



シーケンサー利用技術講習会 ～ サンプルQC: バイオアナライザ ～

アジレント・テクノロジー（株）

津本 裕子

20131021

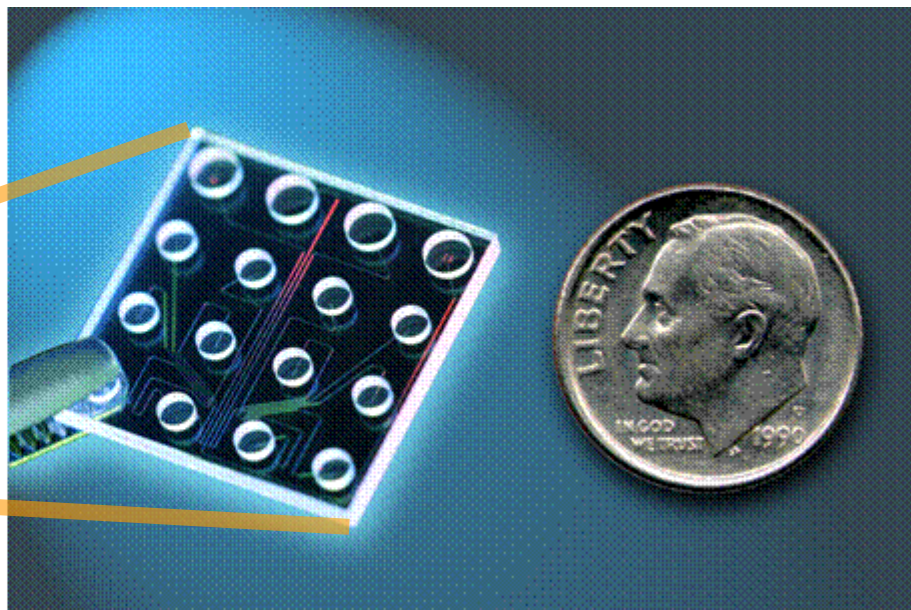
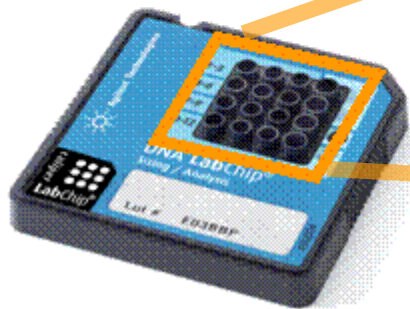
- バイオアナライザのご紹介
- RNAサンプルQCにおけるポイント
- 実習 (NanoDrop & RNA 6000 Nano Kit)
- データの見方 & トラブルシューティング
- 高速多検体電気泳動装置TapeStationのご紹介



バイオアナライザの特長



- DNA / RNA / Protein の電気泳動装置
(※オプション：セルアッセイ機能)
- **短時間**で測定可能
約30分 / 12サンプル (DNA/RNA※) , 10サンプル (Protein) , 6サンプル (cell)
※DNA高感度 / RNAピコは11サンプル
- **少量**で分析可能
必要容量：**1 μ L (DNA/RNA)**
4-5 μ L (Protein)



マイクロチップ型電気泳動装置の**世界標準**



- 世界で **10000台**導入 日本国内 **1000台**
- 論文数 **15000件**以上
- **RIN** ; RNA Integrity Number
RNA品質評価のスタンダード

Go for the industry standard
when it comes to RNA QC!

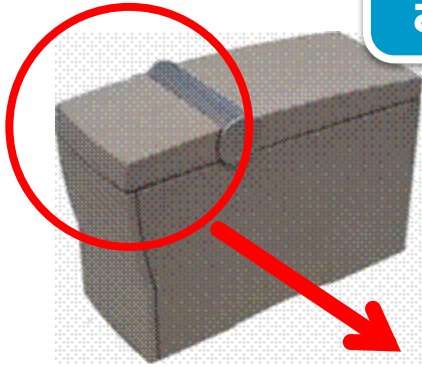
Agilent 2100 Bioanalyzer with RNA Kits



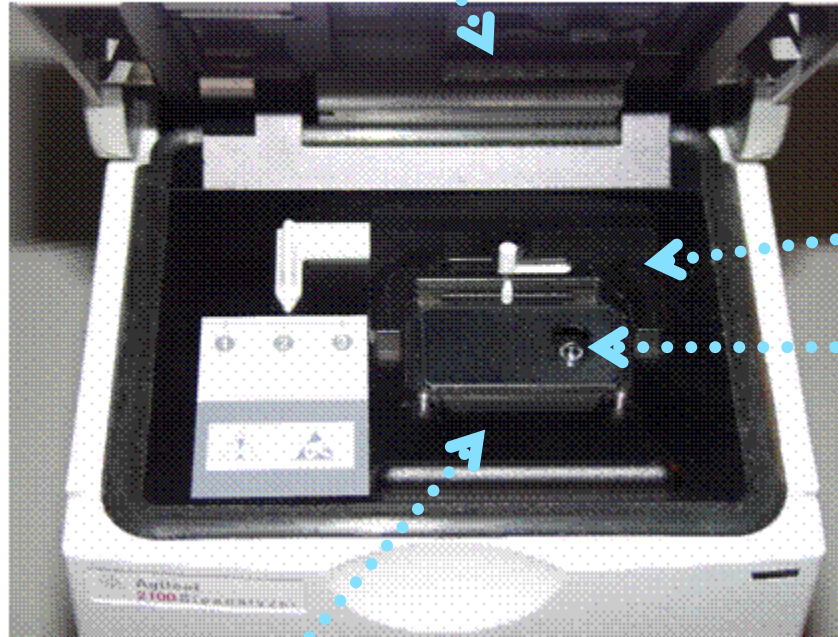
バイオアナライザ装置



電極カートリッジ (電気泳動)
または 圧力カートリッジ (セルアッセイ)



電極カートリッジ



ラボチップ® ホルダ

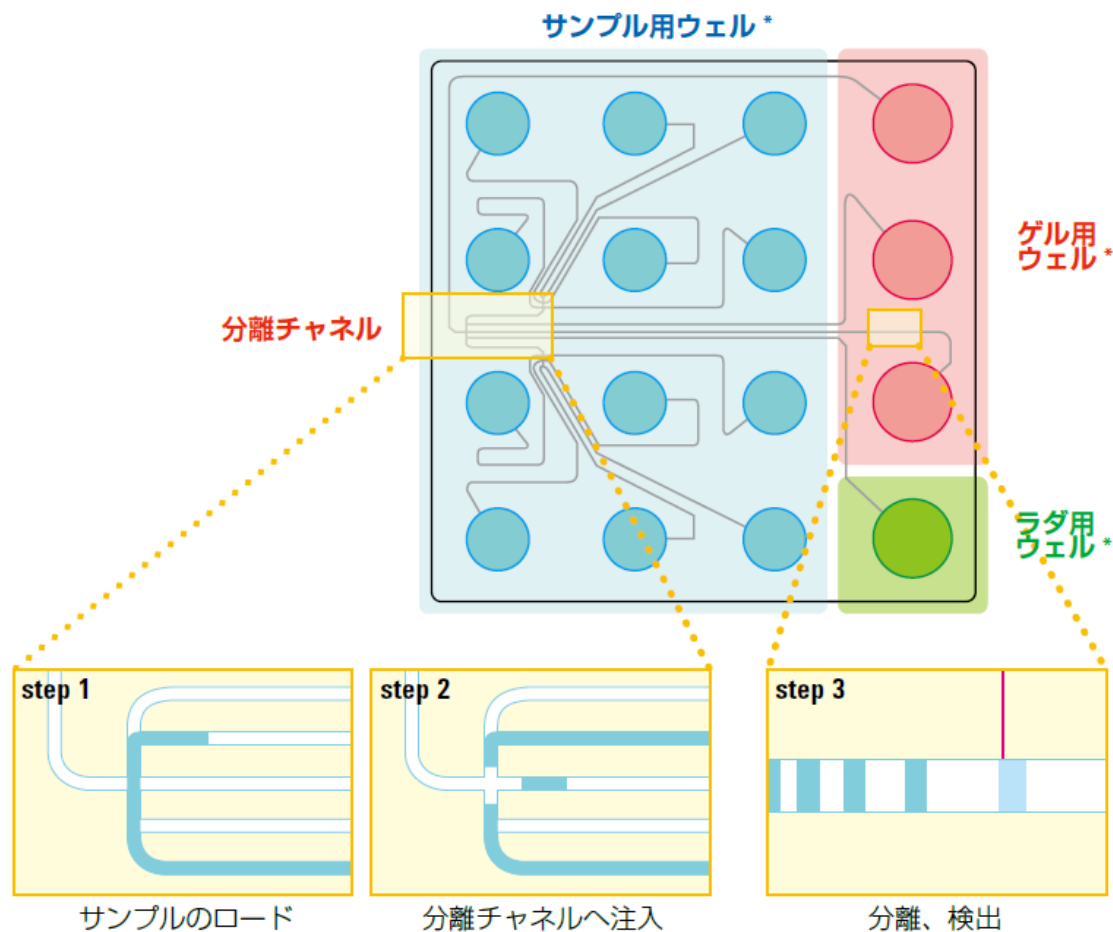
レーザー蛍光検出
(自動光軸調整)

温度制御 (ペルチェ素子)

バイオアナライザ泳動原理




バイオアナライザでは16本の電極全てを使用して電界をかけます





ロードされたサンプルの一部が分離チャンネルにinjectionされます

1台でDNA, RNA, Proteinの泳動が可能

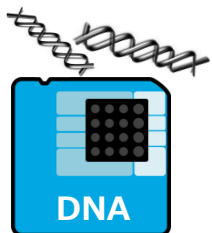


	DNA			
Kit種類	DNA1000	DNA7500	DNA12000	High Sensitivity DNA
分析分子量範囲	25-1,000 bp	100-7,500 bp	100-12,000 bp	50-7,000 bp
定量範囲	0.1-50 ng/μL	0.5-50 ng/μL	0.5-50 ng/μL	5-500 pg/μL

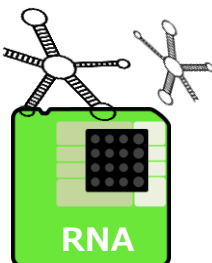
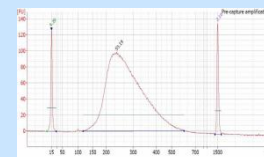
	RNA		
Kit種類	RNA Nano	RNA Pico	Small RNA
分析分子量範囲	-	-	6-150 nt
分析濃度範囲	5-500 ng/μL (total RNA)	50-5,000 pg/μL	1-100 ng/μL (total RNA)

	Protein		
Kit種類	Protein80	Protein230	High Sensitivity Protein250
分析分子量範囲	5-80 kDa	14-230 kDa	10-250 kDa
検出範囲	6-4,000 ng/μL (CAII in PBS)	6-5,000 ng/μL (CAII in PBS)	1-3,000 ng/μL (ラベル化に必要な量)

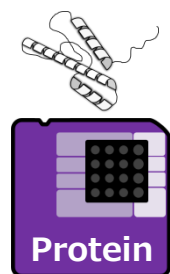
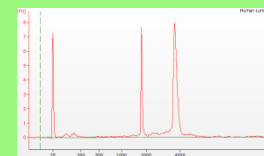
主な使用目的



