

はじめてでも出来る！



バイオアナライザ簡単マニュアル

シリーズII Small RNA キット用

ご注意) 本マニュアルに記載した内容は予告なしに変更することがあります

最新版は巻末のサポートページからダウンロードしてください

キット内容

Agilent Small RNA キット

- Small RNA用ラボチップ25枚
- 電極洗浄用チップ3枚
- シリンジ (1)
- Safe-Lock Eppendorf Tubes PCR clean (DNase/RNase free) (30)
- Small RNA用試薬 (4℃保存)
 - ● Gel (650 μ l x 2vials)
 - ● Dye (70 μ l x 1 vial)
 - ● Marker (内部標準) (600 μ l x 4 vials)
 - ○ Conditioning Solution (270 μ l x 1vial)
 - ● Ladder (分子量標準ラダ) (35 μ l x 1vial) (-20℃, 熱変性後は-80℃)
- スピンフィルタ (2)

ご用意いただくもの

■ RNAサンプル及びラダ調製・分注には下記チューブを推奨します

- Safe-Lock Eppendorf Tubes PCR clean 0.5ml (DNase/RNase free)
Eppendorf社 型番 0030121.023

または

- DNA LoBindチューブ 0.5 ml PCR clean
Eppendorf社 型番 0030 108.035

■ 遠心機

- 1500 x g 及び 13000 x g (rpm表示のみの場合、適宜計算してください)
- 室温で使用

■ ヒートブロック または ウォーターバス (70℃)

■ サンプル保冷用アイスボックス

■ Nuclease-free water



Small RNA Kitは2100 Expert ソフトウェアver02.05以上で
ご使用いただけます

準備に入る前に…



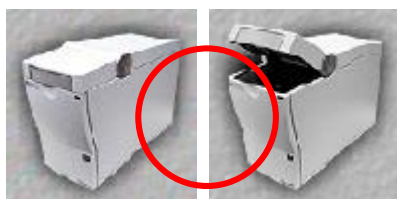
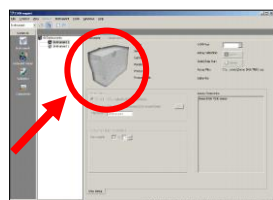
試薬キットの箱は室温（23-25℃前後）で30分以上放置してから
使用します。チップ調製は室温（23-25℃前後）で行ってください。

* 保存条件（4℃）でDyeは凝固しています。完全に融解させたのち、
ボルテックスミキサーでよく攪拌し均一にしましょう。

* 1時間以上使用しない場合、試薬は4℃保管に戻してください



バイオアナライザとPCの電源をいれ、2100 Expertを立上げ
本体とPCが接続されていることを確認してください。



ソフトウェアが装置を
認識しています



ソフトウェアが装置を
認識していません



COM Port セットアップ
接続ケーブル
電源ケーブル
本体スイッチ を
チェックしてください

手順

- 1 電極を洗浄します
- 2 サンプルとラダを調製します
- 3 Gelを調製します
- 4 Gel-Dye Mix を調製します
- 5 チップ調製スタンドを準備します
- 6 チップにGel-Dye Mixを注入します
- 7 チップにConditioning Solutionを入れます
- 8 チップにマーカーを入れます
- 9 チップにラダを入れます
- 10 チップにサンプルを入れます
- 11 マーカーとサンプルを混ぜます
- 12 バイオアナライザで分析します
- 13 電極を洗浄します

2 3
5 は

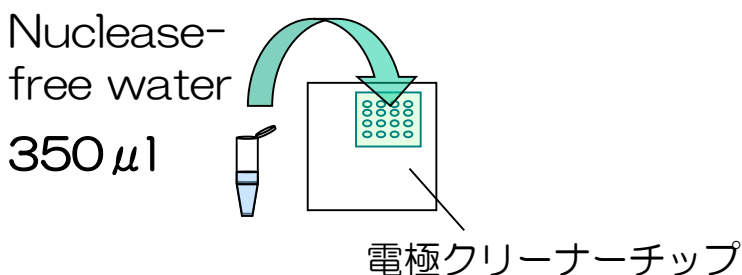
場合によっては
省略できます

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

1 電極を洗浄します 1日の分析の最初に行ってください

電極クリーナーチップで電極を洗浄します(Nuclease-free water)

電極クリーナーチップに
Nuclease-free waterを350 μ l入れます
(どのウェルから入れても構いません)



電極クリーナーをバイオアナライザに
セットし蓋を閉めます



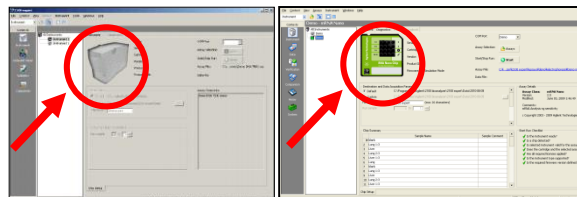
5分後チップを取り出し、**30秒間**蓋を開
けて電極を乾燥させます



RNase に汚染されたり、
汚れのひどい電極を洗浄する方法に
ついては別冊の簡易取扱い説明書を
参考にしてください。



電極クリーナーチップを軽く揺らして
チップの全てのウェルに
Nuclease-free waterが満たされ
るようにします。
蓋を閉めた時にスクリーンの装置の
アイコンがチップに変わること
をご確認ください。



