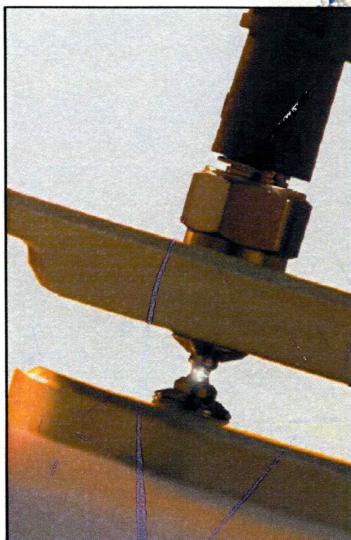


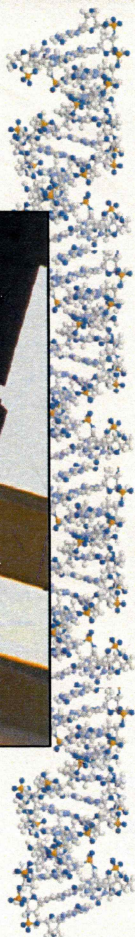
 **NanoDrop**[®]

ND-1000 Spectrophotometer



Ver. 3.x.x Users Manual

取扱説明書 日本語版



セクション

1. 概要
2. 設定
3. 一般的な操作
4. 各測定モードの共通操作
5. 核酸測定モード
6. **MicroArray** 測定モード
7. **UV-VIS** 測定モード
8. タンパク質 **A280** 測定モード
9. タンパク質&**Labels** 測定モード
10. タンパク質 **BCA** 測定モード
11. タンパク質 **Lowry** 測定モード
12. タンパク質 **Bradford** 測定モード
13. セルカルチャー測定モード
14. 問い合わせ

目次

1. 概要	1-1
本体特徴.....	1-1
操作.....	1-1
アプリケーション.....	1-1
2. 設定	2-1
コンピューターの必要条件.....	2-1
ソフトウェア.....	2-1
インストール.....	2-1
ソフトウェアアップグレード.....	2-2
ハードウェア.....	2-2
機器の登録.....	2-2
3. 一般的な操作	3-1
基本操作.....	3-1
ソフトウェアの構成と機能.....	3-3
アカウントの管理.....	3-4
User Preference (初期設定画面).....	3-6
パスワード変更画面.....	3-7
Utilities and Diagnostics.....	3-8
Dye/Chromophore Editor.....	3-8
4. 各測定モードの共通操作	4-1
測定モードの起動.....	4-1
Escape Key (ESC).....	4-1
Measure (F 1).....	4-1
Blank (F 3).....	4-1
Re-blank (F 2).....	4-2
画面の印刷(F 4).....	4-2
Saving Current Screen as JPG Image.....	4-3
Start Report (F 6).....	4-3
Print Report (F 5).....	4-3
Show Report (F 7).....	4-3
Sample ID.....	4-4
Report #.....	4-4
Sample #.....	4-4
Exit.....	4-4
Help.....	4-4
取扱説明書.....	4-4
5. 核酸の測定モード	5-1
サンプルの必要量.....	5-1
測定濃度の範囲.....	5-1
結果表示画面.....	5-1
スペクトルの Normalization.....	5-2
Spectrum Overlay Control.....	5-2

6.	マイクロアレイ測定モード	6-1
	サンプルの必要量.....	6-1
	測定濃度の範囲.....	6-1
	結果表示画面.....	6-2
	ベースラインの算定.....	6-3
	Dye の選択.....	6-3
7.	UV-VIS 測定モード	7-1
	サンプルの必要量.....	7-1
	測定濃度の範囲.....	7-1
	結果表示画面.....	7-1
8.	タンパク質 A280 測定モード	8-1
	サンプルの必要量.....	8-1
	タンパク質測定後のクリーニング法.....	8-1
	測定濃度の範囲.....	8-2
	結果表示画面.....	8-3
	スペクトルの Normalization.....	8-3
	Spectrum Overlay Control.....	8-3
9.	タンパク質&Labels 測定モード	9-1
	サンプルの必要量.....	9-1
	タンパク質測定後のクリーニング法.....	9-1
	測定濃度の範囲.....	9-1
	結果表示画面.....	9-1
	ベースラインのタイプ.....	9-2
	スペクトルの Normalization.....	9-2
10.	タンパク質 BCA 測定モード	10-1
	サンプルの必要量.....	10-1
	タンパク質測定後のクリーニング法.....	10-1
	測定濃度の範囲.....	10-1
	BCA キット、プロトコル、およびサンプルの準備.....	10-1
	結果表示画面.....	10-2
	BCA 測定の操作.....	10-2
	検量線の特徴.....	10-4
	BCA 測定モードの終了.....	10-5
11.	タンパク質 Lowry 法測定モード	11-1
	サンプルの必要量.....	10-1
	タンパク質測定後のクリーニング法.....	10-1
	測定濃度の範囲.....	10-1
	Lowry 改良法キット、プロトコル、およびサンプルの準備.....	10-1
	結果表示画面.....	10-2
	BCA 測定の操作.....	10-2
	検量線の特徴.....	10-4
	BCA 測定モードの終了.....	10-5

12. タンパク質 Bradford 法測定モード	12-1
サンプルの必要量.....	12-1
タンパク質測定後のクリーニング法.....	12-1
測定濃度の範囲.....	12-1
Bradford キット、プロトコル、およびサンプルの準備.....	12-2
結果表示画面.....	12-2
Bradford タンパク質測定の実行.....	12-2
検量線の特徴.....	12-4
Bradford 測定モードの終了.....	12-5
13. セルカルチャー測定モード	13-1
サンプルの必要量.....	13-1
細胞懸濁液濃度.....	13-1
結果表示画面.....	13-1
サンプルの均質性.....	13-2
14. 問い合わせ	17-1

1. 概要

本体特徴

NanoDrop®社の ND-1000 スペクトロフォトメーターはフルスペクトル (220~750nm) 測定可能な分光光度計です。ND-1000 では表面張力を利用した新技術 (特許) を採用し、1ul のサンプル測定で高精度な測定を行なえます。これにより、キュベットのコンタミによる濃度の誤差もありません。さらに、ND-1000 高濃度サンプルも希釈せずに測定可能です。(一般のキュベットを用いる方法より 50 倍高濃度のものが測定可能です。)

操作

測定すべきサンプルを直接ピペットで測定部表面に添加します。光ファイバー端末間に溶液を円柱状に牽引形成することで、測定光路を確立します (光源側の光ファイバーがキセノンフラッシュランプに接続され、受光側の光ファイバーがリニア CCD アレイを利用した分光測定部に接続されています。本体はソフトウェアで制御され、データはログインしたパソコン内のファイルに保存されます。

アプリケーション

- ND-1000 分光光度計を使用して 1ul で測定しても、従来の UV/VIS 分光光度計と同じ結果を得ることが出来ます。この微量サンプルを用いた測定は下記のような場合に最適です。
- DNA サンプルを希釈せずに測定する (上限 dsDNA で 3700ng/ul)
- 蛍光色素でラベリングしたマイクロアレイサンプルの測定
- 蛍光標識されたタンパク質、化合物、および金属タンパク質の測定
- 精製タンパクの測定 (上限: BSA で 100mg/ml)
- ブラッドフォード法によるタンパク質の濃度測定
- BCA 法によるタンパク質の濃度測定
- 細胞などの濁度測定
- 一般的な UV/VIS 分光光度計として

2. 設定

コンピュータの必要条件

ND-1000 を制御するコンピュータとしては、以下の条件を満たして下さい。(マッキントッシュはご利用になれません)

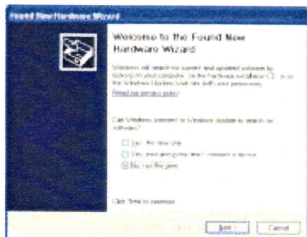
- Microsoft Windows Millennium Edition, XP または 2000
- Windows 98 日本語版では不具合を生じるケースがあり、お奨め出来ません。
- ND-1000 ソフトウェアは Windows 95 または Windows NT では作動しません。
- 233 MHz またはそれ以上の周波数で作動するプロセッサ
- CD ROM ドライブ
- 32 MB またはそれ以上の RAM
- 40 MB 以上のハードディスク容量
- USB ポート (ND-1000 は USB ポート専用です)
- Microsoft Excel かまたはデータを保存できる表計算ソフト (オプション)

ソフトウェアのインストール

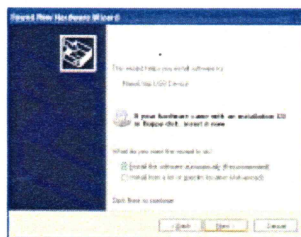
警告:USB ケーブルを用いてND-1000 を接続する前に、システムソフトウェアをコンピュータにインストールする必要があります。

ND-1000 ソフトウェアを適切にインストールするため、以下の説明にしたがってください：

1. すべてのソフトウェアを終了し、USBケーブルを抜いて下さい。
2. NanoDrop CD をコンピュータのドライブに挿入すると、自動的にソフトウェア画面が立ち上がります。(もし、立ち上がらない場合は、マイコンピュータの中からCDのアイコンを選択し、“nd1000-v310-install.exe”のフォルダーをダブルクリックして下さい。) ソフトウェア画面が立ち上がったら、“Install Software”を選択し、指示に従って下さい。
3. 本体の後ろに貼ってある Warning ラベルを剥がし、PCにUSBケーブルをつないで下さい。下記の Found New Hardware Wizard ダイアログが表示されます。(Windows XP SP2 operating system では下図のように適当なソフトウェアを参照するために、インターネット検索を行なうか、尋ねられます。“No, not this time”を選択して下さい。) プロンプトに従ってください。ソフトウェアのインストールが自動的に進行します。



Intro Page: Windows XP-SP2



All Windows Operating Systems

4. これでインストールは終了です。もし、ソフトが起動しなければ、トラブルシューティングを参照して下さい。

フォントの設定

NanoDrop ソフトウェアを最適な環境でお使いになるために、MS Sans Serif font の 8 ポイントにしてください。

1. デスクトップで右クリックしプロパティを選択します。
2. “デザイン” タブを選び、“詳細” を押します。
3. “指定する部分” を“アイコン” に変更し、上記のフォントを選択します。
4. “適用” を押して OK にします。

他のフォントでも使用できますが、文字が収まらない場合がございます。

ソフトウェアアップグレード

基本的に最新のソフトウェアは無料で提供されます。輸入元 (株式会社 スクラム) のホームページ、または NanoDrop Technologies 社のホームページよりダウンロードすることが出来ます。

www.scrum-net.co.jp もしくは、www.nanodrop.com

ハードウェア

接続

本体とパソコンは USB ケーブルで接続できます。また電源は本体の背面に付属の電源アダプター (12V) を接続します。

注意：使用していない場合の待機電力は 1.5W 以下です。本体に入切スイッチはありません。

登録

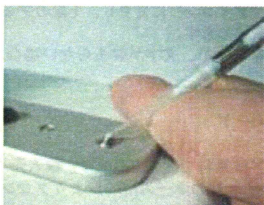
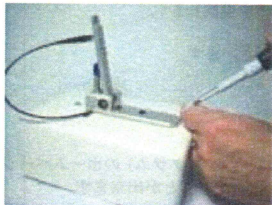
ユーザー登録にご協力下さい。今後 NanoDrop 社は、継続的にソフトウェアのバージョンアップを行っていく予定です。メールなどにて情報をお送り致しますので、納品時、製品についております保証書にご記入の上、必ず国内輸入物の (株) スクラムへ返送下さるようお願い致します。

