

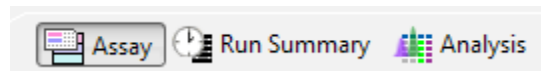
シンプルウェスタンTotal Protein Assayを用いたCompassソフトウェア Quick Reference Guide

proteinsimple

COMPASSでアッセイの開始

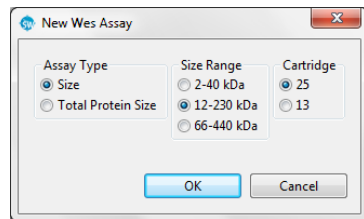
1. アッセイのロード

Compassソフトウェアを開き、Assayアイコンをクリックします。



Fileメニューから**New Assay**をクリックし、Total Protein SizeとSize Range (Wesをご使用の際はCartridgeタイプも選択) を選択後、OKをクリックします。もしくは、保存済みアッセイの中からアッセイを選択するために**Open Assay** を選択します。

プレートのウェルを指定するなどアッセイに変更を加えた場合、先に進む前にFileメニューから**Save as**を選択し、アッセイファイルの保存を行ってください。

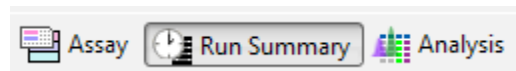


8. アッセイの実行

シンプルウェスタンSeparation moduleの製品同梱書に従いアッセイを準備します。プレート、キャピラリーもしくはキャピラリーカートリッジを装置にセットし、**Start**をクリックします。



測定終了時刻をチェックするのに、**Run Summary**アイコンをクリックします。



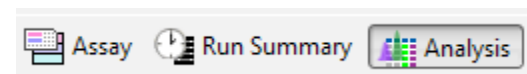
Statusタブ内に**Assay Scheduler**が表示されます:



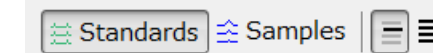
解析

1. 蛍光スタンダードの確認

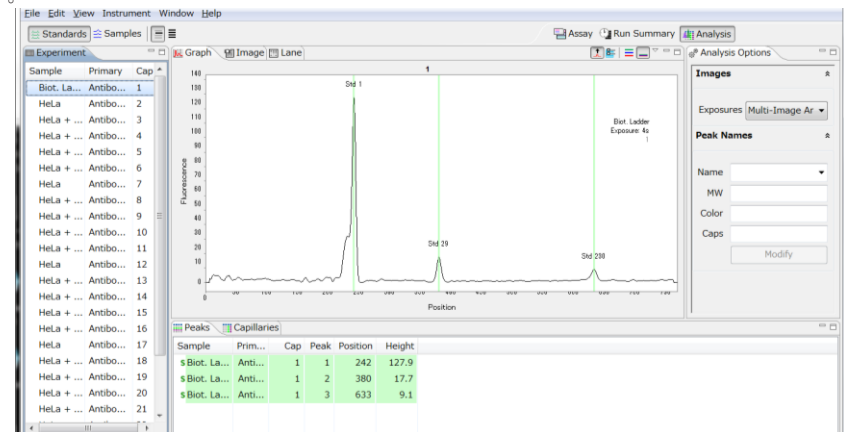
Run Summaryアイコンをクリックします。**Separation**タブで、蛍光スタンダードの分離の様子を動画で確認できます。それぞれのマーカー (12–230 kDaアッセイでは1, 29, 230 kDa。66–440 kDaアッセイでは、57, 280kDa。2–40 kDaアッセイでは1, 26 kDa。) が各キャピラリー内で視覚的に分離されていることを確認してください。**Analysis**アイコンをクリックします。



次に**Show Standards**と**View Selected**アイコンを選択します:



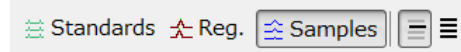
Graph Viewタブで蛍光スタンダードが正しく認識されているかどうかチェックします。正しくない場合、正しいピーク上で右クリックし、**Force Standard**を選択します。各キャピラリーに関して行ってください。



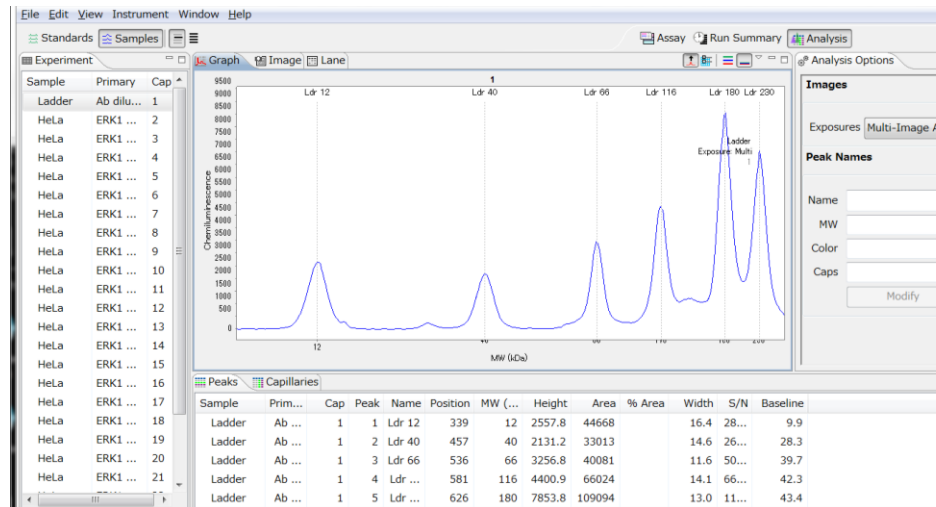
12–230kDaのTotal Protein Assayを用いた蛍光スタンダードの**GraphView**。この電気泳動図で蛍光スタンダードは**Std1**、**Std29**、そして**Std 230**と標識されています。

