 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 1/13

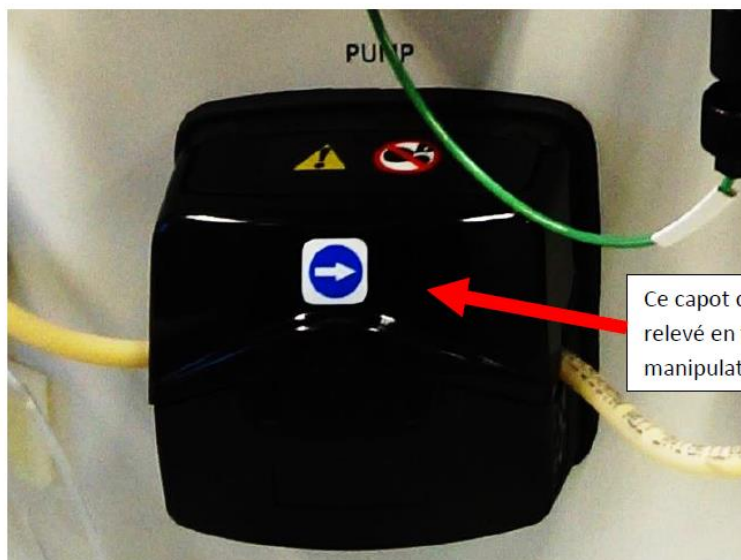
Procédure basée sur le document de J.Guittard

1. Consignes d'utilisation de l'AKTA

1.1. Traitement de la pompe

Desserrer le système péristaltique de la pompe après utilisation et le resserrer en début de manipulation.

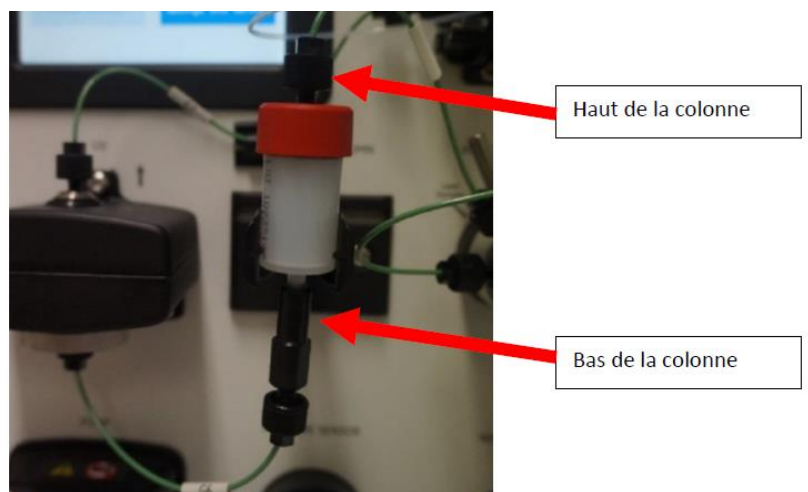
Pompe de l'AKTA




1.2. Montage et démontage d'une colonne

-Pour le montage : visser d'abord la partie basse de la colonne puis la partie haute.

-Pour le démontage : dévisser d'abord le haut puis le bas.