3. 操作全般

サンプル保持システム

基本的な使用法

サンプル保持システムを使用するための主な手順を、以下に記載します。

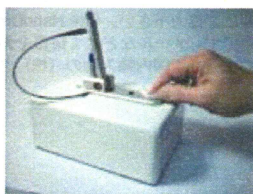


1. 上部アームを上げて、サンプルを下部測定部にピペットで乗せます。



2. 上部アームを閉じ、パソコンのソフトウェアを使って、スペクトルの測定を開始します。上下の測定面間にサンプルの液柱が形成されスペクトルの測定が実行されます。

3. 測定が終わったら、上部アームを開けて、柔らかいラボーパー（キムワイブなど）を使って、上下の測定面のサンプルをふき取ります。この簡単な拭き取り操作で、次の操作へのキャリーオーバーは1/1000以下になります。サンプルのキャリーオーバーに関する性能データについては、ウェブサイト <http://www.nanodrop.com> を参照してください。



サンプル保持システムの使用後のクリーニング法

一連のサンプルの測定後は、上下測定面と周囲を十分にクリーニングする必要があります。このクリーニングを行わなければ、次回の測定に影響を与える可能性があります。測定面のオプティカル部分の金属は、**SUS303** ステンレス鋼を使用し、一般的なラボの薬品に対し耐性があります（付録「溶媒耐腐食性」を参照）。ただし、最後に脱イオン水を使って表面をすべてクリーニングすることが推奨されます。

サンプルの推奨量

上下の測定面の間にサンプルの液柱が形成されることが必要であり、その時のサンプル量が結果に影響することはありません。

サンプルの液柱形成を確実にするために、以下の量で測定することを推奨します。

- 核酸： 1 ul
- dye 結合溶液： 2 ul
- 精製タンパク質： 2 ul
- Bradford 法、または BCA 法溶液： 2ul
- 濁度測定液： 2 ul

1~2 マイクロリットルの分注を確実にこなうには、極細チップのついた高精度ピペッター（0~2 マイクロリットル用）の利用が最適です。サンプルの特性、またはピペッターの精度が不明な場合には、サンプルの量は 2ul が推奨されます。

サンプルのキャリーオーバー

上下測定面は光ファイバーケーブル（石英ガラス）の磨き上げた滑らかな面のため、サンプルが残るようなひびや隙間はありません。

測定上認識できるキャリーオーバーがなくても、常にサンプル測定面を清潔に保つことを推奨します。

サンプルの均一性

均一性のない溶液からのサンプル採取は、殊に量が少ない時には、分光光度法をはじめとするあらゆる測定技術を利用して生成されたデータに、著しいばらつきを引き起こす可能性があります。ゲノム DNA やラムダ DNA、不均一な高濃度核酸の溶液が、分子生物学者には一般的な例として知られています。タンパク質は、変性、沈殿、そして凝結が起こりやすいので、サンプルの均一性を確保するためにも、取り扱いに注意が必要です。

蒸発による影響

測定中のサンプルの蒸発が、測定結果に与える影響は、サンプル濃度で 1~2% 増と考えられます。これは同じサンプルを実際連続して測定することで観察できます。サンプルを測定面に乗せた後、すぐに測定することをお奨めします。

サンプルの回収

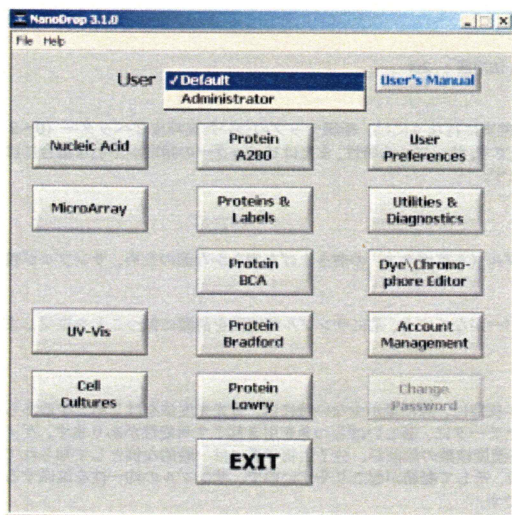
サンプル保持システムの利点のひとつに、測定後、サンプルをそのままピペットで回収出来ることが挙げられます。

ソフトウェアの構成と機能

メインメニュー

上部アームをおろした状態で、下記のパスを選択して、NanoDrop ソフトウェアを起動します。

Start → Programs → NanoDrop → NanoDrop 3.1.0



注意：メインメニューのボタン、もしくは各測定モードの Help ブルダウンメニューから User's Manual の PDF ファイルへアクセスすることができます。

アプリケーション（測定モード）

このソフトウェアは、研究者のニーズに合わせて設計されています。以下のアプリケーション（測定モード）が含まれています。

- **Nucleic Acid Measurement** — 核酸の濃度と純度
- **MicroArray** — dye 結合時の核酸の濃度と純度
- **UV-Vis** — 一般的な UV-Vis の測定
- **Protein A280** — 精製タンパク質の濃度と純度
- **Proteins & Labels** — Dye 標識されたタンパク質や化合物、金属タンパク質の濃度
- **Protein BCA** — BCA 法によるタンパク質濃度測定
- **Protein Bradford** — Bradford 法によるタンパク質濃度測定
- **Protein Lowry** — 改良 Lowry 法によるタンパク質濃度測定
- **Cell Culture** — 濁度の吸光

測定モードについて、詳しくはセクション 5～13 を参照してください。

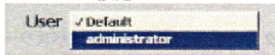
アカウントの管理

Account Management モードでユーザーを追加することが出来ます。そうすることで、自分のデータを指定したユーザーの保存フォルダーに保存したり、パスワードを設定することが出来るので、初期設定をユーザーの選択のまま使用したりすることが出来ます。

Account Management モードにアクセスできるのは、**Administrator** だけです。パスワードの変更モードには、認定アカウント ID を持っているユーザーなら、誰でもアクセスが可能です。今回のソフトウェアバージョンアップに伴い、**3**つの機能が追加されました。

1. **Administrator** (レベル 10 ユーザー) アカウントは消去できません。**Administrator** (下記) を参照してください。
2. ユーザーがそれぞれのアカウントを有する場合、**Default** ユーザーアカウントを消去することができます。**Default User** (下記) を参照してください。
3. データストレージの複製：主要なデータストレージに加え、各データを任意ロケーションへ保存することができます。**User Preference** (下記) を参照してください。

Account の設定

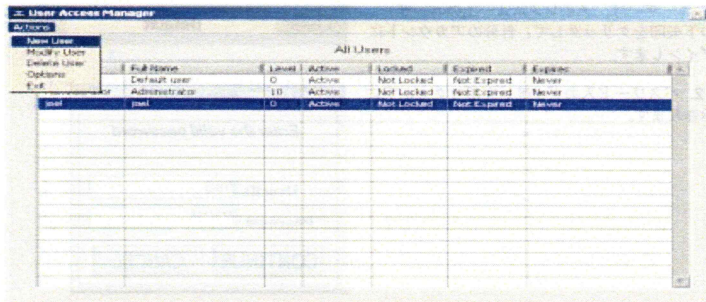


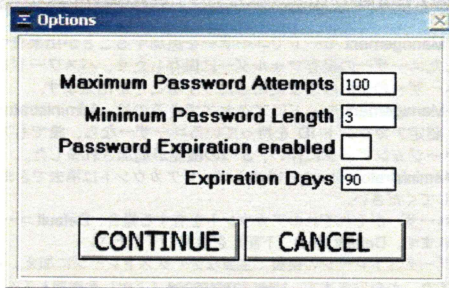
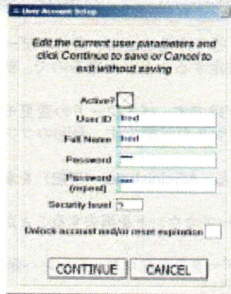
ソフトウェアのインストール時には、**NanoDrop** ソフトウェアに**2**つの指定ユーザー名が存在します。他のユーザーは、追加できます (下記 **Administrator** を参照)。

Administrator: Administrator は、すべてのアカウント設定や **NanoDrop** ソフトウェアの最上位セキュリティレベル (レベル 10) にフルアクセスできます。ソフトウェアをインストール時に、**Account Management** モードにアクセスできるのは、**Administrator** だけです。このソフトウェア・モードを使って、**Administrator** は、以下のことができます。

- **New User** の追加
- **User** の修正
- **User** の削除
- **Options** 入力を使っているアカウントに、条件を設定します。
- **Administrator** (最後のレベル 10 ユーザー) は削除することができません。

下記画面表示例を参照してください。:





注意：Administrator の初期パスワードは、“nanodrop”です。初期のアカウント設定後、Administrator は、このパスワードを変更することを推奨します。

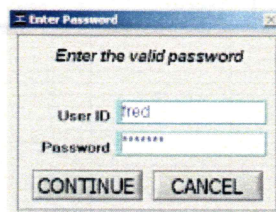
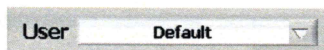
Default User: Default の設定では、測定モードのすべてにアクセスが可能です。これはパスワードで保護されていません。測定データはすべて、自動的に NanoDrop データフォルダー内の“Default” フォルダーに保存されます。Default フォルダー内には、NanoDrop の各測定モードの名前が付いたサブフォルダーがあります。注意：ユーザーが各自のユーザーアカウントを所有する必要がある場合、Administrator は Default ユーザーアカウントを使用不可にすることができます。

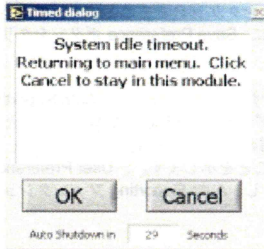
アカウントの アクセスレベル

現在の NanoDrop ソフトウェアにあるセキュリティレベルは、レベル 10 とレベル 0 (デフォルト)、その他の 3 つとなります。レベル 5 は New User アカウントへの推奨レベルです。レベルは 10 にも設定が可能ですが、別のユーザーに Account Management モードへのフルアクセスを可能にしてしまうことになるので、推奨できません。注意：最後のレベル 10 アカウント (Administrator) は削除できません。

アカウントのログイン

1. ユーザーは、メインメニュー上のユーザー名の下矢印をクリックして、自分のアカウントにログインします。
2. パスワード入力ダイアログボックスが下に表示されます。





注意：それぞれのユーザーアカウント（上記の例では、「fred）」は、4 時間を経過すると、自動的に「Default」に戻ります。

ユーザーがアプリケーション・モードのどれかを使用している場合、間もなく終了することを示す画面が 30 秒のカウントダウンと共に、表示されます。ユーザーが「CANCEL」を選択した場合、タイマーはリセットされ、個別ユーザーアカウント、そしてアプリケーションはそのまま残ります。時間が切れると、開いたアプリケーション・モードは終了し、「メインメニュー」と「Default」のユーザーに復帰します。

アカウントのログアウト

ソフトウェアの「System idle timeout」を過ぎるか、またはユーザーが「ログアウト」するかのいずれかまで、個別ユーザーのアカウントはアクティブのままです。後者は、メインメニュー上の「USER」の「Default」をクリックするだけで、実行できます。

アカウントのロックアウト

ユーザー固有のアカウントは、下記例のように、様々な形態でロックアウトになる可能性があります。

- 割り当てられた日数内でパスワードを変更しなかった。
- 連続して 99 回間違ったパスワードを入力した。
- Administrator（管理者）が特定のアカウントをロックした。

