

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 Protein80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 Protein80キット

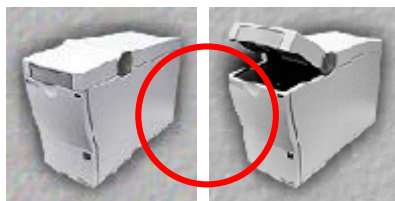
- Protein用ラボチップ25枚
- 電極洗浄用チップ1枚
- シリンジ (1)
- Protein80用試薬
  - Part I 【4°C保存】
    - ● Gel (650  $\mu$ l x 4vials)
    - ● Dye (90  $\mu$ l x 1vial)
    - スピンフィルタ(4)
  - Part II 【-20°C保存】
    - ○ Sample Buffer (SDS化バッファ、内部標準含)  
(200  $\mu$ l x 4 vials)
    - ● Ladder (分子量標準ラダ) (180  $\mu$ l x 1vial)

### ご用意いただくもの

- PCRチューブ
- 遠心機
  - 1000 x g 及び 2500 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
- PCR装置 または 沸騰水浴用器具 (95-100°C)
- 1M DTT (還元条件の場合のみ)
- 超純水 (deionized analysis-grade water)

## 準備に入る前に…

-  Dyeは室温で30分以上放置してから使用します。  
 \* 保存条件 (4°C) でDyeは凝固しています。完全に融解させたのち、ボルテックスミキサーでよく攪拌し均一にしましょう。  
 \* 1時間以上使わない場合、試薬は4°C保管に戻してください。
-  ラダとサンプルバッファの繰り返し凍結融解は避けてください。  
 \* 融解後、ラダ6  $\mu$ l・サンプルバッファ40  $\mu$ lずつ分注したものを-20°Cで保存することを推奨します。
-  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

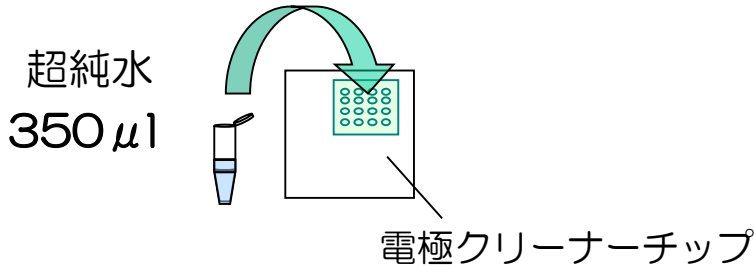
## 手順

- 1 電極を洗浄します
  - 2 **推奨** ラダ・サンプルバッファを分注します
  - 3 Gel-Dye Mixと脱色液を調製します
  - 4 サンプルバッファを調製します
  - 5 サンプルとラダを調製します
  - 6 チップ調製スタンドを準備します
  - 7 チップにGel-Dye Mixを注入します
  - 8 チップに脱色液を入れます
  - 9 チップにラダを入れます
  - 10 チップにサンプルを入れます
  - 11 バイオアナライザで分析します
  - 12 電極を洗浄します
- 2 3 4 6 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 12

# 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)

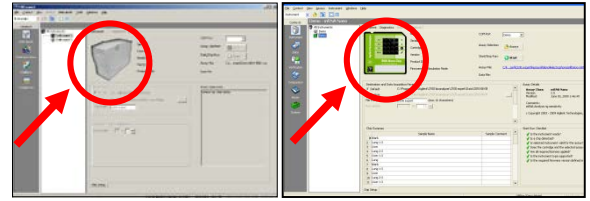


電極クリーナーをバイオアナライザに  
セットし蓋を閉めます

↓  
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超純水が  
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  
入れた超純水はピペットで  
吸い出しておきましょう。

- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

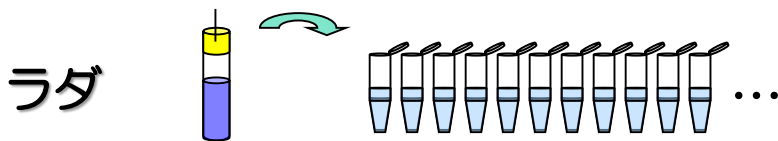
必ず手袋をしましょう



# 2 (推奨) ラダ・サンプルバッファを分注します

**!** ラダ及びサンプルバッファの繰り返し凍結融解は避けてください。

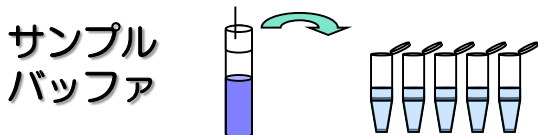
黄色いキャップの  
チューブ



ラダを融解後、0.5ml以下のチューブ  
に6  $\mu$ lずつ分注します (25本)

↓  
分注後、-20°C保存 (遮光)

