

はじめてでも出来る!



バイオアナライザ簡単マニュアル

High Sensitivity Protein250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 Protein 250キット

- High Sensitivity Protein250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 Protein250用試薬
 - High Sensitivity Protein250 ラベル化試薬キット【-20℃保存】
 - ● Labeling Dye (600 μ l x 1 vials 別梱包)
 - ● DMSO (100 μ l x 1 vial, Dye用溶媒)
 - ○ Ethanolamine (100 μ l x 1 vial, ラベル化停止用)
 - ● 10x Standard Labeling Buffer (1 ml x 1 vial)
 - High Sensitivity Protein250 ラダ【-20℃保存】
 - ● Ladder (分子量標準ラダ) (18 μ l x 1 vial, 3ラベル化反応分)
 - High Sensitivity Protein250試薬キット【-20℃保存】
 - ● Gel (600 μ l x 1 vials)
 - ● Destaining Solution; 脱色液(150 μ l x 1 vial)
 - ○ Sample Buffer; サンプルバッファ(100 μ l x 3 vials)


ご用意いただくもの

- pHメータもしくはpH試験紙
(推奨品: Merck, #109543, pHインジケーターストリップ pH6.5-10.0 特定領域用)
- Proteinサンプル及びラダ調製・分注には下記のチューブを推奨します
 - Eppendorf Safe-Lock Protein LoBind 0.5mL
- 遠心機 • 10,000 x g • 室温で使用
- ヒートブロック または ウォーターバス (95-100℃)
- Ice Bath
- 1M DTT (還元条件の場合のみ)
- 超純水 (deionized analysis-grade water)



High Sensitivity Protein 250 Kitをご利用いただくには
2100 Expertソフトウェア ver. 02.06以上が必要です

準備に入る前に…

 サンプルが最適条件でない場合、ラベル化効率に影響します
ラベル化前に以下の点を確認してください

サンプル条件

サンプルの種類	細胞溶解液、細胞抽出液、カラム画分、精製タンパク質、凍結乾燥タンパク質 など
濃度	トータルタンパク質量：1ng/ul~3μg/ul
容量	1ラベル化反応あたり5μl
pH	pH 8.0 - 9.0
最適緩衝液条件	① Standard labeling buffer (SLB:●): 30 mM Tris-HCl, pH 8.5 ※ ¹ ② Sodium bicarbonate buffer: 100 mM NaHCO ₃ , pH 8.5 ※ ² ③ Urea/Thiourea buffer : 30 mM Tris-HCl, 7 M Urea, 2 M Thiourea, pH 8.5 ※ ³
反応干渉物質※ ⁴	<ul style="list-style-type: none"> • 1級アミノ基、チオール基 (DTT, β-メルカプトエタノール, Glutathione, 遊離アミノ酸, イミダゾール, Tris (高濃度)) • 界面活性剤 (CHAPS, TritonX-100, Tween20)

※¹ 最適緩衝液条件が異なる場合、添付の10X Standard Labeling Buffer (●) でサンプルを希釈してください

(サンプルにご使用のbufferのみで、希釈後のpHを予め確認してください)

例：PBS(26mM NaH₂PO₄: 41mM Na₂HPO₄: 79mM NaCl, pH7.4) の場合
1/10 容量の10xSLBを加えることでpH > 8となります

※² Sodium bicarbonate (NaHCO₃) buffer は時間がたつと分解するため、なるべく新しく調製したものをお使いください (4℃で保存、2週間程度まで)
また、使用前に pH を確認してください (pH 8.0 ~9.0)

※³ Urea/Thiourea bufferは時間がたつと分解するため、なるべく新しく調製したものをお使いください (-20℃で保存、2ヶ月程度まで)
また、使用前に pH を確認してください (pH 8.0 ~9.0)

調製法 (500μl)

- 1) Urea (210mg), Thiourea (76mg) に10x SLB 50 μl, 超純水 250 μl を加え、完全に溶解するまで混合
- 2) 超純水 でトータル500μlにする

※⁴ サンプルに反応干渉物質が含まれる場合、カラム等を使用し上記のbufferと置換してください

準備に入る前に…



ラダの繰り返し凍結融解は避けてください。
ラダ 1 vialにはラベル化3回分の量が入っています。
ラダの長時間の室温放置や高温による融解は避けてください。

手順

ラベル化ステップ

- 1 Labeling Dyeを調製します
- 2 サンプルとラダをラベル化します

ラベル化サンプルは保存可能です（遮光・-20℃）

すでにラダ及びサンプルがラベル済みの場合、ラベル化ステップは省略できます

電気泳動ステップ

- 3 電極を洗浄します
- 4 ラベル化サンプル及びラダを希釈します
- 5 サンプルバッファを調製します
- 6 サンプル及びラダを調製します
- 7 チップ調製スタンドを準備します
- 8 チップにGelを注入します
- 9 チップに脱色液を入れます
- 10 チップにラダを入れます
- 11 チップにサンプルを入れます
- 12 バイオアナライザで分析します
- 13 電極を洗浄します

5 7 は
場合によっては
省略できます

ラベル化ステップ

ラベル化サンプルは保存可能です（遮光・-20℃）

使用する試薬

-Part I 【-20℃保存】

- Labeling Dye
- DMSO
- エタノールアミン
- Standard Labeling Buffer

-Part II 【-20℃保存】

- Ladder（分子量標準ラダ）

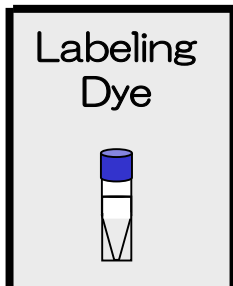
使用する機器等

- pHメータもしくはpH試験紙
- ボルテックスミキサー
- 遠心機（10000 x g, 室温）
- 0.5ml チューブ
- 超純水
- 氷

ラベル化前の準備

遮光

DMSO



【Labeling Dye 調製前】

*Labeling Dyeの調製は1Kitにつき1回のみです

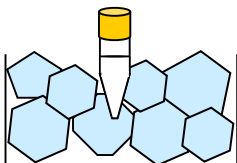
- DMSO（●）を常温にもどし完全に融解して均一にします
- Labeling Dye（●）は遮光し、室温に戻します。

