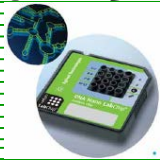


はじめてでも出来る!



バイオアナライザ簡単マニュアル

シリーズII RNA6000 ナノキット用

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 RNA6000 ナノ キット

- RNA ナノ用ラボチップ25枚
- 電極洗浄用チップ2枚
- シリンジ (1)
- Safe-Lock Eppendorf Tubes PCR clean (DNase/RNase free) (30)
- RNA6000 ナノ用試薬 (4℃保存)
 - ● Gel (1.2ml x 2vials)
 - ● Dye (35 μ l x 1 vial)
 - ● Marker (内部標準) (1.2ml x 2 vials)
 - ● Ladder (分子量標準ラダ) (35 μ l x 1 vial) (-20℃, 熱変性後は-80℃)
- スピンフィルタ (4)

ご用意いただくもの

■ RNAサンプル及びラダ調製・分注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 x g 及び 13000 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

■ ヒートブロック または ウォーターバス (70℃)

■ サンプル保冷用アイスボックス


■ RNase-ZAP (Ambion) *他社製類似品の使用は推奨いたしません

■ Nuclease-free water




RIN(RNA Integrity Number)は2100 Expert ver. 02.03以上でご覧いただけます。
それ以前のソフトウェアで取得したデータを別PCで解析することが可能です。

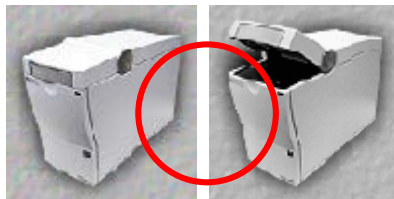
準備に入る前に…

 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。



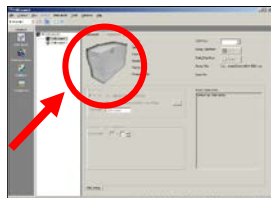
ソフトウェアが装置を
認識しています



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

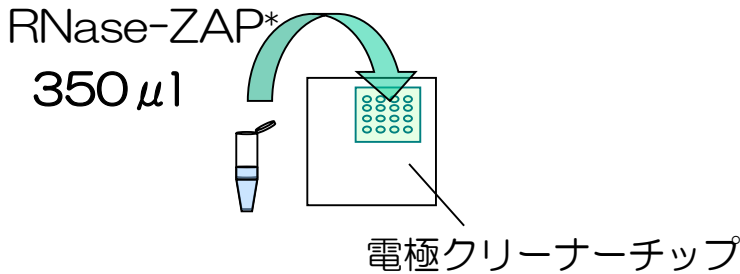
- 1 電極を洗浄します
 - 2 サンプルとラダを調製します
 - 3 Gelを調製します
 - 4 Gel-Dye Mix を調製します
 - 5 チップ調製スタンドを準備します
 - 6 チップにGel-Dye Mixを注入します
 - 7 チップにマーカールを入れます
 - 8 チップにラダを入れます
 - 9 チップにサンプルを入れます
 - 10 マーカーとサンプルを混ぜます
 - 11 バイオアナライザで分析します
 - 12 電極を洗浄します
- 2 3
5 は
場合によっては
省略できます

- 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

1 電極クリーナーチップで電極を洗浄します (RNase-ZAP)

電極クリーナーチップ1枚にRNase-ZAP*を350 μ l入れます
(どのウェルから入れても構いません)



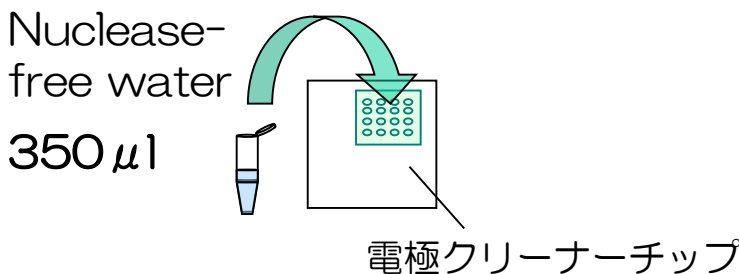
電極クリーナーをバイオアナライザにセットし蓋を閉めます



1分後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 (Nuclease-free water)

続いてもう1枚の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



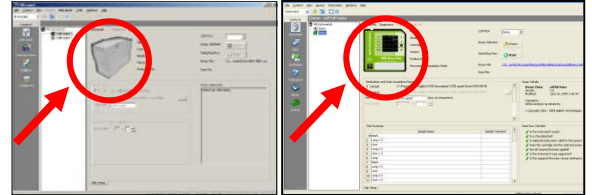
10秒後チップを取り出し、10秒間蓋を開けて電極を乾燥させます



RNase に汚染されたり、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扱い説明書を参考にしてください。