白いキャップの  
チューブ




サンプルバッファを融解後、0.5ml以下のチューブ  
に40  $\mu$ lずつ分注します (5本)

↓  
分注後、-20°C保存 (遮光)



### 3 Gel-Dye Mixと脱色液を調製します

 脱色液はDyeを加えないGelです。Gel-Dye Mixに使用するGelと脱色液は同じものです。  
脱色液の調製は1キットにつき1回のみです。

**1** Gel (●) のバイアルの中身をできるだけすべて (全量650  $\mu$ l) スピンフィルタにうつします (2本)

赤いキャップのチューブ

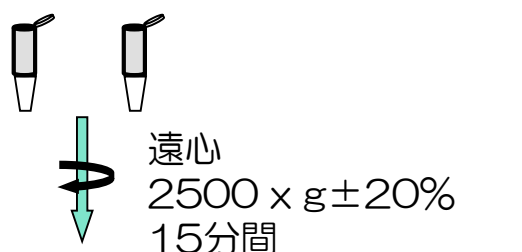


Gel-Dye Mix用

脱色液用

**Gel 650  $\mu$ l/1 vial**

**2** Gelを入れたスピンフィルタ (2本) を遠心濾過します (室温)



遠心  
2500 x g  $\pm$  20%  
15分間

↓

ボルテックスでよく混合します

↓

脱色液としてそのまま使用します

↓

Gel-Dye Mixに使用します 次のステップに進みます

スピンフィルタは捨てます



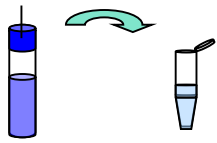
Gelは粘性が高いためゆっくり吸い上げます。またGelを出す時もゆっくり行いピペットチップにGelが残らないようにしましょう。

\* スピンフィルタはキット付属のものを使用します。

\* 遠心分離は室温で行います。

**3** 遠心濾過したGel (1本) に  
Dye (●) 25 $\mu$ l 加え  
ボルテックスでよく混合し  
Gel-Dye Mixを調製します

青いキャップの  
チューブ



ボルテックスで  
良く混合します

Dye 25 $\mu$ l

**遮光します**

フローチャート



## 4 サンプルバッファを調製します

サンプルバッファ (●) に  
還元条件の場合；1M DTT 7 $\mu$ l  
非還元条件の場合；超純水 7 $\mu$ l を  
加えボルテックスで5秒間混合します

白いキャップの  
チューブ



1M DTT  
7 $\mu$ l  
(還元条件)

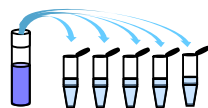
または  
超純水  
7 $\mu$ l  
(非還元条件)

サンプルバッファ  
200 $\mu$ l



ボルテックスで5秒間混合します

サンプルバッファを分注して  
保存している場合



同じ割合で混合してください

例) サンプルバッファ 40 $\mu$ l  
+1M DTT 1.4 $\mu$ l



Dyeは室温で遮光し、30分以上放置して  
から使用します。

\*保存条件 (4 $^{\circ}$ C) ではDyeは凝固して  
います。ボルテックスでよく攪拌し  
均一にしましょう。



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  
に移し換えないでください。



サンプルバッファは室温で2分以上放置  
してから使用してください。



サンプルバッファは遮光を  
心がけてください。



サンプルバッファは繰り返し凍結融解を  
避けてください。  
分注して保存することをお勧めします。



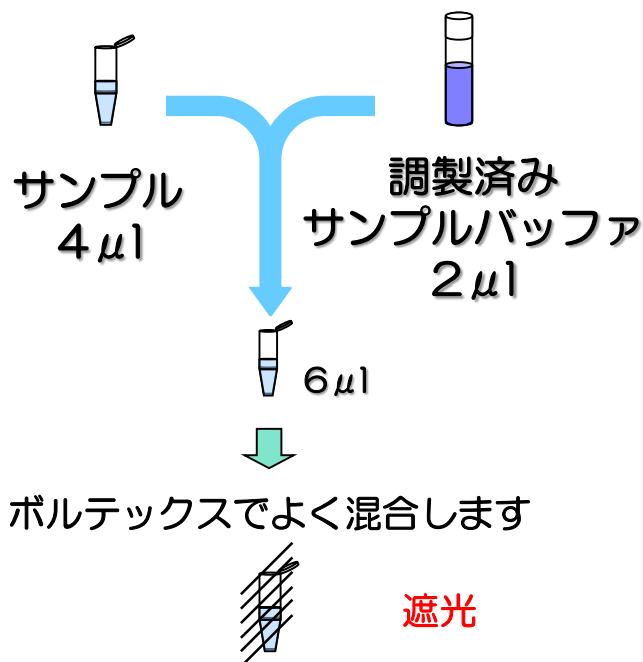
調製したサンプルバッファは1週間  
使用できます (4 $^{\circ}$ C保存)。

