

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 ピコキット用

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 ピコ キット

- RNA ピコ用ラボチップ25枚
- 電極洗浄用チップ3枚
- シリンジ (1)
- Safe-Lock Eppendorf Tubes PCR clean (DNase/RNase free) (30)
- RNA6000 ピコ用試薬 (4℃保存)
 - ● Gel (1.2ml x 2vials)
 - ● Dye (35 μ l x 1 vial)
 - ● Marker (内部標準) (600 μ l x 4 vials)
 - ○ Conditioning Solution (300 μ l x 1 vial)
 - ● Ladder (分子量標準ラダ) (10 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

■ 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。

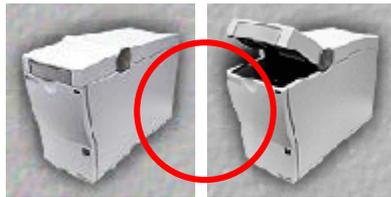
準備に入る前に…

 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。

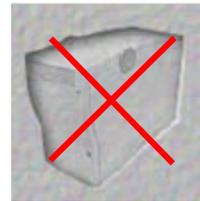
* 保存条件（4℃）でDyeは凝固しています。完全に融解させたのち、
ボルテックスミキサーでよく攪拌し均一にしましょう。

* 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。



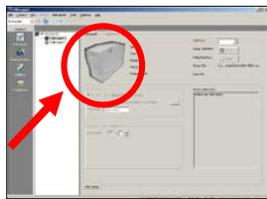
ソフトウェアが装置を
認識しています



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

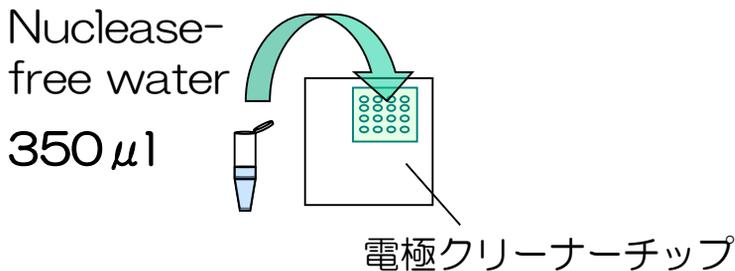
- 1 電極を洗浄します
 - 2 サンプルとラダを調製します
 - 3 Gelを調製します
 - 4 Gel-Dye Mix を調製します
 - 5 チップ調製スタンドを準備します
 - 6 チップにGel-Dye Mixを注入します
 - 7 チップにConditioning Solutionを入れます
 - 8 チップにマーカ-を入れます
 - 9 チップにラダを入れます
 - 10 チップにサンプルを入れます
 - 11 マーカ-とサンプルを混ぜます
 - 12 バイオアナライザで分析します
 - 13 電極を洗浄します
- 2 3
5 は
場合によっては
省略できます

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

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で電極を洗浄
します(Nuclease-free water)

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

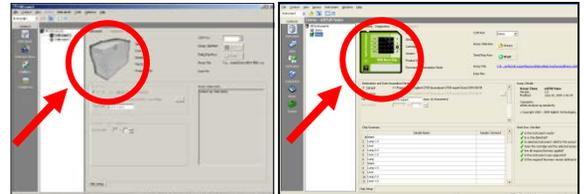
↓
5分後チップを取り出し、**30秒間**蓋を開
けて電極を乾燥させます



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
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。



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。



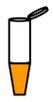
ピコキットでは洗浄にRNase-ZAPを
使用しないでください。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

2 サンプルとラダを調製します



必ず手袋をしましょう

RNA低吸着のチューブの使用を推奨します。
(「ご用意いただくもの」参照)

サンプルの総量を調整します

総量の目安	total RNA	200-5000pg/ μ l
	mRNA	500-5000pg/ μ l



濃度の濃いサンプルはNuclease-free water等で希釈します。

サンプルの緩衝液条件は下記を守ってください。

Tris : 50mM 以下 または NaCl : 50mM以下

RNA濃度や塩濃度が非常に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。



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。



*容器が過熱装置に合わない際は別チューブに移して熱処理してください

RNA 6000 ピコ ラダ(10 μ l)
(黄色のキャップのチューブ)

