

Thermo
SCIENTIFIC



NanoDrop 1000
1 μ L 分光光度計
取扱説明書 v3.7

お使いになる前に必ずお読み下さい

LMS 株式会社 エル・エム・エス
Laboratory & Medical Supplies

本書の内容については万全を期して作成いたしました。万が一不審な点や誤りなど、お気づきのことがありましたらご連絡下さい。お客様の使用誤り、その他異常な条件下での使用により生じた損害、及び本機の使用または使用不能から生ずる付随的な損害について、当社は一切責任を負いません。製品の仕様及び本書の内容については、将来予告無しに変更することがあります。

本書の一部または全部を無断で複製することは禁止されています。また、個人としてご利用になる他は、著作権法上、当社に無断では使用できません。本書のイラストや画面は一部実際と異なる場合があります。

製造元

Thermo Fisher Scientific
3411 Silverside Road
Bancroft Building, Suite 100
Wilmington, DE 19810 U.S.A.
Telephone: 302-479-7707
Fax: 302-792-7155
E-mail: info@nanodrop.com
www.nanodrop.com

Microsoft とそのロゴ、Windows、Windows NT、Excel は米国 Microsoft Corporation の米国及びその他の国における登録商標です。

Adobe、Acrobat は Adobe Systems Incorporated (アドビシステムズ社) の登録商標です。

その他の全ての商標は Thermo Fisher Scientific Inc. と関連会社の登録商標です。

NanoDrop は Thermo Fisher Scientific の商標です。

Revised 7/08

輸入代理店

株式会社エル・エム・エス
〒113-0033 東京都文京区本郷 3-6-7 田中ビル
TEL(03)5842-4301 FAX(03)3811-3212
E-Mail kagaku@lms.co.jp
www.lms.co.jp

目次

1. はじめに	1-1
この商品について.....	1-1
基本操作.....	1-1
アプリケーション.....	1-1
特許.....	1-1
2. セットアップ	2-1
コンピューター動作環境.....	2-1
ソフトウェアのインストール.....	2-1
ソフトウェアのアップグレード.....	2-1
3. 一般的な操作	3-1
サンプル保持システム.....	3-1
サンプル保持システムのクリーニング.....	3-1
ソフトウェアの構成と特徴.....	3-2
User Preferences (測定モードの設定).....	3-3
Utilities and Diagnostics (装置の診断).....	3-3
Account Management (アカウントの管理).....	3-3
Dye/Chromophore Editor.....	3-5
4. 全測定モード共通機能	4-1
各測定モードのスタート.....	4-1
共通の機能.....	4-1
Measure (F1).....	4-1
Blank (F3).....	4-1
Re-blank (F2).....	4-2
Print Screen (F4).....	4-2
Start Report / Recording.....	4-2
Print Report (F5).....	4-2
Show Report (F7).....	4-2
Sample ID.....	4-2
Sample #.....	4-3
Exit.....	4-3
Escape Key (ESC).....	4-3
Show Context Help (Ctrl+H).....	4-3
User's Manual.....	4-3
5. Nucleic Acids (核酸測定モード)	5-1
必要サンプル量.....	5-1
測定濃度範囲.....	5-1
Spectrum Normalization (スペクトルのノーマライズ).....	5-2
Spectrum Overlay Control (スペクトルの上書き).....	5-2
6. MicroArray (マイクロアレイ測定モード)	6-1
蛍光色素の選択.....	6-1
必要サンプル量.....	6-1
測定濃度範囲.....	6-1
ベースラインの計算とノーマライズ.....	6-1
7. UV-VIS (UV-Vis 測定モード)	7-1
必要サンプル量.....	7-1
測定濃度範囲.....	7-1
測定画面の機能.....	7-1
8. Protein A280 (タンパク A280 モード)	8-1
必要サンプル量.....	8-1
測定部の特別なクリーニング.....	8-1
測定濃度範囲.....	8-1
測定画面の機能.....	8-1
Spectrum Normalization (スペクトルのノーマライズ).....	8-2
Spectrum Overlay Control (スペクトルの上書き).....	8-2

9. Proteins & Labels (タンパクとラベルモード)	9-1
蛍光色素の選択	9-1
必要サンプル量	9-1
測定部の特別なクリーニング	9-1
測定濃度範囲	9-1
測定画面の機能	9-2
ベースラインの種類	9-2
10. Protein BCA(タンパク BCA 法モード)	10-1
必要サンプル量	10-1
測定部の特別なクリーニング	10-1
測定濃度範囲	10-1
BCA キット、プロトコール、サンプル調整	10-1
測定画面の機能	10-1
BCA 測定の実行	10-2
スタンダード曲線の機能	10-3
Delete Standard Points	10-3
BCA モードの終了	10-3
11. Protein Lowry (タンパクローリー法モード)	11-1
必要サンプル量	11-1
測定部の特別なクリーニング	11-1
測定濃度範囲	11-1
変法ローリーキット、プロトコール、サンプル調整	11-1
測定画面の機能	11-1
ローリー法測定の実行	11-2
スタンダード曲線の機能	11-2
Delete Standard Points	11-3
ローリー法モードの終了	11-3
12. Protein Bradford (タンパクブラッドフォード法モード)	12-1
必要サンプル量	12-1
測定部の特別なクリーニング	12-1
測定濃度範囲	12-1
ブラッドフォードキット、プロトコール、サンプル調整	12-1
測定画面の機能	12-1
ブラッドフォードでのタンパク測定	12-2
スタンダード曲線の機能	12-3
Delete Standard Points	12-3
ブラッドフォードモードの終了	12-3
13. Protein Pierce 660 nm	13-1
測定画面の機能	13-1
Pierce 660 nm 法測定の実行	13-1
スタンダード曲線の機能	13-2
Delete Standard Points	13-2
14. Cell Cultures (細胞培養モード)	14-1
必要サンプル量	14-1
細胞懸濁液の濃度	14-1
サンプルの均一性	14-1
測定部のコンタミ除去について	14-1
15. データの保存と Data Viewer	15-1
保存ファイルの作成	15-1
保存データの階層	15-1
Data Viewer	15-2
Archive File Converter.....	15-5
表計算ソフトで保存データを開く	15-5
16. Calibration Check	16-1
手順	16-1
ソレノイド下部に溜まった埃の取り除き方	16-2
17. トラブルシューティング	17-1
Error USB2000.....	17-1
Connection Error.....	17-2

Signal Error	17-2
Saturated Detector	17-3
Liquid Column Breakage	17-4
その他のエラーメッセージ	17-5
サンプルの正確性と再現性	17-6
260/280 Ratio (260/280 比)	17-6
ギザギザの異常な波形	17-7
テクニカルサポート	17-7
18. メンテナンスと保証.....	18-1
クリーニング	18-1
キャリブレーション	18-1
保証	18-1
19. 補足.....	19-1
装置の仕様	19-1
ブランクと吸光度の計算式	19-1
濃度計算 (Beer の法則).....	19-1
サンプル保持システム溶媒適合性	19-2
測定部のコンタミ除去について	19-2
ダイモ 400 ラベルライターのセットアップ(オプション)	19-2

1. はじめに

この商品について

Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 はわずか 1µL で高い測定精度と再現性を実現した広波長領域(220-750nm)分光光度計です。この画期的特長は測定サンプルを表面張力で定位置に保つ「サンプル保持特許技術」により可能になりました。キュベットや他のサンプル容器を必要とせず洗浄は数秒で終わり、また NanoDrop 1000 分光光度計は高濃度のサンプルを希釈せずに測定することができます。(通常のキュベットを使う分光光度計と比較して 50 倍の濃度のサンプルを測定できます。)

基本操作

1µL のサンプルを受光側光ファイバーケーブル(下側)にピペッティングします。もう一方の光源側光ファイバーケーブル(上側)がサンプルに接触し受光ファイバーと光源ファイバーの間でサンプルの液柱を作ります。この間隔は 1mm と 0.2mm に設定されています。パルス式キセノンフラッシュランプを光源として使用しリニア CCD アレイを使った分光光度計がサンプルを通過した光を分析します。装置は PC を用い専用ソフトウェアで制御され、データはアーカイブファイルとして PC に保存されます。

アプリケーション

NanoDrop 1000 分光光度計によって UV/VIS の分光光度測定が 1µL の微量サンプルでも簡単に行えるようになりました。微量サンプルで測定できるのと使い勝手の良さで NanoDrop 1000 分光光度計は以下のようなアプリケーションの測定に適しています。

- 希釈なしで 3700ng/ul(dsDNA)までの核酸濃度の測定と純度の測定
- 核酸アレイのマーカ蛍光色素の濃度
- 280nm でのタンパクの測定 (最大 100mg/ml BSA)
- 拡張スペクトル測定、蛍光色素標識タンパク、結合体、金属タンパクの定量
- タンパクのブラッドフォード分析
- タンパクの BCA 分析
- タンパクのローリー分析
- タンパクの Pierce 660 nm 分析
- 細胞濁度の測定
- 一般的な UV-Vis 分光測定

特許

NanoDrop 1000 分光光度計に用いられているサンプル保持技術は、アメリカ特許、6,628,382 と 6,809,826 で保護されています。他の特許は申請中です。

2. セットアップ

コンピューター動作環境

ソフトウェアは以下の条件を満たしている PC で制御できます。Mac OS には対応していません。

- Windows XP、2000、Vista
Windows NT, 95, 98 or ME には対応していません。
- 233MHz 以上の CPU
- CD-ROM ドライブ
- 32MB 以上の RAM
- 40MB 以上のハードディスク空きスペース
- USB ポート (ND-1000 は、USB ポートのみ接続可能です。)
- データ表示用ソフトウェア (Microsoft Excel など) ※必要な場合

ソフトウェアのインストール

警告: ソフトウェアをインストールする前に ND-1000 と PC を接続しないで下さい。Administrator がソフトウェアをインストールして下さい。

ソフトウェアのインストール方法

1. すべてのプログラムを終了します。
2. 付属のソフトウェア CD を CD ドライブに入れるとメニューが自動的に表示されます。もしメニューが表示されない場合は、マイコンピュータから CD ドライブを選び“nd-1000...install.exe”ファイルをダブルクリックして下さい。その後は画面の指示に従って下さい。
3. インストール終了後 USB ケーブルを接続すると、ハードウェアウィザードが起動し「新しいハードウェアを検出しました。ドライバーを探しています。」というメッセージが表示されます。Windows XP SP2 ではインターネットに接続するかを選択する画面が表示されることがあります。その場合は“今回は接続しない”を選択して下さい。画面の指示に従って下さい。



Windows XP- SP2 の場合



その他の Windows の場合

これで NanoDrop 1000 が使用可能な状態となりました。ソフトウェアが正常に動作しない場合はトラブルシューティングを参照して下さい。

システムフォントの設定

ソフトウェアは、MS Sans Serif フォント、サイズ 8 ポイントで適正に表示されます。システムフォントの確認および設定をするには

1. ディスプレイのプロパティを開きます。(デスクトップの適当な場所を右クリックし、プロパティを選択することで開くことができます。)次に“デザイン”タブを選択します。(Windows XP ではさらに“詳細設定”を開きます。)
2. “項目”リストから“アイコン”を選びます。
3. MS Sans Serif(ウエスタン)フォント、サイズ“8”を選びます。
4. OK をクリックします。

他のフォントでも使用することはできますが正しく表示されないことがあります。(フォントの設定は測定結果等には影響ありません。)

ソフトウェアのアップグレード

アップグレード版は website からダウンロードできます。

ケーブルの接続

USB ケーブルで装置と PC を接続し、12VAC アダプターを装置の後部に接続します。

Note: 長期間使用しない場合でも電源ケーブルを接続したままで問題ありません。スタンバイ時の消費電力は 1.5W 以下でフラッシュランプは消えています。また、本機は電源スイッチ、電源ランプを備えていません。

3. 一般的な操作

サンプル保持システム

基本操作

基本的な操作は以下の通りです。



1. サンプリングアームを開いた状態で測定部にサンプルをピペッティングします。



2. サンプリングアームを閉じ PC のソフトウェアを用いて分光測定を行います。サンプルの液柱が上下の測定部の間に表面張力で立ち、分光測定が行われます。

3. 測定終了後、サンプリングアームを開いて上部と下部の測定部からサンプルを拭き取ります。

単に拭き取るだけで濃度が 1000 倍違うサンプルを測定してもキャリーオーバーはありません。

キャリーオーバーについてのデータは [website](#) を参照して下さい。



サンプル保持システムのクリーニング

測定ごとに、サンプルのキャリーオーバーと残渣を防ぐために上下の測定部をクリーニングして下さい。通常は必要ありませんが、高濃度のサンプルの測定後は 2 μ L の水を用いてクリーニングして下さい。また、多数のサンプル測定の後には、上下測定部の周辺も十分にクリーニングして下さい。これは測定後のクリーニングによっても残ってしまったサンプルの影響を防ぐためです。1 日の最後に脱イオン水で上下測定部及び周辺をクリーニングすることをお勧めします。Note: 脱イオン水をのせるのに噴出ボトルを使用しないで下さい。

測定部のコンタミ除去について

コンタミ除去が必要な時には、生物学的な活性のあるものが測定部に存在しないことを確認するために、0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液(市販の漂白剤の 10 倍希釈)等が利用できます。ファイバーを固定している部分は 303 ステンレスを使用していますので研究室等でよく使われる一般的溶媒に対して耐性があります。(サンプル保持システム溶媒適合性を参照して下さい。)Note: 漂白剤をのせるのに噴出ボトルを使用しないで下さい。

タンパクでの特別なクリーニングの必要性について

タンパクや界面活性剤を含む溶液は表面張力が低いため 1 μ L のサンプルでは液柱が立たないことがあります。この場合には測定部を乾いたキムワイブなどで 30-40 回拭くことによって液柱が立つようになります。その他に NanoDrop Pedestal Reconditioning Compound (PR-1)を使用すると測定部表面の汚れ等により測定中に液柱が切れる場合に測定部の状態を早く回復できます。PR-1 についての詳細は [website](#) を確認して下さい。

サンプル量について

サンプル量は重要ではありませんが、上下の測定部の間にサンプルの液柱が形成されなくてはなりません。

一般的に再現性を得るためには以下のような量を必要とします。

- 水溶性の核酸: 1 μ L
- 精製されたタンパク: 2 μ L
- ブラッドフォード、BCA とローリー分析: 2 μ L
- 細胞濁度: 1-2 μ L

最大容量 2 μ L のピペットと高精度のピペットチップを用いて十分な量のサンプルを使うことをお勧めします。最大容量の大きい(0 ~ 10 μ L またはそれより大きい)ピペットでは 1 μ L を測定部に正確にピペッティングできません。またサンプルの特性やピペットの精度についてよく分からない場合は 2 μ L を使うことをお勧めします。

サンプルのキャリーオーバー

NanoDrop 1000 の測定部のサンプルは簡単に取り除くことができます。キムワイプで上下の測定部を拭くだけで濃度が 1000 倍違うサンプルを連続測定してもキャリーオーバーはありません。(データは website を確認して下さい。)測定部は研磨された光ファイバーで、303 ステンレスに光ファイバーが直接埋め込まれた構造になっていますのでサンプルが入り込むことはありません。

サンプルの均一性

不均一な水溶液サンプルは、特に少量のサンプルを使う場合に分光光度法を含む使用されているすべての測定技術により得られたデータがばらつく場合があります。ゲノム DNA、ラムダ DNA、高濃度の高粘度核酸溶液、再溶解した核酸溶液が良く知られています。タンパクは、変性、沈殿、凝集しやすいのでサンプルの均一性を保つために注意して取り扱う必要があります。

揮発の影響

測定中のサンプルの揮発は通常、吸光度に僅かに影響し 1~2% サンプルの濃度が増加します。これは同じサンプルを連続測定することによって確認することができます。ヘキサンのような高揮発性の溶液は測定が完了する前に揮発してしまうかもしれません。DMSO のような低揮発性の溶液では影響はありません。

サンプルの回収

サンプル保持システムの一つの特長として、測定したサンプルを測定部からピペットで回収出来ます。

ソフトウェアの構成と特徴

メインメニュー

サンプリングアームを下ろし、以下の順に選択して NanoDrop ソフトウェアを起動します。

スタート → プログラム → NanoDrop → ND-1000 (Version)



測定モード

ソフトウェアは生命科学で良く使われる次のような測定モードを有しています。

- **Nucleic Acid 核酸測定** – 核酸濃度と純度
- **MicroArray マイクロアレイ測定** – 色素のラベル効率と核酸の純度
- **UV-Vis** – 標準的な UV 可視光測定
- **Cell Cultures 細胞数** – 濁度からの細胞の濃度測定
- **Protein A280 タンパク A280** – 精製済みタンパクの濃度と純度
- **Proteins & Labels** – 蛍光ラベルされたタンパク、化合物、金属タンパクの濃度
- **Protein BCA タンパク BCA 法** – BCA 法を使ったタンパクの濃度測定

- **Protein Bradford タンパクブラッドフォード法** – ブラッドフォード法を使ったタンパクの濃度測定
- **Protein Lowry タンパク ローリー法** – ローリー法を使ったタンパクの濃度測定
- **Pierce 660 nm Protein Assay タンパク Pierce 660 nm 法** – 新しい 660nm 法を使ったタンパクの濃度測定

User Preferences (測定モードの設定)

ユーザー毎に各測定モードの設定を保存することができます。設定できるオプションは以下の通りです。

- **Archiving**

標準設定の *c:\nanodrop data* へのデータ保存に加えて、ユーザーはデータを別の場所にも保存することができます。このオプションは“Archiving”タブの“Duplicate data storage?”にチェックし“Duplicate Data Folder”に保存するフォルダを設定します。User Preferences モードを終了する前に Save & Exit ボタンをクリックすることで設定を保存します。

- **Reports**

ユーザーは全てのサンプルデータのレポートを自動的にセーブする Auto Reporting 機能を選択できます。この機能を有効にするには Users Preferences の Reports タブを選択し Auto Reporting エリアの中の各アプリケーションリストにチェックします。Save & Exit を選択し設定を保存します。

Note: User preferences は“.log”ファイルに保存されます。ソフトウェアをアップグレードする場合はこのファイルを保存しておいて下さい。新しいソフトウェアにアップグレードした後で User preferences の設定が正しくない場合は保存しておいた log ファイルをコピーして下さい。詳しくは“Passwords.log”を参照して下さい。

- **Nucleic Acids**

標準の設定は DNA-50 です。その他に RNA-40、ssDNA-33、Other(数値を設定可能)があります。

- **UV/Vis**

標準の設定では選択できる 2 つのカーソル位置は $\lambda 1$ が 300nm、 $\lambda 2$ が 700nm です。HiAbs(自動で 0.2mm 光路長を利用する。)を設定できます。Normalize を選択すると 400nm~700nm の間でもっとも低い吸光度を使用してノーマライズします。

- **Microarray**

標準の設定は ssDNA-33 です。Dye1 は Cy3(750nm の吸光度でノーマライズ)に設定されています。

その他に RNA-50、ssDNA-33、Alexa fluor を含む登録された色素が選択できます。詳細は Dye/Chromophore Editor を参照して下さい。

- **A280**

精製タンパク分析と濃度測定に 6 つのサンプルタイプが選択できます。標準の設定は Other protein (E1%)です。各サンプルタイプについての詳細はセクション 8 を参照して下さい。Note: ソフトウェアの v3.5.1 から 340nm の吸光度でノーマライズするかどうかを選択可能になりました。

- **Proteins and Labels**

精製タンパク分析と濃度測定に 6 つのサンプルタイプが選択できます。標準の設定は Other protein (E1%)です。

340nm の吸光度で 280nm の吸光度の bichromatic ノーマライズするかどうかを選択できます。デフォルトの設定では Dye1 は Cy3(750nm の吸光度でノーマライズ)に設定されています。

Utilities and Diagnostics (装置の診断)