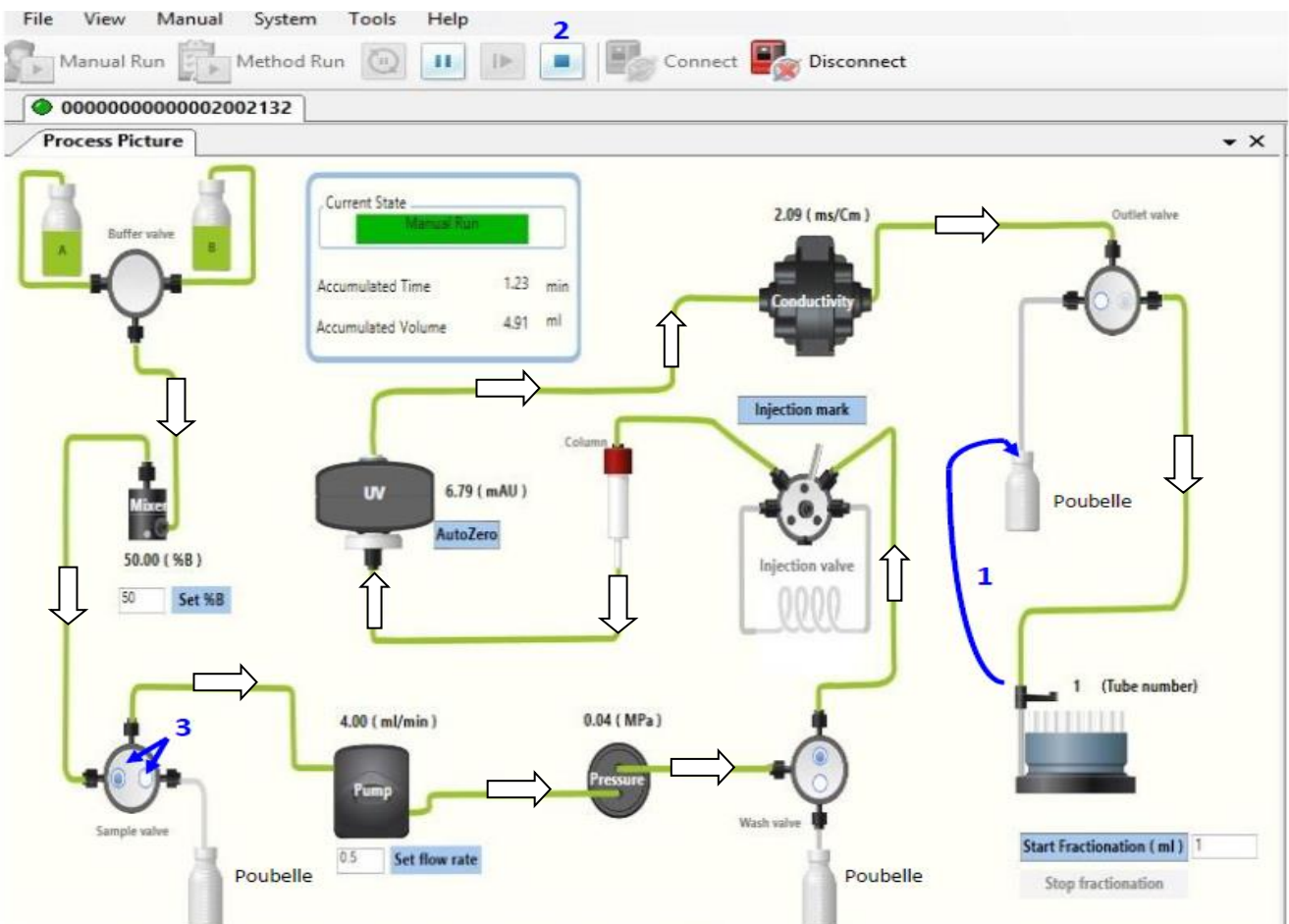
Rédigé par : J. GUITTARD et S.GERBELOT Date : 15/05/2016	Vérfié par : Etudiants BIOAC 2 Date : 24/05/2016	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 29/08/2016
--	---	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 2/13


1.3. Démarrage avec une colonne

A chaque démarrage ou à chaque changement de colonne, faire un rinçage manuel avec le tampon de liaison (tampon A) pour cela :

- Plonger les crépines A et B dans le tampon de liaison.
- Déconnecter le tube du collecteur de fractions de son emplacement et le brancher au récipient poubelle.
- Allumer le chromatographe.
- Ouvrir le logiciel Unicorn puis sélectionner seulement **System Control**.
- Sur **System Control**, connecter le chromatographe à Unicorn en cliquant sur **Connect**.
- Mettre la boucle en position « inject ».
- Lancer la méthode en cliquant sur « **Manual Run** ».
- Choisir un débit de 1 mL/min (Pump, flow rate)
- Ouvrir les vannes (en cliquant sur le schéma présenté sur System control) pour que le solvant passe par l'ensemble du système comme présenté sur le schéma ci-dessous (parcours fléché).
- (A l'écran, vanne bleue = vanne ouverte / Vanne blanche = vanne fermée. Voir 3 sur le schéma ci-dessous).
- Laisser tourner 5 minutes et cliquer sur « end » (Voir le 2 sur le schéma ci-dessous).
- Remettre la boucle en position « load » et le tube collecteur de fractions sur son emplacement d'origine.



Rédigé par : S.GERBELOT et S.GERBELOT Date : 15/05/2016	Vérifié par : Etudiants BIOAC 2 Date : 24/05/2016	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 29/08/2016
---	--	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 3/13

1.4. Rinçage de la colonne en fin d'utilisation

A l'arrêt de l'appareil et pour conserver les colonnes, un rinçage du circuit est à réaliser avec de l'éthanol à 20%.

Pour cela, suivre la même procédure que pour le rinçage initial de la colonne mais en mettant les crépines dans de l'éthanol à 20%.

2. Utilisation du logiciel Unicorn

2.1. Présentation

Le logiciel Unicorn comprend 4 applications que l'on peut ouvrir simultanément :

- **Application « Method Editor »** : Permet d'éditer une procédure.
- **Application « System Control »** : Permet de lancer une méthode déjà enregistrée.
- **Application Evaluation** : Permet d'analyser les profils des chromatographies.
- **Application Administration** : Permet d'installer et de paramétrer le logiciel Unicorn (**ne pas l'utiliser**)

