

製薬支援キャピラリー電気泳動システム

PA 800 Plus

Fast Glycan ラベリング解析キット

アプリケーション ガイド



キットに含まれるもの

ファーストグリカンラベリング解析キット (B94499PTO) 100 サンプル分

Component	Quantity
Magnetic stand	1
M1 magnetic beads	1
D1 reagent	5
D2 reagent	5
D3 reagent	1
D4 reagent	2
L5 catalyst	1
L6 fluorophore	5
GU (glucose ladder); process control	1
IST (internal standard)	1
BST (bracketing standard)	1
HR-NCHO separation gel	1
Pre-assembled capillary cartridge with window (30 cm total length, 375 µm outer diameter (o.d.) x 50 µm inner diameter (i.d)) (PN A55625)	1

このキットは研究目的のみに使用できます。

下記のものは別途購入可能です。

Part Number	Component	Quantity
A55625	Pre-assembled capillary cartridge with window (30 cm total length, 375 µm outer diameter (o.d.) x 50 µm inner diameter (i.d))	1

別途用意する試薬

- Peptide-N-glycosidase F enzyme(PNGase F) (Prozyme, 200mU (PN GKE5006B))
- HPLC グレード アセトニトリル
- 1M シアノボロヒドリドナトリウム THF 溶液 (Sigma-Aldrich PN 296813)

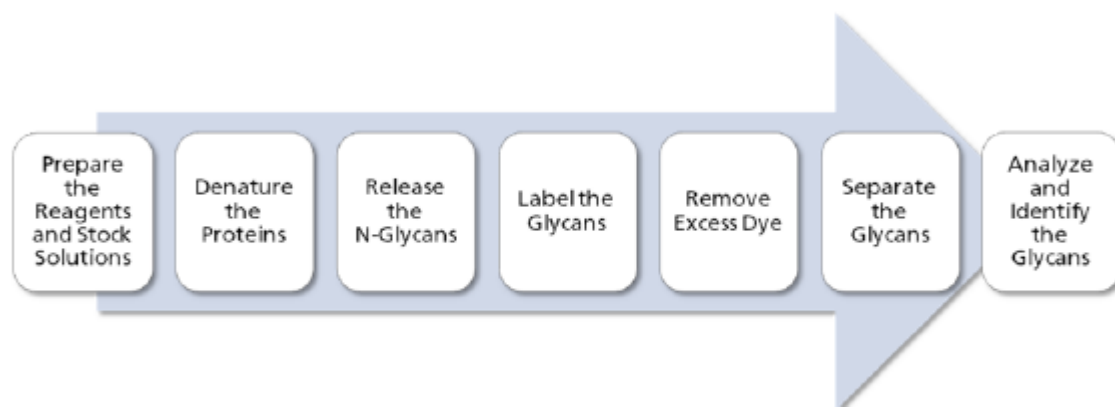


危険 毒性のある化学物質です。使用時には1M シアノボロヒドリドナトリウム THF 溶液の SDS (Safety Data Sheet) を読んでください。

蛍光検出器のキャリブレーションに必要な試薬

- 蛍光テストサンプル (488nm 用) (PN 726022)
- テストサンプル用泳動バッファ (PN 338426)

解析・糖鎖同定までのワークフロー



試薬およびストックソリューションの調製と保存方法

BST (bracketing standard)の調製

1. 100 μ L の純水を BST バイアルに加えボルテックスミキサーで撹拌してください。
これは 50nM の BST 溶液となります。
2. 20 μ L ずつ分注し、-35~-15°Cで冷凍保存してください。(6 か月使用可能)

IST (internal standard)の調製

1. 500 μ L の純水を IST バイアルに加えボルテックスミキサで攪拌してください。

これは 440 μ M の IST 溶液となります。

2. 200 μ L の PCR チューブに 20 μ L ずつ分注し、-35~-15°Cで冷凍保存してください。

(6 か月使用可能)

L6 Fluorophore label の調製

1. 240 μ L の L5 を L6 バイアルに加えボルテックスミキサで攪拌してください。

使用しない時は-35~-15°Cで冷凍保存してください。(3 か月使用可能)

D2 Denaturation Solution の調製

1. 50 μ L の純水を D2 バイアルに加えボルテックスミキサで攪拌してください。

この調製した D2 は 4°Cで 24 時間安定です。

D1, D3, D4 は 4°Cで保存してください。

反応に必要な各溶液の調製

Denaturation Solution

- 0.2mL のフラットキャップ PCR チューブに”Denaturation Solution”と記載し
下記のテーブルに従って各試薬を加え、ボルテックスミキサで攪拌し、Denaturation Solution を調製してください。

Reagent	For 1 Sample	For up to 20 Samples
D1	1 μ L	20 μ L
Reconstituted D2	1 μ L	20 μ L
D3	1 μ L	20 μ L
D4	5 μ L	100 μ L

余った Denaturation Solution は廃棄してください。

Digestion Solution (サンプルのディネーチャのためのインキュベート中に調製できます。)

- 0.2mL のフラットキャップ PCR チューブに”Digestion Solution”と記載し
下記のテーブルに従って各試薬を加え、ボルテックスミキサで攪拌し、Digestion Solution を調製してください。

Reagent	For 1 Sample	For up to 20 Samples
D4	12 μ L	240 μ L
PNase F enzyme	2 μ L	40 μ L

余った Digestion Solution は廃棄してください。

Labeling Solution (糖鎖の切り出しのためのインキュベート中に調製できます。)

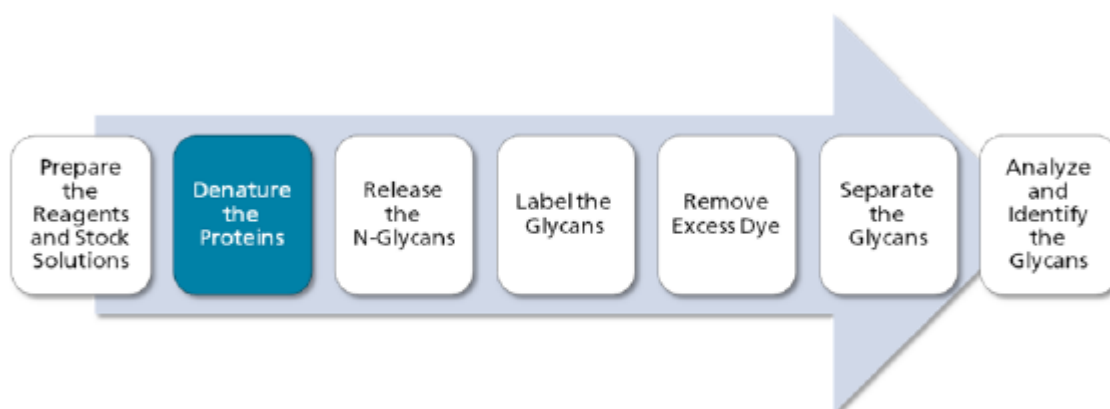
- 0.2mL のフラットキャップ PCR チューブに”Labeling Solution”と記載し
下記のテーブルに従って各試薬を加え、ボルテックスミキサで攪拌し、Labeling Solution を調製してください。この溶液の調製には、1M のシアノボロヒドリドナトリウム THF 溶液を使用しますので、ドラフトチャンバー内で調製してください。