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RNase-ZAP及び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。



*RNase-ZAPは米国Ambion社の登録商標です。他社製類似品の使用は推奨いたしません。



洗浄が終わったら電極クリーナーに入れたRNase-ZAP及び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 12

2 サンプルとラダを調製します



RNA低吸着のチューブの使用を推奨します。必ず手袋をしましょう
 (「ご用意いただくもの」参照)

サンプルの総量を調製します

総量の目安	定量範囲	total RNA	25-500ng/ μ l
		mRNA	25-200ng/ μ l

濃度の濃いサンプルはNuclease-free water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。

サンプルを熱処理します

70°C 2分間 ⇒ 氷上で急冷5分間

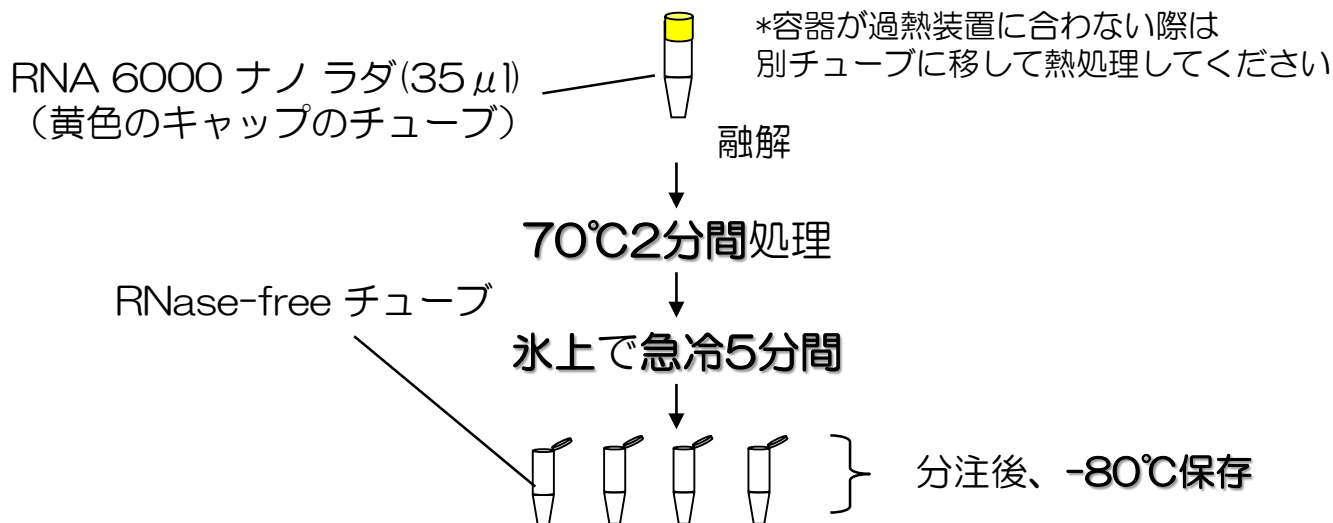
*氷上に保存しておいたサンプルは処理した当日中に使用しましょう。

ラダ*を熱処理します

*ラダは別途ご購入いただけます。

キットに含まれているラダ (冷凍保存品) を融解して均一にし熱処理を行い、その後分注して-80°Cで保存します。

ラダの熱処理が不十分な場合バンドがブロードになったりピークが2つに分かれることがあります。



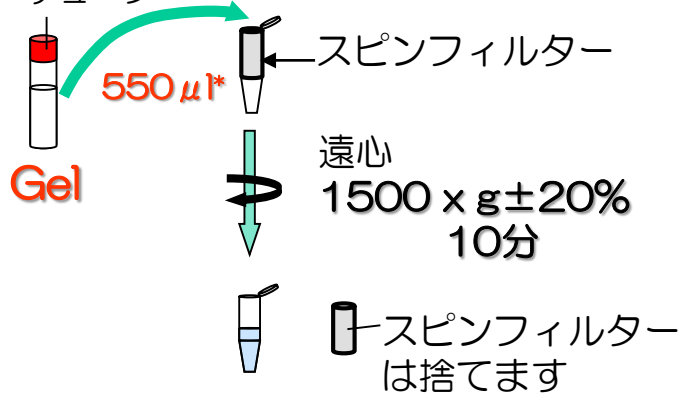
ラダの凍結融解の繰り返しは5回までにしましょう。
 午前に融解し氷上に保存しておいたものは午後にも使用できます。



