

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 DNA1000, 7500, 12000 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 DNA 1000/7500/12000 キット

- DNA用ラボチップ25枚
- 電極洗浄用チップ1枚
- シリンジ (1)
- DNA1000/7500/12000用試薬 (4℃保存)
  - ● Gel (500  $\mu$ l x 3vials)
  - ● Dye (90  $\mu$ l x 1vial)
  - ● Marker (内部標準) (1.2ml x 2 vials)
  - ● Ladder (分子量標準ラダ) (35  $\mu$ l x 1vial)
- スピンフィルタ (3)

### ご用意いただくもの

#### ■ DNAサンプル調製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

- 1500~2240 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


#### ■ Nuclease-free water

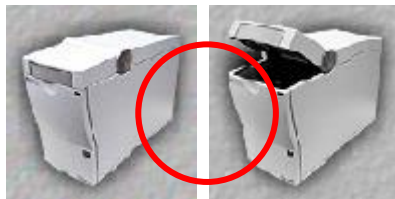
## 準備に入る前に…

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

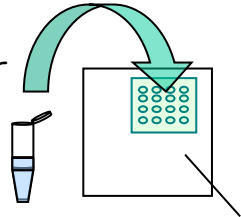
2 3 4 は  
場合によっては  
省略できます

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

# 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にNuclease-free water  
を350  $\mu$ l入れます  
(どのウェルから入れても構いません)

Nuclease-  
free water  
350  $\mu$ l



電極クリーナーチップ

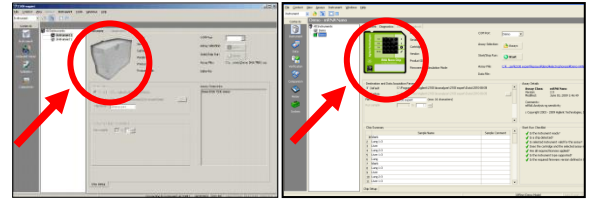
電極クリーナーをバイオアナライザに  
セットし蓋を閉めます



10秒後チップを取り出して、10秒間  
蓋を開けて電極を乾燥させます

## 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  
アイコンがチップが変わることを  
ご確認ください。




## Point


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。


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

# 2 サンプルを調製します 必ず手袋をしましょう


 サンプルのDNAの総量の目安  
・0.5-50ng/ $\mu$ l (ラダをサンプルとした場合)

濃度の濃いサンプルはTE buffer等で希釈します。

 濃度が非常に濃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。

 制限酵素処理したサンプルについては酵素を失活させます

EDTAを最終濃度10mMになるように加えます。

 失活処理をしないと、制限酵素がマーカーを切断し、  
よい分析結果が得られないことがあります。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

## 3 Gel-Dye Mixを調製します

## 1 GelとDyeを混合します

Gel (●) 1バイアルに  
Dye (●) 25 $\mu$ lを  
加え、ボルテックスでよく混合します。

青いキャップの  
チューブ

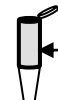
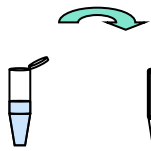
Dye 25 $\mu$ l

赤いキャップの  
チューブ

Gel



ボルテックスで  
良く混合します

2 スピンフィルターで遠心濾過します  
(室温)

← スピンフィルター



遠心



← スピンフィルター  
は捨てます

3 遠心濾過したGel-Dye Mixを  
ボルテックスミキサーで  
もう一度攪拌します

ボルテックスで  
良く混合します

遮光します



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。

\* 保存条件(4 $^{\circ}$ C)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。

遠心分離はキットごとに異なります。

	遠心力	時間
DNA7500 DNA12000	1500 x g $\pm$ 20%	10分
DNA1000		

遠心速度(rpm)の表示しか出ない遠心機の場合  
は次の数式で換算しましょう。

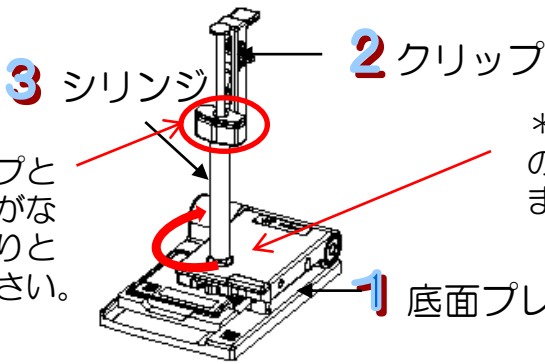
$$\text{遠心力(x g)} = 1.12 \times 10^{-5} \times \text{ローター半径(cm)} \times \{\text{ローターの回転数 (rpm)}\}^2$$