融解

70°C2分間処理

氷上で急冷5分間

RNase-free waterを90 μ lを加え攪拌します

RNase-free チューブ



分注後、-80°C保存

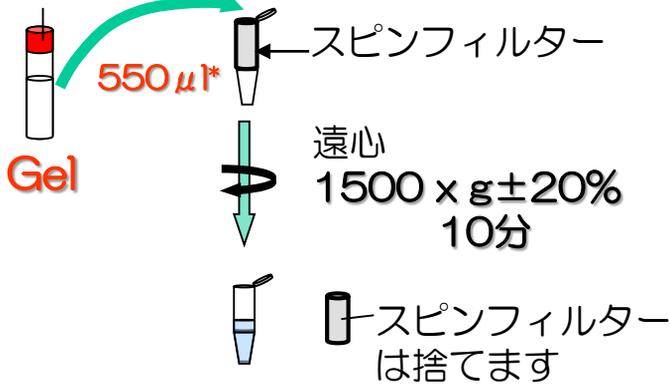
一旦融解した希釈ラダはその日のうちに使用してください。
午前に融解し氷上に保存しておいたものは午後にも使用できます。



3 Gelを調製します

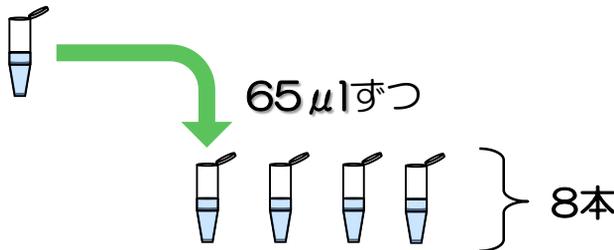
1 Gel (●) 550 μ lをスピ
ンフィルターで遠心濾過します (室温)

赤いキャップの
チューブ

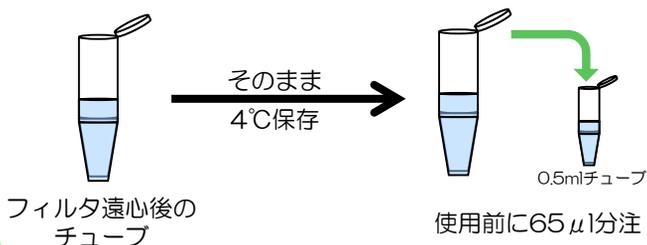


*Gel 1 vial にはフィルター2回分の容量が入
っています
残ったGelはそのまま4°Cで保存してくだ
さい

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。

*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

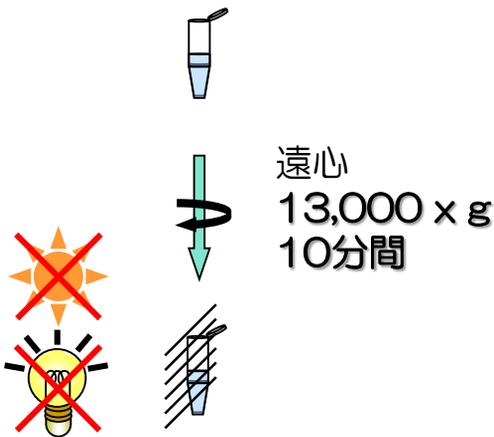
1 分注したGel 65 μ lにDye(●) 1 μ lを入れボルテックスでよく混合します

