

GE Healthcare
Life Sciences

AKTAprime 사용자 설명서



GE Healthcare
Life Sciences KOREA
Version 1.0 ©2015

목차

1. 시스템의 구성.....	3
1.1 Introduction	3
1.2 Description and flow path	3
2. 시스템의 시작.....	5
2.1 On/Off	5
2.2 Main menu overview	5
2.3 Operating the user interface	5
3. 시스템의 준비.....	6
3.1 pump purge (purge : 기포 제거).....	6
3.2 Preparing the system for a run	6
4. 컬럼 연결 및 샘플 loading	8
4.1 Columns and tubing	8
4.2 Sample application overview.....	8
4.3 Injection valve mode	9
5. Method 작성 및 실행	10
5.1 Introduction	10
5.2 During a run.....	11
5.3 Running a method template	11
5.4 Running a stored method	12
5.5 Running the system manually	12
5.6 Template description	13
5.6.1 Application templates.....	13
5.6.2 Method templates	13
6. 시스템 유지관리.....	14
6.1 Periodic maintenance	14
6.2 Cleaning the system	15
6.3 Cleaning the UV flow cell in-place & off-line	15
6.4 Cleaning the conductivity flow cell off-line.....	15

1. 시스템의 구성

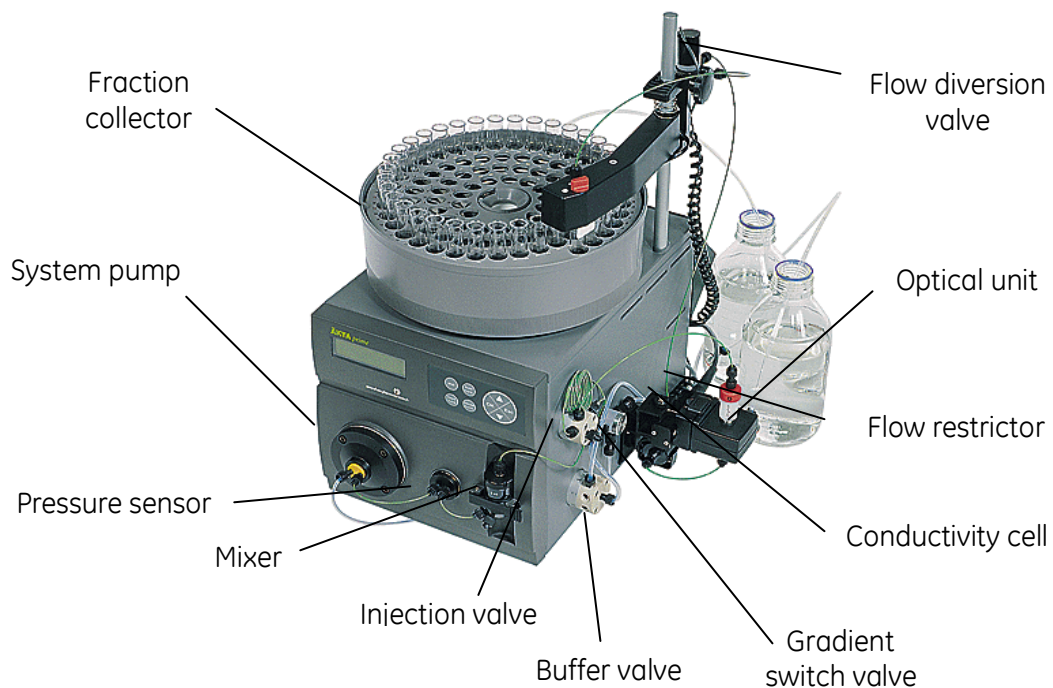
1.1 Introduction

AKTAprime은 compact한 automated liquid chromatography system이며, UV, conductivity를 측정하고, gradient를 생성하고, fraction을 모으는 구성품들을 포함하는 "one-box" system입니다. 앞쪽 panel에 있는 user interface는 LCD display와 membrane push button으로 구성되어 있으며, pH 측정을 위한 probe는 option으로 제공합니다.

AKTAprime은 다음과 같은 특징점을 갖습니다.

- ① Easy unpacking and installation
- ② **Application templates** ready to use
- ③ **Method templates** as a basis for creating customized methods
- ④ Cue cards for simple and quick operation
- ⑤ **Flow rates up to 50ml/min and pressures up to 1 MPa**
- ⑥ High accuracy and reproducibility

1.2 Description and flow path



[Figure 1. AKTAprime의 각 구성 요소]

① **Buffer valve and gradient switch valve**

Buffer valve는 사용할 buffer solution 선택할 경우 A1~A8까지 사용가능하며, large sample volume 을 사용할 경우 Sample pump로써도 적용이 됩니다 (A8).