洗浄が終わったら電極クリーナーに
入れたNuclease-free waterは
ピペットで吸い出しておきましょう。



Small RNAキットでは洗浄に
RNase-ZAPを使用しないでください。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

2 サンプルとラダを調製します



RNA低吸着のチューブの使用を推奨します。必ず手袋をしましょう
(「ご用意いただくもの」参照)



サンプルの総量を調整します

総量の目安

total RNA

1-100ng/ μ l

miRNA画分抽出物

1-20ng/ μ l

Oligonucleotide

100-2000pg/ μ l



濃度の濃いサンプルはNuclease-free water等で希釈します。

サンプルの緩衝液条件は下記を守ってください。

10mM Tris and 0.1mM EDTA以下

RNA濃度や塩濃度が非常に高いサンプルはよい分析結果が得られないことがあります。



サンプルを熱処理します

70°C 2分間 ⇒ 氷上で急冷5分間

*氷上に保存しておいたサンプルは処理した当日中に使用しましょう。



Small RNA ラダ*を熱処理します

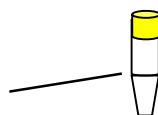
*ラダは別途ご購入いただけます。

キットに含まれているラダ（冷凍保存品）を融解して均一にし
熱処理を行い、その後分注して-80°Cで保存します。



ラダの熱処理が不十分な場合バンドがブロードになったり
ピークが2つに分かれることがあります

Small RNA ラダ(35 μ l)
(黄色のキャップのチューブ)



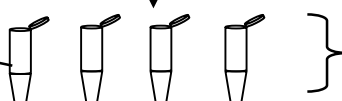
*容器が過熱装置に合わない際は
別チューブに移して熱処理してください

融解

70°C 2分間処理

氷上で急冷5分間

RNase-free チューブ



分注後、-80°C保存

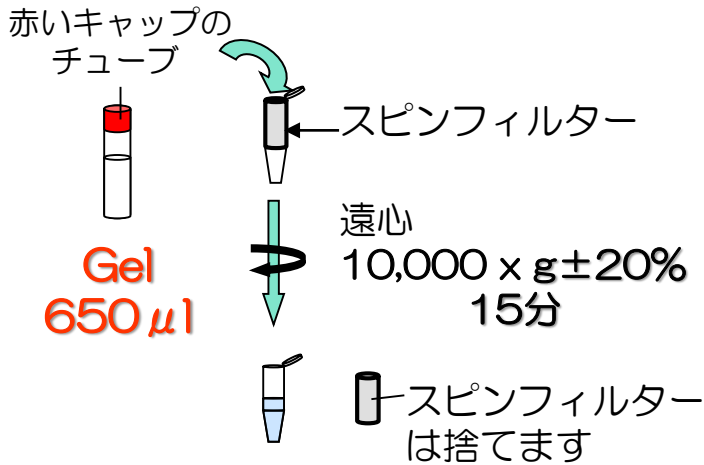


ラダは凍結融解の繰り返しにより分解する場合があります。
繰り返し凍結融解を避けるため、2.5 μ lずつ14本に分注してご使用ください。



3 Gelを調製します

1 Gel (●) 650 μ l (1 vial) をスピンフィルターで遠心濾過します (室温)



試薬キットの箱は室温で30分以上放置してから使用します。

* 試薬の劣化をできるだけ防ぐために、30分の室温放置後はなるべく早く実験を行い、試薬を4℃保管してください。

* 保存条件(4℃)でDyeは凝固しています。完全に融解させたのち、ボルテックスでよく攪拌し均一にしましょう。

* スピンフィルターはキット付属のものを使用します。

* 遠心分離の温度は室温で行います。



Small RNA キットのGelは極めて粘性が高いのでゆっくり吸い上げます。またGelを出す時もゆっくり行いピペットチップにGelが残らないようにしましょう。



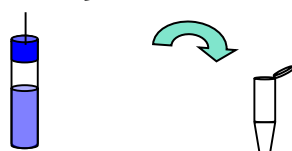
フィルター濾過遠心したGelは**1ヶ月**使用できます(4℃保存)。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