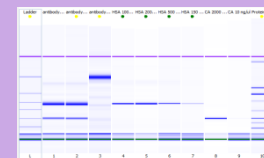
次世代シーケンスのライブラリQC
PCR産物の確認 など



遺伝子発現アレイ・リアルタイムqPCR・RNA-seqのサンプルQC
mRNA・cRNAの確認 など



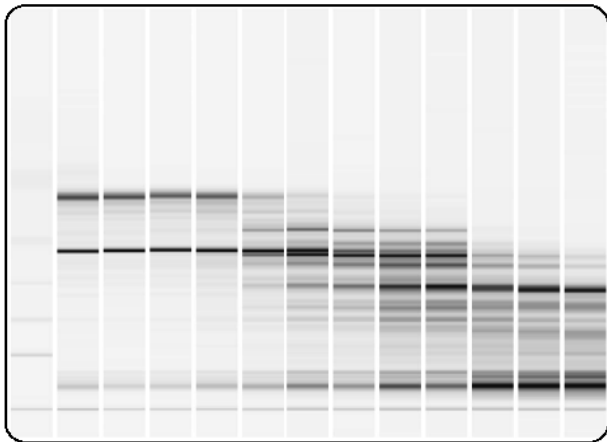
抗体のQC
タンパク質の発現・精製の確認 など



バイオアナライザによる分解度の評価



分解

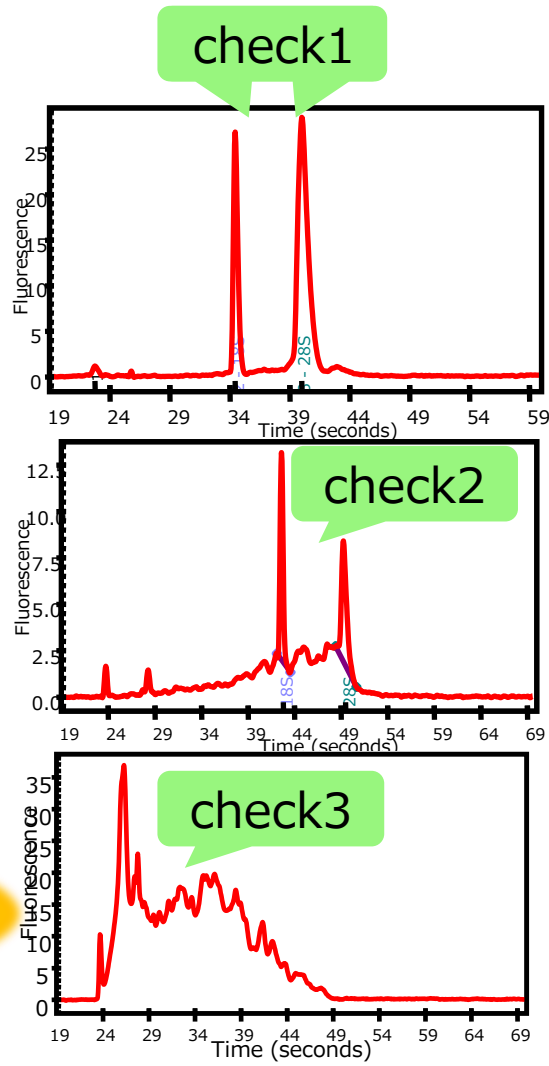


- checkpoint1
rRNAのピーク
- checkpoint2
rRNAのピーク間
- checkpoint3
低分子領域



泳動図での分解度合いの判断って
むずかしい...

分解

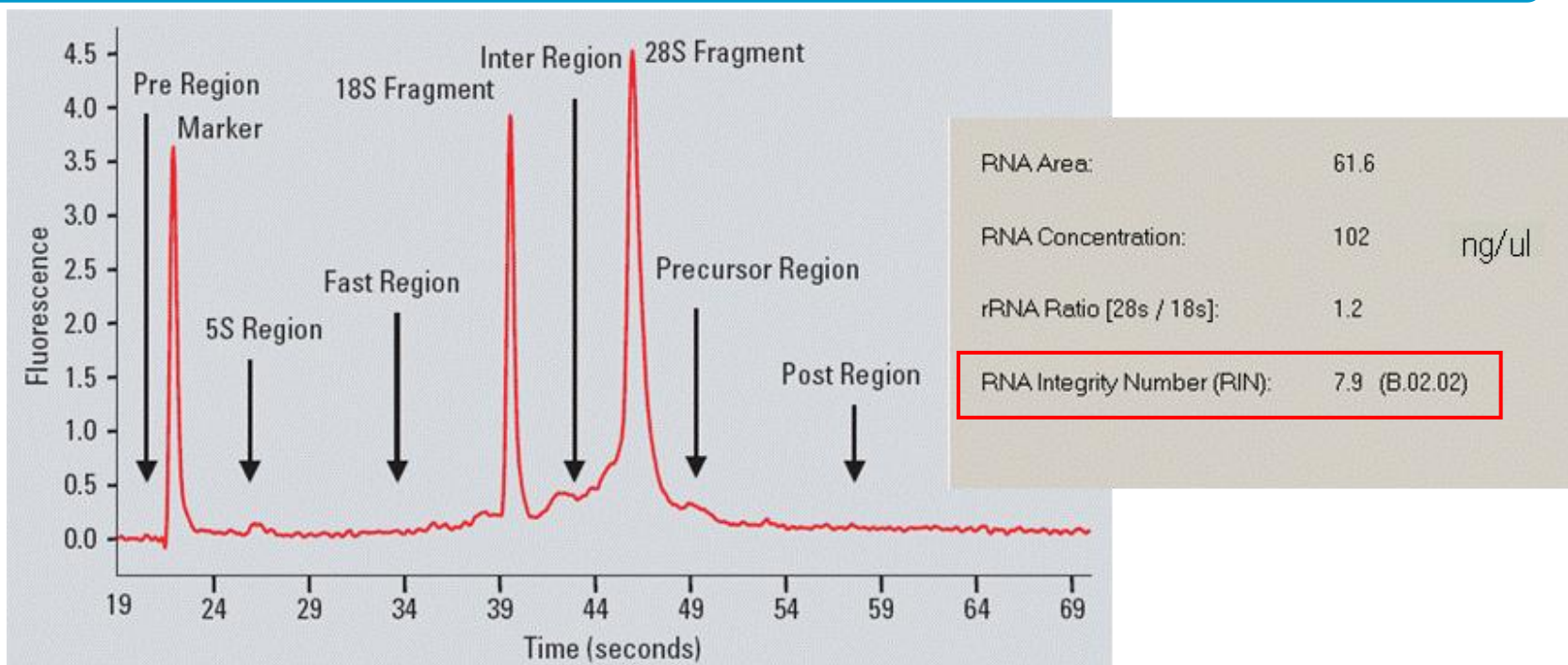


客観的な評価のために



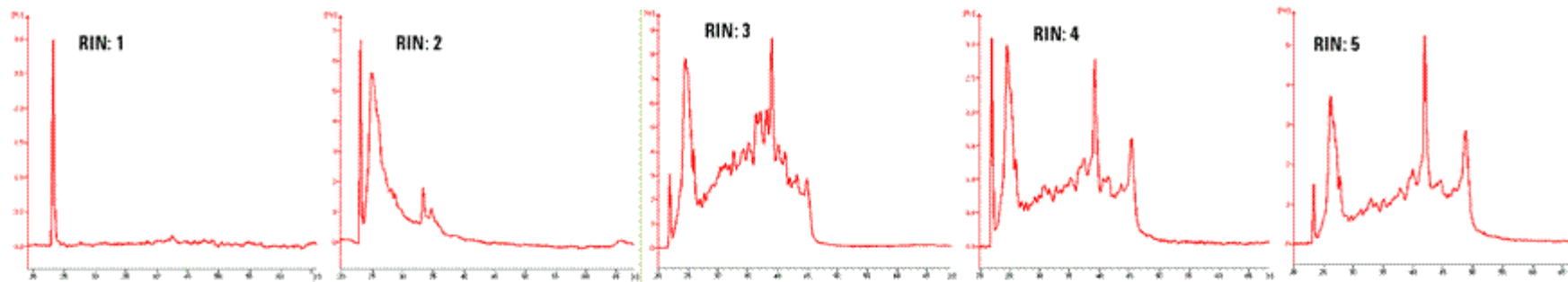
RIN: RNA Integrity Number を計算します

エレクトロフェログラム(電気泳動像)からtotalRNAの分解度を自動的に一つの数値として表示



注) Expert Software ver B02.03以上でRINをご覧いただけます。以前のverで取得したデータを別PCで解析することが可能です。

分解度に応じて1~10に分類



RIN: 1

RIN: 2

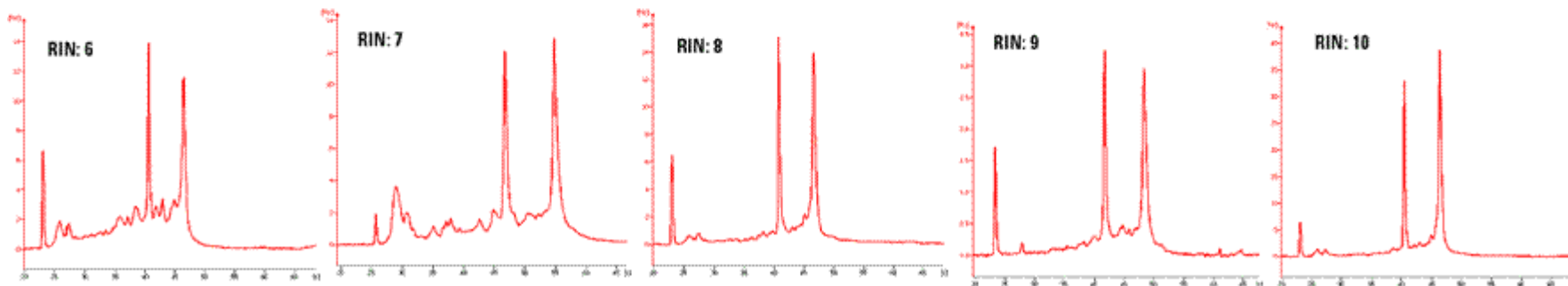
RIN: 3

RIN: 4

RIN: 5



分解の進行



RIN: 6

RIN: 7

RIN: 8

RIN: 9

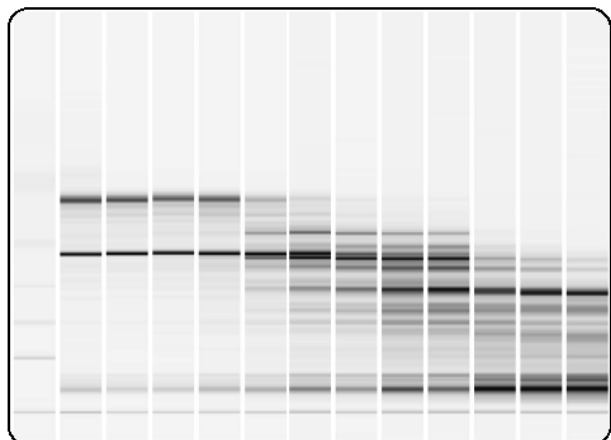
RIN: 10



バイオアナライザによる分解度の評価



分解

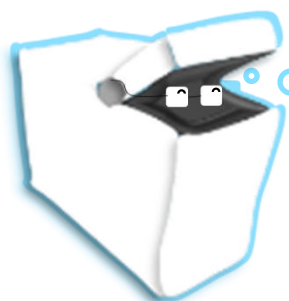


RIN 10 ... 4 ... 1

checkpoint1
rRNAのピーク

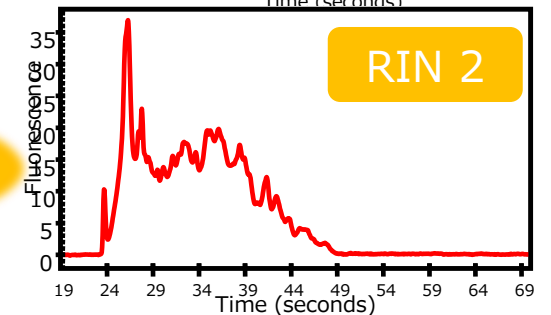
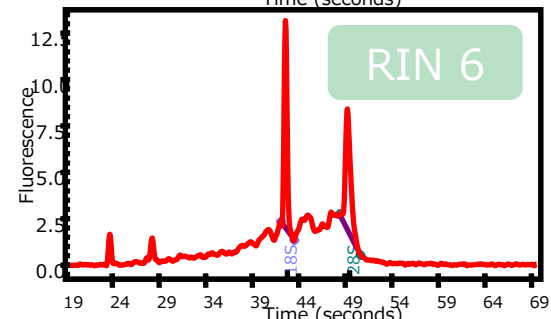
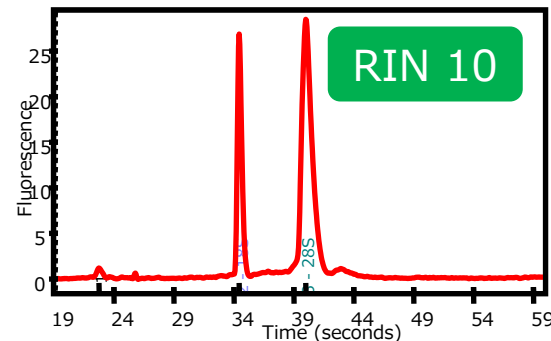
checkpoint2
rRNAのピーク間