Reagent	For 1 Sample	For up to 20 Samples
Reconstituted L6	9 μ L	180 μ L
D4	3 μ L	60 μ L
1 M sodium cyanoborohydride (in THF)	1 μ L	20 μ L
Reconstituted IST	1 μ L	20 μ L

余った Labeling Solution は廃棄してください。

NOTE この溶液は用事調製してください。

プロテインのディネーチャ



1. ヒートブロックを予め 60°C にセットしてください。
2. 100 μ g 糖タンパク水溶液を準備してください。(10mg/mL の糖タンパク 10 μ L)

NOTE 高グルコシル化された糖タンパクは、糖タンパク量を減らしてください。

3. マグネットビーズを準備してください。
 - a. M1 ボトルをボルテックスミキサの最大スピードで攪拌してよく懸濁してください。
 - b. 200 μ L の M1 を 200 μ L フラットキャップ PCR チューブに加えてください。
 - c. サンプルチューブをマグネティックスタンドのセットし、マグネットビーズがバイアルの壁に吸着したらピペットで溶液を取り除いてください。この時ピペットの先端がマグネットビーズに触れないようにしてください。

Tip ! 溶液のみ取り除いてください。ビーズも除去されてしまう場合には小容量のピペットで全て溶液がなくなるまで数回に分けて除去してください。

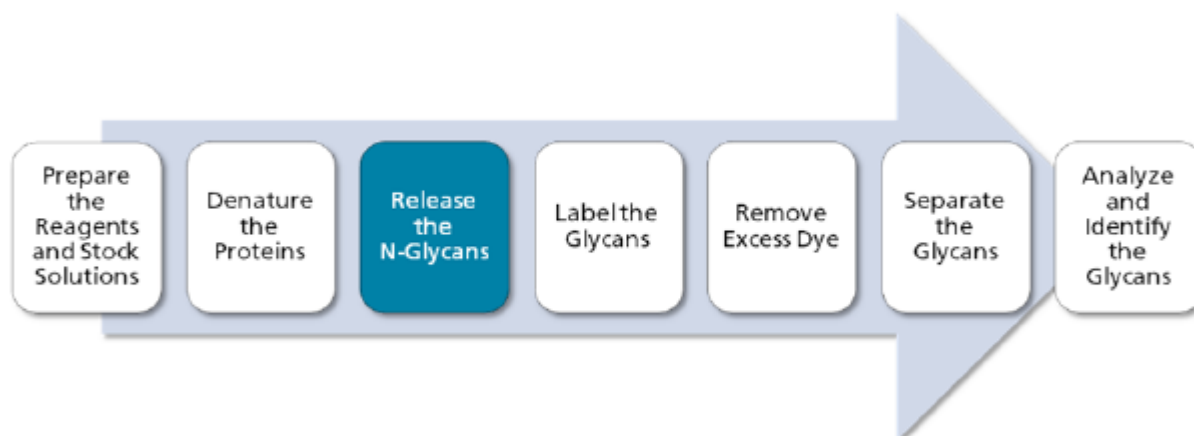
- d. チューブをマグネティックスタンドから外してください。

4. 10 μ L の糖タンパク水溶液を加えてください。この時ピペットの先端がマグネットビーズに触れないようにしてください。
5. サンプルチューブをボルテックスミキサの最大スピードで攪拌してください。マグネットビーズがサンプルとよく混ざっていることを確認してください。
6. 5 μ L の Denaturation Solution を加え、ボルテックスミキサでよく攪拌し、60°C で 8 分間インキュベートしてください。

NOTE: ディネーチャ効率を上げるためサンプルチューブのキャップを閉めないでください。

Tip! 検定済みの温度計を使用してヒートブロックの温度が正確であることを確認してください。

N-結合型糖鎖の切り出し

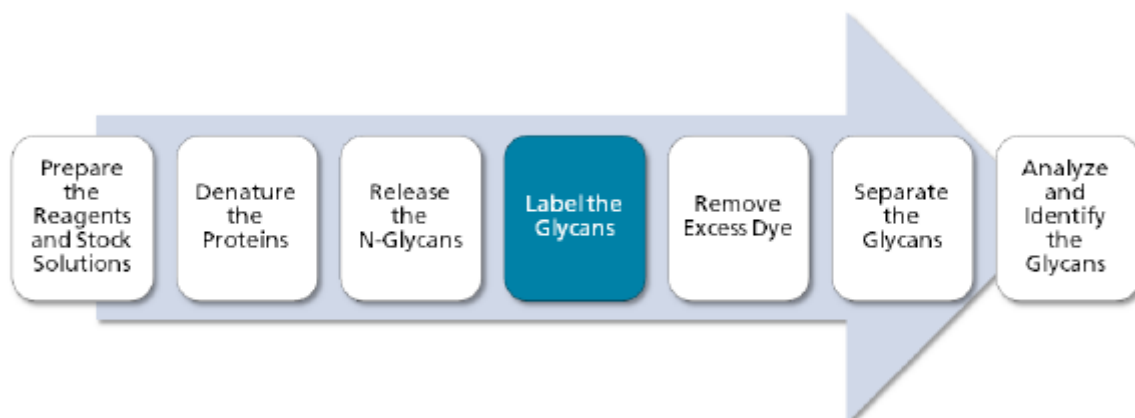


1. ディネーチャのステップが完了したら、 $12\mu\text{L}$ の **Digestion Solution** を加え、 60°C で 20 分間サンプルチューブのキャップを開けインキュベートしてください。
2. 20 分のインキュベートが完了したら、サンプルチューブのキャップをしめ、10 秒間ボルテックスミキサの最大スピードで攪拌してください。
3. $200\mu\text{L}$ のアセトニトリルを加えサンプルチューブのキャップをしめ、10 秒間ボルテックスミキサの最大スピードで攪拌してください。
4. 1 分間、サンプルチューブを室温で放置してください。
5. 遠心機で 1~2 秒間、サンプルをスピンドウンしてください。
6. サンプルチューブをマグネティックスタンドにセットし、マグネットビーズがチューブの壁に吸着したら、ピペットで溶液を取り除いてください。この時ピペットの先端がマグネットビーズに触れないようにしてください。
7. サンプルチューブをマグネティックスタンドから外してください。

NOTE : 反応効率をあげるためサンプルチューブのキャップを閉めないでください。

Tip! 検定済みの温度計を使用してヒートブロックの温度が正確であることを確認してください。

糖鎖のラベリング



1. 11 μ L の **Labeling Solution** を各サンプルに加えてください。
2. 10 秒間ボルテックスミキサの最大スピードで攪拌し、糖鎖をマグネットビーズから溶出させてください。