Administrator（*レベル 10）に限り、Account Management（アカウントの管理）の「Modify User（ユーザーの変更）」入力を使って、ロックされたアカウントのロックを解除できます。注意：すべてのアカウントは（たとえ Administrator であっても）、間違ったパスワード入力になされれば、ロックされる可能性があります。

Password. log ファイル

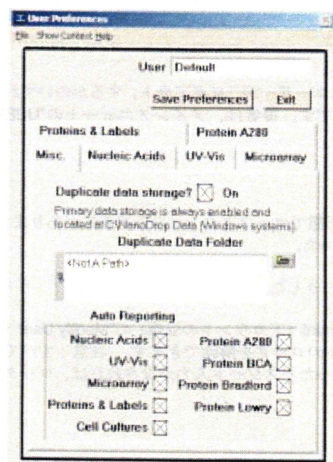
C:\NanoDrop Data\Log Files ディレクトリ内にある、このファイルには、すべてのアカウントユーザー ID とパスワードがそれぞれ含まれています。Administrator は、新規ユーザーのアカウントが追加されたら、その都度このファイルのコピーを作り、同じフォルダーに保存することを強く推奨します。Administrator のアカウントがロック状態になったら、password. log の最新コピーをリネームして、password. log ファイルとして使用することが可能です。そうでなければ、NanoDrop のソフトウェア CD からブランクの password. log ファイル を入手するか、またはウェブサイト www.nanodrop.com からダウンロードすることが可能です。この場合、すべてのユーザーアカウントを、Administrator が再構築する必要があります。

User Preference（初期設定画面）

個々のユーザーは、各アプリケーション（測定モード）において、最もよく使う設定を予め選択しておくことができます。

Duplicate data storage: 主要なデータストレージに加え、各データを任意ロケーションへ保存することができます。このオプションは Misc 下で選択することができます。Duplicate data storage のボックスを "On" にし、Duplicate Data Folder 下のファイルアイコンをクリックすることでファイルパスを選択してください。User Preference ウィンドウを終了する前に、Save Preference ボタンをクリックし、オルターナティブパスを保存します。

Auto Reporting : ユーザーは Auto Reporting オプションを選択することができます。Auto Reporting オプションによって、データは自動的に保存されます。このオプションは Misc 下で選択することができます。Auto Reporting の下に並んだ各アプリケーションの隣のボックスを選択してください。各ボックス内の X マークは、このファンクションが動作中であることを示します。。User Preference ウィンドウを終了する前に、Save Preference ボタンをクリックし、Auto Reporting ファンクションを保存します。



一度設定が保存されると、以後各自ユーザーが NanoDrop ソフトウェアにログインし、アプリケーションのどれかを開けば、自動的に設定が開かれます。

注意: User Preference は ".log" ファイルに保存されます。新規ソフトウェアへのアップグレード行なう際には、このファイルを保護しなくてはなりません。ソフトウェアのアップグレード後、User Preference が正常に機能しない場合は、".log" ファイルを適当なディレクトリへコピーしなくてはなりません。詳細については "Password.log" セクションを参照してください。

パスワードの変更

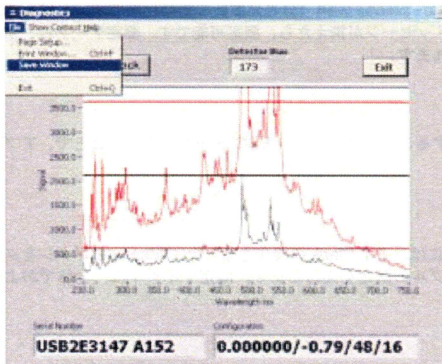
"Change password" でユーザーはそれぞれ、各自のパスワードを変更できるようになります。

注意: Administrator (管理者) は、Account Management の Options 入力を使って、パスワードに期限を設けるかどうかを設定します。設定する場合は、時期を日数で設定します。



Utilities and Diagnostics

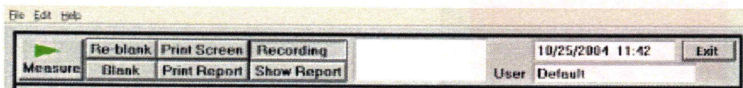
このモードは本体のトラブルの検査時に使用します。"Intensity check"を選択すると、固有のスペクトルが表示され、本体の状況を確認することができます。詳細については、セクション 15: トラブルシューティングを参照してください。



Dye/Chromophore Editor

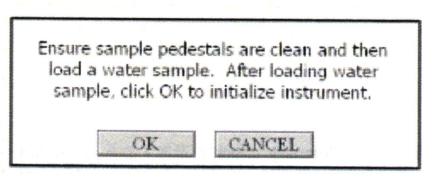
メインメニュー上の Dye/Chromophore Editor ボタンを選択すると、10 種の既存蛍光 dye に加え、MicroArray、Proteins and Labels 測定モードで、ユーザー独自の dye もしくは chromophore を設定し、使用することができます。

4. 各測定モードの共通機能



測定モードの起動

ソフトウェアが起動すると、下記のメッセージが表示されます。



最良の結果を出すために、下部測定部に dH_2O を乗せて、「OK」をクリックします。OK をクリック後、メッセージ **“Initializing Spectrometer- please wait** (分光光度計の初期化中です。しばらくお待ちください。)”が表示されます。このメッセージが消えたら、測定可能です。測定データは、すべて適切な保存ファイルに自動的に記録されます。

Escape Key (ESC)

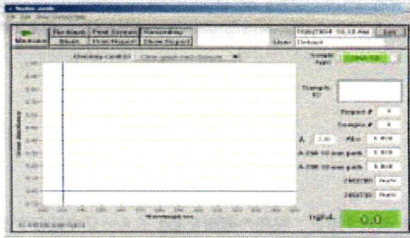
“ESC”キーで全てのスクリーンから **Exit** することができます。“ESC”キーを2回押すことで、アプリケーションを終了することが出来ます。

Measure (F1)

先ず **Measure** ボタンをアクティブにするには、まず **Blank** の操作をし、次に **“Measure”** ボタンをクリックするか **F1** を押すことによってサンプルの測定を実行します。測定サイクルは、全体でおよそ 10 秒かかります。

Blank (F3)

サンプルの測定を実行する前に、ブランクの測定を行なう必要があります (吸光度の算定について詳しくは、付録「ブランピングおよび吸光度の算定」を参照)。初期ブランク測定の実行直後、既存のサンプルスペクトルは消去され、初期ブランクが保存されたことを示す直線が画面に表示されます。



吸光度の算定について詳しくは、付録「ブランキングおよび吸光度の算定」を参照。

Reblank (F2)

Reblank では、次のサンプルの吸光度算定に使用する新しいブランクが設定されます。ただし、Blank (F3) 機能とは異なり、Re-blank 機能では、直前に測定したサンプルの吸光度スペクトルが再計算され、これが画面に表示されます。Re-blank 機能が使われると、以下のメッセージが表示されます。

**Blank Applied
To displayed
Spectrum**

吸光度の算定について詳しくは、付録「ブランキングおよび吸光度の算定」を参照。

画面の印刷

ユーザーはパソコンに接続されているプリンターを使用して、現在の画面を出力することができます。本機能は「Print Screen (F4)」を選択するか、Print ウィンドウよりプリンターを選択することで、利用できます。

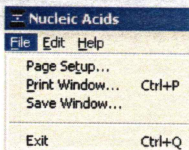
Print Screen (F4)

「Print Screen」ボタンでは、パソコンに接続されているデフォルトのプリンターに、現在の画面がプリントされます。

注意：システム設定では、#30256 [2-5/16" X 4"]の SHIPPING ラベルに Dymo Labelwriter 330 からプリントするようになっていますが、パソコンに接続されたプリンターであればどれでもプリント可能です。

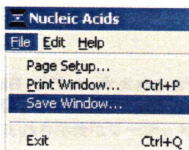
Print Window (Ctrl+P)

Print ダイアログは「File」プルダウンメニューから開始することができます。Print ダイアログから接続された任意のプリンターに印刷を指示できます。



.JPG イメージでの画面の保存

File プルダウンメニューから"Save Window"を選択すると、現在の画面を.jpg イメージで保存することができます。



Start Report (F6)

ユーザーは、最大 12、もしくは 32 件（測定モードによる）の測定結果をまとめてプリンターにプリントすることができます。この機能を開始するには、"Start Report"ボタンを押します。選択されると、このボタンは、"Recording"となり、選択が解除されるまで、この状態を続けます。選択されると、"Sample Report"が、レポートの最大エントリー数に達した時に、自動的にプリントされます。次のサンプル測定では、"Sample #"は自動的に1にリセットされ、"Report #"は1ずつ増えていきます。また、それ以前の"Sample Report"は消去され、更新されたサンプルレポートについてカウントします。

注意："Recording"がデフォルトとなるように設定することも可能です。詳細については、セクション 3 の"User Preference"をご覧ください。

Print Report (F5)

"Print Report" (F5) ボタンを選択すると、"Sample Report"に何かサンプル測定結果がある場合、既存の"Sample Report"がプリントされます。これにより、"Sample Report"の内容は消去されることはありません。

"Sample Report"は、レポートの最大エントリー数に達した際、自動的にプリントされます。この場合、"Sample Report"の内容はすべて消去されますが、すべてのデータは c:\NanoDrop Data (および、User Preference で選択した場合は、Duplicate ロケーション) に保存されます。

注意：システム設定では、#30256 [2-5/16" X 4"]の SHIPPING ラベルに Dymo Labelwriter 330 からプリントするようになっていますが、パソコンに接続されたプリンターであればどれでも プリント可能です。

Show Report (F7)

ユーザーは、'Show Report' ボタンを選択して、いつでも現在の'Sample Report' を構成するエントリーを表示することができます。個々の測定モードに固有の記述パラメータは、それぞれ個々のサンプル ID 用に保存されます。

'Show Report' ウィンドウ内には、3つのオプションがあります。

- **Save** – ユーザーが既存のレポートを保存できるようになります。
- **Print** – 現在のレポートをプリントします。
- **Exit** – 測定画面に戻ります。

Sample ID

ユーザーは、保存されたデータにおいて、後でサンプルを識別する目的で、'Sample ID' を入力することができます。サンプル ID は測定後に入力することは出来ません。

Report

'Report #'は測定されたサンプルのレポート数を示し、連続したレポートごとに番号が増加していきます。

Sample

'Sample #'以前は"Batch Index"と呼ばれていましたが、これは"Sample Report"の記録中に測定したサンプル数を示します。'Sample Report' が完全に一杯になるまで、連続して番号が増加します。現行の'Sample Report' の完了後、続く測定サンプルで自動的に"Sample #" がリセットされて、更新されたサンプルレポートについてカウントします。

Exit (Escape)

すべての測定モードとサポートしているオプションを閉じるコマンドです。

Help

'Context Help' は、メインメニュー、すべてのファンクション、そして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 (コンテキスト・ヘルプの表示)" を選択するか、または"Ctrl H" を選択すると開きます。いったん開くと、画面の要素上にカーソルを置くことで、その要素の説明が自動的に出てきます。'Context Help' は、ユーザーが選択を解除するまで、動作を続けます。

User's Manual

すべての測定モードおよびメインメニューから、PDF 版の取扱説明書にアクセスすることができます。メインメニュー上の"User's Manual"ボタンをクリックするか、各測定モードの Help プルダウンメニューから選択するか、もしくは *Start* → *Programs* → *NanoDrop* → (*Version Number*) で取扱説明書を開くことができます。

