

Agilent 2100 バイオアナライザ



バイオアナライザ 豆知識



便利な機能のご紹介



よく報告されるトラブル・ご質問

Contents



バイオアナライザ 豆知識

- ・サイズの算出方法 3
- ・濃度の算出方法
 - DNA 4
 - RNA Nano/Pico 5
 - small RNA 6
 - Protein 7
 - Protein2 9
- ・RINの計算フロー 10



便利な機能のご紹介

- ・スミアassay
 - DNA 10
 - DNA以外 11
- ・Comparison機能 12



よく報告されるトラブル・ご質問

Expert編

- ・ピークが認識されない 13
- ・間違ったピークがマーカールと認識される 14
- ・RINが計算されない 15
- ・rRNAのピークを調整したい 16
- ・秒表示からサイズ表示に切り替わらない 18

実験操作編

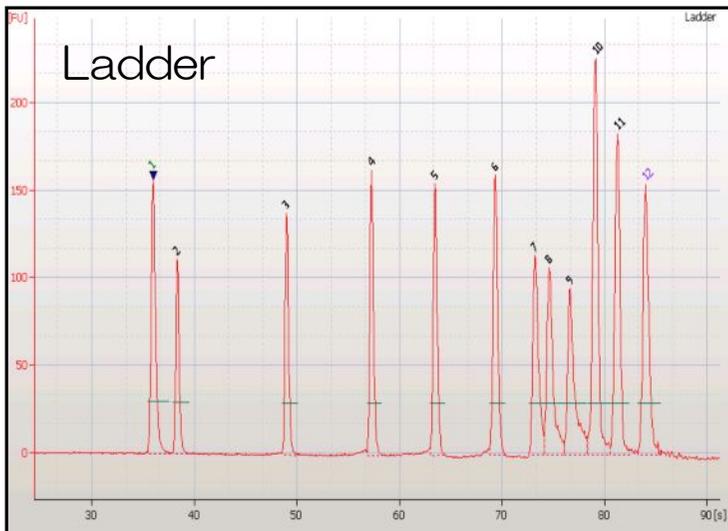
20





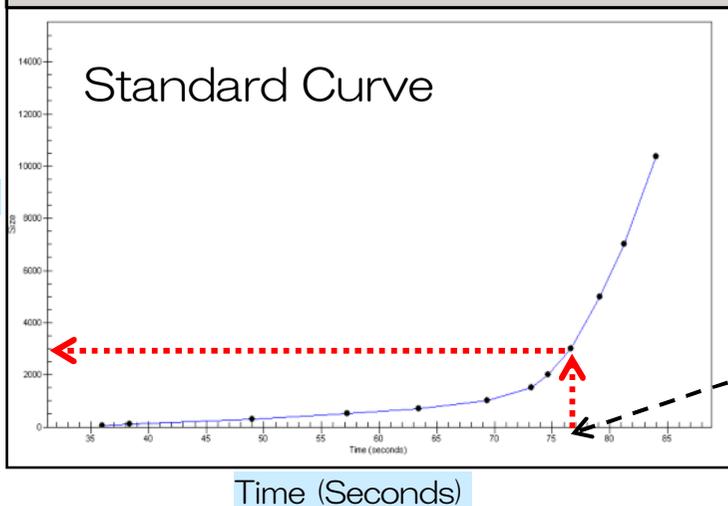
サイズの算出方法

例) DNA7500 assay

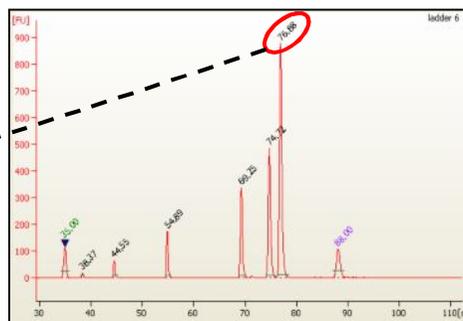


	Size
1	50
2	100
3	300
4	500
5	700
6	1000
7	1500
8	2000
9	3000
10	5000
11	7000
12	10380

- ①ラダは既知のサイズを用いているためソフトウェアにはあらかじめピークサイズがインプットされています
- ②ラダレーンのピークのMigration timeをもとに、Standard Curveを描きます
- ③それぞれのピークのMigration timeからStandard Curveをもとにサイズを算出します

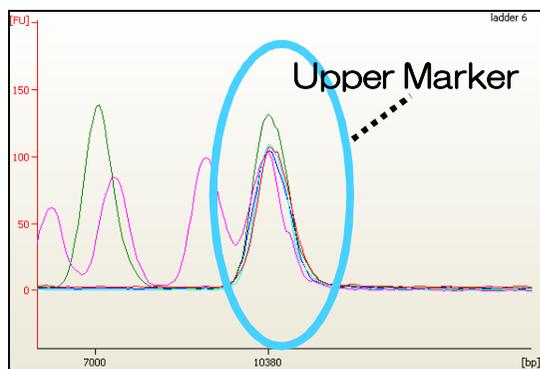
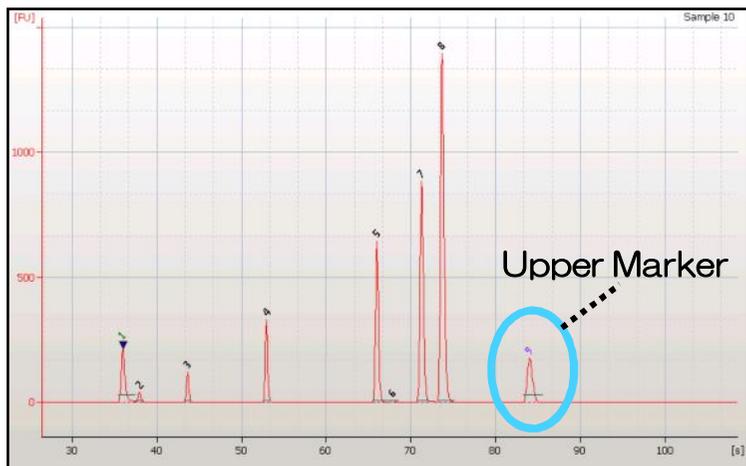