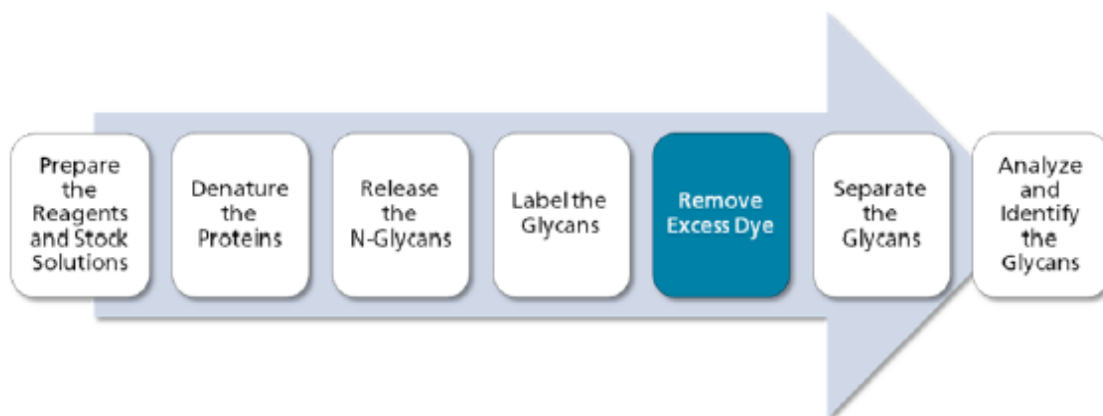
マグネットビーズが **Labeling Solution** とよく混ざっていることを確認してください。

よく混ざっていない場合には再度ボルテックスミキサでよく攪拌してください。
3. サンプルチューブを 60°C で 20 分間チューブのキャップを開けインキュベートしてください。

NOTE : 反応効率をあげるためサンプルチューブのキャップを閉めないでください。

Tip! 検定済みの温度計を使用してヒートブロックの温度が正確であることを確認してください。

過剰の蛍光試薬の除去



1. ラベリング反応が完了したら、サンプルチューブをヒートブロックから取り出してください。
2. ラベリングされたサンプルのリンス
 - a. $10\mu\text{L}$ の D4 を加え、サンプルチューブのキャップを閉め、10 秒間ボルテックスミキサの最大スピードで攪拌してください。
 - b. $160\mu\text{L}$ のアセトニトリルを加え、サンプルチューブのキャップを閉め、10 秒間ボルテックスミキサの最大スピードで攪拌してください。
 - c. 1 分間サンプルチューブを室温で放置してください。
 - d. 遠心機で 1~2 秒間、サンプルをスピンドウンしてください。
 - e. サンプルチューブをマグネットスタンドにセットし、マグネットビーズがチューブの壁に吸着したら、ピペットで溶液を取り除いてください。この時ピペットの先端がマグネットビーズに触れないようにしてください。
3. サンプルの洗浄
 - a. $20\mu\text{L}$ の純水を加え、サンプルチューブのキャップを閉め、10 秒間ボルテックスミキサの最大スピードで攪拌してください。
 - b. $160\mu\text{L}$ のアセトニトリルを加え、サンプルチューブのキャップを閉め、10 秒間ボルテックスミキサの最大スピードで攪拌してください。
 - c. 1 分間サンプルチューブを室温で放置してください。
 - d. 遠心機で 1~2 秒間、サンプルをスピンドウンしてください。

- e. サンプルチューブをマグネットスタンドにセットし、マグネットビーズがチューブの壁に吸着したら、ピペットで溶液を取り除いてください。この時ピペットの先端がマグネットビーズに触れないようにしてください。

4. ステップ3を繰り返してください。

CAUTION : サンプルの喪失に注意してください。サンプルチューブに過剰の蛍光試薬が残存していてもサンプル洗浄は3回以上行わないでください。サンプル洗浄の追加は蛍光試薬の除去と共にサンプルを喪失してしまいます。

5. サンプルチューブをマグネティックスタンドから外してください。
6. 100 μ L の純水を加え、10 秒間ボルテックスミキサの最大スピードで攪拌し、蛍光ラベルされた糖鎖をビーズから溶出させてください。
7. サンプルチューブをマグネティックスタンドにセットしてください。マグネットビーズがチューブの壁に吸着したら、ピペットで溶液を吸い上げ 200 μ L のサンプルチューブに移してください。この時ピペットの先端がマグネットビーズに触れないようにしてください。
8. この溶液を 200 μ L のサンプルチューブに移してください。
9. 溶液を 200 μ L のサンプルチューブに移したら以下のいずれかを行ってください。
- 200 μ L のサンプルチューブをユニバーサルバイアルにセットしバイアルキャップをして本体にセットし分析をスタートしてください。
 - サンプルチューブにキャップをし、分析を実施するまで-35~-15°Cで冷凍保存してください。サンプルは1か月安定です。

グルコースラダーの調製と蛍光ラベリング（オプション）

1. 5mg の GU standard を 1.5mL のマイクロチューブに入れてください。
2. 80 μ L の純水を加え GU standard が完全に溶解するまで、ボルテックスミキサーでよく攪拌してください。
3. 2 μ L の GU standard 水溶液を 0.5mL のチューブに入れてください。
残りの GU standard の水溶液は廃棄してください。
4. 9 μ L の L6 を GU standard を加えてください。
5. ドラフトチャンバー内で 1 μ L の 1M シアノボロヒドリドナトリウム THF 溶液を加えチューブのキャップを閉めてください。
6. 10 秒間ボルテックスミキサーの最大スピードで攪拌してください。
7. 遠心機で溶液をスピンドウンしてください。
8. チューブのキャップを開け、40°C で 60 分間インキュベートしてください。

Note : 反応効率を最大限にするために、サンプルチューブのキャップは開けてください。

Tip! 検定済みの温度計を使用してヒートブロックの温度が正確であることを確認してください。

インキュベーション後は GU standard は乾燥した黄色のペレットになります。

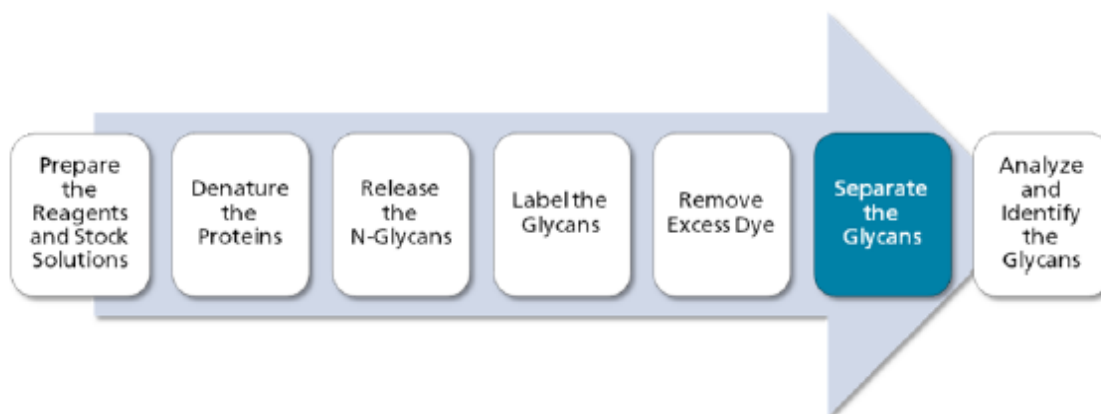
9. GU standard ストックソリューションの調製
 - a. 100 μ L の純水を加えボルテックスミキサーでよく攪拌し完全に溶解してください。
 - b. 遠心機で溶液をスピンドウンしてください。この GU standard は -35~-15°C 冷凍保存で 6 か月安定です。
10. 5 μ L の GU standard ストックソリューションを 1.5mL のチューブに加え、195 μ L の純水を加えてボルテックスミキサーでよく攪拌してください。
11. この GU standard 全量をサンプルバイアルに移し、ユニバーサルバイアルにセットしてください。