checkpoint3
低分子領域



RINだと判断しやすい♪

分解

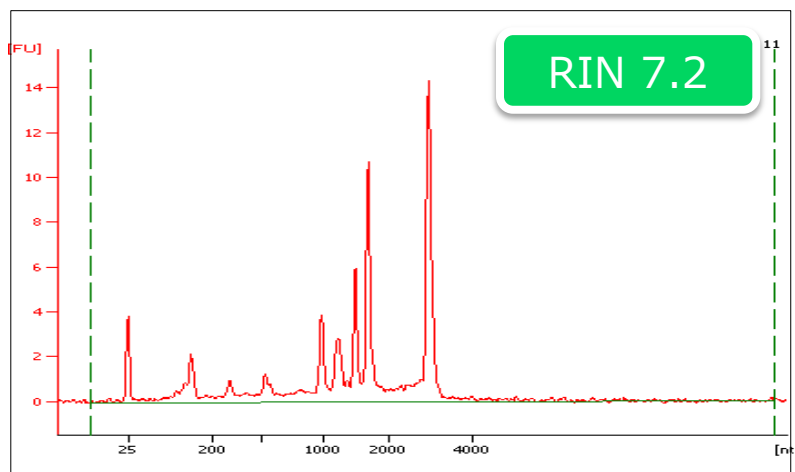




- RINはHuman, Mouse, Ratの典型的なtotal RNAのパターンを基に計算されています
- 泳動の際, Assayを “Eukaryote” “Prokaryote” “Plant” から選択できます

！ 生物種により非分解のRNAでもRINが10にならない場合があります

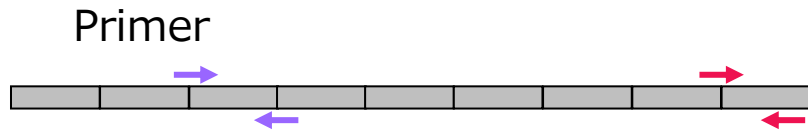
例) Arabidopsis leaves



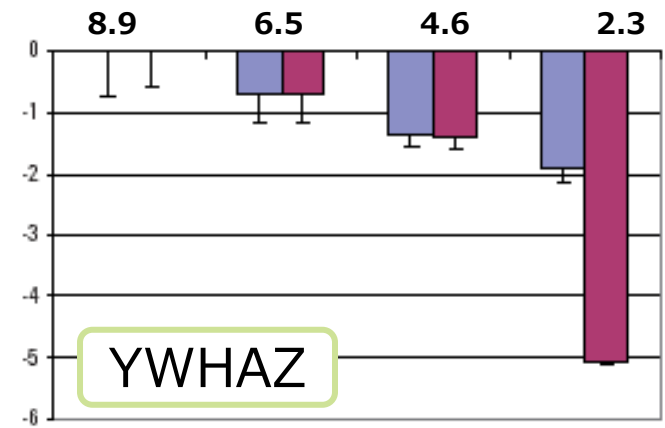
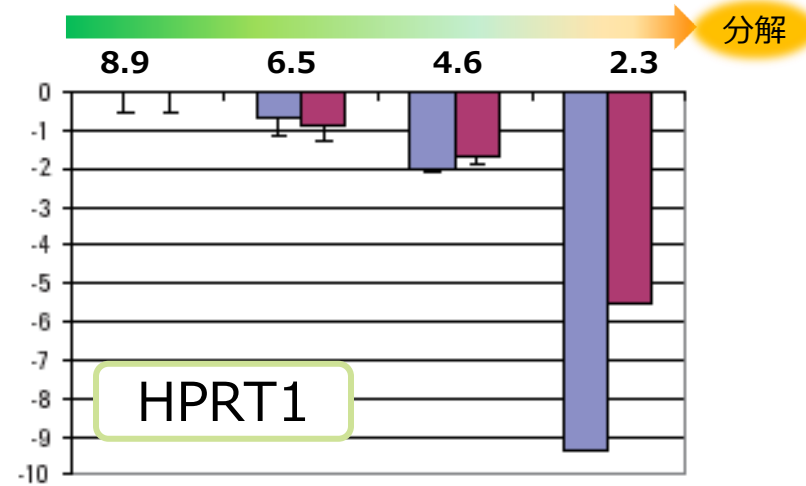
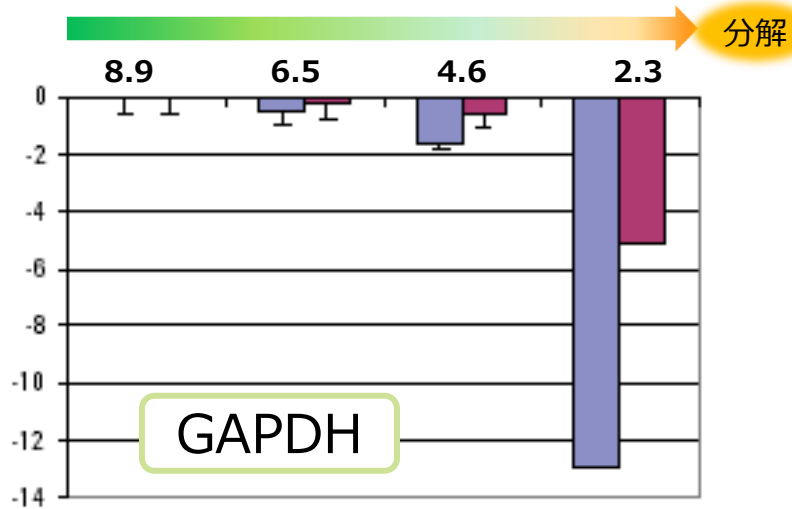
RINが参考にできない生物種の場合

rRNAのピークと その他の領域のシグナル
特に低分子領域をチェックしてください
(p11参照)

