

アジレント

In-situ オリゴ DNA マイクロアレイキット

アレイ CGH (aCGH) 法

Enzymatic ラベル化法

(血液、細胞、組織サンプル)

操作テキスト



Agilent オリゴマイクロアレイ用

Protocol Ver.8.0 対応 (WGA、CGH+SNP、SureScan、SureTag 対応)

(Agilent Stabilization and Drying Solution 対応)

アジレントシュアプリントテクノロジーで製造した DNA マイクロアレイ

For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

2020 年 11 月 改訂

目次

1. アレイ CGH (aCGH)実験.....	4
2. 安全に実験を行うために.....	5
3. 必要なものの確認.....	6
4. 実験で使用する Agilent 試薬キットの確認.....	12
5. CGH マイクロアレイフォーマット(2020 年 10 月現在).....	14
6. 必要なスキャナおよびソフトウェア.....	15
7. DNA サンプルの調製.....	16
7-1. ゲノム DNA の調製.....	19
7-2. ゲノム DNA の定量・品質確認.....	21
8. ラベル化前の反応.....	24
8-1. 増幅法 (オプション).....	24
8-1-1. 断片化.....	27
8-1-2. ライブラリ調製.....	28
8-1-3. 増幅.....	29
8-1-4. PCR 反応物の精製.....	30
8-1-5. 増幅・精製ゲノム DNA の濃度測定.....	32
8-1-6. ラベル化前の増幅 DNA 調製.....	32
8-2. ダイレクト法.....	33
8-2-1. ゲノム DNA の制限酵素反応.....	34
9. ゲノム DNA のラベル化.....	36
9-1. ゲノム DNA のラベル化反応.....	36
9-2. ラベル化 DNA の精製.....	39
9-3. UV によるラベル化DNAの収量・蛍光取り込み率の確認.....	41
10. マイクロアレイ操作.....	42
10-1. ハイブリダイゼーション.....	42
10-1-1. 10x aCGH Blocking Agent の準備.....	42
10-1-2. ハイブリダイゼーション溶液の調製.....	43
10-1-3. ハイブリダイゼーションチャンパの組み立て.....	46
10-1-4. ハイブリダイゼーション.....	50
10-2. マイクロアレイの洗浄.....	51
10-2-1. Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 の加温(終夜).....	52
10-2-2. 洗浄器具の洗浄.....	53
10-2-3. 洗浄器具のアセトニトリルによる洗浄 (Stabilization and Drying Solution 使用時).....	53
10-2-4. Stabilization and Drying Solution の加温 (Stabilization and Drying Solution 使用時).....	54
10-2-5. マイクロアレイの洗浄.....	55
10-3. Agilent スキャナを用いたスキャニングと解析.....	60

10-3-1. マイクロアレイスライドのスキャン	60
10-3-2. マイクロアレイ画像データの解析	67
11. Feature Extraction による tif 画像(スキャン画像データ)の確認.....	70
12. Feature Extraction ソフトウェアによる数値化	72
12-1. Feature Extraction 画面(ウインドウの構成)の説明.....	75
12-2. Agilent Feature Extraction ソフトウェアによる数値化	77
Step 1— Feature Extraction ソフトウェアの起動	77
Step 2—FE project へ数値化するイメージ(.tif)を追加.....	77
Step 3—Project Properties および Extraction Set Configuration タブシートでの設定および確認	78
Step 4—Feature Extraction Project をスタート	80
Step 5—QC Report の確認	81
Step 6—Visual Result の確認	81
12-3. Feature Extracation の結果解析	82
12-4. Feature Extraction 由来のフラグ	83
13. マイクロアレイのレイアウト・デザインファイル.....	84
14. SureDesign	85
15. Feature Extraction 用 Protocol のダウンロードサイト	86
16. Agilent 社の DNA マイクロアレイサポート用ホームページ.....	87
17. Secure Fit マイクロアレイスライドボックスの開け方.....	88
18. トラブルシューティング	89

プロトコルは予告なく変更になることがあります。プロトコルを日本語化するにあたり、作業時間が発生するため、日本語プロトコルは英語の最新バージョンに比べて、どうしても遅れが生じます。製品ご購入の際は、必ず製品添付の英語版プロトコルの Version をお確かめの上、日本語版が古い場合は、最新の英語版を参照くださるようお願い申し上げます。