廃棄物処理



警告！有毒危険化学物質です。溶液、バイアル、キャップ、サンプルの廃棄に
注意してください。

糖鎖の分離



インターフェイスブロックの清掃

Maintenance Guide を参照にして、電極、バイアルオープナ、キャピラリーの先端、インターフェイスブロックの洗浄は1週間に1度行ってください。

キャピラリーカートリッジの準備

1. プレアッセンブルドキャピラリーを専用ボックスから取り出してください。
2. カートリッジからアパーチャーを取り外し、蛍光検出用のウィンドウを PA800 Plus 日本語チュートリアルマニュアルを参照にして取り付けてください。
3. キャピラリーカートリッジを本体にセットしてください。

Note : キャピラリーを交換した場合、*Maintenance Guide* を参照にして LIF detector(蛍光検出器)のキャリブレーションをする事をお勧めします。これは蛍光強度の一貫性を保証するためのものです。

バッファトレイへのバイアルのセット

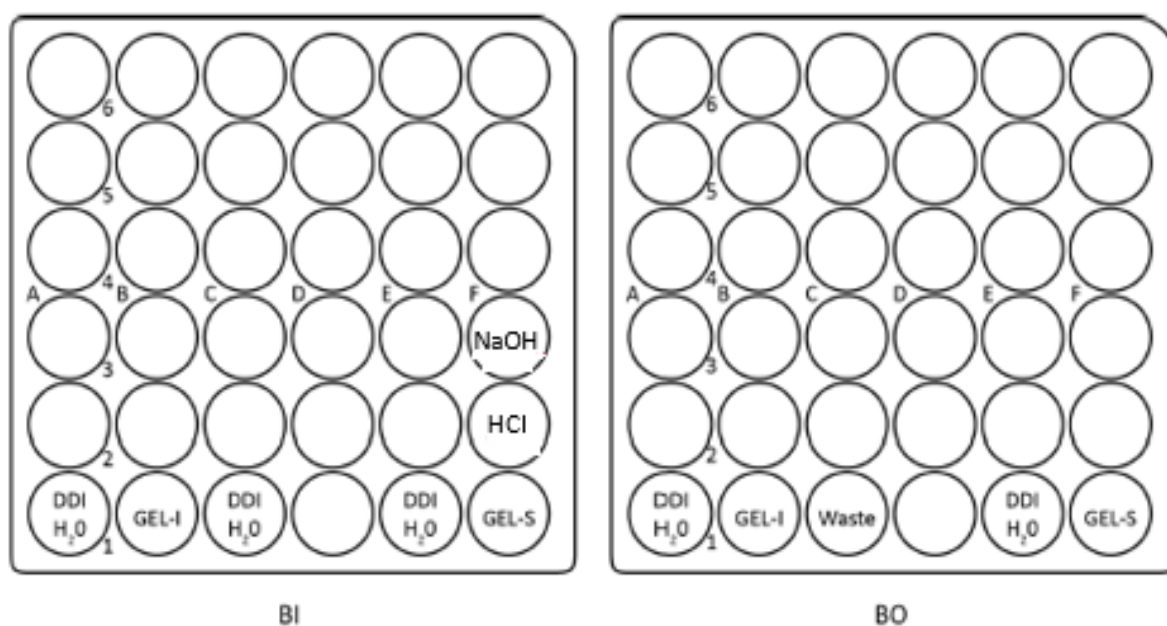
1. サンプル数に応じて下記のように、適切な数のユニバーサルバイアル、バイアルキャップを準備してください。下記にサンプル数が 32 サンプルの場合を示します。
 - 1.5mL の純水が入ったユニバーサルバイアル 5 本

- 1.5mL の HR-CHO separation gel が入ったユニバーサルバイアル 4 本
- 1.5mL の 0.1M NaOH が入ったユニバーサルバイアル 1 本
- 1.5mL の 0.1M HCl が入ったユニバーサルバイアル 1 本
- 1.0mL の純水が入ったユニバーサルバイアル 1 本 （廃液バイアル）

2. バッファトレイのバイアル配置を下記に示します。(32 サンプル分)

純水の入った BI:E1 および BO:E1 は Fast Glycan Shutdown method に使用されます。

バッファトレイのレイアウト



Note : HR-separation gel のイオン強度は泳動中に変化します。Separation method は HR-separation gel のイオン強度の変化を加味して 32 サンプル毎にバッファバイアルを変えるようプログラミングされています。

サンプルトレイへのバイアルセット

1. BST (bracketing standard)の準備とバイアルのセット

- a. 30 μ L の純水を 20 μ L に小分けした BST チューブに加え、ボルテックスミキサーで攪拌してください。
- b. 200 μ L のサンプルバイアルをユニバーサルバイアルにセットしてください。
- c. 50 μ L の BST 水溶液全量をサンプルバイアルに移してください。
- d. このサンプルバイアルをユニバーサルバイアルにセットしキャップをしてください。
- e. このバイアルをサンプルトレイの SI:F8 にセットしてください。

2. サンプルの準備とバイアルのセット

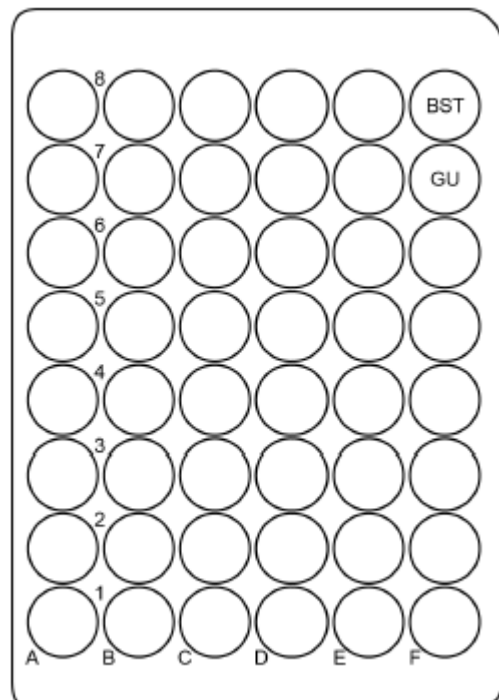
- a. 必要であれば、サンプルを室温にて融解してください。
- b. 50 μ L 以上のサンプルをサンプルバイアルに入れ、サンプルトレイにセットしてください。
最初のサンプルは SI:A1 にセットし、SI:A2～SI:A8, SI:B1～SI:B8…～SI:F6 の順にセットしてください。