分解によるデータへの影響 ~リアルタイムqPCR~



- 5'側での増幅結果
- 3'側での増幅結果



2200 TapeStation





TapeStation 特徴

様々なサンプルQCをより簡単に



➤ ゲル充填済み

チップ調製は必要ありません

➤ 8連チューブ/96well plateに対応

➤ バーコードにより管理が容易

➤ 1Tapeに16レーン

使用しないレーンは再利用可能（2週間以内）

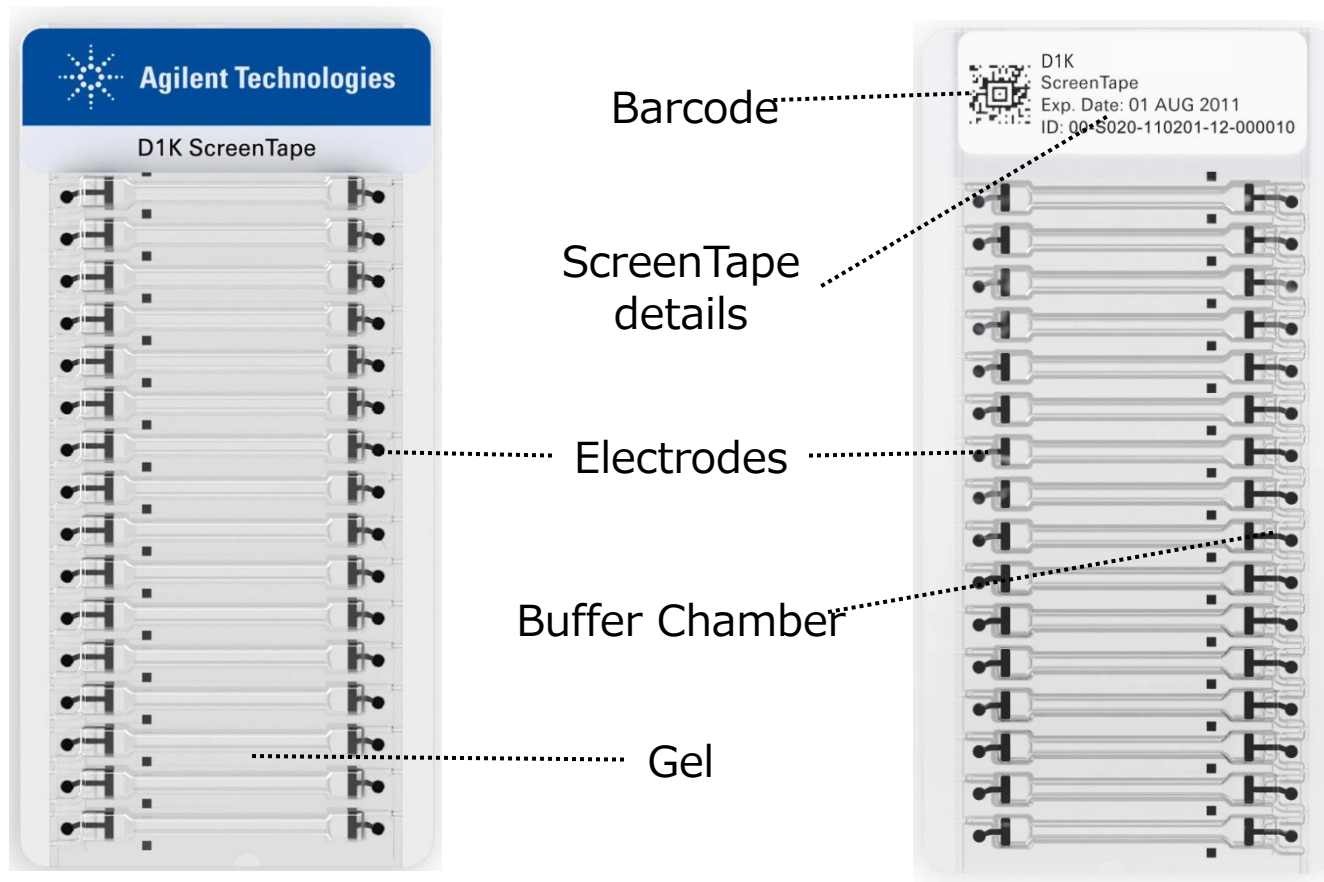
独立レーンなのでクロスコンタミの心配はありません

➤ サンプルのロード、電気泳動、分析まで全自動

ScreenTape



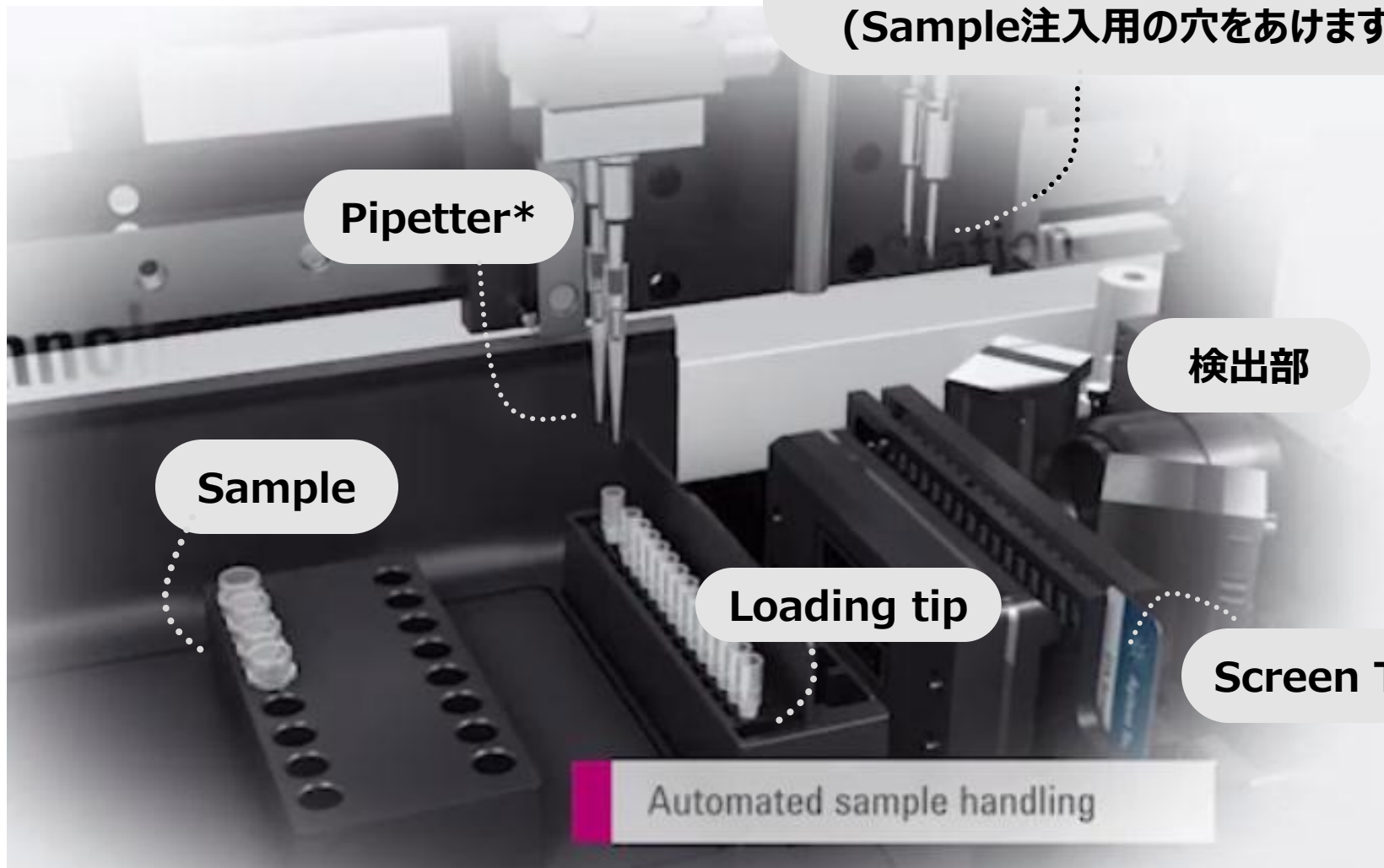
- **ゲル充填済み** ゲル・チップ調製は必要ありません
- **1Tapeに16レーン** 使用しないレーンは再利用可能（2週間）
- **2次元バーコード** Kitの種類を自動認識、使用期限・Lot番号などの管理が容易





TapeStation System

～ サンプルアプライも全自動 ～



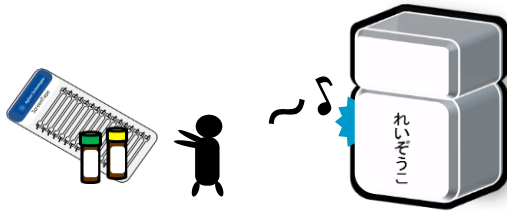
*2連で動きます. Sample (及びLadder) が奇数の場合、1レーン無駄になります



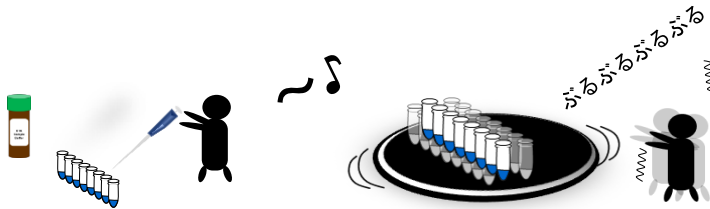
操作: かんたん3ステップ



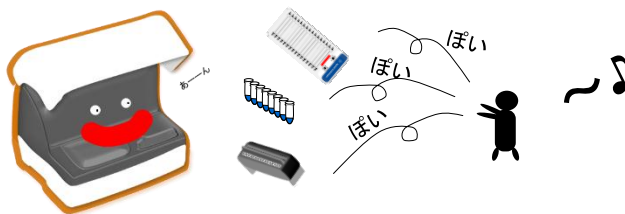
1 Kitを出します



2 サンプルを調製*します

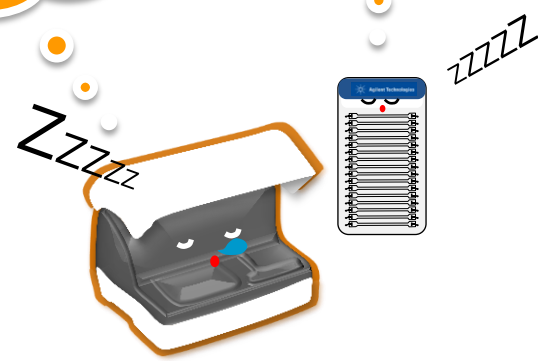


3 調製したサンプル・チップ・Tapeをセットしてスタート!

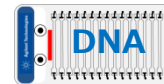


キャリブレーション?
必要ないです

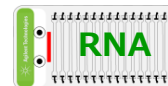
ゲル調製? 試薬調製?
必要ないです



*調製方法



sample bufferと混ぜるだけ



sample bufferと混ぜて熱変性するだけ



ラベル化 (7分) 熱変性 (5分) するだけ

TapeStation Kit



New!

Genomic DNA

High Sensitivity D1K

D1K

High Sensitivity R6K

R6K

P200*

分析範囲

200 to >60,000 bp

35 – 1000 bp

50 – 6000 nt

10 -200 kDa

Sample量

1 μ L

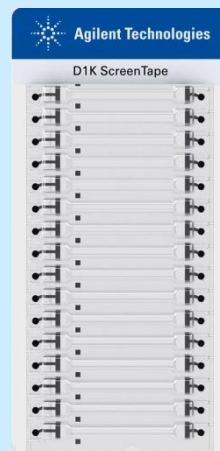
2 μ L

1 μ L

2 μ L

1 μ L

2 μ L



検出限界

0.5ng/ μ L

5 pg/ μ L

100 pg/ μ L

100 pg/ μ L

5 ng/ μ L

5 ng/ μ L

*P200の使用にはG2964AA(核酸・タンパク質分析用システム) が必要です

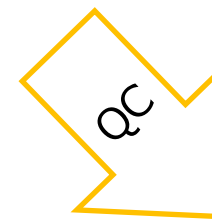
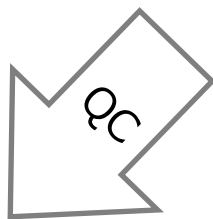
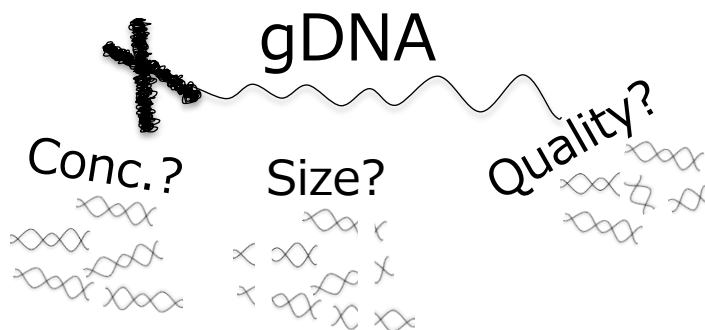
GenomicDNA Kit 仕様



次世代シーケンスや
CGHアレイの
サンプルQCに

Analytical Specification	GenomicDNA
分析分子量範囲	200 to >60,000 bp
感度	0.5 ng/μL
サイズ決定再現性	200-15,000 bp 15% CV
サイズ決定真度	200-15,000 bp ± 10%
定量再現性	15% CV
定量真度	± 20%
定量範囲	10-100 ng/μL
Physical Specification	
分析時間	16 samples < 25 minutes 96 samples < 150 minutes
サンプル数 / 1 Tape	16
サンプル必要量	1 μL
サンプル数 / 1 Kit	112 samples/box

GenomicDNA のサンプルQC




fluorometer

Spectrophotometer

TapeStation



- Conc.!
- Size?
- Quality?



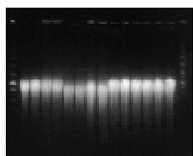
- Conc.?
- Size?
- Quality?



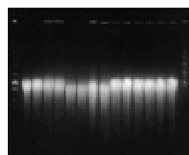
- Conc.!
- Size!
- Quality!



Slab Gel



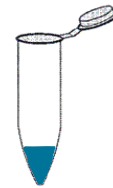
Slab Gel



gDNA:



+ 10µL
sample buffer



Total volume
11µL

Vortex &
Spin down

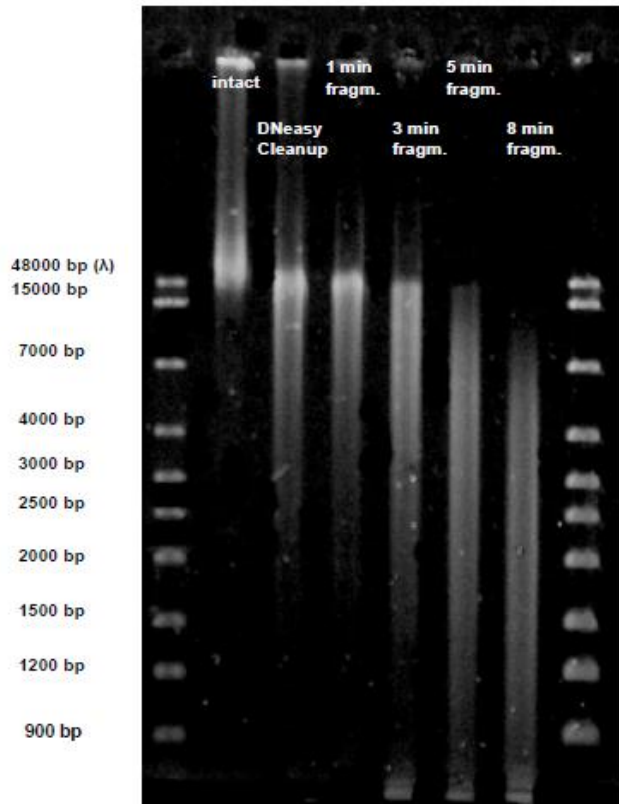


- 必要サンプル量 ; 1µL
- Sample bufferを混ぜるだけですぐ泳動できます

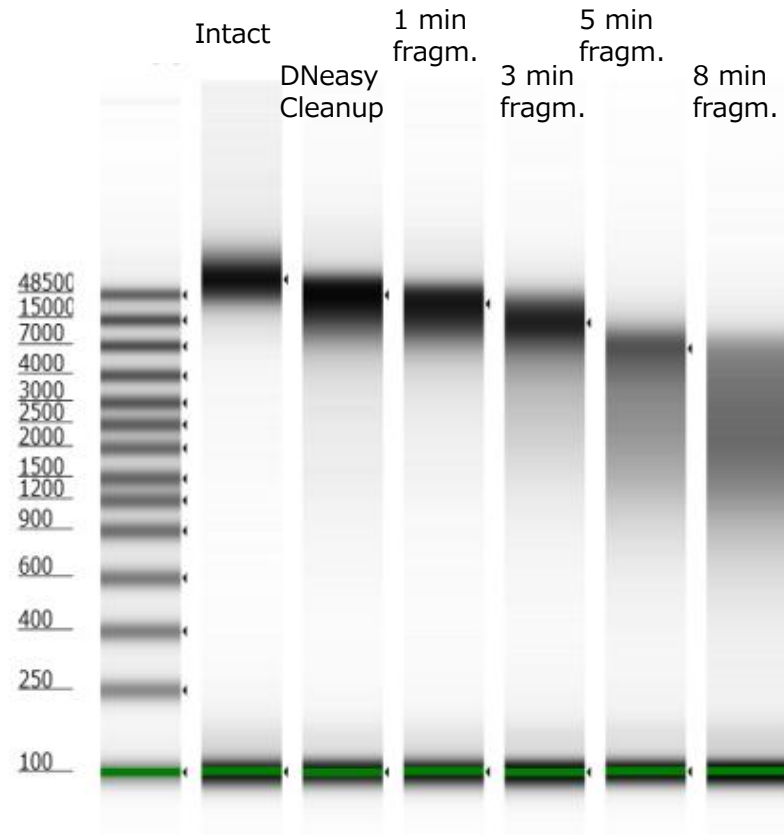
0.8% Agarose gelとの比較



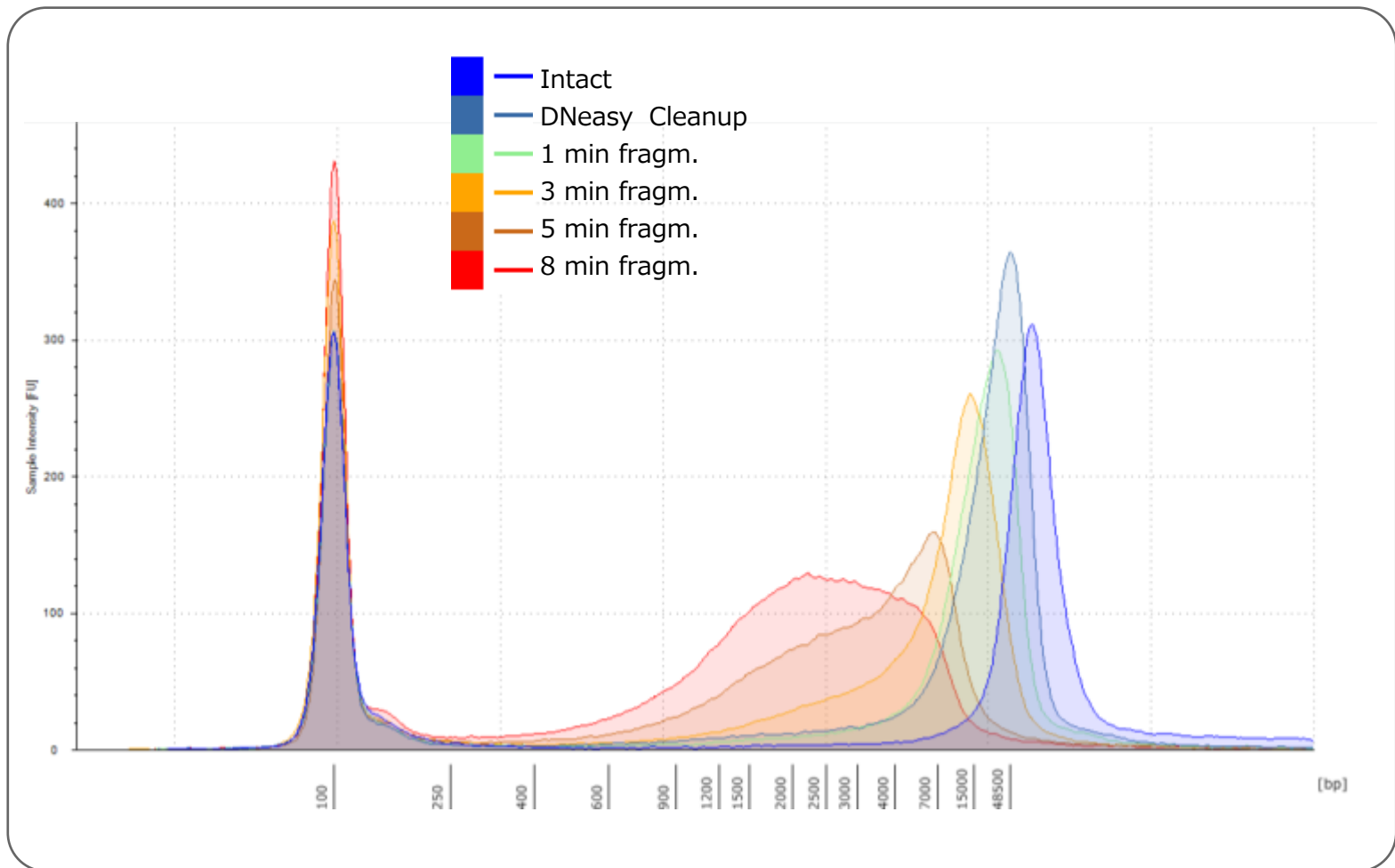
0.8% Agarose gel



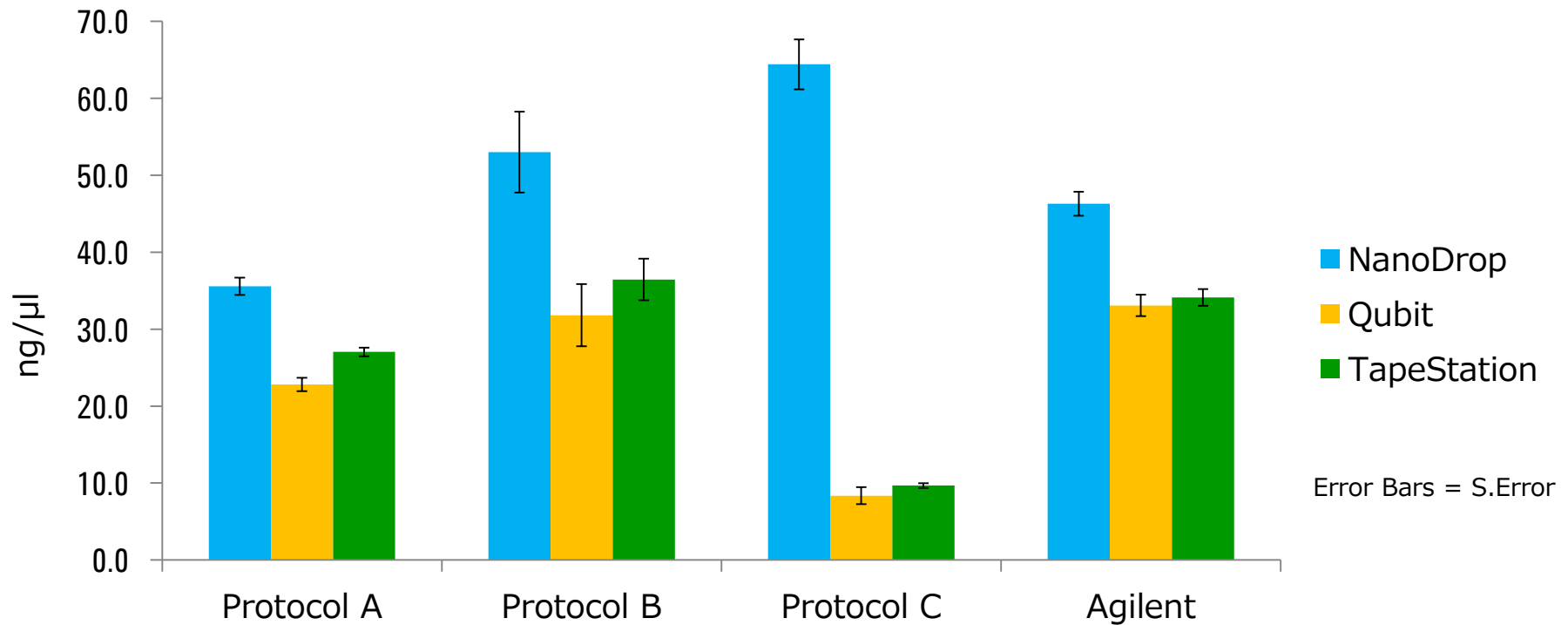
2200 TapeStation



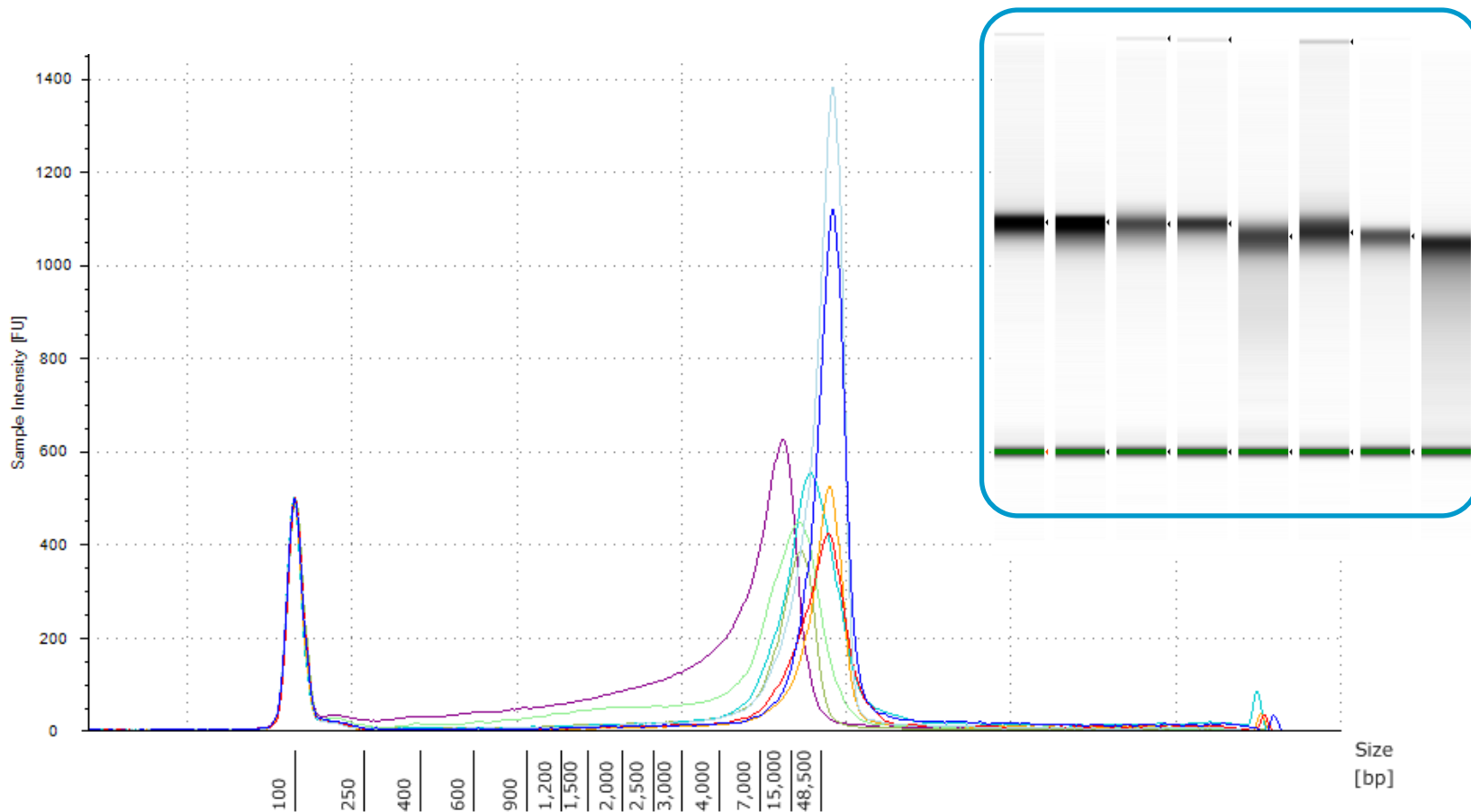
Electropherogramの重ねがき



Qubitと同様二本鎖特異的に定量可能

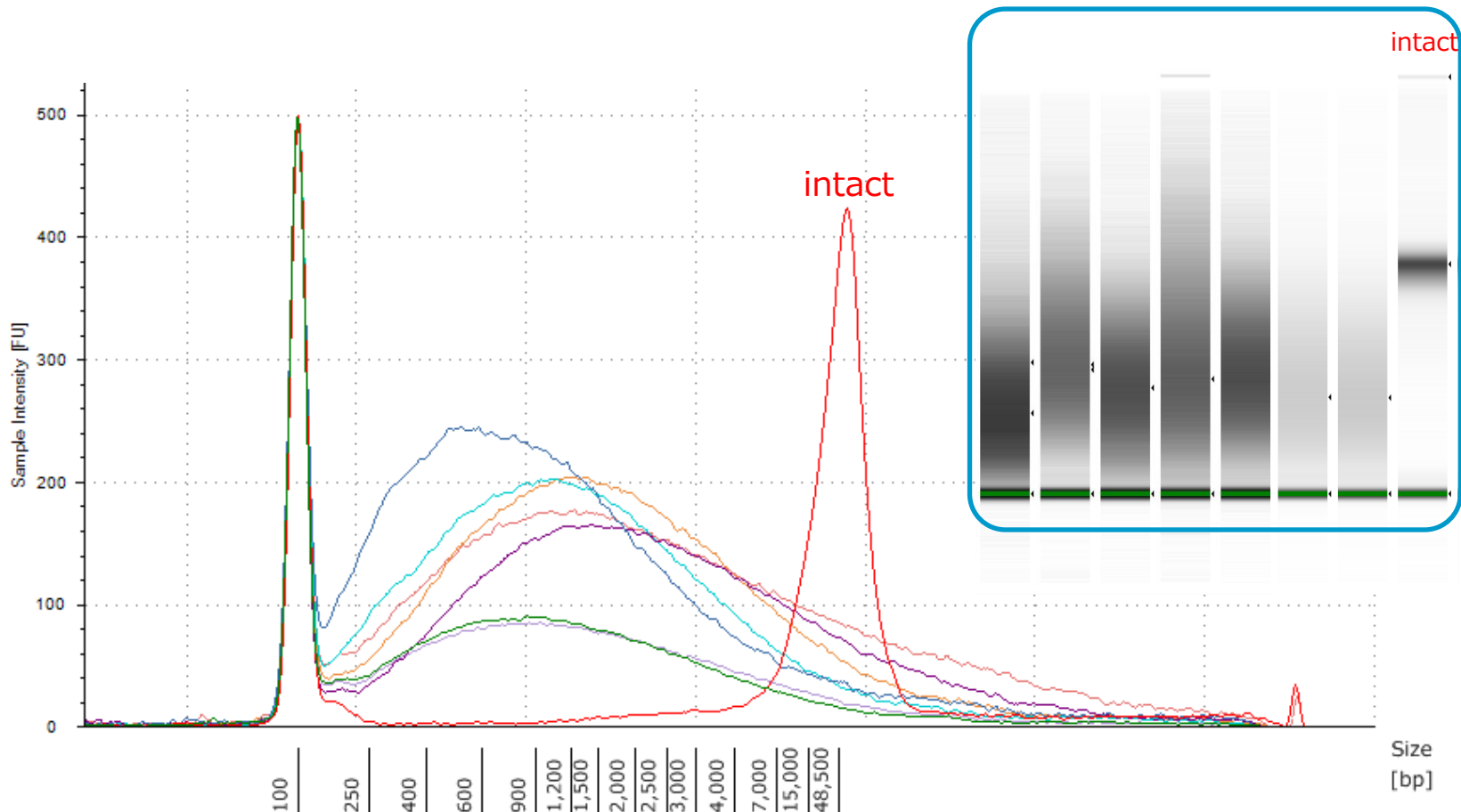


Intactサンプル泳動例



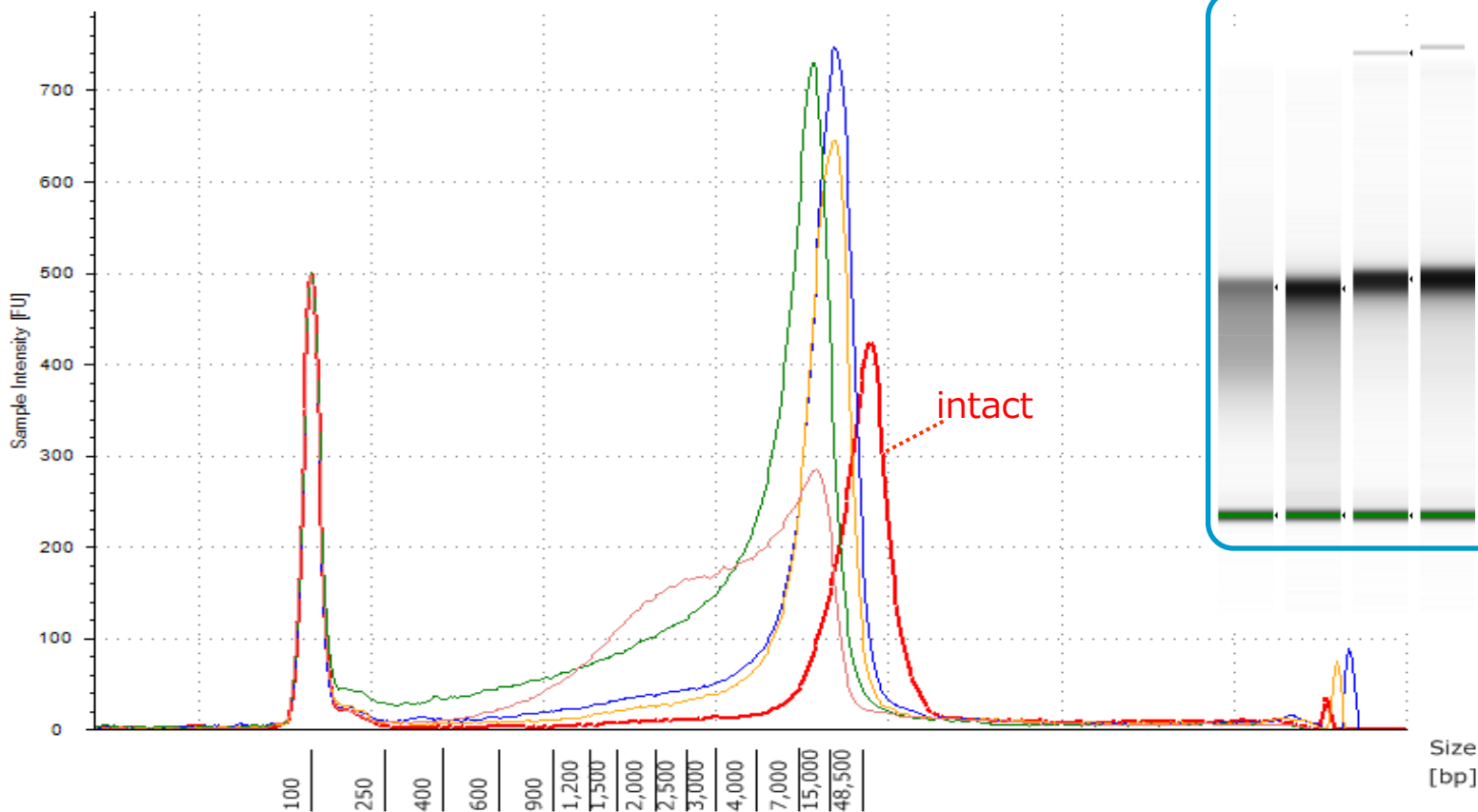
データご提供：公益財団法人がん研究会様

FFPEサンプル泳動例



データご提供：公益財団法人がん研究会様

LCMサンプル泳動例



データご提供：公益財団法人がん研究会様



D1K / HSD1K Kit 仕様



次世代シーケンスの
ライブラリQCや
PCR産物の確認に