3 Gelを調製します

1 Gel (●) 550 μ lをスピ
ンフィルターで遠心濾過します (室温)

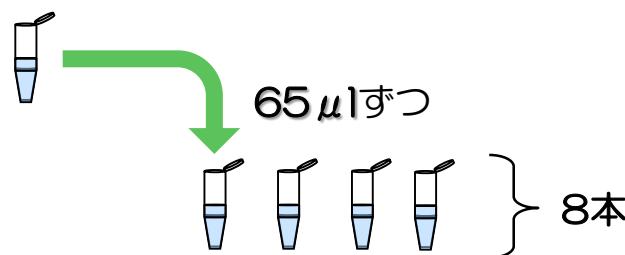
赤いキャップの
チューブ



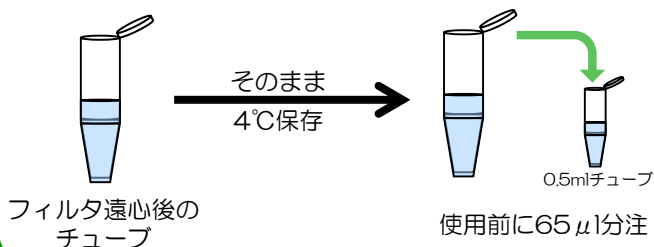
*Gel 1 vial にはフィルター2回分の容量が入
っています

残ったGelはそのまま4°Cで保存してください

2 遠心濾過したGelをRNase-freeの
0.5mlチューブに65 μ lずつ
分注します



分注せずに保存することも可能です



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。

* 試薬の劣化をできるだけ防ぐために、
30分の室温放置後はなるべく早く実験を
行い、試薬を4°C保管してください。

* 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。



Gelは粘性が高いのでゆっくり
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。



必ずキット添付の0.5mlチューブを
使用してください。



フィルター濾過したGelは1ヶ月
使用できます (4°C保存)。

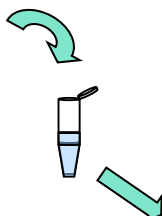


4 Gel-Dye Mixを調製します

1 分注したGel 65 μ lにDye(●) 1 μ lを入れ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 1 μ l



ボルテックスで
良く混合します

2 室温にて13,000 x gで10分間
遠心します



遠心
13,000 x g
10分間



遮光します



Dyeは通常4°C、遮光保存します。
*保存条件(4°C)でDyeは凝固しています。



Dyeや分注したGelは必ず**30分以上室温**に置いた後、ボルテックスでよく攪拌し均一化しましょう。



1 μ l Dyeを加えた後、Dyeバイアルは4°Cへ戻してください。
同日、複数枚のチップを泳動する際は一度にGel-Dye Mixを調製し、なるべくDyeバイアルを室温に放置しないようにしましょう。
また、調製したGel-Dye Mixも長時間の室温放置は避けてください。



調製したGel-Dye Mixは**遮光**してください。



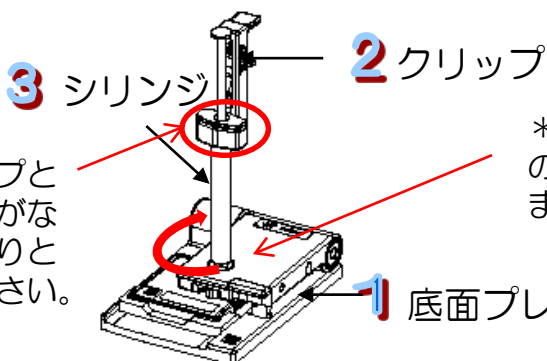
遠心作業終了後は静かに取り出し振動を与えないように注意して**直ちに**使用してください。



調製したGel-Dye Mixは**調製当日限り**有効です。
余ったGel-Dye Mixは廃棄してください。
(分注したGel 65 μ lで調製したGel-Dye Mixは1チップ分です。
残ったGel-Dye Mixは使用できません。)

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

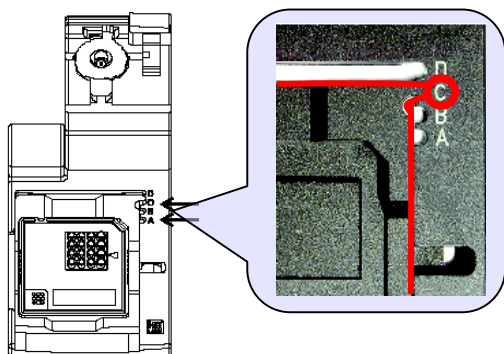
5 チップ調製スタンドを準備します



*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。

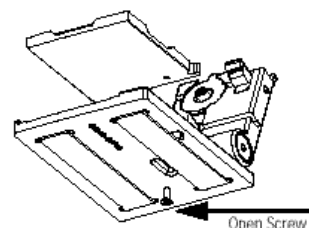
*シリンジを台座に取り付ける際、時計回りの方向でゆるみがない様にしっかりとまわして入れてください。