青いキャップの
チューブ



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



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。



調製したGel-Dye Mixは**遮光**してください。



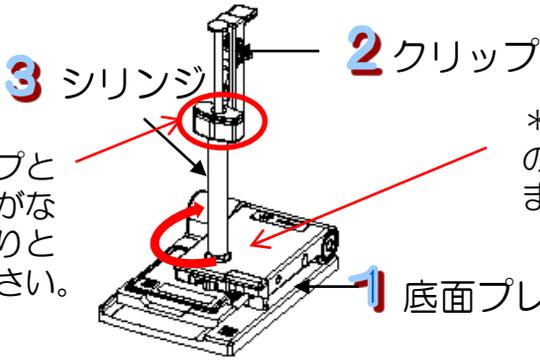
遠心作業終了後は静かに取り出し振動を与えないように注意して**直ちに**使用してください。



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 13

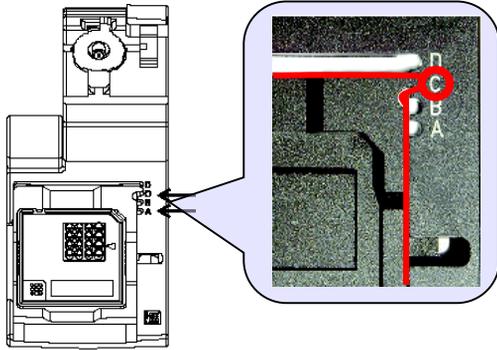
5 チップ調製スタンドを準備します



*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。

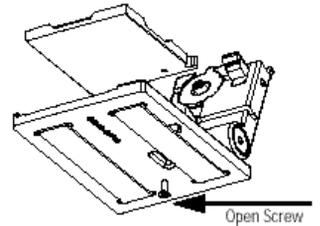
*シリンジを台座に取り付ける際、時計回りの方向でゆるみがない様にしっかりとまわして入れてください。

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

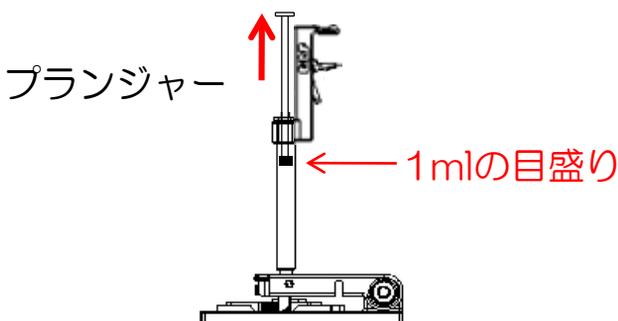


*蓋の裏のシリコンガasketにゲルやほこりなどが付着していたり亀裂が入っていると、ゲルが充填できません。ゲルやほこりなどを取り除いてください。亀裂が入っている場合、新しいものと交換してください。

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

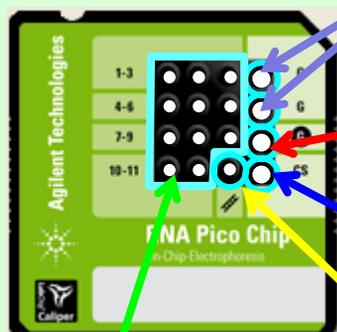


*シリンジはキットを新しくした際、または3ヶ月に1度新品に交換してください。

- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

6 チップにGel-Dye Mixを注入します

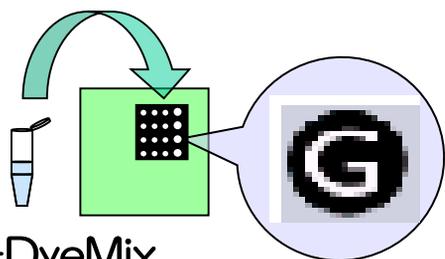
LabChip



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
CS : CSウェル	Conditioning Solutionを入れる穴
ラダ : 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 (11ヶ所あります)