5. 核酸の測定モード

メインメニューより 'Nucleic Acid Measurement' ボタンを選択します。

核酸のサンプルは、NanoDrop® ND-1000 分光光度計を使って、濃度や純度が容易に確認できます。

サンプルの必要量

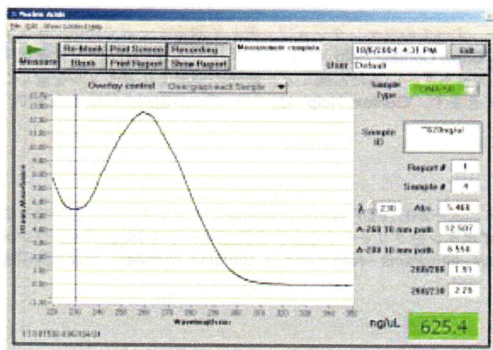
核酸サンプルを測定する時に、確実なサンプル液柱を形成するには、1ul のサンプルで十分であることが分かっています。ただし、ピペッターの精度やサンプルの特性によって、1.5-2ul のサンプルが必要となる場合もあります。

測定濃度範囲

NanoDrop® ND-1000 分光光度計では、核酸サンプルを最大 3700 ng/ul まで希釈しないで正確に測定します。これを実現するために、本体が自動で高濃度を検知して、1mm から 0.2mm の光路長に変えて吸光度を測定します。

およその 検出限界 (下限値) (ng/ul)	およその 検出限界 (上限値) (ng/ul)	測定の繰り返し精度 ($n \geq 5$, SD: ng/ul, CV: %)
1.5	3700 (dsDNA) 3000 (RNA) 2400 (ssDNA)	サンプル範囲 1.5-100 ng/ul: ± 1.5 ng/ul サンプル範囲 >100 ng/ul: $\pm 2\%$

結果表示画面



Sample Type: 測定する核酸の種類によって色分けされています。ユーザーは、dsDNA 用の "DNA-50"、RNA 用の "RNA-40"、あるいは他の核酸用の "Other" を選択することができます。デフォ

ルトの設定は、DNA-50 です。“Other” が選択される場合、ユーザーは 15-150 間の吸光係数を選択できます。この算定について、詳しくは付録「濃度の算出（ベールの法則）」を参照。

λ と Abs: ユーザーが選択する波長とその吸光度。波長は、カーソルを動かすか、またはその隣の上下矢印を用いて、選択できます。

A260: 260nm におけるサンプルの吸光度。(10mm の光路長に換算して表示)

注意: これは、1mm 光路長を用いた実測吸光度の 10 倍、また 0.2mm 光路長を用いた実測吸光度の 50 倍です。

A280: 280nm におけるサンプルの吸光度。(10mm の光路長に換算して表示)

注意: これは、1mm 光路長を用いた実測吸光度の 10 倍、また 0.2mm 光路長を用いた実測吸光度の 50 倍です。

260/280: 260nm と 280nm におけるサンプルの吸光度レシオ。これは DNA と RNA の純度を表しませんが、DNA では吸光度比 1.8 付近、また RNA では、2.0 付近を高純度とみなします。どちらの場合も、この比率が低いと認められる場合、タンパク質、フェノール、または 280nm 付近で強く吸収される他の不純物があることの可能性を示します。この比率に影響を及ぼす可能性のある要素について、詳しくはトラブルシューティング・セクションの「260/280 吸光度比」を参照。

260/230: 260nm と 230nm におけるサンプルの吸光度比。これは核酸純度の補足的な測定値です。高純度な核酸の 260/230 の値は、多くの場合それぞれ 260/280 の値を上回ります。この値は、通常 1.8 ~ 2.2 の範囲にあります。もし比率が範囲外の場合には、不純物がある可能性を示します。

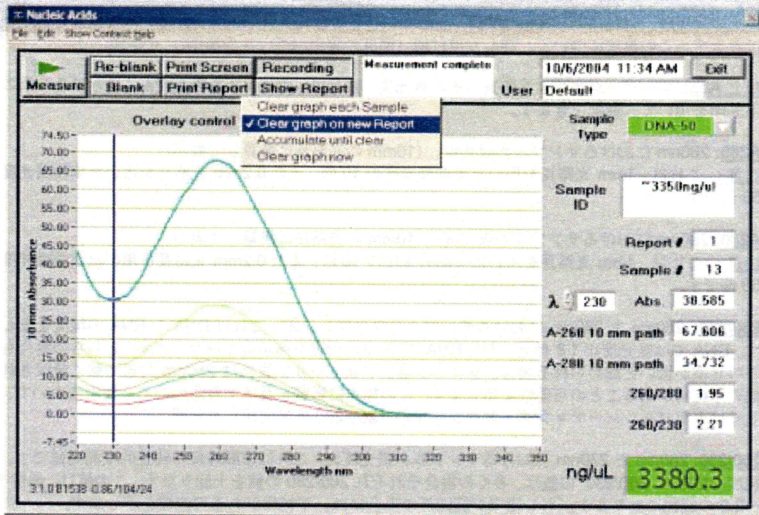
ng/ul: 算出されたサンプル濃度。(340nm をベースラインとした吸光度により算出しています)

スペクトルの Normalization

ベースラインもまた、ほとんどゼロの吸光度になるべき 340nm における吸光度の値に、自動的に設定されます。あらゆるスペクトルが、このゼロを基準としています。

Spectrum Overlay Control

本機能を使用することにより、同一画面上に複数のスペクトルを表示することができます。最新のサンプルプロットは太線で、それ以前のプロットは異なる色で表示されます。5-3 の図をご覧ください。デフォルトオプションでは測定ごとに画面がクリアされるように設定されています。Overlay Control では、デフォルト設定に加え、レポートごとの消去、もしくはユーザーが消去するまでのスペクトルの重ね書きができます。Clear graph now に設定すれば、すべてのプロットを消去します。Overlay ファンクションが機能している場合、核酸、およびタンパク質 A280 測定モードは 260nm での吸光度に合わせて、y 軸を自動的に割り出します。注意：Overlay ファンクションが機能しているとき、“Blank”を取り直しても、既存のサンプルスペクトルは消去されません。



6. MicroArray 測定モード

DNA マイクロアレイで使われる蛍光標識されたプローブを測定することにより、標識効率をかんとんに測定することが出来ます。この測定モードでは、DNA 濃度と色素ラベリング効率の測定が容易に行なえます。また約 1ul 当たり 0.2pmol の色素濃度での検出が可能です。

また、“Dye/Chromophore Editor”を使用すると、ND-1000 ソフトウェアに予め設定されていない蛍光色素を入力、保存することができます。デフォルト設定では、Dye1 は Cy3 に、Dye2 は Cy5 に設定されています。デフォルトの Dye (“User Preference”よりアクセス可能)に含まれる“None”は Dye1、Dye2 のどちらか、もしくは両方の使用を不可能とします。None を選択すると、その Dye に関わる計算と数値の表示が行われません。

サンプルの必要量

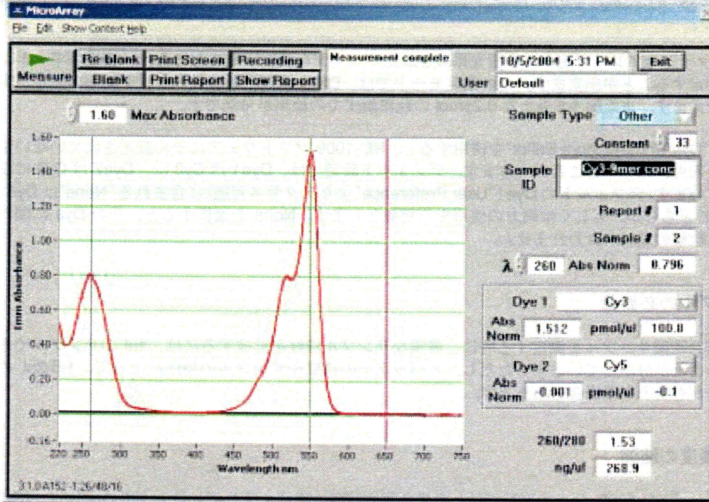
Dye 結合核酸サンプルを測定する時に、確実なサンプル液柱を形成するには、1ul のサンプルで十分であることが分かっています。ただし、ピペッターの精度やサンプルの特性によって、1.5-2ul のサンプルが必要となる場合もあります。

測定濃度の範囲

NanoDrop® ND-1000 分光光度計では、蛍光色素や核酸の濃度をそれぞれ最大 100 pmols/ul (Cy3) と 750ng/ul (DNA) まで、希釈しないで測定出来ます。サンプル濃度の範囲を以下の表に示します。

	およその 検出限界 (下限値) (pmol/ul)	およその 検出限界 (上限値) (pmol/ul)	測定の繰り返し精度 ($n \geq 5$, SD: pmol/ul, CV: %)
Cy3, Cy3.5, Alexa Fluor 555 および Alexa Fluor 660	0.20	100	サンプル範囲 0.20-4.0 pmol/ul: ± 0.20 pmol/ul サンプル範囲 >4.0 pmol/ul: $\pm 2\%$
Cy5, Cy5.5 and Alexa Fluor 647	0.12	60	サンプル範囲 0.12-2.4 pmol/ul: ± 0.12 pmol/ul サンプル範囲 >2.4 pmol/ul: $\pm 2\%$
Alexa Fluor 488 および Alexa Fluor 594	0.40	215	サンプル範囲 0.40-8.0 pmol/ul: ± 0.40 pmol/ul サンプル範囲 >8.0 pmol/ul: $\pm 2\%$
Alexa Fluor 546	0.30	145	サンプル範囲 0.30-6.0 pmol/ul: ± 0.30 pmol/ul サンプル範囲 >6.0 pmol/ul: $\pm 2\%$

結果表示画面



Max Absorbance: 縦軸の上限を変更する時に使用します。

Sample Type: 測定する核酸の種類によって色分けされています。ユーザーは、dsDNA 用の "DNA-50"、RNA 用の "RNA-40"、あるいは他の核酸用の "Other" を選択することができます。デフォルトの設定は、DNA-50 です。"Other" が選択される場合、ユーザーは 15-150 間の吸光係数を選択できます。この算定について、詳しくは付録「濃度の算出（ベールの法則）」を参照してください。

λ と Abs: ユーザーが選択する波長とその吸光度。波長は、カーソルを動かすか、またはその隣の上下矢印を用いて、選択できます。

Dye 1: 測定する Dye。

Abs. Norm: Dye 1 の Normalize された吸光度。

pmol/ul Dye 1: Dye 1 の吸光係数に基づく濃度。この計算について、詳しくは付録「濃度の算出（ベールの法則）」を参照。

Dye 2: 測定する Dye

Abs. Norm: Dye2 の Normalize された吸光度。

pmol/ul Dye 2: Dye2 の吸光係数に基づく濃度。この計算について、詳しくは付録「濃度の算出（ベールの法則）」を参照。

ng/ul : 算出されたサンプル濃度。(340nm をベースラインとした吸光度により算出しています)

260/280: 260nm と 280nm におけるサンプルの吸光度レシオ。これは DNA と RNA の純度を表します。DNA では吸光度比 1.8 付近、また RNA では、2.0 付近を高純度とみなします。どちらの場合も、この比率が低いと認められる場合、タンパク質、フェノール、または 280nm 付近で強く吸収される他の不純物があることの可能性を示します。この比率に影響を及ぼす可能性のある要素について、詳しくはトラブルシューティング・セクションの「260/280 吸光度比」を参照。

ベースラインの算定

ソフトウェアは自動的に 400-750 間でベースラインを算定します。緑の垂直線は Dye1 のピーク波長の位置を示し、赤い垂直線は Dye2 のピーク波長位置を示します。