Gradient switch valve는 Binding buffer와 elution buffer의 gradient를 만들 때 사용합니다.

② **System pump**

System pump는 system을 통하여 sample 또는 buffer solution을 pumping 할 때 사용합니다.

③ **Pressure sensor**

Liquid pressure가 on-line으로 측정이 됩니다.

④ **Mixer**

Binary gradient로 mixing할 때 사용합니다.

⑤ **Injection valve**

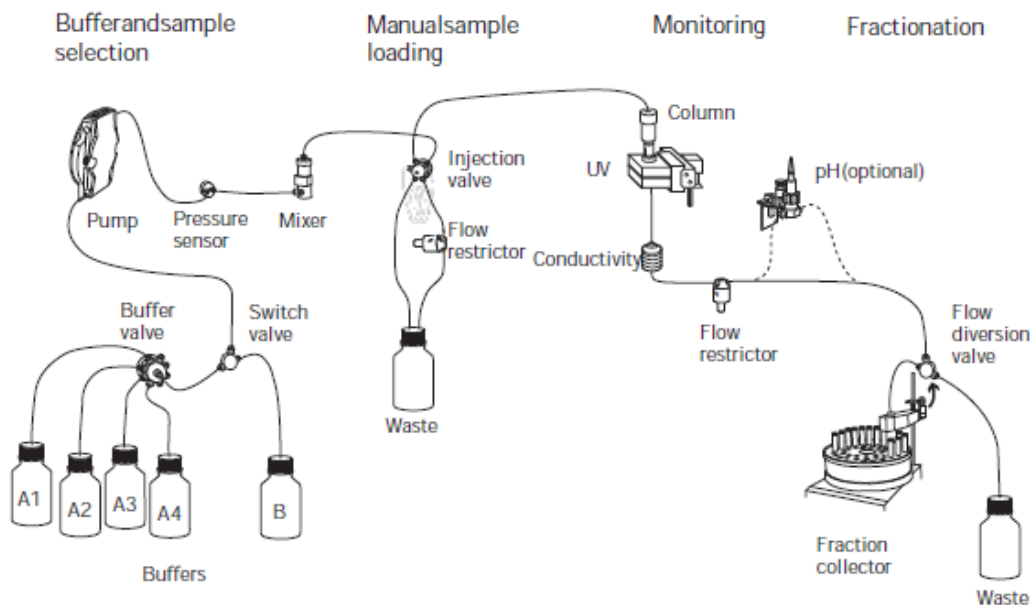
Sample을 sample loop or superloop에 loading하고, column에 injection 할 때 사용합니다.

⑥ **Monitor(UV and Conductivity)**

Sample의 UV absorption와 liquid의 conductivity, pH (optional)를 측정합니다.

⑦ **Fraction collector with flow diversion vlave**

Fraction collector는 tube에 sample fraction을 모을 때 사용하며, Flow diversion valve는 waste와 collection tube 사이의 flow를 바꾸는데 사용합니다.



[Figure 2. AKTAprime의 flow path 모식도]

2. 시스템의 시작

2.1 On/Off

- ① System의 main switch를 on 한다. System은 self-test를 합니다.
- ② Self-test 동안, 몇 가지 message (system name, software version number) 가 display에 표시 됩니다.
- ③ Self-test는 30-40초 정도 소요되며, 완료가 되면 display에 Templates menu가 나타납니다.

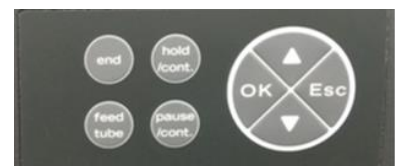
2.2 Main menu overview

- ① **Template**
self-test 후 start-up시 나타나며, Pre-made된 application templates와 method templates를 running할 때 사용합니다.
- ② **Run Stored Method**
User에 의해 작성된 method를 running 할 때 사용합니다.
- ③ **Manual Run**
Method를 사용하지 않고, manual로 system을 running할 때 사용합니다.
- ④ **Program Method**
사용자가 원하는 method를 작성할 때 사용합니다.
- ⑤ **Copy Method**
AKTAPrime 기기에 저장된 method를 PC로 복사할 때 혹은 PC에 저장된method를 AKTAPrime으로 복사할 때 사용합니다.
- ⑥ **Set parameters**
UV, conductivity, pH, temperature를 측정하기 위한 parameter를 setting 할 때 사용합니다.
- ⑦ **Check**
Pump run time, lamp intensity 등의 system parameter를 check할 때 시용합니다.