調製したGel-Dye Mixは4週間使用でき  
ます(遮光、4 $^{\circ}$ C保存)。

\* 調製したGel-Dye Mixは別のチューブ  
に移し換えしないでください。

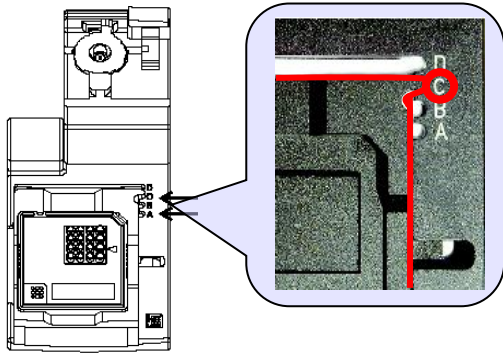
## 4 チップ調製スタンドを準備します



\*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。

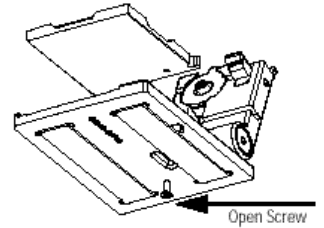
\*シリンジを台座に取り付ける際、時計回りの方向でゆるみがない様にしっかりとまわして入れてください。

### 1 底面プレートの位置を C に合わせます



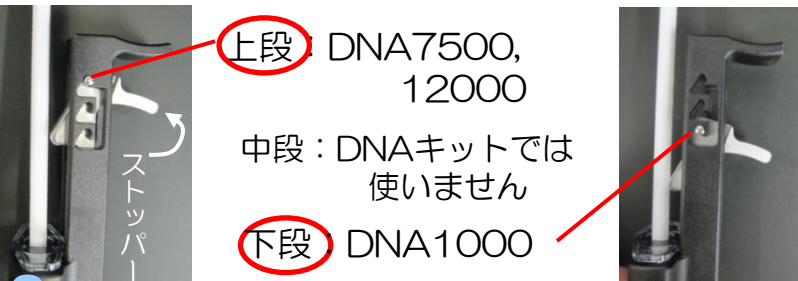
\*プレートの位置をかえる場合

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。



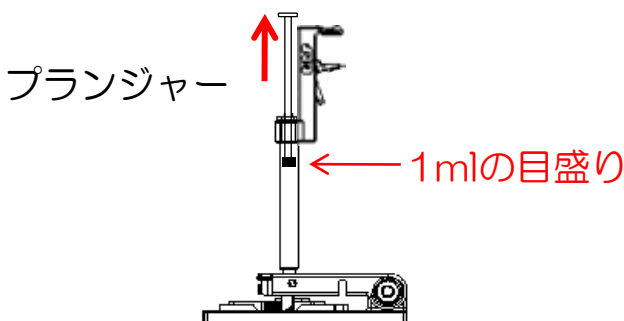
### 2 クリップのストッパーの位置を合わせます

ストッパーの位置はキットごとに異なります。

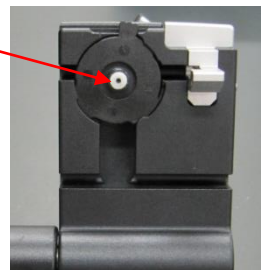


\*蓋の裏のシリコンガasketにゲルやほこりなどが付着していたり亀裂が入っていると、ゲルが充填できません。ゲルやほこりなどを取り除いてください。亀裂が入っている場合、新しいものと交換してください。