エタノールアミン



- エタノールアミン（○）を室温に戻します。

ラダ



- ラダ（●）を-20℃から取り出し、完全に融解して均一にします。
溶解後は氷上に置きます
※ラダの繰り返し凍結融解、長時間の室温放置、高温による融解は避けてください。

10X Standard Labeling Buffer



- 10X Standard Labeling Buffer（●）を室温に戻し、完全に融解して均一にします。



必ず手袋をしましょう



1 Labeling Dyeを調製します *このステップは1Kitにつき1回のみ

1 Labeling Dye (●) と DMSO (●) を-20℃から室温に戻します

遮光

DMSO



Labeling Dye



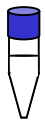
2 DMSOを完全に融解し均一にします

3 Labeling Dye の中身をチューブの底に集めるため
10,000x g, 2分間 遠心をします

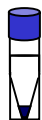
4 DMSO 54 μ lを Labeling Dyeに
加えボルテックスミキサーにより
完全に溶解します

54 μ l

DMSO



Labeling Dye



調製したLabeling Dyeは、
遮光、-20℃にて**6ヶ月**保存可能です。
ふたに調製した日付けを記入します。

調製したLabeling Dyeは**使う直前に**
融解してください。



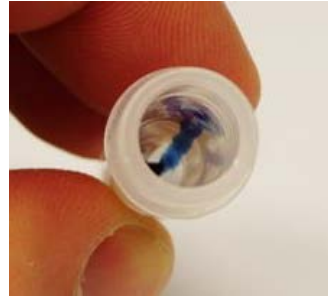
Labeling Dyeは遮光してください。



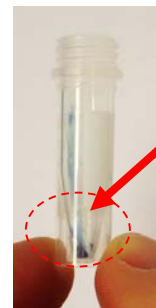
DMSOは融解しにくいので
ボルテックスミキサーで
よく攪拌し、均一にしましょう。



Labeling Dyeはチューブの横に
沿って入っていることがあるので、
必ず遠心で底に集めてから使います。



なるべく遠心で底に集めた
Dyeの上にDMSOを加えます。



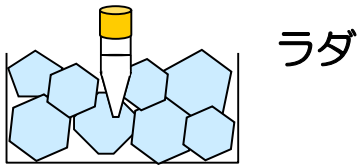
ボルテックスミキサーで
よく攪拌し、均一にしましょう。

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

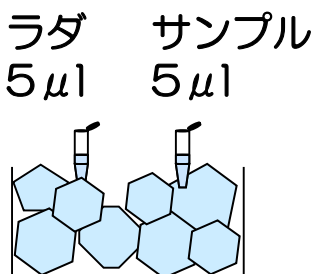
2 サンプルとラダをラベル化します

タンパク質と Labeling Dye の比率は、タンパク質のラベル化効率に影響するため定量結果の再現性に影響します
注意深くピペット操作を行ってください

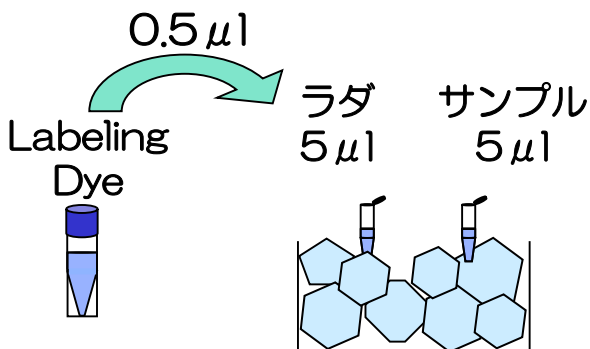
- 1 ラダ (●) を -20°C から取り出し、融解します
融解後は氷上に置きます



- 2 ラダ (●) とサンプルを $5\mu\text{l}$ ずつチューブに入れます
(氷上に置きます)



- 3 調製したLabeling Dye (●) $0.5\mu\text{l}$ をラダとサンプルに加え、よく混合します



ボルテックスミキサーで5秒間混合後、軽く遠心



ラダの繰り返し凍結融解、長時間の室温放置、高温による融解は避けてください。



ラダにはラベル化3回分の量が入っています。



調製用のチューブはタンパク質の吸着の低いものを推奨します。
例：Eppendorf Safe-Lock Protein LoBind 0.5mL



Labeling Dyeは遮光してください。



調製したLabeling Dyeは**使う直前に**融解し、使用前にボルテックスミキサーでよく攪拌し、完全に融解、均一にしましょう。

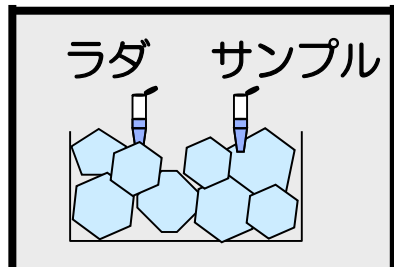
フローチャート

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

2 サンプルとラダをラベル化します (続き)

- 4 氷上に30分間、置きます
(その間にエタノールアミン (●) を
室温に戻します)

