Agilent Fragment Analyzer System 簡易マニュアル
dsDNA 935 Reagent Kit (1-1500bp)
DNF-935-K0500 (500 Samples) / DNF-935-K1000 (1000 Samples)

各キットを初めてご使用の際には必ず英語版の Kit Guide をご一読ください。
本マニュアルはソフトウェア 1.1.0.11 以上に対応しています。
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。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures

Version 2024_04

キットの構成

DNF-935-K0500 (500 Samples)

型番	名称	個数
室温保管		
DNF-475-0050	5x Capillary Conditioning Solution, 50 mL	1
FS-SMO15	Mineral Oil Dropper Bottle, 15 mL	1
冷蔵保管 (4°C)		
DNF-930-0240	dsDNA 930 Gel, 240 mL	1
DNF-355-0125	5x 930 dsDNA Inlet Buffer, 125 mL	1
DNF-495-0060	Dilution Buffer 1x TE, 60 mL	1
冷凍保管 (-20°C)		
DNF-600-U030	Intercalating Dye, 30 µL	1
FS-SLR910-0001	100bp DNA Ladder, 1 mL	1
FS-MRK910F-0003	Markers, 1bp & 1500bp*, 3.2 mL	1

DNF-935-K1000 (1000 Samples)

型番	名称	個数
室温保管		
DNF-475-0100	5x Capillary Conditioning Solution, 100 mL	1
FS-SMO15	Mineral Oil Dropper Bottle, 15 mL	1
冷蔵保管 (4°C)		
DNF-930-0500	dsDNA 930 Gel, 500 mL	1
DNF-355-0300	5x 930 dsDNA Inlet Buffer, 300 mL	1
DNF-495-0125	Dilution Buffer 1x TE, 125 mL	1
冷凍保管 (-20°C)		
DNF-600-U030	Intercalating Dye, 30 µL	2
FS-SLR910-0001	100bp DNA Ladder, 1 mL	2
FS-MRK910F-0003	Markers, 1bp & 1500bp*, 3.2 mL	2

* ホルムアミドを含むため、取り扱いに注意してください。

必要な試薬・器具・消耗品

試薬

- **Capillary Storage Solution（GP-440-0100）** キットに付属しておりません。
- **脱イオン水（sub-micron filtered）** 試薬希釈用

消耗品

- **96-well PCR sample plate** サンプル／Marker プレート用 下表のいずれかをご用意ください

メーカー	型番	名称
Eppendorf	951020303 (Various colors)	Eppendorf 96-Well twin.tec PCR Plates, Semi skirted
MidSci	AVRT1	Pryme PCR Ergonomic Plates, 96x0.2ml, Semi Skirted, Natural
BioRad	HSS-9601	Hard-Shell Full-Height 96-Well Semi-Skirted PCR Plates
Azenta (4titude)	4ti-0900, -0770/C	FrameStar 96 semi-skirt
Scientific Specialty	3450-00	96-Well Semi Skirt UltraFlux PCR Plate
Neptune	3742.X	Semi-Skirted 96-Well PCR Plates

