Agilent Femto Pulse System 簡易マニュアル

Genomic DNA 165kb Kit

FP-1002-0275 (275 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 1.0 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

FP-1002-0275 (275 Samples)

型番	名称	個数
室温保管		
DNF-425-0050	5x Capillary Conditioning Solution, 50 mL	1
GP-435-0100	Storage Solution, 100 mL	1
	Eppendorf LoBind 0.5 mL Tubes (Bag of 50)	1
	Wide-Bore Genomic Pipette Tips, 1 Box	1
冷蔵保管 (4°C)		
FP-5001-0250	FP Large DNA Separation Gel, 250 mL	1
DNF-325-0075	5x Inlet Buffer, 75 mL	1
DNF-497-0060	0.25x TE Rinse Buffer, 60 mL	1
DNF-498-0012	Dilution Buffer 0.25x TE, 12 mL	1
DNF-306-0005	BF-P25 Blank Solution, 5 mL	1
冷凍保管 (-20°C)		
FP-6001-U030	FP Intercalating Dye, 30 µL	1
FP-7002-U035	FP 165 kb Ladder*, 35 µL	1
FP-8001-0003	FP gDNA Diluent Marker, 3 mL	3

* Ladder は高分子 DNA を含むため、物理的衝撃をできる限り与えないように取り扱いください。

必要な試薬・器具・消耗品

試薬

- **脱イオン水（sub-micron filtered）** 試薬希釈用
- **ミネラルオイル** 必要に応じてご用意ください。

消耗品

- **96-well PCR sample plate** サンプル／Rinse 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

- **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

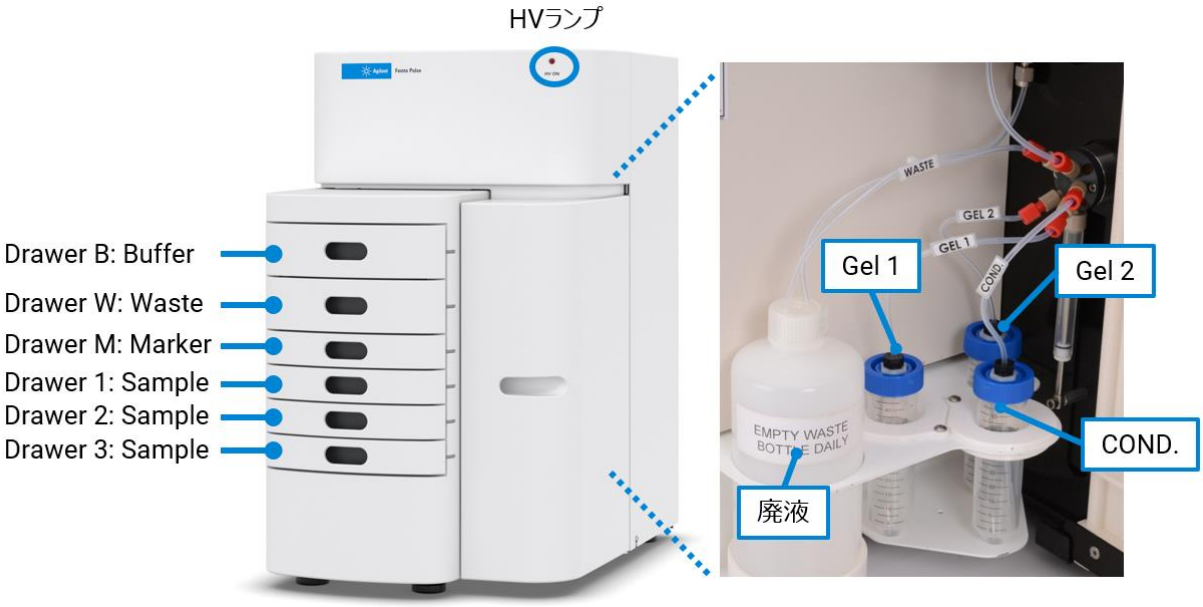
メーカー	型番	名称
Fisher Scientific	12-566-120	Fisherbrand 96-Well DeepWell Polypropylene Microplates: Well Capacity 1 mL
Agilent	P60-20	96-Well Buffer/Waste Tray, case of 50