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

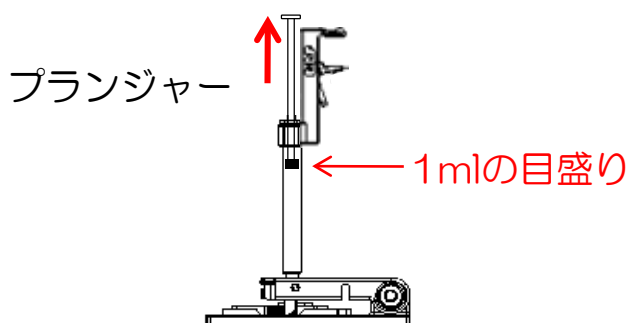


*蓋の裏のシリコンガasketにゲルやほこりなどが付着していたり亀裂が入っていると、ゲルが充填できません。ゲルやほこりなどを取り除いてください。亀裂が入っている場合、新しいものと交換してください。

シリコンガasket



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

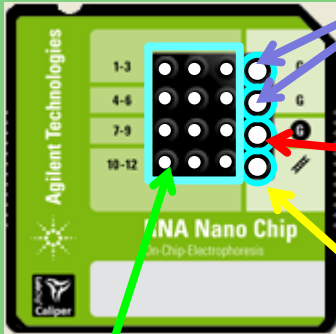


*シリンジはキットを新しくした際、または3ヶ月に1度新品に交換してください。

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

6 チップにGel-Dye Mixを注入します

LabChip



G : Gウェル

Gel-Dye Mixを入れる穴

G : 白抜きGウェル

一番はじめにGel-Dye Mixを入れる穴
ここからゲルを充填します

L : ラダウェル

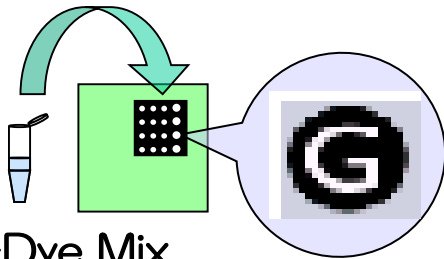
ラダ(分子量標準ラダ)とマーカーを入れる穴

サンプルウェル

サンプルとマーカーを入れる穴
(12ヶ所あります)

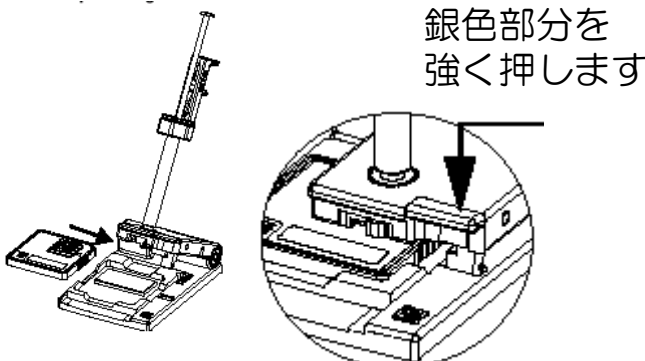
※ LabChipは室温保存します

1 Gel-Dye Mix 9 μ l を **G** (白抜きG) ウェルに入れます



Gel-Dye Mix
9 μ l

2 チップ調製スタンドの蓋を閉めます



銀色部分を強く押します

Point

Gel-Dye Mixは底の方や液表面ではなく、**真ん中**を吸うよう極力気をつけてください。

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

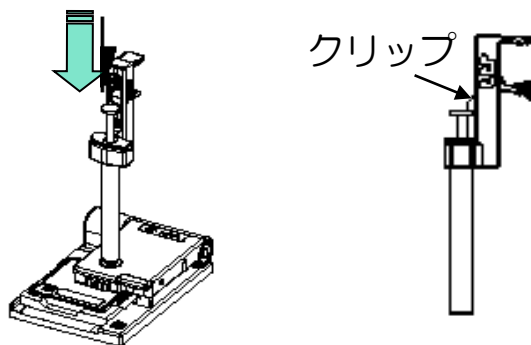
ウェルにGel-Dye Mixを入れる時はピペットチップの先をウェルの底につけるようにします。
(底につけても問題ありません。)