- **96-deepwell 1 mL plates** Buffer／廃液プレート用 下表のいずれかをご用意ください

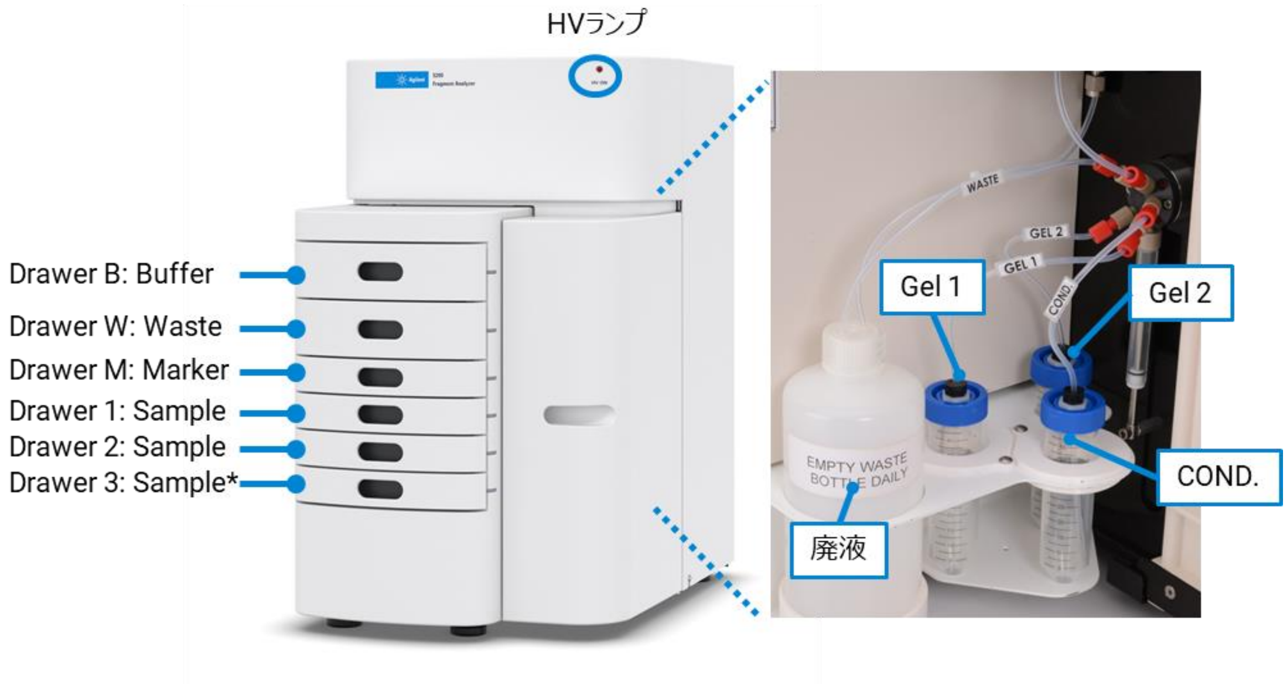
メーカー	型番	名称
Fisher Scientific	12-566-120	Fisherbrand 96-Well DeepWell Polypropylene Microplates; Well Capacity: 1 mL
Thermo Fisher Scientific	260251 / 260252	Nunc 96-Well Polypropylene DeepWell Storage plates
Agilent	P60-20	96 Well Buffer/Waste Tray, case of 50

- **遠沈管** Corning #352070 (50 mL) / Corning #430776 (250 mL)（相当品）
- **プレートシール** プレート遠心時に使用

器具

- **シリンダーまたはピペッター・ディスポピペット**
- **マイクロピペッター・ピペットチップ**
- **ボルテックスミキサー**
- **プレート遠心機**

各部の名称



名称	機能
Drawer B	Buffer プレートをセットします。
Drawer W	廃液プレート（96-deepwell plate）または Open Waste Tray (P60-22) をセットします。
Drawer M	Marker または Rinse プレートをセットします。
Drawer 1-3	サンプルプレートをセットします。 *5300 Fragment Analyzer の場合、Drawer 3 に Storage プレートをセットします。
Gel 1 and 2	調製した Gel-Dye Mix をセットします。
COND.	1x Conditioning Solution をセットします。
廃液	分析ごとに廃液がたまります。
HV ランプ	電圧が印加されている際に点灯します。

はじめに

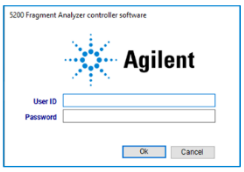
試薬の準備

- **試薬は 30 分以上室温に置いてから使用します。**
- **動作環境温度は 19～25℃です**

システムの起動

PC ➡ 装置 ➡ Fragment Analyzer Controller Software の順にシステムを起動します。

ソフトウェア
アイコン



ログイン画面

- サンプル・試薬調製前にシステムを立ち上げます。
- 初期アカウント設定は以下の通りです。

  User ID: administrator

  Password: 空欄

廃液

1. **Drawer W 内の廃液プレートの廃液を空にします。**

   分析日のはじめまたは 8 分析ごとに行います。

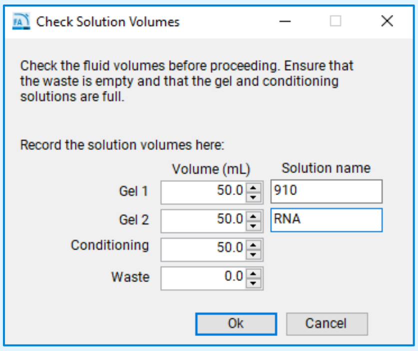
   96-deepwell 1 mL plate の代わりに
   Open Waste Tray (P60-22) を使用できます。