DTT添加後のサンプルバッファは  
できるだけ空気にさらされないよう  
フタを閉めてください。酸化によって  
還元力が低下します。

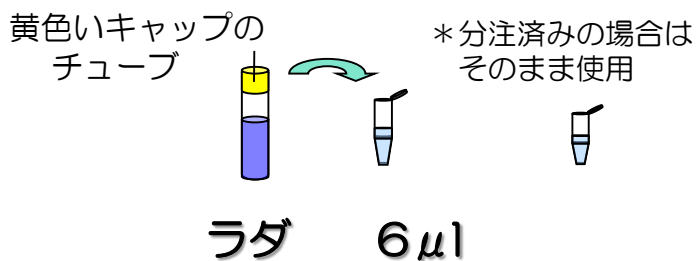
- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

## 5 サンプルとラダを調製します

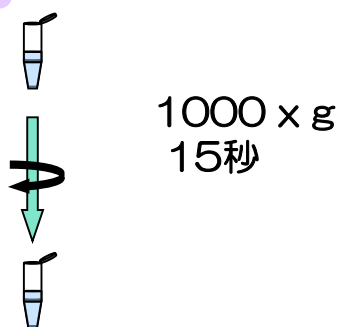
1 サンプル4 $\mu$ lと 4 で調製したサンプルバッファ2 $\mu$ lをPCRチューブで混合します



2 新しいPCRチューブにラダ (●) を6 $\mu$ lとります



3 遠心します



サンプルの調製にはPCRチューブを使用してください。



サンプルバッファは室温で2分以上放置してから使用します。



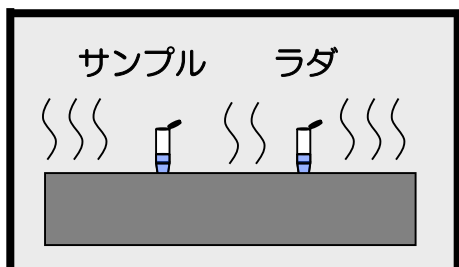
サンプルバッファは遮光を心がけてください。



ラダは繰り返し凍結融解を避けてください。分注して保存することをお勧めします。

\* 卓上小型遠心機でも構いません。

4 サンプルとラダをそれぞれ熱処理  
(95-100°C, 5分間) します



5分

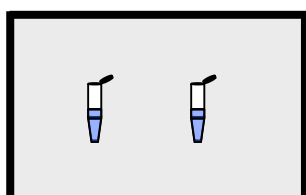


熱処理にはPCR装置または沸騰水浴が適しています。

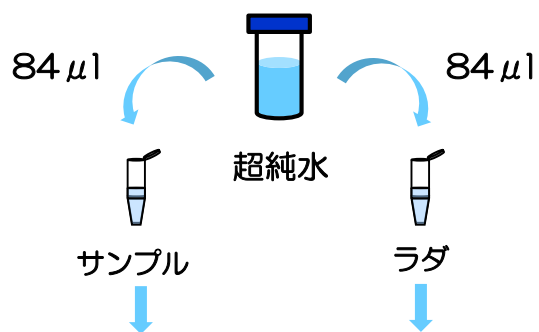


加熱中遮光してください。

5 10秒ほど放冷し、1000 × gで  
15秒間遠心します



6 熱処理したサンプルとラダそれぞれ  
に 超純水84 μl 加え混合します



ボルテックスでよく混合します



遮光



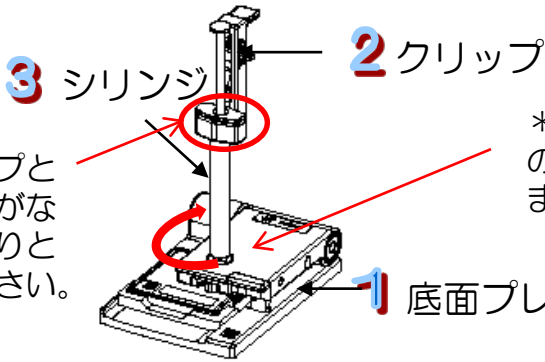
熱処理後のサンプル及びラダは遮光を心がけてください。



調製したサンプルとラダは調製日のみ使用可能です。

- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

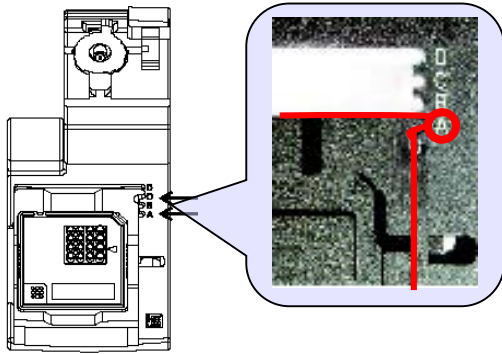
## 6 チップ調製スタンドを準備します



\*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。

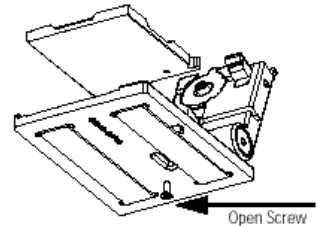
\*シリンジを台座に取り付ける際、時計回りの方向でゆるみがない様にしっかりとまわして入れてください。