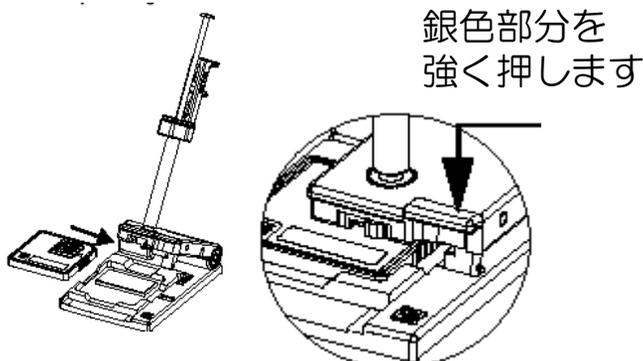
※ LabChipは室温保存します

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。

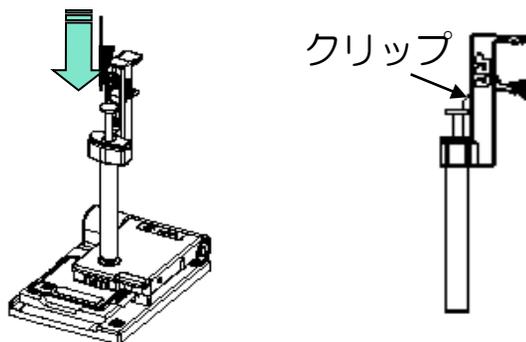
Point

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

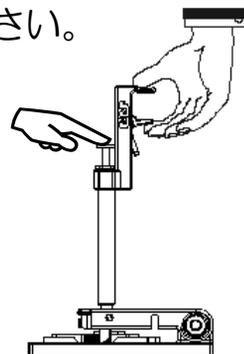
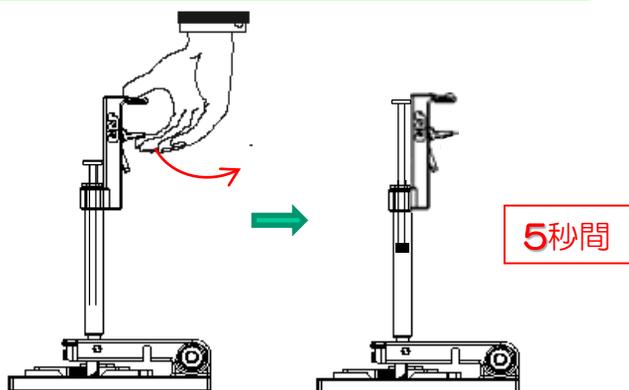


30秒はタイマーできちんと
はかりましょう。

5 クリップのストッパーをはずして
5秒待ちます。



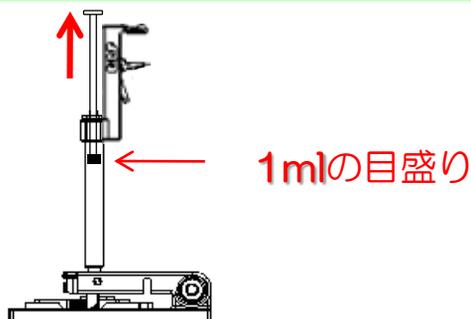
ストッパーをはずす時は
プランジャーに触らないで
ください。



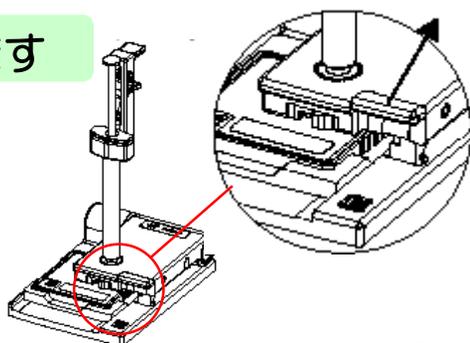
6 プランジャーを元の位置 (1ml) へ
ゆっくり引き上げます



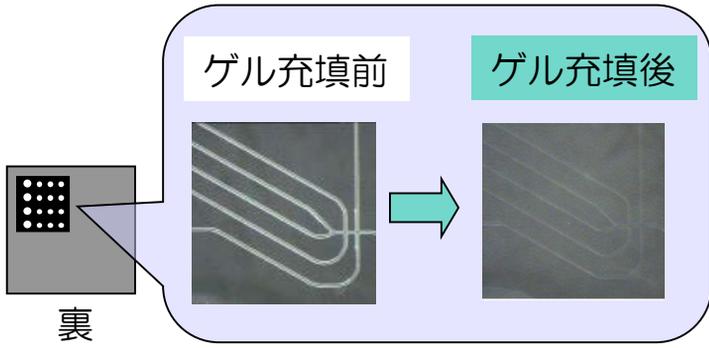
プランジャーを元の位置(1ml)へ
もどさずに蓋を開けると
Gel-Dye Mixが逆流し飛び散るこ
とがあります。