このモードは、光路長の校正値を含む装置の状態と装置の操作上の問題のトラブルシューティングに用いられます。Note: calibration check 機能がソフトウェアの v3.5.1 から新しく追加されました。

詳しくはセクション 16(Calibration Check)とセクション 17(トラブルシューティング)を参照して下さい。

Account Management (アカウントの管理)

アカウントマネージメントモードは各ユーザーが自分のデータを各フォルダに自動的に保存するよう選択することができます。アカウントマネージメントモードには Administrator だけがアクセスできます。

Account Types (アカウントの種類)

ユーザーアカウントは 3 種類あります。

- **Level 10**-最も高いセキュリティレベルで、全てのレベル 10 ユーザーがユーザーの追加、ユーザーの変更、ユーザーの削除、パスワードの設定を行うことができます。ソフトウェアのインストール時には唯一のレベル 10 ユーザーは Administrator でパスワードは“nanodrop”です。初めにアカウントの設定をした後にパスワードを変更することをお勧めします。全てのユーザーをレベル 10 に設定することができますがお勧めしません。(Level 5 の項を参照) Note: Administrator (又は最後のレベル 10 ユーザー) は削除できません。

User ID	Full Name	Level	Access	Locked	Expired	Expires
Default	Administrator	10	Admin	Not Locked	Not Expired	Never
adm	name	5	Admin	Not Locked	Not Expired	8/14/2007 10:11:04 AM

- **Level 5**-一般ユーザーにはこのセキュリティレベルをお勧めします。アカウントへのアクセスはパスワードで管理されていて User preferences を設定できます。また全てのデータは自動で c:\nanodrop data フォルダの中のユーザーアカウントごとに (User preferences で設定していれば設定された場所にも) 保存されます。
- **Default (level 0 security)** - このセキュリティレベルは Default アカウント専用です。このアカウントでは個人アカウントをもたないユーザーが全ての測定モードを使用できます。パスワードで保護されていませんが、このアカウントの User preferences は設定できます。全てのデータは自動的に c:\Nanodrop Data フォルダの中の Default フォルダに保存されます。Note: 全てのユーザーが独自のユーザーアカウントを持っていれば、Administrator は Default アカウントを無効にできます。

Account Log-in/Log-out and Time Out (アカウントのログイン、ログアウト、タイムアウト)

ユーザーアカウントは以下の操作を行うまで有効です。

- 1) Default やその他のユーザーアカウントを選択してログオフする。
- 2) ソフトウェアを終了する。

またユーザーアカウントはソフトウェアのアイドル時間を超えると自動的にログオフします。ソフトウェアを使用しないで 4 時間経過すると自動的に Default ユーザーに戻ります。4 時間経過すると 30 秒のカウントダウン画面が表示されます。CANCEL を選択すると経過時間がリセットされユーザーアカウントと測定モードはさらに 4 時間経過するまで有効です。カウントダウンが終了すると開いていた測定モードは終了し、メインメニューの Default ユーザーに戻ります。

Account Lockout (アカウントのロック)

ユーザーアカウントは以下の場合にロックされます。

- 有効期限内にパスワードを変更しなかった場合
- 間違ったパスワードを 99 回入力した場合
- Administrator がアカウントをロックした場合

Administrator (level 10 ユーザー) のみがロックされたアカウントを解除することができます。Account Management モードの Modify User から設定できます。Note: 全てのアカウントは(Administrator も)間違ったパスワードを入力するとロックされます。

Change Password (パスワードの変更)

このモードで各ユーザーのパスワードを変更することができます。

Note: Administrator は “Account Management”モードの “Options” か “Modify User” で各ユーザーパスワードの有効期限の設定や日数を変更できます。

Edit the current user parameters and click Continue to save or Cancel to exit without saving.

Active:

User ID:

Full Name:

Password:

Security level:

Expires:

Passwords.log file

ソフトウェアでのみ読むことができる各ユーザーの ID とパスワードを含んだファイルです。このファイルは `c:\nanodrop data\log files` フォルダに保存されています。Administrator は新しいアカウントを追加するかパスワードを変更することにこのファイルのコピーを作り同じフォルダ内に保存しておくことをお勧めします。もし Administrator のアカウントがロックされた場合には、コピーの名前を変更すれば“password.log”ファイルとして使用できます。

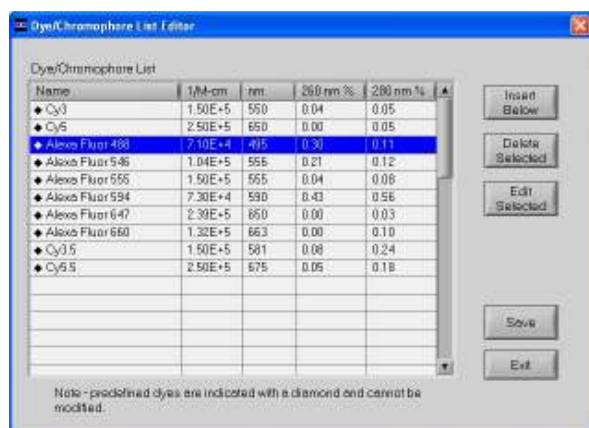
Note: ソフトウェアをアップグレードした場合には、“passwords.log”と“user preferences.log”は自動的に `c:\NanoDrop Data\Log Files` にコピーされます。なんらかの理由で自動的にコピーされなかった場合は `c:\program files\NanoDrop {version}` フォルダから `c:\program files\NanoDrop {version}` フォルダへコピーして下さい。

Dye/Chromophore Editor

Dye/Chromophore Editor は MicroArray、Proteins and Labels の各モードで使用するために、標準登録されている蛍光色素に加えて必要な色素や chromophores を設定できます。

Note 1: 標準登録されている dye メソッドはひし形が表示されていて変更できません。Note 2: それぞれの色素の 260nm と 280nm の吸光度の寄与は%の項に適切な少数補正値を入力することによって校正されます。Dye/Chromophore のリストの中に登録されていない色素の 260nm%と 280nm%の補正値はメーカーにお問い合わせ下さい。

Note: v3.3 以前のソフトウェアからアップグレードしたときは、260 nm %と 280 nm %の補正値にはユーザーの定義値を入力して下さい。



4. 全測定モード共通機能

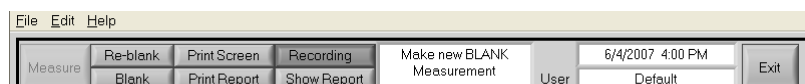
各測定モードのスタート

ソフトウェアをスタートさせると次のようなメッセージが表示されます。



測定結果を正確に再現性良く得るためには**測定部表面が汚れていないことを確かめ**、水を測定部にピペティングして OK をクリックします。“Intializing Spectrometer –please wait”というメッセージが表示され、表示が消えるとシステムが使用できます。測定データは自動的に決められたデータファイルに保存されます。

共通の機能



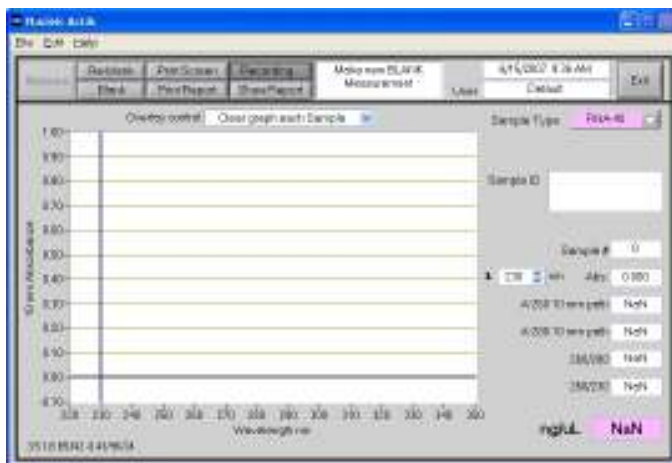
Measure (F1)

測定モードを開いた時、Measure ボタンは灰色になっており使用できません。Measure ボタンを有効にするには blank を測定します。

Measure ボタンは全てのサンプル測定に用いられます。F1 キーを押すか Measure ボタンをクリックして測定を行います。一回の測定時間は約 10 秒です。

Blank (F3)

サンプルの測定の前にブランクを測定し保存する必要があります。(吸光度計算についての詳細は“ブランクと吸光度の計算式”を参照して下さい。)最初のブランクを測定した後、直線が画面上に表示されます。ブランク測定後は表示されているサンプルスペクトルが消え、下図のような直線が表示されます。



正確な測定結果を得るために、測定する前に Blanking Cycle を行うことは有効です。これは装置が正常に動作していて、測定部に汚れが無いことが確認できます。Blanking Cycle の方法は以下の通りです。

1. ブランクサンプル(測定するサンプルに使われているバッファ、溶媒等)を測定部に置き、サンプリングアームを下ろします。
2. “Blank”または F3 キーを押します。
3. 測定が終了したら、キムワイブを用いてブランク溶液を上下の測定部から拭き取ります。
4. ブランク溶液をサンプルとして測定します。“Measure”か F1 キーを押します。測定結果のスペクトルは概ねフラットであるべきです。上下の測定部の表面を拭き、スペクトルがフラットになるまで繰り返します。

吸光度計算についての詳細は“ブランクと吸光度の計算式”を参照して下さい。

Re-blank (F2)

再ブランク(F2)は、ブランク機能(F3)と違い一つ前の測定結果を新しいブランクで更新して再表示し、次の測定から新しいブランク値を使います。再ブランクを行った場合は次のメッセージが表示されます。

Blank Applied
To displayed
Spectrum

Print Screen (F4)

Print Screen ボタンは現在のスクリーン画像を OS が指定しているプリンタに出力します。

Note: システムは Dymo LabelWriter 400 の#30256 [2-5/16' X 4'] shipping labels で最適に印刷されるよう設定されていますが、PC に接続された任意のプリンタで印刷可能です。

Print Window

プリントダイアログは、File メニューか“Ctrl+P”で選択できます。ユーザーは、プリントダイアログからプリントする接続されたプリンタを決めることができます。

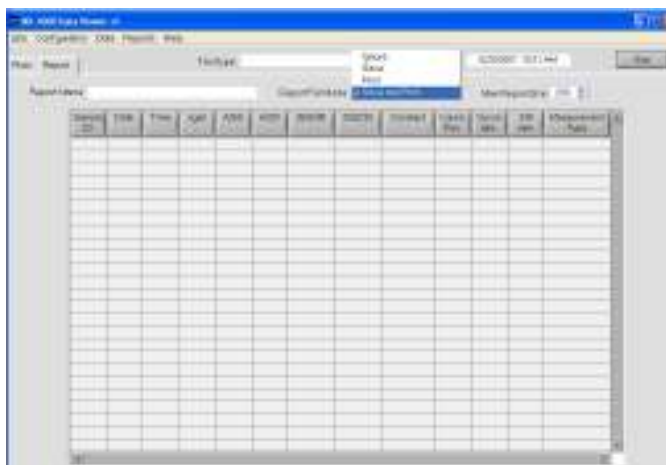
現在の画面を.JPG イメージで保存

File メニューから“Save Window”を選ぶことによって、現在の画面を.jpg ファイルとして保存できます。

Start Report / Recording

複数の測定結果を Report テーブルに記録し指定したプリンタで印刷することができます。この機能を使うためにはまず Start Report ボタンをクリックします。初期設定では Recording に設定されています。詳しくはセクション 15(Data Viewer)を参照して下さい。Note: この機能を無効にするには、Recording ボタンをクリックします。ボタンが Start Report に変わります。

Report に指定した最大数に達したときには 4 つのオプション“Ignore”、“Save”、“Print”、“Save and Print”があります。



全てのデータは c:\NanoDrop Data (User Preferences で設定していれば設定したフォルダの中にも)のファイルの中に保存されます。

Note: この機能は初期設定では“Recording”に設定されています。詳しくはセクション 3 の“User Preferences”を参照して下さい。

Print Report (F5)

Print Report(F5)ボタンをクリックすると記録されている Sample Report を OS で指定されているプリンタで印刷します。これにより Sample Report の内容は消去されます。記録数は変更できます。詳しくはセクション 15 の(Data Viewer)を参照して下さい。全てのデータは c:\NanoDrop Data と User Preferences で選択していれば設定したフォルダにも保存されます。

Note:システムは Dymo LabelWriter 400 の#30256 [2-5/16' X 4'] shipping labels で最適に印刷されるよう設定されていますが、PC に接続された任意のプリンタで印刷可能です。

Show Report (F7)

Show Report ボタンをクリックすると何時でも、現在の Sample Report を表示することができます。この機能はセクション 15 で記述されている Data Viewer ソフトを有効にします。各測定モードの設定値はサンプル ID 毎に保存されます。

Sample ID

SampleID で測定サンプルに名前をつけます。ソフトを立ち上げたときには SampleID のカーソルがフラッシュしバーコード対応となっています。レポートプリントやアーカイブデータファイルでの測定値を区別するために“Sample ID”を入力します。Sample ID の入力はキーボードを使います。装置が次の測定を待っているときはテキストカーソルが点滅しています。

Sample #

“Sample #”インディケータは Sample Report を有効にした時にアクティブになります。これは、測定した最後のサンプルのサンプル番号を示し、サンプルレポートが一杯になるまで測定毎に増えていきます。保存可能な最大数は report page で設定できます。

Exit

すべての測定モードとオプションを閉じます。Exit ボタンをクリックしてから 10 秒間は、Exit をキャンセルできます。10 秒間にキャンセルしなければ、Exit を実行します。Note: 全ての測定データは、自動的にアーカイブファイルに保存されるのでユーザーは何もする必要はありません。

Escape Key (ESC)

ESC キーで全てのスクリーンを閉じることができます。ESC キーを 2 回押すと測定モードを終了できます。

Show Context Help (Ctrl+H)

Context Help は、メインメニュー、全ての機能モード、測定モードで利用できます。ヘルプ機能は、Help メニューから“Show Context Help”を選ぶか、“Ctrl+H”を選択することで利用できます。選択するとカーソルの置かれた画面の説明を自動的に表示します。Context Help は、ユーザーが選択を解除するまで有効です。

User's Manual

メインメニューと全ての測定モードの Help メニューから PDF ファイルの取扱説明書を見ることができます。各測定モードの Help メニューから選択するか *スタート → プログラム → NanoDrop → ND-1000 (version)* からも見ることができます。

5. Nucleic Acids (核酸測定モード)

NanoDrop 1000 分光光度計では核酸サンプルの濃度と純度をチェックできます。核酸サンプルを測定するには、“Nucleic Acid”測定モードを選択します。

必要サンプル量

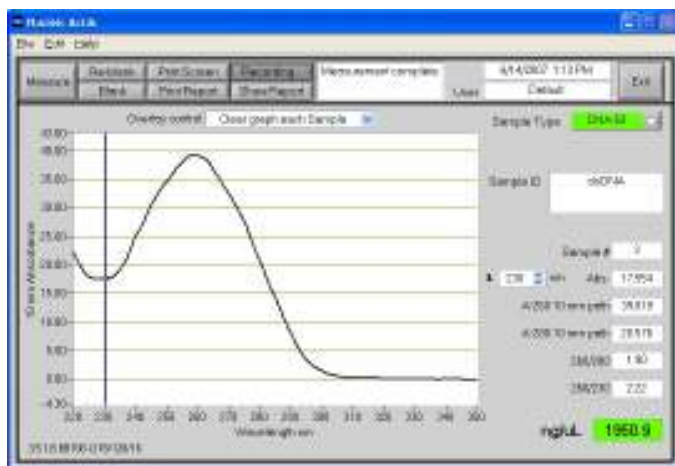
核酸溶液サンプルでは、1 μ L で正確な再現性の良い結果を得ることができます。しかしサンプルの内容やピペットの正確性が良く分からない時には、サンプルによって液柱が作られ光路が完全にカバーされることを保証するために、1.5-2 μ L のサンプル量をお勧めします。

測定濃度範囲

NanoDrop 1000 分光光度計は、3700ng/ul までの核酸サンプルを希釈なしに正確に測定します。このために、装置は、吸光度を計算するのに自動的に 0.2mm の光路長を利用して高濃度を検出します。

推奨測定下限 (ng/ul)	推奨測定上限 (ng/ul)	繰り返し測定の精度 (最低 5 回繰り返し) (SD= ng/ul; CV= %)
2	3700 (dsDNA) 3000 (RNA) 2400 (ssDNA)	sample range 2-100 ng/ul: ± 2 ng/ul sample range >100 ng/ul: $\pm 2\%$

測定画面の機能



Sample Type: 測定する核酸のタイプ(カラーキー)を選択するのに用います。2本鎖 DNA では“DNA-50”、RNA は“RNA-40”、一本鎖 DNA では“ssDNA-33”、その他の核酸では“Other”を選びます。初期設定は DNA-50 です。“Other”を選んだ場合には、定数を 15-150 の間で選択できます。核酸モードの三種類のサンプルタイプで Other を使用するときの定数は、入力し直すまで継続されます。詳しくは補足の“濃度計算(Beerの法則)”を参照して下さい。

λ and Abs: ユーザーが選択した波長とその吸光度です。波長はカーソルを動かして合わせるか波長ボックスの左の上下矢印で合わせます。Note: ユーザーが選択した波長と吸光度はどんな計算にも用いられません。

A260 10 mm path: サンプルの 260nm の吸光度を 10mm の光路長で測った値に換算して表示します。Note: これは、1mm 光路長での実際の測定値の 10 倍で、0.2mm 光路長での実際の測定値の 50 倍です。

A280 10 mm path: サンプルの 280nm の吸光度を 10mm の光路長で測った値に換算して表示します。Note: これは、1mm 光路長での実際の測定値の 10 倍で、0.2mm 光路長での実際の測定値の 50 倍です。

260/280: 260nm と 280nm でのサンプル吸光度の比です。260nm と 280nm の吸光度の比は、DNA と RNA の純度を評価するのに用いられます。比の値が DNA で ~ 1.8 、RNA で ~ 2.0 なら“純度が高い”と見なされます。どちらの場合も比が低い時には、280nm 近くでの吸収を示すタンパク、フェノールや他のコンタミの存在を示しています。この比に影響するファクターについての詳細は、トラブルシューティングの“260/280 Ratio”を参照して下さい。

260/230: 260nm と 230nm でのサンプル吸光度の比です。これは、核酸純度の二次的判断基準です。純度の高い核酸では、260/230 の値は 260/280 の値よりもしばしば高くなります。その値は通常 1.8-2.2 の範囲です。比がかなり低ければ共存のコンタミがあることを示しています。

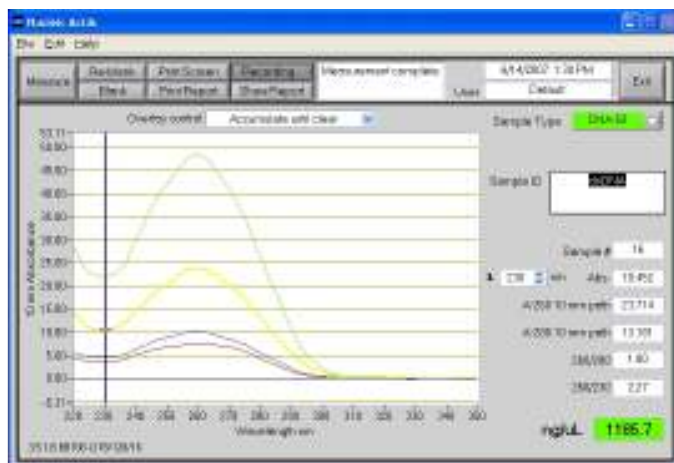
ng/ul: 260nm の吸光度と選択した定数を基にし、ng/ul で表示したサンプル濃度です。詳しくは補足の“濃度計算(Beer の法則)”を参照して下さい。

Spectrum Normalization (スペクトルのノーマライズ)

