

Agilent ProteoAnalyzer System 簡易マニュアル

Protein Broad Range P240 Kit

5191-6640 (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 1.1.0.12 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 2025_02

キットの構成

5191-6640 (275 Samples)

型番	名称	個数
室温保管*		
5191-6643	Protein Conditioning Solution, 340 mL	1
5191-6644	2x Protein Inlet Buffer, 195 mL	1
5191-6645	Protein Broad Range Gel, 125 mL	1
5191-6650	Protein Fluorescent Dye**, 50 µg/tube	3
5191-6651	Dye Resuspension DMF***, 1.5 mL	1
GP-440-0100	Capillary Storage Solution, 100 mL	1
冷凍保管 (-20°C)		
5191-6647	10x Labeling Buffer, 1.1 mL	1
5191-6648	P240 Broad Range Ladder, 30 µL	1
5191-6649	P240 Upper Marker, 30 µL	1

* 室温保管の試薬は受け取り後、24 時間以上室温に置いてから使用してください。

** DMF 溶解後は-20°Cで保存し、6 週間以内に使用してください。

*** DMF には N, N-ジメチルホルムアミドが含まれています。

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
- ・ 1.0 M DTT (-20℃保存、凍結融解は 5 回まで)
- ・ PBS : 30 mM Tris-HCl, 26 mM NaH₂PO₄, 41 mM Na₂HPO₄, 79 mM NaCl, pH 8.5
- ・ 1.0 M NaOH
- ・ 250 mM Iodoacetamide (46 mg/mL、要時調製)
- ・ 0.1 M HCl (メンテナンス用 必要に応じて準備してください)

消耗品

- ・ 96-well PCR sample plate サンプルプレート用

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)
- ・ 0.5 mL Protein LoBind Tubes Eppendorf #022431064
- ・ プレートシール サンプル熱変性時に使用

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
- ・ ヒートブロック/サーマルサイクラー (サンプル熱変性用)

各部の名称



名称	機能
Drawer B	Buffer プレートを設定します。
Drawer W	廃液プレート (96-deepwell plate) または Open Waste Tray (P60-22) を設定します。
Drawer M	使用しません。
Drawer 1-3	サンプルプレートを設定します。
Gel 1	Gel を設定します。
Gel 2	1.0 M NaOH を設定します。
COND.	1x Conditioning Solution を設定します。
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。

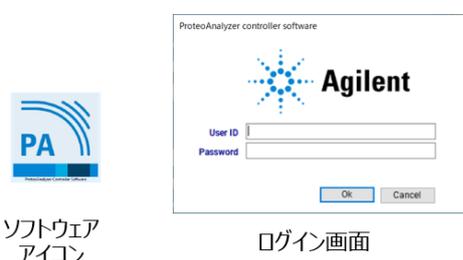
はじめに

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。
- ボトルの試薬は使用前に 4、5 回転倒混和でゆっくり混合してください。
- 動作環境温度は 18～25℃です

システムの起動

PC を起動した後、装置の電源を入れ、ProteoAnalyzer Controller Software を起動します。



- 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。

分析日のはじめに行います。

Daily Conditioning Flush 1 回と分析 2 回で well が一杯になります。

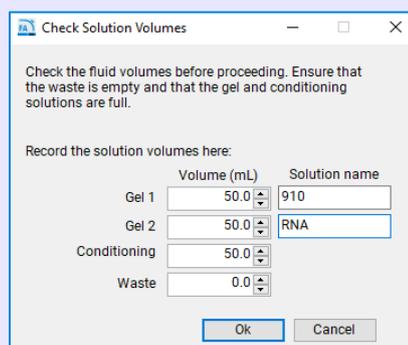
1 日に 3 回以上連続で分析する場合は、96-deepwell 1 mL plate の代わりに Open Waste Tray (P60-22) を使用してください。

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。



Daily Conditioning Flush

分析日の始めに、1.0 M NaOH と Protein Conditioning Solution を使用した洗浄を行います。詳細は p7 をご参照ください。

試薬の調製・セット

Gel

1. Protein Broad Range Gel を新しい遠沈管に分注します。

- 液量は下表を参照ください。

Gel は分析日に分注してください。

2. 装置にセットします。

- Gel 1 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。

Protein Conditioning Solution

1. Protein Conditioning Solution を分注／追加します。

- 液量は次ページを下表ください。
- 新しい遠沈管に分注、あるいは装置にセットされている遠沈管に追加してください。

2. 装置にセットします。

- Cond.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。

必要な試薬液量

Protein Broad Range Gel

分析サンプル数 (分析回数)	Gel
12 (1)	10 mL
24 (2)	15 mL
48 (4)	25 mL
96 (8)	45 mL

Protein Conditioning Solution

分析サンプル数 (分析回数)	Conditioning Solution	Daily Conditioning Flush を実施する場合 (分析日のはじめ)
12 (1)	10 mL	20 mL
24 (2)	15 mL	25 mL
48 (4)	25 mL	35 mL
96 (8)	45 mL	55 mL