7 蓋を開けます



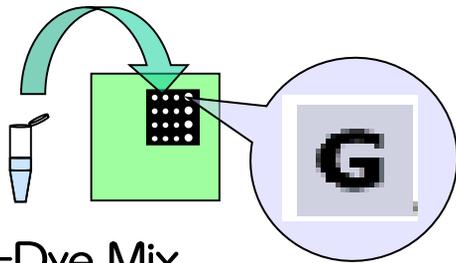
3 チップの確認をします



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9μlずつ入れます



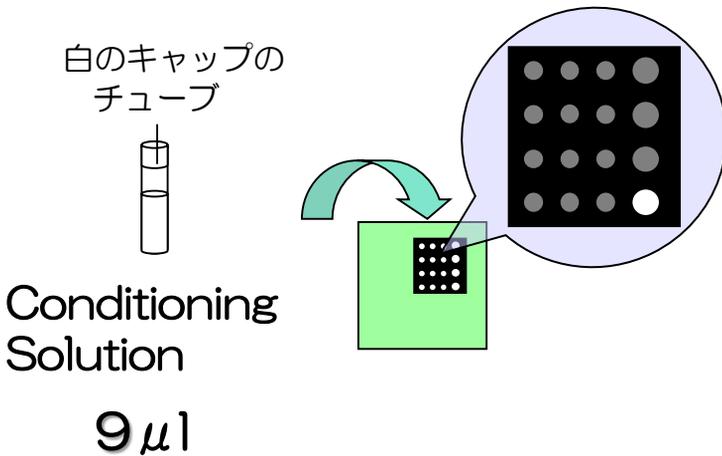
Gel-Dye Mix
 9μl

フローチャート



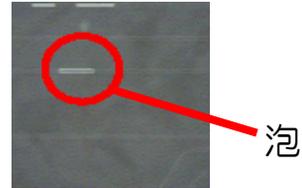
7 チップにConditioning Solutionを入れます

Conditioning Solutionを CS ウェルに入れます



白のキャップのチューブ
 Conditioning Solution
 9μl

✗ 流路に泡が入っている悪い例



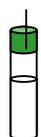
フローチャート



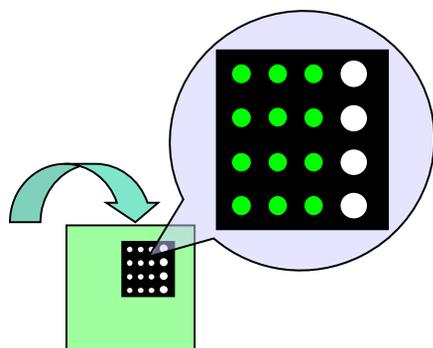
8 チップにマーカールを入れます

マーカール 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



サンプル数が11個以下でも必ず全てのサンプルウェルにマーカールをいれましょう。分析が正常に行われなくなります。

フローチャート

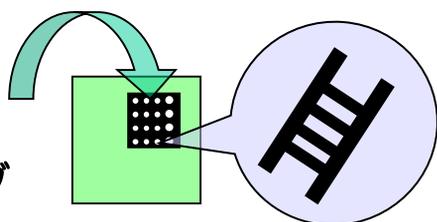


9 チップにラダを入れます

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



調製したラダ
1 μ l

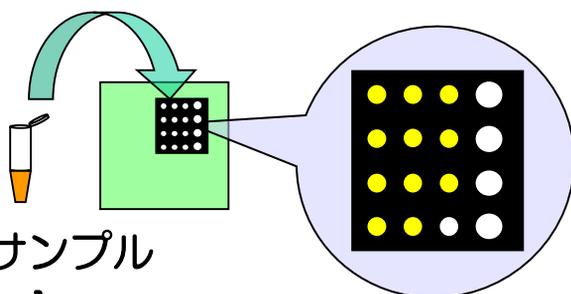


フローチャート



10 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



調製したサンプル
1 μ l

フローチャート



11 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

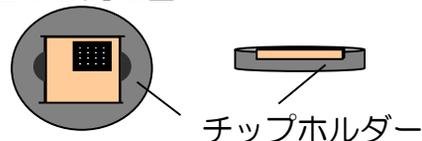


Picoの
