

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 High Sensitivity DNA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 High Sensitivity DNAキット

- DNA用ラボチップ10枚
- 電極洗浄用チップ1枚
- シリンジ (1)
- High Sensitivity DNA用試薬 (4℃保存)
 - ● Gel (300 μ l x 2vials)
 - ● Dye (40 μ l x 1 vial)
 - ● Marker (内部標準) (200 μ l x 4 vials)
 - ● Ladder (分子量標準ラダ) (20 μ l x 1 vial)
- スピンフィルタ (2)

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

- 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

■ 1x TE




High Sensitivity DNA Kitをご利用いただくには 2100 Expert
ソフトウェア ver. 02.07以上が必要です

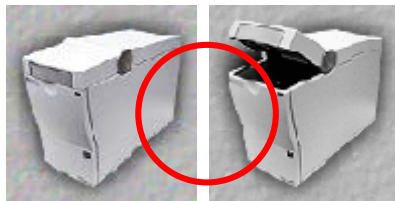
準備に入る前に…

 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

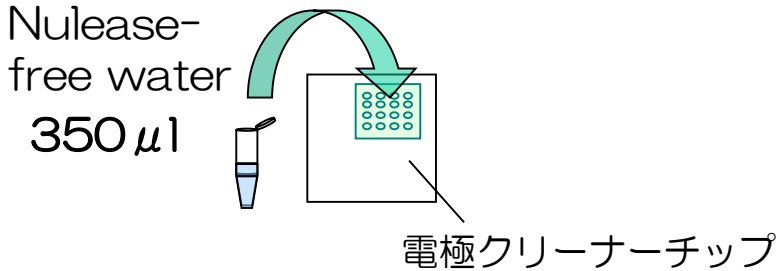
- 1 電極を洗浄します
- 2 サンプルを調製します
- 3 Gel-Dye Mixを調製します
- 4 チップ調製スタンドを準備します
- 5 チップにGel-Dye Mixを注入します
- 6 チップにマーカールを入れます
- 7 チップにラダを入れます
- 8 チップにサンプルを入れます
- 9 マーカーとサンプルを混ぜます
- 10 バイオアナライザで分析します
- 11 電極を洗浄します

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 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


↓
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

フローチャート

- 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
 定量範囲 5-500pg/ μ l (ラダをサンプルとした場合)
 100-10000pg/ μ l (スメアサンプルの場合)

 溶媒がNuclease-free waterの場合は**1xTE buffer**で希釈します。
 Nuclease-free waterが溶媒の場合、ベースラインが不安定になる
 可能性があります。
 濃度が非常に濃いサンプルは1xTEで希釈してください。
 よい分析結果が得られないことがあります。

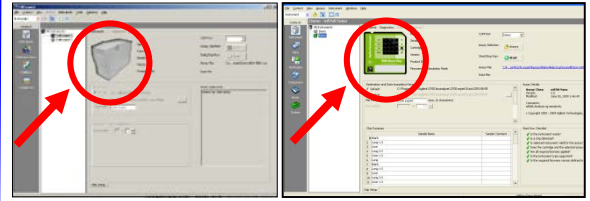
 最大塩濃度 10mM Tris and 1mM EDTA

塩濃度の濃いサンプルはNuclease-free water 等で希釈します。

 塩濃度が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。

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。

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

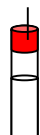
Gel (●) 1バイアルに
Dye (●) 15 μ lを
加え、ボルテックスでよく混合します。

青いキャップの
チューブ

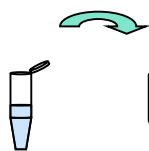
Dye 15 μ l

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 スピフィルターで遠心濾過します
(室温)

←スピフィルター



遠心 2240 x g \pm 20%
10分



スピフィルター
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 (23-25 $^{\circ}$ C前後) 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。

