ツールはアライメントを乱さないように注意深く取り外す必要があります。チャンバーを密閉するO-リングをサンドイッチの端に付け、チャンバーの上部を下げ、チャンバーの側面にあるクリップで密閉します。 10cm^2 のリーフディスクを使用した場合、葉のサンプルの上面がチャンバーの窓の見える範囲に収まっている必要があります。もしそうでなければ、サンドイッチのアライメントが崩れ、葉の部分をすべて照らすことができなくなります。チャンバーを開け、設置ツールでサンドイッチを再度位置合わせする必要があります。

面積が 10cm^2 以下の小さな試料も電極チャンバーで測定することができます。適切な照明が照射されるために、試料は反応チャンバーの中央に置く必要があります。酸素の測定値を単位面積当たりで正規化できるように、試料を挿入する前に面積を測定しておくことをお勧めします。小さな試料は一般に小さな酸素信号を発生させ、分解能を上げるのが難しいことに注意ください。草本類のような細長い葉を持つ試料でこれを克服する一般的な方法は、多数の葉で 10cm^2 の領域を埋めることです。

1.2.4 チャンバー内の二酸化炭素の保持

光合成では、二酸化炭素が環境から取り除かれ、葉の中で炭水化物に還元されます。気相酸素電極のような密閉系では、光合成が進むにつれて二酸化炭素の濃度は徐々に低下していきます。最終的には、二酸化炭素の利用はサンプル固有の生理機能よりもむしろ、光合成速度を制限することになります。

このようなアーティファクトが現れるまでの時間は、光合成による二酸化炭素の消費速度と、実験開始時に反応チャンバーに封入された二酸化炭素の量といういくつかの要因によって決定されます。標準的な大気条件下では、空気中には体積比で約0.035%の二酸化炭素が含まれています。したがって、空の電極ユニットの反応チャンバーには、約 $245\ \mu\text{l}$ の二酸化炭素が含まれていることになります($0.035\% \times 1000 \times$ 反応室の容積 7ml)。典型的な健康な 10cm^2 のC3リーフディスクは、毎分 $50\ \mu\text{l}$ の二酸化炭素を容易に消費し、4-5分で枯渇する可能性があります(Walker 1987)。

また、一定期間試料が乾燥すると、葉の気孔が閉じ、同化が行われる葉の内部への二酸化炭素の侵入が制限される可能性もあります。周囲の二酸化炭素濃度が高ければ、反応チャンバー内の二酸化炭素の総量が増え、葉に入る二酸化炭素の拡散勾配が大きくなるため、このような問題のリスクは軽減されます。通常、二酸化炭素濃度は、過剰な二酸化炭素が他の細胞プロセスに影響を与える可能性を低減するために、1%のオーダーで使用されます(Walker 1987)。

反応チャンバー内の空気中の二酸化炭素濃度を1%程度まで高めるには、いくつかの方法があります。最も一般的な方法は、反応チャンバーのキャピラリーマットに少量の重炭酸塩バッファーを加えることです。重炭酸塩溶液を25℃付近で等量の空気と平衡化させると、溶液は「HCO₃⁻」と「CO₂」にほぼ90:1の割合で解離します。この情報をもとに、反応チャンバーの容積を1%の二酸化炭素環境にするために必要な重炭酸塩溶液の量を計算することができます。計算方法は次の通りです。

1%二酸化炭素の大気中には、1リットルあたり10mlの二酸化炭素が含まれています。理想気体1モルは25℃で24.45Lの体積を占めるので、25℃の理想気体10mlには1 / (24.45 × 1000 × 10) すなわち0.409ミリモルが含まれることになり、1%の大気中の二酸化炭素の濃度は0.409mMとなります。炭酸水素は90:1の割合で解離するので、90倍の濃度の炭酸水素溶液は1%の二酸化炭素を発生させるために解離することになります。そのときの濃度は90×0.409で36.81mMとなります。

LD1/2電極の反応チャンバーでは、毛細管マットは通常2～3滴の重炭酸塩溶液(0.2ml)で処理され、より大量の空気(7ml)で平衡化されます。従って、重炭酸塩溶液の濃度は適当な倍率(7 / 0.2 または35倍)でスケールアップする必要があります。その結果、通常1Mの炭酸水素塩溶液を2～3滴滴下すれば、反応室内を1%の二酸化炭素雰囲気にすることができます。

炭酸水素ナトリウムまたは炭酸水素カリウムがよく使われます。モル溶液は、84.01 GL-1 炭酸水素ナトリウムまたは100.12 GL-1 炭酸水素カリウムを含んでいます。