What's new in v7.1

- ・ Agilent SureTag Complete DNA Labeling Kit と Agilent SureTag DNA Labeling Kit に対応
- ・ 2012 年 1 月作成版よりの改定:p.83 の QC metrics 表を変更

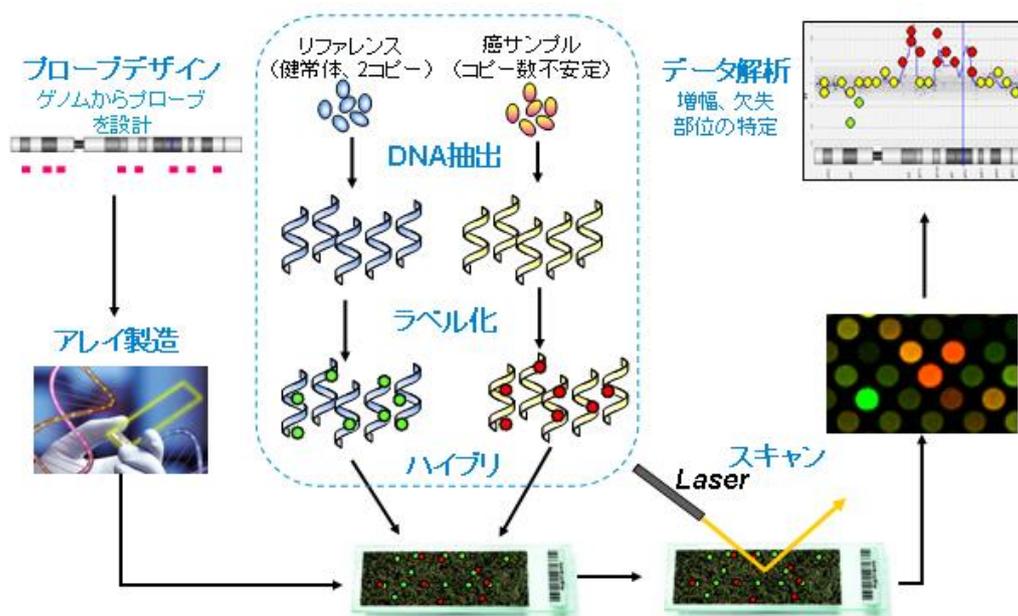
What's new in v7.3

- ・ 取得するデータの精度のために定期的にハイブリダイゼーションオープンを校正する内容を追加
- ・ Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit(販売終了)の内容を削除
- ・ ラベル化時のランダムプライマーアニーリングと、ハイブリダイゼーション時のマスターミックスの、変性温度を 95°Cから 98°Cに変更
- ・ ハイブリダイゼーションの温度を 65°Cから 67°Cに変更

1. アレイ CGH (aCGH)実験

アレイ CGH(aCGH)法は、マイクロアレイと従来の*CGH 法(Comparative Genomic Hybridization: 比較ゲノムハイブリダイゼーション)を組み合わせることで、ハイスループットに目的遺伝子、ゲノムDNA領域のコピー数変化を検出する手法です。

*CGH 法: 1992 年、Kallioniemi らが、Science 誌で発表した方法です。FISH 法(Fluorescence in situ hybridization)を応用した方法で、全染色体を対象として、ゲノム DNA が増幅(gain)、欠失(loss)した領域を調べる方法です。



アジレントのオリゴ DNA マイクロアレイは、インクジェット技術を用いて 60mer の DNA オリゴプローブを、基盤上に直接 in-situ 合成する方法で製造されています。In-situ 合成により、非常に均質なスポットをしかも高密度でアレイ上に作成できるため、アレイ実験の再現性が非常に向上し、信頼性の高い結果を得ることが出来ます。