ベースラインは、吸光度がほとんどゼロである 340nm でのサンプルの吸光度の値に自動的にセットします。全てのスペクトルは、340nm の値をゼロとしてノーマライズしています。

Spectrum Overlay Control (スペクトルの上書き)

ユーザーは、この機能を使って同じ画面に一つ以上のスペクトルを表示できます。現在のサンプルプロットは太く表示され、以前のプロットは異なった色で表示されます。以下の例を見て下さい。



初期設定では、測定ごとに表示をクリアするようにセットされています。Overlay Control では、各サンプルプロット後にクリア(初期設定)、新しいレポート後にクリア、クリアを指示するまで重ね合わせる、の中から選択できます。“Clear now”では、現在及び以前の全てのプロットをクリアします。Overlay 機能が働いている時は、ソフトウェアが 260nm での最高の吸光度のサンプルに基づいて Y 軸をオートスケールします。Note: Overlay 機能が働いている時には、ブランクを行っても、画面に表示されているスペクトルは消えません。

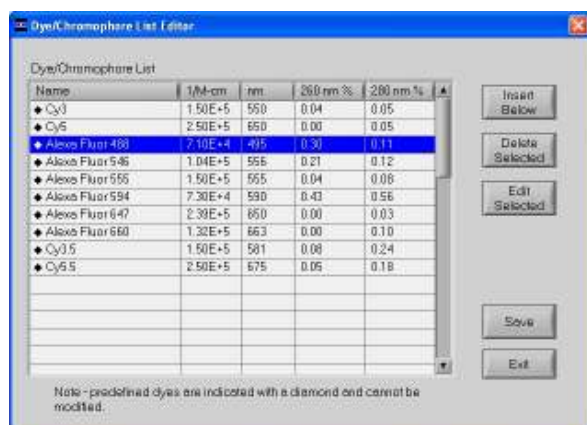
6. MicroArray (マイクロアレイ測定モード)

マイクロアレイでの遺伝子発現用の蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブを前もって選択できると、欠陥のあるサンプルを除き、研究の効率を上げることができます。ナンドロップソフトは、DNA 濃度と色素ラベルの効率測定を簡単に行うことができます。NanoDrop 分光光度計は、蛍光色素の吸光度を測定しますが、マイクロリッター当たり 0.2 ピコモルの低い色素濃度を検出できません。

蛍光色素の選択

現在マイクロアレイ測定モードでは 9 種類の登録済みの蛍光色素を使用することができます。(下図を参照)登録されていない蛍光色素はメインメニューの Dye/Chromophore Editor で登録することができます。色素は Dye1 と Dye2 のボックスをクリックして選択します。各吸光波長、吸光係数と 260nm% と 280nm% の補正値は自動的に測定と濃度の算出に使用されます。ソフトウェアの標準設定では Dye1 が Cy3、Dye2 が Cy5 になっています。メニューから選択できる蛍光色素に加えて、None を選択することもできます。None を選択するとその色素に対する計算が無効になります。

Note: 色素の製造元を参照して正しい値を入力して下さい。



必要サンプル量

蛍光色素標識核酸溶液サンプルでは、1 μ L で正確な再現性の良い結果を得ることができます。しかしサンプルの内容やピペットの正確性が良く分からない時には、サンプルによって液柱が作られ光路が完全にカバーされることを保証するために、1.5-2 μ L のサンプル量をお勧めします。

測定濃度範囲

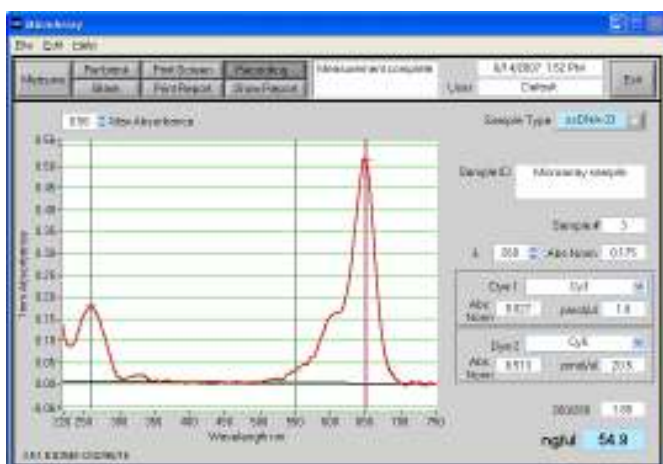
NanoDrop 分光光度計は蛍光色素を 100pmol/ul(Cy3)、核酸濃度を 750ng/ul(DNA)まで希釈なしに正確に測定可能です。測定濃度の範囲と典型的な再現性を下の表に示します。

サンプルタイプ	推奨測定下限 (pmol/ul)	推奨測定上限 (pmol/ul)	繰り返し測定の精度(最低 5 回繰り返し) (SD= pmol/ul; CV= %)
Cy3, Cy3.5, Alexa Fluor 555 and Alexa Fluor 660	0.20	100	sample range 0.20-4.0 pmol/ul: \pm 0.20 pmol/ul sample range >4.0 pmol/ul: \pm 2%
Cy5, Cy5.5 and Alexa Fluor 647	0.12	60	sample range 0.12-2.4 pmol/ul: \pm 0.12 pmol/ul sample range >2.4 pmol/ul: \pm 2%
Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594	0.40	215	sample range 0.40-8.0 pmol/ul: \pm 0.40 pmol/ul sample range >8.0 pmol/ul: \pm 2%
Alexa Fluor 546	0.30	145	sample range 0.30-6.0 pmol/ul: \pm 0.30 pmol/ul sample range >6.0 pmol/ul: \pm 2%

ベースラインの計算とノーマライズ

ソフトウェアは全ての測定に関してスペクトルの表示を 750nm でノーマライズして、色素の計算は 400 から 750 の間で自動的にベースラインを計算します。測定画面上の緑色の垂直線は Dye1 のピーク波長の位置を表し、赤色の垂直線は Dye2 のピーク波長の位置を表します。

測定画面の機能



Max Absorbance: 縦軸の上限を変更する時に用います。

Sample Type: 測定する核酸のタイプ(カラーキー)を選択するのに用います。2本鎖DNAでは“DNA-50”、RNAは“RNA-40”、一本鎖DNAでは“ssDNA-33”、その他の核酸では“Other”を選びます。初期設定はDNA-33です。“Other”を選んだ場合には、定数を15-150の間で選択できます。マイクロアレイモードの三種類のサンプルタイプでOtherを使用するときの定数は、入力し直すまで継続されます。詳しくは補足の“濃度計算(Beerの法則)”を参照して下さい。

λ and Abs Norm: ユーザーが選んだ波長(黒カーソル)と1mm光路長の吸光度です。波長は、黒カーソルを動かすか波長ボックスの左隣りの上下矢印で選択します。Note: ユーザーが選択した波長と吸光度はどんな計算にも用いられません。

Dye 1 (or 2): ユーザーが選択した色素です。

Abs. Norm: 選択した色素の1mm光路長でノーマライズした吸光度です。

pmol/ul: 選択した色素の吸光係数に基づいた濃度です。詳しくは補足の“濃度計算(Beerの法則)”を参照して下さい。

ng/ul: サンプルの核酸濃度は260nm-340nmの吸光度(340nmでノーマライズ)と核酸の定数で計算されます。詳しくは補足の“濃度計算(Beerの法則)”を参照して下さい。

260/280: 260nmと280nmでのサンプル吸光度の比です。260と280nmの吸光度の比は、DNAとRNAの純度を評価するのに用いられます。DNAで比が~1.8、RNAで~2.0なら“純度が高い”と見なされます。どちらの場合も比が低い時には、280nm近くでの吸収を示すタンパク、フェノールや他のコンタミの存在を示しています。この比に影響するファクターに関する詳細は、トラブルシューティングの“260/280 Ratio”を参照して下さい。

7. UV-VIS (UV-Vis 測定モード)

このモードでは普通の分光光度計のように機能します。サンプルの吸光度は 220nm から 750nm まで表示され、カーソルで各ピークの測定値を表示できます。

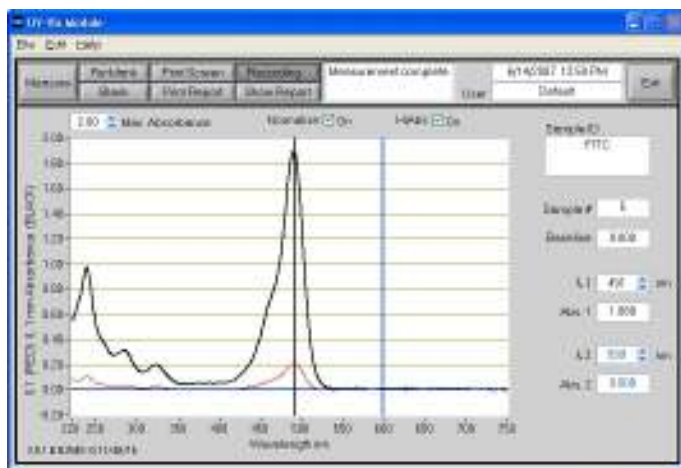
必要サンプル量

ほとんどの水溶液サンプルでは、1 μ L で正確な再現性の良い結果を得ることができます。しかしサンプルの内容やピペットの正確性が良く分からない時には、サンプルによって液柱が作られ光路が完全にカバーされることを保証するために、1.5-2 μ L のサンプル量をお勧めします。

測定濃度範囲

全ての NanoDrop 1000 分光光度計は、10mm 光路長の 15A 相当の吸光度を測定します。500 以降のシリアル番号かレトロフィットされた NanoDrop 1000 分光光度計は、10mm 光路長の 75A 相当まで測定できる短い光路長(0.2mm)を使用できます。

測定画面の機能



λ 1/Abs1 and λ 2/Abs2: ユーザーが選択可能な波長と 1mm 光路長での吸光度の値です。波長はカーソルをドラッグするか、上下矢印を使い選択するか、希望の波長を入力することで設定できます。

Baseline: ユーザーが選択可能なベースライン水平カーソルの吸光度です。このカーソルを新しい位置にドラッグすることで新しいベースラインを設定できます。ベースラインの吸光度がスペクトルの吸光度から引かれます。

Max Absorbance: 縦軸の上限を変更する時に用います。

Hi Abs: 高吸光度のサンプル(10mm 光路長で 75A 相当まで)も直接測定できます(500 以降のシリアル番号かレトロフィットされた ND-1000)。この機能は、“HiSpec”ボタンを選択することで働きます。これを選択すると、吸光度は、短光路長(0.2mm)で測定されて、上図に示されるように 0.1mm 長でノーマライズされた赤線がプロットされます。サンプルデータは “C:\NanoDrop Data\User name\ HiAbs ”に保存されます。このデータは Data Viewer に読み込むことはできませんが Excel で開くことができます。この機能は User Preferences モードで標準のオプションとして設定することができます。

Normalize: ノーマライズ機能はこのモードでのみマニュアルでオンオフすることができます。これを選択すると、ソフトは、自動的に、400-750nm の範囲で最低の吸光度に基づいて、ノーマライズします。この機能は User Preferences モードで標準のオプションとして設定することができます。

8. Protein A280 (タンパク A280 モード)

タンパクは、核酸とは異なって、かなりの多様性を示します。A280 法は、280nm での吸光度を示す精製されたタンパクに適用できます。これは、スタンダード曲線も必要なく、タンパクサンプルの定量もできます。このモードは、UV 曲線を表示し、280nm での吸光度(A280)を測定し、濃度(mg/ml)を計算します。核酸モードと同様に、高濃度のタンパクの場合は、自動的に 0.2mm の光路長に切り替えられます。核酸モードと同様に、A280 モードは、10mm 光路長相当のデータを表示しデータファイルに記録します。

必要サンプル量

タンパクには、疎水性のものと親水性のものがおり、測定するサンプルで種々の表面張力を生じるものがあります。また、ブラッドフォード試薬のように、試薬中に界面活性剤や洗剤が存在するものは表面張力を減少させ、結果として測定の為の液柱の形成を困難にします。このような場合、サンプル量を多くすることにより吸光度に影響を与えることなく、測定できるようになります。**タンパク測定には 2μL のサンプル量をお勧めします。**

測定部の特別なクリーニング

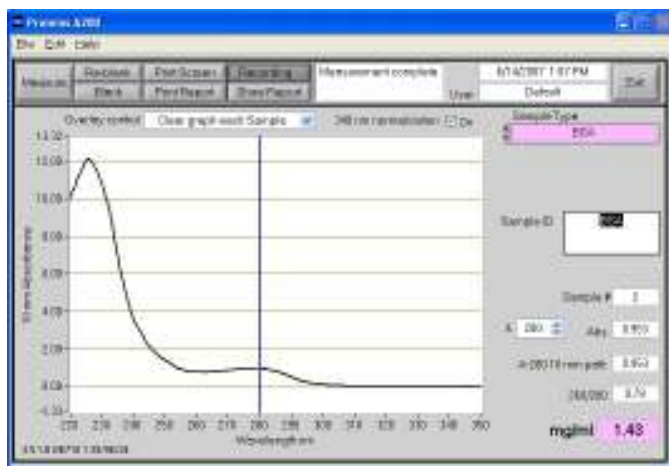
タンパクや界面活性剤を含む溶液は表面張力が低いため液柱が立たないことがあります。この場合には測定部を乾いたキムワイプなどで 30-40 回拭くことによって液柱が立つようになります。その他に NanoDrop Pedestal Reconditioning Compound (PR-1)を使用すると測定部表面の汚れ等により測定中に液柱が切れる場合に測定部の状態を早く回復できます。PR-1 についての詳細は website を確認して下さい。

測定濃度範囲

NanoDrop 1000 分光光度計は、希釈なしに 100mg/ml までのタンパクサンプル(BSA)を正確に測定します。このために装置は、自動的に高濃度を認識して、吸光度を計算するために 0.2mm の光路長を用います。測定濃度の範囲と典型的な再現性を下の表に示します。


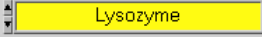
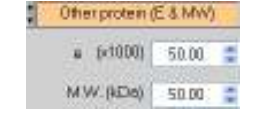
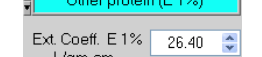
サンプルタイプ	推奨測定下限	推奨測定上限	繰り返し測定の精度 (最低 5 回繰り返し) (SD= mg/ml; CV= %)
精製 BSA	0.10 mg/ml	100 mg/ml	sample range 0.10-10 mg/ml: ± 0.10 mg/ml sample range >10mg/ml: ± 2%

測定画面の機能



Sample Type: 精製したタンパクの分析、濃度測定に用いられる 6 つのサンプルタイプが選択できます。全てのサンプルタイプは、SampleType ボックスをクリックすることで見ることができます。サンプルタイプ(カラーキー)は希望のオプションをクリックするかサンプルタイプボックスの左の上下矢印をスクロールすることで選択します。各サンプルタイプの説明を以下に示します。

	一般的レファランス 280nm で 1.00D(光路長が 10mm 即ち 1cm)の吸光度を示す 0.1%(1mg/ml)のタンパク溶液を仮定して濃度計算します。
	BSA レファランス 未知のタンパク(サンプル)濃度は 1%(10mg/ml)BSA 溶液の 280nm での吸光係数 6.7 を用いて計算されます。

	IgG レファランス 未知のタンパク(サンプル)濃度は、1%(10mg/ml)IgG 溶液の 280nm での吸光係数 13.7 を用いて計算されます
	リゾチームレファランス 未知のタンパク濃度は、1%(10mg/ml)のリゾチーム溶液の 280nm での吸光係数 26.4 を用いて計算されます。
	モル吸光係数($M^{-1} cm^{-1}$)とキロダルトンでの分子量を入力します。e の最大値は 999×1000 で M.W. の最大値は 9999×1000 です。
	タンパクの 10mg/ml(1%)溶液での吸光係数($L gm^{-1}cm^{-1}$)を入力します。

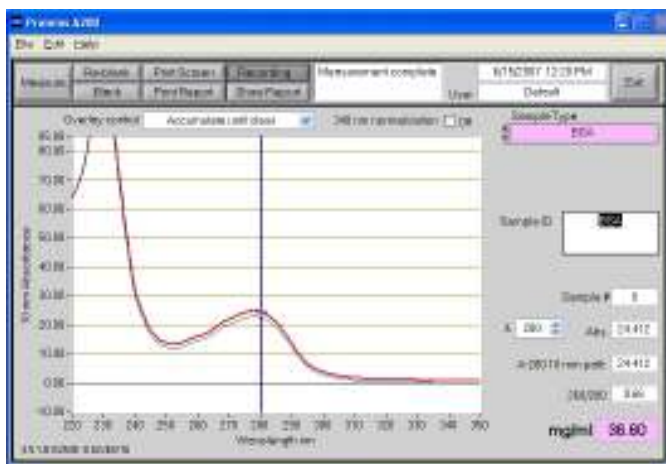
λ and Abs: ユーザーが選択可能な波長と吸光度の値です。波長はカーソルをドラッグするか、上下矢印を使い選択するか、希望の波長を入力することで設定できます。Note: ユーザーが選択した波長と吸光度はどんな計算にも用いられません。

A280 10-mm Path: 測定するタンパクサンプルの 280nm での 10mm 相当の吸光度です。

A260/280: 260nm と 280nm でのサンプル吸光度の比です。

Spectrum Normalization (スペクトルのノーマライズ)

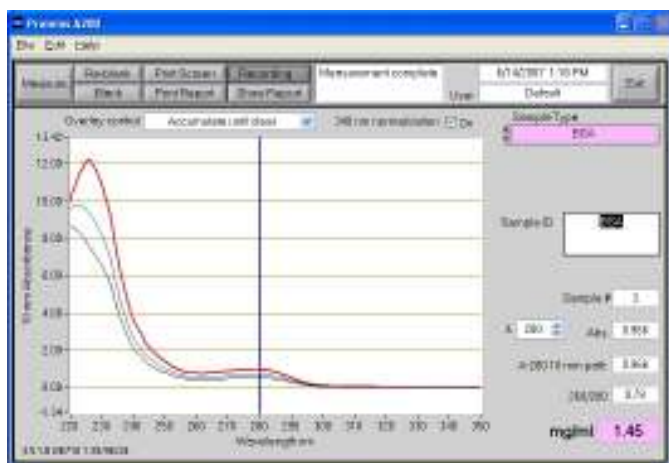
ベースラインは、吸光度がほとんどゼロである 340nm でのサンプルの吸光度の値に自動的にセットします。全てのスペクトルは、340nm の値をゼロとしてノーマライズしています。全てのデータはノーマライズされ同じフォーマットで保存されます。スペクトルのノーマライズを無効にすることもでき、そのときのスペクトルはベースラインからのオフセットになります。



Note: スペクトルのベースラインオフセットが大きい場合、計算されたタンパク濃度は実際の値より高くなる場合があります。サンプルによっては上図のように大きいベースラインオフセットを示すかもしれません。

Spectrum Overlay Control (スペクトルの上書き)

ユーザーは、この機能を使って同じ画面に一つ以上のスペクトルを表示できます。現在のサンプルプロットは太く表示され、以前のプロットは異なった色で表示されます。以下の例を見て下さい。



初期設定では、測定ごとに表示をクリアするようにセットされています。Overlay Control では、各サンプルプロット後にクリア(初期設定)、新しいレポート後にクリア、クリアを指示するまで重ね合わせる、の中から選択できます。“Clear now”では、現在及び以前の全てのプロットをクリアします。Overlay 機能が働いている時は、ソフトウェアが 260nm での最高の吸光度のサンプルに基づいて Y 軸をオートスケールします。Note: Overlay 機能が働いている時には、ブランクを行っても、画面に表示されているスペクトルは消えません。