2.3 Operating the user interface

① Menu navigation

- ◇ ▲▼: Menu를 선택하기 위해서 ▲ 또는 ▼를 누릅니다.
- ◇ OK: Sub menu로 들어가기 위해서 OK를 누릅니다.
- ◇ Esc: 상위 menu로 돌아가기 위해서는 Esc를 누릅니다.



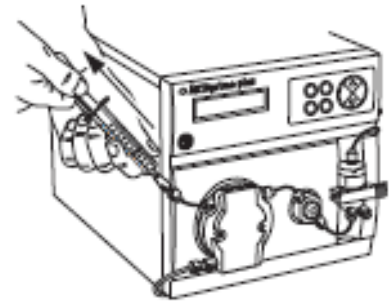
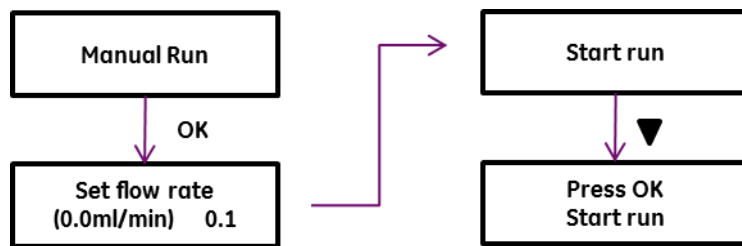
② Control keys

- ◇ **Feed tube** : fraction collector를 한 position 진행시킬 때 feed tube를 누릅니다.
- ◇ **End** : 진행되는 method operation 을 끝낼 때 end를 누릅니다. Manual operation을 stop할 때 end를 누릅니다.
- ◇ **Hold/Cont** : Method time 또는 volume을 hold하거나 현재의 농도에서 gradient를 hold할 때 hold/cont를 누르게 되면 Pump와 fraction collector는 계속 진행이 됩니다.
- ◇ **Pause/Cont** : Method를 끝내지 않고 모든 operation을 pause할 때 pause/cont를 누르게 되면 Pump와 fraction collector를 포함한 모든 기능이 멈춥니다.

3. 시스템의 준비

3.1 pump purge (purge : 기포 제거)

펌프 좌측 위의 stop plug를 제거하고 purging kit를 연결한 후 주사기를 천천히 당기면서 펌프에 있는 Air를 제거합니다. Manual run을 통해 0.1ml/min으로 설정 후 천천히 주사기를 당기면서 진행합니다.

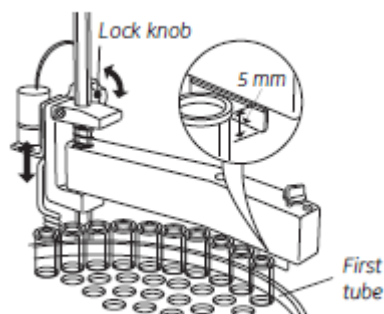


빠른 속도로 퍼지를 하면 오히려 기포가 발생할 수도 있으니 천천히 주사기를 당기면서 진행합니다. A Line과 B Line 각각 15ml 정도 진행을 합니다.

3.2 Preparing the system for a run

일반적인 방법으로 buffer, sample 그리고 fraction을 받을 준비는 다음과 같이 진행합니다.

- ① Buffer inlet tubing A1과 B를 binding buffer와 elution buffer에 꽂아 둡니다. Tubing이 ethanol로 채워져 있으면, 증류수에 담근 후 증류수로 모두 washing 후 각 버퍼에 넣습니다.
- ② Flow diversion valve의 waste tubing을 waste bottle에 둡니다.
- ③ Injection valve의 port 4, 5 waste tubing을 waste bottle에 둡니다.
- ④ pH electrode를 calibration 합니다 (optional).
- ⑤ Injection valve의 port 1과 UV flow cell 사이에 column을 연결합니다.
- ⑥ Fraction collector에 충분한 tube를 준비하고, first tube에 arm을 위치합니다.