炭酸ガス濃度は、純シリンダーガスを決められた濃度で混合することで、より精密に制御することができます。あらかじめ混合された「特殊」ガスをオーダーメイドで購入したり、純酸素、窒素、二酸化炭素のシリンダーガスをマスフローコントロールバルブやWöstoffポンプを使って決められた比率で混合したりすることができます。このような混合ガスの二酸化炭素濃度は、赤外線ガス分析器(IRGA)を使って確認することができます。正確な要件に合わせて調整することができます。この混合ガスをLD1/2チャンバーに流し、両タップを開いて大気圧を置換することができます。

同一サンプルで複数の実験プロトコルを連続して行う場合、または光合成の速度が速い実験を行う場合、反応チャンバー内の1%炭酸ガス環境の炭酸ガス含有量が不足する可能性があります。1%を超える二酸化炭素濃度の使用は、他の細胞プロセスに対する二酸化炭素の上昇効果によって引き起こされるアーティファクトのリスクにより、推奨されません。従って、プロトコル中にチャンバー内の二酸化炭素の再充填が必要になることがあります。その場合、両方のタップを開いて反応チャンバーの密閉を解除し、二酸化炭素を含んだ空気をチャンバーに流し、二酸化炭素が減少した空気と入れ替えることにより行われます。理想的には、チャンバーの空気と同じ程度に加温・加湿された既知のガス組成で行うことを推奨します。しかし、ガス混合装置がない場合は、呼吸をチャンバーに通して二酸化炭素濃度を高めることができます。

チャンバー内を流れる空気は、チャンバーの温度にあらかじめ平衡化されている必要があります。これは、チャンバー温度を制御する循環水槽に収納された密閉されたチャンバーに呼気を吹き込むことで行われます。シリンジを介して、LDチャンバーに空気を送り込みます。シリンジをタップから外した後、チャンバー内の気圧が上昇していないことを確認するために、数秒間タップを開いたままにすることが重要です。

クラーク型酸素電極は、炭酸ガスが存在すると、通常、電解液中に重炭酸塩が発生します。これは、酸素が還元されるときに陰極で水酸化イオンが生成され、これが膜を通して拡散する二酸化炭素と反応するためです。ある状況下では(例えば、チャンバー内の二酸化炭素の分圧が高く、陰極での酸素消費量が少ない場合(チャンバー内で酸素が発生しない場合)、二酸化炭素の侵入が水酸化イオンの生成を上回り、電解液が酸性になります。その結果、残留電流が上昇し、特に電極が最大感度で使用されている場合、かなりの人工信号が記録されることがあります。この擬似信号は時間とともに増加し、電極の過去の履歴によって変化するため、極端な場合には装置が使用不能になることもあります。

1.2.5 温度制御

1.2.5.1 温度制御概要

すべての実験法には、試料が酸素を発生または消費するのに最も効率的となる最適温度があり、この実験温度が実験期間中常に維持されることが重要です。つまり、実験中に反応容器に添加するものは、添加前に実験温度であらかじめ平衡化されている必要があります。

G.A. Truesdale と A.L. Downing の研究(The solubility of oxygen in water, 1954, Nature 173: 1236)によると、任意の温度と大気圧において、空気飽和脱イオン水の溶存酸素濃度は既知であり、数学的に計算することが可能です。

液体中の酸素濃度は温度の上昇に伴い減少するため、実験開始前に試料と添加物の両方について測定温度を設定することが重要です。しかし、この効果に加えて、酸素電極のディスク自体も温度に対して敏感です。

電極ディスクの信号は、温度の上昇に伴い増加します。高温を使用する実験(ミトコンドリア呼吸研究など)では、キャリブレーションや測定を行う前に、ディスクを実験温度に完全に平衡化させることをお勧めします。これには最大15分かかることがあります。

したがって、液相系だけでなく、気相系も同様に温度変動の影響を受けやすくなっています。

測定温度は、指定された温度で装置がキャリブレーションされるため、実験の初期検討事項の一つとして決定する必要があります。

Oxythermペルチェチャンバーを除き、他のすべての液相および気相電極チャンバーは、反応/試料容器を包むウォータージャケットを介して試料とディスクの温度制御を行います。液相系では、容器はホウケイ酸ガラスで構成され、循環水と試料間の効率的な熱伝達を可能にし、効果的な温度制御を維持します。