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

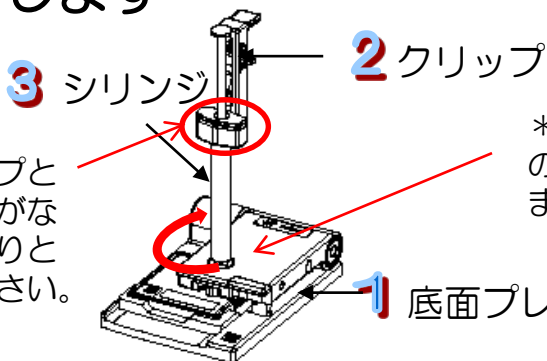


調製したGel-Dye Mixは6週間使用できます (遮光、4 $^{\circ}$ C保存)。

* 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。

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

4 チップ調製スタンド(プライミングステーション)を準備します

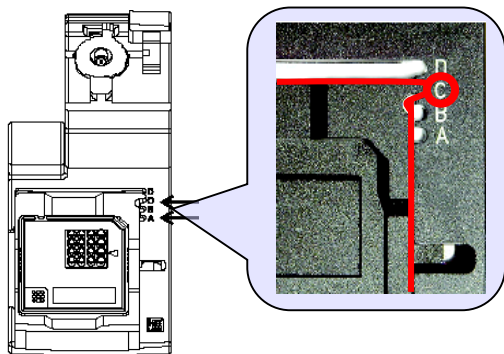


*メタルクリップとシリンジに隙間がないようにしっかりと押し入れてください。

*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。

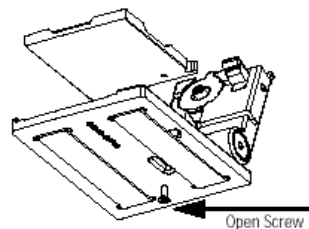
1 底面プレート

1 底面プレートの位置を C に合わせます

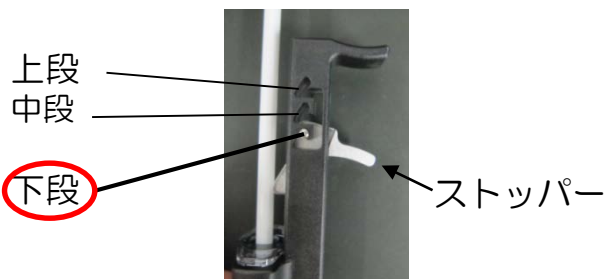


*プレートの位置をかえる場合

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。

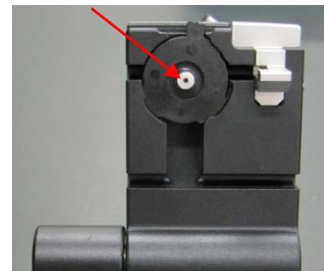


2 クリップのストッパーの位置を合わせます

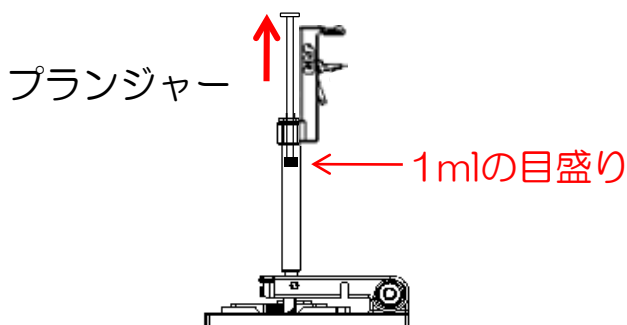


*蓋の裏のシリコンガスケットにゲルやほこりなどが付着していたり亀裂が入っていると、ゲルが充填できません。ゲルやほこりなどを取り除いてください。亀裂が入っている場合、新しいものと交換してください。