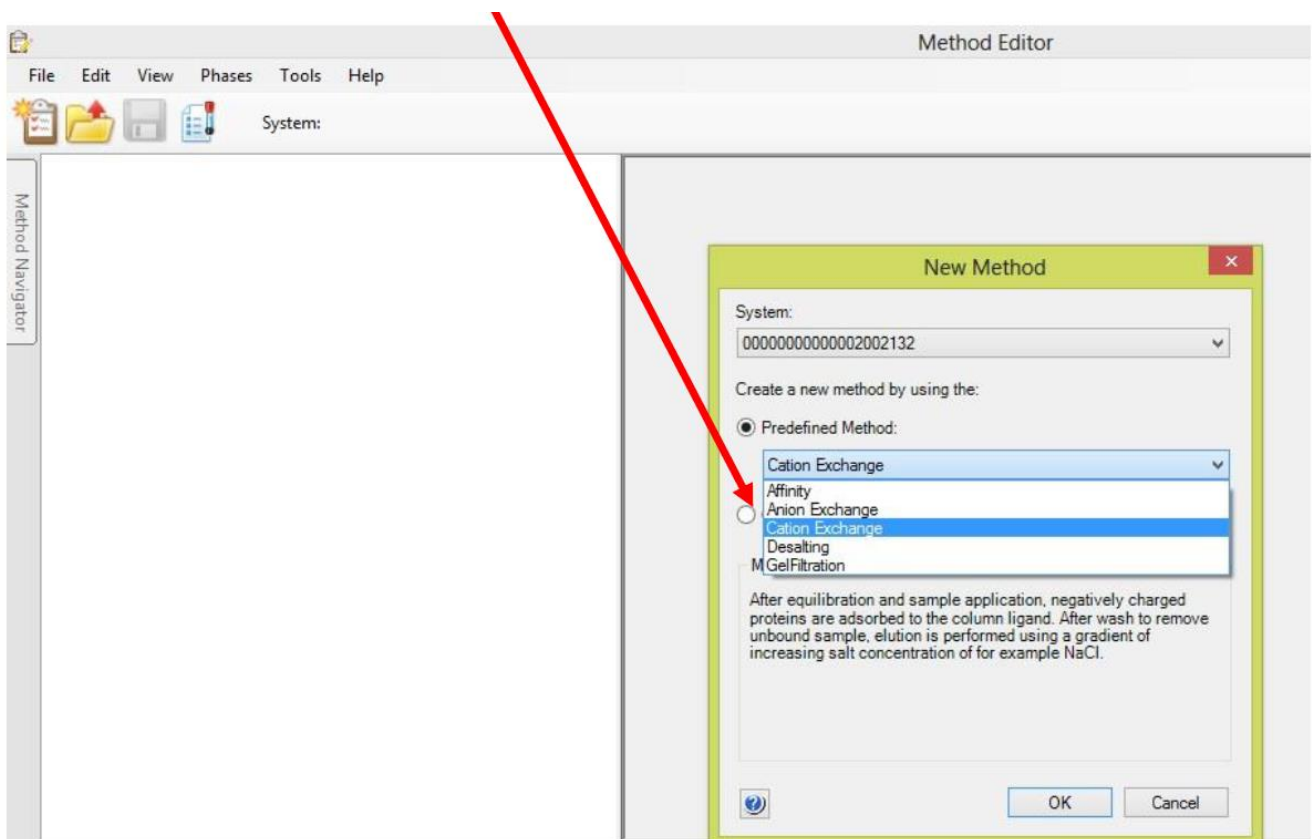
2.2. Procédure utilisation UniCORN pour l'application Method Editor


-Ouvrir le logiciel Unicorn.

-Cocher «**Method Editor** » et cliquer sur « **OK** »

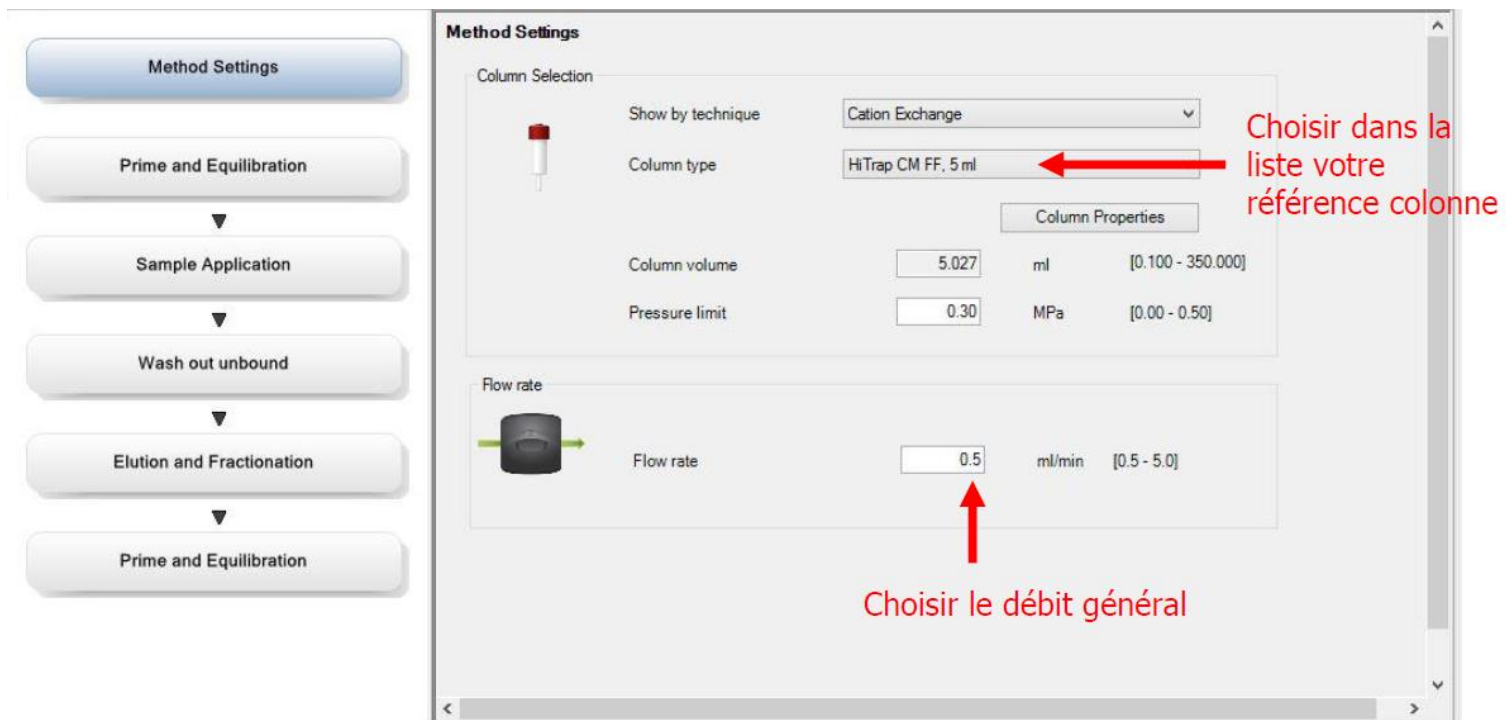
-Sur le bandeau en haut, cliquer sur « **File** » puis « **New Method** »