2. **廃液ボトルを空にします。**

   必要に応じて行います。

   ソフトウェア上で 450 mL 以上の液量が入っている場合、
   分析を追加することができません。

ボトルの液量を変更した際にはソフトウェアの
Utilities → Solution Levels
から変更後の液量を入力します。



試薬の調製・セット

Gel-Dye Mix

1. **Separation Gel と Intercalating Dye を混合します。**
   - 液量は次ページを参照ください。
   - Prime を行う場合には 表の液量 + 2.5 mL 分を使用します。
   - 泡立てないように転倒混和でゆっくり、しっかりと撹拌します。
2. **装置にセットします。**
   - Gel 1 または Gel 2 にセットし、ソフトウェアから液量を変更します。
   - 液量が不足している場合は分析を入力することができません。

- Intercalating Dye は遮光状態で30 分以上室温に戻し、よく攪拌してから使用してください。
- 調製した Gel-Dye Mix は遮光・常温で保管し、調製後 2 週間まで使用できます。

1x Conditioning Solution

1. **5x Conditioning Solution を希釈します。**
   - 液量は次ページを参照ください。
   - 脱イオン水で 5 倍に希釈し、泡立てないように混合します。
2. **装置にセットします。**
   - COND.のラインにセットし、ソフトウェアから液量を変更します。
   - 液量が不足している場合は分析を入力することができません。

希釈した 1x Conditioning Solution は室温で保管できます。
希釈後もボトル記載の期限内にご使用ください。

Prime

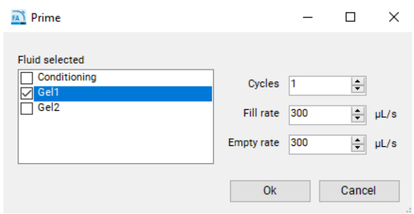
Prime は流路の溶液を置換する際に行います。**2.5 mL** の溶液を使用します。

使用する Gel-Dye Mix の種類を切り替える、ライン中の古い溶液を交換する、流路中の気泡を取り除く際に行います。

分析開始前に行う場合：

メニューバーより Utilities > Prime を選択します。

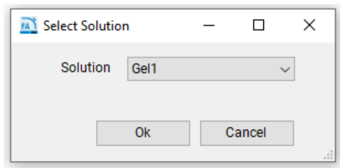
Prime を行う溶液にチェックを入れ、OK をクリックすると Prime が始まります。



自動分析中に行う場合：

Method Queue 上で右クリックし、Insert Prime を選択します。

Prime を行う溶液を選択し OK をクリックすると Method Queue（12 ページ）に追加されます。



必要な試薬液量

5200 Fragment Analyzer（12 本キャピラリ）

分析サンプル数 (分析回数)	Intercalating Dye	Separation Gel	1x Conditioning Solution
12 (1)	1.0 µL	10 mL	10 mL
24 (2)	1.5 µL	15 mL	15 mL
36 (3)	2.0 µL	20 mL	20 mL
48 (4)	2.5 µL	25 mL	25 mL
96 (8)	4.5 µL	45 mL	45 mL

5300 Fragment Analyzer（48 本キャピラリ）

分析サンプル数 (分析回数)	Intercalating Dye	Separation Gel	1x Conditioning Solution
48 (1)	2.5 µL	25 mL	25 mL
96 (2)	4.0 µL	40 mL	40 mL
144 (3)	5.5 µL	55 mL	55 mL
192 (4)	7.0 µL	70 mL	70 mL
288 (8)	10.0 µL	100 mL	100 mL

5300 Fragment Analyzer（96 本キャピラリ）

分析サンプル数 (分析回数)	Intercalating Dye	Separation Gel	1x Conditioning Solution
96 (1)	4.0 µL	40 mL	40 mL
192 (2)	8.0 µL	80 mL	80 mL
288 (3)	12.0 µL	120 mL	120 mL
384 (4)	16.0 µL	160 mL	160 mL
480 (5)	20.0 µL	200 mL	200 mL