アジレント・テクノロジーでは、マイクロアレイ実験をされる実務者の方を対象に [DNA マイクロアレイ カスタムニュース](#)を配信しています。実験プロトコルのアップデート・新製品のご案内・実験に関するトラブルシューティング・試薬や消耗品の保存など、**実験を成功させるためのテクニカルサポート**に内容を限定して、E-mail でお送りしています。受信をご希望の方は「DNA マイクロアレイ カスタムニュース配信希望」と明記して、お名前・ご所属・配信を希望する E-mail アドレスを下記宛先までお知らせください。

email_japan@agilent.com

2. 安全に実験を行うために

- ・ スライドガラスの縁は鋭利です。手袋をはめ、十分注意して取り扱ってください。
- ・ 本実験では、毒性のある試薬を使用します。操作時の安全には、白衣、手袋、必要に応じてマスク、眼鏡をご着用いただくなど各自で十分ご注意ください。お願い申し上げます。
- ・ Cyanine 3-dUTP と Cyanine 5-dUTP は発癌性物質を含んでいる可能性があります。吸引、誤飲、皮膚への直接の接触は避けてください。
- ・ 2x HI-RPM Hybridization Buffer には塩化リチウム(LiCl)が含まれています。塩化リチウム(LiCl)には中枢神経系への毒性があります。催奇性があり、乳児に悪影響を与える可能性があります。不妊を誘発する可能性があります。吸入、皮膚接触、誤飲により、害を引き起こします。必ず適切な白衣、手袋、マスク、防護めがね等を着用してください。
- ・ 2x HI-RPM Hybridization Buffer にはドデシル硫酸リチウム(LLS)が含まれています。ドデシル硫酸リチウム(LLS)は毒性があり、目、気管器系、皮膚に炎症を起こす可能性があります。必ず適切な白衣、手袋、マスク、防護めがね等を着用してください。
- ・ 2x HI-RPM Hybridization Buffer には Triton が含まれています。誤飲により害を引き起こします。
 - ・ Agilent Stabilization and Drying Solution (cat. No. 5185-5979)は、毒性、引火性があります。必ず、適切なヒュームフード(ドラフト)内で使用して下さい。
 - ・ Agilent Stabilization and Drying Solution (cat. No. 5185-5979)は有機溶媒を含んでいます。ご施設における所定の廃棄処理を行ってください。

実験上の注意

- ・ 血液・細胞・凍結組織からゲノム DNA を抽出する際は、実験の成功率を上げるために本プロトコルに記載されている方法に従ってください。FFPE サンプルを用いた実験は、Ailent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis (ULS Labeling for Blood, Cells, Tissues, or FFPE) Protocol (p/n G4410-90020)をご参照下さい。FFPE サンプルは SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイではサポートいたしておりません。
- ・ DNA の抽出方法をこの資料に記載されている方法に従うことが出来ない場合は、DNA に RNA やたんぱく質の混入がないことを確認してください。
- ・ ヌクレアーゼのコンタミネーションを防ぐために、実験中はパウダーフリーの手袋を着用し、推奨の試薬およびヌクレアーゼフリーでエアロゾル耐性のピペットチップを使用してください。
- ・ 実験作業場所を清潔に保ってください。
- ・ ゲノム DNA は物理的な衝撃により破壊されやすいので、ゲノム DNA を含む溶液は、ボルテックスによる攪拌を行わないようにして下さい。指でやさしくチューブをタッピングする混合を行って下さい。
- ・ ゲノム DNA を含む液や酵素の繰り返し凍結融解を避けてください。
- ・ 凍結されている試薬を使用する場合は
 1. 室温以下の温度で、できるだけすばやく試薬を溶かす
 2. ボルテックスミキサで軽く攪拌し混合し、5~10 秒の遠心で壁や蓋についた液を底に落とす
 3. 使用するまで氷上か cold block におく。
- ・ 概して、バイオセーフティーレベル1 (BL1)のルールに従い実施してください。

3. 必要なものの確認

【マイクロアレイ保存上の注意】

マイクロアレイは室温で保存して下さい。マイクロアレイのフォイルの袋開封後は、マイクロアレイのスライドは室温の暗所で、真空デシケータか窒素パージしたボックスで保管をしてください。開封後は高湿・温度変化・外気との接触を極力避けて下さい。保管に必要な設備がない場合、全てのマイクロアレイスライドは受注製造によって1スライドパッケージで納品することが可能です。納期はお問い合わせください。

【ラベル化の試薬の保管について】

SureTag DNA Labeling Kit および SureTag DNA Complete DNA Labeling Kit には Cyanine 3 dUTP 色素と Cyanine 5 dUTP 色素が含まれます。色素は到着後-20°Cで保存し、溶解後は遮光 4°Cで保存してください(色素の繰り返し凍結融解を避けてください。分注不可)。実験間隔があく場合は、-20°Cでも保存可能です。