気相電極チャンバーでは、試料は石英窓で循環水と分離され、効果的な熱伝導が行われます。

ウォータージャケットは、付属のプラスチックコネクタを使用して、温度調節された循環水槽からのフローチューブおよびリターンチューブに接続する必要があります。

DW1、DW1/AD、DW3電極チャンバーでは、フローチューブを下部ウォータージャケットコネクタへ、リターンチューブを上部ウォータージャケットコネクタに接続してください。これにより、常に新鮮な水がDW1ウォータージャケットの周囲を流れ、気泡を分散させ、上部の出口ポートへ自然に上昇するようになります。他の電極チャンバーでは、ウォータージャケットのコネクターは同一平面上にあるので、フロー/リターンチューブはどちらのコネクターにも接続することができます。

循環器と電極チャンバー間の配管は、良好な温度制御を維持するため、最小限の長さにする必要があります。6リットル/分以上の流量を供給できるサーキュレータを推奨します。

ウォータージャケットは、循環する空気だけで温度を制御する多くのシステムよりも、より効果的に試料温度を制御することができますが、それらと同様に、大きな赤外線成分を含む光によってチャンバー内で発生する熱を急速に放散させることはできません。

したがって、光源を使用する場合は、適切なフィルター（水、硫酸銅溶液、干渉フィルター、熱反射ミラーなど）を使用する必要があります。もちろん、加熱せずに光を飽和させることは非常に難しいですが、電極自体がわずかな温度変化にも反応するため、どのような光フィルターシステムを採用しても、その効果を容易に確認することができます。

ハンザテックLS2や生産終了のFLS1などのハロゲン白色光源は、かなりの熱量を発生します。これらの光源には、光源による発熱を抑えるために赤外線低減ホットミラーフィルターが装着されていました。

現在ハンザテックが販売している光源はすべてLEDを使用しており、熱の発生を大幅に抑えています。

1.2.5.2 液相試料の温度効果

G.A. TruesdaleとA.L. Downingの研究(The solubility of oxygen in water,1954, Nature 173: 1236)によると、任意の温度と大気圧において、空気飽和、脱イオン化水は、数学的に計算できる既知の濃度の溶存酸素を含んでいます。

このデータは、Truesdale & Downing (Nature 173:1236, 1954)が発表した所定の温度と標準大気圧における水中の溶存酸素の測定値に基づいています。

温度(°C)	酸素(PPM)	酸素(nmol/ml)
0	14.16	442.5
5	12.37	386.6
10	10.92	341.3
15	9.76	305
20	8.84	276.3
25	8.11	253.4
30	7.52	235
35	7.02	219.4

表中の酸素値の計算式は以下の通りです。

$$C_s = 14.16 - (0.394 * T) + (0.007714 * T^2) - (0.0000646 * T^3)$$

(ここで、 C_s は酸素飽和濃度(ppm)、 T は温度(°C)です)

1ppmは、

1 $\mu\text{g/ml}$ または $(1\mu\text{g}/32\text{g/mol}) = 0.03125 \mu\text{mol/ml}$ または 31.25 nmol/ml
に相当します。

1.2.5.3 電極ディスクに対する温度の影響

電極ディスクからの信号は温度の上昇とともに増加します。したがって、電極ディスクからの応答は、温度が異なると酸素信号の応答と逆になります。高温を使用するアッセイ(ミトコンドリア呼吸研究など)では、キャリブレーションや測定を行う前に、ディスクをアッセイ温度に完全に平衡化することを推奨します。これは最大で15分かかることがあり、以下のように観察することができます。