3. GU standard (オプション)

GU standard はプロセスコントロールとして取り扱われます。

- a. **グルコースラダーの調製と蛍光ラベリング** 1～11 にしたがって GU Standard を調製してください。
- b. 調製した GU Standard をユニバーサルバイアルに入れキャップをしてください。
- c. このバイアルをサンプルトレイの SI:F7 にセットしてください。

サンプルトレイのレイアウト



Fast Glycan の実行

Fast Glycan instrument の立ち上げ

1. 32 Karat ソフトウェアをスタートするとエンタープライズスクリーンに実行可能なアッセイが表示されます。
2. Fast Glycan をダブルクリックしてください。
3. ログインスクリーンでプロジェクト Fast Glycan を選択してください。

ユーザネーム：Proteomelab

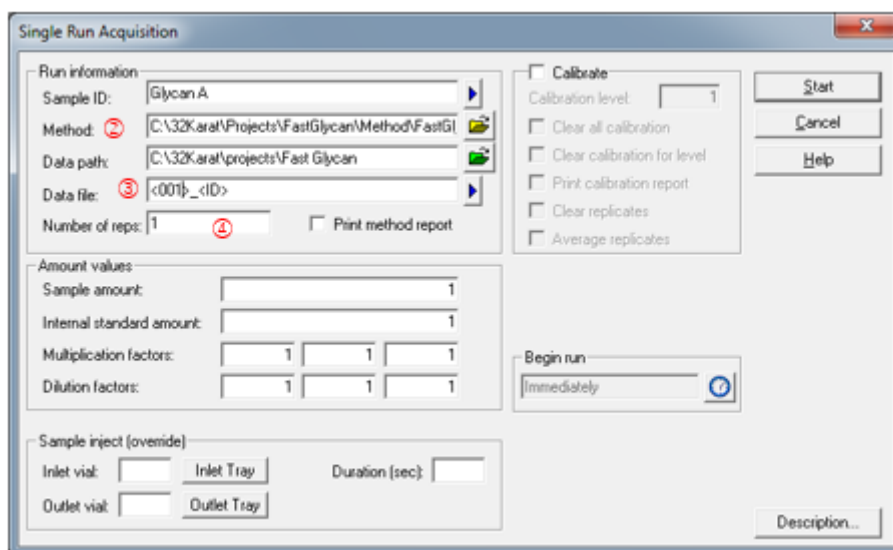
パスワード：PA800

キャピラリーのコンディショニング

キャピラリーは使用前にコンディショニングが必要です。

1. メニューバーから **Control>Single Run** をクリックし、シングルラン アクイジションダイアログボックス①を開いてください。
2. ②で Fast Glycan Conditioning を選択し、③でデータファイル名を入力してください。
3. ③で矢印ボタンをクリックし Increment オプションをクリックしてください。
4. Number of Reps に 1 と入力してください。
5. Start ボタンをクリックし Conditioning を実行してください。

シングルラン アクイジション ダイアログボックス ①



サンプルの分析

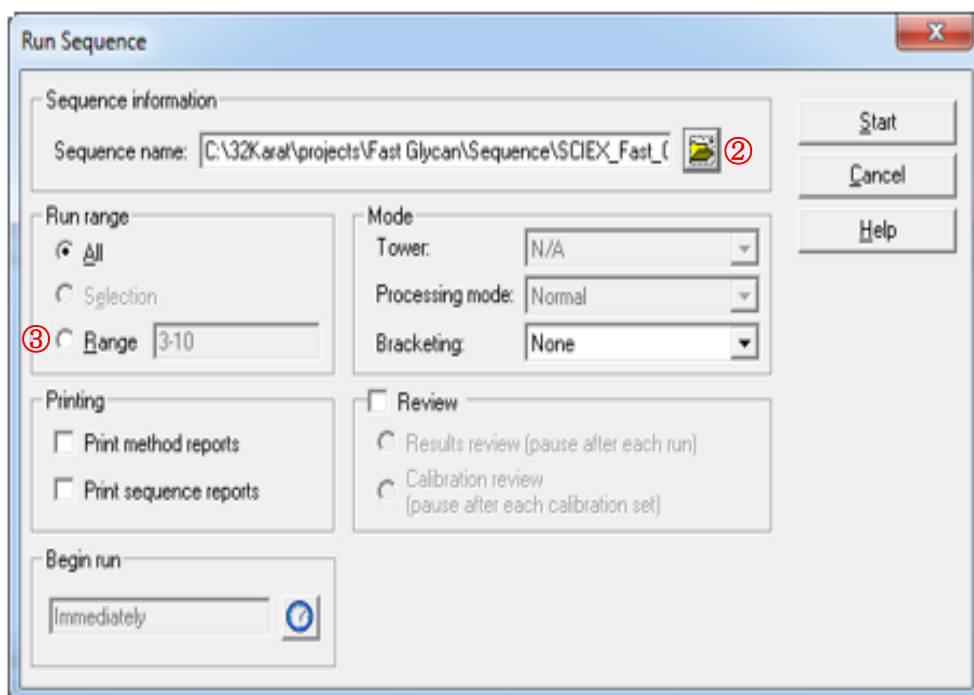
サンプル分析するにはコンディショニングと同様、メニューバーから **Control>Single Run** をクリックしシングルラン アクイジションダイアログボックスを開き、Method のボックスで

Fast Glycan Separation を選択し (②)、Data file, Number of reps を入力し (③および④)、Start ボタンをクリックして **Fast Glycan Separation** を実行してください。

複数のサンプルを連続して自動分析するには

1. タスクバーより **Control>Sequence Run** をクリックするとシークエンスランダイアログボックス (①) が開きます。
2. Folder ボタン (②) を開き、適切な Fast Glycan Sequence (④)を選択してください。
3. サンプル数に応じて Run range (③) を設定してください。
4. Start ボタンをクリックしてシークエンスを実行してください。