【試薬・消耗品の保証期間について】

アジレントマイクロアレイおよびその他のアジレント製品の保証期間は、箱やチューブの入った小袋あるいはボトルに記載の Expiration date(Exp. date)までです。保証期間を過ぎた製品については欠品等があった場合も交換ができない場合がありますので、製品が納品されたらすぐに内容物を確認して下さい。

保証期間を過ぎると性能の保証ができないため、保証期間内に使用するよう計画して下さい。

実験に使用する全ての試薬・消耗品のロット番号と Expiration Date を記録して下さい。お問い合わせ頂く際はこれらの情報を添えて、お問い合わせ下さい。

※指定: 必ず指定されたものをご使用ください。指定品以外を使用された場合は保証の対象外になります。

※相当: コメント欄に記載された条件を満たすものなら、何を使用されてもかまいません。(青文字は Agilent 製品です)

※ULS プロトコルに必要な試薬・機器類につきましては、Ailent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis (ULS Labeling for Blood, Cells, Tissues, or FFPE) Protocol (p/n G4410-90020) をご参照ください。

消耗品(試薬など)

■ゲノムDNA抽出時

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当	最少必要数	1キット容量	備考
Phosphate Buffered Saline pH7.4 (PBS)	Amresco	E504-500ML	指定	1		ゲノムDNAの精製に使用
Clear E-Gel 18-Pak (1.2% agarose, no stain)	Life Technologies	G5518-01	指定	1		ゲノムDNAの断片化を確認するための電気泳動のゲル
SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain	Life Technologies	S11494	指定	1		電気泳動後のゲルを染色するための試薬
TrackIt 1kb DNA Ladder	Life Technologies	10488-072	指定	1		ゲノムDNAの断片化を確認するための電気泳動のサイズマーカー
DNase/RNase-free distilled water	Life Technologies	10977-015	指定	適宜		
Qubit dsDNA BR Assay Kit, for use with the Qubit fluorometer (100 assays) **	Invitrogen	Q32850	指定	1		** オプション: Qubit fluorometer に使用。二本鎖DNAを高い選択性で定量できる、蛍光を原理とした定量方法であればよい。
RNase A (100 mg/mL)	Qiagen	19101	指定	1		ゲノムDNAの精製に使用
Proteinase K (>600 mAU/mL, solution)	Qiagen	19131	指定	1		ゲノムDNAの精製に使用
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen	69504	指定	1		ゲノムDNAの精製に使用
Ethanol (95% to 100% molecular biology grade)	Sigma-Aldrich	E7203-6x500ML	指定	1		

■制限酵素・ラベリ化反応

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当	最少必要数	1キット容量	備考
SureTag DNA Labeling Kit	Agilent	5190-3400	指定	1	右記参照	1キット25アレイ分 (1X, 2X, 4Xフォーマット) または50アレイ分(8Xフォーマット)
SureTag DNA Complete DNA Labeling Kit	Agilent	5190-4240	指定		右記参照	1キット25アレイ分 (1X, 2X, 4Xフォーマット) または50アレイ分(8Xフォーマット)。Human Reference DNA (Male, Female)を含む **オプション:
Purification Columns **	Agilent	5190-3391	指定		50 units	8xフォーマット使用時など別途必要に応じてご準備ください。 SureTag Complete DNA Labeling Kit・SureTag DNA
1x TE (pH 8.0), Molecular grade	Promega	V6231	指定	適宜		
GenomePlex Complete Whole Genome Amplification Kit †	Sigma-Aldrich	WGA2-10RXN	指定	1	5アレイ分	†増幅法を行う場合に必要 DNAの増幅に使用
		WGA2-50RXN	指定	1	25アレイ分	
GenElute PCR Clean-Up Kit †	Sigma-Aldrich	NA1020	指定	1	35アレイ分	†増幅法を行う場合に必要 増幅DNAの精製に使用
Human genomic DNA for reference **	Promega	G1521 (Female), G1471 (Male)	指定			** オプション: 実験内容に応じてご準備ください。 ・ Promega Male, FemaleはCGH+SNPマイクロアレイ実験に使用できません。 ・ SureTag Complete DNA Labeling Kit には、CGHおよびCGH+SNPマイクロアレイ実験に使用可能なhuman Reference DNA (Male, Female, Individual 由来) が含まれます。
	Coriell	NA18505, NA18517, NA12891, NA12878, NA18579	指定			
Mouse genomic DNA for reference **	Jackson Labs	000664 (male and female)	指定			
Rat genomic DNA for reference **	Harlan Sprague	custom	指定			