-Choisir le type de chromatographie désirée (voir photo ci-dessous) et cliquer sur **OK**.



 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 4/13

- Programmer les pages demandées pour votre méthode.
- **1^{ère} page « Method Setting »** : choix de la colonne et du débit général (Exemple pour chromatographie échangeuse ions)



Method Settings

Column Selection

Show by technique: Cation Exchange

Column type: HiTrap CM FF, 5 ml

Column Properties

Column volume: 5.027 ml [0.100 - 350.000]

Pressure limit: 0.30 MPa [0.00 - 0.50]


Flow rate

Flow rate: 0.5 ml/min [0.5 - 5.0]

Choisir dans la liste votre référence colonne

Choisir le débit général

Rédigé par : J. GUITTARD et S.GERBELOT Date : 15/05/2016	Vérifié par : Etudiants BIOAC 2 Date : 24/05/2016	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 29/08/2016
--	--	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 5/13


- **2^{ème} page : « Prime Equilibration »** : Equilibration de la colonne et mise en route. (Exemple pour Chromatographie échangeuse ion)


02132 Remarque : CV = Volume de la colonne (ici 5 mL)

Prime and Equilibration

Prime
 Prime the pump ← Rinçage général, 5 mL de chaque solvant sont passés dans le système


Equilibrate column
 Equilibrate with CV [0.0 - 100.0] ← Choisir le volume de solvant qui rince la colonne

Flow Rate
 Use the same flow rate as in Method Settings ← Choisir le débit du rinçage
 Flow rate ml/min [0.5 - 5.0]

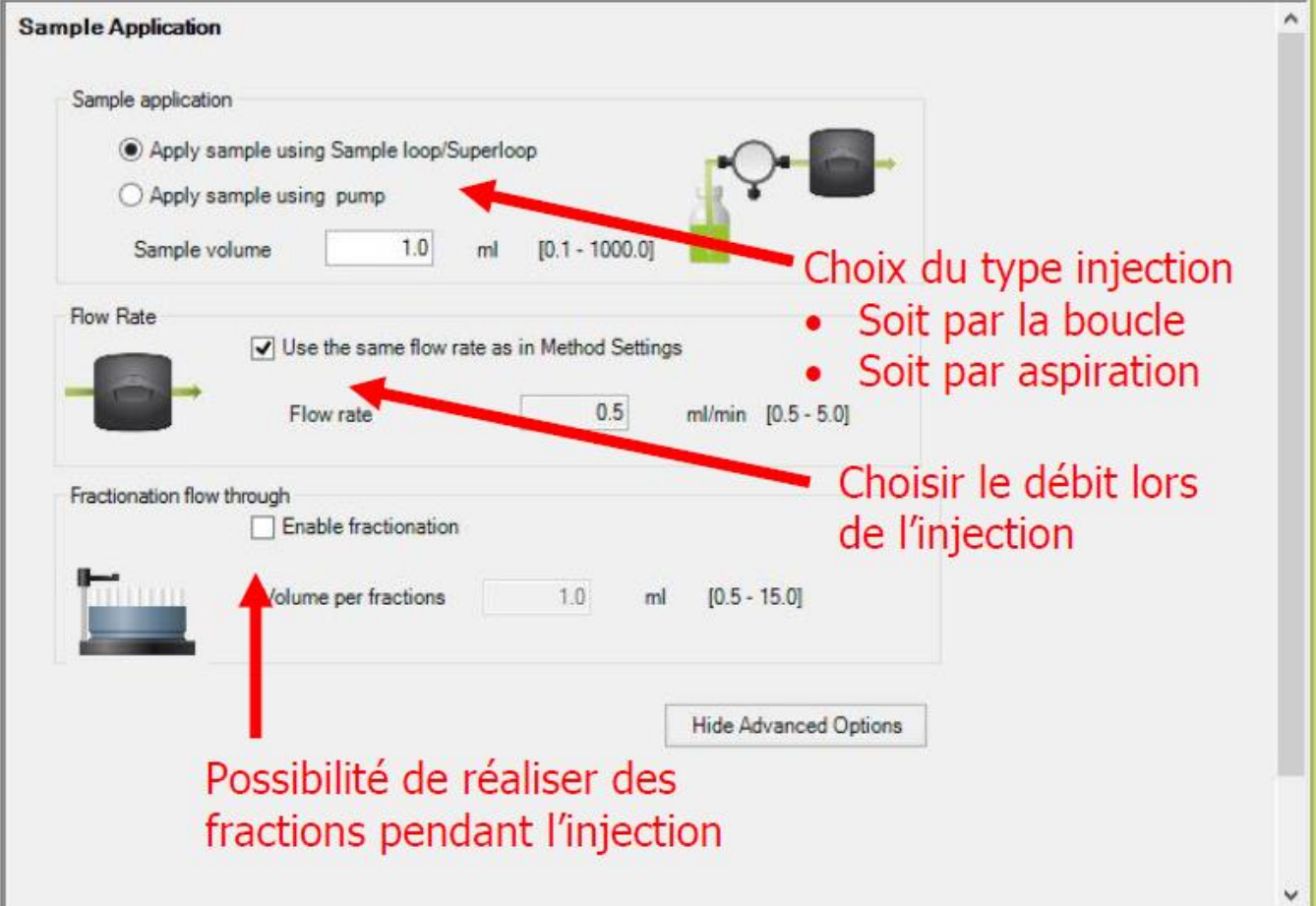
Start concentration
 Set %B concentration %B [0.0 - 100.0] ← % de solvant B pour rincer la colonne