### 1 底面プレートの位置を A に合わせます

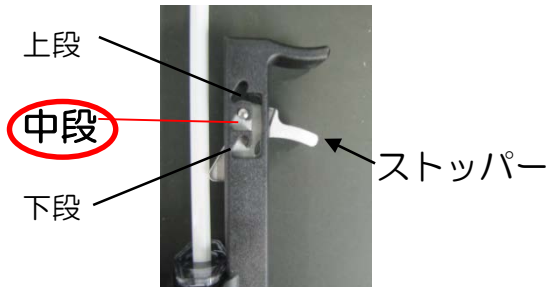


\*プレートの位置をかえる場合

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。

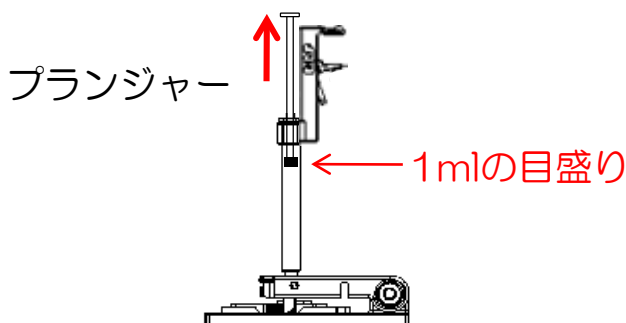


### 2 クリップのストッパーの位置を合わせます

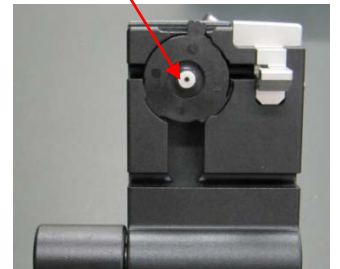


\*蓋の裏のシリコンガasketにゲルやほこりなどが付着していたり亀裂が入っていると、ゲルが充填できません。ゲルやほこりなどを取り除いてください。亀裂が入っている場合、新しいものと交換してください。