4 Gel-Dye Mixを調製します

1 Kitに添付されている0.5mlチューブにDye(●)2 μ lを入れます

青いキャップの
チューブ



Dye 2 μ l

2 3 でフィルター済みのGelを40 μ l
加え、ピペティングで攪拌します



フィルター後のGel
40 μ l

ピペティングで
均一になるまで
良く混合

3 室温にて13,000 x gで10分間
遠心します



遠心
13,000 x g
10分間



遮光します



Dyeは通常4℃、遮光保存します。

* 保存条件(4℃)でDyeは凝固しています。

Dyeや遠心したGelは必ず**30分以上室温**に置いた後、ボルテックスでよく攪拌し均一化しましょう。



必ずKitに添付の0.5mlチューブを使用してください。



Small RNA KitのGelは極めて粘性が高いので注意してください。40 μ l吸い上げる際はゆっくり行い、ピペットのプランジャーをリリースしてから**15秒以上**経つまでGelの液面から引きあげないでください。はきだす際はピペットチップ内部にゲルが残っていないことを確認してください。



ボルテックスのみでの混合は非常に困難です。ピペティングと転倒混和で十分攪拌されたことを確認してください。



遠心作業終了後は静かに取り出し振動を与えないように注意して直ちに使用してください。



調製したGel-Dye Mixは**調製当日限り**有効です。

余ったGel-Dye Mixは廃棄してください

(分注したゲル65 μ lで調製した

Gel-Dye Mixは**1チップ分**です。

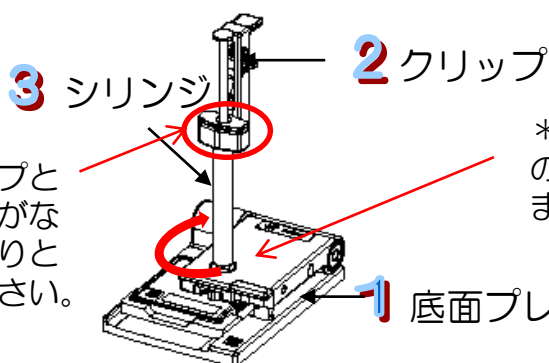
残ったGel-Dye Mixは**使用できません。**)



調製したGel-Dye Mixは**遮光**してください。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

5 チップ調製スタンドを準備します

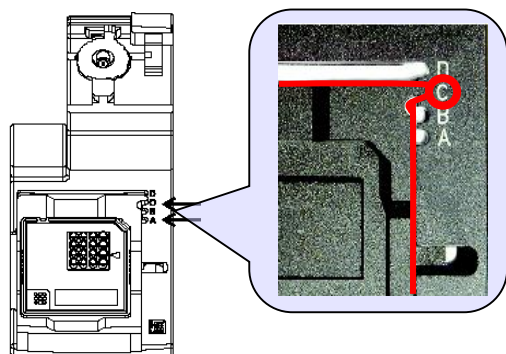


*メタルクリップとシリンジに隙間がないようにしっかりと押し入れてください。

*シリンジを台座に取り付ける際、時計回りの方向でゆるみがない様にしっかりまわして入れてください。

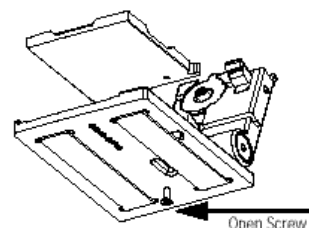
1

底面プレートの位置を C に合わせます



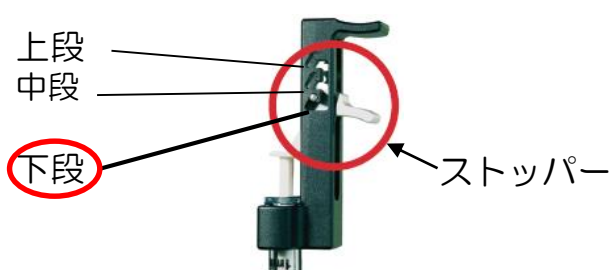
*プレートの位置をかえる場合

チップ調製スタンドの底面裏側にあるネジをプラスドライバーではずしてプレートを移動させた後、再びネジで固定します



2

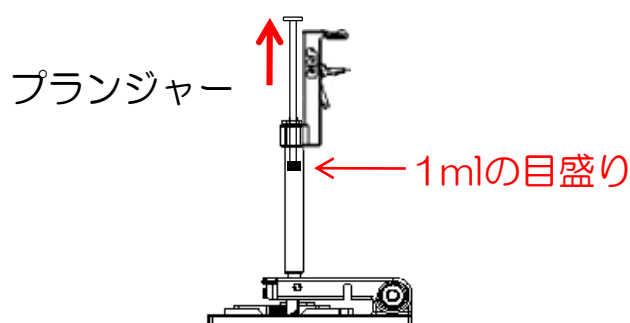
クリップのストッパーの位置を合わせます



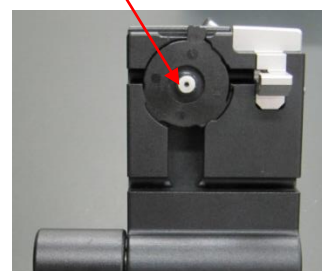
*蓋の裏のシリコンガasketにゲルやほこりなどが付着していたり亀裂が入っていると、ゲルが充填できません。ゲルやほこりなどを取り除いてください。亀裂が入っている場合、新しいものと交換してください。