1x Inlet Buffer

1. 5x dsDNA 930 Inlet Buffer を希釈します。

- 脱イオン水で 5 倍に希釈し、泡立てないように混合します。

希釈した 1x Inlet Buffer は 4℃で保管できます。
希釈後もボトル記載の期限内に使用ください。

2. Buffer Plate に分注します。

- 96-deepwell 1 mL plate 指定の Well に 1 x Inlet Buffer を **1 mL** ずつ加えます。

 12 本キャピラリ：A 行のすべての Well
 48 本キャピラリ：A-D 行すべての Well
 96 本キャピラリ：すべての Well

1x Inlet Buffer は分析日の始めに交換します。
継ぎ足さずに新しい溶液に交換します。

12 本キャピラリの場合はステージを Park にして Plate を取り出してください。操作方法はステージの操作をご参照ください

Buffer プレートは定期的に新品に交換してください。

3. Drawer B にセットします。

- 分注した Buffer プレートの A 行が奥側となるようにセットします。

Storage Solution の交換

1. Storage プレートを取り出します。

- ステージ操作アイコンの Park をクリックし、
Storage Buffer が分注されたプレートを取り出します。

 5200 Fragment Analyzer：
 Drawer B の Buffer プレート (96-deepwell 1 mL plate)

 5300 Fragment Analyzer：
 Drawer 3 の 96-well sample plate

Storage Solution の交換は 2～4 週間に 1 度行ってください。
設置環境によって頻度は変わります。

Storage プレートは定期的に新品に交換してください。

2. Storage Solution を交換します。

- プレートに残っている Storage Solution を廃棄し、新しい Storage Solution を加えます。

 12 本キャピラリ：H 行のすべての Well に 1 mL
 48 本キャピラリ：A-D 行すべての Well に 100 µL
 96 本キャピラリ：すべての Well に 100 µL

3. プレートをセットします。

- もとの Drawer に戻し、ステージ操作アイコンの Store をクリックします。

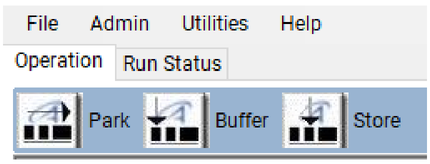
ステージの操作

ソフトウェア左上のステージ操作アイコンより、ステージを操作できます。

Park：ステージが保持しているプレートを Drawer に戻します。

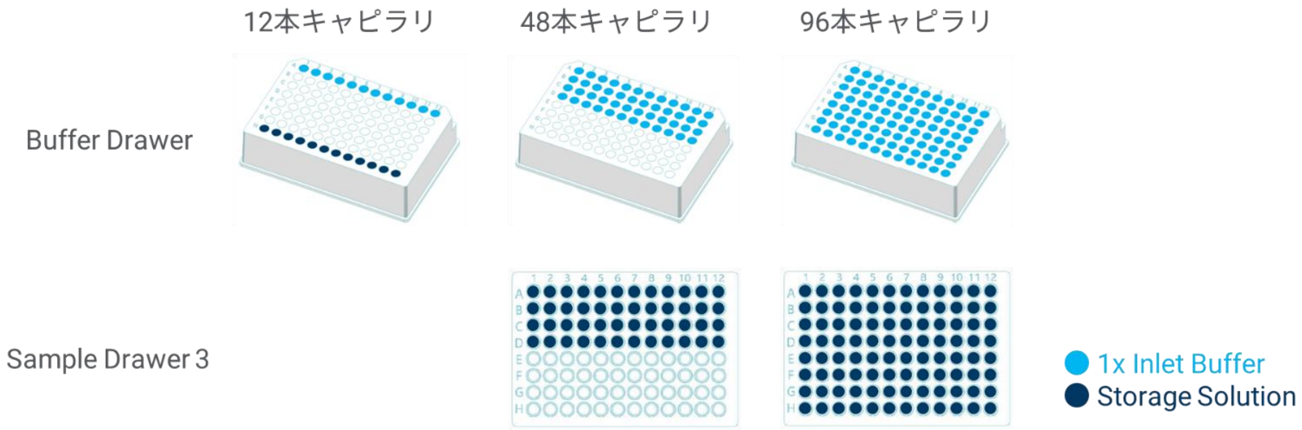
Buffer：1x Inlet Buffer がキャピラリに浸る位置にプレートを移動します。