### 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

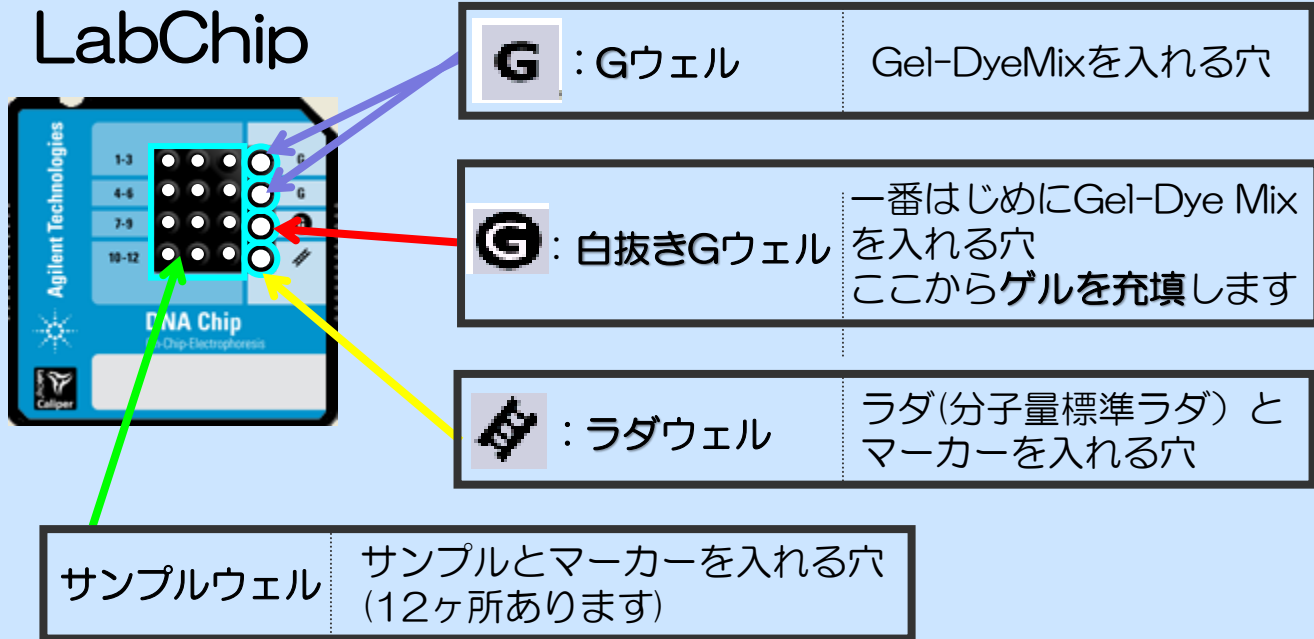


シリコンガasket



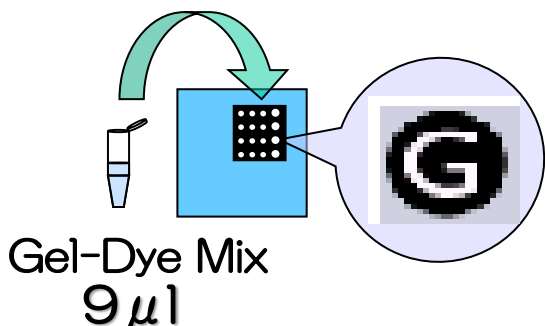
\*シリンジはキットを新しくした際、または3ヶ月に1度新品に交換してください。

## 5 チップにGel-Dye Mixを注入します

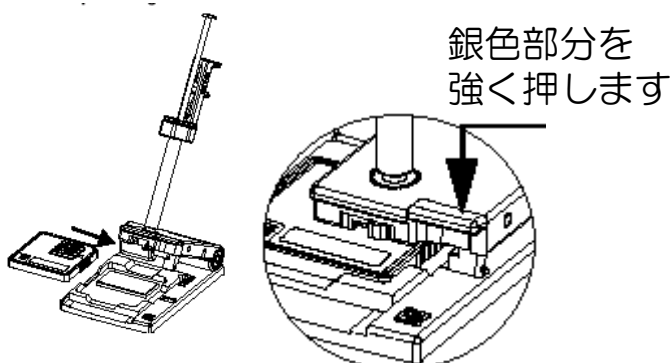


※ LabChipは室温保存します

1 Gel-Dye Mix 9  $\mu$ 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は粘性が高いため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ン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