- **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	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。
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

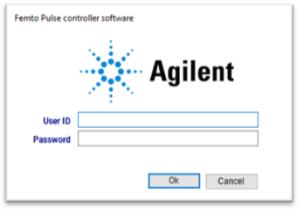
試薬の準備

- **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 ➡ Femto Pulse 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。

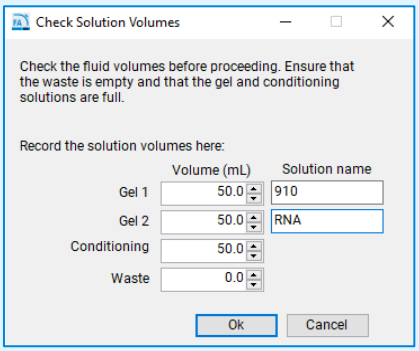
   96-deepwell 1 mL plate の代わりに
   Open Waste Tray (P60-22) を使用できます。

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、しっかりと攪拌します。
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。
- 分析日ごとに調製してください。

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。

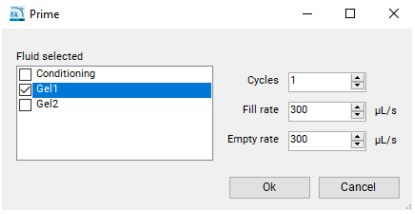
希釈した 1x Conditioning Solution は室温で保管できます。
希釈後もボトル記載の期限内にご使用ください。

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。

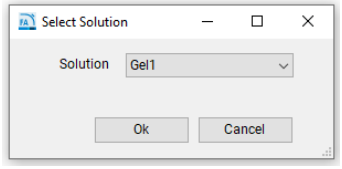
分析開始前に行う場合：

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（13 ページ）に追加されます。



必要な試薬液量

Gel-Dye Mix

分析サンプル数 (分析回数)	Intercalating Dye	Separation Gel
12 (1)	1 µL	10 mL
24 (2)	2 µL	20 mL
36 (3)	3 µL	30 mL
48 (4)	4 µL	40 mL
96 (8)	8 µL	80 mL

Gel-Dye Mix _20 min Conditioning (p.8) を行う場合

分析サンプル数 (分析回数)	Intercalating Dye	Separation Gel
12 (1)	1.5 µL	15 mL
24 (2)	2.5 µL	25 mL
36 (3)	3.5 µL	35 mL
48 (4)	4.5 µL	45 mL
96 (8)	8.5 µL	85 mL

1x Conditioning Solution

分析サンプル数 (分析回数)	1x Conditioning Solution
12 (1)	10 mL
24 (2)	20 mL
36 (3)	30 mL
48 (4)	40 mL
96 (8)	80 mL

1x Conditioning Solution_20 min Conditioning (p.8) を行う場合

分析サンプル数 (分析回数)	1x Conditioning Solution
12 (1)	25 mL
24 (2)	35 mL
36 (3)	45 mL
48 (4)	55 mL
96 (8)	95 mL

1x Inlet Buffer

1. **5x 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 を取り出し、分注します。**
   - ステージ操作アイコンの Park をクリックし、ステージ移動完了後に取り出します（「ステージの操作」参照）
   - 96-deep well 1 mL plate の A 行すべての Well に 1 x Inlet Buffer を **1 mL** ずつ加えます。

1x Inlet Buffer は分析日の始めと 8 分析ごとに交換します。
継ぎ足さずに新しい溶液に交換します。

   - Storage Solution の交換を行う場合、引き続き Storage Solution の交換に進んでください。

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。

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。
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。