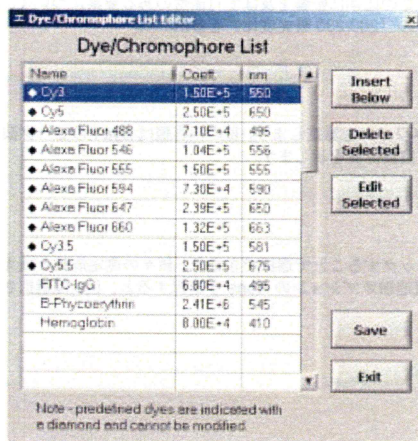
蛍光色素の選択

これらは、Dye 1 と Dye 2 のボックスをクリックすることで選択できます。個々の測定波長と吸光係数を利用して濃度計算を行っています。新規追加オプションの None を選択すると、Dye は選択されません。

- None
- ✓ Cy3
- Cy5
- Alexa Fluor 488
- Alexa Fluor 546
- Alexa Fluor 555
- Alexa Fluor 594
- Alexa Fluor 647
- Alexa Fluor 660
- Cy3.5
- Cy5.5

Dye/Chromophore Editor

メインメニューの **Dye/Chromophore Editor** ボタンを使用することにより、10 種の既存 fluorescent dye 設定に追加して、任意の dye もしくは chromophore を設定することができます。注意：既存の Dye を編集・修正することはできません。



7. UV-VIS 測定モード

メインメニューより **UV/VIS Measurement** を選択することで、**220nm~750nm** の全波長間での分光光度計として利用できます。全波長間でのスキャン波形と任意の波長での吸光度を表示します。サンプルの吸光度は、カーソルで個々のピーク値が測定できます。

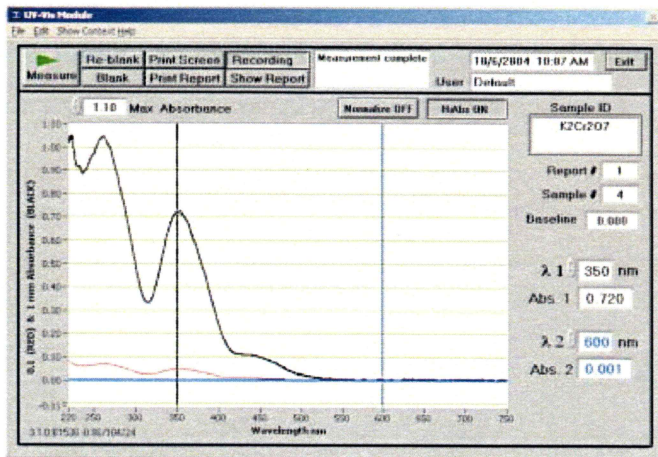
サンプルの必要量

サンプルを測定する時に、確実なサンプル液柱を形成するには、**1ul** のサンプルで十分であることが分かっています。ただし、ピペッターの精度やサンプルの特性によって、**1.5-2ul** のサンプルが必要となる場合もあります。

測定濃度の範囲

ND-1000 分光光度計では、**10mm** 光路長換算で **75Abs**、(**750.D**) 相当の吸光度まで測定できます。ただし、本体のシリアル番号が **500** 番以下のものでは、改良を加えない限り最大吸光度 **15Abs** (**150.D**) です。

結果表示画面



λ_1 /Abs1 と **λ_2 /Abs2**: 任意の波長での吸光度は、予め λ_1 と λ_2 と二波長選択されます。あるいは、測定後に 2 本のカーソルバーを動かして選択できます。

Baseline: ベースラインの吸光度を示し、これはユーザーが任意に動かすことができます。

Max Absorbance: このボックスの数値を考慮して、縦軸の最大吸光度を設定できます。

Hi Abs: 高濃度（光路長 10mm で 75OD 相当まで）のサンプルが直接測定できます。この機能は、ヘッダーバーの "Hi Abs" ボタンを選ぶと、選択されます。これが選択されると、吸光度は、短光路長（0.2mm）を使って測定され、表示例のように赤線でプロットされます。Sample ID に入力した情報は、サンプルのデータと共にファイルフォルダー "C:\NanoDrop Data\Username\UV-Vis HiAbs" に保存されます。

Normalize: 選択されると、ソフトウェアが自動的に 400nm～700nm の範囲で、吸光度の最小値を基準にスペクトルを標準化します。この機能はこの測定モードにおいてのみ、ON/OFF が可能です。



8. Protein A280 測定モード

タンパク質は、核酸とは異なり、著しい多様性を示します。紫外吸光法（A280 法）は、精製されたタンパク質に適用され、280nm における吸光度を示します。検量線の作成は必要なく、そのままタンパク質サンプル濃度の測定ができます。このモードでは、220~350nm の UV スペクトルが表示され、280nm (A280) におけるタンパク質の吸光度と濃度 (mg/ml) が表示されます。核酸モードのように、高濃度のタンパク質では 0.2mm の光路長に自動的に切り替わります。また核酸モードと同じように、タンパク質 A280 モードは、画面や保存データファイルに 10mm (1cm) 相当のデータを表示し保存します。

サンプルの必要量

タンパク質の中には、疎水性のものもあれば、また親水性ものもあり、測定されるサンプルによって表面張力は様々です。加えて、Bradford 試薬のような試薬内に界面活性剤などが存在すると、表面張力を大幅に変動することがあります。このような場合は、サンプルの量は増やすことにより、解決できます。タンパク質の測定には、2ul 程度のサンプルをおすすめします。サンプル量は吸光度や濃度算出に影響を及ぼしません。

タンパク測定後のクリーニング法

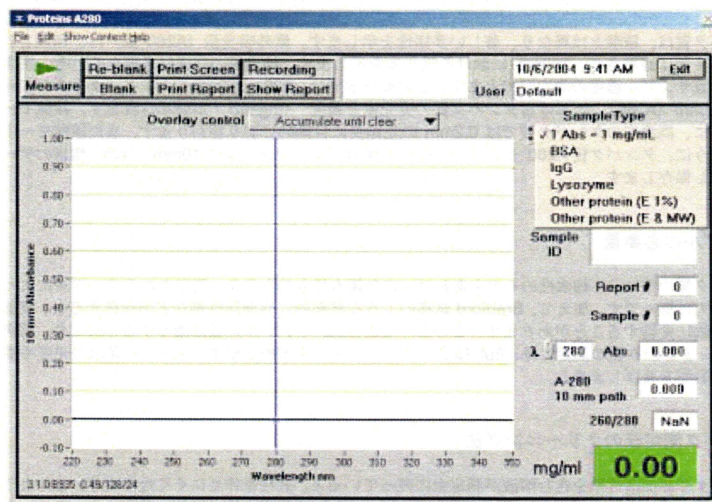
タンパクや界面活性剤を含む溶液が測定台に残っていると、液柱を作りにくくなります。このような液体を測定後は、測定面を 15~20 回拭いて下さい。それでも液柱が出来ない場合は、エタノールを含ませたラボーパーパーで拭き、その後、水を含ませたラボーパーパーで拭いた後、乾いたラボーパーパーで良く拭いて下さい。

測定濃度の範囲

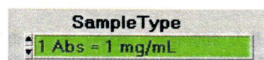
NanoDrop® ND-1000 分光光度計では、タンパク質サンプルを最大 100mg/ml (BSA) まで、希釈することなく測定します。高濃度サンプルでは、本体が自動で高濃度を検知して、0.2mm の光路長を使って吸光度を算定します。濃度範囲と標準的な再現精度の表を以下に示します。

	およその 検出限界 (下限値) (mg/ml)	およその 検出限界 (上限値) (mg/ml)	測定の繰り返し精度 (n ≥ 5, SD: mg/ml, CV: %)
精製 BSA	0.10mg/ml	100 mg/ml	範囲 0.05- 10 mg/ml: ± 0.10mg/ml 範囲 >10mg/ml: ± 2%

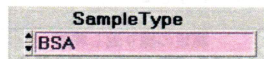
結果表示画面



Sample Type (サンプルの種類): 精製タンパク質の分析と濃度の測定には、6つのサンプルタイプから選択します。サンプルタイプは **Sample Type** ボックスをクリックして選べます。各サンプルタイプの内容については、以下に示します。



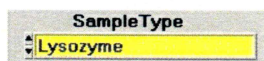
280nm において 1.0 O.D. (光路長 10mm) の吸光度をもつ 0.1% (1 mg/ml) のタンパク質溶液として測定した標準的な基準設定。



Bovine Serum Albumin (牛血清アルブミン)。未知のタンパク質 (サンプル) 濃度は、1% (10mg/ml) の BSA 溶液がもつ 280nm で 6.7 の吸光係数を用いて算定されます。



IgG。未知のタンパク質 (サンプル) 濃度は、1% (10mg/ml) の IgG 溶液がもつ、280nm で 3.7 の吸光係数を用いて算定されます。



Lysozyme (リゾチーム) の基準。不明なタンパク質 (サンプル) 濃度は、1% (10mg/ml) のリゾチーム溶液がもつ、280nm で 26.4 の吸光係数を用いて算定されます。

SampleType

Other protein (E & MW)

ϵ (x1000) 50.00

M.W. (kDa) 50.00

吸光係数 ($M^{-1} cm^{-1}$) と分子量 (MW) からタンパク質濃度が算定されます。

SampleType

Other protein (E 1%)

Ext. Coeff. E 1%
L/gm-cm 10.00

10mg/ml (1%) 水溶液に対する吸光係数 ($L gm^{-1}cm^{-1}$) からタンパク質濃度が算定されます。

λ と Abs.: この機能で、ユーザーは、波長カーソルバーを動かして、任意の波長に対する吸光度を表示できます。または、上下矢印を使って希望する波長に動かすか、波長カーソルバーで変更できます。

A280 10-mm Pass: 測定されたサンプルの 280nm における 10mm 光路長相当の吸光度。

A260/280: 260nm と 280nm におけるサンプル吸光度の比率。

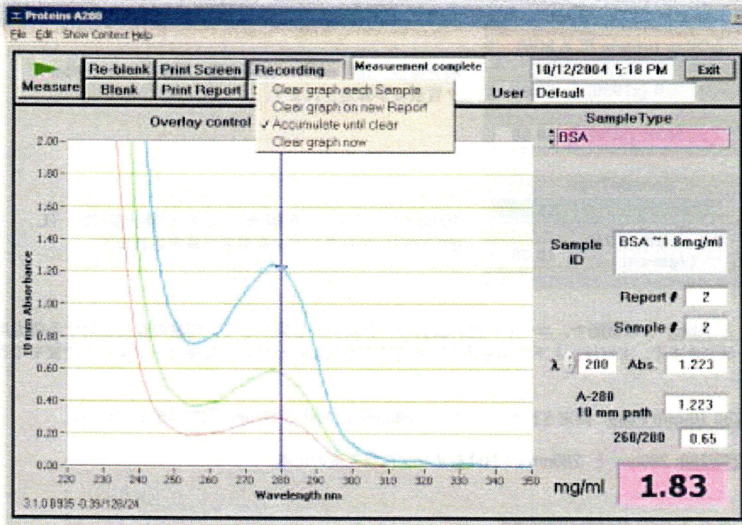
スペクトルの Normalization

340nm における吸光度をベースラインの基準(ゼロ)に設定しています。すべてのデータは normalize され、同じフォーマットで保存されます。

Spectrum Overlay Control

本機能を使用することにより、同一画面上に複数のスペクトルを表示することができます。最新のサンプルプロットは太線で、それ以前のプロットは異なる色で表示されます。8-4 の図をご覧ください。