1x Protein Inlet Buffer および Buffer プレーートの準備

1. 2x Protein Inlet Buffer を希釈します。

- 脱イオン水で 2 倍に希釈し、泡立えないように混合します。

希釈後もボトル記載の期限内に使用ください。

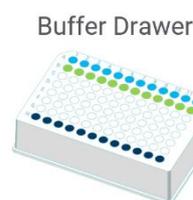
2. Buffer プレートに分注します。

- 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 と脱イオン水は**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。

3. 脱イオン水に分注します。

- 96-deep well 1 mL plate の B 行すべての Well に脱イオン水を 1 mL ずつ加えます。
- 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。



- 1x Inlet Buffer
- DI water
- Storage Solution

3. Drawer B にセットします。

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

Storage Solution の交換

1. Buffer 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 1 mL 加えます。

3. Drawer B にセットします。

- A 行が奥側となるようにセットし、ステージ操作アイコンの Store をクリックします。

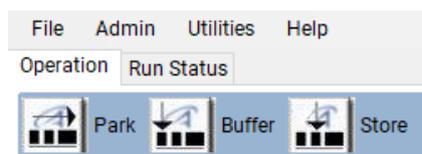
ステージの操作

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 がキャピラリーに浸る位置にプレートを移動します。

Store : Storage Solution がキャピラリー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。

Daily Conditioning Flush

分析日のはじめに実施します。

【必要な試薬】

- 1.0 M NaOH 20 mL
- Protein Conditioning Solution 20 mL

【手順】

1. 1.0 M NaOH、Protein Conditioning Solution を装置にセットします。
 - NaOH は Gel2 にセットしてください。
2. Waste Drawer（上から 2 段目）に 96-deepwell 1 mL plates をセットしてください。
3. Capillary Array – Conditioning から Add to queue をクリックしてください。
4. “Daily Conditioning Flush.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 15 分かかります。
6. 完了後、分析を行います。

ラベリング

Protein Fluorescent Dye の溶解

Dye のチューブを初めて使用する際に行ってください（キットには 3 本含まれています）。

Dye Resuspension DMF には N, N-ジメチルホルムアミドが含まれています。

• Protein Fluorescent Dye に DMF を加えます

44 μ L の Dye Resuspension DMF を 1 本の Dye のチューブに加え、vortex で 30 秒混合しスピンドウンします

Dye 溶解後は -20°C で保管し、**6 週間** 以内に使用してください。

Ladder の調製

• Ladder を希釈します

サンプルと同じ溶媒 3 μ L に Ladder を 1 μ L 加え、vortex で混合しスピンドウンします。

希釈した Ladder はその日のうちに使用してください。保存はできません。

(Upper Marker を使用する場合) Upper Marker の調製

Upper Marker を希釈します

5.7 μL の脱イオン水に 1 μL の P240 Upper Marker を加えて混合し、スピンドウンします。

Upper Marker は 240 kDa です。目的のタンパク質のサイズに応じて使用するか決定してください。

Upper Marker を使用した場合、サイズの正確性があがります (p 15 参照)。

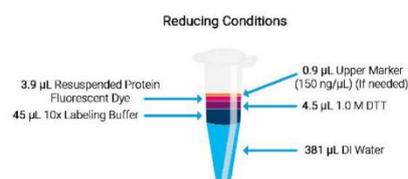
希釈した Upper Marker はその日のうちに使用してください。保存はできません。

Master Mix の調製

- 0.5 mL Protein LoBind を使用し、下表に従い Master Mix を調製します
- 試薬は vortex でよく混合してから使用してください
- Master Mix は要時調製してください
- Master Mix は調製後、vortex で十分混合しスピンドウンしてください
混合が不十分な場合、定量に影響が出ます