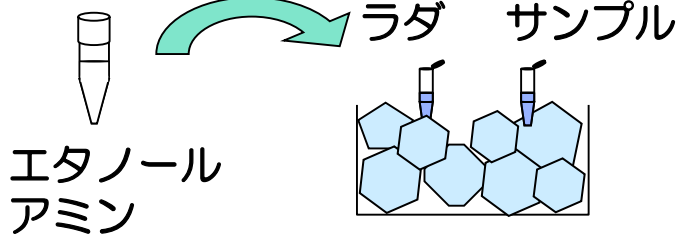
遮光



30分



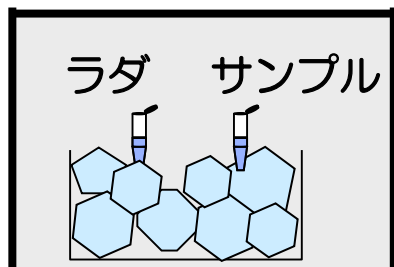
- 5 エタノールアミン (●) 0.5 μ l を
加えよく混合します。

0.5 μ l

↓
ボルテックスミキサーで
5秒間混合後、軽く遠心

- 6 氷上に10分間、置きます

遮光



10分



すぐに測定に用いない場合
2-6 のステップの後、
遮光、-20°Cで保存可能です



Labeling Dyeを加えたラダ、
サンプルは遮光してください。



遮光してください。



次の反応に用いるラダは1 μ lです。
残りは1 μ lずつ分注し
-20°Cで保存してください。

電気泳動ステップ

使用する試薬等

-PartⅢ【-20℃保存】

- ● Gel
 - ● Destaining Solution; 脱色液
 - ○ Sample Buffer; サンプルバッファ
- High Sensitivity Protein用 ラボチップ, 電極洗浄用チップ
 - シリンジ

その他必要なもの

- ヒートブロックまたはウォーターバス (95~100℃)
- ボルテックスミキサー
- 遠心機 (0.5mlチューブに対応できるもの。卓上遠心機も可)
- 0.5ml チューブ
- 1M DTT (還元条件時)
- 超純水
- 氷

泳動前の準備

- ● Gel
- ● 脱色液
- ○ サンプルバッファ

常温に戻し、完全に融解し均一にします
 * 脱色液とサンプルバッファは遮光します
 * 1時間以上使わない場合、試薬は4℃保管に戻してください

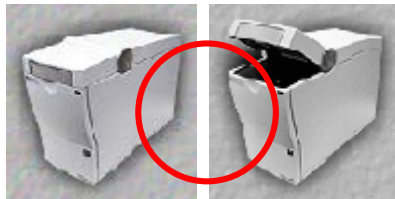
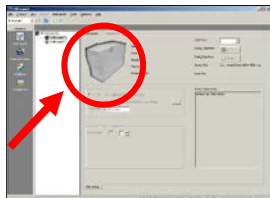
遮光



泳動前の準備



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

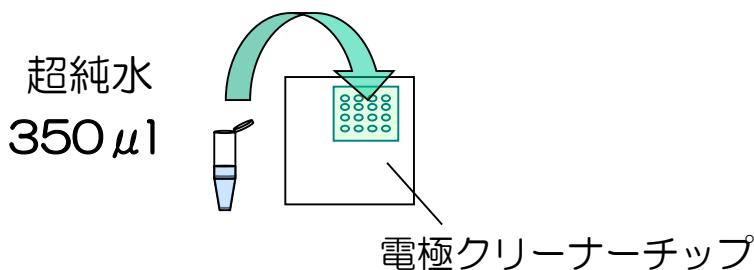
フローチャート



3 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超純水を350 μ l
入れます (どのウェルから入れても構いません)



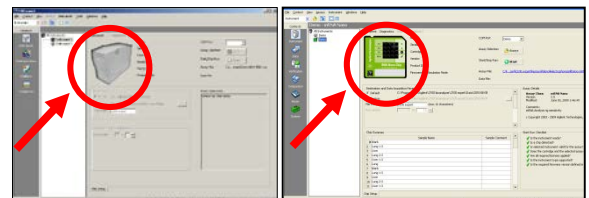
電極クリーナーをバイオアナライザに
セットし蓋を閉めます



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



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
チップに入れた超純水はピペットで
吸い出しておきましょう。

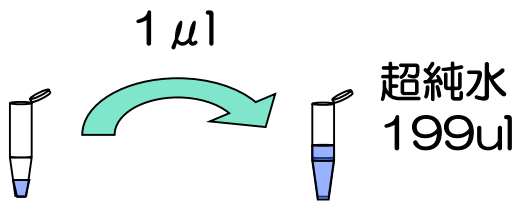
フローチャート



4 ラベル化サンプル及びラダを希釈します

1

ラベル化したラダ1 μl に
超純水 199 μl を加えます
(200倍希釈)



ラベル化したラダ



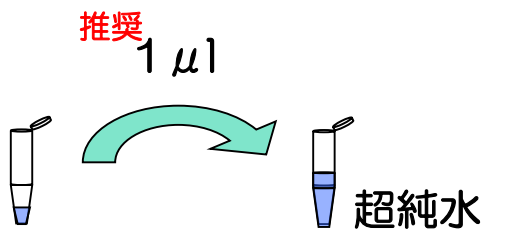
希釈後は保存できません。



ラベル化後のサンプル及び
ラダは遮光してください。

2

ラベル化したサンプルは適宜
超純水で希釈してください
(200倍希釈が推奨)