Reset UV monitor (Auto Zero) ← Zéro du spectro

Rédigé par : J. GUITTARD et S.GERBELOT Date : 15/05/2016	Vérfié par : Etudiants BIOAC 2 Date : 24/05/2016	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 29/08/2016
--	---	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 6/13

- **3^{ème} page : « Sample application »** : Choix du type d'injection (Exemple pour la chromatographie échangeuse d'ions)



Sample Application

Sample application

- Apply sample using Sample loop/Superloop
- Apply sample using pump

Sample volume ml [0.1 - 1000.0]

Flow Rate

Use the same flow rate as in Method Settings

Flow rate ml/min [0.5 - 5.0]

Fractionation flow through

Enable fractionation


Volume per fractions ml [0.5 - 15.0]

Hide Advanced Options

Annotations:

- Choix du type injection
 - Soit par la boucle
 - Soit par aspiration
- Choisir le débit lors de l'injection
- Possibilité de réaliser des fractions pendant l'injection

Rédigé par : J. GUITTARD et S.GERBELOT Date : 15/05/2016	Vérifié par : Etudiants BIOAC 2 Date : 24/05/2016	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 29/08/2016
--	--	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 7/13

- **4^{ème} page : « Wash out unbound »** : Etape de filtration (Exemple pour la chromatographie échangeuse d'ions)



Wash out unbound

Wash column with CV ← **Choix du volume à filtrer**


Flow Rate
 Use the same flow rate as in Method Settings ← **Choisir le débit lors de la filtration**
 Flow rate ml/min

Start concentration
 Set %B Concentration %B ← **% de solvant B durant la filtration (si 0 alors 100% de solvant A)**

Fractionation
 Enable Fractionation
 Fractionation Volume ml ← **Possibilité de réaliser des fractions pendant la filtration**

Hide Advanced Options

Rédigé par : J. GUITTARD et S.GERBELOT Date : 15/05/2016	Vérifié par : Etudiants BIOAC 2 Date : 24/05/2016	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 29/08/2016
--	--	---

 <p>LYCEE SAINT-PAUL IV</p>	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 8/13

- 5^{ème} page : « Elution and Fractionation » : Programme de l'éluion (Exemple pour la chromatographie échangeuse d'ions)

Elution and Fractionation

Isocratic elution

Choisir le mode d'éluion

Set target %B concentration % B [0.0 - 100.0]

Set elution volume CV [0.0 - 100.0]

Paramètres mode isocratique

Gradient elution

Start %B concentration at % B [0.0 - 100.0]

Paramètres mode gradient

Type	Target %B Concentration (0-100)	Volume (0-100) CV
1 Linear	100.0	4.00
2 Step	100.0	3.00

Choisir % final de B et volume d'éluion

Note: A gradient delay (0.1 ml) is automatically added, provided that the last gradient segment is linear.
Max 5 segments are allowed.

Enable Fractionation

Possibilité de réaliser des fractions pendant l'éluion

Fractionation settings

Fractionation type: Fixed volume fractionation

Fixed fractionation volume: ml [0.5 - 15.0]

Choisir le volume des fractions

How Rate

Use the same flow rate as in Method Settings

Flow rate: ml/min [0.5 - 5.0]

Choisir le débit lors de l'éluion


Start fractionation after CV (only for isocratic elution)

Single step

Advanced Settings...