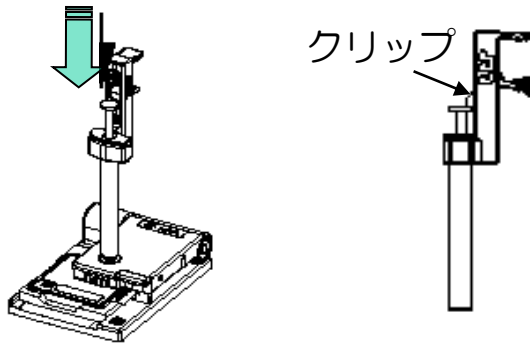
ウェルにGel-Dye Mixを入れる時はピペットチップの先をウェルの底につけるようにします。  
(底につけても問題ありません。)

\*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

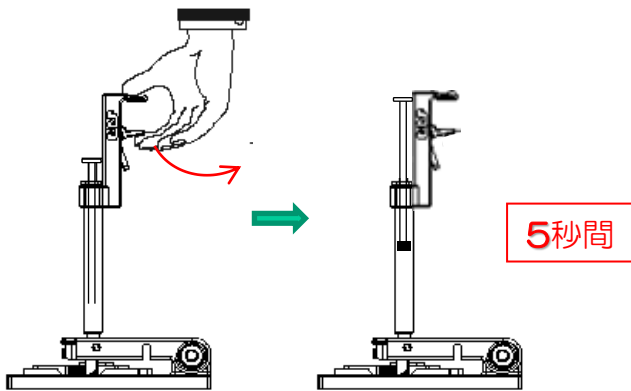


4

そのまま所定の時間(右参照)  
放置します

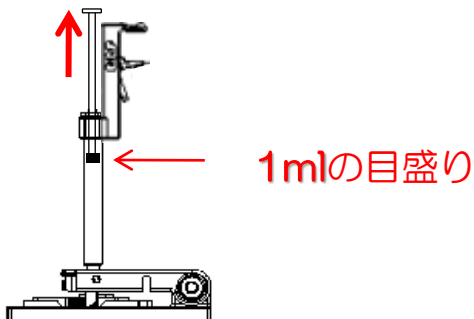
5

クリップのストッパーをはずして  
5秒待ちます



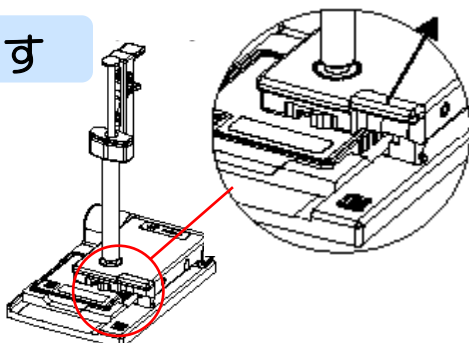
6

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



放置時間はタイマーできちんと  
はかりましょう。

放置時間はキットごとに異なります。

DNA7500, DNA12000

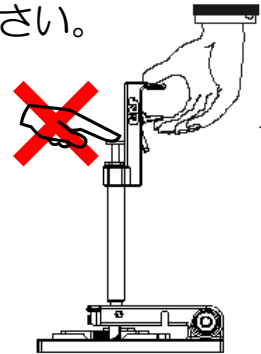
→30秒

DNA1000

→60秒

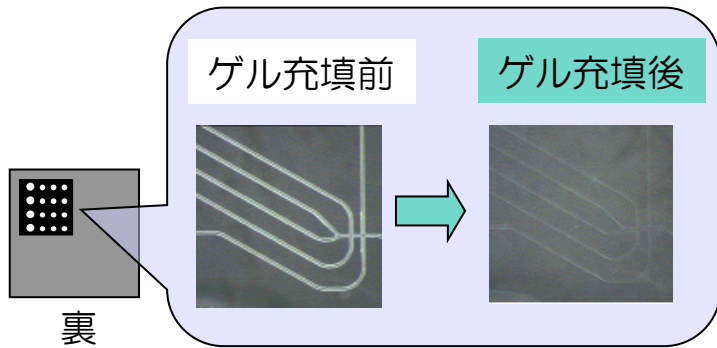


ストッパーをはずす時は  
プランジャーに触らないで  
ください。



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-Dye Mixが逆流し飛び散るこ  
とがあります。

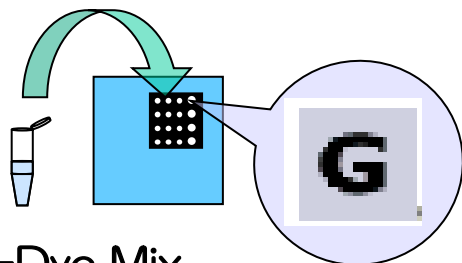
### 3 チップの確認をします



#### 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。)

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




Gel-Dye Mix

9 $\mu$ l

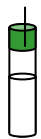
フローチャート



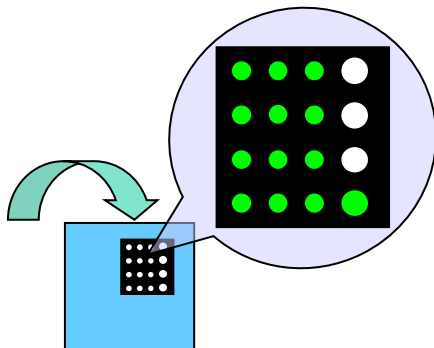
## 6 チップにマーカーを入れます

マーカー 5 $\mu$ lを  
ラダウェル  とサンプルウェル(1-12)  
に入れます

緑のキャップの  
チューブ



Marker  