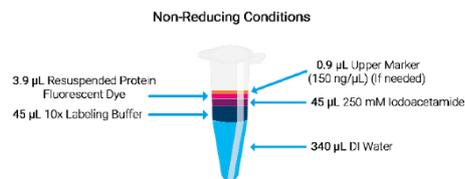
【還元条件の場合】

	12 サンプル (1行) 分
脱イオン水	381 μL
10x Labeling Buffer	45 μL
1.0 M DTT	4.5 μL
溶解済み Protein Fluorescent Dye	3.9 μL
(必要に応じて) 希釈済み P240 Upper Marker	0.9 μL



【非還元条件の場合】

	12 サンプル (1行) 分
脱イオン水	340 μL
10x Labeling Buffer	45 μL
250 mM Iodoacetamide	45 μL
溶解済み Protein Fluorescent Dye	3.9 μL
(必要に応じて) 希釈済み P240 Upper Marker	0.9 μL



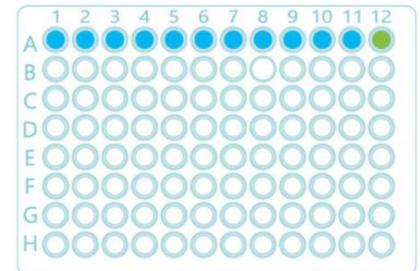
サンプル・Ladder のラベル化

1. Master Mix をサンプルプレートに分注します

調製した Master Mix を 29 μL ずつ 96-well plate の 1~12 列目の Well に分注します。

2. サンプル・Ladder を分注します

1~11 列目の Well にサンプルを 1 μL ずつ、12 列目の Well に希釈済み Ladder を 1 μL 分注します。



● サンプル
● Ladder

3. Master Mix とサンプル・Ladder を混合します

プレートにしっかりシールし、3000 rpm、2 分 vortex で混合し、20 秒スピンドアウンします。

溶液中に気泡がないか確認してください。

Vortex で混合後、サンプルが Well 間で混ざっていないか液量を確認してください。

4. サンプル・Ladder を熱変性します

ヒートブロックまたはサーマルサイクラーで、85 $^{\circ}\text{C}$ *、10 分間インキュベート後、室温で 5 分間冷却します。

気泡の発生をふせぐため、冷却後は vortex で混合しないでください。

* サンプルにより熱変性の温度を最適化してください。

抗体の多くは分解を避けるため、70 $^{\circ}\text{C}$ に温度を下げるのが推奨されます。

また、安定なタンパク質の場合は、完全に変性するため 95~100 $^{\circ}\text{C}$ に温度をあげる必要がある場合があります。

5. サンプルプレートをセットします

20 秒スピンドアウンをした後、シールをはがし Drawer 1~3 のいずれかにセットします。

分析

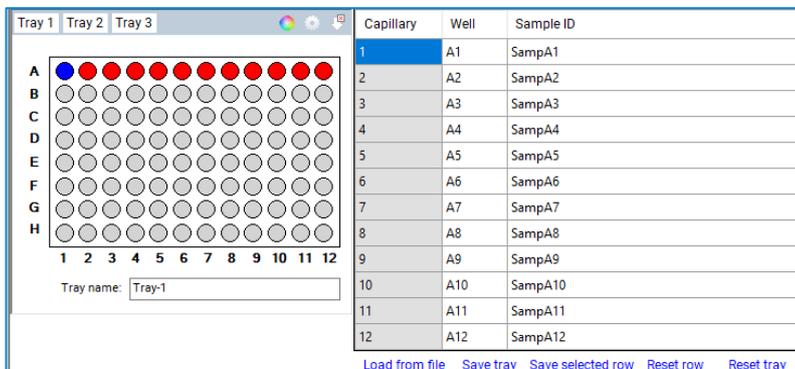
サンプルの選択・入力

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。

【Upper Marker を使用する場合】

5190-6640UM-LM – ProteoAnalyzer Broad Range Kit LM and UM

【Upper Marker を使用しない場合】

5190-6640LM – ProteoAnalyzer Broad Range Kit LM only

- “Gel” プルダウンメニューが “Gel1” が確認します。
- その他の項目は必要に応じて入力します。

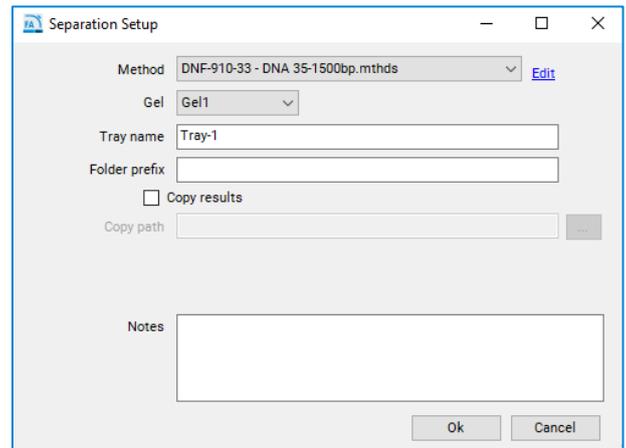
Tray name : トレイ名

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



- “Edit”から注入時間と電圧を変更することができます。

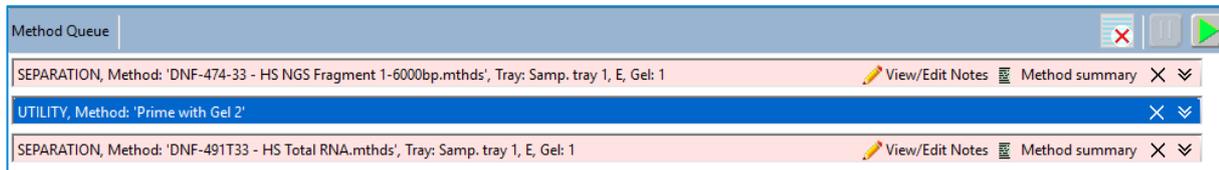
ピークが高すぎる場合（データに“Peak height above RFU threshold”が表示される場合）、injection time または injection voltage を下げる、ピークが低すぎる場合は上げると改善する場合があります。Injection voltage の変更前に injection time を変更することを推奨します。また、Injection voltage を 9 kV 以上に変更することは推奨しません。