Analytical Specification	D1K	High Sensitivity D1K
分析分子量範囲	35-1000 bp	35-1000 bp
ピーク分離能	35 – 300bp: 15%, 300 – 1000bp: 10%	35 – 100bp: 15%, 300 – 1000bp: 10%
感度	0.05 ng/μL	5 pg/μL
サイズ決定再現性	5% CV	5% CV
サイズ決定真度	± 10%	± 10%
定量再現性	10% CV	15% CV
定量真度	± 20%	± 20%
定量範囲	0.1 - 50 ng/μL	75 - 1000 pg/μL
Physical Specification		
分析時間	16 samples < 20 minutes 96 samples <100 minutes	16 samples < 20 minutes 96 samples <100 minutes
サンプル数 / 1 Tape	16	16
サンプル必要量	1 μL	2 μL
サンプル数 / 1 Kit	112 samples/box	112 samples/box



D1K/HSD1K Library QC

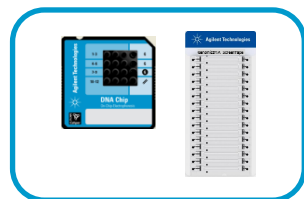


例: SureSelect



Check!

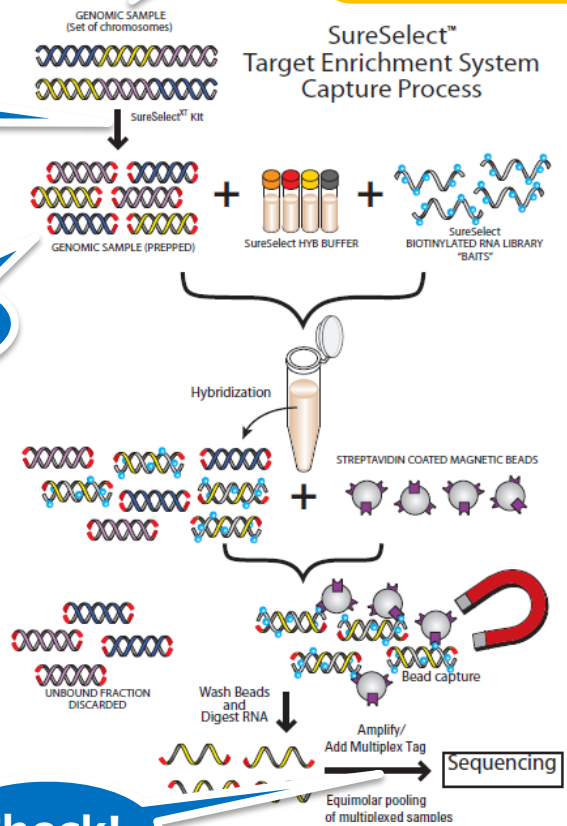
Check!



Check!



Check!