5 $\mu$ l




✗ 流路に泡が入っている悪い例

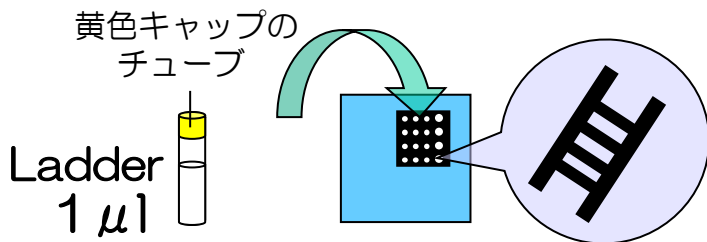




- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

## 7 チップにラダを入れます

ラダ1  $\mu$ lをラダウェル  に入れます

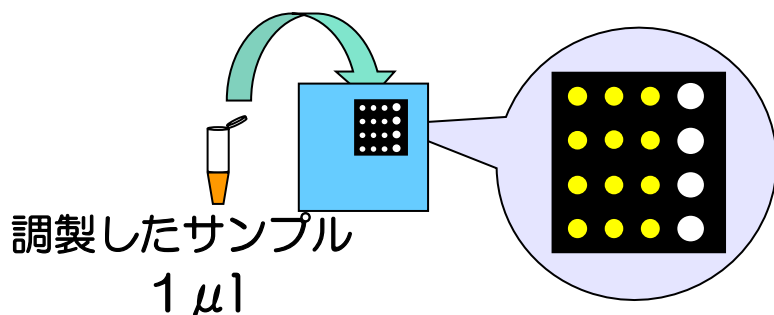


フローチャート

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

## 8 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  $\mu$ lを各サンプルウェルに入れます



フローチャート

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

## 9 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

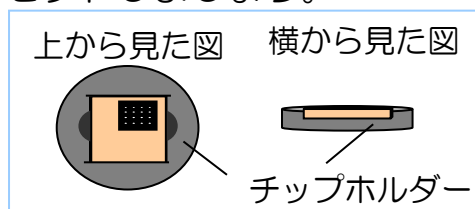


1分間

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。



**X** 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で使用します。



## 10 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

Kitにより適宜選択してください

- DNA1000
- DNA7500
- DNA12000



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。

フローチャート



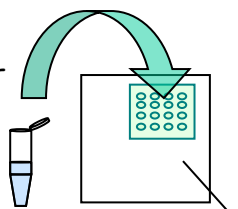
## 11 電極を洗浄します

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

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

Nuclease-free water  
350  $\mu$ 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