### 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

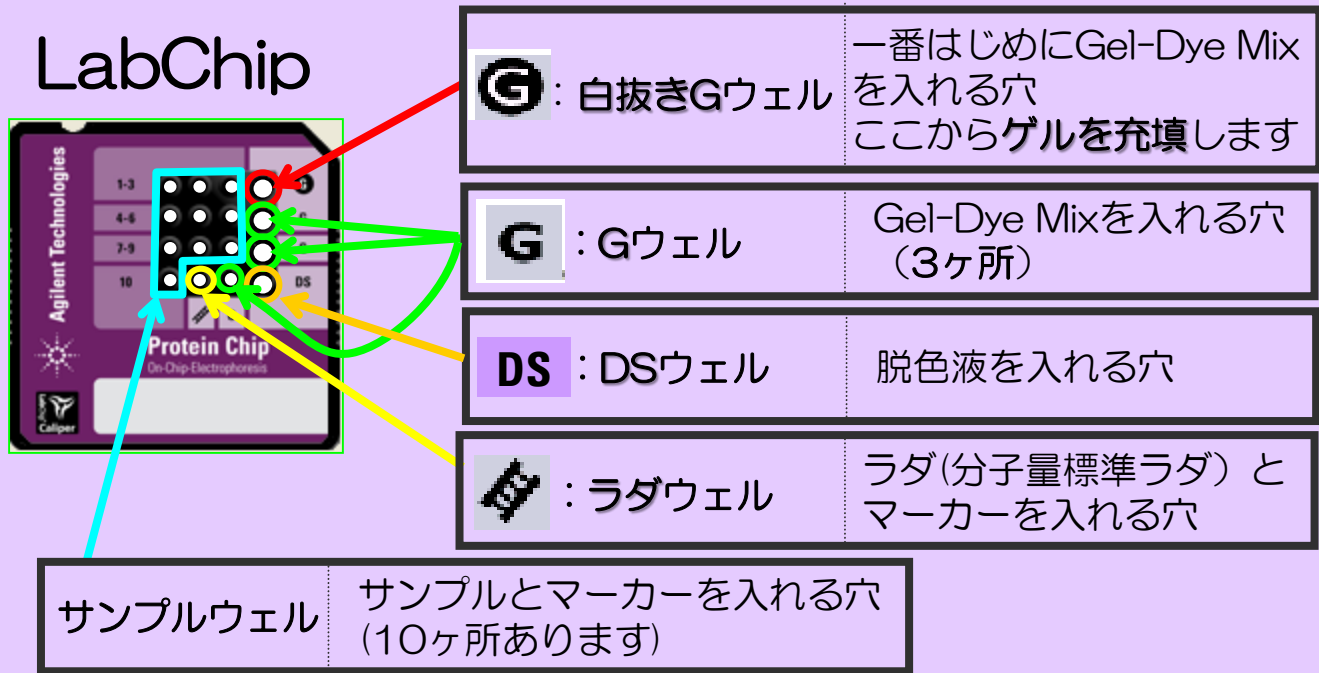


\*シリンジはキットを新しくした際、または3ヶ月に1度新品に交換してください。



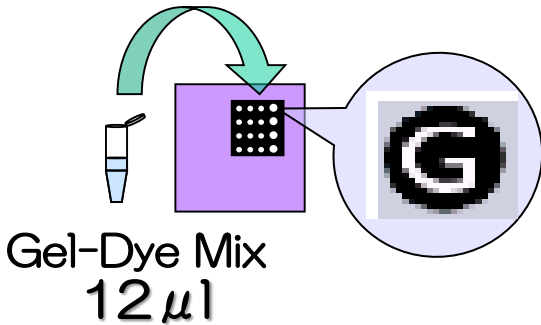
- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