シリコンガスケット



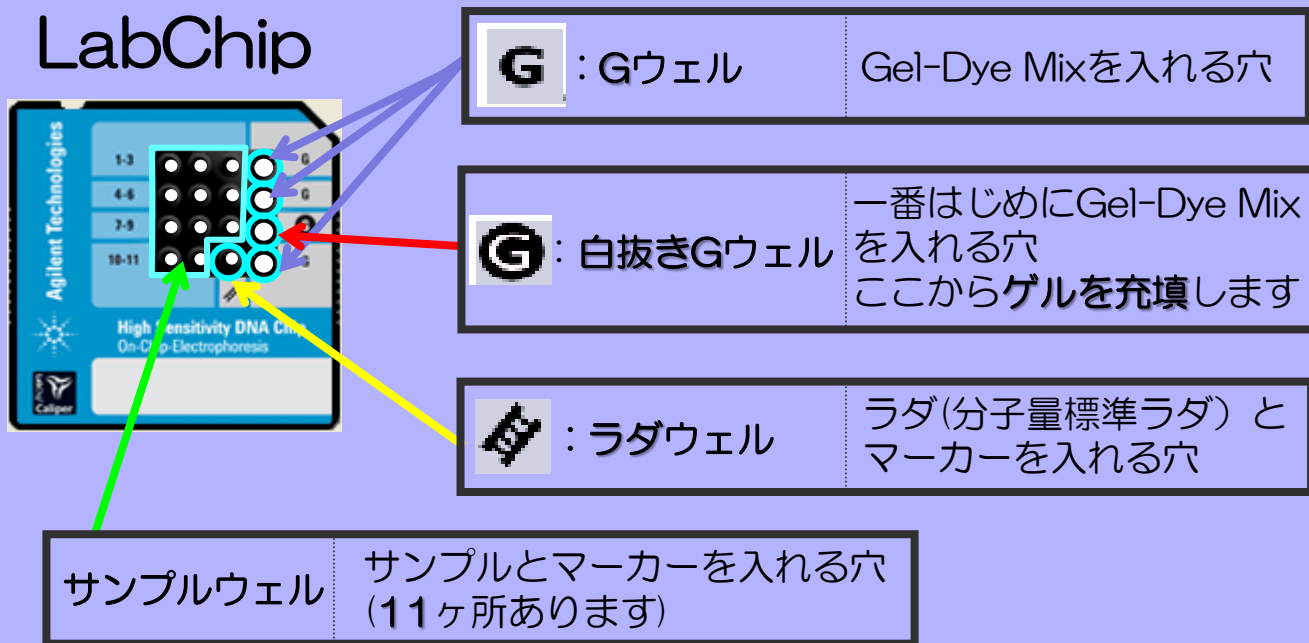
3 シリンジのプランジャーを1mlの所まで引き上げておきます



*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。

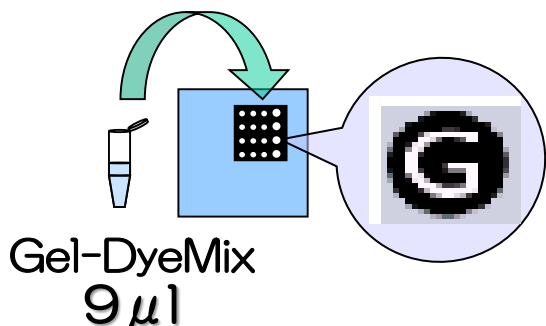
- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

5 チップにGel-Dye Mixを注入します

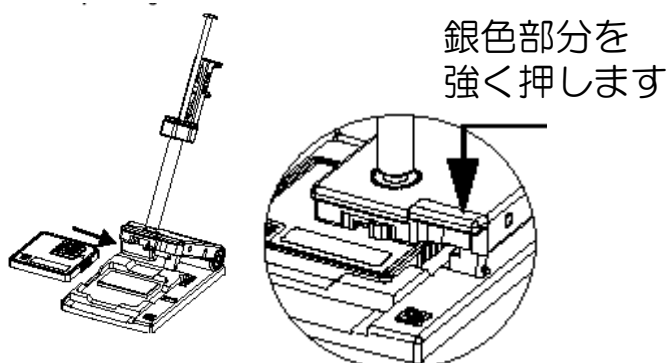


※ LabChipは室温保存します

1 Gel-Dye Mix 9 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

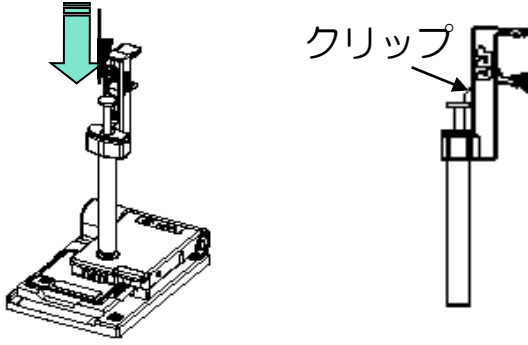
ウェルにGel-Dye Mixを入れる時はピペットチップの先をウェルの底につけるようにします。
(底につけても問題ありません。)

*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



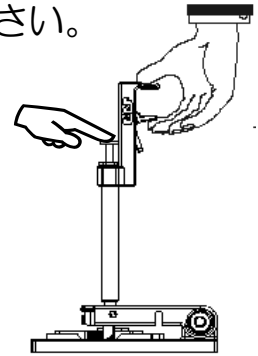
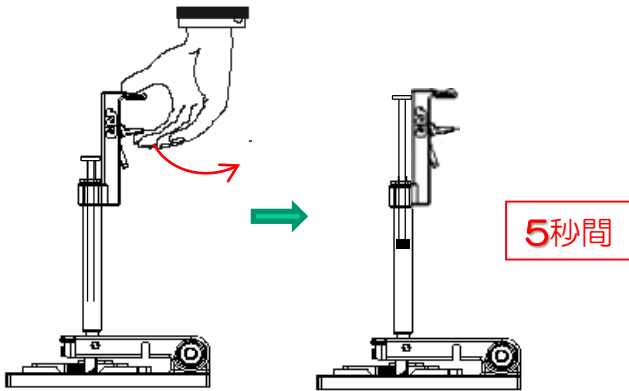
60秒はタイマーできちんと
はかりましょう。