ラベル化したラダ



残りのラベル化ラダ及びサンプルは
遮光、 -20°C で保存してください。



ラベル化サンプルの希釈倍率が200倍以下の場合

内部標準が検出上限を上回り、その結果補正に不具合が生じる
場合があります。

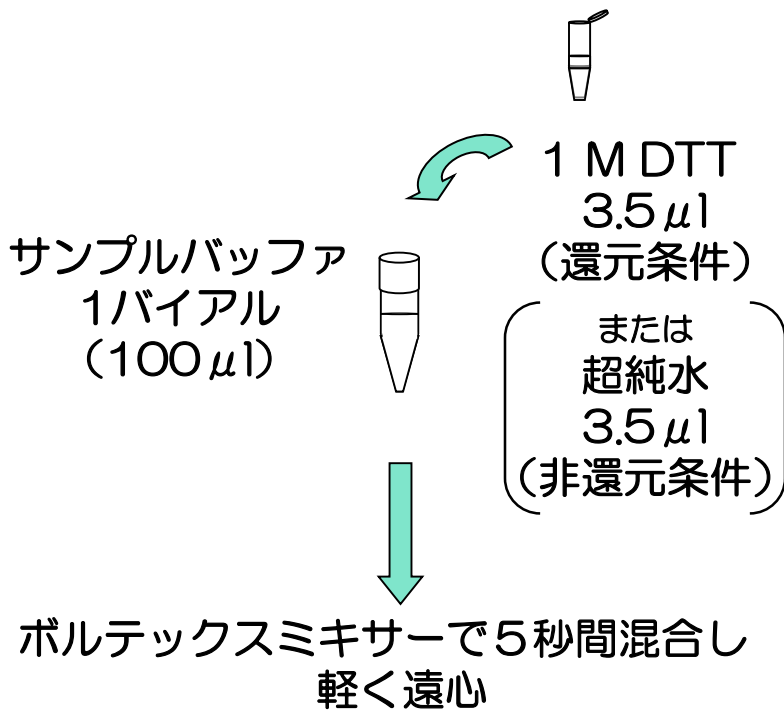
内部標準のピークは、ラベル化時のタンパク質濃度が低いほど
高くなる傾向があります。ご注意ください。

フローチャート



5 サンプルバッファの調製

サンプルバッファ(●) 1 vial (100ul) に
 還元条件の場合； 1M DTT 3.5ul
 非還元条件の場合； 超純水 3.5ulを
 (または100：3.5容量比の割合で)
 加え混合します



サンプルバッファは使用前に
遮光の上常温に戻し、完全に
融解し均一にしてください。



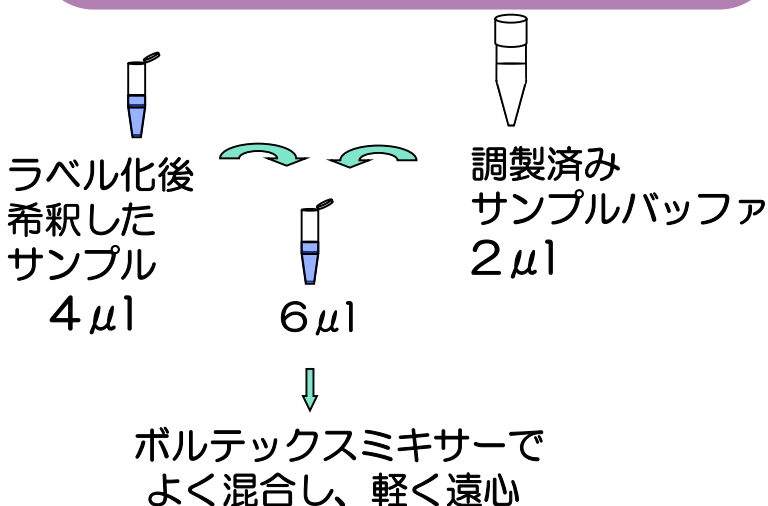
調製したサンプルバッファは
-20℃で6ヶ月保存可能です。
サンプルバッファは遮光保存
してください。
DTT添加後のサンプルバッファは
できるだけ空気にさらされない
ようフタを閉めてください。
酸化によって還元力が低下します。

フローチャート

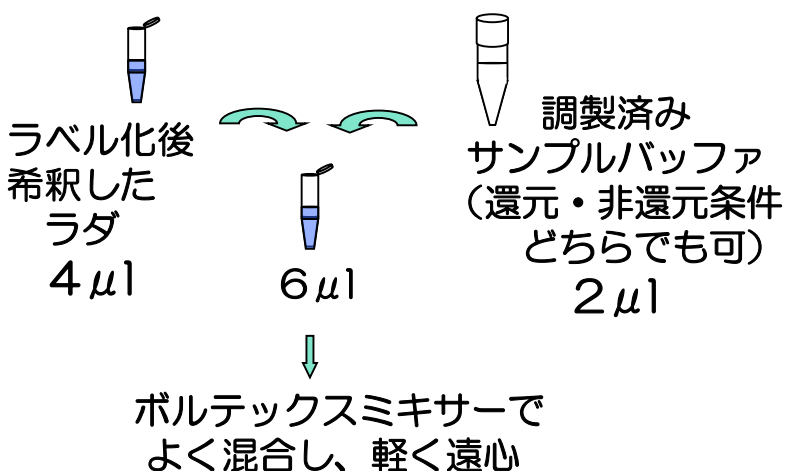
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

6 サンプル及びラダを調製します

- 1
- 4 でラベル化後、希釈したサンプル $4\mu\text{l}$ と
- 5 で調製したサンプルバッファ $2\mu\text{l}$ を
- 0.5mlチューブで混合します
(1ウェル分の量です※)



- 2
- 4 でラベル化後、希釈したラダ $4\mu\text{l}$ と
- 5 で調製したサンプルバッファ $2\mu\text{l}$ を
- 0.5mlチューブで混合します