■ハイブリダイゼーションと洗浄

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当	最少必要数	1キット容量	備考
Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip hybridization kit	Agilent	5188-5220	指定	1	右記参照	1キットは25アレイ分(1X)、50アレイ分(2X)、110アレイ分(4X)、290アレイ分(8X)
DNase/RNase-free distilled water	Life Technologies	10977-015	指定	適宜		Blocking Agent (Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip hybridization kit) の溶解に使用
Human Cot-1 DNA *	Agilent	5190-3393	指定	1	625µg	* Human サンプルで実験をする場合 1キットは 12アレイ分(1X)、25アレイ分(2X)、 125アレイ分(4X)、312アレイ分(8X)
Mouse Cot-1 DNA *	Life Technologies	18440-016	指定		500µg	* Mouseサンプルで実験をする場合 1キットは10アレイ分(1X)、 20アレイ分(2X)、100アレイ分(4X)、 250アレイ分(8X)
Rat Cot-1 DNA * (Rat Hybloc DNA)	Applied Genetics	RHB	指定		500µg	* Ratサンプルで実験をする場合 1キットは10アレイ分(1X)、 20アレイ分(2X)、100アレイ分(4X)、 250アレイ分(8X)
Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 and 2	Agilent	5188-5226	指定	1	1	5188-5221 2個と5188-5222 1個のセット
Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 (4L)	Agilent	5188-5221	指定		1	上記セットの単品販売品 使用量: 小Dish使用時、 約550-600mL/洗浄。
Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 (4L)	Agilent	5188-5222	指定		1	上記セットの単品販売品 使用量: 小Dish使用時、約250mL/洗浄。
10% TritonX-102 **	Agilent	5185-5975	指定	1	50mL	**オプション: Wash Buffer 1, 2に添加して使用。 (添加を推奨)
Milli-Q ultrapure water	Millipore		指定			
Stabilization and Drying Solution (500mL) **	Agilent	5185-5979	指定	1	500mL	**オプション: オゾン濃度5ppb以上の環境下で マイクロアレイ実験の洗浄・スキャンを実施する際に必要に応じて使用 ※オゾンブースの使用を強く推奨します。
Acetonitrile **	Sigma-Aldrich	271004-1L	指定		1L	**オプション: Stabilization and Drying Solution 使用時 スライド洗浄の工程で使用

オプション: ハイスループットで実施する場合もしくは増幅法のサンプル調製に

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当	最少必要数	1キット容量	備考
サーマルサイクラー (ふたを加熱できるもの)	Agilent	G8800A	相当	1		
96 well PCR plate	Agilent	401334	相当	1		
遠心機 (96-well plate対応)	Eppendorf	5810	相当	1		
Heat Sealer	Eppendorf	951023078	指定	1		
Peal-it-Foil (はがせるもの)	Eppendorf	951023205	指定	1		

オプション: 2-pack マイクロアレイをハイスループットで実施する場合

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当	最少必要数	1キット容量	備考
Tall Chimney PCR plate	ABgene	AB-1184	指定			