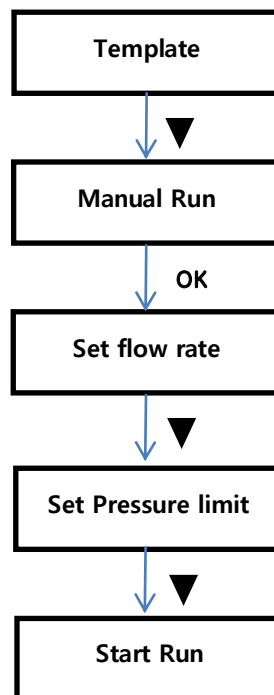
- ⑦ Injection valve의 port 2와 6 사이에 sample loop을 연결합니다.
- ⑧ System pump를 manual로 작동하여, inlet tubing을 liquid로 채웁니다..
Liquid를 30 ml/min로 pumping하고, injection valve는 waste position으로 둡니다.
- ⑨ Inlet tubing B를 채울 때는 **Set Concentration %B** menu에서 100%로 입력합니다.
- ⑩ 채워진 flowpath에서 trapped air bubble을 제거하기 위해서purging 합니다.
- ⑪ Injection valve의 port 3에 union luer female/ 1/16" male 또는 injection fill port를 연결합니다.

4. 컬럼 연결 및 샘플 loading

4.1 Columns and tubing

Ion exchange, gel filtration, hydrophobic interaction, affinity chromatography에 사용되는 다양한 pre-packed column을 AKTApriime에 사용할 수 있으며, 기본적으로 System은 pump부터 outlet까지는 0.75mm i.d. tubing, waste tubing은 1.0mm i.d. tubing으로 연결이 되어 있습니다.

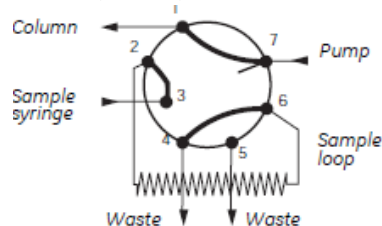
- ① 먼저 컬럼을 연결하기 위해 flow와 alarm pressure를 입력합니다.
*Flow는 0.5ml/ min, alarm pressure는 사용하고자 하는 column에 따라 다르므로 컬럼 사용자 설명서를 참고합니다.
- ② Column에 공기가 들어가지 않도록 drop-to drop방법으로 연결을 합니다.
- ③ 장비와 column이 연결이 되면 end 버튼을 눌러 기기 작동을 멈춥니다.
*단, column에 에탄올이 충전되어 있는 경우는 3차 증류수로 치환 후 사용합니다.



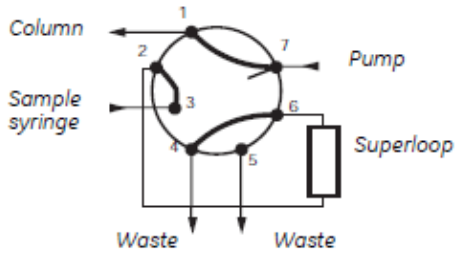
4.2 Sample application overview

Sample은 다음 의 3가지 방법으로 application이 가능합니다.

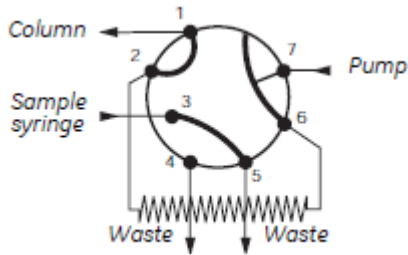
- ① **Sample loops, filled manually with a syringe**



② Superloop, filled manually with a syringe



③ The system pump for large sample volumes (Buffer valve A8사용)

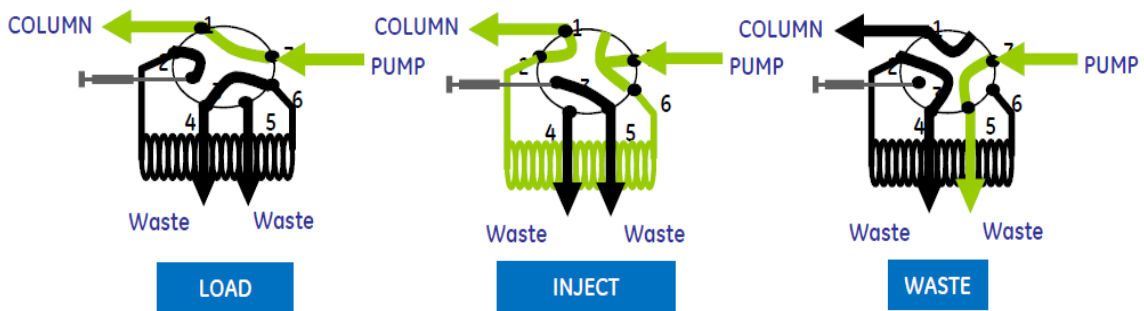


적용할 sample volume에 따라서 적합한 technique을 선택하시면 됩니다.