# 7 チップにGel-Dye Mixを注入します

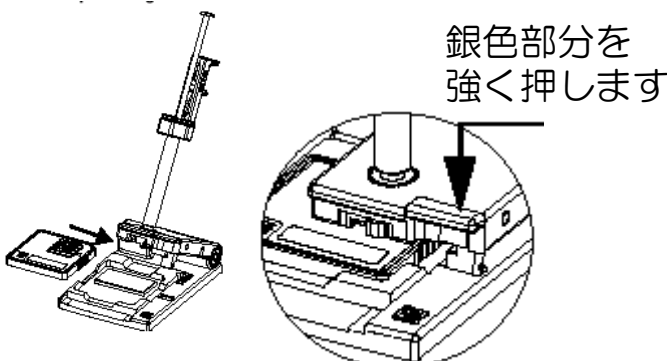


※ LabChipは室温保存します

1 Gel-Dye Mix 12  $\mu$ 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。

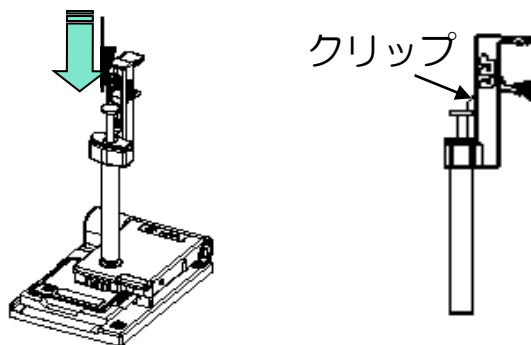
**Point**

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

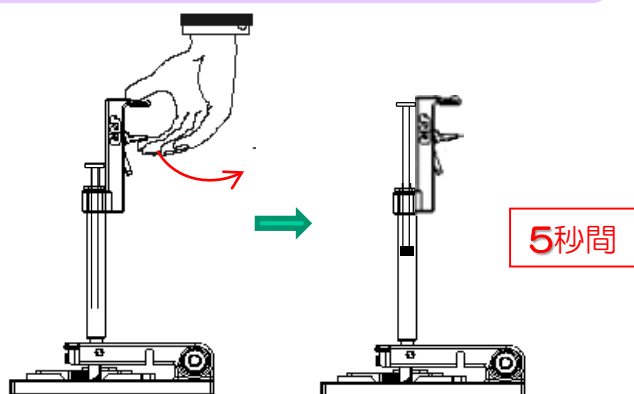


4 そのまま60秒間放置します

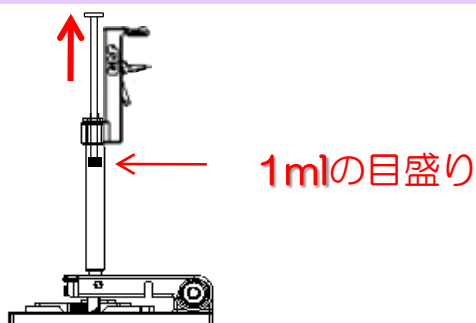


60秒はタイマーできちんとはかりましょう。

5 クリップのストッパーをはずして  
5秒待ちます

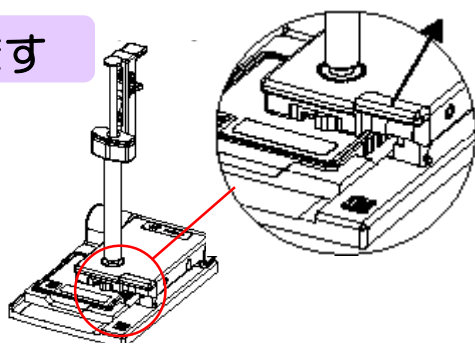


6 プランジャーを元の位置 (1ml) へ  
ゆっくり引き上げます

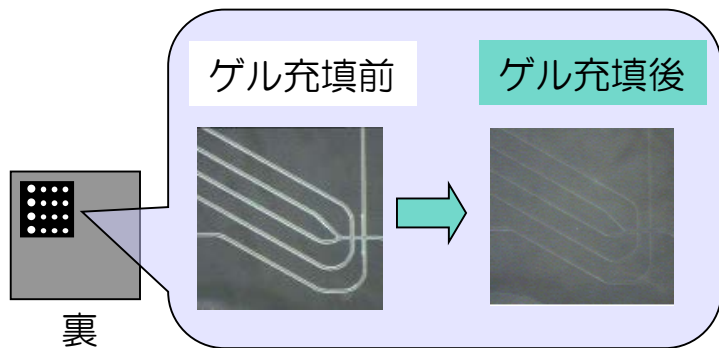


プランジャーを元の位置(1ml)へ  
もどさずに蓋を開けると  
Gel-Dye Mixが逆流し飛び散るこ  
とがあります。

7 蓋を開けます



3 チップの確認をします



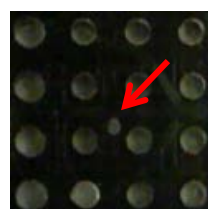
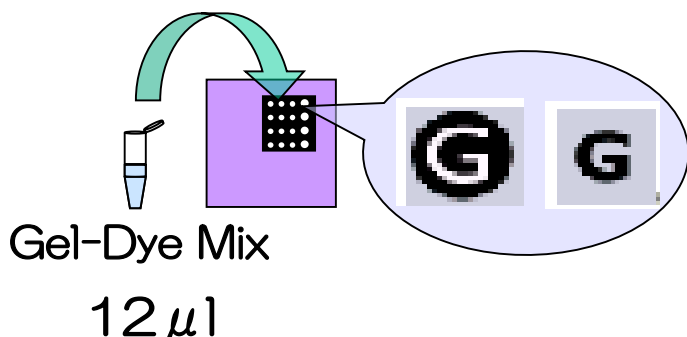
Point