機器・器具

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当	必要数	1キット容量	備考
P10, P20, P200, P1000 マイクロピペット	Pipetman	P10, P20, P200, P1000	相当			例：1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL
Steatile, nuclease-free aerosol barrier ピペットチップ			相当			使用するマイクロピペットに適合するもの。滅菌済み、nuclease-free、エアロソルバリアのもの。
パウダーフリー手袋 SAFE SKINグローブPRE	Kimberly Clark	(S) 220 (M) 330 (L) 440	相当			アレイスライドの洗浄工程以外に使用。パウダーフリーのもの。
クリーンガード ブルーニトリルグローブ	Kimberly Clark	(S) 57371 (M) 57372 (L) 57373	相当			アレイスライドの洗浄工程に使用。事前にピーカーに入れたWash buffer1で手袋を洗い、手袋から垂れるbufferが白濁していないこと、ピーカー内のbufferに微粒子がないことを確認してください。ニトリルグローブとフラットピンセット33Aのどちらかをアレイの洗浄ステップで使用することをお勧めします
1.5mL RNase-free Microfuge Tube (98℃に耐性のあるもの)	Ambion	AM12400	相当			ハイブリダイゼーションや、マスターミックス調製などに使用
200 μL Thin-Wall Tube	Agilent	410091	相当			制限酵素・ラベリ化・ハイブリダイゼーションの作業にてサーマルサイクラーを使用する場合必要
E-Gel PowerBase v.4 †	Life Technologies	G6200-04	指定	1		† Life Technologies E-gel使用時に必要
E-Gel Opener †	Life Technologies	G5300-01	指定	1		† Life Technologies E-gel使用時に必要
UV-Transilluminator with SYBR Safe photographic filter	Alpha Innotech	AlphaImager 2000	相当	1		染色した電気泳動ゲルの検出に使用
SYBR photographic filter	Life Technologies	S7569	指定	1		染色した電気泳動ゲルの検出に使用
Qubit Fluorometer **	Life Technologies	Q32857	指定	1		**オプション： 二本鎖DNAを高い選択性で定量できる、蛍光を原理とした定量方法であればよい。
Thin wall, clear 0.5mL PCR tube **	Life Technologies VWR	Q32856 10011-830	指定 指定			**オプション：Qubit測定に使用
UV-VIS Spectrophotometer	NanoDrop	NanoDrop 8000 もしくは 2000	相当	1		サンプルゲノムDNAの品質確認や、増幅DNA・ラベリ化DNAの測定に使用。230 nm, 260 nm, 280 nmの吸光が測定できるもの。(220-320 nmの連続スキャンができるものが望ましい)
サーマルサイクラー (ふたを加熱できるもの)	Agilent	G8800A	相当	1		
高速遠心機	Eppendorf	5430	相当	1		1.5 mL遠心チューブを遠心できるもの
vacuum concentrator ++	Thermo Scientific	DNA120-115	相当	1		++ マイクロアレイのフォーマットに依存して準備が必要 (4x, 8x フォーマットには必要) また増幅法実施時、増幅DNA濃度が低い場合にも使用。左記装置以外を使用する際は、予め長時間連続使用時に発熱しないことや、ロータに(壁面に底が接することなく)チューブが入ることを確認してください。

Vacuum concentrator について：MV-100[TOMY]：サンプルを Microcon チューブから Eppendorf チューブに移し替えて行ってください (Microcon チューブ底部が遠心機内壁に接触するため)。また、長時間連続使用は、発熱することがあるので避けてください。CC-105 [TOMY]：Solid タイプロータ使用時はサンプルを Microcon チューブから Eppendorf チューブに移し替えて行ってください (もしくは Composite タイプのロータをご使用ください)