Ladder size はAssay Propertyから
Standard Curve:はChip Summaryから確認可能





濃度の算出方法 -DNA assay-



Overlaid Samples

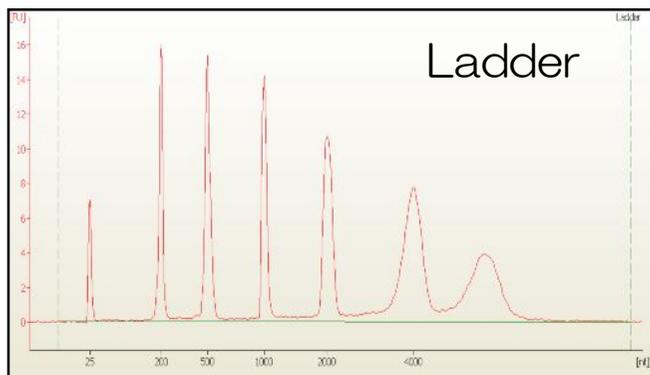
- ①Markerに入っているUpper Markerは
既知濃度です
- ②各レーンのUpper Markerのエリアを基準に
インジェクション量の補正を行います
- ③各ピークがもつサイズをもとに、correction
factorをかけます
correction factor: Agilentがもつ経験的な値。
インジェクション時のサイズ
によるバイアスを補正する
ためのもの
- ④サイズに応じてモル濃度計算をおこないます

$$\text{Peak Conc.} = (\text{The Area}) * (\text{UpperMarker known conc.} / \text{UpperMarker Area}) * (\text{injectoin bias factor})$$





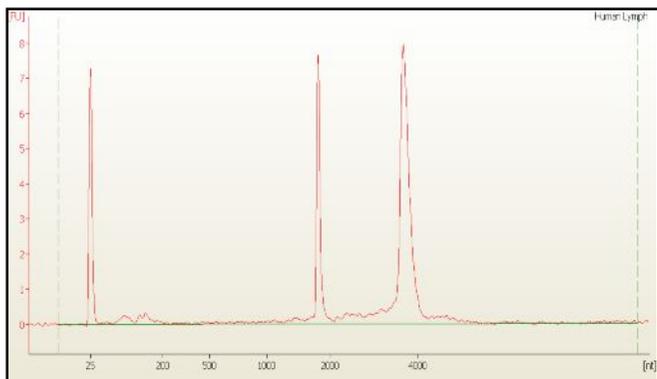
濃度の算出方法 -RNA(Nano/Pico) assay-



①Ladderに入っているRNAは既知濃度です

Nano: 150ng/ul

Pico : 1000pg/ul



②Ladderのエリアを基準に濃度を算出します

Ladder Area : Ladder Conc.

= Sample Area : Sample Conc.

Nano

RNA Conc. (ng/ul) = (The Area) * (Ladder Area) / (150 * Sample Area)

Pico

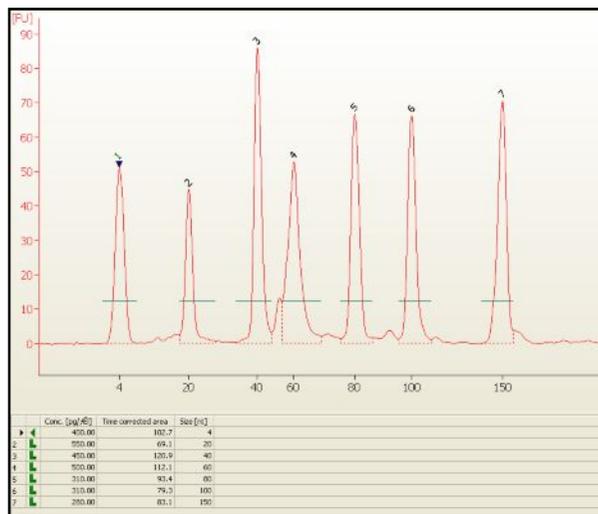
RNA Conc. (pg/ul) = (The Area) * (Ladder Area) / (1000 * Sample Area)





濃度の算出方法 -small RNA assay-

Ladder



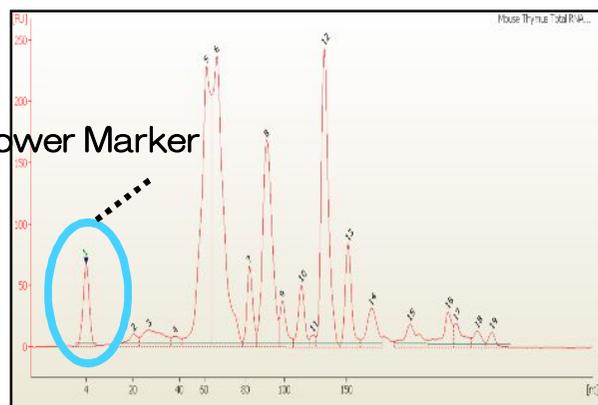
① Ladderに入っている各ピークは既知濃度です

② Ladderの各ピークのエリアを基準にサイズごとの補正值を計算します

③ 各レーンのLower Markerは既知濃度 (500pg/ul) です

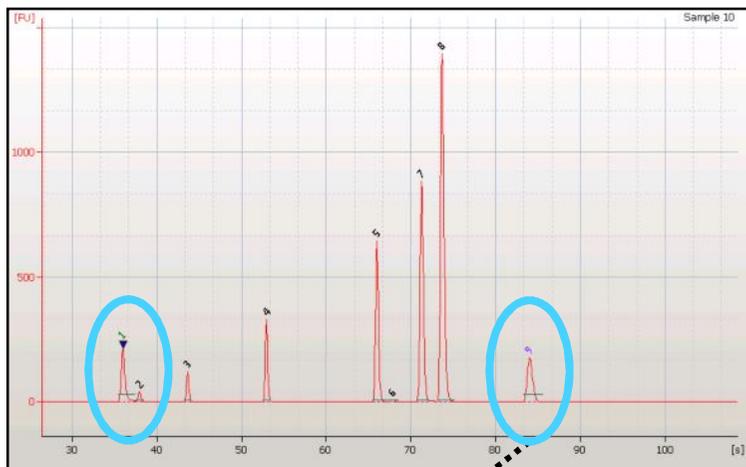
④ ②と③で求めたfactorでmiRNA、small RNAと想定される領域の濃度を計算します