9. Proteins & Labels (タンパクとラベルモード)

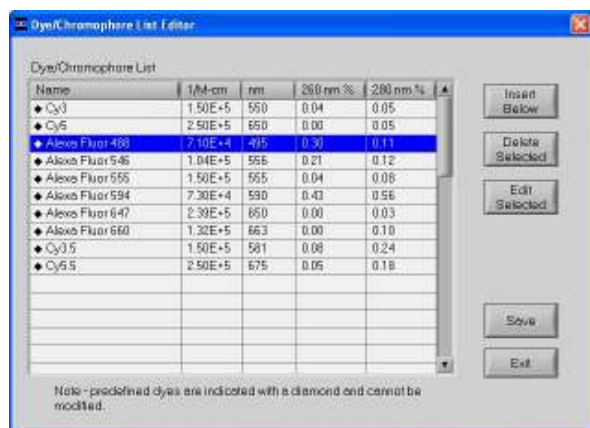
このモードは波長比を用いて、タンパク濃度の定量(A280)、蛍光色素濃度(タンパクアレイ結合体)の定量、金属タンパク(ヘモグロビンのような)の純度の測定に用いられます。

蛍光色素の選択

現在タンパクとラベルモードでは9種類の登録済みの蛍光色素を使用することができます。(下図を参照)登録されていない蛍光色素はメインメニューのDye/Chromophore Editorで登録することができます。

色素はDye1とDye2のボックスをクリックして選択します。各吸光波長、吸光係数と260nm%と280nm%の補正値は自動的に測定と濃度の算出に使用されます。ソフトウェアの標準設定ではDye1がCy3、Dye2がCy5になっています。メニューから選択できる蛍光色素に加えて、Noneを選択することもできます。Noneを選択するとその色素に対する計算が無効になります。

Note: 色素の製造元を参照して正しい値を入力して下さい。



必要サンプル量

タンパクには、疎水性のものと親水性のものとがあり、測定するサンプルで種々の表面張力を生じるものがあります。また、ブラッドフォード試薬のように、試薬中に界面活性剤や洗剤を有し、表面張力に影響を与えるものがあります。このような場合、サンプル量を多くすることにより吸光度に影響を与えることなく、測定できるようになります。**タンパク測定には2μLのサンプル量をお勧めします。**

測定部の特別なクリーニング

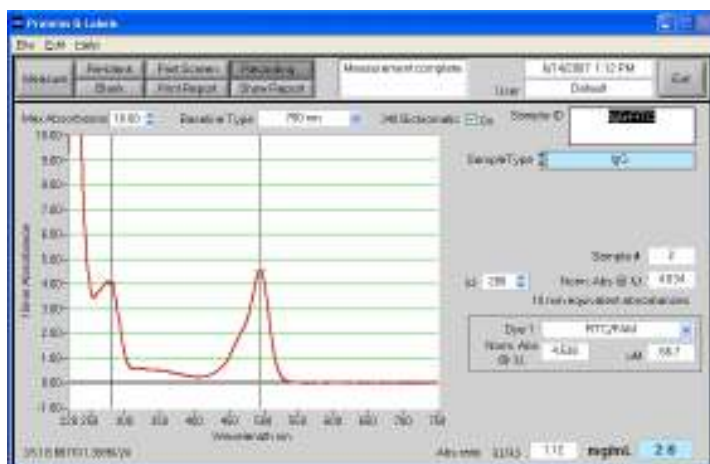
タンパクや界面活性剤を含む溶液は表面張力が低いため液柱が立たないことがあります。この場合には測定部を乾いたキムワイプなどで30-40回拭くことによって液柱が立つようになります。その他にNanoDrop Pedestal Reconditioning Compound (PR-1)を使用すると測定部表面の汚れ等により測定中に液柱が切れる場合に測定部の状態を早く回復できます。PR-1についての詳細はwebsiteを確認して下さい。

測定濃度範囲

NanoDrop 1000 分光光度計はタンパクサンプルを20mg/ml(BSA)まで希釈なしに正確に測定可能です。測定濃度の範囲と典型的な再現性を下の表に示します。

サンプルタイプ	推奨測定下限	推奨測定上限	繰り返し測定の精度 (最低5回繰り返し) (SD= mg/ml; CV= %)
精製 BSA	0.10 mg/ml	20 mg/ml	sample range 0.10-10 mg/ml: ± 0.10 mg/ml sample range >10mg/ml: ± 2%
Cy3	0.2uM	100uM	sample range 0.20-4.0 pmol/ul: ± 0.20 pmol/ul sample range >4.0 pmol/ul: ± 2%

測定画面の機能



Max Absorbance: 縦軸の上限を変更する時に用います。

Sample Type: タンパク A280(セクション 8)でも使用可能な 6 つの同じサンプルタイプを精製したタンパクの分析、濃度測定に用いることができます。サンプルタイプは、SampleType ボックスをクリックすることで見ることができます。サンプルタイプ(カラーキー)は希望のオプションをクリックするかサンプルタイプボックスの左の上下矢印をスクロールすることで選択します。各サンプルタイプの説明は、タンパク A280(セクション 8)を参照して下さい。

λ3: ユーザーが選択した波長です。

Norm Abs @ λ3: ユーザーが選んだ波長(黒カーソル)の 10mm 光路長相当の吸光度です。

Dye 1 (or 2): ユーザーが選択した色素です。

Norm Abs @ λ1: 選択した色素のノーマライズした 10mm 光路長相当の吸光度です。

uM: 選択した色素の吸光係数に基づいた濃度です。詳しくは補足の“濃度計算(Beerの法則)”を参照して下さい。

Abs ratio λ1/λ3: 色素 1 の吸光度とユーザーが選択した波長(λ3)の吸光度との比です。

mg/ml: 280nm から 340nm を引いた吸光度を用いて計算したタンパクサンプルの濃度(340nm でノーマライズした場合)です。詳しくは補足の“濃度計算(Beerの法則)”を参照して下さい。

ベースラインの種類

このモードには、ユーザーが選択できる 2 つの“ベースラインタイプ”オプションがあります。初期設定は 750nm でスペクトルをノーマライズしてあります。二つ目の方法としては、400-750 の傾いたベースラインを 750nm でノーマライズして、400 と 750nm の間のベースラインを直線化します。

340nm の吸光度で 280nm の吸光度の bichromatic ノーマライズするかどうかを選択できます。

10. Protein BCA(タンパク BCA 法モード)

BCA(Bicinchoninic Acid)タンパクアッセイは、タンパク濃度を決定する方法の一つです。より希釈されたタンパク溶液やかなり高いUV(280nm)吸収をするものが存在する場合に良く用いられます。タンパクの A280 法とは異なって、BCA アッセイ法は、未知のタンパクを測定する毎にスタンダード曲線を作成する必要があります。タンパクが存在する結果として生じる Cu-BCA キレートは、最大波長の 562nm で測定され、750nm でノーマライズされます。アッセイで使用される前もって処方された BCA と CuSO₄ 試薬は、数多くのメーカーからキットとして販売されています。そのメーカーの推奨法に従って、試薬を混ぜてアッセイを行います。

必要サンプル量

タンパクには、疎水性のものと親水性のものとがあり、測定するサンプルで種々の表面張力を生じるものがあります。また、ブラッドフォード試薬のように、試薬中に界面活性剤や洗剤を有し、表面張力に影響を与えるものがあります。このような場合、サンプル量を多くすることにより吸光度に影響を与えることなく、測定できるようになります。**タンパク測定には 2μL のサンプル量をお勧めします。**

測定部の特別なクリーニング

タンパクや界面活性剤を含む溶液は表面張力が低いいため液柱が立たないことがあります。この場合には測定部を乾いたキムワイプなどで 30-40 回拭くことによって液柱が立つようになります。その他に NanoDrop Pedestal Reconditioning Compound (PR-1)を使用すると測定部表面の汚れ等により測定中に液柱が切れる場合に測定部の状態を早く回復できます。PR-1 についての詳細は website を確認して下さい。

測定濃度範囲

20:1 のサンプル量希釈試薬を使用するときは、NanoDrop 1000 分光光度計で、BCA アッセイの検出濃度範囲は、~0.20mg/ml から 8.0mg/ml までです。1:1 のサンプル量希釈試薬を使用するときは検出濃度範囲は 0.01–0.20mg/ml です。

Assay Type	推奨測定下限	推奨測定上限	繰り返し測定の精度 (最低 5 回繰り返し) (SD= mg/ml; CV= %)
Regular BCA	0.2 mg/ml	8.0 mg/ml	± 2% (over entire range)
Mini BCA	0.01 mg/ml	0.20 mg/ml	± 0.01 mg/ml (over entire range)

BCA キット、プロトコール、サンプル調整

市販の BCA タンパクキットメーカーは、普通二つの異なったタンパク濃度範囲での方法を示します。

- **通常の方法—試薬/サンプル容量比 20:1 を用いる方法** 正確にスタンダードを用意するために、BCA 試薬 80μL に 4μL のサンプルを加えることをお勧めします。(サンプル量は多いほど望ましい。)
- **ミニアッセイ—試薬/サンプル容量比 1:1 を用いる方法** 容量は最低 10μL のサンプルと 10μL の BCA 試薬をお勧めします。どちらも同じピペットを使用すれば、ピペット間で生じる誤差をなくします。
Note: 60°C でアッセイする場合には、容量を 2 倍にすれば、シールしたチューブ内での蒸発や濃縮による間違った結果を防げます。

キット試薬に加えて、スタンダード曲線を作るのに用いるスタンダードの BSA も BCA 法と共に供給されます。薦められているインキュベーション時間と温度を含めて、アッセイプロトコールに従います。さらに、スタンダード(BSA)を用いて注目の分析範囲(mg/ml)での希釈を用います。Note: NanoDrop は、高濃度の測定ができるので、メーカーが準備している濃度よりも濃い濃度のスタンダードを準備する必要があるかもしれません。

測定画面の機能

View Standard Curve (F8): このボタンを選択すると、何時でもスタンダード曲線を見ることができます。

Sample Type: レファランス、スタンダード 1-7、サンプルを選択します。ソフトはレファランスを測定するように促し、サンプルを測定する前に少なくとも一つのスタンダードを測るように促します。

Replicate #: レファランスとスタンダード測定の間 replicate の回数です。

Reset all Standards (F11): 全てのスタンダードの全ての replicate をクリアします。

Reset 1 Standard (F12): 選択したスタンダードの全ての replicate をクリアします。

Absorbance at 562nm: 1mm 光路長で 562nm での Cu-BCA 錯体の吸光度です。

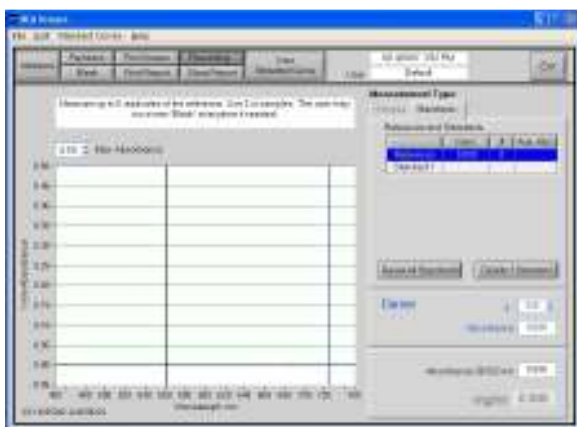
Cursor λ and Absorbance: ユーザーが選択することができるカーソルの波長とその吸光度です。Note: ユーザーが選択した波長と吸光度はどんな計算にも用いられません。

mg/ml: ml 当たりの mg で表したサンプル(未知)の濃度です。

BCA 測定の実行

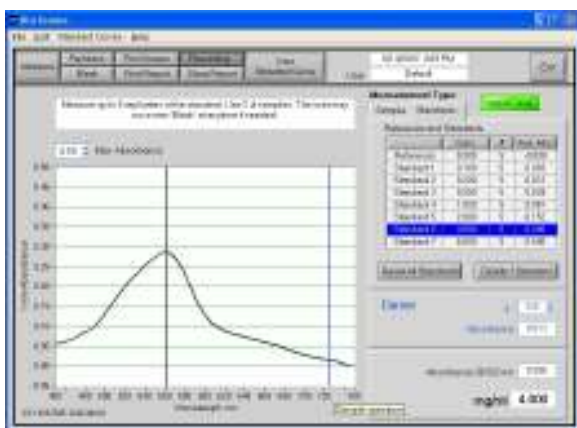
BCA 測定するごとにスタンダード曲線が必要です。スタンダード曲線はソフトウェアに記憶させることができますがキットメーカーのガイドライン通りに、BCA アッセイを行う度にスタンダード曲線を作ることをお勧めします。スタンダード曲線の“set-up”で再読み込みができます。この機能により前に保存したスタンダード曲線で使用した各スタンダードを再読み込みできます。単一かマルチポイントスタンダード曲線の作成法がソフトに含まれています。スタンダード曲線は、レファランス(BCA 試薬のみタンパクなし)と一つのスタンダードの一回測定で作ります。マルチポイントスタンダード曲線作成法は、7 つまでの異なったスタンダードでそれぞれ最大で 5 回の replicate が可能です。スタンダードを作成しないと測定はできません。

スタンダード曲線を作成する前にブランクを測定する必要があります。ブランクとして水を使用し 0 もしくはレファランスサンプルとしてタンパクを加えない色素試薬を使用する事をお勧めします。未知のタンパク濃度の測定には 3 つの手順があります。スタンダード曲線の作成を含めて、必要な手順を下に示します。



Step 1: レファランス (BCA 試薬のみタンパクなし)の測定

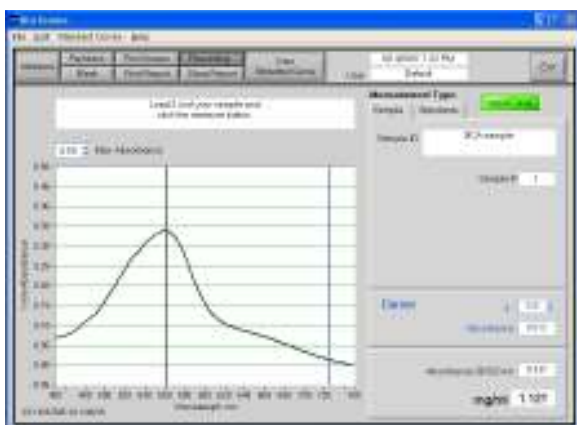
Note: ソフトは、画面の右の大きなテキストボックスで次のステップを指示します。



Step 2: スタンダードの測定

7 つのスタンダードでそれぞれ 5 replicate まで測定できます。

ソフトウェアは最低 1 つのスタンダードとレファランスか 2 つのスタンダードが測定されるまでサンプルの測定ができません。多項式カーブではより多くのスタンダードポイントが必要です。



Step 3: サンプルの測定

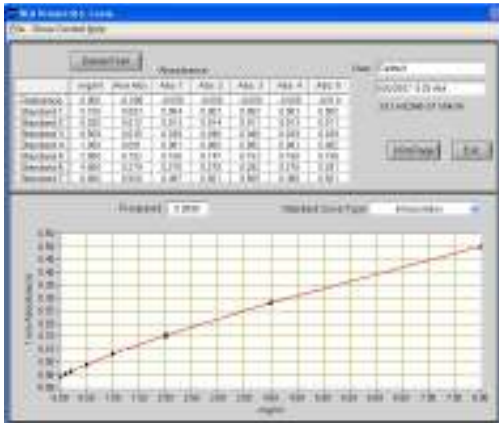
サンプル濃度は二つのスタンダードの間で引いた直線が多項式カーブを用いて計算されます。[Note: 濃度を得るためにサンプルは、スタンダード曲線の内に収まっていなければなりません。]

スタンダード曲線の機能

スタンダード曲線は、“Standard Curve”メニューから“Save as”か“Load Standard Curve”を選ぶことによって、レファランス用に保存、読込ができます。“View Standard Curve”ボタンを選択すればいつでもスタンダード曲線を見ることができます。ソフトウェア v3.5.1 から“Load Standard Curve Set-Up”でスタンダード曲線の濃度を再読み込みできます。

Delete Standard Points

The Delete Point では表から削除するデータポイントを最初に選び、“Delete Point”ボタンを選ぶことで削除することができます。そのスタンダードが間違っていたり、読み取れなかったりしたときは“Delete 1”を選択することによってそのスタンダードの全ての測定を削除できます。また“Reset all Standards”を使えば全てのスタンダードを削除できます。



Regular BCA Standard Curve:
0.2 – 8.0 mg/ml



mini-BCA Standard Curve:
0.01 – 0.20 mg/ml

BCA モードの終了

全ての未知サンプルの処理が終わるまで BCA モードを終了しないことをお勧めします。

11. Protein Lowry (タンパクローリー法モード)

変法ローリータンパクアッセイは、タンパク濃度を定めるため広く用いられていて、ローリータンパク定量法と言われている別法です。BCA アッセイ法やブラッドフォード法と同様に、変法ローリー法は、未知のタンパクを測定する毎にスタンダード曲線を作成する必要があります。変法ローリー法は、アルカリ溶液中のタンパクと硫酸銅との反応を含み、その結果として四角菌状の銅タンパク複合体を生成します。フォーリンチオカルトール試薬が効果的にキレート化銅複合体の比率を下げ、水溶性の青い物質を生成させます。これは、405nm でノーマライズされ、650nm で測定されます。アッセイで使用される前もって処方された試薬は、数多くのメーカーからキットとして販売されています。そのメーカーの推奨法に従って、試薬を混ぜてアッセイを行います。

必要サンプル量

タンパクには、疎水性のものと親水性のものとがあり、測定するサンプルで種々の表面張力を生じるものがあります。また、ブラッドフォード試薬のように、試薬中に界面活性剤や洗剤を有し、表面張力に影響を与えるものがあります。このような場合、サンプル量を多くすることにより吸光度に影響を与えることなく、測定できるようになります。**タンパク測定には 2 μ L のサンプル量をお勧めします。**

測定部の特別なクリーニング

タンパクや界面活性剤を含む溶液は表面張力が低いため液柱が立たないことがあります。この場合には測定部を乾いたキムワイプなどで 30-40 回拭くことによって液柱が立つようになります。その他に NanoDrop Pedestal Reconditioning Compound (PR-1)を使用すると測定部表面の汚れ等により測定中に液柱が切れる場合に測定部の状態を早く回復できます。PR-1 についての詳細は website を確認して下さい。

測定濃度範囲

NanoDrop 1000 分光光度計で、変法ローリーアッセイの検出濃度範囲は、~0.20mg/ml から 8.0mg/ml です。

Assay Type	推奨測定下限	推奨測定上限	繰り返し測定の精度 (最低 5 回繰り返し) (CV= %)
Modified Lowry	0.2 mg/ml	4.0 mg/ml	$\pm 2\%$ (over entire range)

変法ローリーキット、プロトコール、サンプル調整

市販の変法ローリータンパクキットメーカーは、典型的な方法の概要を示します。

変法ローリー法 - 試薬 / サンプル容量比 5:1 を用いる方法

- 正確にスタンダードを用意するために、最少 20 μ L のサンプル溶液に 100 μ L の変法ローリー試薬を加えることをお勧めします。どちらも同じピペットを使用すれば、ピペット間で生じる誤差をなくします。
- 最初に 10 分間室温でインキュベートした後に、10 μ L のフォーリンチオカルトール試薬を加え、30 分間室温でインキュベートします。

キット試薬に加えて、スタンダード曲線を作るのに用いるスタンダードの BSA も変法ローリー法と共に供給されます。薦められているインキュベーション時間と温度を含めて、アッセイプロトコールに従います。さらに、スタンダード(BSA)を用いて注目の分析範囲(mg/ml)での希釈を用います。Note: NanoDrop 1000 分光光度計は、高濃度の測定ができるので、メーカーが準備している濃度よりも濃い濃度のスタンダードの準備が必要な場合があります。

測定画面の機能

View Standard Curve (F8): このボタンを選択すると、何時でもスタンダード曲線を見られます。

Sample Type: レファランス、スタンダード 1-7、サンプルを選択します。ソフトはレファランスを測定するように促し、サンプルを測定する前に少なくとも一つのスタンダードを測るように促します。