Sample application technique	Volume to inject
① Sample loop, manual filling	25 ul – 5 ml
② Superloop, manual filling	1 ml – 150 ml
③ System pump	> 10 ml

4.3 Injection valve mode

Port가 7개로 구성되어 있는 밸브이며, 포지션은 3개입니다.



① Load

Default position으로 버퍼는 펌프로부터 컬럼으로 흐릅니다. Sampleloop에 Sample을 loading 하는 포지션입니다.

② Inject

버퍼는 펌프로부터 Sampleloop를 다니며 컬럼에 흐른다. Column에 Sample을 첨가하는 포지션이다

③ Waste

펌프로부터 기존에 채워져 있던 buffer를 새로운 buffer로 교환하기 위한 포지션입니다. Pump wash를 작동시키면, 자동적으로 이 포지션으로 바뀌게 됩니다.

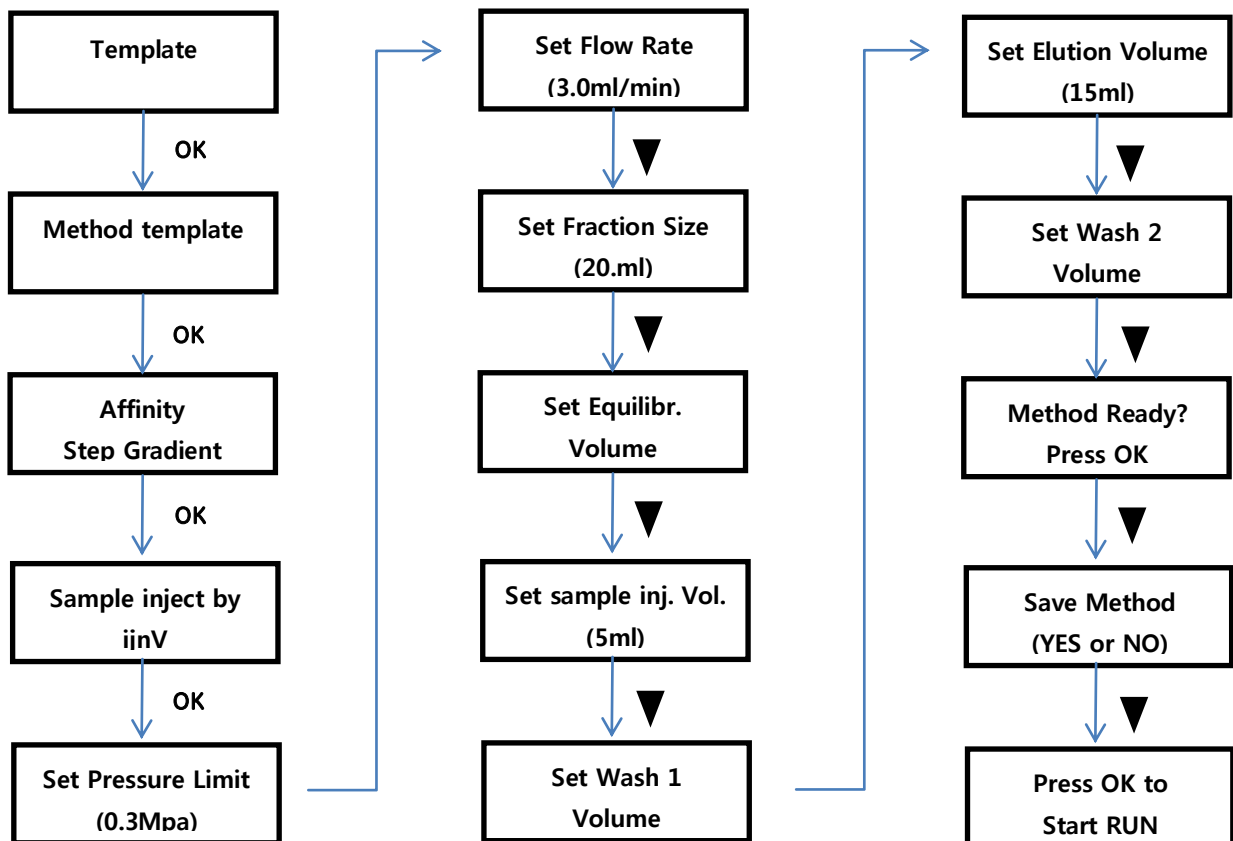
5. Method 작성 및 실행

5.1 Introduction

AKTApriime은 pre-made template 또는 method를 사용하거나, manual로 system을 running할 수 있습니다. 다음 4 가지의 running option 들을 이용할 수 있습니다.