Store：Storage Solution がキャピラリに浸る位置にプレートを移動します。



ステージ移動画面が表示されている、およびステージの動作音がしている間は Drawer を開けないでください。

dsDNA 935 Kit (1-1500bp)



Marker

1. Marker を分注します

Marker は室温に戻した後、よく攪拌してく使用してください。

- 96-well sample plate の指定の Well に **30 µL** 分注します。

  12 本キャピラリ：A 行のすべて

  48 本キャピラリ：A-D 行

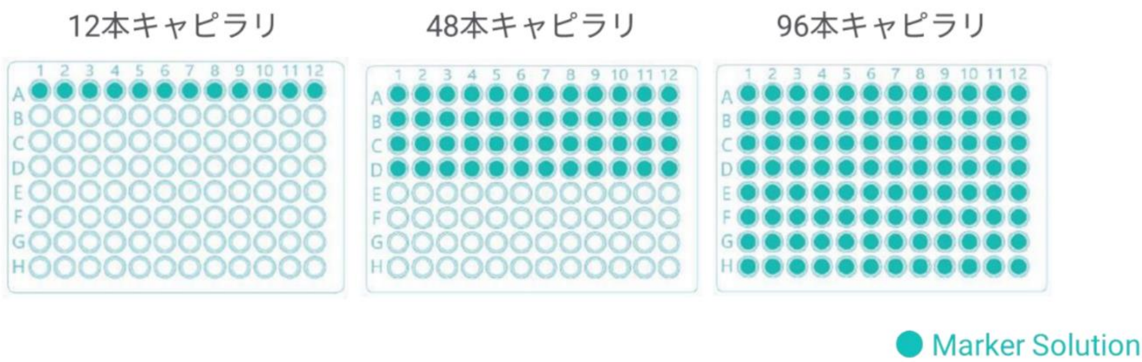
  96 本キャピラリ：すべての Well

> Marker プレートは 1 か月に 1 回の交換を推奨します。
>
> Marker プレートは約 30 分析再利用することが可能です。
>
> 4℃あるいは －20℃で保管してください。

2. 分注した Well に Mineral Oil を 1 滴、滴下します

3. Marker プレートを Drawer M にセットします

- プレートの A 行が奥側になるようにセットします。



サンプル・Ladder の調製

サンプル推奨濃度

0.5～50 ng/µL（input DNA）

濃度が高い場合には 1x TE で希釈してください。

Ladder は室温に戻した後、よく撹拌して使用してください。
サンプル・Ladder の調製には指定の 96-well PCR sample plate を使用してください。

1. Ladder を指定の Well に 24 µL 分注します。

12 本キャピラリ：分析行 12 列目

48 本キャピラリ：D12 または H12

96 本キャピラリ：H12

過去に分析した Ladder データを基にサイズ・濃度測定を行うことが可能です。その場合には Ladder Well でサンプルを分析することが可能ですが、キットスペックより測定精度は下がるのでご注意ください。