目盛りに合わせ

Point

チップホルダーにチップを水平に
セットしましょう。

上から見た図 横から見た図



チップホルダー

✗ チップが水平に入っていない悪い例



*専用ミキサーは
Picoの印に合わせて使用します。

Pico目盛りがない場合はお問い合わせ
ください。



12 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 Pico
 原核生物 → Prokaryote totalRNA Pico
 植物 → Plant totalRNA Pico (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 Pico

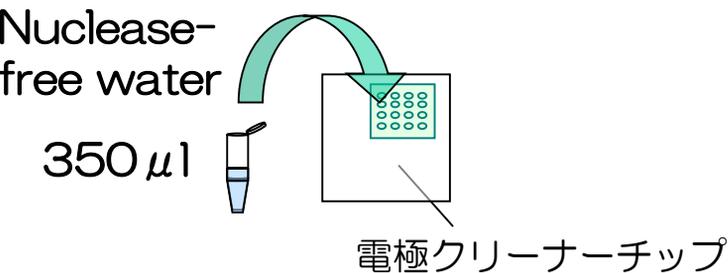
フローチャート



13 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(Nuclease-free water)

電極クリーナーチップ1枚にNuclease-free water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

↓
30秒後チップを取り出して、**30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ないことがあります。



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

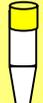
電極クリーナーチップを軽く揺らしてチップの全てのウェルにNuclease-free waterが満たされるようにします。
 蓋を閉めた時にスクリーンの装置のアイコンがチップに変わることをご確認ください。

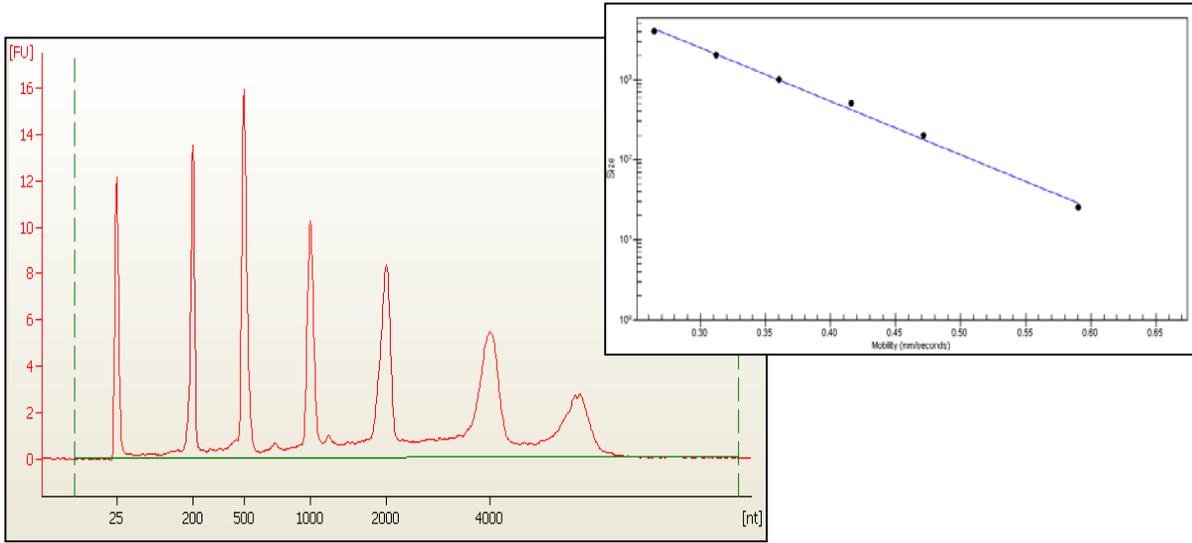


簡単プロトコル比較表

		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	2 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。