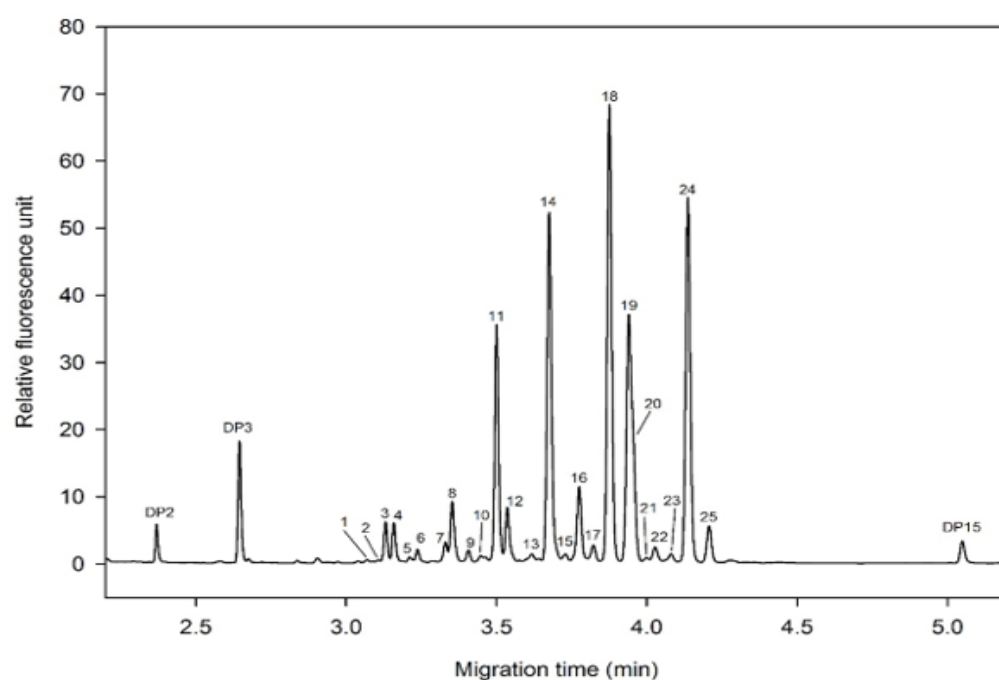
シークエンスラン ダイアログボックス ①



シーケンステーブル ④

Sequence: SCIEK_Fast_Glycan_Sequence.seq											
Run #	Status	Run Type	Level	Conc Override	Custom Parameters	Reps	Sample Inject Inlet	Sample Inject Outlet	Sample Inject Duration	Sample ID	Method
1		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					Fast Glycan Conditioning.met
2		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:A1	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	conditioning.dat
3		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:A2	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	Fast Glycan Separation.met
4		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:A3	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	1017 4-54-34 pm-rep2.dat
5		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:A4	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	Fast Glycan Separation.met
6		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:A5	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	1017 5-07-05 pm-rep3.dat
7		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:A6	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	Fast Glycan Separation.met
8		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:A7	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	1017 5-19-36 pm-rep4.dat
9		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:A8	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	Fast Glycan Separation.met
10		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:B1	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	1017 5-32-07 pm-rep5.dat
11		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:B2	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	Fast Glycan Separation.met
12		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:B3	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	1017 5-44-37 pm-rep6.dat
13		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:B4	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	Fast Glycan Separation.met
14		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:B5	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	1017 5-57-03 pm-rep7.dat
15		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:B6	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	Fast Glycan Separation.met
16		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:B7	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	1017 6-09-35 pm-rep8.dat
17		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:B8	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	Fast Glycan Separation.met
18		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:C1	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	1017 6-22-06 pm-rep9.dat
19		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:C2	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	Fast Glycan Separation.met
20		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:C3	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	1017 6-34-35 pm-rep10.dat
21		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1	SI:C4	BO:B1	5.0	huligG_A_M7021	Fast Glycan Separation.met
22		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					1017 6-47-06 pm-rep11.dat
23		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					Fast Glycan Separation.met
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					1017 6-59-37 pm-rep12.dat
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					Fast Glycan Separation.met
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					1017 7-02-04 pm-rep13.dat
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					Fast Glycan Separation.met
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					1017 7-12-06 pm-rep14.dat
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					Fast Glycan Separation.met
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					1017 7-24-37 pm-rep15.dat
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					Fast Glycan Separation.met
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					1017 7-37-04 pm-rep16.dat
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					Fast Glycan Separation.met
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					1017 7-49-34 pm-rep17.dat
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					Fast Glycan Separation.met
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					1017 8-02-04 pm-rep18.dat
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					Fast Glycan Separation.met
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					1017 8-14-35 pm-rep19.dat
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					Fast Glycan Separation.met
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					1017 8-27-00 pm-rep20.dat
		Unknown	0 n/a	Unconfigured		1					Fast Glycan Shutdown.met

IgG N-Glycan の泳動結果の表示例



Identified IgG glycan structures from measurements including duplicates (raw data)				
Peak	Structure / Abbreviation	Migration time (min)	GU value	Monoisotopic Mass [Da] NIBRT
-	DP2 [H2]	2.104	2.00	
-	DP3 [H3]	2.367	3.00	
1	A2G2S2 [H5N4A2]	3.070	4.76	2222.78
2	A2BG2S2 [H5N5A2]	3.110	4.94	2425.86
3	FA2G2S2 [H5N4F1A2]	3.130	5.02	2368.84
4	FA2BG2S2 [H5N5F1A2]	3.160	5.16	2571.92
5	A2(6)G1S1 [H4N4A1]	3.210	5.50	1769.63
6	A2(3)G1S1 [H4N4A1]	3.240	5.59	1769.63
7	FA2(6)G1S1 [H4N4F1A1]	3.290	5.90	1915.69
8	FA2(3)G1S1 [H4N4F1A1]	3.330	6.06	1915.69
9	A2G2S1 [H5N4A1]	3.350	6.34	1931.69
10	A2BG2S1 [H5N5A1]	3.410	6.60	2134.77
11	FA2G2S1 [H5N4F1A1]	3.450	6.81	2077.75
12	FA2BG2S1 [H5N5F1A1]	3.500	7.00	2280.83
13	A2B [H3N5]	3.540	7.31	1519.57
14	FA2 [H3N4F1]	3.620	7.71	1462.54
15	A2(3)G1 [H4N4]	3.680	8.15	1478.54
16	FA2B [H3N5F1]	3.730	8.25	1665.62
17	A2B(3)G1 [H4N5]	3.780	8.38	1681.62
18	FA2(6)G1 [H4N4F1]	3.820	8.78	1624.60
19	FA2(3)G1 [H4N4F1]	3.880	9.13	1624.60
20	FA2B(6)G1 [H4N5F1]	3.940	9.16	1827.68
21	A2G2 [H5N4]	4.000	9.20	1640.59
22	FA2B(3)G1 [H4N5F1]	4.030	9.23	1827.68
23	A2BG2 [H5N5]	4.080	9.77	1843.67
24	FA2G2 [H5N4F1]	4.140	10.18	1786.65
25	FA2BG2 [H5N5F1]	4.210	10.57	1989.73
-	DP15 [H15]	5.049	15.00	

各メソッドの設定内容 (Fast Glycan Conditioning, Separation, Shut down)

インストルメント イニシャルコンディション (共通)

The 'Instrument Setup' dialog box is shown with the 'LIF Detector Initial Conditions' tab selected. The settings are as follows:

- Auxiliary data channels:**
 - ☐ Voltage max: 30.0 kV
 - ☒ Current max: 40.0 μ A
 - ☐ Power
 - ☐ Pressure
- Mobility channels:**
 - ☐ Mobility
 - ☐ Apparent Mobility
 - ☐ Plot trace after voltage ramp
- Analog output scaling:**
 - Factor: 1
- Temperature:**
 - Cartridge: 25.0 $^{\circ}$ C
 - Sample storage: 10.0 $^{\circ}$ C
- Trigger settings:**
 - ☐ Wait for external trigger
 - ☒ Wait until cartridge coolant temperature is reached
 - ☐ Wait until sample storage temperature is reached
- Inlet trays:**
 - Buffer: 36 vials
 - Sample: 48 vials
- Outlet trays:**
 - Buffer: 36 vials
 - Sample: No tray

An 'Apply' button is located at the bottom right of the dialog.