- ① **Application templates**
가장 자주 사용되는 purification의 template 입니다. 이들 template는 sample volume만 입력하면 되고, 나머지 모든 parameter는 preset 되어 있습니다.
- ② **Method templates**
공통으로 사용되는 purification technique에 대한 template 이며, 이들 template는 flow rate, elution volume 같은 다양한 parameters를 입력할 수 있습니다.
- ③ **Stored methods**
사용자에 의해서 작성되고, 저장된 method 입니다.
- ④ **Manual run**
Pre-programmed template 또는 method를 사용하지 않고, 사용자가 manual로 system을 running 할 수 있습니다.

예를 들어서 Method templates 중 affinity step gradient elution를 사용하여 Method를 작성해보면 아래와 같습니다.



5.2 During a run

① Viewing Progress

② Running display

진행되는 running 상태는 앞쪽의 display에 나타난다. Run data는 4개의 display로 나누어 볼 수 있으며, ▲ 또는 ▼를 눌러서 원하는 running display를 선택합니다.

③ Running display1

method number 또는 type (M = manual run, AT = application template, MT = method template), running mode 표시, 경과된 method volume 또는 time, 현재의 flow rate와 pressure가 나타납니다.

④ Running display 2

UV absorbance 값, buffer B의 농도와 pH, 실제 conductivity 값이 나타납니다.

⑤ Running display 3

percentage의 conductivity 값, 현재의 온도, tube number, fraction size가 나타납니다.

⑥ Running display 4

waste valve, buffer valve, injection valve의 position이 나타납니다.

⑦ Changing Parameters

Run 동안, process parameter의 몇몇은 바꿀 수 있다. 이들 parameter 중 gradient를 제외하고 run동안 언제든지 바꿀 수 있습니다. uffer B의 농도, 유속, fraction size, buffer valve position, injection valve position, autozero, event mark 등의 parameter를 바꿀 수 있습니다.

⑧ Interrupting a run

Run을 중단할 때는 다음의 3 가지 방법이 있습니다.

- 1) **end button**을 누릅니다. **End method**라는 prompt가 나타나면, **y**를 입력하고, **OK**를 누릅니다.
- 2) **pause/cont. button**을 누릅니다. Pump는 stop되고 set flow rate와 gradient 값은 유지됩니다.
- 3) **hold/cont. button**을 누릅니다. 현재의 gradient 값으로 유지되며, pump는 run을 계속합니다.

5.3 Running a method template

AKTAprime system은 공통으로 사용하는 purification technique에 대한 4 개의 method template를 포함합니다. Method template를 사용할 때는 몇몇 parameter를 setting 해야 합니다.

① Selecting method template

- 1) Main menu Templates를 선택하고, **OK**를 누릅니다.
- 2) Sub menu Method template를 선택하고, **OK**를 누릅니다.
- 3) 원하는 template를 선택하고, **OK**를 누릅니다.

② Setting the parameters

- 1) Sample injection 방법을 선택합니다.
- 2) 압력 limit를 정하고, **OK**를 누릅니다.

- 3) 유속을 정하고, **OK**를 누릅니다.
 - 4) Fraction size를 정하고, **OK**를 누릅니다.
 - 5) Equilibration volume을 정하고, **OK**를 누릅니다.
 - 6) Injection 할 sample volume을 정하고, **OK**를 누릅니다.
 - 7) Wash 1 volume을 정하고, **OK**를 누릅니다.
 - 8) 이 setting은 gel filtration method template에는 적용되지 않습니다.
 - 9) Elution volume을 정하고, **OK**를 누릅니다.
 - 10) Wash 2 volume을 정하고, **OK**를 누릅니다.
 - 11) 이 setting은 gel filtration method template에는 적용되지 않습니다.
 - 12) Method ready prompt에서 **yes**를 선택하고, **OK**를 누릅니다.
- ③ **Storing the method**
- 1) Method를 저장할 때, **yes**를 선택하고 **OK**를 누릅니다.
 - 2) 그렇지 않으면 **no**를 선택하고, **OK**를 누릅니다.
 - 3) Method number를 선택하고 **OK**를 누르면, method가 저장됩니다.
- ④ **Starting the run** → Press OK to start run prompt에서 **OK**를 누르면, run이 시작됩니다.
- ⑤ **Finishing the run** → Run을 끝내기 위해서 Method Complete prompt에서 **OK**를 누릅니다.