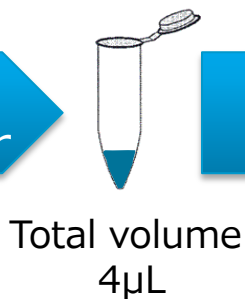
D1K/HSD1K サンプル調製方法



D1K:



+ 3µL
sample buffer



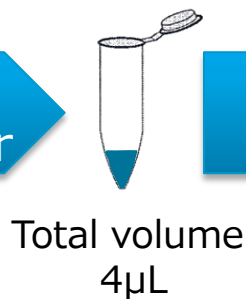
Vortex &
Spin down



HS D1K:



+ 2µL
sample buffer



Vortex &
Spin down



- 必要サンプル量 ; 1µL or 2µL (HighSensitivity)
- Sample bufferを混ぜるだけですぐ泳動できます



Data

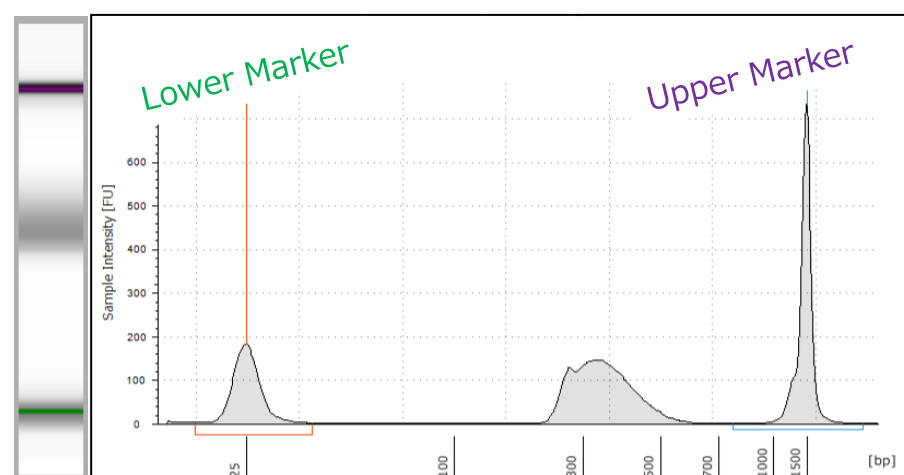
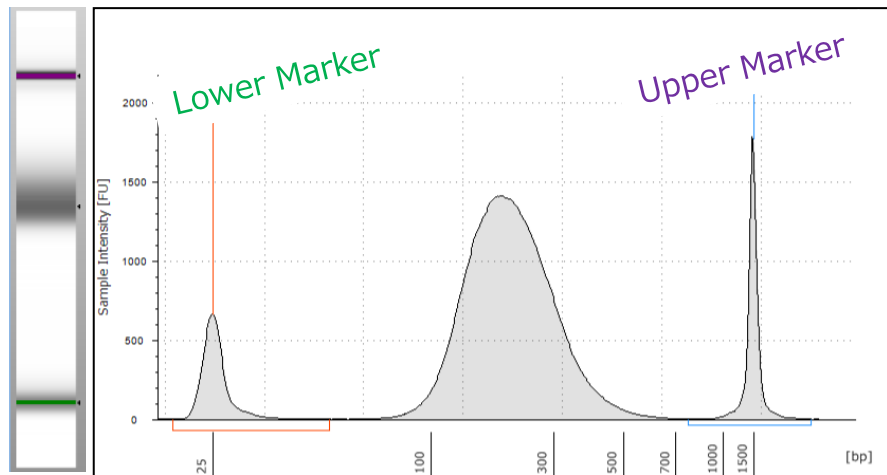


D1K

gel electropherogram

HS D1K

gel electropherogram



Region Assayにより指定した範囲のAverage size, Conc., Molarity が自動で計算されます

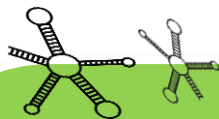
Region Table

Sample Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Region Molarity [pmc]	% of Total
100	700	293	520	2730	92.74



R6K / HSR6K Kit 仕様



遺伝子発現アレイや
リアルタイムqPCR
RNA-seqサンプルの
QCに

Analytical Specification	R6K	High Sensitivity R6K
分析範囲	50 - 6000 nt	50 - 6000 nt
感度	2 ng/ μ L	100 pg/ μ L
サイズ再現性	20% CV	20% CV
定量範囲	2 - 500 ng/ μ L	100 - 10000 pg/ μ L
Physical Specification		
分析時間	16 samples < 20 minutes 96 samples ~ 100minutes	16 samples < 15 minutes 96 samples ~ 100minutes
サンプル数 / 1 Tape	16	16
サンプル必要量	1 μ L	2 μ L
サンプル数 / 1 Kit	112 samples/box	112 samples/box



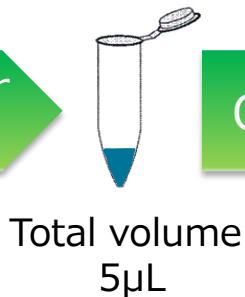
D1K/HSD1K サンプル調製方法



R6K:



+ 4 μ L sample buffer
72 °C, 3 min



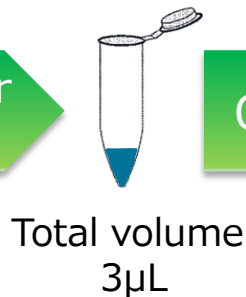
On ice, 2min



HS R6K:



+ 1 μ L sample buffer
72 °C, 3 min



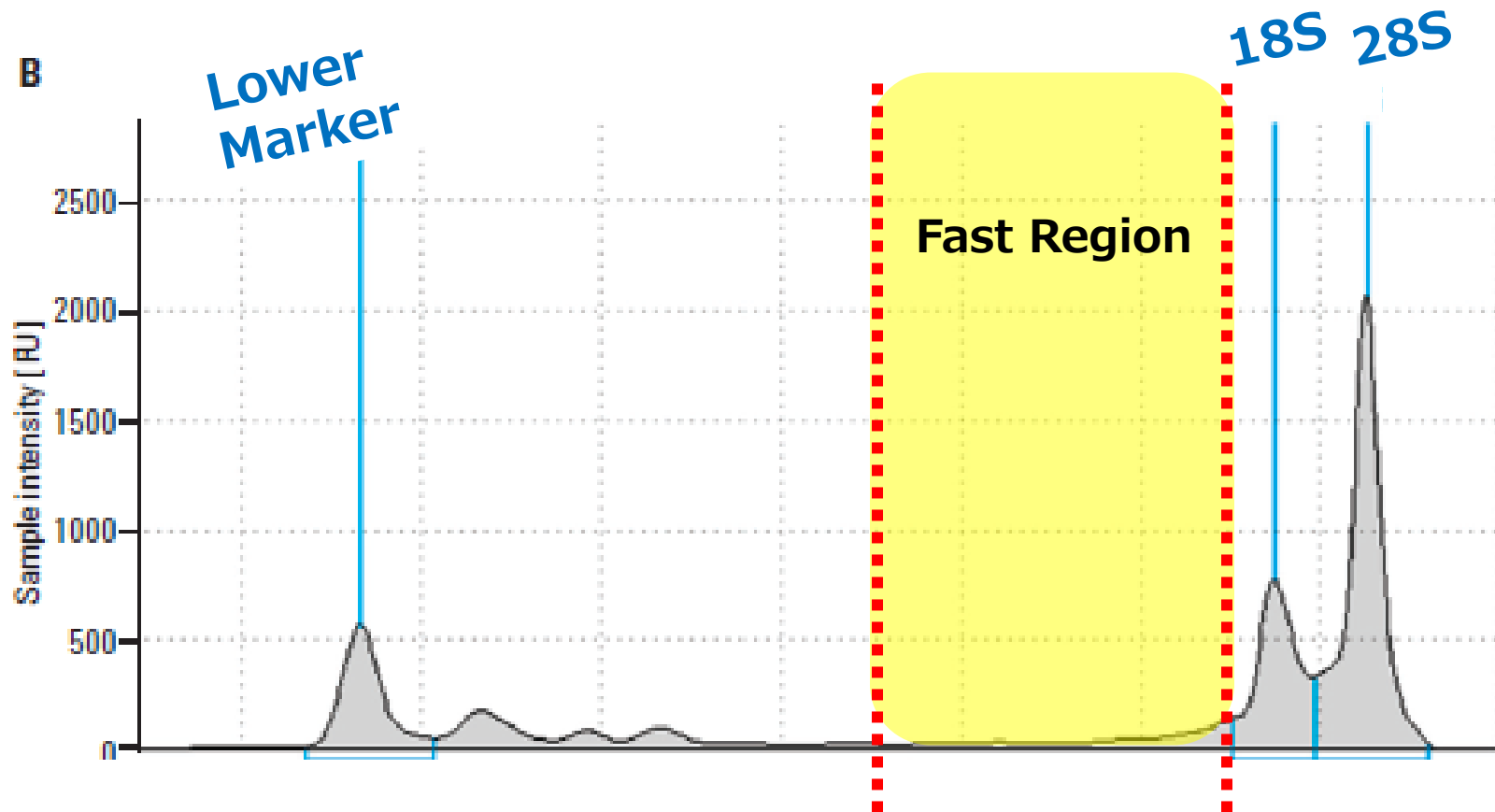
On ice, 2min



- 必要サンプル量 ; 1 μ L or 2 μ L (HighSensitivity)
- Sample bufferを混ぜて熱変性するだけですぐ泳動できます

RNA Integrity Number equivalent

低分子領域(Fast Region)と18Sの面積比より算出

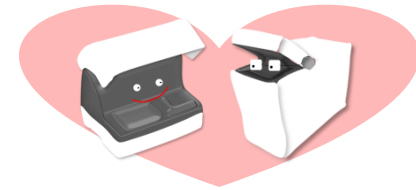




RIN^e vs. RIN

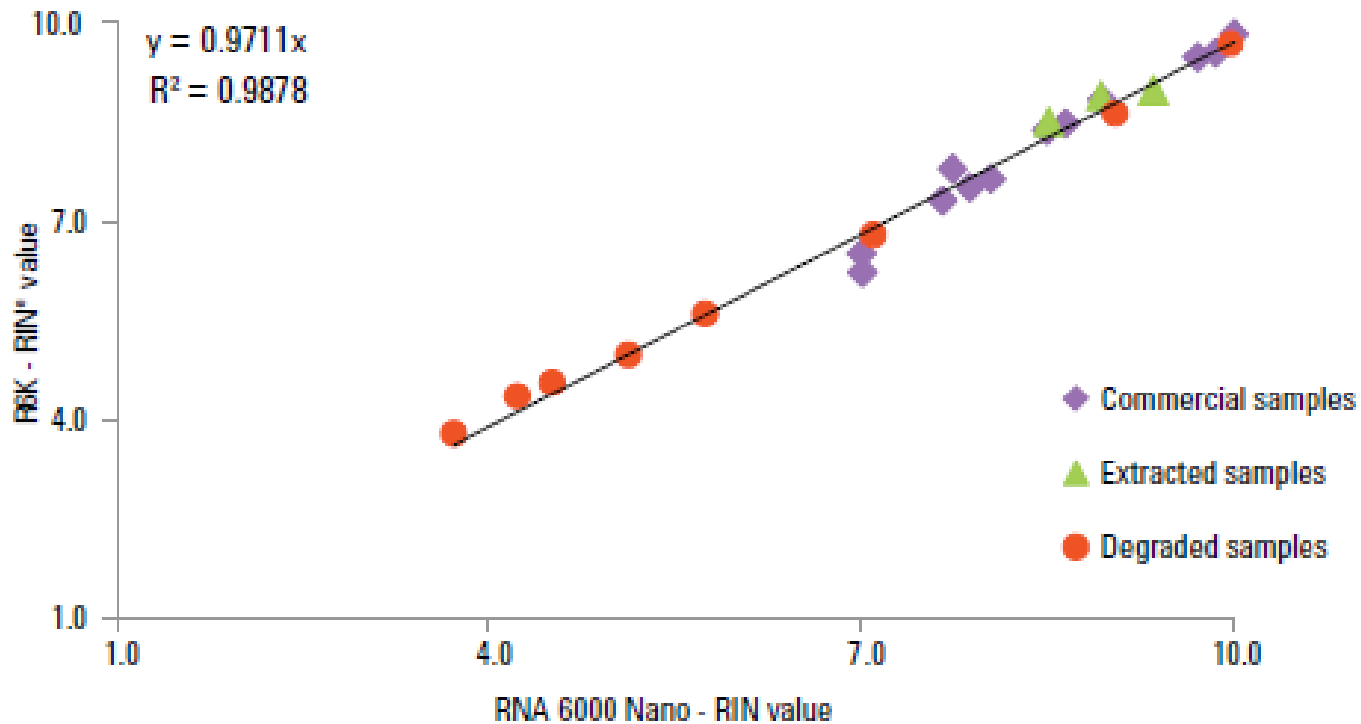


世界標準であるバイオアナライザのRINと非常に相関の高いRIN^e



A

RIN and RIN^e Correlation
RNA 6000 Nano and R6K kit



P200 Kit 仕様

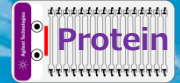


抗体のQCや
タンパク質の発現・
精製ステップの確認に

Analytical Specification	P200
分析分子量範囲	10 - 200 kDa
ピーク分離能	15%
サイズ決定真度*	±10% (CAII, Lysozyme, beta lactoglobulin)
サイズ決定再現性*	3% CV
定量再現性*	100 - 1000 ng/uL for IgG; 15% CV
定量範囲*	5 - 5000 ng/uL BSA, Lysozyme; 12.5 - 5000 ng/uL IgG
感度*	5 ng/uL Lysozyme; 12.5 ng/uL IgG
Physical Specification	
分析時間	16 samples < 15 minutes
サンプル数 / 1 Tape	16
サンプル必要量	2 µL
サンプル数 / 1 Kit	112 samples/box