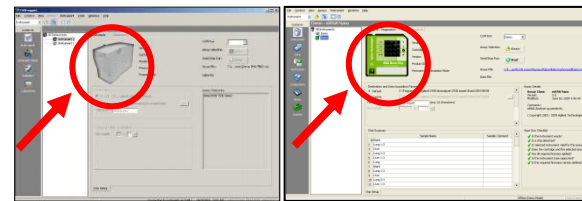
↓  
10秒後チップを取り出して、10秒間蓋を開けて電極を乾燥させます



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くなることがあります。

**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。





**Point**

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。

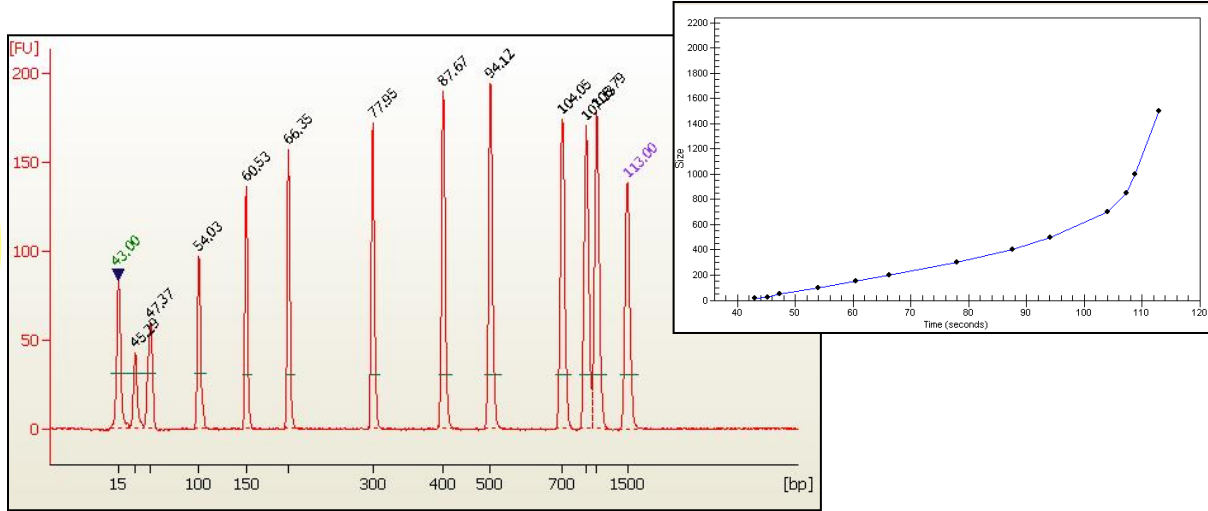
汚れのひどい電極を洗浄する方法については別冊の簡易取り扱い説明書を参考にしてください。

# 簡単プロトコル比較表

		DNA 7500 12000	DNA 1000	High Sensitivity DNA
分子量範囲		7500Kit 100~7500bp 12000Kit 100~12000bp	25~1000bp	50~7000bp
サンプルの調製	フラグメント サンプル	DNA総量 0.5~50ng/ $\mu$ l		DNA総量 5~500pg/ $\mu$ l
	スミア サンプル	-		DNA総量 100~ 10000pg/ $\mu$ l
Gel-Dye Mix	Gel ●	1 vial		
	Dye ●	25 $\mu$ l		15 $\mu$ l
フィルター遠心	遠心力	1,500 x g $\pm$ 20%	2,240 x g $\pm$ 20%	
	時間	10分	15分	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のアプリ量		G 9 $\mu$ l		
Gel-Dye Mixの圧縮時間		30秒	60秒	
Gel-Dye Mixのアプリ量		G 9 $\mu$ l		
Marker Buffer (●) の アプリ量		E とサンプルウェル 5 $\mu$ l		
ラダ (●) のアプリ量		E 1 $\mu$ l		
サンプルのアプリ量		1 $\mu$ 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		