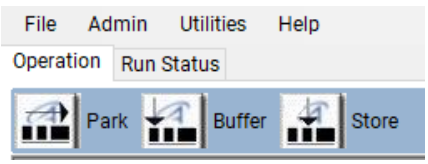
ステージの操作

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。



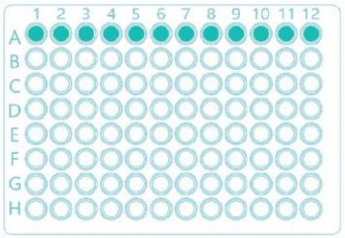
ステージ移動画面が表示されている、およびステージの動作音がしている間は Drawer を開けないでください。

Rinse Buffer

1. **0.25x TE Rinse Buffer を分注します。**
   - 96-well sample plate の A 行すべての Well に **200 µL** 分注します。

Rinse Buffer は分析日の始めに新しく分注します。
分注位置を変更する場合は分析 Method の
入力時に Edit より指定を変更する必要があります。

2. **Rinse 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。



● Rinse Buffer

20 min Conditioning（推奨）

- Genomic DNA 165 kb Kit では最良の分析結果を得るために、1 日の分析の始めに行うことを強く推奨します。
- キャピラリのコンディショニングは分析に加え、Gel-Dye Mix を 5 mL、1x Conditioning Solution を 15 mL 使用します。

1. 画面左部の Capillary Array – Conditioning より Add to Queue を選択します。
2. 20 min Conditioning を選択し、OK をクリックします。
3. Method Queue の をクリックすると Conditioning が開始します。

サンプル・Ladder の調製

- Ladder は高分子 DNA を含むため、物理的衝撃をできる限り与えないように取り扱いください

Ladder の分注

1. **Ladder を混合します。**
   ピペットの目盛りを 15 µL にセットし、付属の Wide-bore tips を用いて、3 回ゆっくりとピペッティングをします。

Ladder を初めて使用する際に行ってください。
Ladder は使用前に室温で 30 分間静置します。

2. **Ladder を分注します。**
   付属の Wide-bore tip、LoBind Tube を使用し、Ladder を 5 µL ずつ分注します。
   - 分注した Ladder は -20℃あるいは 2 週間以内の使用であれば 4℃に保管してください。
   - 凍結融解を 5 回以内で使用してください。

Ladder の調製

1. **Ladder を溶解します。**
   分注済みの Ladder を使用前に 30 分以上室温に静置します。

Ladder・サンプルの調製には指定の 96-well PCR sample plate を使用してください。

2. **Dilution Buffer を分注します。**
   付属の LoBind Tube に 9 µL の 0.25x TE Dilution Buffer を加えます。

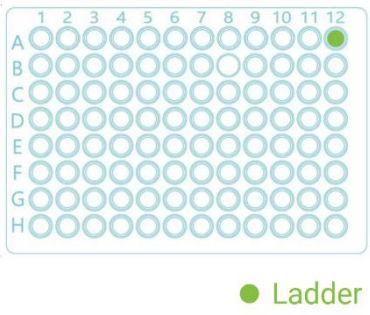
Diluent Marker は室温に戻し、攪拌してから使用してください。

3. **Marker を加えます。**
   ステップ 2 のチューブに 90 µL の Diluent Marker を加え、ボルテックスします。

4. **Ladder と Marker を混合します。**
   I. ピペットの目盛りを 5 µL にセットし、Wide-bore tip を用いて Ladder を 1、2 回ゆっくりとピペッティングします。
   II. ステップ 3 で調製した溶液に 1 µL の Ladder を加えます。
   III. ピペットの目盛りを 20 µL にセットし、Wide-bore tip を用いて 5 回ゆっくりとピペッティングしてください。

調製した Ladder はその日のうちに使用してください。

5. **Ladder をサンプルプレートに分注します。**
   調製した Ladder を分析する行の 12 列目の Well に 20 µL 加えてください。