3

シリンジのプランジャーを1mlの所まで引き上げておきます



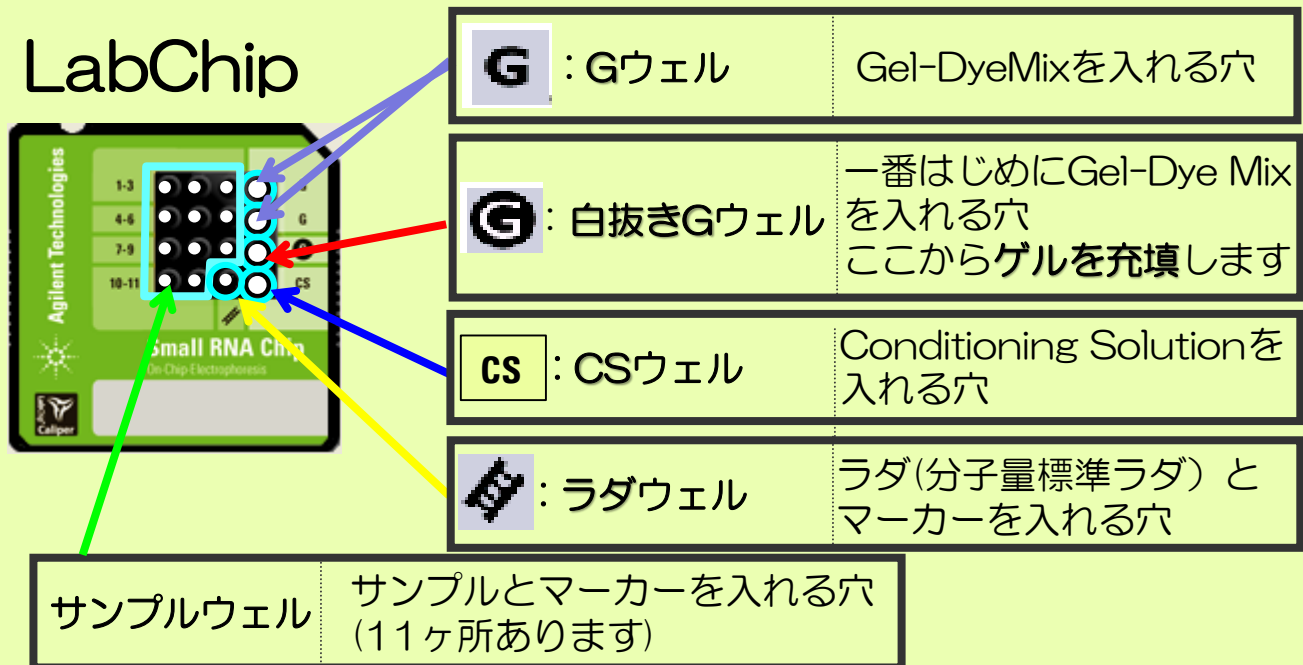
シリコンガasket



*シリンジはキットを新しくした際、または3ヶ月に1度新品に交換してください。

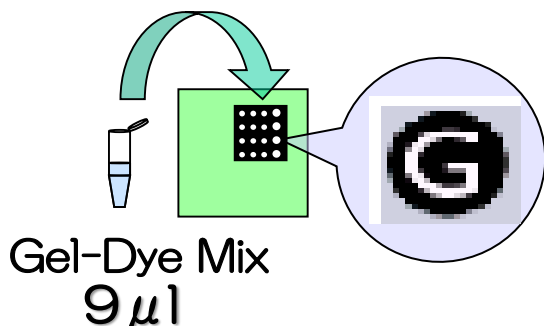
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