サンプルおよび調製したサンプルは遮光してください。

※
空のサンプルウェルがあると泳動できません。
サンプルが10サンプルより少ない場合は、同じサンプル（もしくはラダ）を数本調製してください。



ラダの調製に使用するサンプルバッファは還元・非還元条件どちらでも可能です。



ラダおよび調製したラダは遮光してください

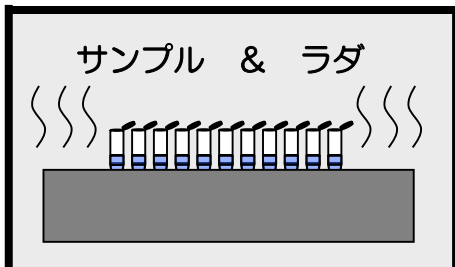
フローチャート



6 サンプル及びラダを調製します（続き）

4 サンプルとラダをそれぞれ熱処理
(95-100℃, 5分間) します

95~100℃



5分



蒸発をできるだけ防ぐため
5分以上加熱しないでください。

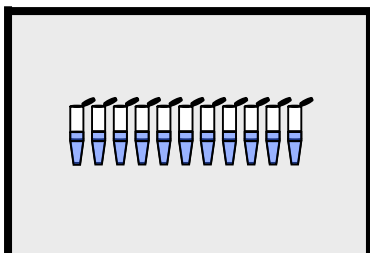


蓋があかないように注意して
ください。



加熱中遮光してください。

5 1-2分ほど放冷し、1000 x gで
15秒間遠心します



1~2分

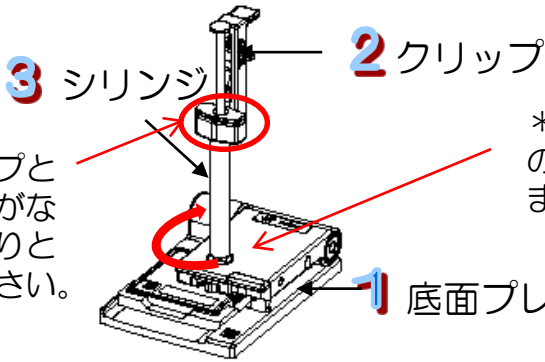


* 遠心は卓上小型遠心機でも構いません。

フローチャート

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

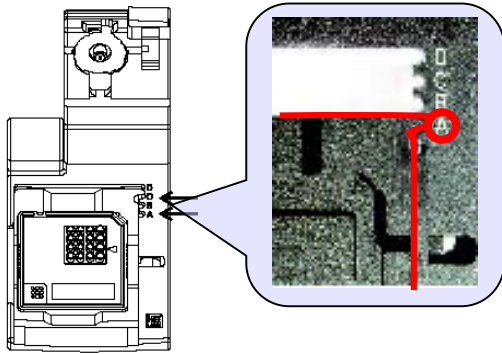
7 チップ調製スタンドを準備します



*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。

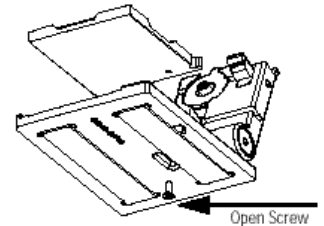
*シリンジを台座に取り付ける際、時計回りの方向でゆるみがない様にしっかりとまわして入れてください。

1 底面プレートの位置を A に合わせます

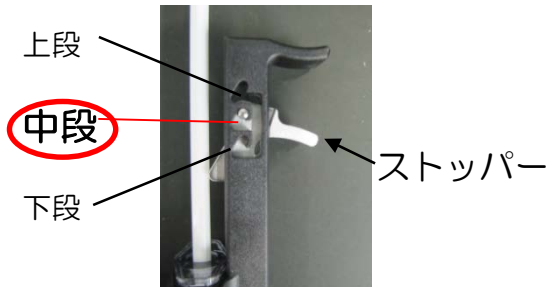


*プレートの位置をかえる場合

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。

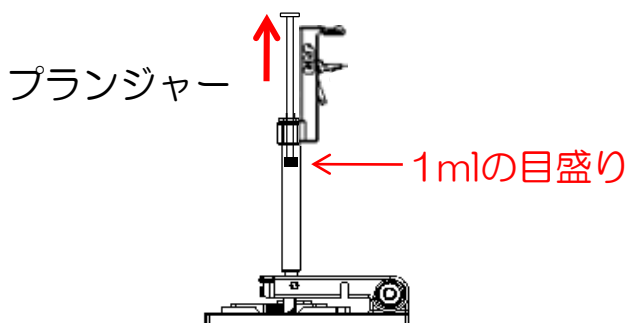


2 クリップのストッパーの位置を合わせます



*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

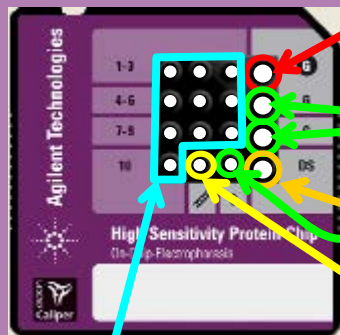


*シリンジはキットを新しくした際、または3ヶ月に1度新品に交換してください。

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

8 チップにGelを注入します

LabChip



G : 白抜きGウェル

一番はじめにGel(●)を入れる穴
ここからゲルを充填します

G : Gウェル

Gel (●)を入れる穴
(3ヶ所)