Lower Marker



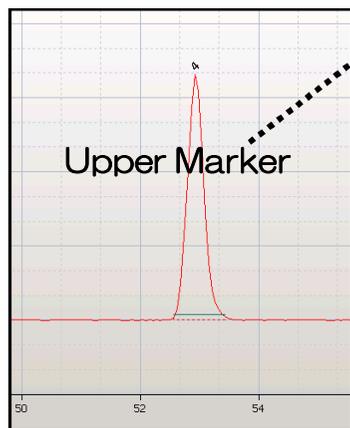


濃度の算出方法 - Protein 80&230assay -



①各レーンのMarkerのエリアを基準にインジェクション量の補正を行います

Protein 80, 230KitではUpper Markerを使います。



②各ピークの補正值をかけます

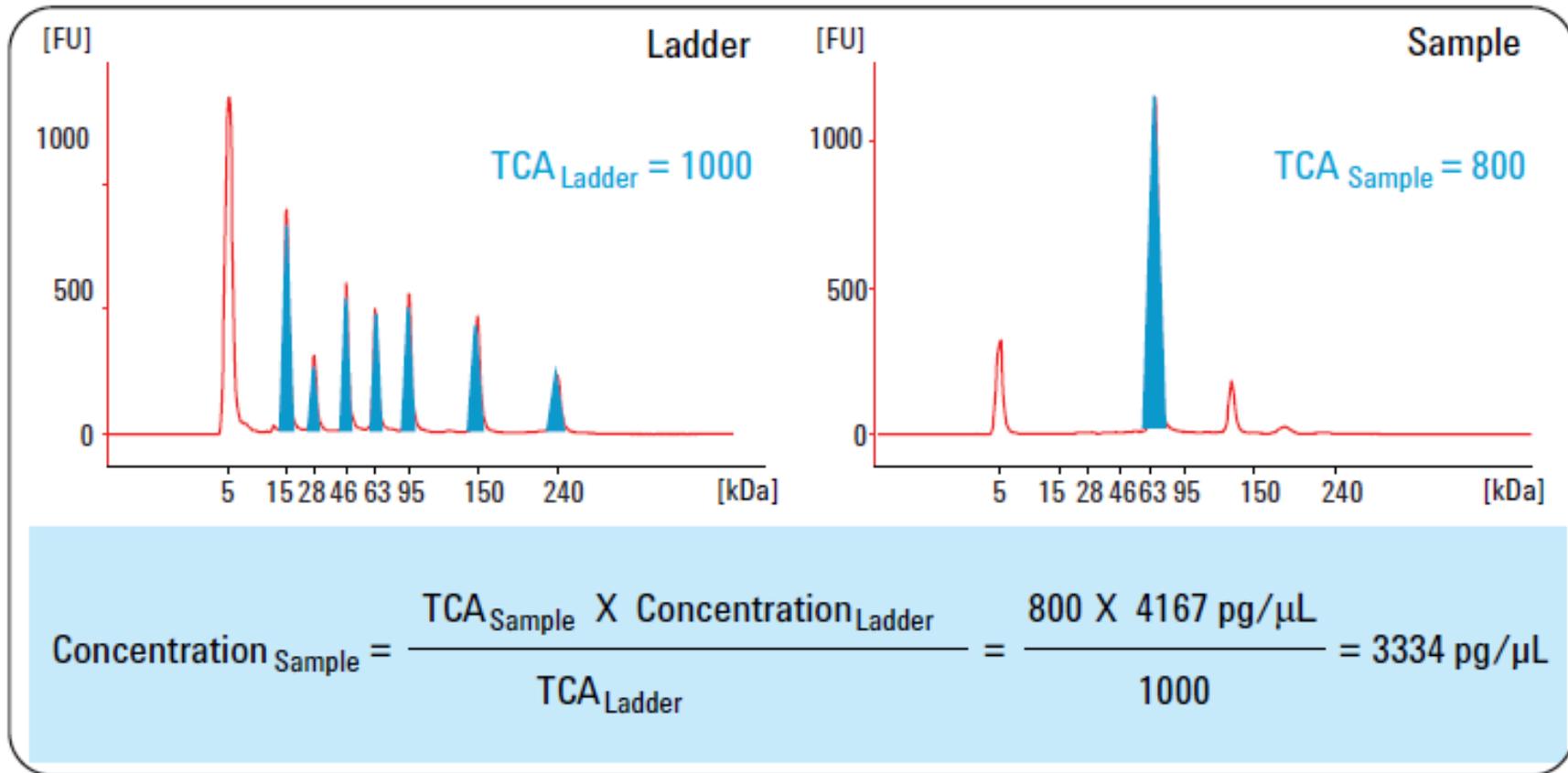
$$\text{Peak Conc.} = (\text{The Area}) * (\text{Marker known conc.} / \text{Marker Area})$$

*ただし、染色効率はタンパク質の種類によって異なります
→ Protein assay 2参照





濃度の算出方法 - High Sensitivity Protein 250 assay-



Ladder のtime corrected areaと濃度(4,167 pg/μL*)を基に
Sampleのtime corrected areaから算出

*通常プロトコルで調製時のSample Bufferと混合するときのladder濃度
(ladder のもとの濃度= 1 mg/mL)



濃度の算出方法 - Protein assay 2 -

染色効率はタンパク質の種類により異なります

Upper Markerのみでの補正（前頁）の他、標品による濃度補正も可能です

Assay Properties | Chip Summary | Gel | Electropherogram | Result Flagging | Log Book

Data File : Demo Protein 80 Series II.xad
Location : C:\...\t#2100 bioanalyzer#2100 expert#dat
Created : July 11, 2008 21:45:00
Modified : June 03, 2009 1:46:21
Software : Created by version B.02.07.SI437
Assay : Protein Analysis 5 - 80 kDa Diagnostics, v4.