Replicate #: レファランスとスタンダード測定の間 replicate の回数です。

Reset all Standards (F11): 全てのスタンダードの全ての replicate をクリアします。

Reset 1 Standard (F12): 選択したスタンダードの全ての replicate をクリアします。

Absorbance at 650 nm: 1mm 光路長の 650nm での Cu-錯体の吸光度です。

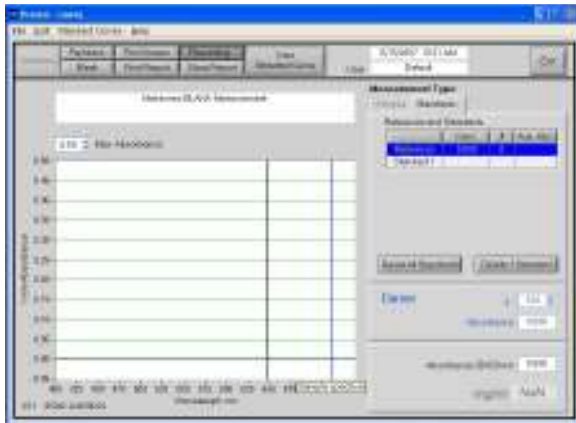
Cursor λ and Absorbance: ユーザーが選択することができるカーソルの波長とその吸光度です。Note: ユーザーが選択した波長と吸光度はどんな計算にも用いられません。

mg/ml: ml 当たりの mg で表したサンプル(未知)の濃度です。

ローリー法測定の実行

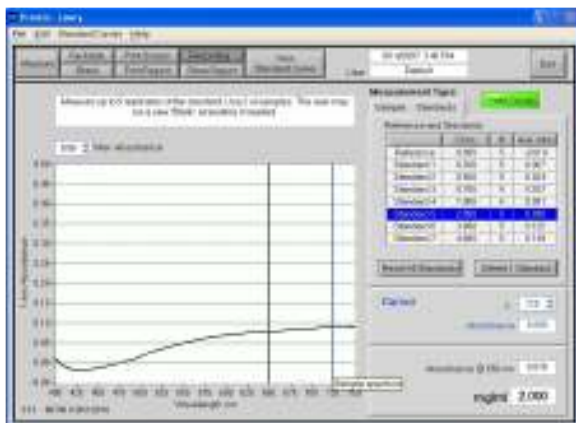
ローリー法測定することにスタンダード曲線が必要です。スタンダード曲線はソフトウェアに記憶させることができますがキットメーカーのガイドライン通りに、アッセイを行う度にスタンダード曲線を作ることをお勧めします。スタンダード曲線の“set-up”で再読み込みができます。この機能により前に保存したスタンダード曲線で使用した各スタンダードを再読み込みできます。単一かマルチポイントスタンダード曲線の作成法がソフトに含まれています。スタンダード曲線は、レファランス(ローリー試薬のみタンパクなし)と一つのスタンダードの一回測定で作ります。マルチポイントスタンダード曲線作成法は、7つまでの異なったスタンダードでそれぞれ最大で5回のreplicateが可能です。スタンダードを作成しないと測定はできません。

スタンダード曲線を作成する前にブランクを測定する必要があります。ブランクとして水を使用し0もしくはレファランスサンプルとしてタンパクを加えない色素試薬を使用する事をお勧めします。未知のタンパク濃度の測定には3つの手順があります。スタンダード曲線の作成を含めて、必要な手順を下に示します。



Step 1: レファランスの測定(ローリー試薬-ゼロ標準)

Note: ソフトは、画面の右の大きなテキストボックスで次のステップを指示します。



Step 2: スタンダードの測定

7つのスタンダードでそれぞれ5replicateまで測定できます。

ソフトウェアは最低1つのスタンダードとレファランスか2つのスタンダードが測定されるまでサンプルの測定ができません。多項式カーブではより多くのスタンダードポイントが必要です。



Step 3: サンプルの測定

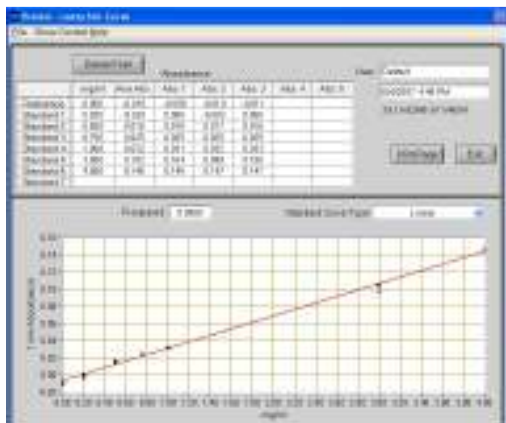
サンプル濃度は二つのスタンダードの間で引いた直線か多項式カーブを用いて計算されます。[Note:濃度を得るためにサンプルは、スタンダード曲線の内に収まっていなければなりません。]

スタンダード曲線の機能

スタンダード曲線は、“Standard Curve”メニューから“Save as”か“Load Standard Curve”を選ぶことによって、レファランス用に保存、読み込めます。“View Standard Curve”ボタンを選択すればいつでもスタンダード曲線を見ることができます。ソフトウェア v3.5.1 から“Load Standard Curve Set-Up”でスタンダード曲線の濃度を再読み込みできます。

Delete Standard Points

The Delete Point では表から削除するデータポイントを最初に選び、“Delete Point”ボタンを選ぶことで削除することができます。そのスタンダードが間違っていたり、読み取れなかったりしたときは“Delete 1”を選択することによってそのスタンダードの全ての測定を削除できます。また“Reset all Standards”を使えば全てのスタンダードを削除できます。



Modified Lowry
Standard Curve:
0.2 – 4.0 mg/ml

ローリー法モードの終了

全ての未知サンプルの処理が終わるまでローリーモードを終了させないことをお勧めします。

12. Protein Bradford (タンパクブラッドフォード法モード)

ブラッドフォードアッセイは、タンパク濃度を決めるために 2 番目によく用いられる方法で、より希釈されたタンパクで検出感度が低いか UV 吸収(280nm)がかなり高いものが混じっている場合に良く用いられています。BCA 法やローリー法のように、ブラッドフォード法はアッセイ毎に測定する前にスタンダード曲線を作ることが必要です。

ブラッドフォードは、タンパク濃度の測定として、タンパクによって生じるクマシーブルー色素の吸光度の 595nm へのシフトを用います。制限されたタンパク色素合成物は 595nm で測定され、750nm でノーマライズされます。キットのクマシーブルー、アルコール、界面活性剤の混ざった安定化した一種類の試薬が多くのメーカーから手に入ります。アッセイ全体でメーカーの薦める条件とタイミングを守って下さい。

必要サンプル量

タンパクには、疎水性のものと親水性のものがあり、測定するサンプルで種々の表面張力を生じるものがあります。また、ブラッドフォード試薬のように、試薬中に界面活性剤や洗剤を有し、表面張力に影響を与えるものがあります。このような場合、サンプル量を多くすることにより吸光度に影響を与えることなく、測定できるようになります。**タンパク測定には 2 μ L のサンプル量をお勧めします。**

測定部の特別なクリーニング

タンパクや界面活性剤を含む溶液は表面張力が低いため液柱が立たないことがあります。この場合には測定部を乾いたキムワイプなどで 30-40 回拭くことによって液柱が立つようになります。その他に NanoDrop Pedestal Reconditioning Compound (PR-1)を使用すると測定部表面の汚れ等により測定中に液柱が切れる場合に測定部の状態を早く回復できます。PR-1 についての詳細は website を確認して下さい。

測定濃度範囲

通常のブラッドフォードアッセイを用いるナノドロップの NanoDrop 1000 分光光度計では、未知タンパク濃度は、100ug/ml から数千 ug/ml まで測定できます。直線に良くフィットする領域は、100-1000ug/ml です。ミニブラッドフォードアッセイは、約 15-125ug/ml の範囲をカバーします。

クマシー色素に基づいたタンパクアッセイでは、クマシー色素-色素とクマシー色素-タンパクの凝集物が生じることが良くあります。時間と共に粒子が観察されるようになり、吸光度の読みのふらつきの原因となります。装置の光路長が 1.0mm、ブラッドフォード試薬(クマシー色素)の濃度、酸性 pH の結果として 595nm での総分析物(タンパク-色素)のシグナルが \sim 0.150A に制限されることも重要です。スタンダードとサンプル(未知)を 3 回繰り返して測定することは、特にブラッドフォードアッセイで得られるシグナルが限られている時には、有効です。

Assay Type	推奨測定下限	推奨測定上限	繰り返し測定の精度 (最低 5 回繰り返し) (SD= ug/ml; CV= %)
Regular Bradford	100 ug/ml	8000 ug/ml	sample range 100-500 ug/ml: \pm 25 ug/ml sample range 500-8000 ug/ml: \pm 5%
Mini Bradford	15 ug/ml	100 ug/ml	sample range 15-50 ug/ml: \pm 4 ug/ml sample range 50-125 ug/ml: \pm 5%

ブラッドフォードキット、プロトコール、サンプル調整

市販のブラッドフォードタンパクキットのメーカーは、二つの異なった濃度範囲での方法を示しています。

- **通常のアッセイ法**—試薬/サンプル容量比 50:1 を用いる。正確なスタンダードを準備するのに、ブラッドフォード試薬 200 μ L に最少で 4 μ L のサンプル量を用いることをお勧めします。(より多いサンプル量が望ましい。)
- **ミニアッセイ法**—試薬/サンプル容量比 1:1 を用いる。十分量の 1:1 混合試薬を準備するために、PCR チューブで 10 μ L のサンプルと 10 μ L のブラッドフォード試薬を混ぜることをお勧めします。どちらも同じピペットを使用すれば、ピペット間で生じる誤差をなくします。

キット試薬と一緒に、スタンダード曲線を作成するためのタンパクスタンダード(例えば BSA)もメーカーから供給されています。メーカーのプロトコールに従い測定対象範囲(ug/mL)をカバーするスタンダードを希釈します。Note: Nanodrop 1000 分光光度計は、より高い濃度のタンパク濃度を測定できますので、メーカーが供給するものよりも高い濃度のスタンダードタンパクを用意する必要があるかもしれません。

測定画面の機能

View Standard Curve (F8): このボタンを押せば、何時でもスタンダード曲線を見ることができます。

Sample Type: レファランス、スタンダード 1-7、サンプルを選択します。ソフトはレファランスを測定し、次にサンプルを測定する前に少なくとも 1 個のスタンダードを測定するように指示します。

Replicate #: レファランスとスタンダード測定のための replicate の回数です。

Reset all Standards (F11): 全てのスタンダードの全ての replicate をクリアします。

Reset 1 Standard (F12): 選択したスタンダードの replicate をクリアします。

Absorbance at 595 nm: 1mm 光路長の 595nm でのタンパク-色素複合体の吸光度です。

Cursor λ and Absorbance: ユーザーが選択することができるカーソルの波長とその吸光度です。Note: ユーザーが選択した波長と吸光度はどんな計算にも用いられません。

ug/ml: サンプル(未知)の ug/ml で表した濃度です。

ブラッドフォードでのタンパク測定

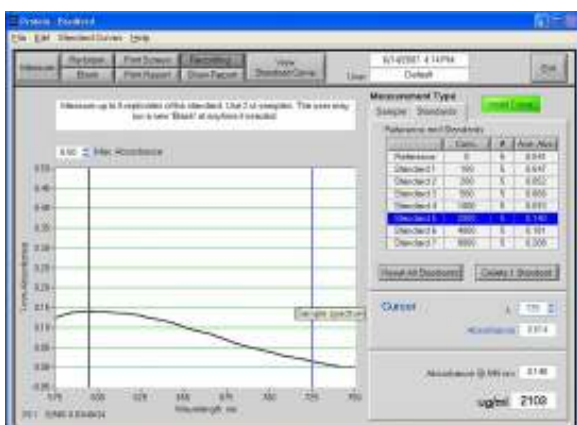
ブラッドフォード測定するごとにスタンダード曲線が必要です。スタンダード曲線はソフトウェアに記憶させることができますがキットメーカーのガイドライン通りに、アッセイを行う度にスタンダード曲線を作ることをお勧めします。スタンダード曲線の“set-up”で再読み込みができます。この機能により前に保存したスタンダード曲線で使用した各スタンダードを再読み込みできます。単一かマルチポイントスタンダード曲線の作成法がソフトに含まれています。スタンダード曲線は、レファランス(ブラッドフォード試薬のみ-タンパクなし)と一つのスタンダードの一回測定で作ります。マルチポイントスタンダード曲線作成法は、7つまでの異なるスタンダードでそれぞれ最大で5回の replicate が可能です。スタンダードを作成しないと測定はできません。

スタンダード曲線を作成する前にブランクを測定する必要があります。ブランクとして水を使用し0もしくはレファランスサンプルとしてタンパクを加えない色素試薬を使用する事をお勧めします。未知のタンパク濃度の測定には3つの手順があります。スタンダード曲線の作成を含めて、必要な手順を下に示します。



Step 1: レファランス測定(ブラッドフォード試薬-ゼロ標準)

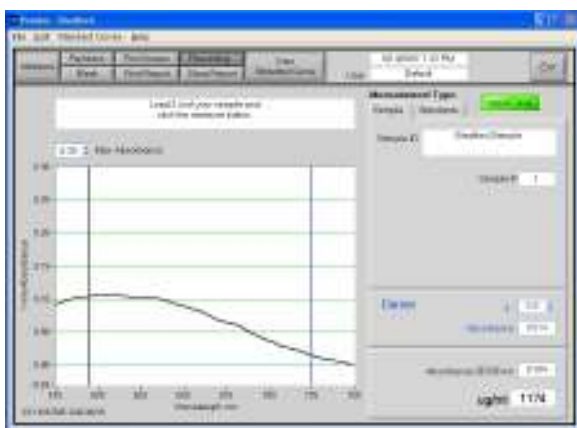
Note: ソフトは、画面の右の大きなテキストボックスで次のステップを指示します。



Step 2: スタンダードの測定

7つのスタンダードでそれぞれ5replicateまで測定できます。

ソフトウェアは最低1つのスタンダードとレファランスか2つのスタンダードが測定されるまでサンプルの測定ができません。多項式カーブではより多くのスタンダードポイントが必要です。



Step 3: サンプルの測定

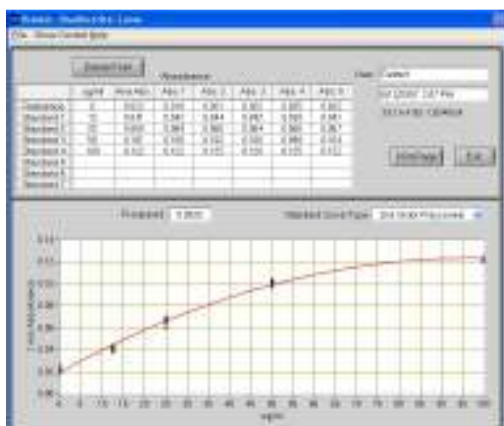
サンプル濃度は二つのスタンダードの間で引いた直線か多項式カーブを用いて計算されます。
 [Note:濃度を得るためにサンプルは、スタンダード曲線の内に収まっていなければなりません。]

スタンダード曲線の機能

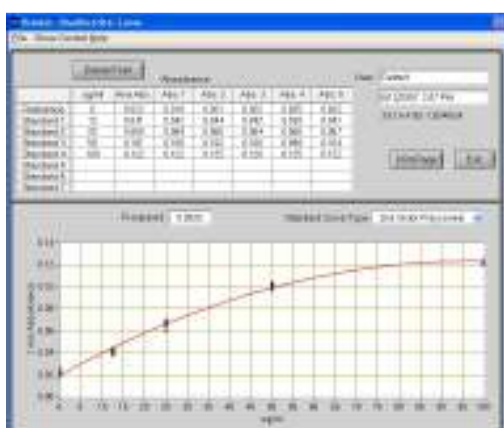
スタンダード曲線は、“Standard Curve”メニューから“Save as”か“Load Standard Curve”を選ぶことによって、レファランス用に保存、読込ができます。“View Standard Curve”ボタンを選択すればいつでもスタンダード曲線を見ることができます。ソフトウェア v3.5.1 から“Load Standard Curve Set-Up”でスタンダード曲線の濃度を再読み込みできます。

Delete Standard Points

The Delete Point では表から削除するデータポイントを最初に選び、“Delete Point”ボタンを選ぶことで削除することができます。そのスタンダードが間違っていたり、読み取れなかったりしたときは“Delete 1”を選択することによってそのスタンダードの全ての測定を削除できます。また“Reset all Standards”を使えば全てのスタンダードを削除できます。



Regular Bradford curve covers 200-8000 ug/ml. Note the linear range is 100-1000 ug/ml



A mini-Bradford assay covers an approximate range of 15-100 ug/ml.