デフォルトオプションでは測定ごとに画面がクリアされるように設定されております。**Overlay Control** では、デフォルト設定に加え、レポートごとの消去、もしくはユーザーが消去するまでのスペクトルの重ね書きができます。**Clear graph now** に設定すれば、すべてのプロットを消去します。**Overlay** ファンクションが機能している場合、核酸、およびタンパク質 A280 測定モードは 260nm での吸光度に合わせて、y 軸を自動的に割り出します。注意：**Overlay** ファンクションが機能しているとき、“Blank”を取り直しても、既存のサンプルスペクトルは消去されません。



9. Proteins & Labels 測定モード

この測定モードは波長比を用いて、タンパク質濃度 (A280nm)、プロテインアレイに結合した fluorescent dye の標識効率、もしくは metalloprotein (ヘモグロビン等) の純度を測定します。ユーザーは "Dye/Chromophore Editor" を使用し、ND-1000 のソフトウェアにデフォルト設定されていない fluorescent dye を入力・保存することができます。Proteins & Labels 測定モードのデフォルト設定は Dye1 へ Cy3、Dye2 へ "None" となっています。デフォルトの Dye ("User Preference" よりアクセス可能) に含まれる "None" は Dye1、Dye2 のどちらか、もしくは両方の使用を不可能とします。None を選択すると、その Dye に関わる計算と数値の表示が行われません。

サンプルの必要量

タンパク質の中には、疎水性のものもあれば、また親水性のものもあり、測定されるサンプルによって表面張力は様々です。加えて、Bradford 試薬のように試薬内に界面活性剤などが存在すると、表面張力を大幅に変動することがあります。このような場合は、サンプルの量を増やすことにより、解決できます。タンパク質の測定には、**2 μ L** 以上のサンプルをおすすめします。サンプル量は吸光度や濃度の算出に影響を及ぼしません。

タンパク測定後のクリーニング法

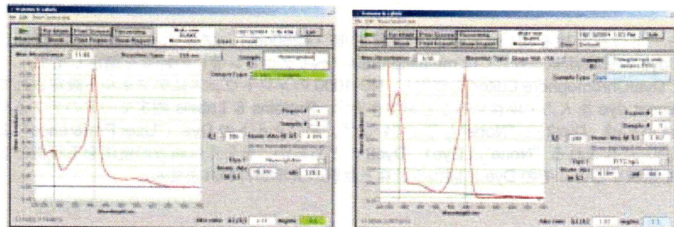
タンパクや界面活性剤を含む溶液が測定台に残っていると、液柱を作りにくくなります。このような液体を測定後は、測定面を **15~20** 回拭いてください。それでも液柱ができない場合は、エタノールを含ませたラボーパーで拭き、その後、水を含ませたラボーパーで拭いた後、乾いたラボーパーでよく拭いてください。

測定濃度の範囲

NanoDrop[®]ND-1000 分光光度計ではタンパク質サンプルを 20mg/ml (BSA) まで希釈することなく正確に測定します。濃度範囲と標準的な再現精度の表を以下に示します。

	およその 検出限界 (下限値)	およその 検出限界	測定の繰り返し精度 ($n \geq 5$, SD: mg/ml, CV: %)
精製 BSA	0.10 mg/mL	20 mg/mL	範囲 0.05- 10 mg/mL: ± 0.10 mg/mL 範囲 > 10 mg/mL: $\pm 2\%$
Cy3	0.2 μ M	100 μ M	範囲 0.20- 4.0 pmol/ μ L: ± 0.20 pmol/ μ L 範囲 > 4.0 pmol/ μ L: $\pm 2\%$

結果表示画面



Max Absorbance: 縦軸の上限を変更するときに使用します。

Sample Type: 精製タンパク質&Labels の解析と濃度測定に使用するサンプルは、タンパク質 A280 と同じ 6 つのサンプルタイプから選択できます。サンプルタイプは **Sample Type** ボックスをクリックするか、**Sample Type** ボックス左の上下矢印を使用し、ボックス内をスクロールすることで選べます。各サンプルタイプの詳細については本文セクション 8: Protein A280 測定モードの記述を参照してください。

$\lambda 3$:

Norm Abs @ $\lambda 3$: は各波長における標準吸光度です。(10mm 光路長換算)

Dye 1: 選択された Dye です。

Norm Abs @ $\lambda 1$: Dye1 の標準吸光度。(10mm 光路長換算)

μM : Dye 1 の吸光係数をベースに算出された濃度。計算式の詳細については、本文付録 C の濃度の算出 (ベールの法則) を参照してください。

Dye 2: 選択された Dye です。

Norm Abs @ $\lambda 2$: Dye2 の標準吸光度。(10mm 光路長換算)

μM : Dye 2 の吸光係数をベースに算出された濃度。計算式の詳細については、本文付録 C の濃度の算出 (ベールの法則) を参照してください。

Abs ratio $\lambda 1/\lambda 3$: ユーザの選択した波長での吸光度 ($\lambda 3$) に対して Dye1 の吸光度の比率です。

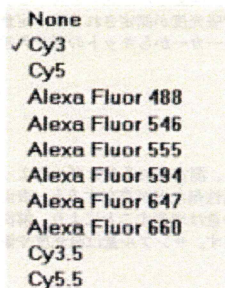
mg/mL: 吸光度 280nm~340nm でのタンパク質の濃度を示します。

ベースラインのタイプ

Proteins & Labels 測定モードでは、**Baseline Type** を 2 つから選択することができます。デフォルトの設定 (User Preferences) は表示を 750nm でノーマライズしております。また、400-750 Slope Baseline Type では、750nm で画面をノーマライズし、400-750nm の範囲でスロープ状のベースラインをノーマライズします。

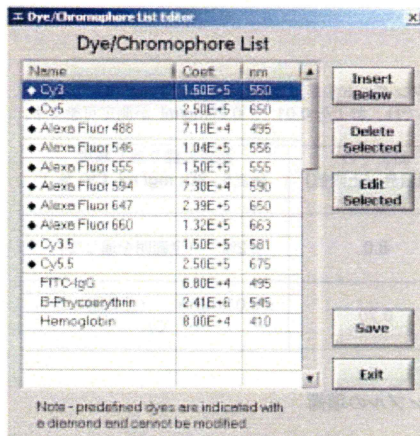
蛍光色素の選択

これらは、**Dye 1** と **Dye 2** のボックスをクリックすることで選択できます。個々の測定波長と吸光係数を利用して濃度計算を行っています。新規追加オプションの **None** を選択すると、**Dye** は選択されません。



Dye/Chromophore Editor

メインメニューの **Dye/Chromophore Editor** ボタンを使用することにより、10種の既存 fluorescent dye 設定に追加して、任意の dye もしくは chromophore を設定することができます。注意：既存の Dye を編集・修正することはできません。



10. タンパク質 BCA 測定モード

BCA (Bicinchoninic Acid) タンパク質定量法は、タンパク質濃度を測定する方法の一つです。タンパク質溶液や UV (280nm) 吸光度の高い物質がある 場合によく利用されます。タンパク質 **A280** 法とは異なり、**BCA** 定量法では、不明なタンパク質を測定する前に、検量線の作成が必要になります。タンパク質と作成される **Cu-BCA** キレートは、**562nm** の波長で吸光度が測定されます。定量に使用される、予め調整された **BCA** や **CuSO₄** の試薬は、数多くのメーカーからキットの形で入手できます。それぞれのメーカーの説明書に従い調整してください。

サンプルの必要量

タンパク質の中には、疎水性のものもあれば、また親水性のものもあり、測定されるサンプルによって表面張力は様々です。加えて、**Bradford** 試薬のような試薬内に界面活性剤などが存在すると、表面張力を大幅に変動することがあります。このような場合は、サンプルの量は増やすことにより、解決できます。タンパク質の測定には、**2ul** 程度のサンプルをおすすめします。サンプル量は吸光度や濃度算出に影響を及ぼしません。

タンパク測定後のクリーニング法

タンパクや界面活性剤を含む溶液が測定台に残っていると、液柱を作りにくくなります。このような液体を測定後は、測定面を **15~20** 回拭いて下さい。それでも液柱が出来ない場合は、エタノールを含ませたラボーパーで拭き、その後、水を含ませたラボーパーで拭いた後、乾いたラボーパーで良く拭いて下さい。

測定濃度の範囲

NanoDrop® ND-1000 分光光度計では、スタンダード法が **0.20mg/ml** から数 **mg/ml (mg/ml)** まで測定可能です。**mini-BCA (ミニ BCA)** 法では、およそ **0.01 ~ 0.20mg/ml** が測定可能です。

	およその 検出限界 (下限値) (mg/ml)	およその 検出限界 (上限値) (mg/ml)	測定の繰り返し精度 ($n \geq 5$, SD: mg/ml, CV: %)
スタンダード BCA	0.2	8.0	±2% (全範囲を通して)
ミニ BCA	0.01	0.20	±0.01 mg/ml (全範囲を通して)

BCA キット、プロトコル、およびサンプルの準備

市販の **BCA** タンパク質測定キットのメーカーは、通常次のような **2** 種類の異なるタンパク質濃度範囲に対して、手順を説明しています。

- スタンダードBCA-20:1の試薬/サンプル 容量比率を使用。スタンダードとして **BCA 試薬 80ul** に対して、**最小値 4ul** のサンプルの使用を推奨します。
- ミニBCA-1:1の試薬/サンプル 容量比率を使用。PCR チューブやマイクロプレートを使用し、例えば **10ul** のサンプルと **10ul** の **BCA 試薬** を使って準備します。**注意: 60°C** で定量を実行するので、使用量を倍にすると、密閉したリアクションチューブ内の蒸発・凝縮による結果のずれが少なくなります。

キットの試薬に加え、検量線を作成するためのタンパク質標準 (**BSA** や **IgG**) も、各メーカーによって提供されています。推奨される反応時間や温度をはじめ、定量に対しては、メーカーのプロトコルに従います。さらに、対象の分析範囲 (**mg/ml**) をカバーする、それぞれのスタンダード (**BSA** や **IgG**) で希釈系列サンプルを準備します。

結果表示画面

View Standard Curve (F8) : このボタンを選択すると、検量線を見ることができます。

Sample Type: Reference, Standard1~5、そして **Sample** が選択できます。ソフトウェアは **Reference**、**Standard** の測定を促し、その後サンプルの測定を可能にします。

Replicate #: Reference と **Standard** の測定回数を示します。

Reset Window (F11) : すべての **Standard** の測定結果を消去します。

Reset This Std (F12) : 選択された **Standard** の測定結果を消去します。

Absorbance at 562nm: Cu-BCA 化合物の **562nm** における吸光度です。

Cursor λ: カーソルバーをドラッグして移動することにより、任意の波長を設定できます。

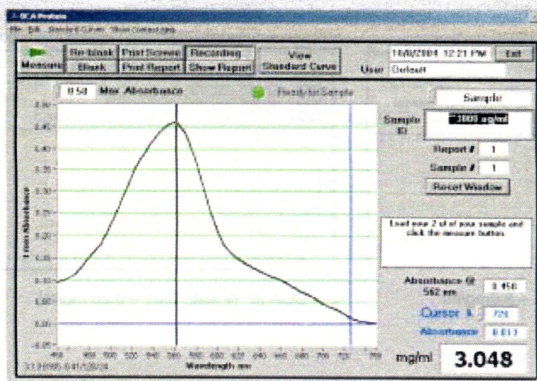
Absorbance : Cursor λにおける吸光度を示します。

mg/ml: サンプルの濃度を示します。

BCA 測定の操作

メーカーのキットの説明書に従い、BCA 法による測定を行なう時は、その都度検量線の作成が必要になります。 検量線の作成は、ソフトウェアに組み込まれています。検量線は、**Reference** (BCA 試薬と溶媒のみ) と最大 **5** 個までの **Standard** を利用でき、それぞれの測定は **5** 回まで測定できます。