6 チップにGel-Dye Mixを注入します

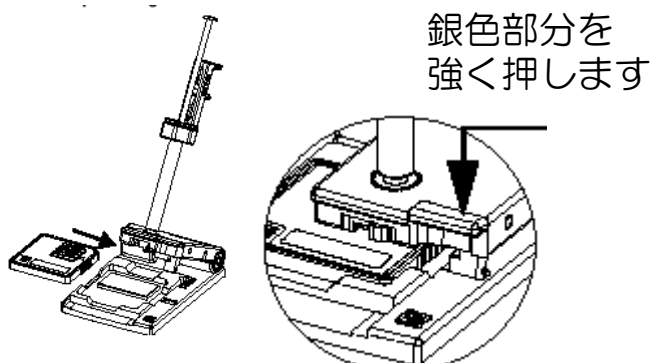


※ LabChipは室温保存します

1 Gel-Dye Mix 9 μ l を **G** (白抜きG) ウェルに入れます



2 チップ調製スタンドの蓋を閉めます



Point

Gel-Dye Mixは底の方や液表面ではなく、**真ん中**を吸うよう極力気をつけてください。

Gelは粘性が高いのでピペッティング作業はゆっくり行いましょう。インバースピペッティングでアプライすることをお勧めします。

インバースピペッティングとは…
第1ストップから少し押した状態で液を吸い上げ、液を出す際には第1ストップで止める方法です。

Point

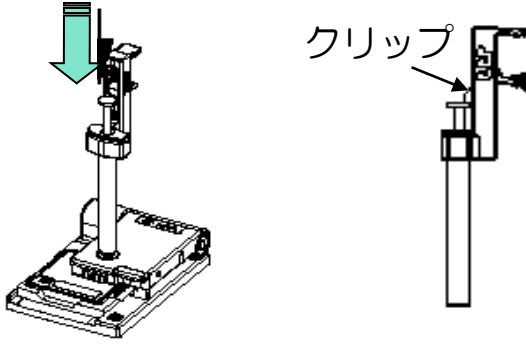
ウェルにGel-Dye Mixを入れる時はピペットチップの先をウェルの底につけるようにします。
(底につけても問題ありません。)