Sample Name	Sample Com...	Use For Calibration	Conc. [ng/μl]	Statu
IgG non-red.		<input type="checkbox"/>	0	✓
2 IgG 1:5 (red.)		<input checked="" type="checkbox"/>	200	✓
3 IgG 1:20 (red.)		<input checked="" type="checkbox"/>	50	✓
4 IgG 1:10 (red.)		<input checked="" type="checkbox"/>	100	✓
5 IgG 1:2 (red.)		<input checked="" type="checkbox"/>	500	✓
6 IgG (pur, red.)		<input checked="" type="checkbox"/>	1000	✓
7 IgG non-red.		<input type="checkbox"/>	0	✓
8 Low Range ladder				
9 Low Range ladder				
10 PBS blank				

Chip Lot # Reagent Kit Lot #

① 10ウェルのうち、何ウェルかに濃度をふった標品、残りにサンプルを入れて測定します

② データファイルを開き、Chip Summaryに標品の情報を入力します

③ ソフトウェアが標品のレーンのメインピークをもとにStandard Curveをかきます

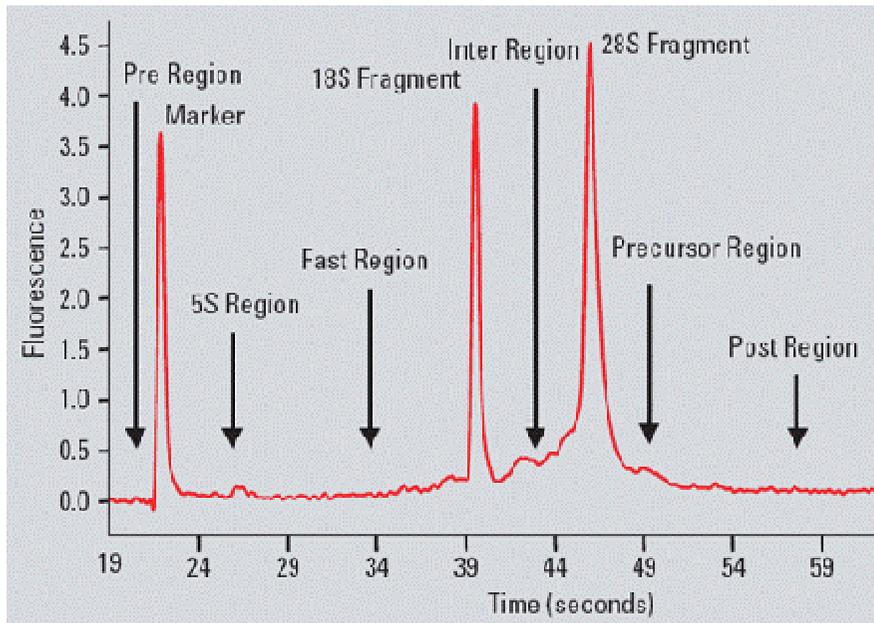
④ ③をもとに濃度を補正し算出します





RIN計算のフロー

① エレクトロフェログラムの region分けをおこないます



② Anomaly thresholdによる 異常データの検出をおこないます

- フラグ 赤字→Critical
⇒RIN値が計算されず
- フラグ 黒字→Criticalではない
⇒RIN値は計算される

- Unexpected baseline signal
- Unexpected signal in pre-region
- Unexpected signal in 5S-region
- Unexpected signal in fast-region
- Unexpected signal in inter-region
- Unexpected signal in precursor-region
- Unexpected signal in post-region
- Unexpected ribosomal ratio
- Unexpected sample type
- Unexpected lower marker