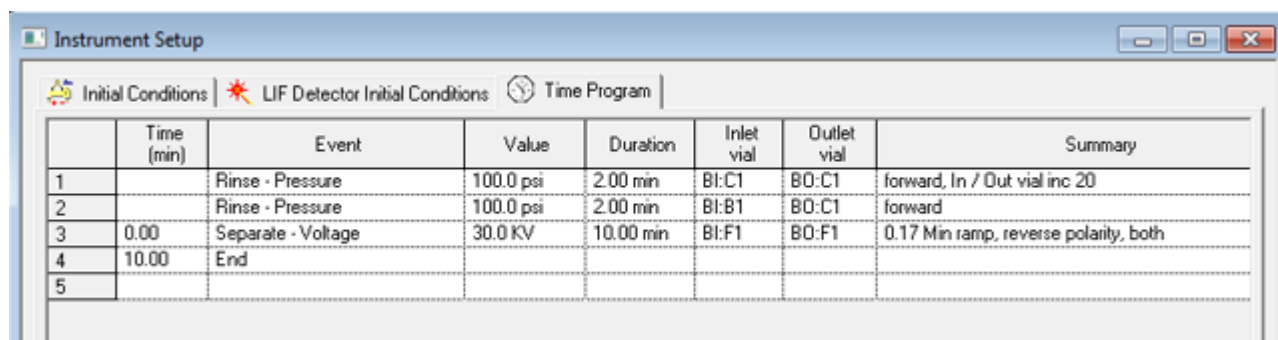
ディテクタ イニシャルコンディション (共通)

The 'Instrument Setup' dialog box is shown with the 'LIF Detector Initial Conditions' tab selected. The settings for the two detector channels are as follows:

- Electropherogram channel 1:**
 - ☒ Acquisition enabled
 - Dynamic range: 100 RFU
 - Filter settings:**
 - ☒ High sensitivity
 - ☐ Normal
 - ☐ High resolution
 - Peak width (pts): 16-25
 - Signal:**
 - ☒ Direct
 - ☐ Indirect
 - Laser/filter description - information only:**
 - Excitation wavelength: 488 nm
 - Emission wavelength: 520 nm
- Electropherogram channel 2:**
 - ☐ Acquisition enabled
 - Dynamic range: 100 RFU
 - Filter settings:**
 - ☐ High sensitivity
 - ☒ Normal
 - ☐ High resolution
 - Peak width (pts): 16-25
 - Signal:**
 - ☒ Direct
 - ☐ Indirect
 - Laser/filter description - information only:**
 - Excitation wavelength: 635 nm
 - Emission wavelength: 675 nm
- Data rate:**
 - Both channels: 16 Hz
- Relay 1:**
 - ☒ Off
 - ☐ On
- Relay 2:**
 - ☒ Off
 - ☐ On

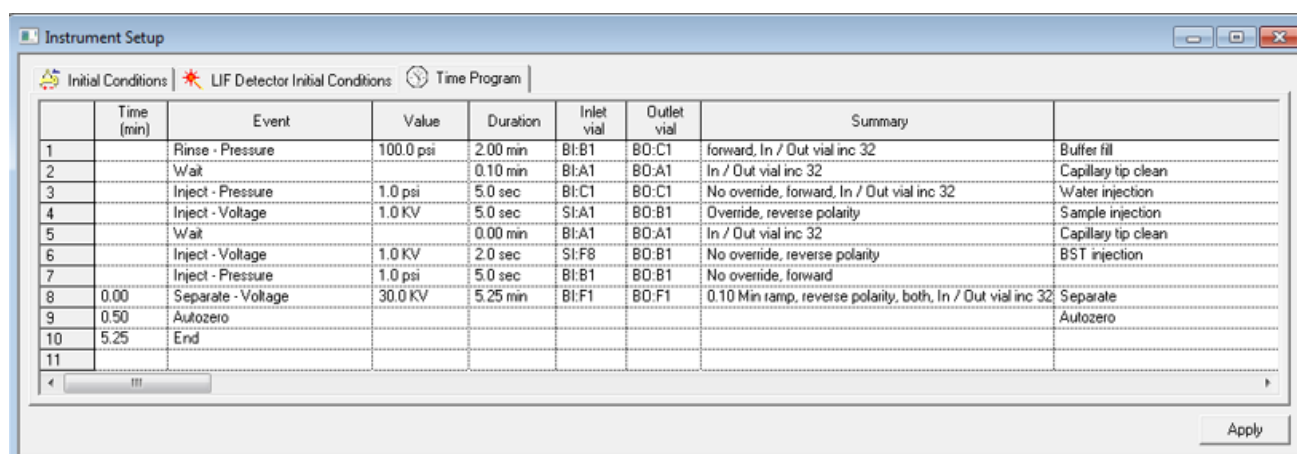
An 'Apply' button is located at the bottom right of the dialog.

Fast Glycan Conditioning タイムプログラム



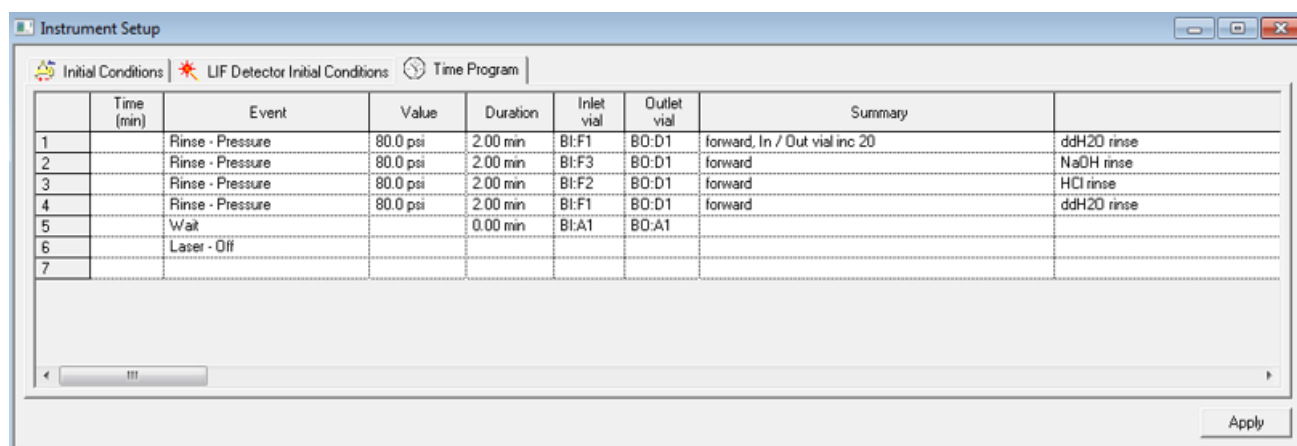
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary
1		Rinse - Pressure	100.0 psi	2.00 min	BI:C1	BO:C1	forward, In / Out vial inc 20
2		Rinse - Pressure	100.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:C1	forward
3	0.00	Separate - Voltage	30.0 KV	10.00 min	BI:F1	BO:F1	0.17 Min ramp, reverse polarity, both
4	10.00	End					
5							