DS : DSウェル

脱色液(●)を入れる穴

Ladder : ラダウェル

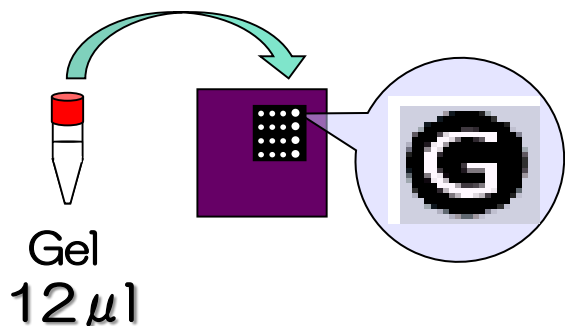
ラダ(分子量標準ラダ)を入れる穴

サンプルウェル

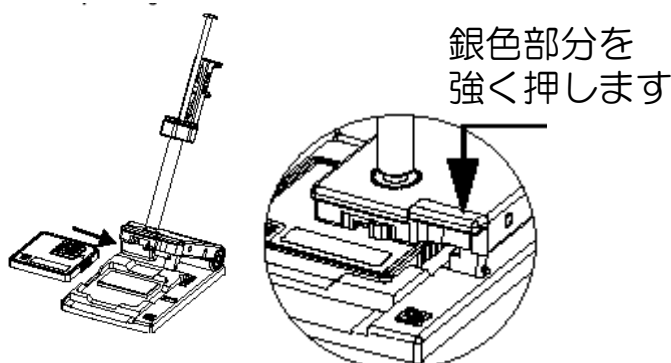
サンプルを入れる穴
(10ヶ所)