*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30秒放置します



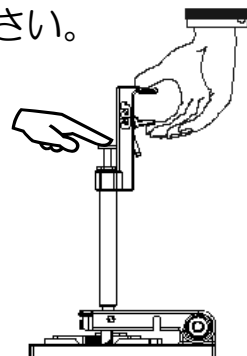
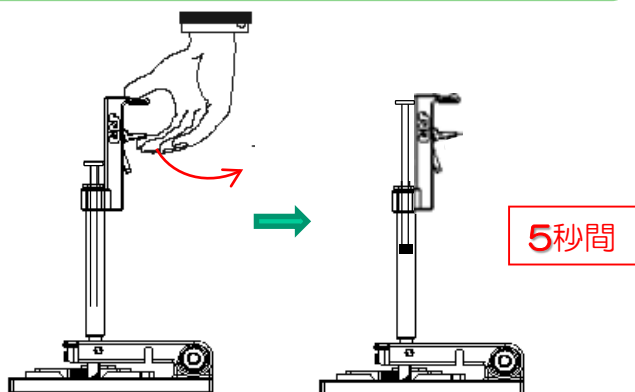
30秒はタイマーできちんと
はかりましょう。

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。

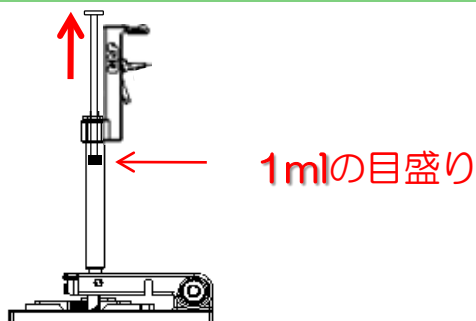


6

プランジャーを元の位置 (1ml) へ
ゆっくり引き上げます

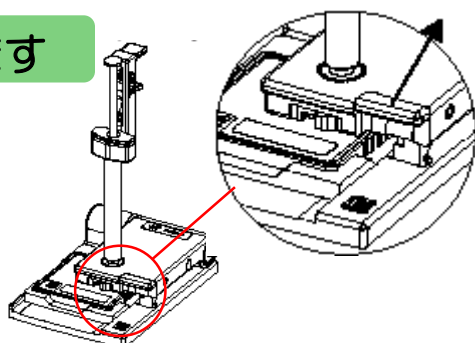


プランジャーを元の位置(1ml)へ
もどさずに蓋を開けると
Gel-Dye Mixが逆流し飛び散るこ
とがあります。

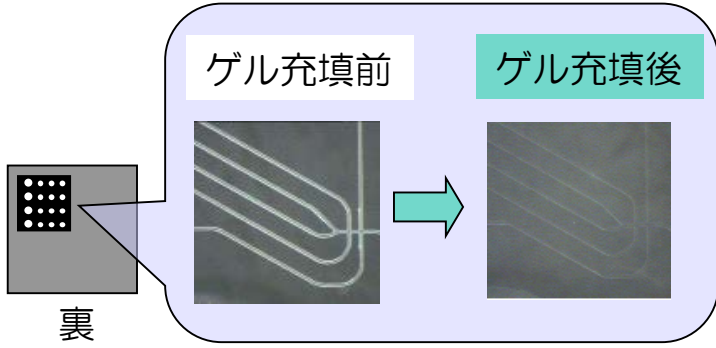


7

蓋を開けます



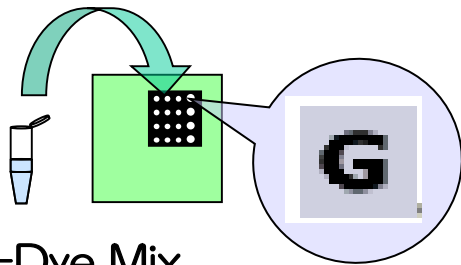
3 チップの確認をします



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2ヶ所にGel-Dye Mixを9 μ lずつ入れます

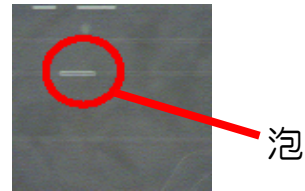


Gel-Dye Mix
 9 μ l

フローチャート



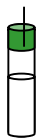
X 流路に泡が入っている悪い例



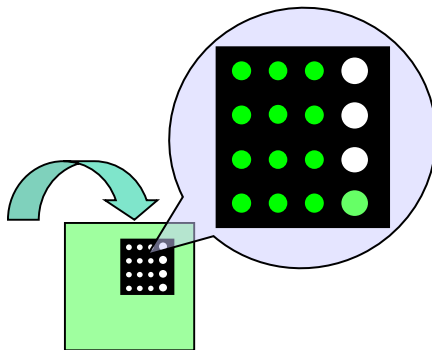
7 チップにマーカーを入れます

マーカー 5 μ lをラダウェル **4** 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 μ l

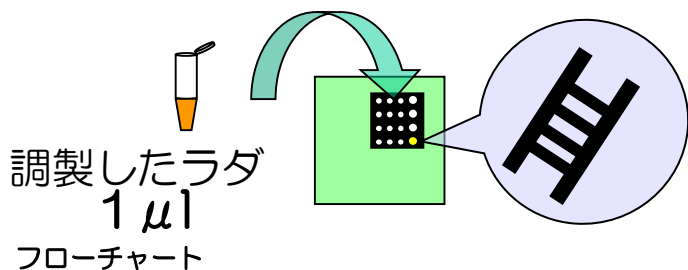


サンプル数が12個以下でも必ず全てのサンプルウェルにマーカーをいれましょう。
 分析が正常に行われなくなります。

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

8 チップにラダを入れます

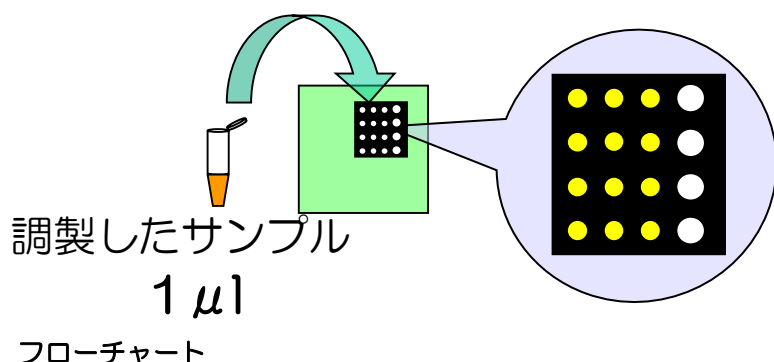
サンプル調製方法（ 2 を参照）にしたがって調製したラダ1 μ lをラダウェル  に入れます