ブラッドフォードモードの終了

全ての未知サンプルの処理が終わるまでブラッドフォードモードを終了しないことをお勧めします。

13. Protein Pierce 660 nm

Thermo Scientific Pierce 660nm タンパクアッセイ試薬は溶液中の微量タンパクの急速、正確で再現性のある比色検出の為に提供されている方法です。試薬は還元剤と界面活性剤の両方を含んでいるサンプルの総タンパク濃度を測定するのに理想的です。

ダイナミックレンジ

15:1 のサンプル量希釈試薬を使用する時は 50-2000ug/ml の BSA において直線性があります。アッセイの感度は 25-1000ug/ml において 7.5:1 のサンプル量希釈試薬を使用することで増加させることができます。

Assay Type	推奨測定下限	推奨測定上限	繰り返し測定の精度 (最低 5 回繰り返し) (SD= ug/ml; CV= %)
15:1	50 ug/ml	2000 ug/ml	± 5% (over entire range)
7.5:1	25 ug/ml	1000 ug/ml	± 5% (over entire range)

- 通常の方法—試薬／サンプル容量比 15:1 を用いる方法 正確にスタンダードを用意するために、60µL の Pierce 660 nm 試薬に 4µL のサンプルを加えることをお勧めします。(サンプル量が多いほど望ましい。)
- ミニアッセイ—試薬／サンプル容量比 7.5:1 を用いる方法 十分な量を用意する為に PCR チューブの中に 6µL のサンプルと 45µL の Pierce 660 nm 試薬を用いることをお勧めします。

薦められているインキュベーション時間と温度を含めて、アッセイプロトコールに従います。さらに、スタンダード(BSA)を用いて注目の分析範囲(mg/ml)での希釈を用います。

Note:NanoDrop 1000 分光光度計は、高濃度の測定ができるので、メーカーが準備している濃度よりも濃い濃度のスタンダードの準備が必要な場合があります。

測定画面の機能

View Standard Curve (F8): このボタンを選択すると、何時でもスタンダード曲線を見られます。

Sample Type: レファランス、スタンダード 1-7、サンプルを選択します。ソフトはレファランスを測定するように促し、サンプルを測定する前に少なくとも一つのスタンダードを測るように促します。

Replicate #: レファランスとスタンダード測定の間 replicate の回数です。

Reset all Standards (F11): 全てのスタンダードの全ての replicate をクリアします。

Reset 1 Standard (F12): 選択したスタンダードの全ての replicate をクリアします。

Absorbance at 660 nm: 1mm 光路長の 660nm でのタンパク-試薬複合体の吸光度です。

Cursor λ and Absorbance: ユーザーが選択することができるカーソルの波長とその吸光度です。Note: ユーザーが選択した波長と吸光度はどんな計算にも用いられません。

ug/ml: ml 当たりの µg で表したサンプル(未知)の濃度です。

Pierce 660 nm 法測定の実行

Pierce 660 nm 法測定するごとにスタンダード曲線が必要です。スタンダード曲線はソフトウェアに記憶させることができますがキットメーカーのガイドライン通りに、アッセイを行う度にスタンダード曲線を作成することをお勧めします。スタンダード曲線の“set-up”で再読み込みができます。この機能により前に保存したスタンダード曲線を使用した各スタンダードを再読み込みできます。単一かマルチポイントスタンダード曲線の作成法がソフトに含まれています。スタンダード曲線は、レファランス(試薬のみ—タンパクなし)と一つのスタンダードの一回測定で作ります。マルチポイントスタンダード曲線作成法は、7 つまでの異なったスタンダードでそれぞれ最大で 5 回の replicate が可能です。スタンダードを作成しないと測定はできません。

スタンダード曲線を作成する前にブランクを測定する必要があります。ブランクもしくは 0 レファランスサンプルとしてタンパクを加えない色素試薬を使用する事をお勧めします。

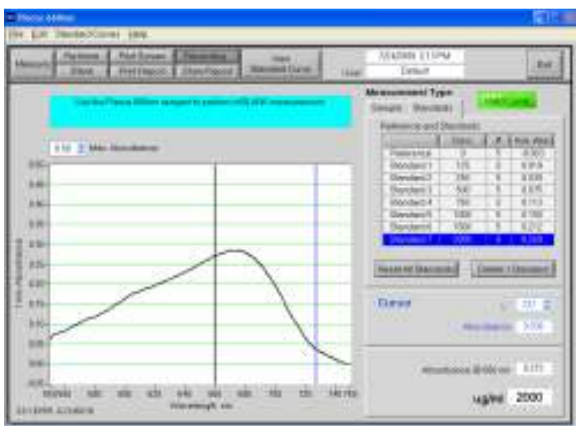
Note- これは水をブランクとして使用することを推奨している NanoDrop 1000 の他の比色分析と異なります。

未知のタンパク濃度の測定には 3 つの手順があります。スタンダード曲線の作成を含めて、必要な手順を下に示します。



Step 1: レファランスの測定 (660nm 試薬-ゼロ標準)

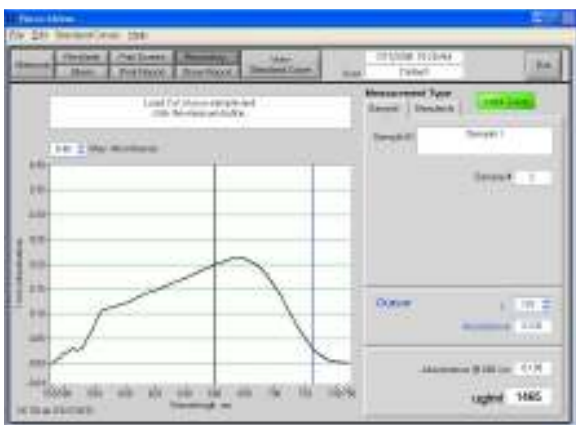
Note: ソフトは、画面の右の大きなテキストボックスで次のステップを指示します。



Step 2: スタンダードの測定

7つのスタンダードでそれぞれ 5 replicate まで測定できます。

ソフトウェアは最低 1 つのスタンダードとレファランスか 2 つのスタンダードが測定されるまでサンプルの測定ができません。多項式カーブではより多くのスタンダードポイントが必要です。



Step 3: サンプルの測定

サンプル濃度は二つのスタンダードの間で引いた直線か多項式カーブを用いて計算されます。[Note: 濃度を得るためにサンプルは、スタンダード曲線の内に収まっていなければなりません。]

スタンダード曲線の機能

スタンダード曲線は、“Standard Curve”メニューから“Save as”か“Load Standard Curve”を選ぶことによって、レファランス用に保存、読込ができます。“View Standard Curve”ボタンを選択すればいつでもスタンダード曲線を見ることができます。

Delete Standard Points

The Delete Point では表から削除するデータポイントを最初に選び、“Delete Point”ボタンを選ぶことで削除することができます。そのスタンダードが間違っていたり、読み取れなかったりしたときは“Delete 1”を選択することによってそのスタンダードの全ての測定を削除できます。また“Reset all Standards”を使えば全てのスタンダードを削除できます。



The 15:1 reagent to sample ratio assay covers 500-2000 ug/ml.

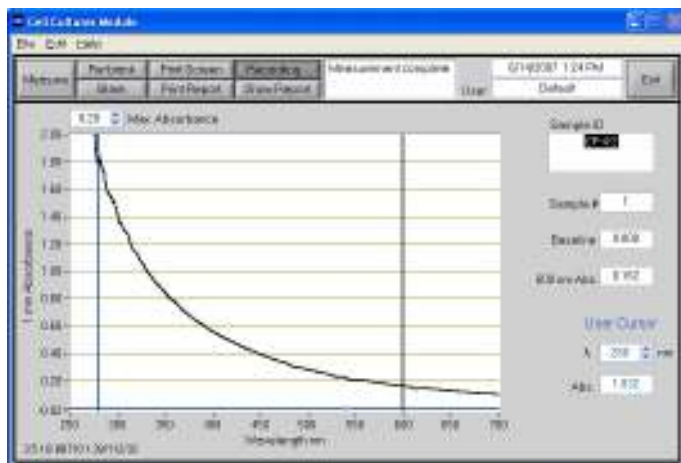
14. Cell Cultures (細胞培養モード)

吸光分光光度計を用いて、吸収の無い懸濁細胞による光散乱をモニターすることは、生命科学研究室で通常に行われていることです。これは、分光光度計での違いを際立たせます。

Note: NanoDrop 1000 とキューベットを使う装置の細胞培養での吸光度値の違いの大きな理由は光路長が短いことです。(1 mm と 1 cm) 読み取り値が必ずしも 10 倍でないのは懸濁液内の細胞と分光光度計の特性に左右されます。

このモードは、220nm から 700nm までの吸光を表示します。第 1 のカーソルは細胞懸濁液のモニターで一般的な波長(600nm) に固定されていて、2 番目のカーソルは任意の波長にセットできます。

測定画面の機能



600nm Absorbance: 600nm でのベースライン吸光度を差し引いた現在の吸光度を示します。Note: 1mm 光路長の吸光度が表示されます。

λ and Abs: ユーザーが選択した波長カーソルと吸光度の現在の値を示します。波長はカーソルをドラッグするか、上下矢印を使い選択するか、希望の波長を入力することで設定できます。

Baseline: 現在のベースラインの水平カーソルの吸光度です。新しいベースラインを引くために新しい垂直位置にこのカーソルをドラッグします。ベースラインの吸光度がスペクトルの吸光度より差し引かれます。

Max Absorbance: 縦軸の上限を変更する時に用います。

必要サンプル量

通常水溶液サンプルでは、1 μ L で正確な再現性の良い結果を得ることができます。しかしサンプルの内容やピペットの正確性が良く分からない時には、サンプルによって液柱が作られ光路が完全にカバーされることを保証するために、1.5-2 μ L のサンプル量をお勧めします。

細胞懸濁液の濃度

短い光路長を用いることで、NanoDrop 1000 分光光度計は、通常のキューベットタイプよりも 10 倍高い吸光度を測ることができます。このことで細胞懸濁液の濃度を直接モニターできるようになります。全体のスペクトルが表示されるので 600nm で非常に低い“吸光度”を示した希釈したサンプルを 280nm のような低い波長でモニターすることができます。

サンプルの均一性

吸光度測定のためのサンプリングの時には、細胞が均一に懸濁していることを確認すべきで、細胞の沈殿を避けるために直ぐに値を読まなければいけません。濃度を測定する時には十分に攪拌して下さい。

測定部のコンタミ除去について

コンタミ除去が必要な時には、生物学的な活性のあるものが測定部に存在しないことを確認するために、0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液(市販の漂白剤の 10 倍希釈)等が利用できます。ファイバーを固定している部分は 303 ステンレスを使用していますので研究室等でよく使われる一般的溶媒に対して耐性があります。(サンプル保持システム溶媒適合性を参照して下さい。)Note: 漂白剤や水をのせるのに噴出ボトルを使用しないで下さい。

15. データの保存と Data Viewer

全ての測定モードのサンプルデータは自動的にアーカイブファイルとして保存され、Data Viewer モードかエクセルのような表計算ソフトで開くことができます。

保存ファイルの作成

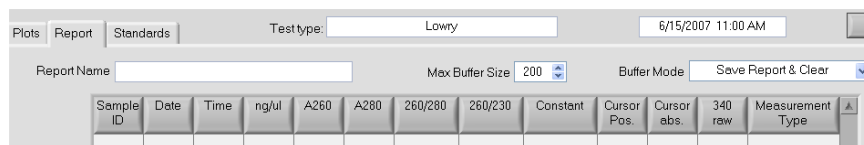
各測定モードをスタートする毎に、ログインしたユーザー用フォルダ内の測定モードのフォルダにファイルが作成されます。測定された各モードの全てのデータは日付ごとに一つのファイルとして保存されます。これらのファイルは、測定モード名と日付で保存されます。例えば、核酸モードの中の“Nucleic Acid 2007 06 04.ndj”と名付けられた保存ファイルは、2007年の6月4日に測定したことを意味します。独自の拡張子である.ndj ファイルは Data Viewer で自動的に開くことができます。(Data Viewer の項を参照して下さい。)

Name	Size	Type	Date Modified
Nucleic Acid 2007 06 13 v3.5.ndj	4 KB	NDJ File	6/13/2007 7:53 AM
Nucleic Acid 2007 06 04 v3.5.ndj	4 KB	NDJ File	6/4/2007 4:00 PM

データを編集したり、フォーマットを変更したりした場合はユーザーの選択した名前前で保存します。スペクトルは、以後の分析に必要なら波長データから再プロットできます。

Note1: 保存ファイルに示される吸光度データは、画面に表示されるものの一部分です。核酸とタンパク A280、プロテインとラベルモードでは、データは 1.0cm(10.0mm)光路長に換算しています。マイクロアレイ、UV-Vis、BCA タンパク、ブラッドフォード、ローリーと細胞培養モードでは、データは 1.0mm(0.1cm)光路長です。Hi-Abs UV-Vis サンプルでは、データは 0.1mm 光路長で換算してあります。

Note 2: 全てのモードのデータには“Measurement”という列が作成され、測定ごとに“Measure”、“Blank”、“Reblank”のいずれかが表示されます。“Measure”と表示された行はその前のブランクをもとに測定されたもの、“Blank”と表示された行はブランクの実行を、“Reblank”と表示された行は一つ前の測定を再ブランクによって計算し直された結果を示します。

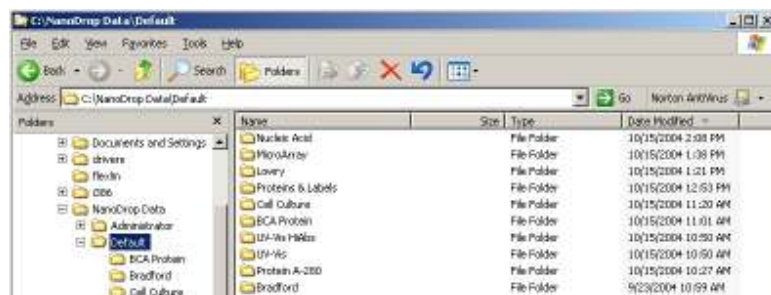


保存データの階層

保存ファイルの階層は以下の通りです。

C:\NanoDrop Data → User name → Application Module (BCA Protein, Lowry, Bradford, Cell Culture, MicroArray, Nucleic Acid, Protein A-280, Proteins & Labels, UV-Vis or UV-Vis HiAbs)

全ての保存データファイルは、以下のようにユーザーフォルダの中のアプリケーションモードフォルダに保存されます。



任意の場所への保存

既定の保存場所の他に、任意の場所にデータを保存することができます。メインメニューの User Preferences の Archiving タブの“Duplicate data storage box”を On に設定し、“Duplicate data Folder”に任意の保存先フォルダを設定します。User Preferences モードを終了する前に Save Preference ボタンをクリックすることで設定を保存します。

全てのデータは測定を完了する毎に保存ファイルに記録されます。ソフトウェアや PC が不正に終了しても保存ファイルに影響はありません。

Data Viewer

Data Viewer は多様なデータレポートソフトウェアで、ユーザーはレポートの構成をカスタマイズし、保存してあるデータを再読み込み、再プロットできます。Data Viewer を使えばデータを最も適切に再描画できます。この機能は測定中では各測定モードの Show Report 機能から使用することができます。またメインメニューからも使用できます。Data Viewer モードを使用するときは PC に NanoDrop 1000 本体を接続する必要はありません。

Data Viewer の特徴

Data Viewer は2画面または3画面あり、タブ形式で Plots、Reports、Standard Curves で構成されています。ユーザーはタブを選択することで各画面に移動出来ます。

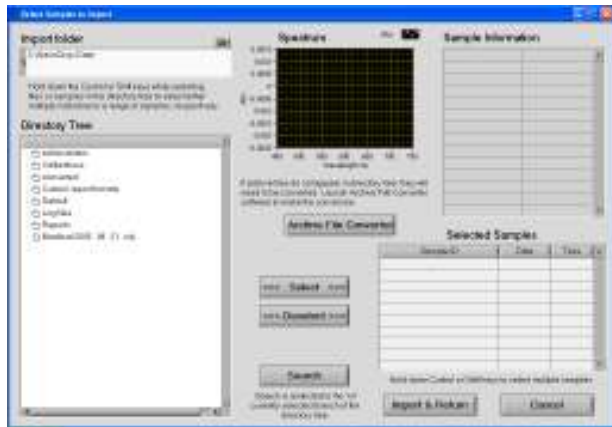
ソフトウェアはメインメニューからか Show Report からか、どちらからアクセスするかに関係なく Report ページを開きます。Note: Show Report から Data Viewer にアクセスする場合は Start Report ではなく Recording を選択して下さい。

ツールバーの機能 (3 画面共通)

- **File:** この機能には Page set-up、Print Window、Save Window があります。
- **Configuration:** この機能には Auto Scale、Include graph in printout、Include standards in printout があります。
- **Data:** この機能には import data、rename samples、delete sample data があります。Note: 異なる測定モードのサンプルをインポートする場合は全てのサンプルを削除した後、Data Viewer を終了し、再度起動します。
- **Reports:** レポートに含まれる機能を選択します。詳しくは Report Page を参照して下さい。
- **Help/Context Help:** メインメニュー、全ての機能モード、測定モードで有効です。ヘルプ機能は Help メニューから Show Context Help を選択するか Ctrl+H を選択します。有効にすると、マウスを画面の項目上に合わせると自動的に説明が表示されます。これはキャンセルするまで有効です。

Import

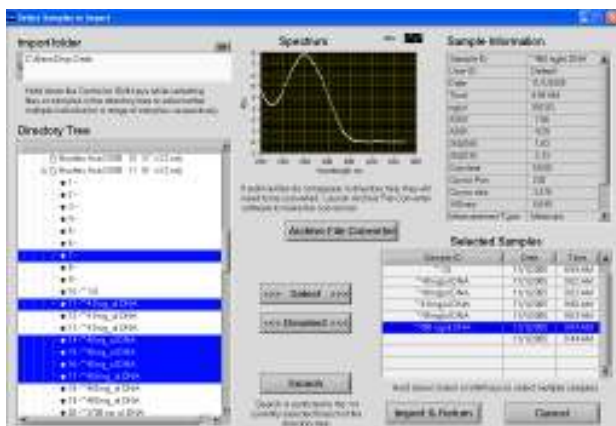
サンプルをインポートするには Data Viewer モードで Data メニューから Import Samples を選択します。下図のような Import Folder box と Directory Tree のある新しい画面が表示されます。



機能:

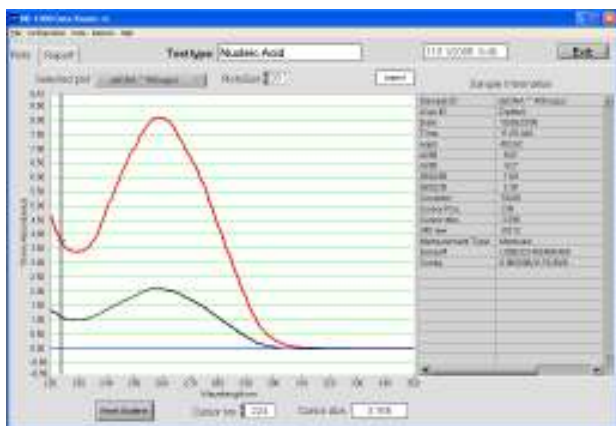
- **Import folder:** インポートするデータの含まれているフォルダを選択します。フォルダの選択はユーザーフォルダか又はそれ以上の階層を選択し、測定モードやメソッドフォルダを選択する必要はありません。
- **Directory tree:** インポートするデータを選択します。各ファイル名の左のマークをクリックすると内容を表示します。インポートするファイルかファイル全体を選択します。選択するファイルは全て同じ測定モードのファイルでなくてはなりません。Note: Hi Abs data は Data Viewer にインポートすることはできませんがエクセル等で開くことができます。
- **Archive File Converter:** v3.2 以前のソフトウェアで保存されたデータや c:\nanodrop data に保存されていないデータはコピーし .ndj 形式のファイルに変換する必要があります。詳しくは Archive File Converter の項を参照して下さい。Note: オリジナルの保存ファイルはこの作業をしても変更されません。
- **>>> or <<<:** 選択しているサンプルを Selected Samples box に移動するのに用います。Note: 初期設定では 200 サンプルまでです。
- **Search:** サンプル ID から特定のデータを検索するのに用います。

- **Sample Information and Spectrum:** 最後に選択したサンプルのデータが表示されます。
- **Import and Return:** 選択したサンプルのデータを Reports windows に表示するのに用います。Note: Shift キーや Control キーを使うことによって複数のサンプルを選択したり、選択を解除したりすることができます。下図を参照して下さい。



Plots

Plots ページは選択したサンプルスペクトルを表示します。

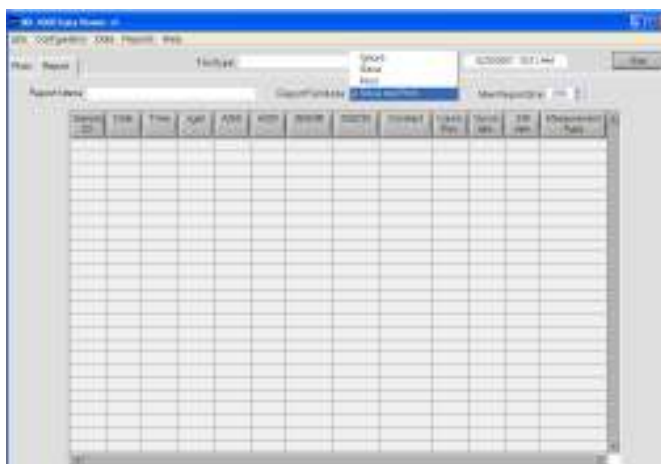


機能:

- **Test Type:** 自動的に測定モードが表示されます。
- **Date:** 自動的にレポートを作成した日時が表示されます。
- **Selected Plot:** サンプルデータを選択する方法は 2 種類あります。グラフの上にカーソルを動かし直接選択するか Selected Plot メニューから選択 (legend も同時に表示されます。) します。選択したサンプルのグラフが一番上に表示されます。
- **Plots/Sets:** 一画面に表示することのできるスペクトルの最大数を選択します。(最大 20 まで) Report 画面では多くのサンプルデータを表示できますが Graph 画面では 20 スペクトルまでです。それ以上は新しいページに表示されます。各ページの表示数が Set の数になります。
- **Legend:** カーソルを legend ボックスに合わせると sample name と画面に表示されている色の組み合わせが表示されます。表示する色は選択できません。
- **Sample information:** 選択したサンプルのデータが表示されます。表示されるデータは選択したデータの測定モードに適した項目が表示されます。Note: データはサンプルを測定したときのデータが表示され Data Viewer の画面上でカーソル位置を変えても変更されません。
- **Movable x and y axis:** 全ての測定モードのデータで利用できます。もしグラフが画面に収まっていなければ表示上限を入力することによって軸を再表示します。画面下部に表示されてくるカーソル吸光度は移動可能な縦軸の位置を表します。X 軸は Y のピーク値とベースラインによって決められます。Reset Baseline は X 軸を 0 に戻します。