5.4 Running a stored method

AKTApriime system은 40 개의 programmed method를 저장할 수 있습니다. Method는 method template 또는 line-by-line programming을 사용하여 작성할 수 있습니다.

- ① **Selecting a stored method**
 - 1) system을 준비합니다.
 - 2) Main menu에서 **Run Stored Method**를 선택하고, **OK**를 누릅니다.
 - 3) Method number를 선택하고, **OK**를 누릅니다.
- ② **Starting the run**
 - 1) Run을 시작하려면, Press OK to start run prompt에서 **OK**를 누릅니다.
 - 2) Run 동안, 중요한 parameter 값은 보여지며 또한 recorder로 print 됩니다.
 - 3) 몇몇 parameter setting 들은 run 동안 바꿀 수 있습니다.
- ③ **Finishing the run** → Run 을 끝내기 위해서 Method Complete prompt에서 **OK**를 누릅니다. Method가 끝나기 전에 run을 중지하려면, **End**를 누릅니다.

5.5 Running the system manually

Preprogrammed method 또는 template를 사용하지 않고 manual로 AKTApriime system을 run하려면, 다음과 같이 수행합니다.

- ① **Preparing a manual run**
 - 1) 일반적인 system 준비를 합니다.

- 2) Main menu에서 **Manual Run**을 선택하고, **OK**를 누릅니다.
- ② **Setting the parameters**
- 1) Menu 선택은 ▲▼ key를 선택하고, 원하는 parameter를 setting 합니다.
- 2) Method base, %B concentration, gradient, flow rate, fraction base, fraction size, pressure limit, Buffer valve position, injection valve position 등을 setting 합니다.
- ③ **Starting the run** → Run을 시작하기 위해서 Press OK to start run에서 **OK**를 누릅니다.
- ④ **During the run** → Run 동안, 중요한 parameter 값은 보여지며 Gradient를 제외한 parameter 값들은 manual run 동안 언제든지 바꿀 수 있습니다. Auto-zero 또는 Event mark의 recorder 기능도 가능합니다.
- ⑤ **Finishing the run** → Run 을 끝내기 위해서 Method Complete prompt에서 **OK**를 누릅니다. Method가 끝나기 전에 run을 중지하려면, **End**를 누릅니다.

5.6 Template description

Template는 2 개의 category로 나눌 수 있습니다.

- **Application templates** → Sample volume만 입력하면, 사용할 준비가 됩니다.
- **Method templates** → Flow rate, elution volume, equilibration volume 같은 많은 parameters를 입력해야 하며, 여기서 만든 method는 system에 저장할 수 있습니다.

5.6.1 Application templates

System washing과 priming을 수행하는 System Wash Method template를 포함합니다.

다음과 같은 application template를 제공합니다.

- ◇ **Desalting**
- ◇ **Purification of His-tagged proteins**
- ◇ **Purification of GST-tagged proteins**
- ◇ **Purification of monoclonal antibodies**
- ◇ **IgM purification**
- ◇ **Removal of albumin**
- ◇ **Protein renaturation on column**
- ◇ **Anion exchange**
- ◇ **Cation exchange**

5.6.2 Method templates

4 개의 가장 공통적인 purification techniques을 위한 templates를 제공합니다.

- ◇ **Gel filtration / buffer exchange**
- ◇ **Ion exchange gradient elution**
- ◇ **(HIC)Hydrophobic interaction chromatography gradient elution**
- ◇ **Affinity step gradien**