サンプルの調製

サンプル推奨濃度

フラグメント：0.3～30 pg/μL、スメア：5～500 pg/μL
濃度が高い場合には Dilution Buffer 0.25x TE で
希釈してください。

サンプルは使用前に 30 分間室温に
静置してください。

サンプルを攪拌するときは Wide-bore tips を使用し、ゆっくりとピペッティングを行ってください。

Diluent Marker は室温に戻し、攪拌してから使用してください。

1. **1～11 列目の Well に 18 μL の Diluent Marker を加えます。**

空の Well には Blank Solution, Diluent Marker, 1x TE 等のバッファーを 20 μL 加えます。

2. **2 μL の DNA サンプルを Diluent Marker を分注した Well に加えます。**

3. **Diluent Marker とサンプルを混合します。**

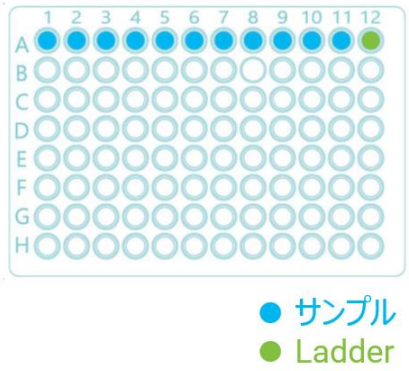
   ピペットの目盛りを 18 μL にセットし、Wide-bore tip を用いて
   2、3 回ゆっくりとピペッティングします。

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。

4. **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。

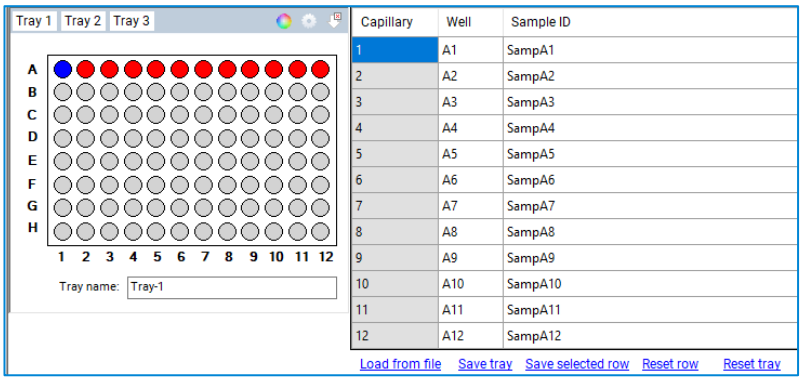


分析

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。

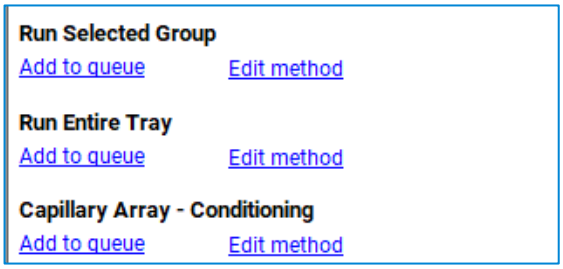


Load From File	.txt、.csv 形式のファイルをインポートします。
Save Tray	選択トレイのサンプル名を出力します。
Save Selected Row	選択行のサンプル名を出力します。
Reset Row	選択行のサンプル名をデフォルトに戻します。
Reset Tray	選択トレイのサンプル名をデフォルトに戻します。

分析 Method の入力

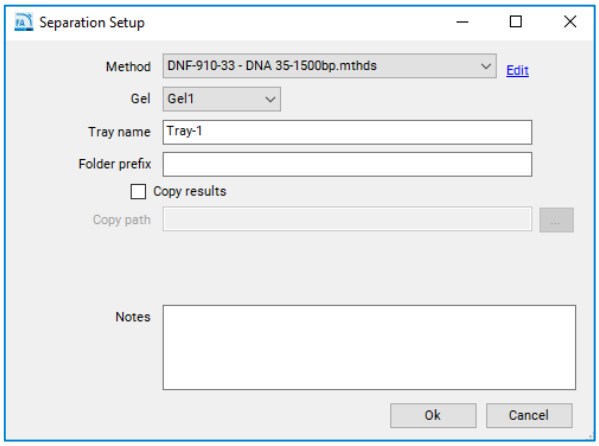
1. Add to queue をクリックします。

- 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以下のいずれかを選択します。
  - FP-1002-22 - gDNA 165Kb：短時間で分析できます。
  - FP-1002E22 - Extended gDNA 165 Kb：
    50 kb 以上で高い分離能が得られます