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。

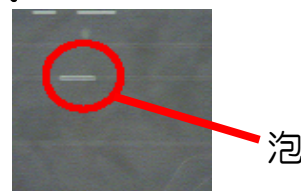
流路の形と異なる不定形の大きな泡は無視して下さい。

9 (白抜きG) ウェルに残っている Gel-Dye Mixをピペットでいったん取り除きます

10 (白抜きG) ウェルと (G) ウェル3ヶ所の合計4ヶ所に Gel-Dye Mixを12 $\mu$ lずつ入れます



✗ 流路に泡が入っている悪い例

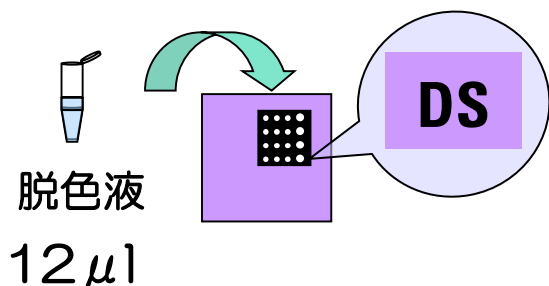


フローチャート



8 チップに脱色液を入れます

DS ウェルに脱色液を12 $\mu$ l入れます



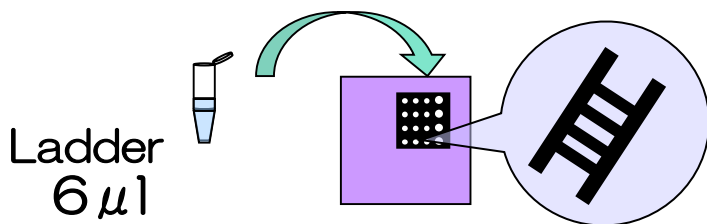
Point

脱色液は粘性が高いのでゆっくり吸い上げます。  
また脱色液を出す時もゆっくり行い、ピペットチップに残らないようにしましょう。



## 9 チップにラダを入れます

調製したラダ6  $\mu$ lをラダウェル  に入れます



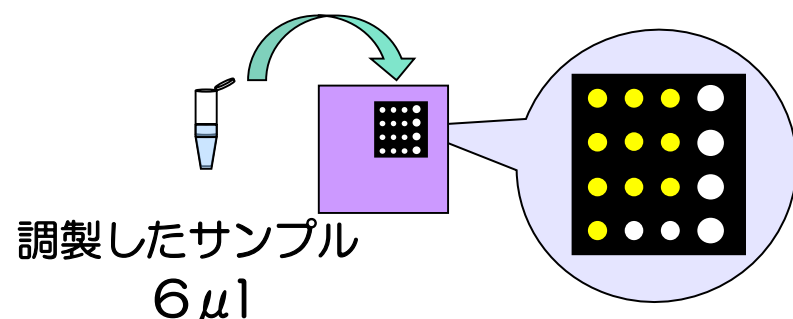
Ladder  
6  $\mu$ l

フローチャート



## 10 チップにサンプルを入れます

調製したサンプル6  $\mu$ lを  
各サンプルウェルに入れます



調製したサンプル  
6  $\mu$ l

サンプルが10個以下の場合  
残りのサンプルウェルに調製した  
残りのラダ液6  $\mu$ lを入れます



必ず残りのサンプルウェルに  
ラダを入れましょう。  
分析が正常に行われなくなります。



## 11 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

Protein80 を選択してください



フローチャート



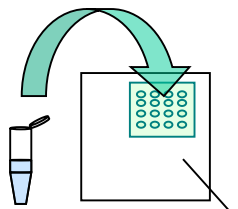
## 12 電極を洗浄します

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超純水を350  $\mu$ l 入れます(どのウェルから入れても構いません)

超純水  
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

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。

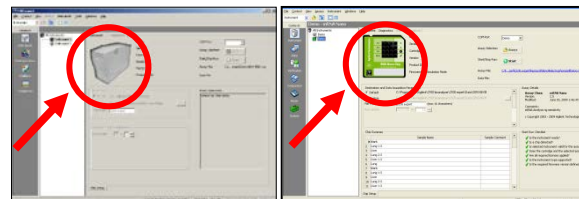
バイオアナライザの操作と解析については別冊の簡易取り扱い説明書を参考にしてください。



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。



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超純水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。



洗浄が終わったら電極クリーナーに入れた超純水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

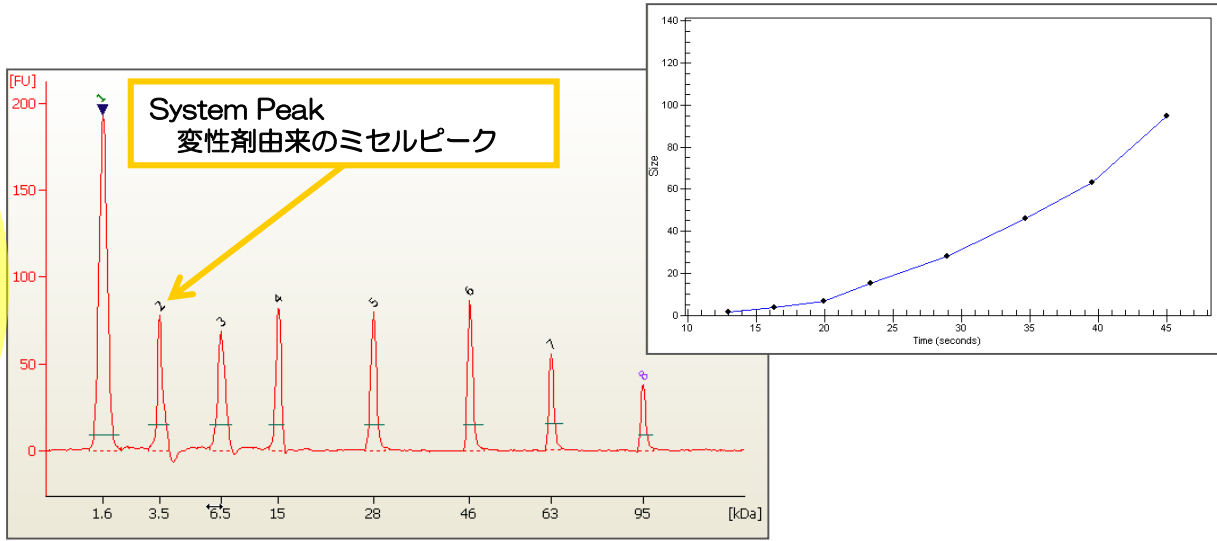
		Protein80	Protein230	High Sensitivity Protein250
分子量範囲		5~80kDa	14~230kDa	10~250kDa
定量範囲		60~2,000ng/ $\mu$ l (CA II in PBS)	15~2,000ng/ $\mu$ l (CA II in PBS) 30~2,000ng/ $\mu$ l (BSA in PBS)	0.3~3,000ng/ $\mu$ l
定性範囲		6~4,000ng/ $\mu$ l (CA II, BLG in PBS)	6~5,000ng/ $\mu$ l (CA II) 15~5,000ng/ $\mu$ l (BSA in PBS)	ラベル化時の必要総タンパク質量 通常プロトコル: 1~3,000ng/ $\mu$ l Picoプロトコル*: 10pg~1ng/ $\mu$ l
Gel-Dye Mix	Gel ●	1 vial (事前にフィルタ遠心)	1 vial (Dyeを入れた後遠心)	調製の必要なし
	Dye ●	25 $\mu$ l		
フィルタ遠心	遠心力	2,500 x g $\pm$ 20%		
	時間	15分		
底面プレートの位置		A		
クリップの位置				
Gel-Dye Mix**の アプライ量		 12 $\mu$ l (ゲル充填後、除去)	 12 $\mu$ l (除去必要なし)	
Gel-Dye Mix**の 圧縮時間		60秒		90秒
Gel-Dye Mix**の アプライ量		 (Gel-Dye Mix除去後) と  12 $\mu$ l		 12 $\mu$ l
脱色液の アプライ量		 12 $\mu$ l		
ラダ (●) の アプライ量		予め調製必要  6 $\mu$ l		
サンプルの アプライ量		予め調製必要 6 $\mu$ l		
専用ミキサー		なし		