便利な機能のご紹介

スミアアッセイ -DNA assay-

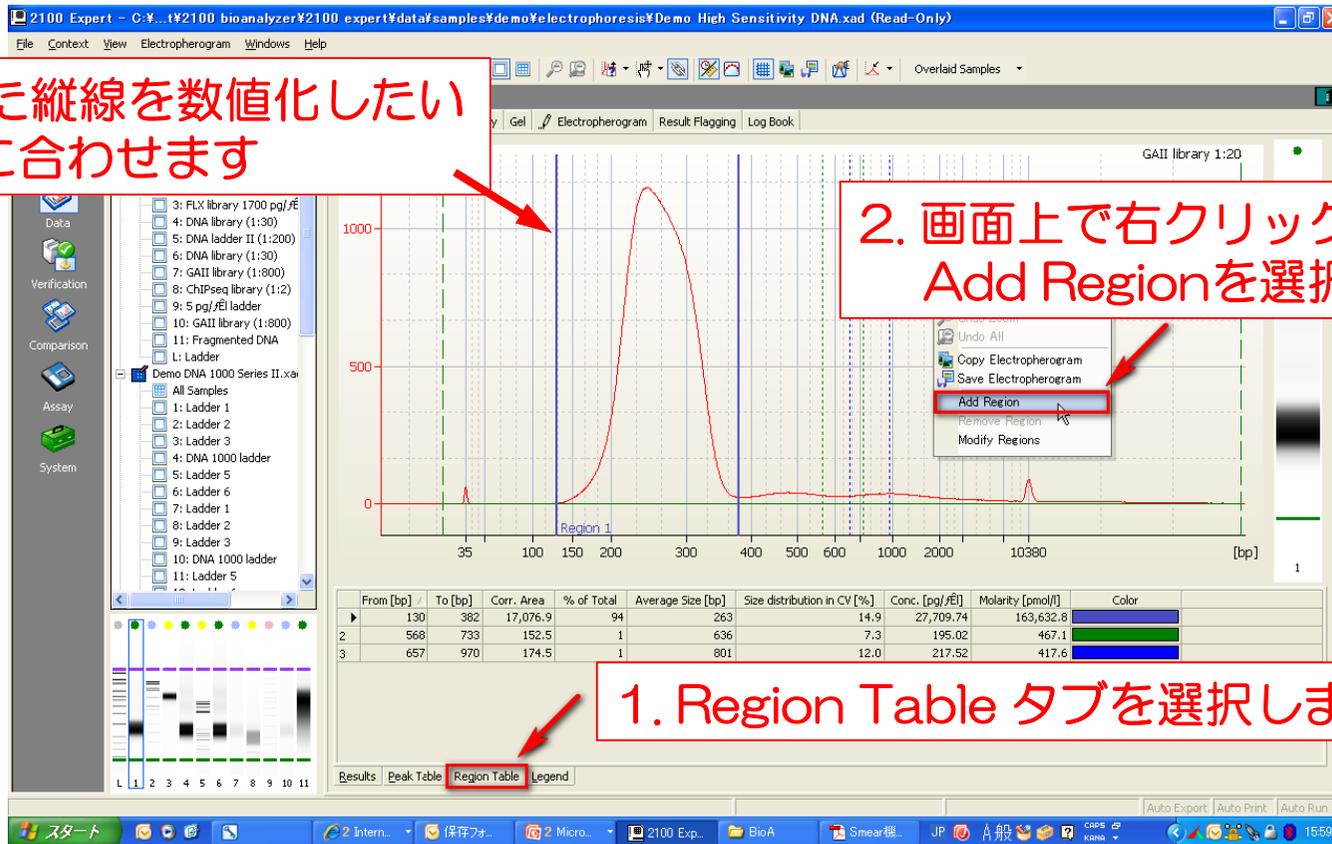
任意のピークの特徴を数値化できます
示される値

- ・ 範囲
- ・ 割合
- ・ 濃度
- ・ 平均サイズ
-

3. 現れた縦線を数値化したい
ピークに合わせます

2. 画面上で右クリック
Add Regionを選択します

1. Region Table タブを選択します





便利な機能のご紹介

スメアアッセイ -DNA assay以外-

DNA assay以外の場合、スメアアッセイはデフォルト設定ではありません。
(Region Tableタブがありません)

The screenshot shows the 2100 Expert software interface. The main window displays an electropherogram for 'Mouse heart' with a peak at approximately 1800 nt. The 'Advanced' settings panel is open, and the 'Smear Analysis' section is highlighted. The 'Perform Smear Analysis' checkbox is checked. The 'Region Table' tab is selected in the bottom navigation bar.

2. プルダウンからAdvancedを選択します

3. Smear AnalysisのPerform Smear AnalysisをONにします

1. Set point explorerを表示します

4. Region Tableが表示されます



Comparison機能

異なるチップからのデータを選択抽出して、ひとつのファイルに統合できます
最大48データまで可能です

2100 Expert

File Context View Windows Help

Comparison

Contexts

All Comparison Files

Comparison

Instrument

Data

Manifestation

Comparison

Assay

1. Contextsバーから Comparison をクリックします

2. ファイル（複数選択可）を開きます
開いたデータはSelect Data Fileに
リストされます

2100 Expert

File Context View Windows Help

Comparison

Contexts

All Comparison Files

Comparison Co.

Instrument

Assay

System

Select Data Files

Demo DNA 1000 Series II.xad

1: Ladder 1
2: Ladder 2
3: Ladder 3
4: DNA 1000 ladder
5: Ladder 5
6: Ladder 6
7: Ladder 1
8: Ladder 2
9: Ladder 3
10: DNA 1000 ladder
11: Ladder 5
12: Ladder 6
L: Ladder

3. 比較したいデータを選択し、右クリック
Add Sample to New Comparison Fileを
クリックします

2100 Expert

File Context View Windows Help

Comparison

Contexts

All Comparison Files

ComparisonFile3 DNA 1000

Comparison Context

In the Comparison context, you can

Instrument

Assay

System

Select Data Files

Demo DNA 1000 Series II.xad

1: Ladder 1
2: Ladder 2
3: Ladder 3
4: DNA 1000 ladder
5: Ladder 5
6: Ladder 6
7: Ladder 1
8: Ladder 2
9: Ladder 3
10: DNA 1000 ladder
11: Ladder 5