2. Biotinylated ladder(ビオチン化ラダー)の確認

Show SamplesとSingle View Selectedアイコン上をクリックします。:



Experimentタブでラダーを選択します。ビオチン化ラダーは、12-230 kDaアッセイでは分子量12、40、66、116、180そして230 kDa; (66-440 kDaアッセイでは66、116、200、280そして440 kDa。2-40 kDaアッセイでは2、5、12、26そして40kDa) を示していることをご確認ください。Graph Viewタブでこれらが正しく認識されていることをご確認ください。ピークが間違っして認識されている場合、そのピーク上で右クリック後、Remove Peakを選択します。ラダーのピークが見えない場合、Viewをクリック後、View Regionをクリックした後にFull Rangeを選択します。



12-230kDaのビオチン化ラダーのGraph View。ラダーのピークは、この電気泳動図でLdr12、Ldr40、Ldr66、Ldr116、Ldr180そしてLdr230と標識されます。

3. サンプルピークのラベル

GraphビューでのピークもしくはLaneビューでのバンドは、自動的に算出された分子量で標識されます。分子量、ピーク面積、ピークの高さ、そしてシグナルノイズ比 (S/N) を含んだ解析結果はPeaksテーブル内で表示されます。

手でサンプルピークを標識することも可能です。Editメニューを選択し、Analysisをクリックします。AnalysisスクリーンでメニューからPeak Namesを選択します。Analysis Group: Proteinテーブル直下のAddをクリックし、テーブル内にピーク名を入力します。各セルにピーク名と分子量を入力します。デフォルトでは、入力した分子量の±10%の範囲内のピークが自動的に標識されます。

次に、左下のApplySettingsボックス下のAddをクリックし、ピーク名 (複数の場合もあり) をボックスに入力します。次に、Apply Toカラムの最初のセルをクリックし、新しいピーク名をドロップダウンリストのいずれかに関連付けます:

- **Allを選択** (測定ファイルのすべてのサンプルを選択)
- **各抗体や試薬名を選択** (例: 同一の一次抗体名を用いたキャピラリー)
- **個々のキャピラリーを選択 (Custom Settingsにて選択を行います)**

OKをクリックしますと、サンプル中のバンドやピークにピーク名が付けられます。

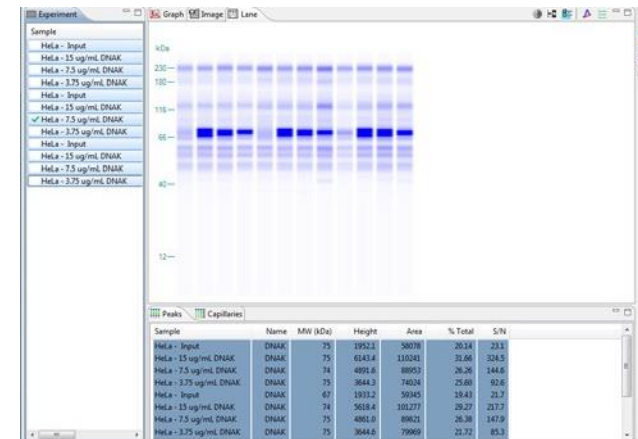
4. 最終結果の分析

Total Protein Assayの結果には%Totalが含まれています。これは、キャピラリーで測定された総面積と比較して、指定されたピークの計算面積%を表示します。この値は、個々のピーク面積をキャピラリーの曲線下面積全体 (総タンパク質の面積) で割り、100を掛けたものです。

Viewを選択し、Groupingをクリックしますと、結果をグループ化することで関連する統計の表示が可能となります。

ピーク領域 (Area)、パーセントまたは総面積 (% Total)、標準偏差 (Std. Dev)、%CV (変動計数) および標準誤差 (SEM) などのグループ化されたデータは、Peak Groups (下の図参照)、Capillary Groups、およびGraph Plotタブのいずれかに表示されます。

表のデータをコピーして、Excelやその他のグラフ作成プログラムに貼り付けることも可能です。



HeLa細胞ライゼートにスパイクしたDNAXの総タンパク質量に対する割合 (%Total) を示す結果表とLane View。