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

9 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



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

10 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

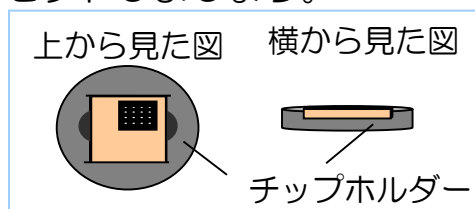


1分間

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	12
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

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

- total RNA (RINが計算されます)
 サンプルの生物種により適宜選択してください
 真核生物* → Eukaryote totalRNA Nano
 原核生物 → Prokaryote totalRNA Nano
 植物 → Plant totalRNA Nano (ver 02.07以上)
 *酵母の場合、植物用Assayを選択することをおすすめします
- mRNA (RINは計算されません)
 mRNAやcRNAの場合 → mRNA Nano

フローチャート

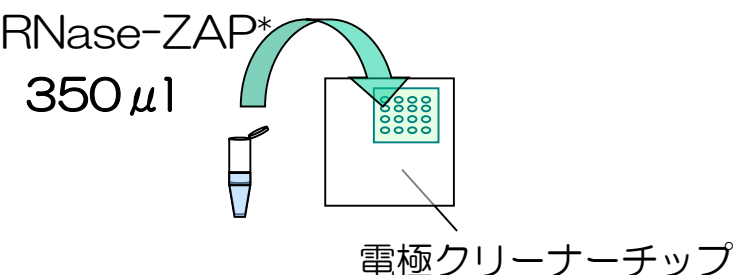
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

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(RNase-ZAP)

電極クリーナーチップ1枚にRNase-ZAP*を350 μl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。



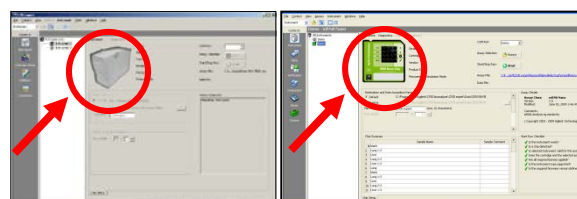
分析の終了したチップはなるべく早く取り出しましょう。
 放置時間が長すぎると試料が電極にこびりつき、以降の分析が正常に行われなくなることがあります。



RNase に汚染されたり、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扱い説明書を参考にしてください。