5

クリップのストッパーをはずして
5秒待ちます。



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。

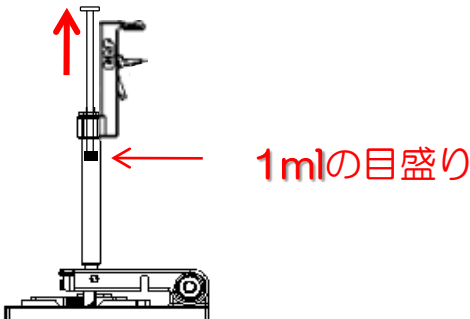


6

プランジャーを元の位置 (1ml) へ
ゆっくり引き上げます

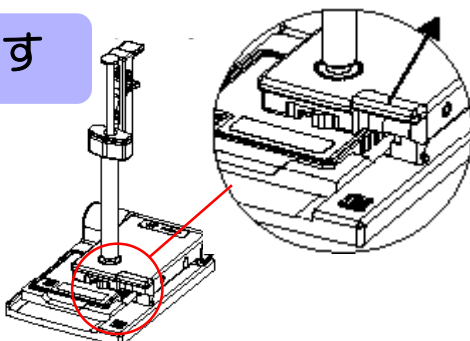


プランジャーを元の位置(1ml)へ
もどさずに蓋を開けると
Gel-Dye Mixが逆流し飛び散るこ
とがあります。

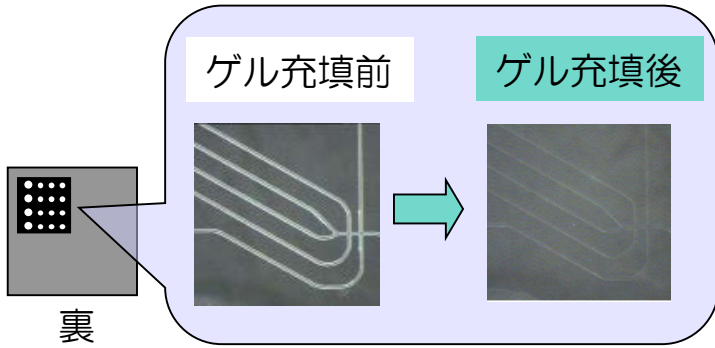


7

蓋を開けます



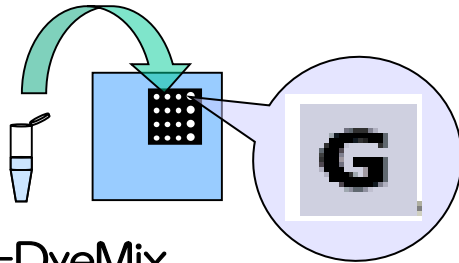
3 チップの確認をします



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3ヶ所にGel-Dye Mixを9 μ lずつ入れます




Gel-DyeMix

9 μ l

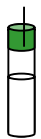
フローチャート



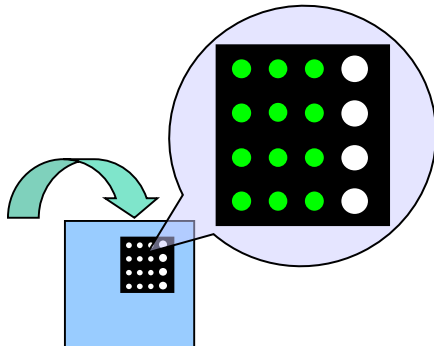
6 チップにマーカーを入れます

マーカー 5 μ lを
ラダウェル  とサンプルウェル(1-11)
に入れます

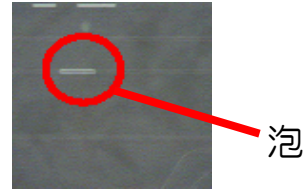
緑のキャップの
チューブ



Marker
5 μ l




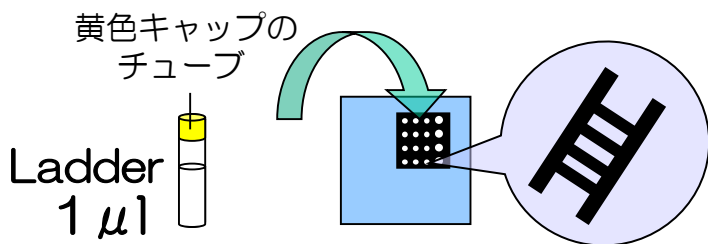
✗ 流路に泡が入っている悪い例



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 μ lをラダウェル  に入れます

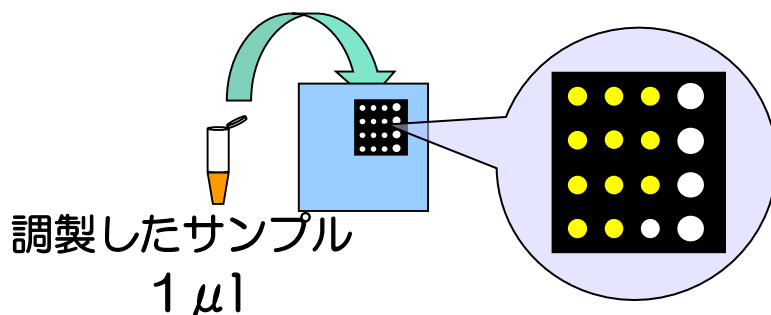


フローチャート

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 μ 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

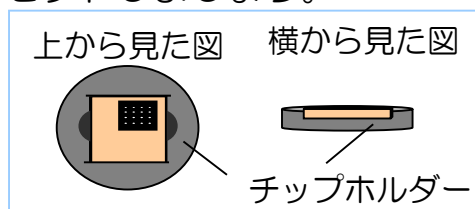


1分間

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。