*ウェルに大きな泡がないことを確認し、泡がある場合はピペットチップの先でつぶしましょう。

*正しく閉まると「カチッ」と音がします。

3

プランジャーを押しクリップに
ひっかけます

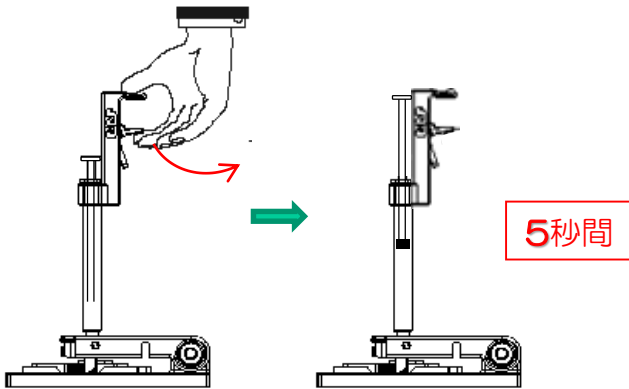


4

そのまま60秒放置します

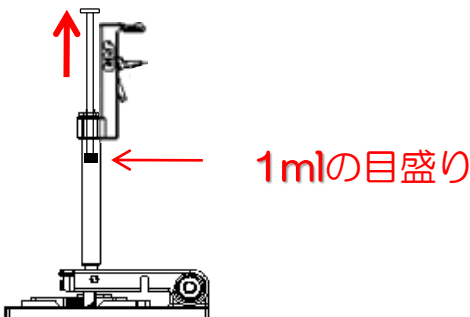
5

クリップのストッパーをはずして
5秒待ちます



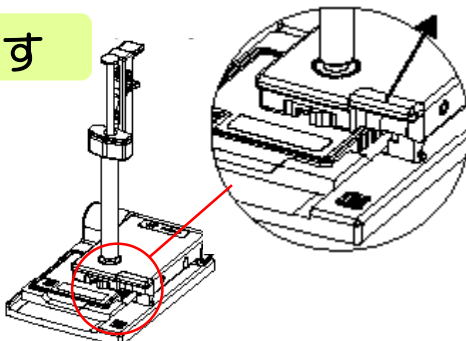
6

プランジャーを元の位置 (1ml) へ
ゆっくり引き上げます



7

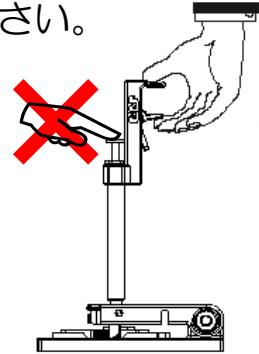
蓋を開けます



60秒はタイマーできちんと
はかりましょう。



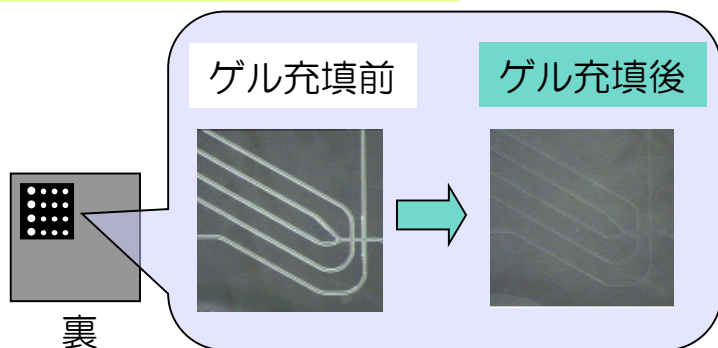
ストッパーをはずす時は
プランジャーに触らないで
ください。



プランジャーを元の位置 (1ml) へ
もどさずに蓋を開けると
Gel-DyeMixが逆流し飛び散ること
があります。

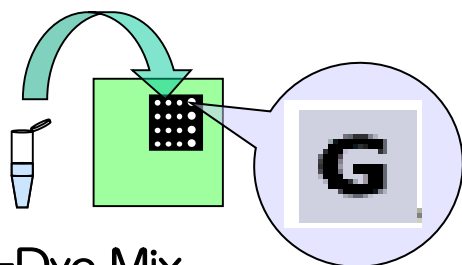
3

チップの確認をします



9

残りの **G** ウェル2ヶ所にGel-Dye Mix
を $9\mu\text{l}$ ずつ入れます



Gel-Dye Mix

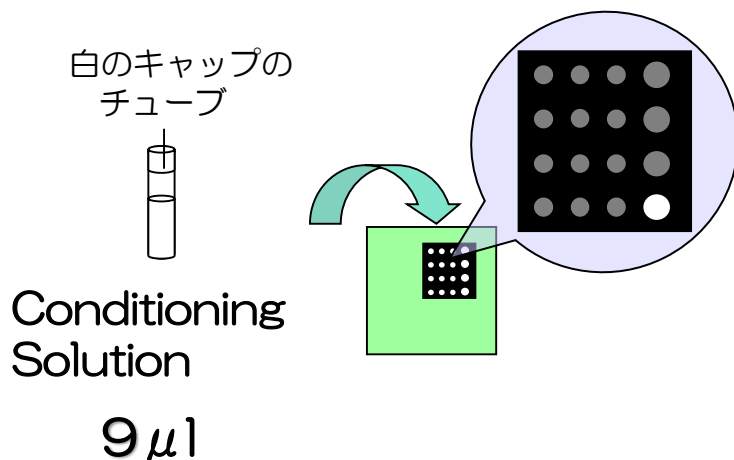
 $9\mu\text{l}$

フローチャート

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----

7 チップにConditioning Solutionを入れます

Conditioning Solutionを **CS** ウェルに
入れます

白のキャップの
チューブConditioning
Solution $9\mu\text{l}$

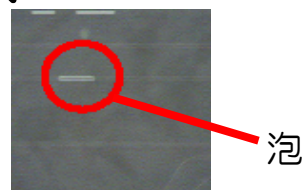
Point

チップを裏返して流路が見えなくなっていたらOK!

流路に泡が入っていないことも確認しましょう。

(流路の形と異なる不定形の大きな泡は無視して下さい。)