Hide Advanced Options

Rédigé par : J. GUITTARD et S.GERBELOT Date : 15/05/2016	Vérifié par : Etudiants BIOAC 2 Date : 24/05/2016	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 29/08/2016
--	--	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 9/13

- **6^{ème} page : « Prime and Equilibration »** : Rinçage et remise en condition (Exemple pour la chromatographie échangeuse d'ions)



Prime and Equilibration

Prime
 Prime the pump ← Rinçage général, 5 mL de chaque solvant sont passés dans le système

Equilibrate column
 Equilibrate with CV [0.0 - 100.0] ← Choisir le volume de solvant qui rince la colonne

Flow Rate
 Use the same flow rate as in Method Settings ← Choisir le débit du rinçage
 Flow rate ml/min [0.5 - 5.0]


Start concentration
 Set %B concentration %B [0.0 - 100.0] ← % de solvant B pour rincer la colonne

Reset UV monitor (Auto Zero). ← Zéro du spectro

Hide Advanced Options

- Enregistrer la méthode en cliquant sur l'icône « disquette ».
- Nommer la méthode dans le fichier du **système** AKTA utilisé.

Rédigé par : J. GUITTARD et S.GERBELOT Date : 15/05/2016	Vérifié par : Etudiants BIOAC 2 Date : 24/05/2016	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 29/08/2016
--	--	---

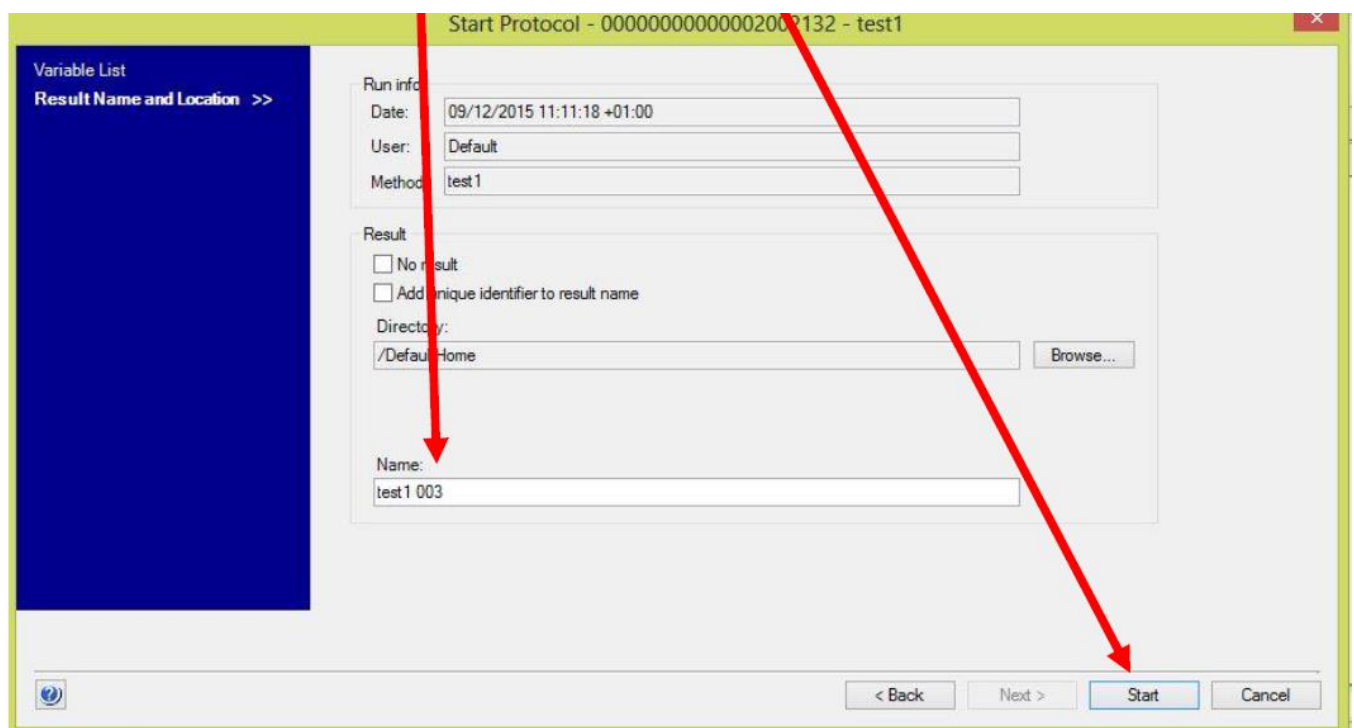
 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 10/13

2.3. Lancer une méthode avec System Control


- Lancer **System Control** et cliquer sur **CONNECT**.



- Cliquer sur **Method Run**, puis choisir la méthode et valider par **OK**.
- Valider la méthode en cliquant sur **Next**.
- Donner un nom au fichier de résultats dans « **Name** »
- Lancer la procédure en cliquant sur **Start**.