Point

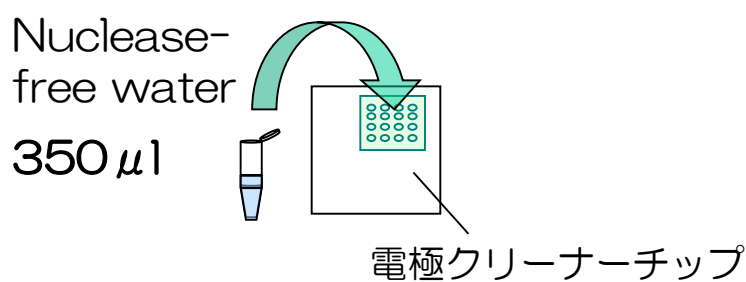
電極クリーナーチップを軽く揺らしてチップの全てのウェルにRNase-ZAPが満たされるようにします。
 蓋を閉めた時にスクリーンの装置のアイコンがチップに変わることをご確認ください。



*RNase-ZAPは米国Ambion社の登録商標です。他社製類似品の使用は推奨いたしません。

3 電極クリーナーチップで電極を洗浄 します(Nuclease-free water)

続いて**もう1枚**の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)



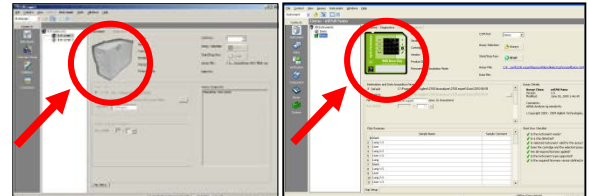
電極クリーナーをバイオアナライザに
セットし蓋を閉めます



10秒後チップを取り出し、**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RNase-ZAP及び
Nuclease-free waterはピペット
で吸い出しておきましょう。

よく精製されたRNAの分析を
2チップ以上連続して行う場合のみ
RNase-ZAPによる洗浄作業を
(12-2)省略できます。

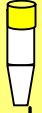
簡単プロトコル比較表

		RNA6000 ナノ	RNA6000 ピコ	Small RNA
分子量範囲		-	-	6-150nt
サンプルの調製		total RNA 25~500ng/ μ l	total RNA 0.2~5ng/ μ l	Total RNA 1~100ng/ μ l
		Poly(A)+RNA 25~250ng/ μ l	Poly(A)+RNA 0.5~5ng/ μ l	miRNA画分抽出物 1~20ng/ μ l
				Oligonucleotide 10~2000ng/ μ l
Gel-Dye Mix	Gel ●	(事前に要フィルター遠心)		
	Dye ●	65 μ l	40 μ l	
フィルター遠心	遠心力	Gelのみ 550 μ l 1,500 x g \pm 20% (65 μ l分注)	Gelのみ 650 μ l 10,000 x g \pm 20% (分注なし)	
	時間	10分	15分	
Gel-Dye Mix 再遠心	遠心力	Gel-Dye Mix 13,000 x g		
	時間	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のアプライ量		G 9 μ l		
Gel-Dye Mixの圧縮時間		30秒	60秒	
Gel-Dye Mixのアプライ量		G 9 μ l		
脱色液のアプライ量		なし		
Conditioning Solution (○)のアプライ量		なし	CS 9 μ l	
Marker (●)のアプライ量		III とサンプルウェル 5 μ l		
ラダ (●)のアプライ量		ナノ・ラダ	ピコ・ラダ	Small RNAラダ
		III 1 μ l		
サンプルのアプライ量		サンプルウェル 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	2000/min	2400/min