- “Edit” から Rinse Buffer 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。

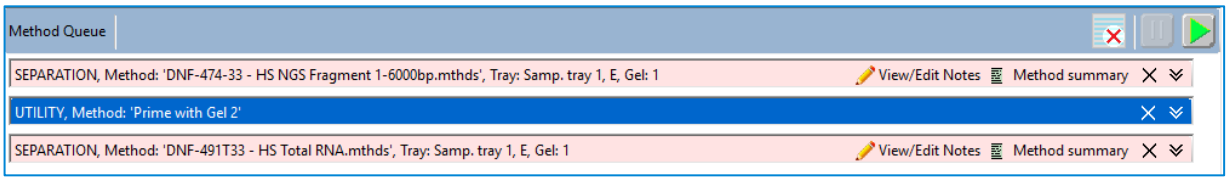
  Notes：自由記入欄

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。

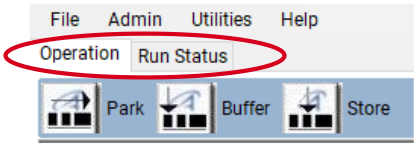
Method Queue に入力された分析をリストの上から順に連続で行います。

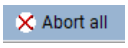
分析中の注意点

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 

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。

Method D によるキャピラリ洗浄

- 高分子領域のシグナルが検出されない場合、行ってください。
- 本 Kit をご使用の場合、最低でも月に 1 度行っていただくことを推奨します。

【ご用意いただくもの】

- Open Waste Tray（装置納品時に 1 つ付属しています。#P60-22）
- 0.5N NaOH 25 mL（取り扱いにご注意ください）
- 1x Conditioning Solution 35 mL（分析 1 回分を含む）
- Gel-Dye Mix 20 mL（分析 1 回分を含む）

【手順】

1. 1x Conditioning Solution、0.5N NaOH、Gel-Dye Mix を装置にセットします。
   - NaOH は Gel2 に、Gel-Dye Mix は Gel1 にセットしてください。
   - NaOH のバーコード入力は扉裏側のバーコードを使用してください。
2. Waste Drawer（上から 2 段目）にからの Open Waste Tray をセットしてください。
   - 1 mL Deep well プレートは使用しないでください。
3. Capillary Array – Conditioning から Add to queue をクリックしてください。
4. “Method D Flush – 0.5N NaOH – Conditioning - Gel.mthdc” を選択し、OK を選択してください。
5. をクリックし、洗浄を開始してください。洗浄には約 50 分かかります。
6. 洗浄後すくに 20min Conditioning（p.8 参照）を行います。
7. 分析を開始してください。
   - 分析を 1 回追加するごとに Gel-Dye Mix、1x Conditioning Solution がそれぞれ 10 mL 必要になります。

Kit スペック

	FP-1002-0275 Genomic DNA 165kb Kit
サイズ範囲	1.3 - 165 kbp
サイズ真度 [1]	± 15%
サイズ再現性 [1]	20% CV
定量範囲 （フラグメント） [1]	0.3 - 30 pg/µL
定量範囲 （スメア） [2]	5 - 500 pg/µL
定量再現性 [1, 2]	25% CV
泳動時間	70 min. (Fast Method) 180 min. (Extended Method)

[1] Results based on Lambda DNA Fragment.
[2] Results determined using Coriell gDNA sample (Cat#19238)

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