タイマー			相当	1			
ポルテックスミキサ			相当	1			
アイスバケツ			相当	1			
Sterile storage bottle **	Nalgen	455-1000	相当	1		**オプション： Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2を37度で予め加温する際に必要に応じて使用	
循環温浴槽 もしくはヒートブロック	Eppendorf	5355-000-011	相当	0~3		ゲノムDNA抽出時は56℃で使用。 制限酵素・ラベル化反応で使用する時*は37度・65度・98度で使用。 (*サーマルサイクラーで代用可) ハイブリダイゼーションでは、使用する反応容器に依存 (日本語プロトコルp.38参照)	
1×244K, 1×1M アレイフォーマット用 ガスケットスライド	Agilent	G2534-60003	指定	5個 20個 100個	5個	1x1M, 244Kフォーマット用 (5個セット)	
	Agilent	G2534-60008	指定		20個	1x1M, 244Kフォーマット用 (20個セット)	
	Agilent	G2534-60005	指定		100個	1x1M, 244Kフォーマット用 (100個セット)	
2×105K, 2×400K アレイフォーマット用 ガスケットスライド	Agilent	G2534-60002	指定		5個	2x105K, 2x400Kフォーマット用 (5個セット)	
	Agilent	G2534-60009	指定		20個	2x105K, 2x400Kフォーマット用 (20個セット)	
	Agilent	G2534-60006	指定		100個	2x105K, 2x400Kフォーマット用 (100個セット)	
4×44K, 4×180K アレイフォーマット用 ガスケットスライド	Agilent	G2534-60011	指定		5個	4x180K, 4x44Kフォーマット用 (5個セット)	
	Agilent	G2534-60012	指定		20個	4x180K, 4x44Kフォーマット用 (20個セット)	
	Agilent	G2534-60013	指定		100個	4x180K, 4x44Kフォーマット用 (100個セット)	
8×15K, 8×60K アレイフォーマット用 ガスケットスライド	Agilent	G2534-60014	指定		5個	8x60K, 8x15Kフォーマット用 (5個セット)	
	Agilent	G2534-60015	指定		20個	8x60K, 8x15Kフォーマット用 (20個セット)	
	Agilent	G2534-60016	指定		100個	8x60K, 8x15Kフォーマット用 (100個セット)	
プラスチック製ピンセット	Agilent		指定		1		ハイブリチャンバとともに納品
ハイブリダイゼーション オープン	Agilent	G2545A	指定		1		20rpm、67℃で使用 別途専用ロータが必要。(下記)
ハイブリダイゼーション オープンロータ	Agilent	G2530-60029	指定		1		最大24/ハイブリダイゼーションチャンバまで載せることができます。
オリゴDNAマイクロアレイ用 ハイブリダイゼーションチャンバ	Agilent	G2534A	指定	2~		1スライドガラスに1つ必要。ロータのバランスのため偶数個ご準備ください。	
ハイブリエイド **	アジレントにお問合せ下さい	HYB-100	指定	1セット		**オプション：必要に応じてご準備ください。	
オゾンフリーブース ** (使用を推奨)	アズワン株式会社	2-M005-01B	指定	1		**オプション (強く推奨)： 環境中のオゾン濃度が5ppb以上の場合には必要 洗浄・スキャン環境からオゾンを除去する装置。 サイズ：1760(W)x710(D)x1000(H)mm	
オゾンフリーブース用 フィルタ **	アズワン株式会社	3-4425-11	指定	1	6	**オプション (強く推奨)： オゾンフリーブース使用時、フィルタ交換の際に 追加購入(6本入り)	
フラットピンセット 33A ** (使用を推奨)	アズワン株式会社	7-160-13	相当	2		**オプション (強く推奨)： アレイスライド洗浄時、解体に使用。手袋からの予期せぬ汚れから、マイクロアレイを防ぐために使用を推奨。	
スターラー付恒温槽	株式会社日伸理化	SW-500NT	相当	1			
スターラープレート **	Coming	6795-410	相当	1, 3		** 洗浄プロトコル内容により必要数が異なる Stabilization and Drying Solution使用時は3つ準備	
回転子 **			相当	2, 4		** 洗浄プロトコル内容により必要数が異なる。 Stabilization and Drying Solution使用時は4つ準備 ・1回に洗浄するスライドガラスが5枚以下の場合 3cm程度の長さのもの	

スライド洗浄ガラス容器 (Dish) (中または小) **	Wheaton	(中) 900301 (小) 900201	指定	3,5	1セット 3個入り	** 洗浄プロトコル内容により必要数が異なる。 Stabilization and Drying Solution使用時は5つ準備 中：1回に洗浄するスライドガラスが6~8枚の場合 小：1回に洗浄するスライドガラスが5枚以下の 場合 ThermoShandon102は廃止していますが、お持ちの物 があれば使用可能です。
	Thermo Shandon	(中) 122 (小) 102	指定		1個	
スライドラック (ステンレス製)	Thermo Shandon	(中) 113 (小) 109	指定	1	1	ThermoShandon109は廃止していますが、お持ちの物 があれば使用可能です。
Agilent scanner	Agilent	G4900DA, G2565CA	指定	1	1	1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K マイクロアレイには高 分解能仕様のスキャナが必要
スライドホルダ	Agilent		指定	1		Agilent スキャナ用 (スキャナとともに納品)。 スライドガラスの枚数分必要
真空デシケータもしくは N2ガスボンベ						開封後のマイクロアレイスライドの保存時に使用。 真空デシケータか、もしくは窒素パージした容器に保存 することを推奨。
ウェハーガードGNガス フィルターガン **	日本インテグ リス株式会社	WGGB01KAG (ガン本体)、 WGFG01KL5 (フィルター)、 XX671000T (スパイラルチューブ)	推奨	1		**オプション： 上記窒素ガス使用時、ボンベに装着して使用します。 フィルターガンのほかに、フィルターおよびスパイラル チューブが必要です。
ブLOWER			推奨	1		スライドガラス表面に付着したほこりなどを吹き飛ばす ために使用します。水分が出る恐れがあるため、ス プレー缶ではなくゴム製のブLOWERをご使用ください。窒 素ガスで代用可能。
スーパードライ 小型 **	SAYNSYO	59-0090 (2段タイプ)	相当	1		**オプション：デシケータとして準備する場合。 パッケージ開封後のマイクロアレイや使用済みのマイク ロアレイの保存用デシケータです。 1段タイプ(59-0089)もあります。
Ozone-barrier slide cover **	Agilent	G2505-60550	指定	1	25個	**オプション：オゾン濃度が5ppb以上の環境中で、 G2565CAかG2565BAでスキャンする際に使用。 スライドガラスの枚数分ご準備ください。(オゾンブ ース内でスキャンする場合は必須ではない)
漏斗 **			相当	1		**オプション：Stabilization and Drying Solution 使用 時 Stabilization and Drying Solution を 保存用の瓶に移す際に使用
500mLの褐色または透明なガラス瓶 **			相当	1		**オプション：Stabilization and Drying Solution 使用 時 Stabilization and Drying Solution の保存用の瓶