4. 新しく Comparison ファイル
(拡張子 ; xac) が作成されます





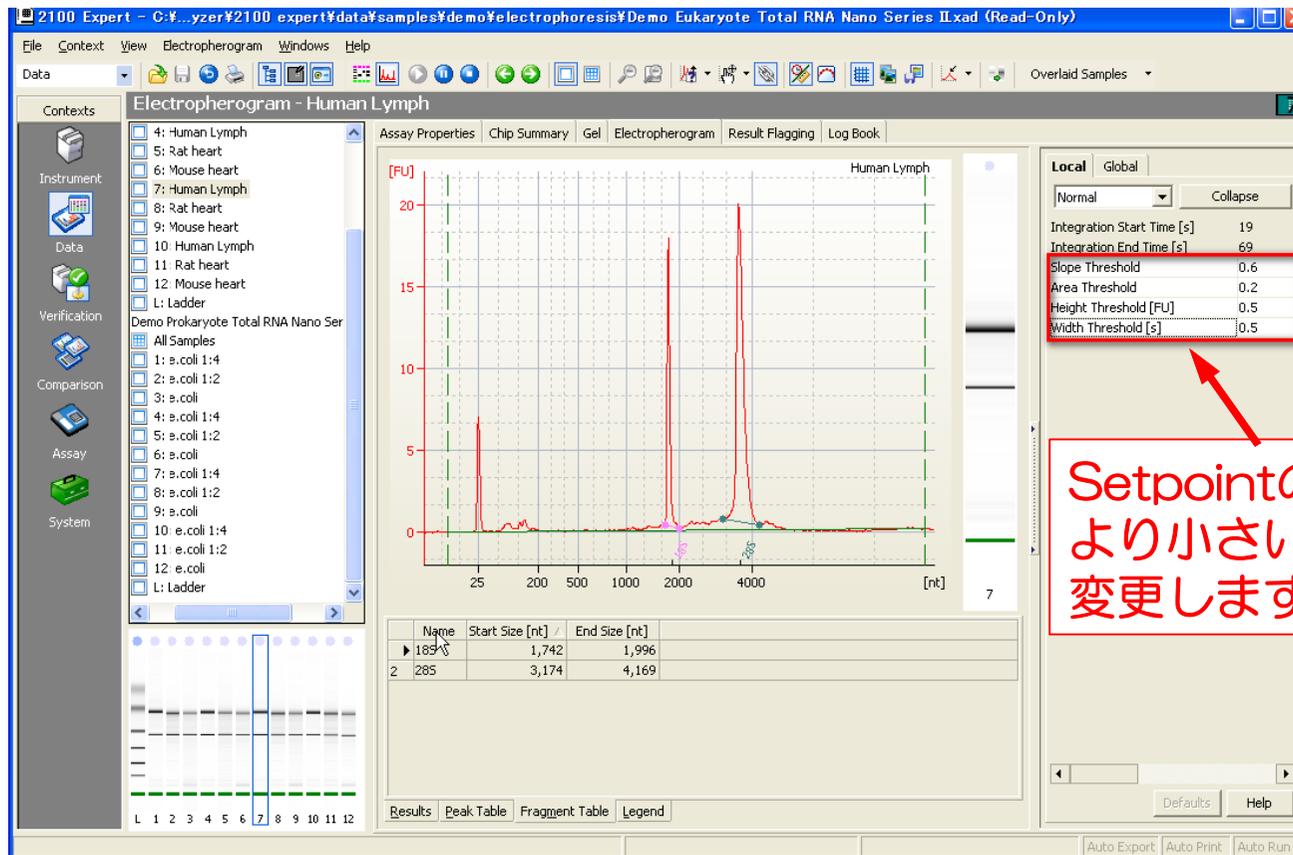
よく報告されるトラブル・ご質問 (Expert編)

ピークが認識されない

設定されている閾値以下のピークは認識されません

(例：シグナルが弱い、ピークがブロード)

認識させるためにSetpointの値を変更する必要があります





よく報告されるトラブル・ご質問 (Expert編)

間違ったピークがマーカーと認識されている

マーカーと近い泳動度を持ったピークがある場合、
正しくマーカーが認識されない場合があります

2. 正しいピークを選択し右クリック
(選択されたピークは▼マークが示されます)

3. Manually Set Lower (またはUpper) Markerを選択します

1. Peak Tableタブを選択

Size [bp]	Conc. [ng/μl]
15	4.20
25	3.86
51	3.98
101	3.88

Electropherogram peaks (bp): 66.41, 77.92, 87.59, 94.19, 103.92, 107.11, 108.86, 113.00



よく報告されるトラブル・ご質問 (Expert編)

RINが計算されない

プログラム上の想定範囲外のデータの場合、エラーとなりRINが表示されません
 ⇒p. 9 「RIN計算のフロー参照」
 RINを表示させるため、フラグのたった項目の設定を変更する必要があります

The screenshot shows the 'Expert' software interface with the following elements:

- Electropherogram - e.coli 1:4**: A plot showing signal intensity (FU) versus time (nt). A red box highlights the 'Advanced' dropdown menu in the 'Local' settings panel.
- Local Settings Panel**: Contains 'Advanced', 'Baseline Correction', and 'Integrator' sections. The 'Advanced' section is highlighted with a red box.
- RNA Integrity Number Table**: A table with the following data:

Code	Description	Cal
1	Unexpected signal in 5s region, Analysis	1
- RNA Integrity Number Settings**: A list of thresholds:
 - Pre Region Anomaly Thresh... 0.6
 - 5S Region Anomaly Thresh... 0.5
 - Fast Region Anomaly Thre... 0.56
 - Inter Region Anomaly Thre... 0.7
 - Precursor Region Anomaly ... 0.46
 - Post Region Anomaly Thre... 0.45

1. フラグのたったデータを選択します

3. Setpoint (Advanced)から”RNA Integrity Number”の項目からエラーの内容に該当する項目の値を“1”に変更します

2. エラータブを開き、エラーの内容を確認します



よく報告されるトラブル・ご質問 (Expert編)

rRNAのピークを調整したい

rRNAピークはマニュアルで調整できます

まず、任意のピークをプログラムに認識させ、ピークの範囲を設定します

1. Fragment Tableを選択します

2. 認識させたいピークの上で右クリックし Add Fragmentを選択します

3.rRNA1というピークがテーブルに、バーがエレクトロフェログラム上に追加されます

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]
rRNA 1	3,865	5,081

4. バーの始点と終点を移動させ、ピークの範囲を設定します



よく報告されるトラブル・ご質問 (Expert編)

rRNAのピークを調整したい

設定したピークに名前 (真核生物の場合、18S/28S) を設定します

The screenshot shows the Agilent 2100 Expert software interface. A red dashed box highlights the 'Setpoints' dialog box, which contains a table with the following data:

Name	From [nt]	To [nt]	Color
▶ 28S	3420	4240	

Below the table are buttons for 'Delete', 'Add', 'OK', and 'Cancel'. A red arrow points from the '28S' entry to the 'Advanced' dropdown menu in the 'Local' settings panel on the right. Another red arrow points from the 'Advanced' dropdown to the 'Fragment Detection' table in the 'RNA Fragment' section of the 'Peak Filter' panel. A third red arrow points from the 'Fragment Detection' table to the 'Fragment Table' in the main results area.