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。

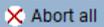
分析中の注意点

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 の順にシャットダウンします。

Sample Buffer Compatibility List

Low Impact: 50% - 300% signal compared to PBS *	Comment
200 mM Tris-HCl, pH 8.0	
50 mM Citrate buffer pH 4	
50 mM Acetate buffer pH 5.2	
50 mM MES pH 6	
50 mM MOPS pH 7	
50 mM HEPES, pH 8.0	
100 mM NaHCO ₃ pH 8.5	
7 M urea or 2 M thiourea	
5% 2-Mercaptoethanol	
20 mM DL-Dithiothreitol (Cleland's Reagent, DTT)	
50 mM MgCl ₂	
100 mM KCl	ドデシル硫酸カリウムの溶解度が低いため、より高濃度のカリウムの使用は推奨しません
1% Triton X-100	
1% Tween 20	
4% CHAPS	高濃度のCHAPSはサイジングに影響を与えるので、サンプルと同じ溶媒でLadderを希釈することを推奨します
1% NP-40	
1% SDS	
300 mM NaCl	300 mMより塩濃度が高い場合、よりイオン強度の低いbufferに変更することを推奨します
Strong Impact: < 50% signal compared to PBS *	Comment
50 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)	蛍光色素に適しません

*Phosphate Buffered Saline: 30 mM Tris-HCl, 26 mM NaH₂PO₄, 41 mM Na₂HPO₄, 79 mM NaCl, pH 8.5

還元用試薬

Reagents	Comment
10 mM DL-Dithiothreitol (Cleland's Reagent, DTT)	推奨
5% 2-Mercaptoethanol	10 mM DTTと比べ3~5倍シグナルが低下します
50 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)	蛍光色素に適さないため推奨しません

Kit スペック

	LM & UM	LM only
分析サイズ範囲	10 – 200 kDa	10 – 240 kDa
代表的なサイズ真度	<10% for BSA, CAII (using reduced conditions)	<15% for BSA, CAII (using reduced conditions)
サイズ再現性	<5% CV for BSA, CAII, GREMLIN-1, and NIST mAb (using reduced conditions)	<8% CV for BSA, CAII, GREMLIN-1, NIST mAb (using reduced conditions) <10% CV for intact NIST mAb (using non-reduced conditions)
定量範囲	2 - 2,000 ng/μL for BSA in PBS	
感度 (S/N>3)	1 ng/μL for BSA, CAII in PBS	
定量再現性	<25% CV for 2 – 20 ng/μL BSA <15% CV for 20 – 2,000 ng/μL BSA	
代表的なサイズ分離能	<10% MWR 15 - 150 kDa (based on ladder)	
泳動時間	20 min.	

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

(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