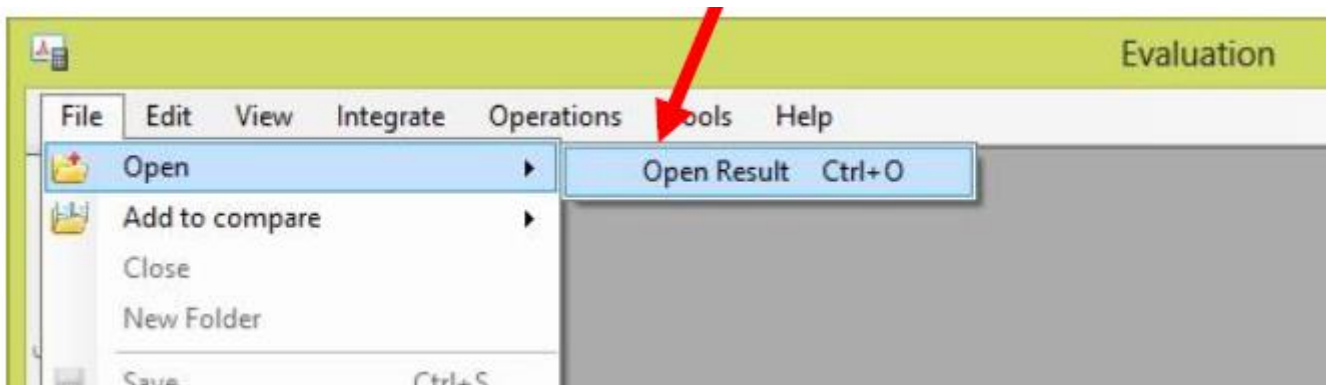


Rédigé par : J. GUITTARD et S.GERBELOT Date : 15/05/2016	Vérifié par : Etudiants BIOAC 2 Date : 24/05/2016	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 29/08/2016
--	--	---

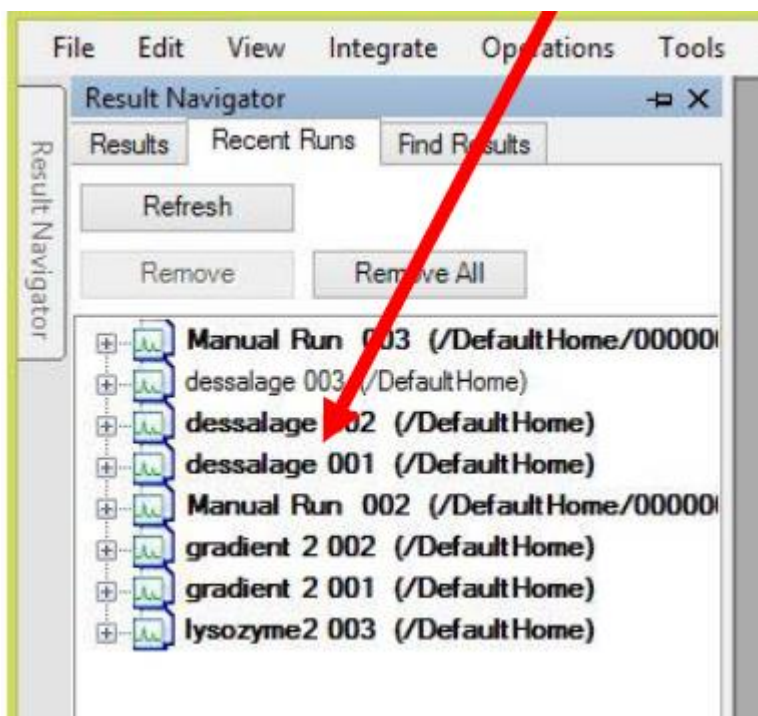
 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 11/13

2.4. Utilisation de l'application « Evaluation » pour le traitement des résultats


- Ouvrir l'application « Evaluation »
- Ouvrir le fichier de résultats



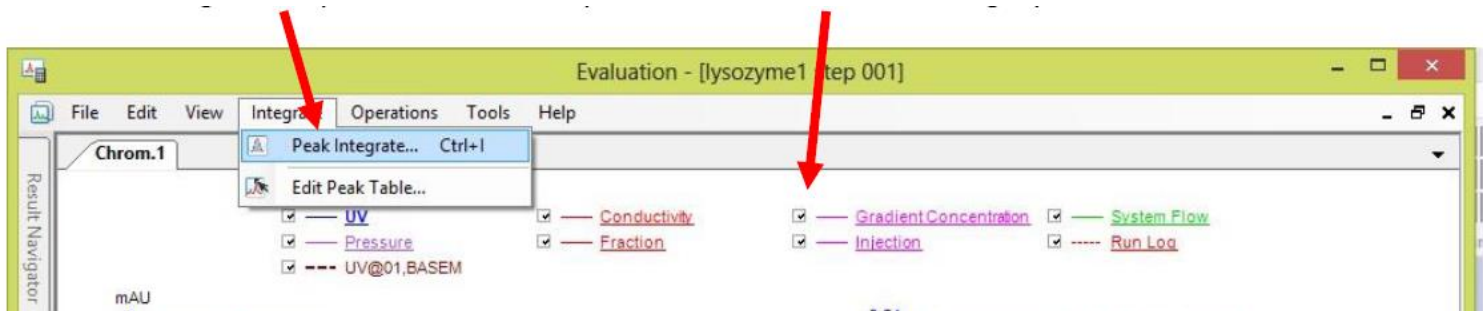
- Choisir le fichier correspondant à l'analyse faite