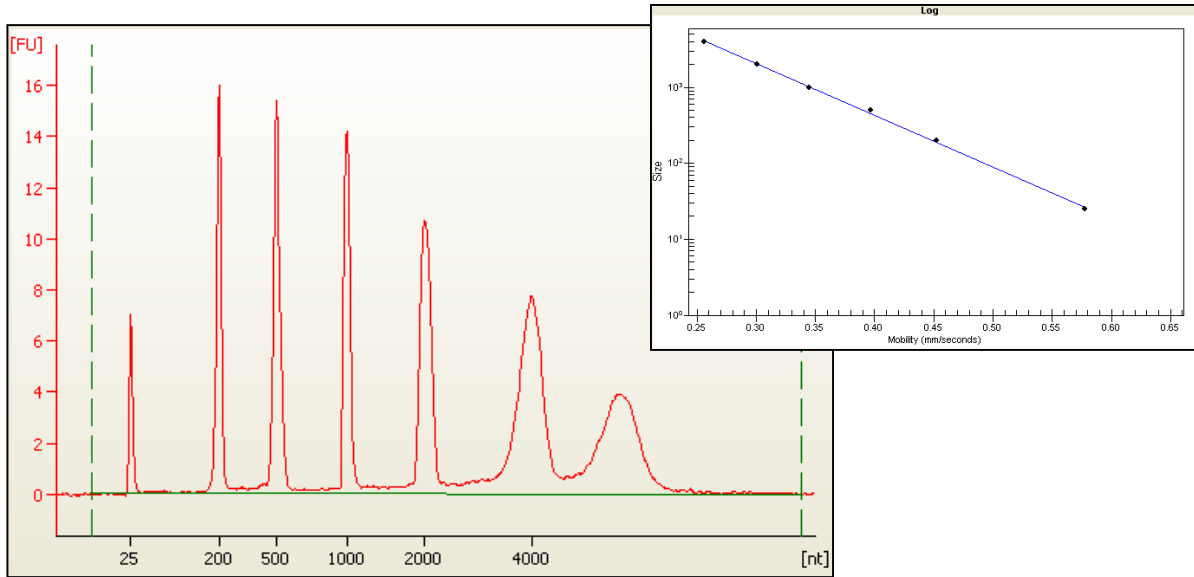
ladder :ラダ (分子量標準ラダ)

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



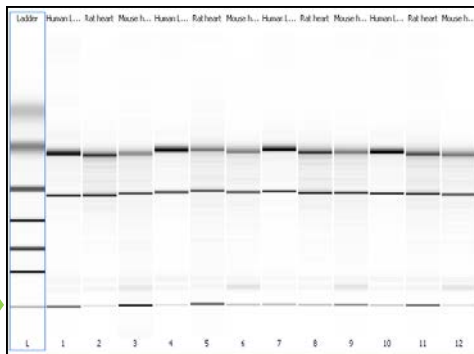
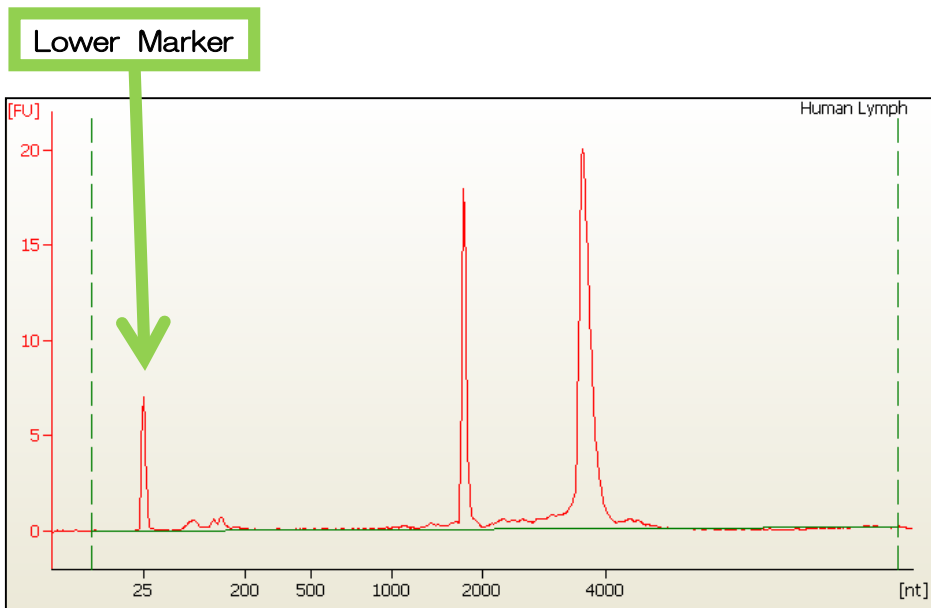
Marker :マーカー (内部標準)

ラダと全てのサンプルに加え、データを補正します。

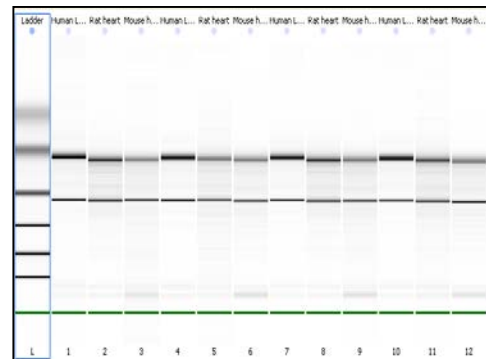
緑のキャップのチューブ



Marker



補正



Lower Marker

RNA ナノKit

マーカー及びラダの各ピークの分子量 (nt)

	RNA6000 ナノ
LM	25
1	200
2	500
3	1000
4	2000
5	4000

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。