5. SetpointのAdvancedを選択

7. 現れたFragment Tableの名前を変更し OKをクリックします

6. RNA Fragmentの” Fragment Detection” のTableをクリックします





秒表示からサイズ表示に切り替わらない

アイコン  をクリックしても表示が切り替わらない場合、

以下の原因が考えられます

- ・ マーカーが認識されていない場合
→ マーカーのピークが低い場合、ピークとして認識されません
ピークを認識させ、マーカーを設定してください
(p.13 の「ピークが認識されない」参照)
- ・ 分析途中でストップボタンを押した場合
→ 分析途中のデータがあるとサイズ表示されません
(次ページ参照)
- ・ Comparison機能の場合
→ Comparisonモードではサイズ表示ができません
Dataモードでは同一チップ上のラダを基にサイズを計算しています
このため、複数のチップ上のデータを比較するComparisonモードでは
計算上、サイズ表示が難しく秒表示になります
- ・ 上記以外 → 弊社サポート窓口へお問い合わせください



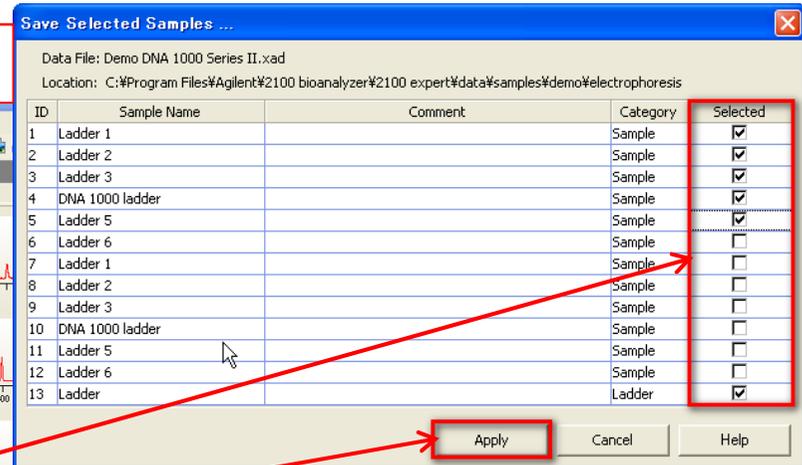
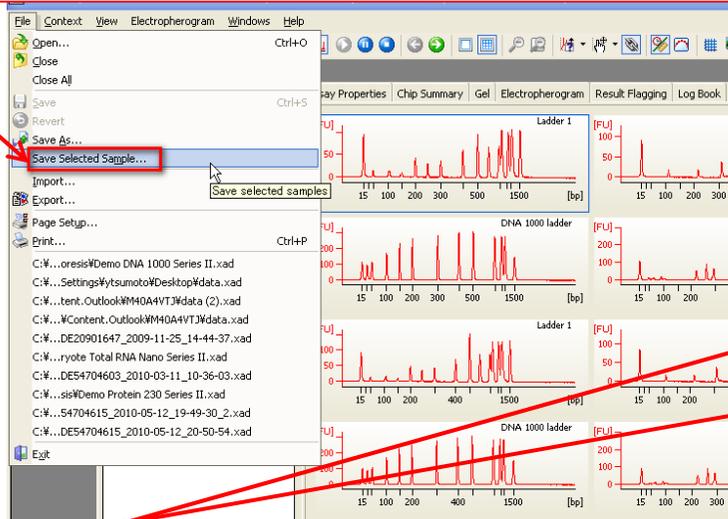


よく報告されるトラブル・ご質問 (Expert編)

秒表示からサイズ表示に切り替わらない

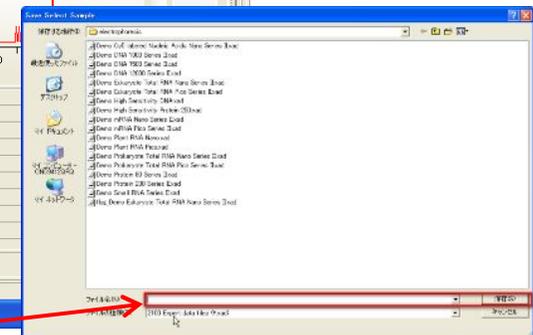
- 分析途中でストップボタンを押した場合
→分析途中のデータがあるとサイズ表示されません
最後のデータを除く必要があります

1. Fileから “Save Selected Sample” を選択



2. 最後のレーンを除いたサンプルに チェックしApply

3. 名前を付けて保存 このファイルを開くとサイズ表示されます





実験操作編 -チェックポイント-

データに問題がある場合は以下の点についてチェックしてください

【試薬】・ Expire Dateを過ぎた試薬・チップを使用していませんか？

*チップにも使用期限があります。古いチップを使用すると泳動パターンが乱れる可能性がありますのでご注意ください

・ Gel-dye Mixの調製時に

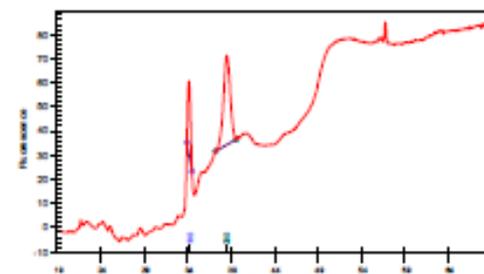
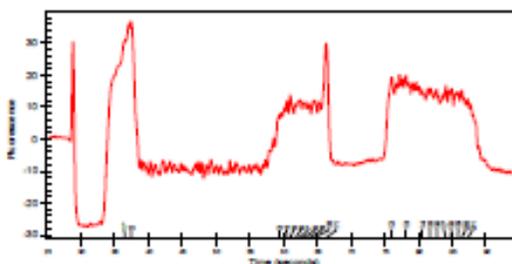
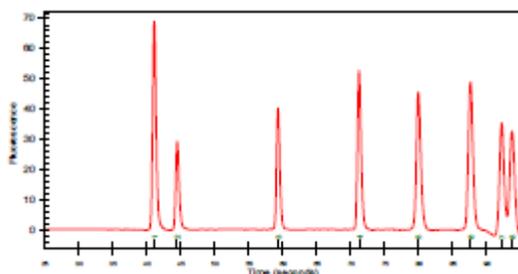
試薬は常温に戻し、よくMixしてから使用していますか？