Reports

Reports ページでは選択したサンプルのデータが表形式で表示されます。表示する項目は測定モードごとに変更し保存できます。



Reports ページのオプションはツールバーから利用できます。

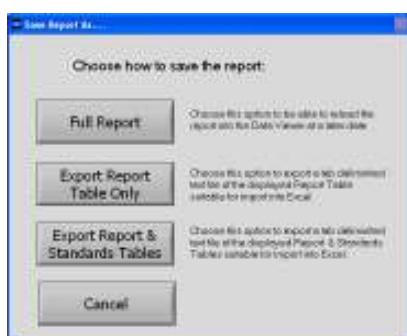
Configure Report を選択すると下図の画面が現れます。



OK を選択すると Reports ページに戻り、選択した項目が表示されます。

機能:

- **Sort:** データの種類(例えば date や sample name)ごとに昇順、降順に並び替えることができます。
- **Save Report Format:** 現在の Report の表示項目のフォーマットを.ndf 形式で保存します。保存した Report フォーマットを標準のフォーマットにするにはメインメニューで、Users Preferences を選択し Reports をクリックします。Default Report から各モードに保存されたリストの中からフォーマットを選択します。
- **Load Report Format:** サンプルをインポートする前でも、した後でも保存してあるフォーマットを呼び出すことができます。
- **Print report:** 初期設定では Report ページのみ印刷します。ツールバーの Configuration から standards と plots を印刷するかどうかを選択できます。
- **Save Report and Load Report:** この機能には下図に示すような幾つかのオプションがあります。



Full Report を用いると後でデータを Data Viewer の report に呼び出すことができます。保存した report はプルダウンメニューの Load Report から開くことができます。Load Report 機能を使った場合、Report ページには既定の項目が表示されます。Note: メインメニューの User Preferences モードから項目を変更できます。Reports は.ndy 形式で保存されます。

他の二つはエクセルのような表計算ソフトで開くための保存オプションです。Reports を開くには C:\NanoDrop Data\Reports フォルダからファイルを右クリックして開きます。

Report page のその他の機能:

- **Test Type:** 自動的に測定モードが表示されます。
- **Date and time:** 自動的にレポートを作成した日時が表示されます。
- **Report Name:** Report の名前を入力します。
- **Report Full Mode:** レポートを管理するオプションです。Ignore、Save、Print、Save and Print が選択できます。レポートが設定した Max Report Size に達したときに選択したオプションを実行します。
- **Max Report Size:** 初期設定は 200 です。Note: Report Full Mode で Ignore を選択しているときはこの機能は無効です。

Standards Page

スタンダード画面は各サンプルの測定時に使用された実際の reference と standard が表示されます。Note: この画面はスタンダード曲線を使用する測定モードでのみ表示されます。

Sample ID	Curve Type	Ref conc	Ref Abs	Std 1 conc	Std 1 Abs	Std 2 conc	Std 2 Abs	Std 3 conc	Std 3 Abs	Std 4 conc
Reference	Interp	0.00	0.029	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
Standard 1	Interp	0.00	0.029	100.00	0.047	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
Standard 2	Interp	0.00	0.029	100.00	0.047	1000.00	0.099	NaN	NaN	NaN
Standard 3	Interp	0.00	0.029	100.00	0.047	1000.00	0.108	2000.00	0.073	NaN

Archive File Converter

c:\Nanodrop Data folder に保存されている以前のソフトウェアバージョンの保存ファイルはソフトウェアを初めて使用したときに.ndj ファイルに自動的にコピーし変換されます。以前のソフトウェアバージョンで c:\NanoDrop Data に保存されていないファイルは Data Viewer で使用する前に手動でファイルを変換する必要があります。File Converter は Import Data page からアクセスでき、一度に一つのファイルかファイルフォルダごとに変換できます。Note: オリジナルの保存ファイルはこの作業をしても変更されません。



表計算ソフトで保存データを開く

保存ファイルはタブ区切りされておりエクセルやその他の表計算ソフトで開くことができます。エクセルで開きデータを変更した場合は新しい名前でも保存して下さい。.ndj ファイルのデータが変更されると Data Viewer モードでデータが認識できなかったり、インポートできなくなったりします。

16. Calibration Check

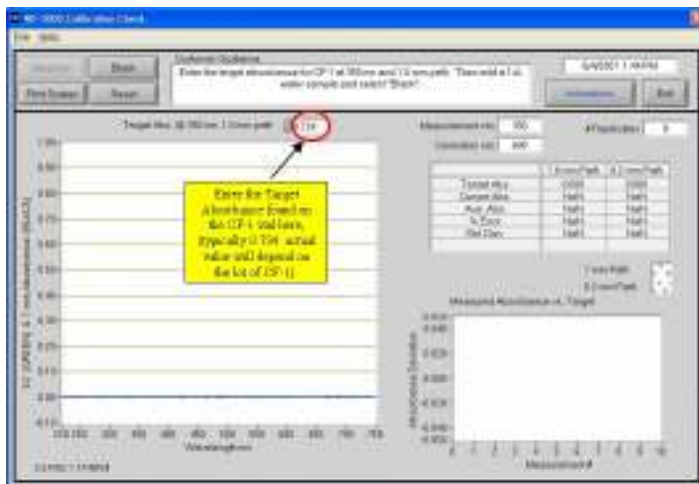
Calibration Check は Main Menu の Utilities and Diagnostics モードから実行できます。このモードでは 2 つの光路長が精度範囲内にあるかどうかを確認します。



Calibration Check を行うには CF-1 が必要です。CF-1 は NanoDrop 1000 分光光度計を校正する為に使われるニクロム酸カリウム溶液です。一般的な分光光度計を校正する為に用いられるニクロム酸カリウムの約 10 倍の濃度です。

手順

1. 測定部を洗浄し 1 μ L の水をのせ、玉状になっているかを確認します。
2. 装置のソレノイド周辺の埃を取り除きます。詳細はこの項の“ソレノイド下部に溜まった埃の取り除き方”を確認して下さい。
3. Calibration Check ソフトを起動し、ソフトのテキストボックスの指示に従います。
4. CF-1 のバイアルに記載された Target Absorbance を下図の場所に入力します。通常 Target Absorbance は 0.734 ですが実際の値は CF-1 のロットにより異なります。



5. 1 μ L の脱イオン水をのせ、Blank を選択します。
6. CF-1 は開封する前に十分に攪拌します。全ての液体をバイアルの底部に落とします。
7. 注意して CF-1 のバイアルを折り開封します。
8. ソフトのテキストボックスに従います。1 μ L の CF-1 を 10 回測定します。10 回測定するとテキストボックスに結果が表示されます。
9. 1 μ L を使用して行った結果が合格でなかった場合、2 μ L を使用して再度測定します。

キャリブレーションチェックの許容範囲の表はドロップダウンメニューの Help から確認できます。

測定結果は Print Screen でプリントする事ができます。また測定結果の.JPG ファイルが C:\NanoDrop Data\Calib check に自動的に保存されます。

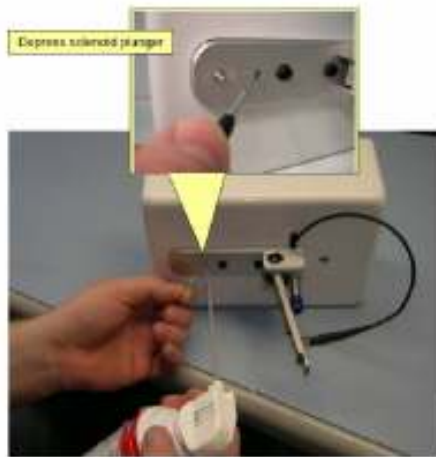
校正が必要な場合は販売店または(株)エル・エム・エスまでご連絡下さい。

NOTE: CF-1 Calibration Fluid は使い捨てのバイアルで供給されます。CF-1 はバイアルを開封後一時間以内に使用して下さい。外気に長くさらしたり、他の容器に移すことは濃度が大きく変化する原因となります。

ソレノイド下部に溜まった埃の取り除き方

上下測定部の台座は、時々ラボワイプで 30～40 回強く拭くことでリコンディショニングをする必要がある場合があります。いくつかのラボワイプでは、これらの過程の間に糸くずが出て、結果として装置のソレノイド下部に埃が溜まる場合があります。多量の埃が溜まると吸光度光路長がずれ、誤った測定結果を引き起こします。下記を参照して溜まった埃を取り除いて下さい。

1. 装置を横に倒します。(測定部を手前側にします。)
2. サンプリングアームを開けます。
3. クリップか小さいドライバーを使ってソレノイドプランジャーを押し、エアダスター等で圧縮空気をソレノイドプランジャーの穴に噴出します。装置の内部に高圧ガスが入らないようにスプレーを立てて下さい。



17. トラブルシューティング

Error USB2000



このエラーはソフトウェアの起動時に表示され、通常 USB ケーブルが正しく接続されていないかソフトウェアが正しくインストールされていないことを意味します。以下を確認して下さい。

1. USB ケーブルが PC と装置に正しく接続されているか確認して下さい。
2. ケーブルが正しく接続されているがエラーが表示されている場合は、スタートメニューから“USB Reset”を起動します。スタート → プログラム → NanoDrop → Utilities → USB Reset. (もし USB Reset のソフトウェアが PC にインストールされていない場合はホームページからダウンロードすることができます。)
3. USB Reset の画面の指示に従います。ケーブルを抜き再接続した後、下図のような画面が表示されます。(Windows XP SP2 ではインターネットに接続するかを確認してきますが“いいえ、今回は接続しない”を選択して下さい。) ソフトウェアの自動インストールが始まります。

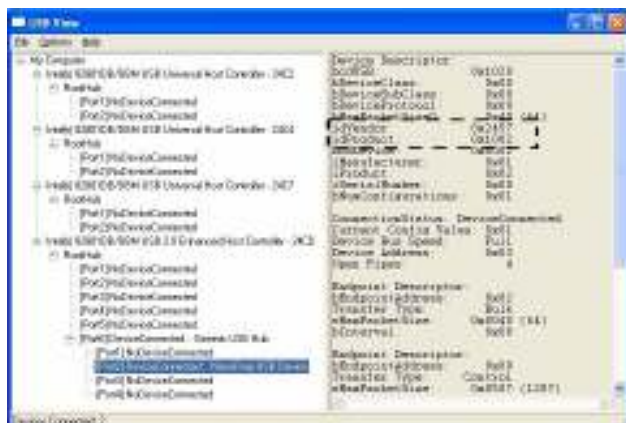


Intro Page: Windows XP- SP2



Other Windows Operating Systems

4. ソフトウェアを実行して下さい。正常に動作しない場合は 5 に進んで下さい。
5. ソフトウェアを終了してから USB View ソフトを実行し USB の接続を確認します。スタート → プログラム → NanoDrop → Utilities → USB View. (もし USB View のソフトウェアが PC にインストールされていない場合はホームページからダウンロードすることができます。)
6. Device Connected をクリックすると下のような図が表示されます。多くの USB デバイスが接続されている場合は NanoDrop の接続されているポートを確認します。接続されている装置の一つは“idVendor”と“idProduct”が下図のように 0x2457 と 0x1002 と表示されなくてはなりません。これらが表示されていれば USB の接続は正常です。“idVendor”と“idProduct”が下図と違っているか、USB デバイスが表示されなければ 7 に進んで下さい。



7. 接続した PC の USB ハブ/ポートの不具合を確認するために別の PC にソフトをインストールします。USB View を 2 台目の PC で実行します。最初の PC と同じ表示が表れたら装置は修理が必要です。販売店または株式会社エム・エスまでご連絡下さい。

Connection Error



このエラーはソフトウェア起動中に USB の接続が途切れたときに表示されます。多くの場合“Retry”を押すことで回復します。主な原因は次のとおりです。

PC の電源設定による場合

PC がスタンバイまたは休止状態になると USB の接続が失われ、この場合は“Retry”を押しても接続は回復しません。この場合は“Retry”を押す前に USB ケーブルを一旦外し、再接続して下さい。

PC の電源設定を変更するには、スタート→コントロールパネル→パフォーマンスとメンテナンス(XP のみ)→電源オプションを開き、システムスタンバイとシステム休止状態の設定をいずれも“なし”にします。



静電気

非常に乾燥した環境では使用者から装置への静電気が問題となる場合があります。衣服等の静電気は金属製品を触るなどして逃がして下さい。

PC の USB ポートの故障

時々 Connection Error が発生する場合には、PC の USB ポートに問題がある可能性があります。このときには他の PC にソフトウェアをインストールして確認して下さい。エラーが表示されない場合は最初の PC の USB ポートを修理する必要があるかもしれません。

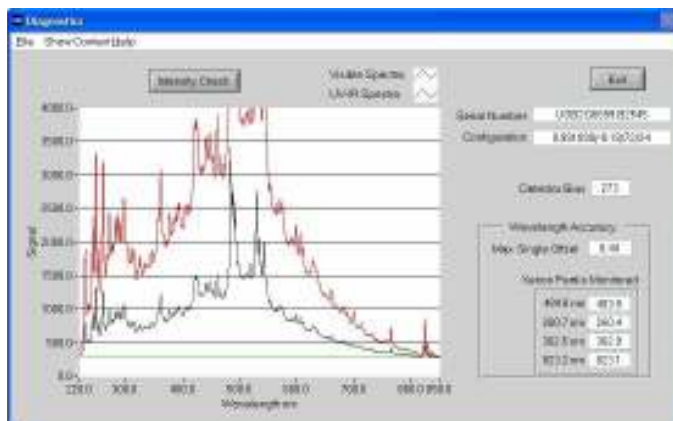
Signal Error



これは光源が発光していないか、強度が弱い場合に表示されます。エラーメッセージに表示された方法で改善しない場合は、以下の方法で光源の状態の確認をして下さい。

- メインメニューから Utilities and Diagnostics を開く。

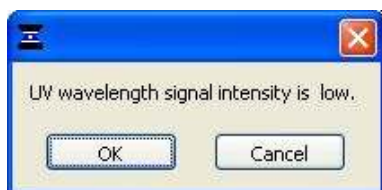
- アームを下げて OK をクリックし、使用可能状態になったら Intensity Check を押します。ここで、また次のような波形が表示され Detector Bias が 65 以上であれば正常です。これは USB の接続、電源が正常に機能していてランプが十分に照射されていることを意味します。



- もし波形が表示されない場合には、AC アダプターが装置と電源に正しく接続されているか確認して下さい。次に AC アダプターが正常に働いているか確認して下さい。12-20VDC の出力があれば正常です。

以上を確認しても改善されない場合は販売店または株式会社エル・エム・エスまでご連絡下さい。

UV Wavelength signal Intensity is low

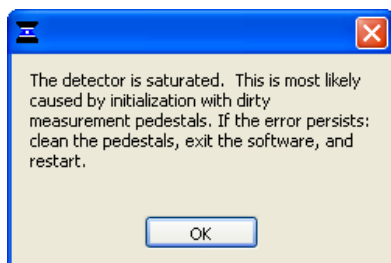


上記のエラーメッセージは UV 領域での検出シグナルが低いときに表示されます。原因の多くは UV 範囲の吸収を持つサンプル（タンパクや核酸等）が測定部で乾燥した為です。以下の手順でクリーニングして下さい。

1. 5 μ L の dH₂O を測定部にのせる。
2. サンプリングアームを下ろし、液柱を作り 2~3 分そのままにしておく。
3. 上下の測定部をきれいなキムワイブで拭き取る。

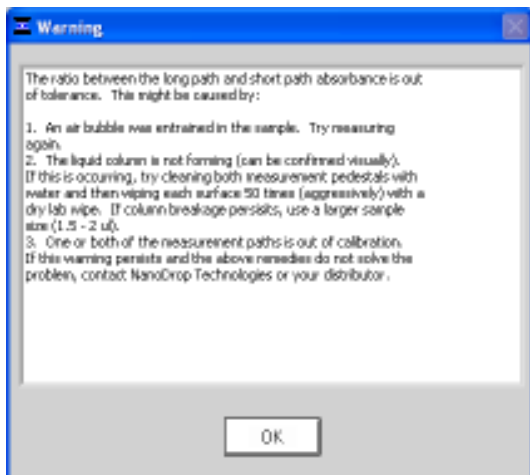
Note: 通常測定部の乾燥したサンプルを取り除くには水で十分です。乾燥したタンパク等を取り除く場合には、より十分なクリーニングが必要な場合があります。これらの場合、水の代わりに 0.5M HCl を使用することをお勧めします。HCl を使用した場合はいかなる HCl も残らないよう水でクリーニングして下さい。Note: 脱イオン水や HCl をのせるのに噴出ボトルを使用しないで下さい。

Saturated Detector



このエラーはソフトウェアのインシャライズ時に非常に長い検出時間で算出した場合に表示されます。このエラーの多くは最後の測定のあと測定部表面に乾燥したサンプルが残っていることが原因です。脱イオン水を用いて上下測定部を洗浄し、測定モードからメインメニューに戻ることによって改善されます。各測定モードの使用時に再インシャライズされるのでソフトウェアを完全に終了する必要はありません。以上を確認しても改善されない場合は販売店または株式会社エル・エム・エスまでご連絡下さい。

Liquid Column Breakage



このエラーはサンプルの液柱に問題がある可能性がある時に表示されます。ソフトウェアは長光路長と短光路長の吸光度を比較して、短光路長の吸光度が長光路長の吸光度の 20%でなく、測定精度の範囲に入っていなければエラーを表示します。原因の多くは、液柱が正しく測定部に形成されていないためです。

タンパクや界面活性剤を含む溶液は、測定部表面を張力のない状態にするので、1 μ L のサンプルでは、液柱は立ちません。以下を確認して下さい。ブラッドフォード試薬を使用している 1 μ L では液柱が立ちにくくなります。

測定部のクリーニング

NanoDrop Pedestal Reconditioning Compound (PR-1)を使用すると測定部表面の汚れ等により測定中に液柱が切れる場合に測定部の状態を早く回復できます。

1. PR-1 のバイアルを開け、キットに付属している塗布棒に少量取ります。
2. 上下の測定部表面に薄く塗布します。
3. PR-1 が乾燥するまで 30 秒待ちます。
4. 四つ折にしたきれいなキムワイプで上下の測定部表面の全てのコンパウンドが取り除かれるまで拭き取ります。Note: キムワイプが黒くなりますが異常ありません。

キムワイプが黒くならなくなったら拭き取りは十分です。クリーニングができていないかを確認する為に測定部に 1 μ L の水をのせ、水が玉状になるかを確認します。PR-1 についての詳細は [website](#) を確認して下さい。

PR-1 を使用しない手順は以下の通りです。

1. 厚みができるように何度か折り返したキムワイプを用意します。
2. 測定部を強く 50 回以上拭きます。拭き取り中に何度かキムワイプを折り返してください。上部の測定部を拭き取るときはサンプリングアームに余分な力がかからないように注意します。

目視で液柱が立っているのにエラーが表示される場合は販売店または(株)エル・エム・エスまでご連絡下さい。

Error: Code 8

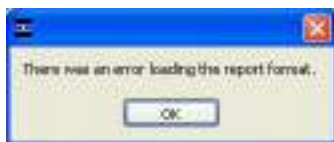


このエラーメッセージの多くは、ログインしている Windows アカウントが c:\nanodrop data かその下のフォルダにアクセスできないときに起こります。PC の administrator はソフトウェアを使用する全てのアカウントが正常にアクセスできるか確認して下さい。

Can't Find LabView RunTime Engine...