6. 시스템 유지관리

6.1 Periodic maintenance

Interval		Actions
Every day	System	<ul style="list-style-type: none"> * Eluent의 leakage가 없는지 시스템을 점검합니다. * 2-3일 동안 system을 사용하지 않을 경우는 증류수로 모든 flow path를 washing 한 후 20% ethanol로 채워두고 Column 과 pH electrode는 제거합니다. 모든 tubing과 flow path가 rinsing 되었는지를 확인합니다.
	System pump	<ul style="list-style-type: none"> * Leakage를 확인합니다. Pump로 부터 leakage가 있을 경우는 tubing connection을 확인합니다. * Pressure pulsation 이나 불규칙적인 이상이 발견되면, system을 96% ethanol 로 washing 하고 증류수로 다시 washing 합니다.
	PH electrode (optional)	<ul style="list-style-type: none"> * pH electrode를 calibration 합니다.
Every week	Inlet filters	<ul style="list-style-type: none"> * Inlet filter를 check 하고, 필요 시 교체합니다.
Every month	Monitor	<ul style="list-style-type: none"> * Section 7.4에 따라 monitor를 check 합니다.
	Flow Restrictor	<ul style="list-style-type: none"> * Flow restrictor가 다음의 back-pressure가 생성되는지를 Check (0.2 ± 0.05 MPa)합니다.
Every 6 months	Monitor	<ul style="list-style-type: none"> * Section 7.9 와 7.10에 따라서 UV flow cell을 cleaning 합니다.
	Fraction Collector	<ul style="list-style-type: none"> * Tube rack에 drive sleeve를 check 하고, 필요 시 교환합니다. * Section 7.6에 따라서 tube shift의 number를 check 합니다.
	Superloop	<ul style="list-style-type: none"> * 위, 아래, moveable seal O-ring의 상태를 check 하고, 필요 시 교환 합니다. * Bottom end piece가 깨끗한지 damage가 없는지 check 합니다.
	Mixer	<ul style="list-style-type: none"> * Mixer chamber가 깨끗한지 damage가 없는지 check 합니다. * Tubing connector도 check 합니다.
Yearly	Injection valve and Buffer valve	<ul style="list-style-type: none"> * External과 internal leakage를 check 합니다. 필요 시 channel plate와 distribution plate를 교체합니다.
Every 2 years	Mixer	<ul style="list-style-type: none"> * 완전한 mixing chamber로 교체합니다.
	Superloop	<ul style="list-style-type: none"> * O-ring을 교체합니다.

6.2 Cleaning the system

① At the end of the day

바로 다음날 다른 buffer로 AKTAprime을 사용할 계획이라면, **System Wash Method**를 사용하여 증류수로 rinsing 합니다.

- 1) Inlet tubing을 증류수에 넣습니다.
- 2) Template menu에서 **Application Template** 그리고 **System Wash Method**를 선택합니다.
- 3) 사용할 valve port를 선택하고, method를 시작하기 위해서 **OK**를 누릅니다.

② **Leaving the system for a Few days** → 증류수로 System Wash Method를 사용하여 run하고, 20% ethanol로 반복합니다. (**pH electrode는 wash 하지 않습니다)

③ **pH electrode (optional)** → pH electrode를 사용하지 않으면 flow cell로 부터 제거하고, dummy electrode를 flow path에 삽입합니다. pH electrode는 pH 4 buffer와 2M KNO₃의 1:1 mixture에 항상 보관 합니다.

④ **Monthly cleaning** → System을 매달 또는 ghost peak이 나타날 때, 다음의 방법으로 cleaning 합니다.

- 1) Column을 분리하고 적당한 capillary로 교체합니다.
- 2) 모든 inlet tubing을 1M NaOH에 넣습니다.
- 3) 모든 inlet tubing에 대해서 **System Wash Method**로 run 합니다.
- 4) 1M NaOH로 20분 동안 전체 system을 flush 합니다. (1ml/min)
- 5) 즉시 증류수로 step 3과 4를 반복합니다.

6.3 Cleaning the UV flow cell in-place & off-line

In-place cleaning은 1M NaOH로 30분 동안 pumping 한후, 사용할 buffer로 washing 합니다.

Off-line cleaning은 다음의 과정으로 진행합니다.

- ① Flow cell의 inlet에 syringe를 연결하고, 증류수를 cell 내로 분사합니다.
- ② Decon 90, Deconex 11, RBS 25와 같은 10% surface active detergent solution으로 syringe를 채우고, 5번 정도 분사를 계속합니다.
- ③ 1분 정도 flow cell에 detergent solution을 둡니다.
- ④ Flow cell을 통해서 남아있는 detergent solution을 pumping 합니다.
- ⑤ Syringe를 rinsing 하고, 증류수로 flow cell을 flushing 합니다.

6.4 Cleaning the conductivity flow cell off-line

Conductivity flow cell은 다음의 방법으로 cleaning합니다.

- ① System pump 또는 syringe를 사용하여 flow cell을 통해서 1M NaOH 15ml을 1 ml/min로 pumping 합니다.
- ② 15분 정도 둡니다.
- ③ 증류수로 충분히 rinsing 합니다.