 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。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

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

High Sensitivity DNA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

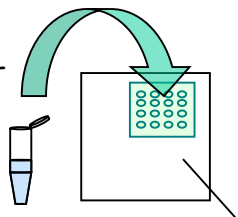
11 電極を洗浄します

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 μ 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 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

↓
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

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。

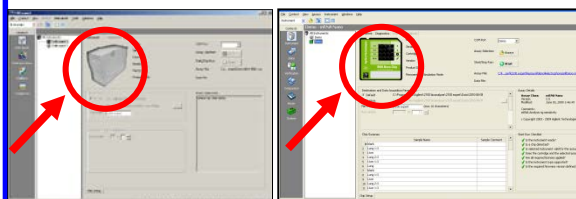
バイオアナライザの操作と解析については別冊の簡易取り扱い説明書を参考にしてください。



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 0.1~50ng/ μ l		DNA総量 5~500pg/ μ l
	スメア サンプル	-		DNA総量 100~ 10000pg/ μ l
Gel-Dye Mix	Gel ●	1 vial		
	Dye ●	25 μ l		15 μ 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 μ l		
Gel-Dye Mixの圧縮時間		30秒	60秒	
Gel-Dye Mixのアプリ量		G 9 μ l		
Marker Buffer (●) の アプリ量		III とサンプルウェル 5 μ l		
ラダ (●) のアプリ量		III 1 μ l		
サンプルのアプリ量		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		

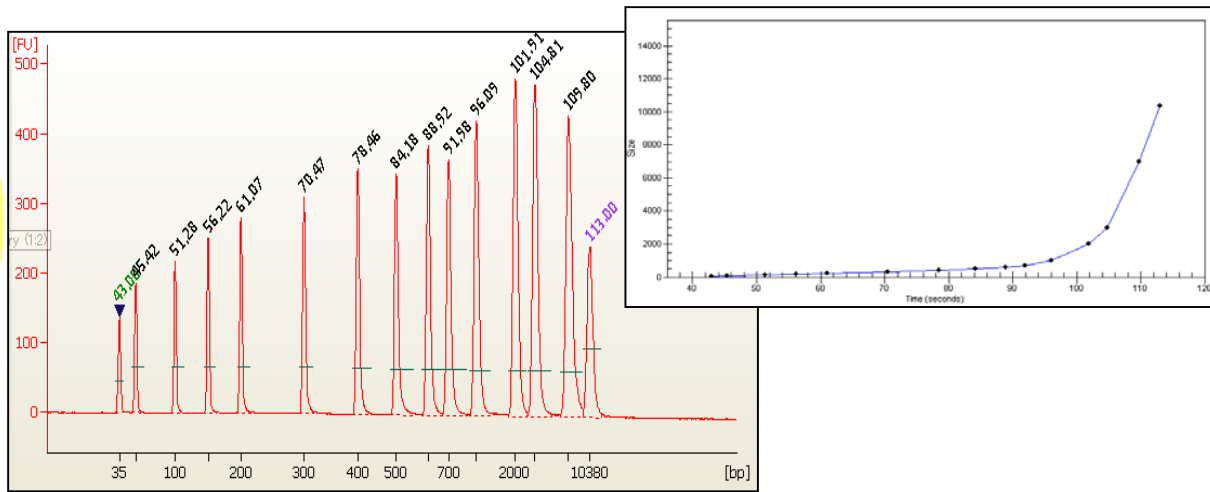
ladder :ラダ (分子量標準ラダ)