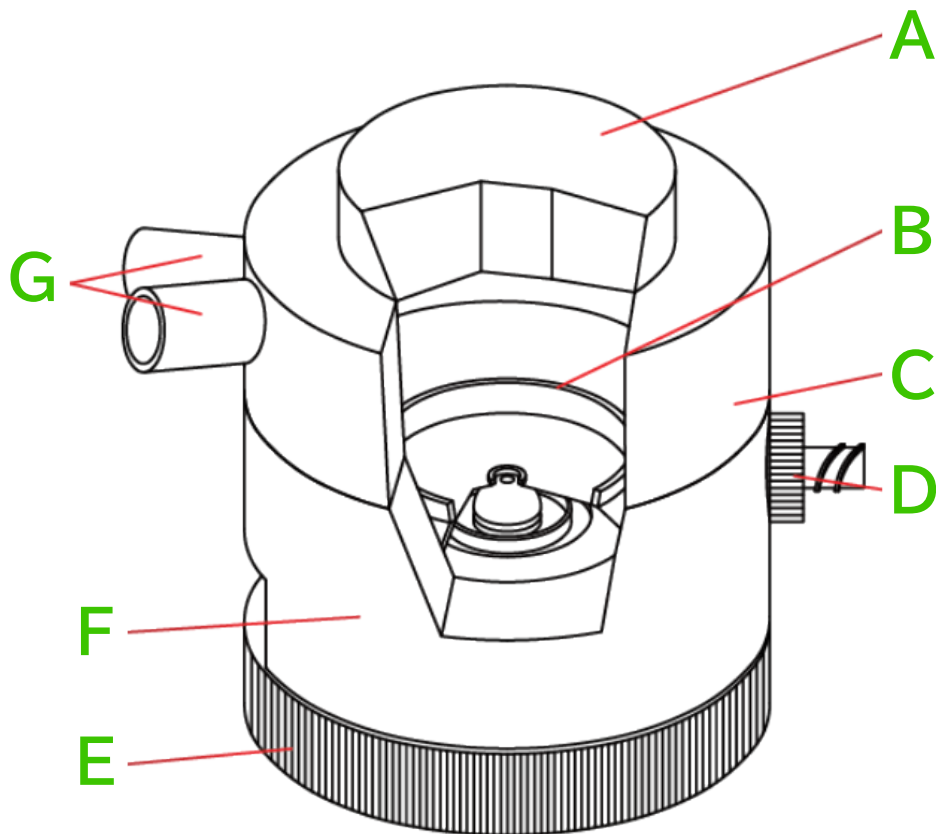
- 電極ディスクを準備し、電極チャンバーの底部に正しく取り付けます。液相チャンバーの場合は、実験温度にあらかじめ平衡化された空気飽和脱イオン水(1ml)をチャンバーに加え、攪拌する。
- 電極チャンバーのウォータージャケットを循環水槽に接続します(詳細については、温度制御の設定セクションを参照)。
- 測定を開始し、酸素信号を観察する。
実験温度が高い場合(例:32°C)、電極ディスクの温度感受性のため、電極ディスクからの信号が最初は上昇します。
- 電極ディスクが温度と平衡し始めると、試料への高温の影響が逆効果となり、信号が減少し始めます。
- ディスクからの信号が再び安定すると、ディスクは測定温度に平衡化され、キャリブレーションを行うことができます。

1.3 お手入れとメンテナンス

1.3.1 LD1/2の分解

LD1/2のアクリル製トップウィンドウは、ネジを外すだけでウォータージャケットの内部を洗浄することができます。パースペックス(プレキシガラス)製のトップウィンドウを希釈されていないエタノールやアセトンなどにさらさないように注意してください。リーフチャンバーとトップセクションの石英ガラス窓をシールしている大きなOリングは、時々状態を確認し、必要であれば交換する必要があることに注意してください。このOリングが劣化するとリーフチャンバーが正しく密閉されず、信号のドリフトが発生する可能性があります。

1.3.2 LD1/2 スペアパーツ



- A: トップウィンドウ
部品番号 820051
- B: スペアOリング
部品番号 S8B
- C: ウォータージャケット
部品番号 941000
- D: ガスポート
部品番号 820055
- E: ベースリング
部品番号 820054
- F: リーフチャンバー
部品番号 941001
- G: ウォータージャケットコネクターソケット&プラグ
部品番号 890123、890124
- 電極ディスク
部品番号:S1
- 石英窓ウォータージャケット
部品番号 885201
- 予備Oリング
部品番号 S8B
- サンプルサポート
部品番号 S14
- ガスタップ&シリンジ
部品番号 S15
- リーフカッター
部品番号 941002
- リーフアライメントツール
部品番号 941003

サポート情報

ハンザテック製品をご購入いただいたお客様には、継続的なサポートと迅速で効率的な対応をお約束します。

ハンザテック製品はすべて、製造上の欠陥や素材の欠陥に対して、出荷から12ヶ月間保証されています。ただし、誤用や不正な修理による損傷は保証の対象外です。

機器に問題が発生した場合は、旭光通商にご相談ください。保証期間内であれば、修理や交換に対応いたします。

保証期間中の部品代、工賃は無料ですが、通関料、返送料は必要に応じて請求させていただく場合があります。

保証期間外の修理についても、旭光通商までご連絡いただき、費用の見積もりと返送方法についてご相談ください。

Hansatech
Instruments

日本総代理店
旭光通商株式会社
www.kyokko.com