このエラーはソフトウェア構成のうち一つ以上が取り除かれたか壊れたことを意味します。表示されたときはスタート→プログラム→ NanoDrop→ Utilities→ Runtime Installer と選択して Labview Runtime engine を再インストールして下さい。

Report Format Loading Error



このエラーは c:\nanodrop data\custom report formats に保存されている report format files にアクセスできないか、ファイルがフォルダから削除されている場合に表示されます。NanoDrop のすべてのユーザーがこのフォルダに正常にアクセスできるか administrator が確認して下さい。もしファイルが移動されていれば元に戻して下さい。見つからなければソフトウェアを再インストールして下さい。

その他のエラーメッセージ

Can't find file OOIDRV.INI...

このエラーは administrator 以外のユーザーがソフトウェアをインストールしようとした時に表示されます。administrator がソフトウェアをインストールして下さい。

Source Error...

このエラーは、適正な光強度を得られていないことを示しています。サンプルアームが下がっているか、電源が接続されているかチェックします。

Error 9000

このエラーは passwords.log ファイルが無いか不正であるときに表示されます。

ソフトウェアを再インストールしプロンプトが現れたら上書きします。新しい passwords.log ファイルが C:\NanoDrop Data\Log フォルダに現れます。

Error 9003

このエラーは、モニターの解像度が必要である 1024x768 より低いときに表示されます。PC の設定を確認して下さい。スタートメニューツールバーが横でなく下にあることを確認して下さい。

Low Detector Bias...

ソフトが検出器の問題を検出した時に表示されます。このエラーが表示された時は販売店または(株)エル・エム・エスまでご連絡下さい。

OOIDRV\ Timeout

このエラーは旧バージョンのソフトウェアをアンインストールした時に必要なファイルが削除された場合に表示されます。ソフトウェアを再インストールして下さい。

EZUSB.SYS Cannot Be Found...

このエラーメッセージが表示されたときには以下を実行して下さい。

- Windows 2000: テキストボックスに C:\WINNT\INF と入力
- Windows XP: テキストボックスに C:\WINDOWS\INF と入力

これでインストールが完了します。

Driver X Configuration Failed- You Must Manually Edit the Registry

このメッセージ(または同じような意味のメッセージ)は、ウィンドウズ 2000 か XP にソフトウェアをインストールしようとした時に起こります。これは、コンピューターにソフトをインストールするのに必要な認可を持っていないために起こるものです。表示された場合にはシステム管理者にご相談下さい。

Insufficient Memory...

このエラーメッセージ(または同じような意味のメッセージ)は、ハードディスク空きスペースが 40MB 以下のコンピューターに操作ソフトをインストールしようとした時に起こります。

No Printer Connected...

このエラーは PC にプリンタが接続されていない時に印刷しようとした時に表示されます。

サンプルの正確性と再現性

もし測定結果が正確でなく再現性が無ければ、サンプルかサンプルの均一性が液柱が壊れた原因が考えられます。以下の作業を行って下さい。

- **測定開始前にサンプル測定部を洗浄する。**
測定開始時に測定部の台座が汚れていると吸光度と読み取り値を誤り(より低く)サチュレーションを起こします。測定前に脱イオン水を用いて測定部から乾いたサンプルを取り除いて下さい。Note: 脱イオン水をのせるのに噴出ボトルを使用しないで下さい。
- **1.5-2 μ L のサンプルを使用する。**
測定中にサンプルの液柱が壊れると異常な結果が表示されます。測定中に液柱ができていないかを確認して下さい。液注が壊れる場合は 1.5-2 μ L のサンプル量を使用して下さい。また、タンパクや界面活性剤を含む溶液は、測定部表面張力が弱く、液柱が形成しにくいことで知られています。このような場合、測定部を乾いたキムワイブなどで 15-20 回拭くと液柱が立つようになります。
- **DNA サンプルを 55 $^{\circ}$ C に温め、測定前に攪拌する。**
NanoDrop 1000 分光光度計では微量のサンプルで測定可能であるのでサンプルの均一性が非常に重要です。ゲノム DNA やラムダ DNA のような大きな分子を含むサンプルの場合に特に影響します。Note: 多いサンプル量が必要なキュベットを使用する分光光度計ではこの影響は少なくなります。
- **ブランクサイクル**
これは装置が正常に動作していて、キャリーオーバーしていないかを確認します。ブランクサイクルは以下のように行って下さい。
 1. 測定モードを起動します。
 2. ブランクサンプル(測定するサンプルに使われているバッファー、溶媒等)を測定部に置きサンプリングアームを下ろします。
 3. “Blank” (F3) をクリックしブランクを測定します。
 4. “Measure” (F1) を選択してブランク溶液をサンプルとして測定します。測定結果は 0.050A 以下の誤差であるべきです。(10mm 光路長換算)
 5. 測定結果が 0.005A 以下になるまでキムワイブで上下の測定部を繰り返し拭きまします。(1mm 光路長時)
- **ブランク溶液とサンプルは同じものを使用する。**
バッファーはしばしば UV 範囲で吸収するため装置のブランクはサンプルと同じ物質を使用して下さい。
- **薄いサンプルを使用しない。**
検出限界付近のサンプルでは測定結果が大きく異なる場合があります。各測定モードの測定濃度範囲を参照し測定可能な範囲で使用して下さい。
- **CF-1 を用いた精度と再現性の確認**
CF-1 は Thermo Fisher Scientific 社のニクロム酸カリウムのキャリブレーションスタンダード溶液です。6ヶ月毎に新しい CF-1 を用いて装置の状態を確認するのは有効です。

260/280 Ratio (260/280 比)

多くの研究者は、通常のキュベットを使う分光光度計から NanoDrop 1000 分光光度計に変えた時に、260/280 比の一定のシフトを経験します。これには、以下に示した三つの主な原因が考えられます。

サンプルの酸性度での変化

溶液の pH のわずかな変化が 260:280 を変えます。^{**} 酸性溶液は、260:280 比が 0.2-0.3 低くなり、塩基性溶液では、比が 0.2-0.3 高くなります。NanoDrop 1000 分光光度計と他の分光光度計を比較する時、NanoDrop 1000 分光光度計で測定した希釈していないサンプルの pH が他の分光光度計で測定した希釈したサンプルと同じであることを確認することが重要です。

^{**} William W. Wilfinger, Karol Mackey, and Piotr Chomczynski¹, 分光光度計による核酸純度の評価法での pH とイオン強度の影響: Biotechniques 22:474-481 (March 1997)

分光光度計の波長の正確性

260nm での核酸の吸光度は、一般的には、平坦ですが、280nm での吸光度曲線は、急な傾きを示しています。波長の精度での少しのずれでも 260:280 比に大きく影響します。例えば、波長精度の +/-1nm のずれは、260:280 比の +/-0.2 の違いを生じます。多くの分光光度計は、1nm の精度をうたっていますので、両方共波長精度の範囲内にある 2 台の分光光度計で同じ核酸サンプルを測定した時、260:280 比が 0.4 異なる可能性があります。

ヌクレオチド比

DNAとRNAを構成する5つのヌクレオチドは、260:280比がかなり異なります。** 以下に独立に測定した場合に推定した260:280比を表示しています。

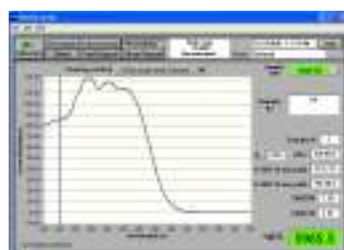
グアニン	1.15
アデニン	4.50
シトシン	1.51
ウラシル	4.00
チミン	1.47

研究されている核酸の結果としての260:280比は、存在している4種のヌクレオチドの260:280比の重量平均にほぼ等しくなっています。一般的に受け入れられているDNAとRNAの比は、1.8と2.0であり、“親指の規則”となっていることを知ることは重要です。実際の比は、核酸の構成によって決まっています。RNAは、典型的には、チミンに比較してウラシルの高い比によって、より高い260:280比を持っています。

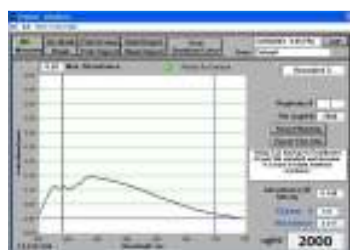
** Leninger, A. L. *Biochemistry*, 2nd ed., Worth Publishers, New York, 1975

ギザギザの異常な波形

波形の一部が滑らかでなくギザギザだが、他の部分が滑らかである波形が表示された場合はサチュレーションをしている可能性があります。これはソフトウェア起動時にサンプル測定部が汚れていた為検出時間が長くなり過ぎたことが原因です。上下の測定部をクリーニングしてソフトウェアを再起動して下さい。サチュレーションをしている場合は以下のような画像が表示されます。



核酸モードの場合



ブラッドフォードモードの場合

全体が滑らかでなくギザギザの波形は分光器に十分な光が届いていないことが原因です。疑わしい場合は下記テクニカルサービスを参照のうえご連絡下さい。

テクニカルサポート

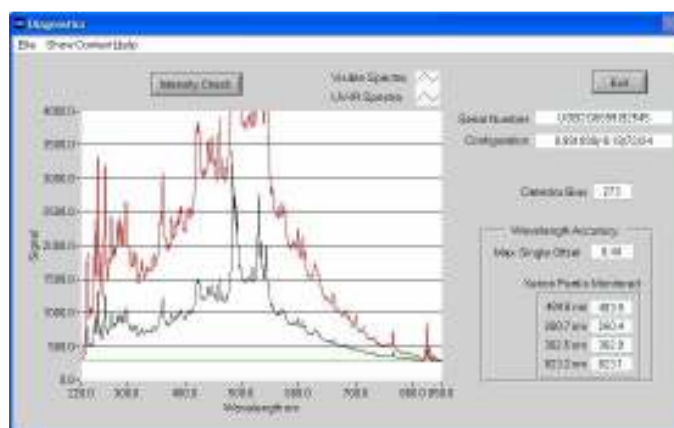
以上のトラブルシューティングによっても問題が解決しない時には、販売店または㈱エル・エム・エスまでご連絡下さい。なお次の各データをお送りいただくと診断時の役に立ちます。

・ 装置の製造番号

製造番号は装置の底部に記載されています。

・ Utilities and Diagnostics モードの画像

画像を得るには Utilities and Diagnostics モードを選び OK を押してイニシャライズします。Intensity Check をクリックするとスペクトルが表示されます。File→Save Window を選択し画像を保存して販売店または㈱エル・エム・エスまでご連絡下さい。



・ アプリケーションモードスクリーンのプリント

使用している PC での実際のスペクトルの画像は問題の診断に非常に役立ちます。画像の保存方法は非常に簡単です。測定モードで“Alt+Print”を押して下さい。これで PC のクリップボードにハイライトスクリーンウィンドウがコピーされます。次にコピーした画像を MS Word、MS Paint 等のプログラムに貼り付けて下さい。この.jpg や.doc ファイルを保存してご連絡下さい。

データ保存ファイル

測定したデータに関して質問がある場合は、そのデータを含むファイルを添付して販売店または(株)エル・エム・エスまでご連絡下さい。保存ファイルは C:\NanoDrop Data → User name → Application Module (BCA Protein, Bradford, Cell Culture, Protein Lowry, Proteins and Labels, MicroArray, Nucleic Acid, Protein A-280, UV-Vis or UV-Vis HiAbs) に保存されています。

18. メンテナンスと保証

クリーニング

トラブルの発生を防ぐため、測定部は常にクリーンに保って下さい。各サンプルの測定が終わった時に、キャリーオーバーと汚れが残ることを防ぐために上下の測定部からサンプルを拭き取ります。また高濃度のサンプル測定後や、1日の最後など多数回の測定後は蒸留水でクリーニングすることをお勧めします。NanoDrop 1000 分光光度計で最も重要なメンテナンスは測定部表面をクリーンに保つことです。

- 5µL の dH₂O を測定部にのせる。
- サンプリングアームを下ろし、液柱を作り 2~3 分そのままにしておく。
- 上下の測定部をきれいなキムワイプで拭き取る。

Note: 通常測定部の乾燥したサンプルを取り除くには水で十分です。乾燥したタンパク等を取り除く場合には、より十分なクリーニングが必要な場合があります。これらの場合、水の代わりに 0.5M HCl を使用することをお勧めします。HCl を使用した場合はいかなる HCl も残らないよう水でクリーニングして下さい。Note: 脱イオン水や HCl をのせるのに噴出ボトルを使用しないで下さい。

キャリブレーション

光路長(精度) キャリブレーションチェック

CF-1 キャリブレーション溶液を用いて 6 ヶ月毎に点検することは、装置の状態を確認する為には有効です。キャリブレーションチェックの方法は Utilities and Diagnostics モードで確認できます。

波長

波長はソフトをスタートさせる時にキセノンランプのピークに基づいて自動的にキャリブレーションします。ユーザーはキャリブレーションの必要はありません。

消耗部品

通常、定期的に交換が必要な部品はキセノンフラッシュランプのみです。フラッシュランプは最低 3 万回の測定が可能です。フラッシュランプの寿命がくると出力が安定しなくなるか完全に出力されなくなります。交換が必要な場合は販売店または(株)エル・エム・エスまでご連絡下さい。

保証

通常の使用において発生した故障等については、ご購入より一年間保証いたします。

19. 補足

装置の仕様

- 必要サンプル量: 1-2 μ L
- 長光路長: 1mm 短光路長(高濃度測定): 0.2mm
- 光源: パルスキセノンフラッシュランプ
- 検出器: 2048 画素リニアシリコン CCD
- 波長範囲: 220-750nm
- 波長精度: 1nm
- 波長分解能: 3nm(FWHM Hg 546nm)
- 吸光度誤差: 0.003A (1mm 光路長)
- 吸光度精度: 2% (257nm で 0.76 吸光度の時)
- 吸光度範囲: 0.02-75 (10mm 長相当の吸光度)
- 検出下限: 2 ng/microliter (dsDNA)
- 検出上限: 3700 ng/microliter (dsDNA)
- 測定サイクル時間: 10 秒
- サイズ: 14cmx20cm
- 重量: 1.6 kg
- サンプル測定部の材質: SUS303 ステンレス 光ケーブル材質: クオーツ
- 操作電圧: DC12V
- 操作時消費電力: 6W
- スタンバイ時消費電力: 1.5W
- CE 規格認定
- UL/CSA 規格認定
- システムソフトウェア: Windows 2000、XP、Vista 対応

ブランクと吸光度の計算式

NanoDrop 1000 分光光度計が“ブランク”の時、スペクトルはレファランス物質(ブランク)で測り、波長での光強度のアレイとしてメモリーにストアします。サンプル測定の際は、サンプルを透過した光の強度を記録します。ブランク強度とサンプル強度は、次の式によってサンプル吸光度を計算するのに用いられます。

$$\text{吸光度} = -\log(\text{サンプル強度}/\text{ブランク強度})$$

サンプルとブランク共の測定した光の強度が、一定の波長での吸光度を計算するのに必要です。

濃度計算 (Beer の法則)

概説

Beer-Lambert の公式が、計算した吸光度と濃度との相関に用いられます。

$$A = E * b * c$$

ここで、**A** は、吸光度単位(A)で表した吸光度、**E** は、L/モル-cm 単位で表示した各波長でのモル吸光係数(あるいは吸収係数)、**b** は、cm で表示した光路長、**c** はモルで表示した溶質の濃度(M)。

蛍光色素(マイクロアレイ測定)

ソフトウェアは、マイクロアレイ濃度モードで蛍光色素濃度を計算するのに、Beer-Lambert の一般式を用います。各色素の吸光係数を下の表に示します。

色素名	吸光係数 (liter/mol-cm)	測定波長 (nm)
Cy3	150000	550
Cy5	250000	650
Alexa Fluor 488	71000	495
Alexa Fluor 546	104000	556
Alexa Fluor 555	150000	555
Alexa Fluor 594	73000	590
Alexa Fluor 647	239000	650
Alexa Fluor 660	132000	663
Cy3.5	150000	581
Cy5.5	250000	675

核酸

核酸の定量では、Beer-Lambert の式は単位に ng-cm/ml の吸光係数を用いるように変更されます。この吸光係数から次の方程式が与えられます。

$$c = (A * e)/b$$

ここで、**c** は、ng/ul で表示した核酸濃度、**A** は AU で表示した吸光度、**e** は **ng-cm/ul** での各波長の吸光係数、**b** は、cm 単位の光路長です。

一般的に受け入れられる核酸の吸光係数は

- 2 本鎖 DNA: 50 ng-cm/ul
- 1 本鎖 DNA: 33 ng-cm/ul
- RNA: 40ng-cm/ul

NanoDrop 1000 分光光度計では、10mm 光路長を用いる一般的な分光光度計と異なり、1.0mm と 0.2mm の光路長が用いられます。従って、NanoDrop 1000 分光光度計は、一般的な分光光度計に比べて 50 倍も濃い濃度のサンプルを測定することができます。

Note: 保存ファイルにある吸光度データはソフトの画面表示されるデータポイントの一部でしかありません。核酸、タンパク A280、タンパクとラベルモードではデータは、1.0cm(10mm)光路長のデータに換算されます。マイクロアレイ、UV-Vis、タンパク BCA、タンパクブラッドフォード、タンパクローリー、セルカルチャーモードでは、データは、0.1cm(1.0mm)光路長に換算されます。高吸光度の UV-Vis サンプルでは、データは、0.1mm 光路長で換算されます。

サンプル保持システム溶媒適合性

NanoDrop 1000 分光光度計は、生命科学研究室で用いられるほとんどの溶媒の使用が可能です。それらはメタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、アセトン、エーテル、クロロフォルム、四塩化炭素、DMSO、DMF、アセトニトリル、THF、トルエン、ヘキサン、ベンゼン、カセイソーダ、次亜塩酸ナトリウム(漂白剤)、希塩酸、希硝酸、希酢酸です。

フッ化水素(HF)は、フッ素イオンが光学系の光ファイバーを溶かす恐れがあるので使用できません。

測定部のコンタミ除去について

コンタミ除去が必要な時には、生物学的な活性のあるものが測定部に存在しないことを確認するために、0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液(市販の漂白剤の 10 倍希釈)等が利用できます。ファイバーを固定している部分は 303 ステンレスを使用していますので研究室等でよく使われる一般的溶媒に対して耐性があります。(サンプル保持システム溶媒適合性を参照して下さい。)Note: 希釈した漂白剤をのせるのに噴出ボトルを使用しないで下さい。

ダイモ 400 ラベルライターの設定アップ(オプション)

ダイモ 400 ラベルライターのドライバーインストール後、次の設定を行って下さい。(下記手順はウィンドウズ XP のもので他のウィンドウズでは多少異なります。)

1. コントロールパネルから、プリンタと FAX を開きます。
2. DYMO LabelWriter 400 を右クリックし、プロパティを選びます。
3. 全般のタブで“印刷設定”を選び、レイアウトの印刷の向きを“横”にチェックし、OK を選びます。
4. 詳細設定を選び、次のようにセットします。
 - **用紙サイズ:** 30256
 - **印刷品質:** Barcodes and Graphics
5. OK をクリックしてこのウィンドウを閉じ、“適用”をクリックします。
6. 次に“詳細設定”タブを選び、“詳細な印刷設定を有効にする”ボックスがチェックしてあることを確認します。
7. デバイスの設定タブで給紙方法と用紙の割り当てで“30256”を選択します。
8. “OK”をクリックしてこのウィンドウを閉じ、“適用” “OK”をクリックして終了します。

用紙の選択が適用されているかソフトウェアの Set-up から確認します。

1. Data Viewer モードを開き File メニューから Page Set-up を選択します。
2. Printer Set-up をクリックしプリンタ名から DYMO LabelWriter 400 を選択します。
3. プロパティをクリックし、詳細設定をクリックします。
4. 用紙サイズで 30256 Shipping を選択し OK をクリックします。