タンパク質濃度の測定には、3つの手順ステップがあります。検量線の作成を含めた、操作手順は次の通りです。



ステップ 3: Samples の測定

いったん検量線が設定されると、赤色 インジケータライトが緑色になり、サンプルの測定を開始できます。サンプル濃度は、用いたスタンダード濃度の範囲内でしか測れません。検量線は点と点を結ぶインターポレーション直線となっています。

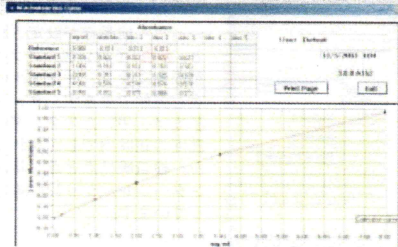
Standard Curve Features

Standard Curve プルダウンメニューより **Save as** もしくは **Load** ファンクションを選択することで、検量線の保存およびリロードが可能となります。

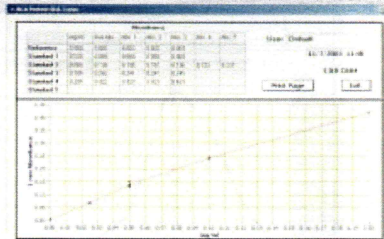


Bradford 法によるタンパク質定量とは異なり、BCA 法タンパク質定量 (562nm) は、定量範囲全体にわたって直線的で、約 10 倍以上のシグナルの利用ができます。下に検量線の代表的な例を示します。 **View Standard Curve Button** を選択することで検量線を見ることができます。

表上の削除するデータポイントを選んだ後、**Delete Point** ボタンを選択すると、ポイントが削除されます。



Standard BCA 法 検量線: 0.2 – 8.0mg/ml



ミニ BCA 法 検量線: 0.01 – 0.20 mg/ml

BCA 測定モードの終了

すべての未知濃度サンプルの測定を終えるまでは、絶対にBCA測定モードを終了しないで下さい!

11. タンパク質 Lowry 測定モード

Lowry 改良法は、広く用いられている Lowry 法に替わるタンパク質濃度の測定法です。BCA や Bradford アッセイのように、Lowry 改良法も未知濃度のタンパク質測定の際には検量線の作成が必要となります。Lowry 改良法の手順には、アルカリ溶液中でのタンパク質と cupric sulfate の反応による、銅-タンパク質錯体の生成を含みます。Folin-Ciocalteu 試薬はキレートされた銅錯体と反応し、650nm で測定され、405nm でノーマライズされる青い親水性の産物を生成します。下記アッセイで使用する試薬は多くのメーカーからキットの形で入手できます。使用に関しては、各メーカーの指示に従ってください。

サンプルの必要量

タンパク質の中には、疎水性のものもあれば、また親水性のものもあり、測定されるサンプルによって表面張力は様々です。加えて、Bradford 試薬のように試薬内に界面活性剤などが存在すると、表面張力を大幅に変動することがあります。このような場合は、サンプルの量を増やすことにより、解決できます。タンパク質の測定には、2 μ L 以上のサンプルをおすすめします。サンプル量は吸光度や濃度の算出に影響を及ぼしません。

タンパク測定後のクリーニング法

タンパクや界面活性剤を含む溶液が測定台に残っていると、液柱を作りにくくなります。このような液体を測定後は、測定面を 15~20 回拭いてください。それでも液柱ができない場合は、エタノールを含ませたラボーパーで拭き、その後、水を含ませたラボーパーで拭いた後、乾いたラボーパーでよく拭いてください。

測定濃度の範囲

NanoDrop[®]ND-1000 分光光度計では、0.20mg/mL~8.0mg/mL の範囲で Lowry 改良法を実行できます。濃度範囲と標準的な再現精度の表を以下に示します。

	およその 検出限界 (下限値) (mg/ml)	およその 検出限界 (上限値) (mg/ml)	測定の繰り返し精度 ($n \geq 5$, SD: mg/ml, CV: %)
Lowry 改良法	0.2	8.0	$\pm 2\%$ (すべての範囲を通して)

Lowry 改良法キット、プロトコル、およびサンプルの準備

市販の Lowry タンパク質測定キットのメーカーは、通常、使用手順について説明しています。それぞれ参照してください。

キットの試薬に加え、検量線を作成するためのタンパク質標準 (BSA) も各メーカーによって提供されています。推奨される反応時間や温度をはじめ、定量に対しては、メーカーのプロトコルに従って

ください。さらに対象の分析範囲 (mg/mL) をカバーする、それぞれのスタンダード (BSA 等) で希釈系列サンプルを準備します。注: ND-1000 ではより高濃度のタンパク質も測定することができます。その場合、メーカーによって提供されるよりも、高濃度のタンパク質標準作成する必要があります。

結果表示画面

View Standard Curve (F8): このボタンを選択すると検量線を見ることができます。

Sample Type: Reference、Standard 1~5、そして Sample が選択できます。ソフトウェアは Reference、Standard の測定を促し、その後サンプルの測定を可能にします。

Replicate #: Reference と Standard の測定回数を示します。

Reset Window (F11): すべての Standard の測定結果を消去します。

Reset This Std (F12): 選択された Standard の測定結果を消去します。

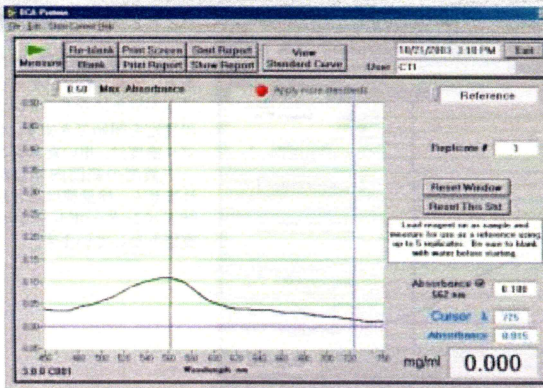
Absorbance at 650nm: Cu 化合物の 650nm での吸光度です。

Cursor λ : カーソルバーをドラッグして移動することにより、任意の波長を設定できます。

mg/mL: サンプルの濃度を示します。

Lowry 測定の操作

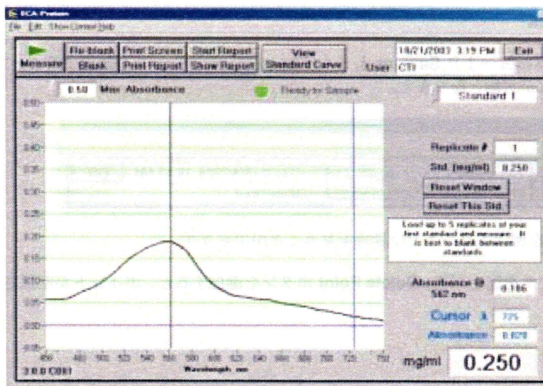
メーカーのキットの説明書に従い、Lowry 改良法による測定を行なう時は、その都度検量線の作成が必要となります。検量線の作成はソフトウェアに組み込まれています。検量線は Reference (Lowry 改良法試薬のみ) と Standard の使用により作成されます。検量線は 5 つの異なる Standard につき 5 回まで測定できます。タンパク質濃度の測定には以下の 3 つの手順ステップがあります。検量線の作成を含めた操作手順は次の通りです。



ステップ 1: "Reference"
(BCA 試薬と溶媒) の測定

このソフトウェアでは、最低1つの **Standard** と **Reference** または2つの **Standard** が測定されるまで、**Sample** の測定ができません。

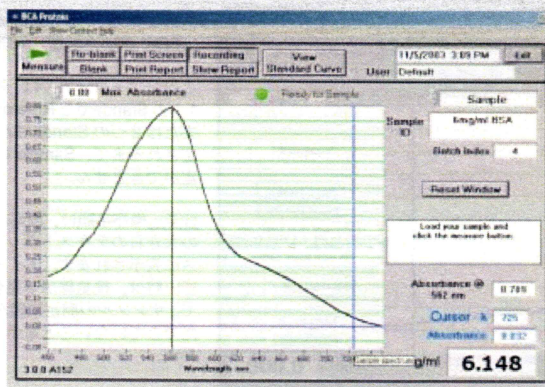
注意: 操作手順は、画面右側の大き目のテキストボックスに表示されます。ライトが赤い時は、検量線が不完全で、サンプルの測定準備がまだできていないことを示します。



ステップ 2: **Standard** の測定

それぞれの **Standard** の最大5個まで測定できます。このソフトウェアでは、最低1つの **Standard** と **Reference** または2つの **Standard** が測定されるまで、**Sample** の測定ができません。

誤った操作をした場合や、データがおかしい場合は、"Reset This Standard" (F12) を押してその **Standard** 液を取り直し、"Reset window" を押してすべてのデータを取り直すことができます。



ステップ 3: Samples の測定

いったん検量線が設定されると、赤色 インジケータライトが緑色になり、サンプルの測定を開始できます。サンプル濃度は、用いたスタンダード濃度の範囲内でしか測れません。検量線は点と点を結ぶインターポレーション直線となっています。

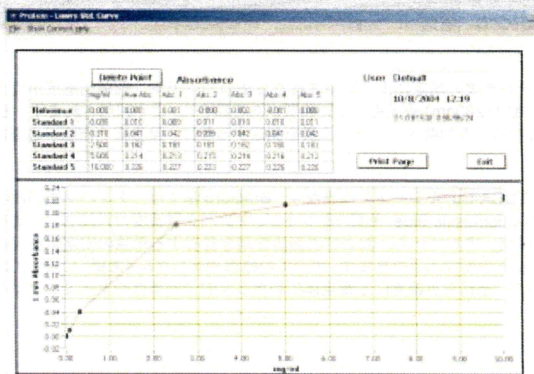
Standard Curve Features

Standard Curve プルダウンメニューより **Save as** もしくは **Load** ファンクションを選択することで、検量線の保存およびリロードが可能となります。



View Standard Curve Button を選択することで検量線を見ることができます。

表上の削除するデータポイントを選んだ後、**Delete Point** ボタンを選択すると、ポイントが削除されます。



Lowry 改良法の検量線：
0.2 - 0.8 mg/ml

Lowry 測定モードの終了

すべての未知濃度サンプルの測定を終えるまでは、絶対に Lowry 測定モードを終了しないでください。

12. タンパク質 Bradford 測定モード

Bradford 定量法も、タンパク質濃度の測定によく利用される方法の一つです。低検出感度が要求される低濃度タンパク質溶液や UV (280nm) 吸光度の高い物質がある場合に、よく利用されます。BCA 法と同じように、Bradford 法では、未知濃度のタンパク質を測定する前に、検量線の作成が必要になります。

BCA 定量法でモニターされる BCA-Cu キレートとは異なり、Bradford 法では、タンパク質が誘発する吸光度 による 595nm への Coomassie Blue 色素のシフトが、タンパク質濃度の尺度として使用されます。Coomassie Blue 試薬、アルコール、および表面活性剤を含有する単独の安定試薬混合液が、数多くのメーカーからキットの形で入手できます。すべての標準やサンプル (未検) に対しては、メーカーのアドバイスに従って、それらが確実に定量全体にわたって同一の条件やタイミングになっているようにします。