※ LabChipは室温保存します

1 Gel (●) 12 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。

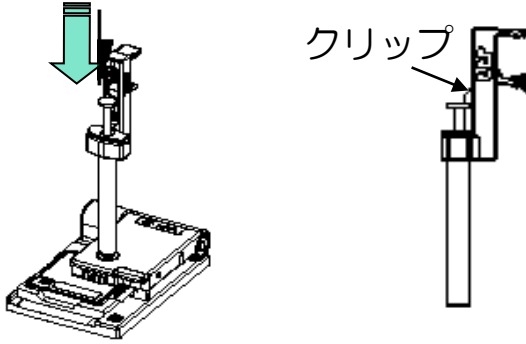
Point

ウェルにGel-DyeMix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。

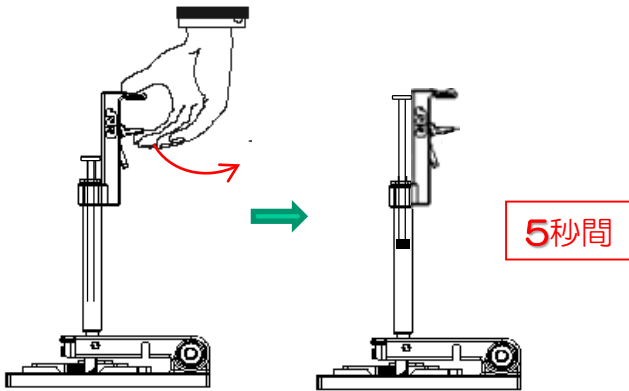
*正しく閉まると「カチッ」と音がします。

- 3 プランジャーを押しクリップに
ひっかけます

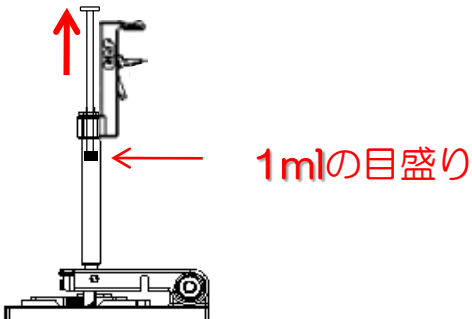


- 4 そのまま 90秒間 放置します

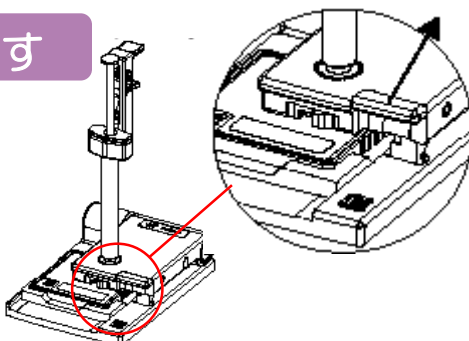
- 5 クリップのストッパーをはずして
5秒待ちます



- 6 プランジャーを元の位置 (1ml) へ
ゆっくり引き上げます



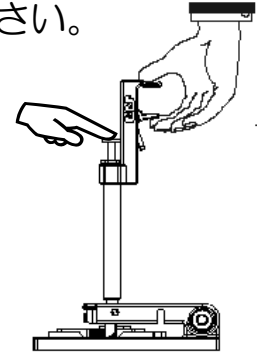
- 7 蓋を開けます



90秒はタイマーできちんとはかりましょう。

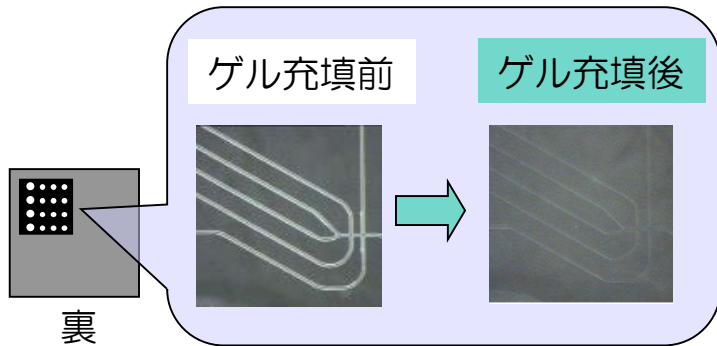


ストッパーをはずす時は
プランジャーに触らないで
ください。

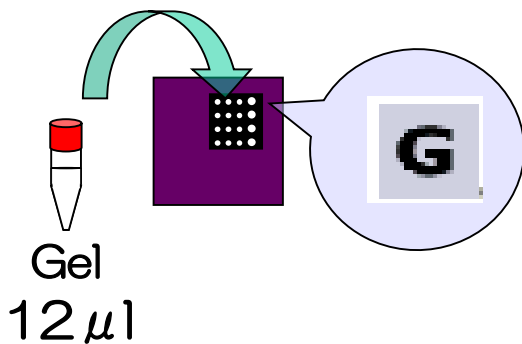


プランジャーを元の位置(1ml)へ
もどさずに蓋を開けるとGelが
逆流し飛び散ることがあります。

8 チップの確認をします



9 G ウェル3ヶ所に Gel (●) を12 μ lずつ入れます

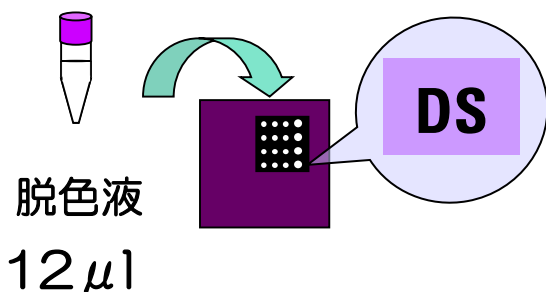


フローチャート



9 チップに脱色液を入れます

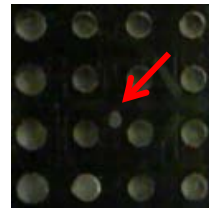
DS ウェルに脱色液を12 μ l入れます



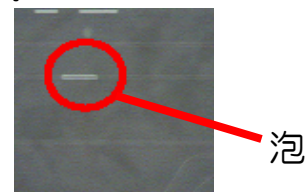
Point

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。



✗ 流路に泡が入っている悪い例



Point

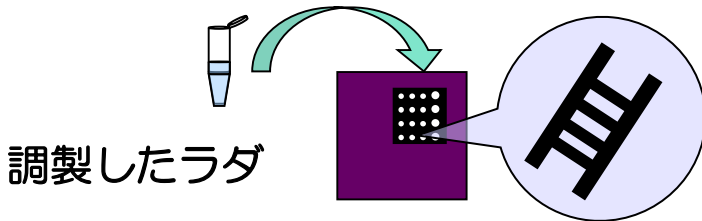
脱色液は粘性が高いためゆっくり吸い上げます。
また脱色液を出す時もゆっくり行い、ピペットチップに残らないようにしましょう。

フローチャート



10 チップにラダを入れます

調製したラダ6 μ l (全量) をラダウェル  に入れます



調製したラダ

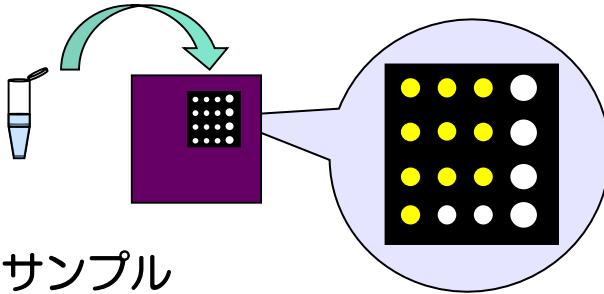
6 μ l (全量)

フローチャート



11 チップにサンプルを入れます


調製したサンプル6 μ l (全量) を
各サンプルウェルに入れます




調製したサンプル

6 μ l (全量)

気泡が入らないようにゆっくり
サンプルを入れてください。

 5%以上の液量のロスがあると
適切な電圧がかからず分析が途中で止まります

 サンプル数が10サンプルより少ない場合
必ず残りのサンプルウェルにサンプル、もしくはラダを
入れてください。分析が正常に行われなくなります。

フローチャート

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

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

High Sensitivity Protein 250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 12 13

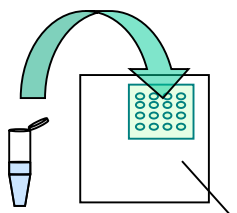
13 電極を洗浄します

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

電極クリーナーチップに超純水を350 μ 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 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。

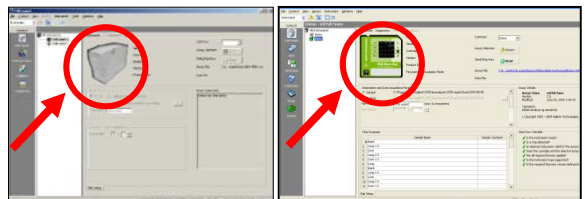
バイオアナライザの操作と解析については別冊の簡易取り扱い説明書を参考にしてください。



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。



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チップ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/ μ l (CA II in PBS)	15~2,000ng/ μ l (CA II in PBS) 30~2,000ng/ μ l (BSA in PBS)	0.3~3,000ng/ μ l
定性範囲		6~4,000ng/ μ l (CA II, BLG in PBS)	6~5,000ng/ μ l (CA II) 15~5,000ng/ μ 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/ μ l Picoプロトコル*: 10pg~1ng/ μ 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 μ 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		 中段		
Gel-Dye Mix**の アプライ量		 12 μ l (ゲル充填後、除去)	 12 μ 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 μ l		 12 μ l
脱色液の アプライ量		 12 μ l		
ラダ (●) の アプライ量		予め調製必要  6 μ l		
サンプルの アプライ量		予め調製必要 6 μ l		
専用ミキサー		なし		