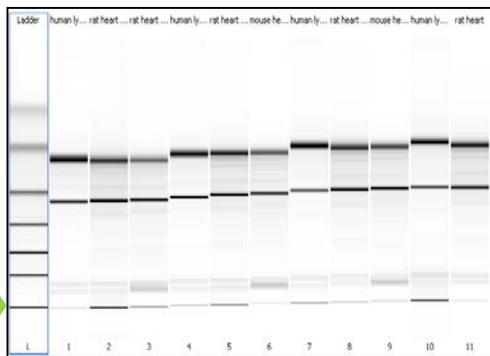
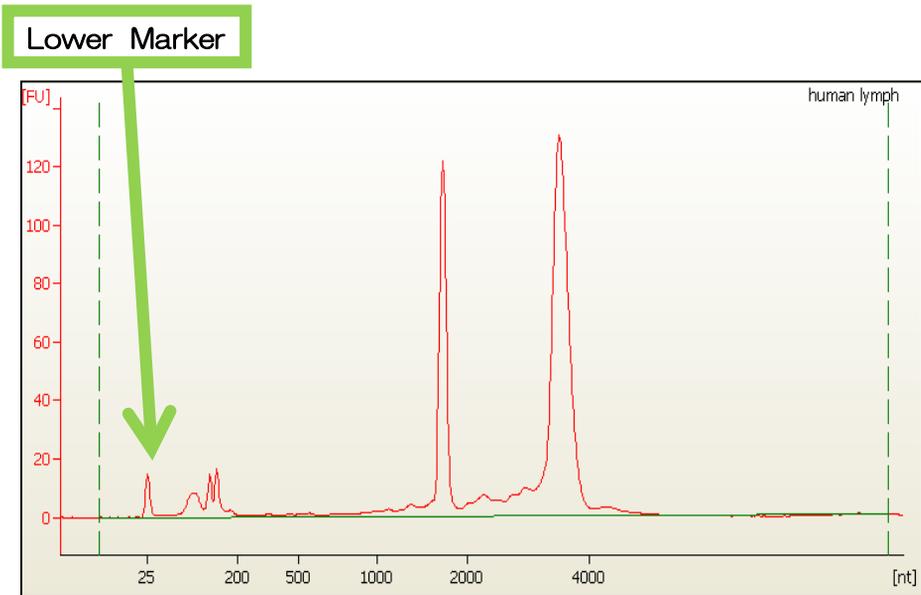
黄色キャップの
 チューブ

 Ladder



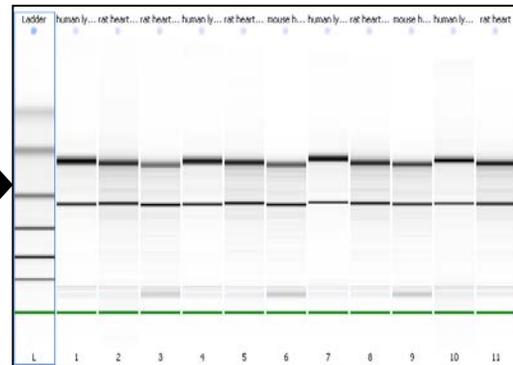
Marker :マーカー (内部標準)
 ラダと全てのサンプルに加え、データを補正します。

緑のキャップの
 チューブ

 Marker



補正



Lower Marker

RNA ピコKit

マーカー及びラダの各ピークの分子量 (nt)

	RNA6000 ピコ
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。