サンプルの必要量

タンパク質の中には、疎水性のものもあれば、また親水性ものもあり、測定されるサンプルによって表面張力は様々です。加えて、Bradford 試薬のような試薬内に界面活性剤などが存在すると、表面張力を大幅に変動することがあります。このような場合は、サンプルの量は増やすことにより、解決できます。タンパク質の測定には、2ul 程度のサンプルをおすすめします。サンプル量は吸光度や濃度算出に影響を及ぼしません。

タンパク測定後のクリーニング法

タンパクや表面活性剤を含む溶液が測定台に残っていると、液柱を作りにくくなります。このような液体を測定後は、測定面を 15~20 回拭いて下さい。それでも液柱が出来ない場合は、エタノールを含ませたラボペーパーで拭き、その後、水を含ませたラボペーパーで拭いた後、乾いたラボペーパーで良く拭いて下さい。

測定濃度の範囲

NanoDrop® ND-1000 分光光度計では、標準の Bradford 定量法を使用して、100ug/ml から数千マイクログラム/ml までの未検タンパク質の濃度が、測定できます。最適な直線性は、100ug/ml ~ 1000ug/ml の範囲にあります。ミニ Bradford 定量法では、およそ 15ug/ml ~ 125ug/ml の範囲がカバーされます。

Coomassie 色素-色素、および Coomassie 色素-タンパク質の集合は、Coomassie 色素ベースのタンパク質検定でしばしば見かけます。時間が経過すると、吸光度の表示に大きな揺らぎを引き起こす可能性がある、微粒子が観察できます。本体の 1.0mm 光路長、Bradford (Coomassie 色素) 試薬の濃度、そして酸性 pH の結果として、595nm における全検体 (タンパク質・色素) のシグナルが 0.150A までに抑えられることに注意することも重要です。抑えられた定量シグナルを Bradford 定量法で入手した時には特に、Standards (標準) や Samples (サンプル) (未検) を 3 回測定するのは良い方法です。

	およその 検出限界 (下限値) (ug/ml)	およその 検出限界 (上限値) (ug/ml)	測定の繰り返し精度 (n ≥ 5, SD: ug/ml, CV: %)
Standard Bradford 法	100 ug/ml	8000 ug/ml	サンプル範囲 100-500 ug/ml: ± 25 ug/ml サンプル範囲 500-8000 ug/ml: ± 5%
ミニ Bradford 法	15 ug/ml	125 ug/ml	サンプル範囲 15-50 ug/ml: ± 4 ug/ml サンプル範囲 50-125 ug/ml: ± 5%

Bradford キット、プロトコル、およびサンプルの準備

市販の BCA タンパク質測定キットのメーカーは、通常次のような 2 種類の異なる濃度範囲に対して、手順を説明しています。

- **Standard 定量 - 50:1 の試薬/サンプル 容量比率を使用。** スタンダードの準備として、Bradford 試薬 200ul に対して、最小値 4ul のサンプルの使用が推奨されます。
- **ミニ定量 - 1:1 の試薬/サンプル 容量比率を使用。** PCR チューブやマイクロプレートを用い、10ul のサンプルと 10ul の Bradford 試薬を使って準備します。

キットの試薬に加え、検量線を作成するためのタンパク質標準 (例、BSA) も、メーカーによって提供されています。メーカーのプロトコルに従い、対象の分析範囲 (ug/ml) をカバーする標準 (BSA) の希釈を用います。

結果表示画面

View Standard Curve (F8) : このボタンを選択すると、検量線を見ることができます。

Sample Type: Reference、Standard1~5、そして Sample が選択できます。ソフトウェアは Reference、Standard の測定を促し、その後サンプルの測定を可能にします。

Replicate #: Reference と Standard の測定回数を示します。

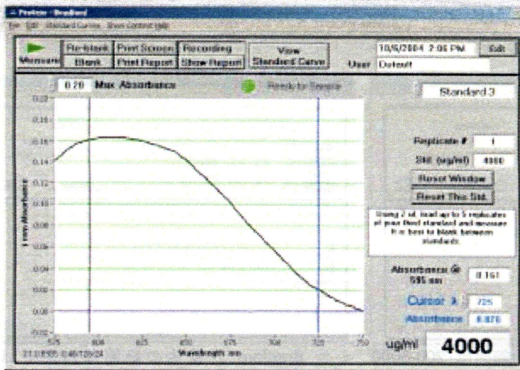
Reset Window (F11) : すべての Standard の測定結果を消去します。

Reset This Std. (F12) : 選択された Standard の測定結果を消去します。

Absorbance at 595nm : タンパクと色素の結合による 595nm における吸光度です。

Cursor λ と Absorbance : カーソルバーをドラッグして移動することにより、任意の波長を設定し、cursor λ における吸光度を示します。
注意: この値は自動的な計算には用いられません。

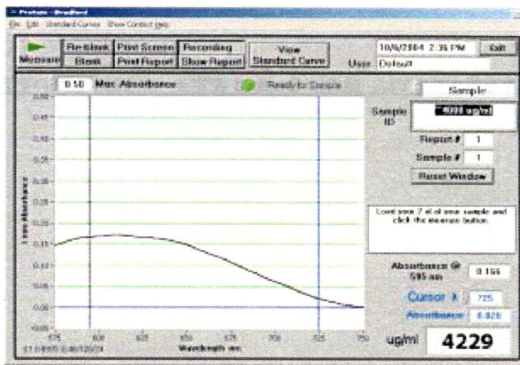
ug/ml: サンプルの濃度を示します。



ステップ 2: Standard の測定

それぞれの Standard の最大 5 個まで測定できます。このソフトウェアでは、最低 1 つの Standard と Reference または 2 つの Standard が測定されるまで、Sample の測定ができません。

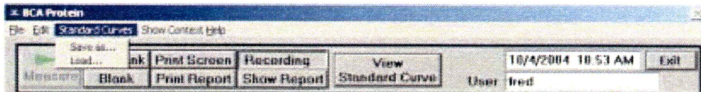
誤った操作をした場合や、データがおかしい場合は、"Reset This Standard" (F12) を押してその Standard 液を取り直したり、"Reset window" を押してすべてのデータを取り直したりすることができます。ステップ 3: Samples の測定



いったん検量線が設定されると、赤色 インジケータライトが緑色になり、サンプルの測定を開始できます。サンプル濃度は、用いたスタンダード濃度の範囲内では測れません。検量線は点と点を結ぶインターポレーション直線となっています。

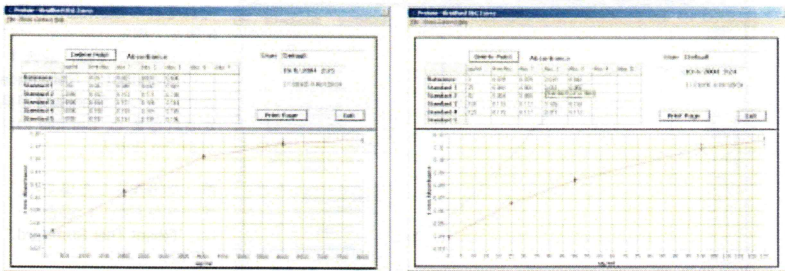
Standard Curve Features

Standard Curve プルダウンメニューより Save as もしくは Load ファンクションを選択することで、検量線の保存およびロードが可能となります。



View Standard Curve Button を選択することで検量線を見ることができます。

表上の削除するデータポイントを選んだ後、**Delete Point** ボタンを選択すると、ポイントが削除されます。



スタンダード Bradford 曲線の範囲は 200-8000 ミニ Bradford 定量法の範囲はおよそ 15 ~ 100ug/ml。直線範囲が 100~1000ug/ml であることに注意。

Bradford モードの終了

すべての未知濃度サンプルの測定を終えるまでは、絶対に **Bradford 測定モードを終了しないで下さい!**

13. セルカルチャー測定モード

分光光度計を使った非吸収性浮遊細胞の測定は、濁度計などの代わりに良く使われる方法です。分光光度計を扱うメーカーによって測定法に違いがあるようです。

“Cell Cultures” 測定モードでは、サンプルスペクトルが 220nm～700nm まで表示されます。一般的な 600nm 固定波長での吸光度と波長カーソルバーによる任意の波長での吸光度測定が可能です。

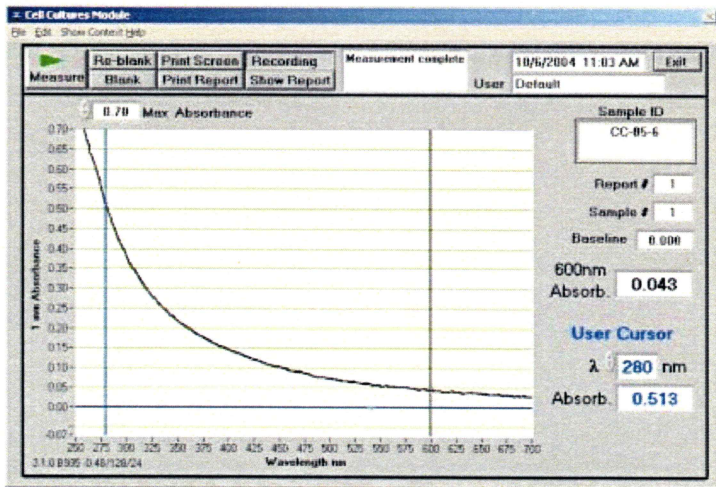
サンプルの必要サイズ

確実なサンプル液柱を形成するには、1ul のサンプルで十分であることが分かっています。ただし、ヒペッターの精度やサンプルの特性によって、2ul のサンプルが必要となる場合もあります。

細胞懸濁液濃度

1mm 光路長であるため、ND-1000 では、キューベットを使用した (10mm) 分光光度計が測定できる 10 倍濃度の吸光度が測定できます。スペクトル全体が表示されるため、600nm 以外における吸光度を偵察できます。

結果表示画面



600nm Absorbance : 600nm における 1mm 光路長での吸光度を示します。

λ & Absorb : 波長カーソルバーを動かすか、 λ のボックスに直接任意の波長を入れて、その波長における吸光度を **Absorb** に表示します。

Baseline : 測定後、ベースラインはベースラインをドラッグして動かすことができます。吸光度は動かしたベースラインに従って、表示し直します。

Max Abs : 縦軸のスケールを設定し直すのに使用します。

サンプルの均質性

サンプルは測定前に十分再浮遊させた、均一な懸濁液よりピペッティングし、素早く測定する必要があります。

14. お問い合わせ先

国内輸入元

株式会社 スクラム
〒130-0021
東京都墨田区緑 1-8-9 A&Y ビル
TEL: (03) 5625-9711 Fax: (03) 3634-6333
E-mail: webmaster@scrum-net.co.jp
ウェブサイト: www.srum-net.co.jp

製造元

NanoDrop Technologies, Inc.
PO Box 415
Rockland, DE 19732
USA
TEL: +1-302-984-0334 Fax: +1-302-984-0336
E-mail: info@nanodrop.com
ウェブサイト: www.nanodrop.com

NanoDrop は NanoDrop Technologies, Inc. の登録商標です。また他の商標や登録商標、製品名は各社の所有する名称です。各社の所有する特許に関連した技術名についても表記されています。

Copyright © 2004 NanoDrop Technologies, Inc.

お問い合わせ



株式会社 スクラム

〒130-0021 東京都墨田区緑 1-8-9 A&Yビル

TEL: (03) 5625-9711 Fax: (03) 3634-6333

E-mail : webmaster@scrum-net.co.jp

Web : [//www.scrum-net.co.jp](http://www.scrum-net.co.jp)

ND1222SM