試薬の量、遠心速度、時間は正確ですか？

・ チップにアプライする時に

正確な液量をアプライしていますか？

インバースピペッティング（第1ストップよりさらに押し上げた状態で吸い上げ、出す時は第一ストップで止める）を行ってください



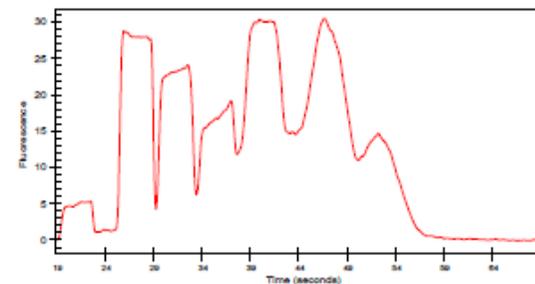
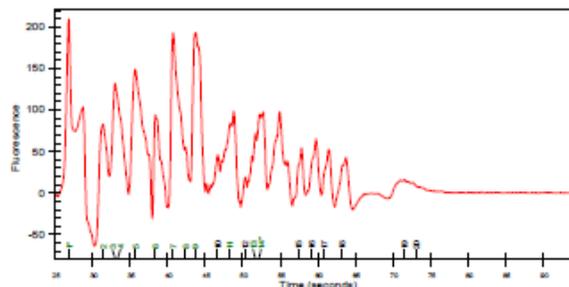
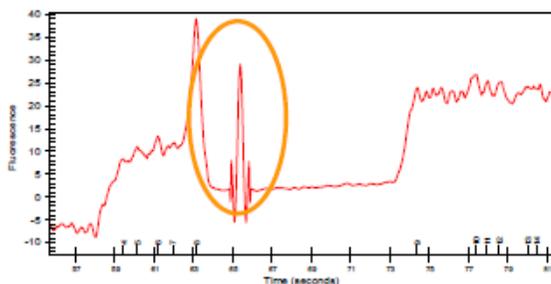


実験操作編 -チェックポイント-

データに問題がある場合は以下の点についてチェックしてください

【サンプル】

- ・ スペックよりも高濃度ではありませんか？
Kitにより適正濃度が異なります
- ・ 高分子Genomic DNAが高濃度に入っていないですか？
DNase処理、希釈等を行ってください
- ・ サンプルの塩濃度は適正ですか？
DNA HS, RNA Pico, Small RNAの場合、ご注意ください



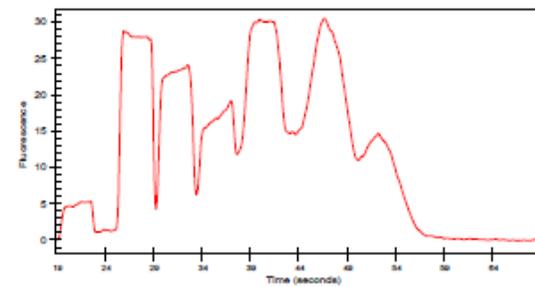
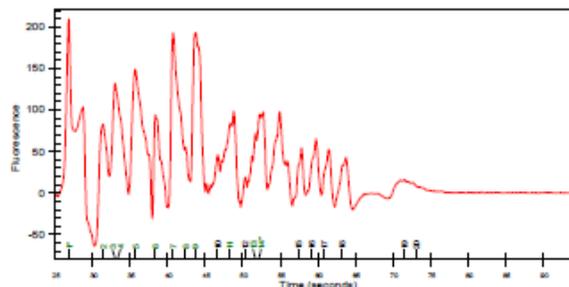


実験操作編 -チェックポイント-

データに問題がある場合は以下の点についてチェックしてください

【プライミングステーション、ゲル充填時】

- ・プライミングステーションをメンテナンスしていますか？
 - ガスケットに汚れ、亀裂はありませんか？
 - シリンジは定期的に交換していますか？（シリンジはKitについています）
 - シリンジはスタンドにきちんとセットされていますか？
- ・充填時のストッパーの位置、充填時間は正しいですか？
- ・充填後、流路に気泡が入っていませんか？（気泡が入った場合は調製し直してください）





実験操作編 -チェックポイント-

データに問題がある場合は以下の点についてチェックしてください

【電極】

- 分析後の電極の洗浄を適切に行っていますか？
泳動終了後、直ちに洗浄を行ってください
クリーニングチップでの洗浄は液量 350 μ l を守っていますか？
洗浄液がクリーニングチップ内で偏っていませんか？
- 数か月に一度、超音波による洗浄を行ってください



Agilent 2100 バイオアナライザ

日本アジレントゲノミクスウェブサイト
<http://Agilentgenomics.jp>

製品に関するお問い合わせ先

Phone: 0120-477-111
 Fax: 0120-565-154
 Mail: email_japan@agilent.com

The screenshot shows the Agilent Japan Genomics website. The header includes the Agilent logo and the text 'アジレント・テクノロジー株式会社' (Agilent Technologies Inc.) and 'ライフサイエンスと化学分析' (Life Sciences and Chemical Analysis). The main navigation bar has links for '製品とサービス' (Products and Services), 'お問い合わせ' (Contact Us), 'お問い合わせ' (Contact Us), and 'お問い合わせ' (Contact Us). The main content area is titled 'ゲノミクス' (Genomics) and features a grid of product images and descriptions. A red box highlights the 'バイオアナライザ' (Bioanalyzer) section, which lists various models and their features. Below this, there are sections for '製品紹介' (Product Introduction) and '論文紹介' (Paper Introduction).