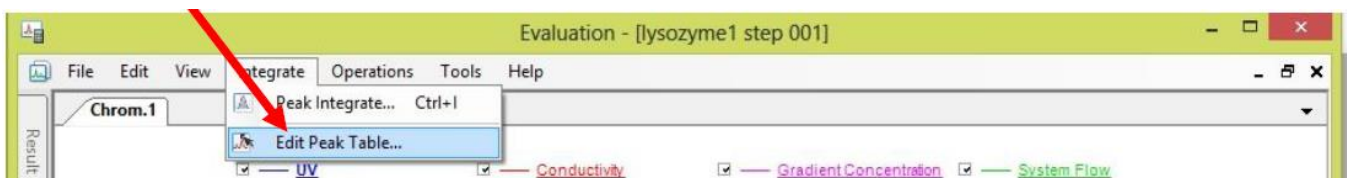
Rédigé par : J. GUITTARD et S.GERBELOT Date : 15/05/2016	Vérifié par : Etudiants BIOAC 2 Date : 24/05/2016	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 29/08/2016
--	--	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 12/13

- Intégrer les pics et choisir les paramètres à laisser sur le graphe.

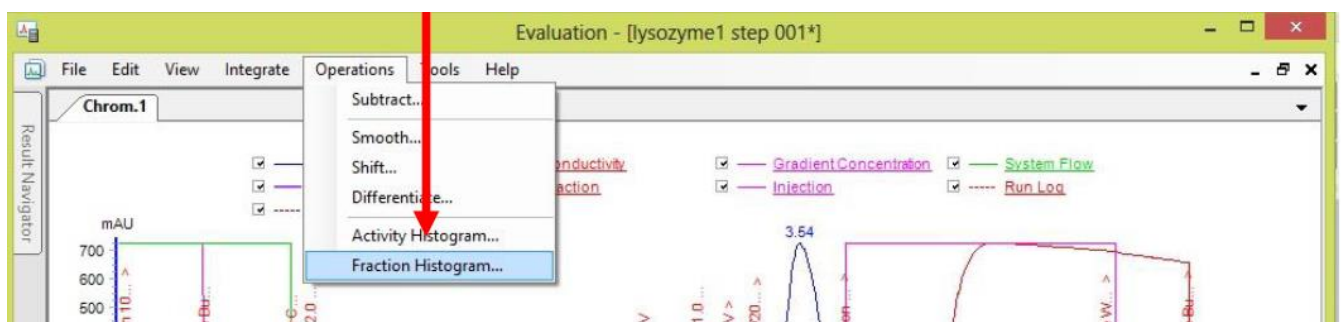


- Un tableau avec l'aire des pics doit apparaître sous le graphe.
- Editer les pics obtenus (nommer et/ou éliminer certains pics)




No	Peak name	Retention (ml)	Retention at start (ml)	Retention at end (ml)	Area (ml*mAU)	Delete	Split
1		-21.864	-22.49	-20.68	6.0518		
2		-19.114	-19.53	-13.16	9.5964		
3		-5.357	-6.74	-5.35	2.3066		
4		3.538	1.66	9.35	1826.5420		
5		11.769	9.35	15.82	324.2039		

- Pour trouver l'aire correspondant à chaque fraction, aller dans **Operations** puis **Fraction Histogram**



Rédigé par : J. GUITTARD et S.GERBELOT Date : 15/05/2016	Vérifié par : Etudiants BIOAC 2 Date : 24/05/2016	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 29/08/2016
--	--	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 036
	Utilisation AKTA START	Version : 1
		Date de mise en circulation 30/08/2016
		Page : 13/13

Fraction Histogram

Source chromatogram and curve:

Chrom. 1

- 001: UV
- 002: Conductivity
- 003: Gradient Concentration
- 006: System Flow
- 007: Pressure
- 024: UV@01.BASEM (1)

Source chromatogram and fraction curve:

Chrom. 1

- 011: Fraction

Target chromatogram and curve:

Chrom. 1

- 004:
- 005:
- 008:
- 009:
- 010:
- 013:
- 014:
- 015:
- 016:
- 017:
- 018:
- 019:
- 020:
- 021:
- 023:

Curve name:
UV@0111,HIST

Path length (cm)		UV@0111,HIST						
Fraction	Start (ml)	Stop (ml)	Duration (ml)	Area (ml*mAU)	Ext. coef.	Conc.	Amount	
T1	5.701	6.198	0.497	59.227				
T2	6.198	7.198	1.000	56.148				
T3	7.198	8.202	1.004	35.897				
T4	8.202	9.205	1.003	31.005				
T5	9.205	10.199	0.994	29.632				
T6	10.199	11.199	1.000	58.286				
T7	11.199	12.203	1.004	137.966				
T8	12.203	13.206	1.004	81.622				
T9	13.206	14.200	0.993	22.245				
T10	14.200	15.200	1.000	4.320				

Export Table

Printable

Possibilité d'export en xls

Note: The values are calculated using zero baseline

OK

Cancel

Rédigé par : J. GUITTARD et S.GERBELOT Date : 15/05/2016	Vérifié par : Etudiants BIOAC 2 Date : 24/05/2016	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 29/08/2016
--	--	---