2. サンプルを分析する Well に Diluent buffer 1xTE を 22 µ L ずつ分注します。

空の Well には Dilution buffer を 24 µL 加えます。

3. サンプルを 2 µL ずつ加えます。

4. サンプルとバッファを混合します。

推奨の混合方法は以下の通りです。

・プレートをシールし、3,000 rpm で 2 分間ボルテックス　または

・ピペッターを 20 µL にセットし、5～10 回ピペッティング

5. サンプルプレートをセットします。

プレートをシールし、スピンダウンして溶液中の気泡を取り除いた後、プレートシールをはがし、Drawer 1～3 のいずれかにセットします。

長時間の分析となる場合はサンプルの蒸発を防ぐため、ミネラルオイルを各 Well に 1 滴、滴下します。

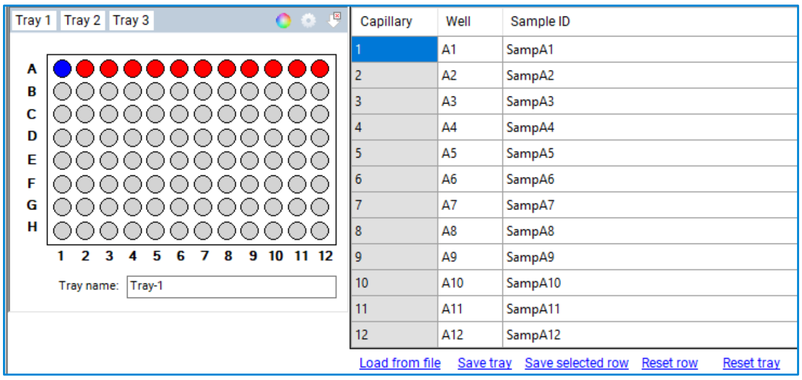
プレートは A 行が奥側となるようにセットします。

分析

サンプルの選択・入力

1. **分析するトレイ・サンプルを選択します。**
   - 画面左上のプレートマップから選択します。

2. **サンプル名を入力します。**
   - 直接入力、あるいは csv, txt ファイルのインポートができます。
   - その他以下の操作を行えます。

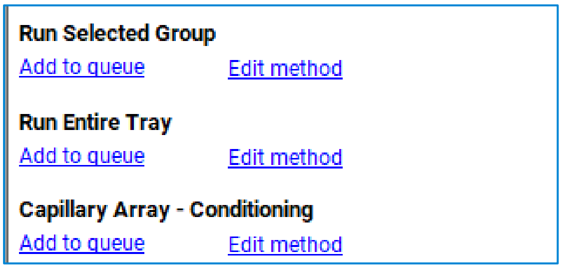


Load From File	.txt、.csv 形式のファイルをインポートします。
Save Tray	選択トレイのサンプル名を出力します。
Save Selected Row	選択行のサンプル名を出力します。
Reset Row	選択行のサンプル名をデフォルトに戻します。
Reset Tray	選択トレイのサンプル名をデフォルトに戻します。

分析 Method の入力

1. Add to queue をクリックします。

- 選択したサンプル位置の分析を行う場合は
“Run Selected Group” の “Add to queue” を
クリックします。
- 1 トレイ全体の分析を行う場合、
“Run entire Tray” の “Add to queue” を
クリックします。



2. Method を入力します。

- “Method” プルダウンメニューから
DNF-935-(22/33/55)* - DNA 1-1500bp.mthds
を選択します。

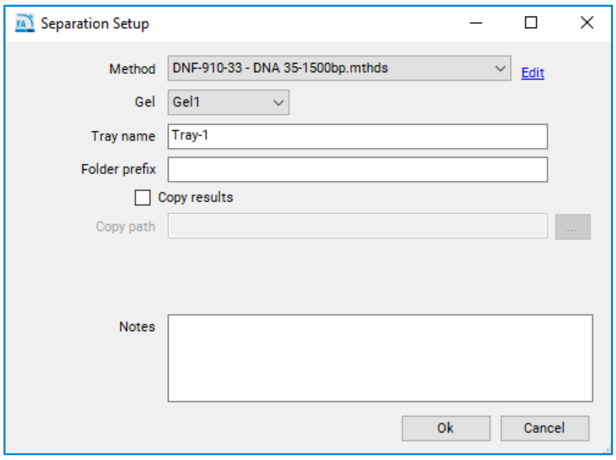
  *使用するキャピラリの長さによって変わります。
  （Ultra-Short：22、Short：33、Long：55）
- “Edit” から Marker を分注した Well の位置を
変更できます。
- “Gel” プルダウンメニューから使用する Gel を選択します。
- その他の項目は必要に応じて入力します。

  Tray name：トレイ名

  Folder Prefix：フォルダ名の接頭

  Copy results：分析結果のコピーを別のフォルダに保存できます。
  チェックを入れた場合、Copy Path より保存先を指定してください。

  Notes：自由記入欄

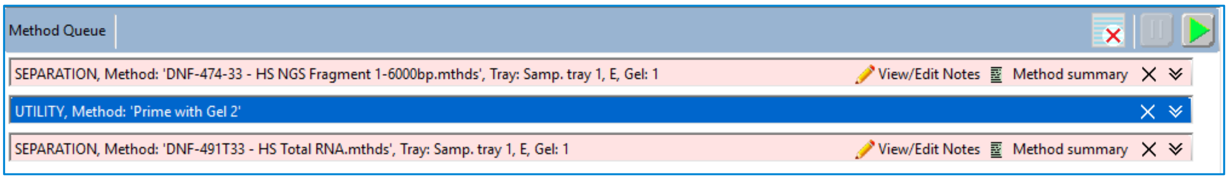


3. OK をクリックします。

- Method Queue に分析が追加されます。

Method Queue

- Method Queue には入力した分析・コンディショニングメソッドが表示されます。
- 分析を開始するとリストの上のアイテムから連続分析を行います。
- メソッドの順序はアイテムをドラッグすることで変更できます。