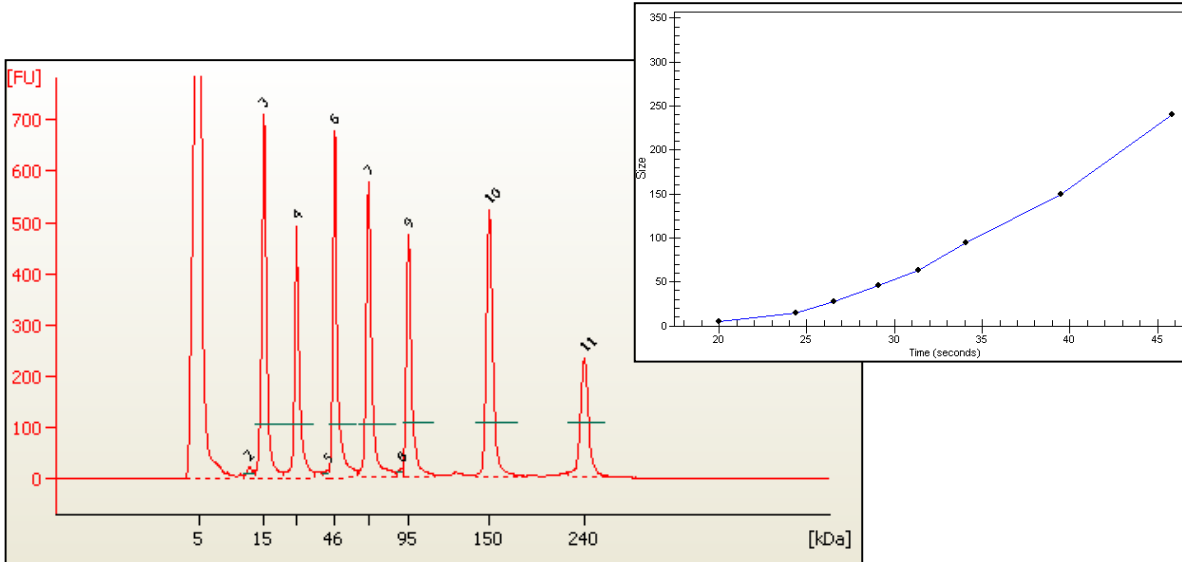
*参照 <http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5990-3703EN.pdf>

**High Sensitivity Protein250 Kitの場合、Gelのみ

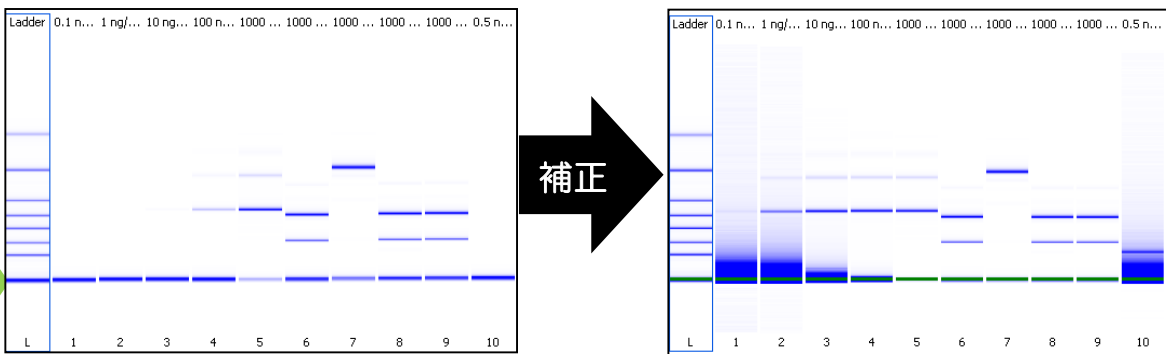
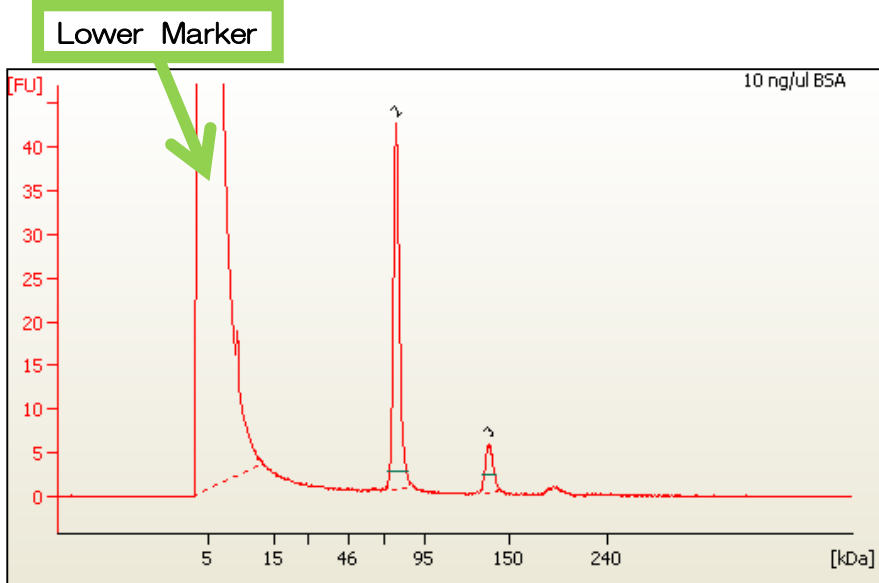
ladder :ラダ (分子量標準ラダ)
 ソフトウェア上でラダレーンのピーク的位置 (Migration Time)を基に
 Standard Curveをかきます。それをもとにサンプルの各ピークのサイズを計算します。

黄色キャップの
 チューブ

 Ladder
 予めラベル化・
 調製が
 必要です



Marker :ラベル化されなかったDyeが内部標準となります。



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
(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。