* サンプルにより異なります

P200 サンプル調製方法

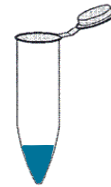


Labeling Dyeの希釈:

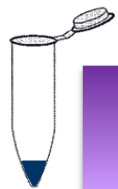
例) 16サンプルの場合
40 μ L stain solutionを準備

+ 8 μ L P200
5xLabeling dye

+ 32 μ L P200
Labeling buffer



Use immediately
or
Store below -20 °C
< 1 week



2 μ L
Sample

+ 2 μ L stain solution
75 °C, 7 min



Total volume
4 μ L

+4 μ L sample buffer
75 °C, 5 min



Total volume
8 μ L

+2 μ L markers*



*Kit付属のmarker (内部標準) はラベル化済みです

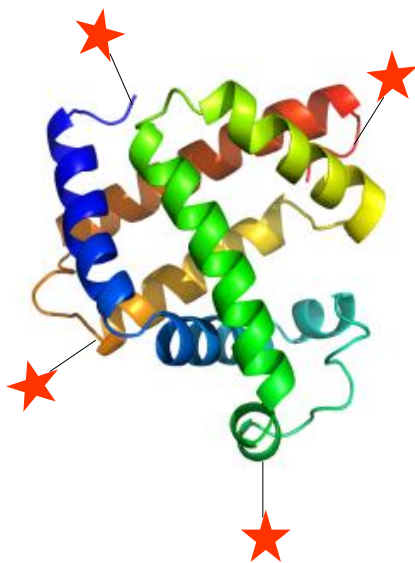
○ 必要サンプル量 ; 2 μ L

○ ラベル化 7 min, 変性5 min後、すぐ泳動できます

P200 ラベル時注意点



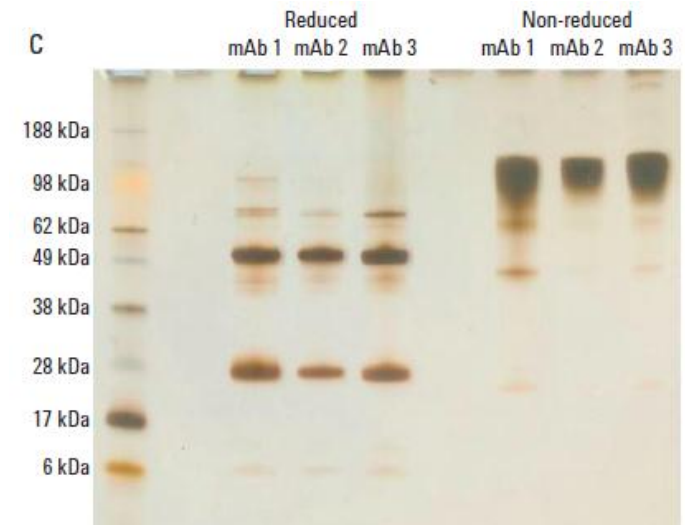
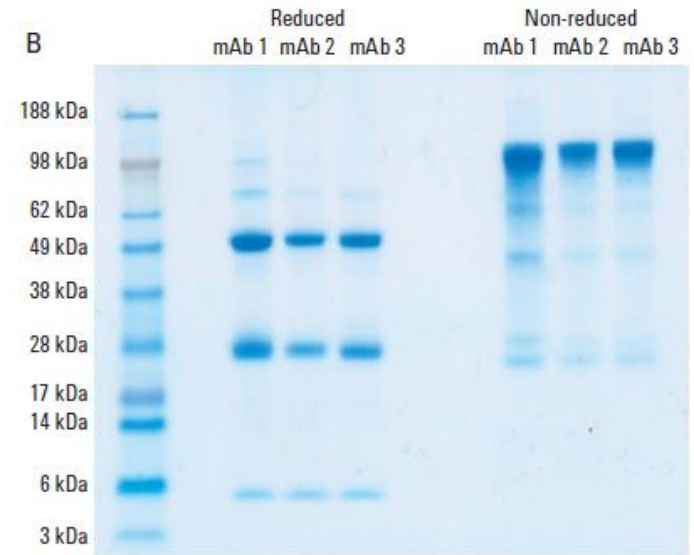
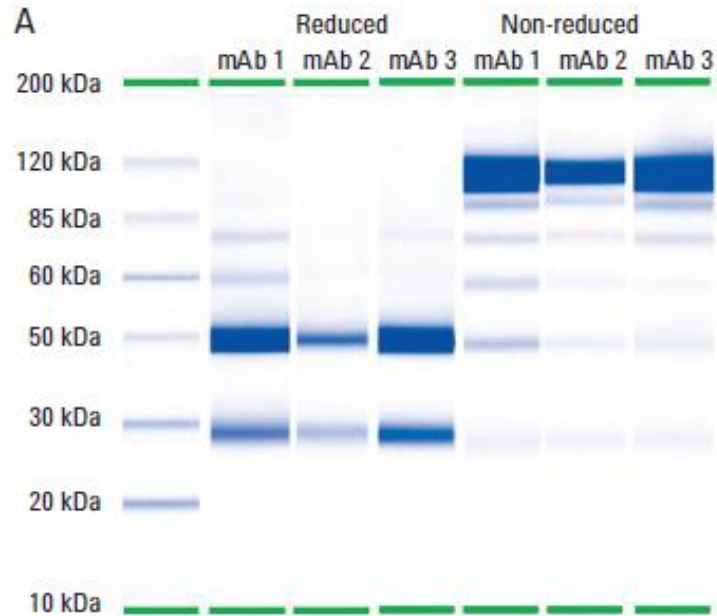
リジン基
およびN末の-NH₂に結合するラベルを使用

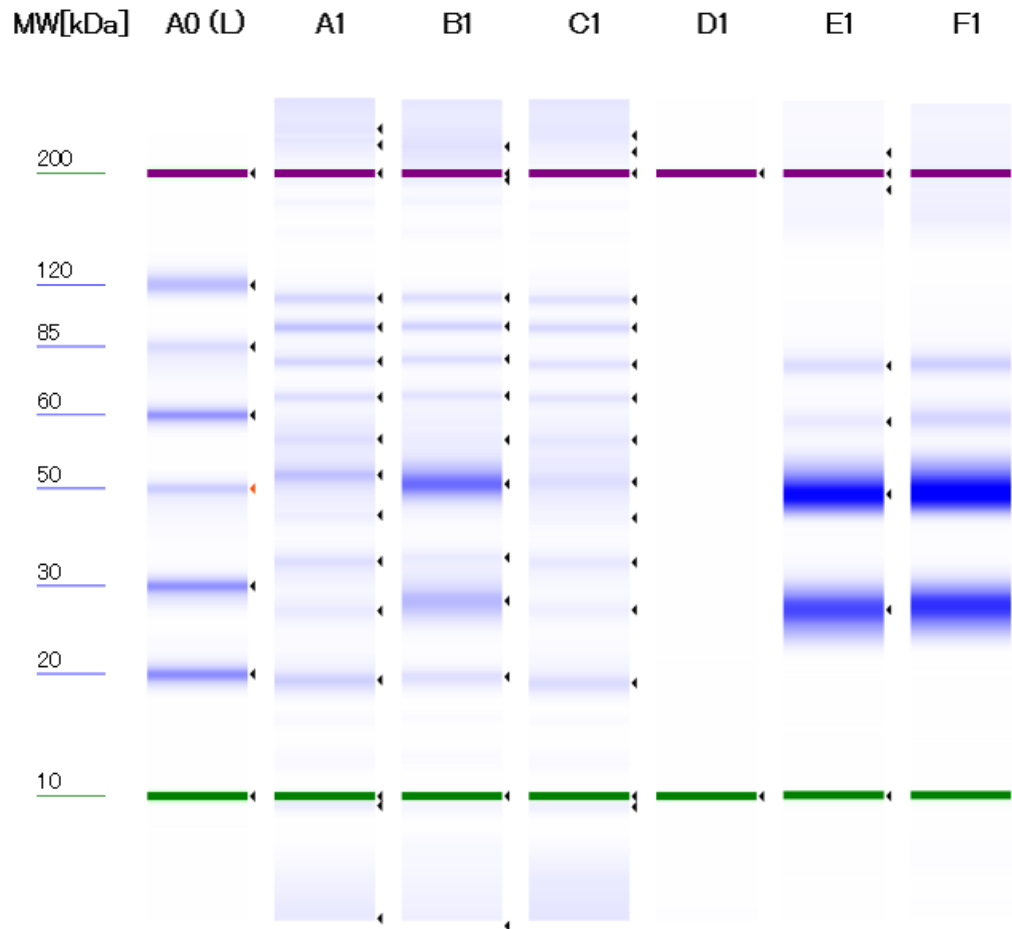


- ✓ pH
pH8-10が最適条件です
(Kit付属のpH bufferはpH9. 希釈bufferとして推奨)
- ✓ Buffer
高濃度のNaCl, SDS, Primary Amines
や Guanidineが含まれている場合
buffer置換等をおこなってください
- ✓ Modification
N末やLysineが修飾されている場合、ラベル化
効率が低下します

(詳細はApplication Note 5990-9603ENをご参照ください)

P200泳動例 vs Coomassie, vs Silver stain





A0: Ladder

A1: Lysate

**B1: Lysate +
IgG**

**C1: Flow
Through**

D1: Wash

E1: Eluate

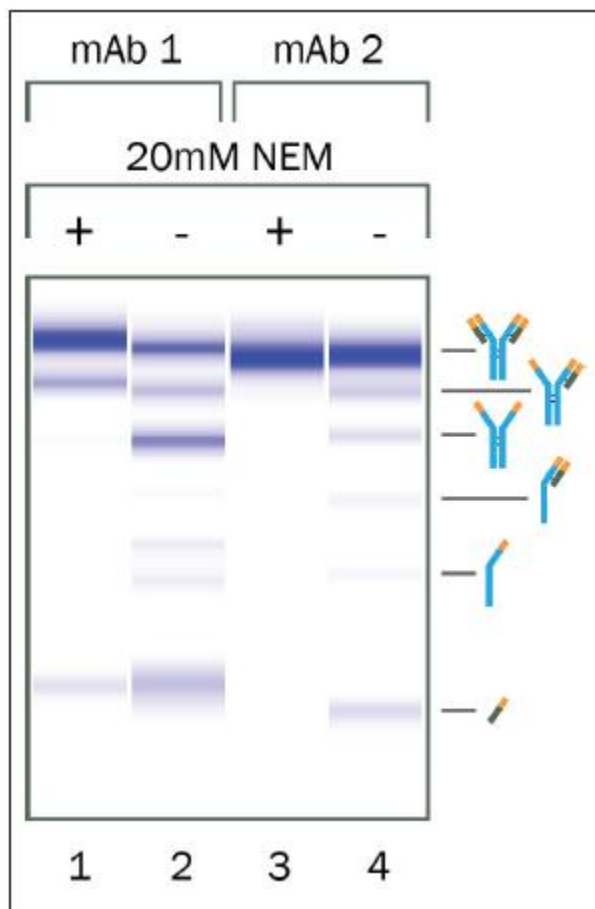
F1: Standard

P200 泳動例

Antibody with NEM



P200



SDS-PAGE