 ***Clear***	Method Queue 内のメソッドをすべて削除します。
 ***Pause***	現在行っているメソッドが完了した後、連続分析を中断します。
 ***Start***	メソッドを開始します。
View/Edit Notes	分析メモの確認・入力ができます
Method Summary	Method の詳細を表示・編集が行えます
×	入力した Method を削除します

以下は Method Queue 上で右クリックすることで表示することができます。

Insert Pause	連続分析の一時停止を Queue に追加します。
Insert Prime	Prime のメソッドを Queue に追加します。 連続分析中に使用するゲルを切り替える際に使用します。

分析の開始

1. 分析開始前に、下記について再度確認します。

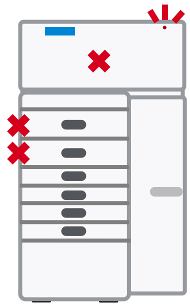
- Drawer が完全に閉じていますか？
- プレートは A 行が奥向きになるようセットされていますか？
- プレートシールははがされていますか？

2. Method Queue の をクリックします。

Full Conditioning を行い、ゲル充填後にサンプルのインジェクション、電気泳動を行います。
Method Queue に入力された分析をリストの上から順に連続で行います。

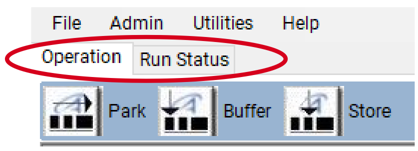
分析中の注意点

分析中は以下の点にご注意ください。



- ステージ稼働中に Drawer を開けないでください。
- 泳動中（HV ランプ点灯中）に Drawer B、Drawer W、装置上部のフードを開けないでください。
- 分析中に装置以外の機器との USB 通信を行わないでください。

分析中の操作



- 分析を開始すると“Run Status”タブに自動で切り替わります。
“Run Status”タブは装置で行っている動作を確認することができます。
- “Operation”タブから追加の分析を入力できます。
- 分析を中断する場合には、“Run Status”画面右上の Abort all を選択します。

  次の分析が自動で始まります。
  連続分析を中断する場合には“Method Queue”の Pause をクリックしてから“Abort all”を選択して下さい。

分析の終了

- Method Queue に入力したすべての分析が完了すると、“Operation”タブに自動で戻ります。
ProSize Data Analysis Software よりデータの確認・解析を行ってください。
- データはデフォルトで以下に保存されています。

  C:¥Agilent Technologies¥Data¥(日付ごとのフォルダ)¥
- 廃液を捨て、ソフトウェア ➡ 装置 ➡ PC の順にシステムをシャットダウンします。

Kit スペック

		DNF-935 dsDNA 935 Kit (1-1500bp)
サイズ範囲		100 – 1,500 bp
サイズ真度 [1]		± 15% or better
サイズ再現性 [1]		2% CV
ピーク分離能 [1]	US	1 - 100 bp ≤ 15% 100 - 1500 bp ≤ 10%
	S	1 - 100 bp ≤ 15% 100 - 1,000 bp ≤ 10%
	L	1 - 1,500 bp ≤ 5%
推奨濃度範囲		0.5 - 50 ng/μL (input DNA)
泳動時間	US	15 min.
	S	20 min.
	L	35 min.

[1] Results using DNA Ladder of DNA Fragment standards initially prepared in 1x TE buffer
US = Ultra Short, S = Short, L = Long (Ultra Short は 5200 Fragment Analyzer のみ)

プロトコルなどのダウンロードサイト

https://www.chem-agilent.com/lsca-booth/DNAMicroArray/yan_MicroArray.htm

（ログイン ID、パスワードはお問い合わせください。）

製品に関するお問い合わせ

Tel: 0120-477-111

Mail: email_japan@agilent.com

電話・メール受付時間 土、日、祝祭日、5/1 を除く

9：00～12：00、13：00～17：00