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



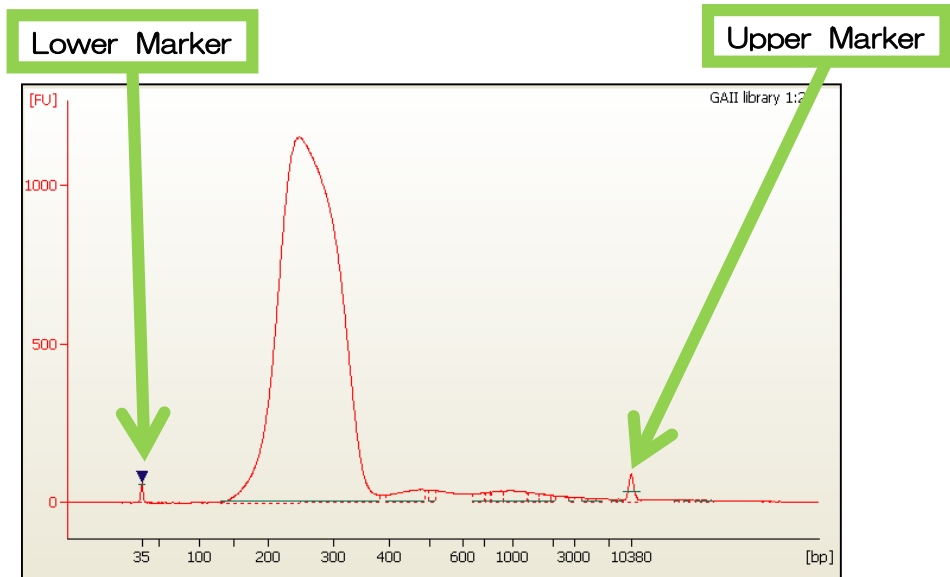
Marker :マーカー (内部標準)

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

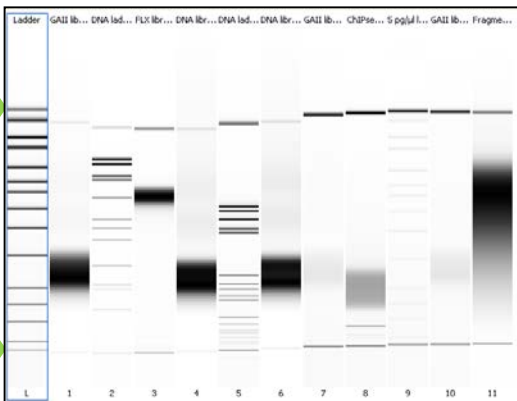


Marker

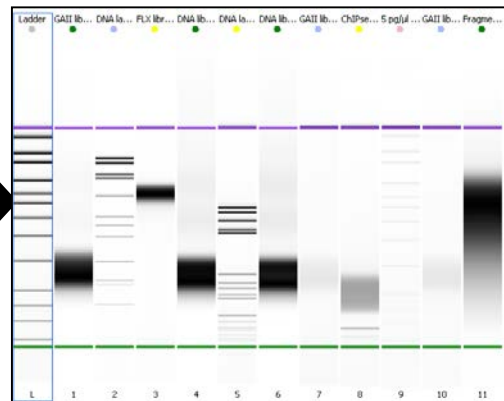


Upper Marker

Lower Marker



補正



DNA Kit

マーカー及びラダの各ピークの分子量 (bp)

	High Sensitivity DNA
LM	35
1	50
2	100
3	150
4	200
5	300
6	400
7	500
8	600
9	700
10	1000
11	2000
12	3000
13	7000
UM	10380

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。