✗ 流路に泡が入っている悪い例



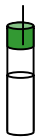
フローチャート



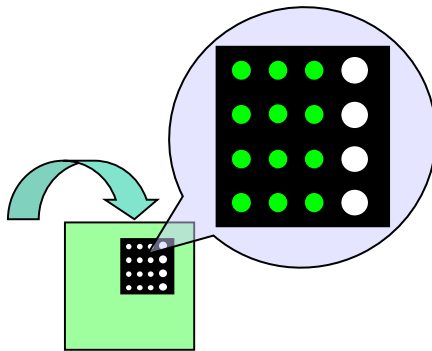
8 チップにマーカーを入れます

マーカー 5 μ lをラダウェル  とサンプルウェル(1-11)に入れます

緑のキャップの
チューブ



Marker
5 μ l



サンプル数が11個以下でも必ず
全てのサンプルウェルにマーカーを
いれましょう。
分析が正常に行われなくなります。

フローチャート

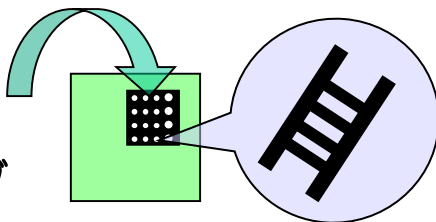


9 チップにラダを入れます

サンプル調製方法 (2 を参照) にしたがって調製したラダ1 μ lを
ラダウェル  に入れます



調製したラダ
1 μ l

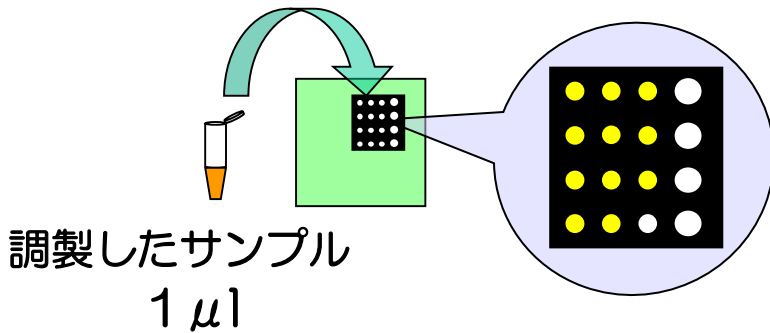


フローチャート



10 チップにサンプルを入れます

サンプル調製方法（ 2 を参照）にしたがって調製したサンプル1 μ lを各サンプルウェルに入れます



フローチャート



11 マーカーとサンプルを混ぜます

専用ミキサーで1分間
サンプルをよく攪拌します



タイマーセット



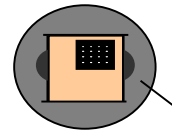
1分間

2400/minの
目盛りに合わせ

Point

チップホルダーにチップを水平に
セットしましょう。

上から見た図 横から見た図



チップホルダー



チップが水平に入っていない悪い例



*専用ミキサーは
2400/minで使します。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

12 バイオアナライザで分析します

調製したチップをバイオアナライザに
セットして分析を開始します

Assayの選択

Small RNAを選択してください



フローチャート

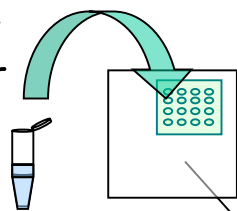
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

13 電極を洗浄します

1 バイオアナライザでの分析終了後
速やかにチップを取り出します

2 電極クリーナーチップで電極を洗浄
します(Nuclease-free water)

電極クリーナーチップ1枚にNuclease-free
waterを350 μ l入れます
(どのウェルから入れても構いません)

Nuclease-
free water350 μ l

電極クリーナーチップ

電極クリーナーをバイオアナライザに
セットし蓋を閉めます

↓
30秒後チップを取り出して、**30秒間**
蓋を開けて電極を乾燥させます



調製したチップは5分以内に分析 を
開始します。
放置時間が長すぎると試料が乾燥
して分析が正常に行われなくなります。

バイオアナライザの操作と解析に
ついては別冊の簡易取り扱い説明書
を参考にしてください。



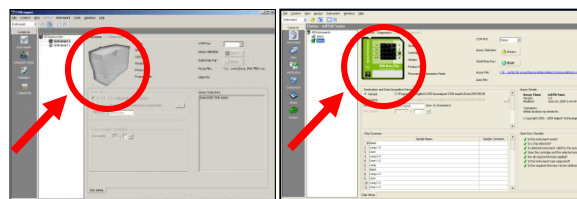
分析の終了したチップは
なるべく早く取り出しましょう。
放置時間が長すぎると試料が
電極にこびりつき、以降の分析が
正常に行われないことがあります。



RNase に汚染されたり、
汚れのひどい電極を洗浄する方法に
ついては別冊の簡易取扱い説明書を
参考にしてください。

Point

電極クリーナーチップを軽く揺らして
チップの全てのウェルにNuclease-
free waterが満たされるようにします。
蓋を閉めた時にスクリーンの装置の
アイコンがチップに変わること
をご確認ください。



簡単プロトコル比較表

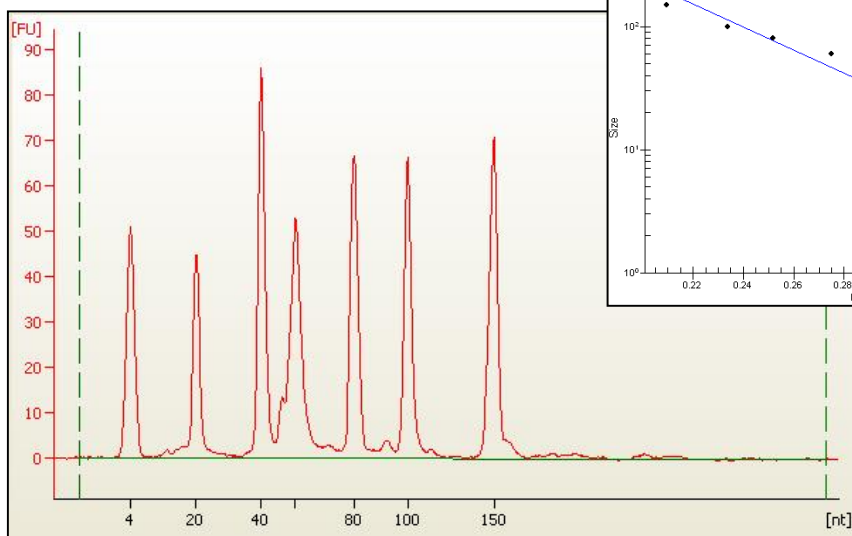
		RNA6000 ナノ	RNA6000 ピコ	Small RNA
分子量範囲		-	-	6-150nt
サンプルの調製		total RNA 25~500ng/ μ l	total RNA 0.2~5ng/ μ l	Total RNA 1~100ng/ μ l
		Poly(A)+RNA 25~250ng/ μ l	Poly(A)+RNA 0.5~5ng/ μ l	miRNA画分抽出物 1~20ng/ μ l
				Oligonucleotide 10~2000pg/ μ l
Gel-Dye Mix	Gel ●	(事前に要フィルター遠心)		
	Dye ●	65 μ l	40 μ l	2 μ l
フィルター遠心	遠心力	Gelのみ 550 μ l 1,500 x g $\pm$ 20% (65 μ l分注)	Gelのみ 650 μ l 10,000 x g $\pm$ 20% (分注なし)	
	時間	10分	15分	
Gel-Dye Mix 再遠心	遠心力	Gel-Dye Mix 13,000 x g		
	時間	10分		
底面プレートの位置		C		
クリップの位置		上段 	下段 	
Gel-Dye Mixのアプライ量		 9 μ l		
Gel-Dye Mixの圧縮時間		30秒	60秒	
Gel-Dye Mixのアプライ量		 9 μ l		
脱色液のアプライ量		なし		
Conditioning Solution (●) のアプライ量		なし	 9 μ l	
Marker (●) のアプライ量		 とサンプルウェル 5 μ l		
ラダ (●) のアプライ量	ナノ・ラダ	ピコ・ラダ	Small RNAラダ	
	 1 μ l			
サンプルのアプライ量		サンプルウェル 1 μ l		
専用ミキサー攪拌時間		60秒		
専用ミキサー攪拌速度		2400/min	2000/min	2400/min