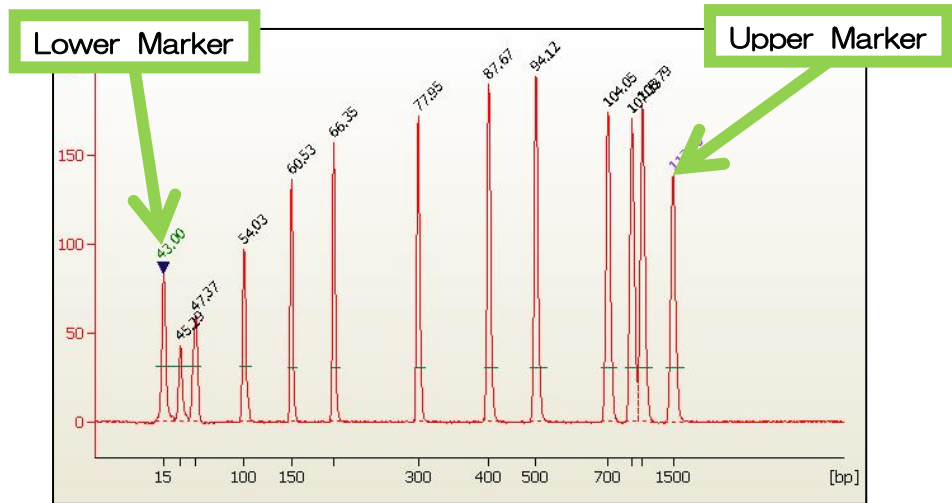
**ladder** :ラダ (分子量標準ラダ)  
 ソフトウェア上でラダレーンのピークの位置 (Migration Time) を基に  
 Standard Curveをかきます。それをもとにサンプルの各ピークのサイズを計算します。

黄色キャップの  
チューブ  
  
 Ladder



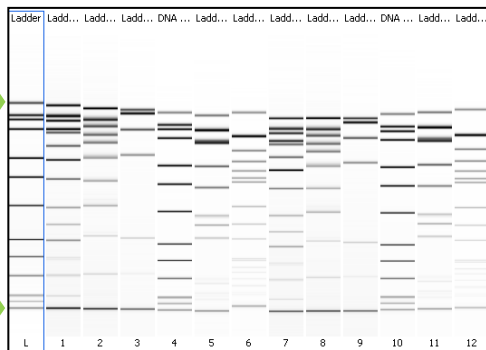
**Marker** :マーカー (内部標準)  
 ラダと全てのサンプルに加え、データを補正します。

緑のキャップの  
チューブ  
  
 Marker

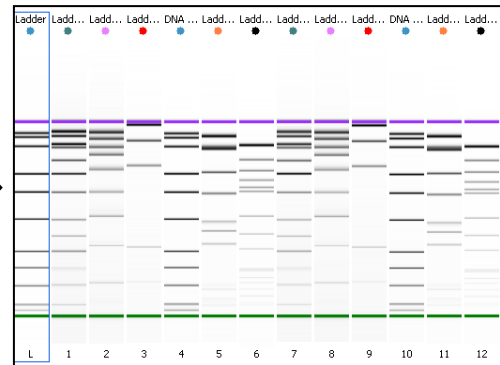


Upper Marker

Lower Marker



補正



# DNA Kit

マーカー及びラダの各ピークの分子量 (bp)

	DNA 1000	DNA 7500	DNA 12000
LM	15	50	50
1	25	100	100
2	50	300	300
3	100	500	500
4	150	700	700
5	200	1000	1000
6	300	1500	1500
7	400	2000	2000
8	500	3000	3000
9	700	5000	5000
10	850	7000	7000
11	1000	-	10380
UM	1500	10380	17000

## 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/lsc-a-booth/DNAMicroArray/yan\\_MicroArray.htm#bioA](https://www.chem-agilent.com/lsc-a-booth/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。