Fast Glycan Separation タイムプログラム



	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary
1		Rinse - Pressure	100.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:C1	forward, In / Out vial inc 32
2		Wait		0.10 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 32
3		Inject - Pressure	1.0 psi	5.0 sec	BI:C1	BO:C1	No override, forward, In / Out vial inc 32
4		Inject - Voltage	1.0 KV	5.0 sec	SI:A1	BO:B1	Override, reverse polarity
5		Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 32
6		Inject - Voltage	1.0 KV	2.0 sec	SI:F8	BO:B1	No override, reverse polarity
7		Inject - Pressure	1.0 psi	5.0 sec	BI:B1	BO:B1	No override, forward
8	0.00	Separate - Voltage	30.0 KV	5.25 min	BI:F1	BO:F1	0.10 Min ramp, reverse polarity, both, In / Out vial inc 32
9	0.50	Autozero					Separate
10	5.25	End					Autozero
11							

Fast Glycan Shutdown タイムプログラム



	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary
1		Rinse - Pressure	80.0 psi	2.00 min	BI:F1	BO:D1	forward, In / Out vial inc 20
2		Rinse - Pressure	80.0 psi	2.00 min	BI:F3	BO:D1	forward
3		Rinse - Pressure	80.0 psi	2.00 min	BI:F2	BO:D1	forward
4		Rinse - Pressure	80.0 psi	2.00 min	BI:F1	BO:D1	forward
5		Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	
6		Laser - Off					
7							

トラブルシューティング

症状	考えられる原因	処置方法
ピークが検出されない。	LIF ディテクター	LIF ディテクタのレーザが ON になっている事を確認してください。LIF ディテクタがキャリブレーションされていることを確認してください。 プローブスタビライザーが LIF ディテクタのロックダウンバーに適切に接続されていることを確認してください。
	セパレーションメソッドが間違っている。	32Karat ソフトウェアでセパレーションメソッドを開き下記を確認してください。 ・泳動電圧が 30kV になっているか。 ・ Reverse polarity に設定されているか。 泳動中に PA800 Plus の LED が琥珀色に点灯している事を確認してください。電圧 (Reverse polarity) がかかっている時は点灯します。
	サンプルバイアルの底に気泡が発生している。	サンプルチューブを遠心して気泡を取り除いてください。
	キャピラリーウィンドウかキャピラリーの先端が破損している。	キャピラリーウィンドウと先端を検査してください。どちらかが破損している場合には新しいプレアッセンブルドキャピラリーに交換してください。 コットンスワブを純水で湿らせて LIF カートリッジアパーチャープラグアッセンブリを清掃してください。
ピーク強度が弱い。	蛍光ラベリング反応が適切に行われなかった。	IST (DP3) ピークと BST (DP2, DP15) ピークを比較してください。IST ピークが BST ピークに比べて低い場合には N-Glycan の切り出しからやり直してください。その時下記を確認してください。 ・新しい L6 であること。 ・240 μ L の L5 を L6 に加えたこと。 ・シアノボロヒドリドナトリウム THF 溶液が透明で沈殿物がないこと。 ・ラベリング反応が 60°C、20 分間インキュベートであること。

症状	考えられる原因	対処法
ピーク強度が弱い。	酵素の活性が低い、	IST ピークの強度を検証してください。50RFU 以下であると、再度糖鎖の切り出しを行い、PNGase を多めに加えるか異なった Lot の酵素を使用してください。 Denaturation Solution および Labeling Solution に D4 を加えたかどうか確認してください。
	サンプル濃度が低い。	糖タンパクの量が 100 μ g であることを確認してください。サンプル濃度が明らかに低い場合には、10kDa モレキュラーカットフィルターを使用してサンプルの濃縮を行ってください。
	糖鎖の切り出しが不完全。	糖タンパク量が 100 μ g であることを確認してください。可能であれば、サンプル調製をやり直してください。その時、糖鎖切り出しのインキュベーションの時間を延ばし、酵素の量を増やすか、新しい Lot の酵素を使用してください。
ピークが振り切れる。 (ピークの先端が平ら)	サンプル濃度が高すぎる。	糖タンパク溶液を純水で希釈し、サンプル調製をやり直してください。
電流値が低い。	キャピラリーに問題がある。	キャピラリーの温度が 25°C になっていることを確認してください。 キャピラリーが破損していないことを確認してください。 キャピラリーのウィンドウと先端を検査してください。破損している場合には新しいプレアッセンブルドキャピラリーに交換してください。 プローブスタビライザーが LIF ディテクタのロックダウンバーに接続されていることを確認してください。(System Maintenance Guide を参照してください。)
	試薬が汚染されている。	バイアルとバイアルキャップを新しいものと交換してください。
1 日の間で移動時間がシフトする。	キャピラリーに問題がある。	キャピラリーを適切にコンディショニングしてください。
長期間にわたって電流値が低く移動時間がシフトする。	キャピラリーが部分的に詰まっているか、表面が汚染されている。	次のようにキャピラリーをコンディショニングしてください。 1. 純水を 90psi で 2 分間リンスしてください。 2. 0.1M NaOH を 90psi で 2 分間リンスしてください。

		3. 0.1M HCl を 90psi で 2 分間リンスしてください。 4. 純水を 90psi で 2 分間リンスしてください。
キャリーオーバー	バイアル或いはキャップが汚染されている。	新しいバイアルに純水を入れ、新しいキャップをしてください。必要に応じてバイアルインクリメントを設定してください。 バッファバイアルを新しいバイアル、バイアルキャップにしてください。必要に応じてバイアルインクリメントを設定してください。 廃液バイアルに純水 1.0mL が入っている、またはキャピラリーの先端が純水に届いていることを確認してください。
エレクトロフェログラムにスパイクノイズが入る。	セパレーションゲルに気泡が混入している。	セパレーションゲルの入ったバイアルを 10～20 秒超音波洗浄にかけて脱気してください。
エクストラピークが存在する。	L6 を加えたチューブの汚染物が L6 と反応している。	新しいマイクロバイアルを使用してください。特にラベリング反応に関連しているバイアルの汚染はエクストラピークの出現を引き起こします。
小さい糖鎖(DP<5)が予想より少ない。	小さい糖鎖が過剰の蛍光色素と一緒に取り除かれた。	過剰の蛍光色素の除去のための洗浄回数を少なくしてください。
データ解析中に複数のファイルの保存ダイアログが出現する。	Sciex PDF Writer software の folder のロケーションが間違っている。	Folder のロケーションが適切であるか、また他の設定が正しく設定されているか確認してください。 <i>GU Value Software Release Note</i> を参照してください。
GU value レポートがデータアナリシス終了時にレポートされない。	Sciex PDF がプリンターセッティングされていない。	Sciex PDF Writer software が正しくインストールされていることを確認してください。 <i>GU Value Software Release Note</i> を参照してください。



株式会社エービー・サイエックス

本社：〒140-0000 東京都品川区北品川4-7-35 御殿山トラストタワー

TEL：0120（318）551 FAX：0120（318）040

大阪：〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎 3-19-3 ビアスタワー

URL：http://www.absciex.jp e-mai：jp_sales@absciex.com

本内容は予告なく変更する場合がありますのでご了承ください。

RUO-IVD-05-4092-B_Fast Glycan_20180925

～