ladder :ラダ（分子量標準ラダ）
ソフトウェア上でラダレーンのピークの位置（Migration Time）を基に
Standard Curveをかきます。それをもとにサンプルの各ピークのサイズを計算します。

黄色キャップの
チューブ



Ladder



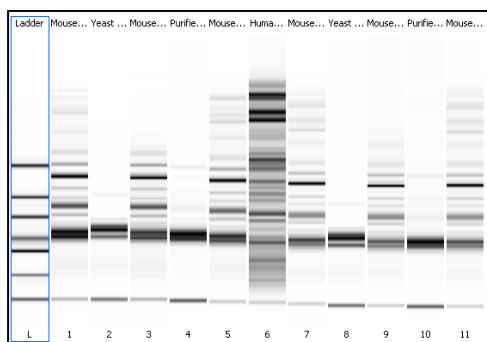
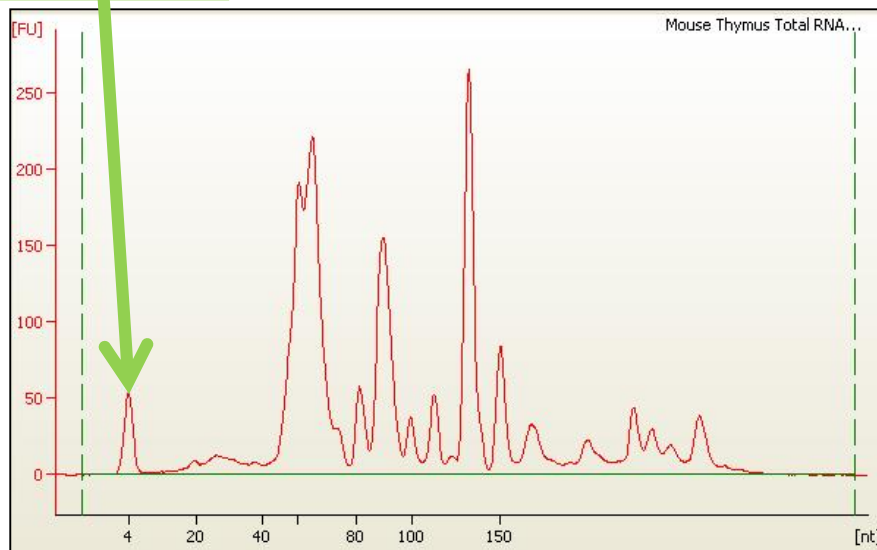
Marker :マーカー（内部標準）
ラダと全てのサンプルに加え、データを補正します。

緑のキャップの
チューブ

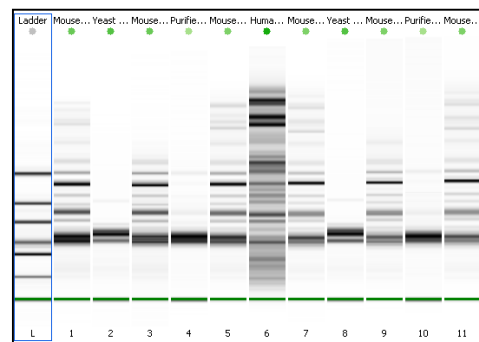


Marker

Lower Marker



補正



Small RNA Kit

マーカー及びラダの各ピークの分子量 (nt)

	Small RNA
LM	4
1	20
2	40
3	60
4	80
5	100
6	150

Tips!

○バイオアナライザのプロトコルなどのダウンロードサイト

https://www.chem-agilent.com/lscabooth/DNAMicroArray/yan_MicroArray.htm#bioA
(ログイン名、パスワードはお問い合わせください。)

○バイオアナライザのシリアルナンバー確認方法

<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1000578#serial>

※本資料掲載の製品は全て研究用です。
その他の用途にご利用いただくことはできません。