\*参照 <http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5990-3703EN.pdf>

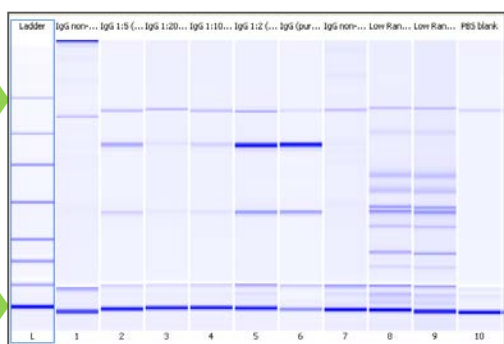
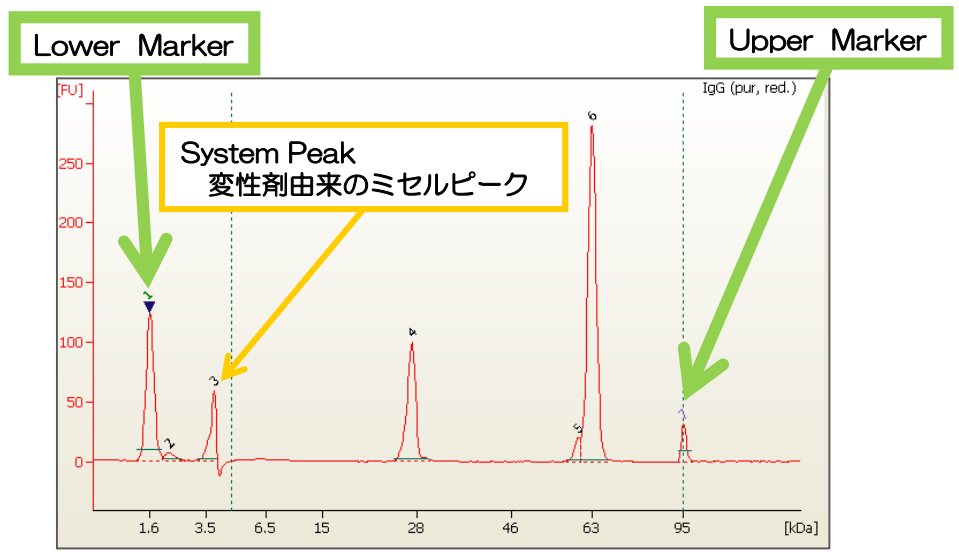
\*\*High Sensitivity Protein250 Kitの場合、Gelのみ

**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的位置 (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。

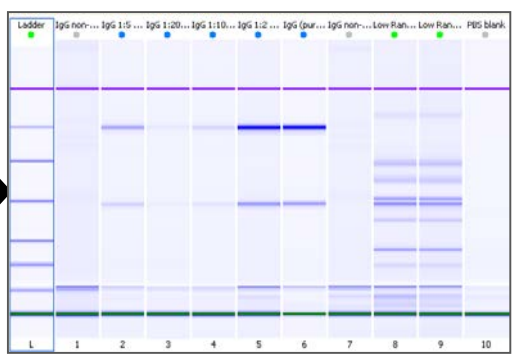
黄色キャップの  
 チューブ  
  
 Ladder  
 予め調製が  
 必要です



**Marker** :サンプルバッファ及びラダの中にMarkerが含まれています。  
 Markerを使用しデータを補正します。



補正



# Protein Kit

マーカー及びラダの各ピークの分子量 (kDa)

	Protein 80	Protein 230	High Sensitivity Protein 250
LM	1.6	4.5	5.0
1	3.5	7.0	15.0
2	6.5	15.0	28.0
3	15.0	28.0	46.0
4	28.0	46.0	63.0
5	46.0	63.0	95.0
6	63.0	95.0	150.0
7	-	150.0	240.0
UM	95.0	240.0	-

## 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](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。