オプション：組織からゲノムDNAを抽出する場合

品名	製造 メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当	最少 必要数	1キット 容量	備考
Thermale shaker	Eppendorf	22670000	相当	1		

4. 実験で使用する Agilent 試薬キットの確認

アジレント SureTag DNA Labeling Kit 50 反応分 (x8 フォーマット 100 反応分)

(製品番号 5190-3400)

Component	Volume (ul)	保存条件
Nuclease Free water	1500	-20°C
Random Primers	265	-20°C
10 x dNTPs	265	-20°C
5 X Reaction Buffer	525	-20°C
Exo-Klenow Fragment	55	-20°C
10X Restriction Enzyme Buffer	130	-20°C
BSA	10	-20°C
Alu I	25	-20°C
Rsa I	25	-20°C
Cyanine3-dUTP*	75	遮光。-20°C、溶解後は4°C
Cyanine5-dUTP*	75	遮光。-20°C、溶解後は4°C
Amicon Ultra-0.5, Ultracel-30 Membrane, 30kDa	50 units	室温

*Cyanine 3 dUTP 色素と Cyanine 5 dUTP 色素が含まれます。色素は到着後-20°Cで保存し、溶解後は遮光 4°Cで保存してください(色素の繰り返し凍結融解を避けてください。分注不可)。実験間隔があく場合は、-20°Cでも保存可能です。

アジレント SureTag Complete DNA Labeling Kit 50 反応分 (x8 フォーマット 100 反応分)

(製品番号 5190-4240)

Component	Volume (ul)	保存条件
Human Reference DNA (Male and Female)**	25 µg each	-20°C、溶解後は4°C
Nuclease Free water	1500	-20°C
Random Primers	265	-20°C
10 x dNTPs	265	-20°C
5 X Reaction Buffer	525	-20°C
Exo-Klenow Fragment	55	-20°C
10X Restriction Enzyme Buffer	130	-20°C
BSA	10	-20°C
Alu I	25	-20°C
Rsa I	25	-20°C
Cyanine3-dUTP*	75	遮光。-20°C、溶解後は4°C
Cyanine5-dUTP*	75	遮光。-20°C、溶解後は4°C
Amicon Ultra-0.5, Ultracel-30 Membrane, 30kDa	50 units	室温

*Cyanine 3 dUTP 色素と Cyanine 5 dUTP 色素が含まれます。色素は到着後-20°Cで保存し、溶解後は遮光 4°Cで保存してください(色素の繰り返し凍結融解を避けてください。分注不可)。

実験間隔があく場合は、-20°Cでも保存可能です。

**ゲノム DNA の繰り返し凍結融解を避けてください。(長期保存の際は分注後-20°C保存推奨)

アジレント Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit 25 スライドグラス分**(製品番号 5188-5220)**

本キットは開封するまでは室温(17-23°C)で保存してください。

Component	Volume (ul)	保存条件
2 x Hi-RPM Hybridization Buffer	1400/vial, 5 vials	室温*
10 X aCGH Blocking Agent	1 vial	室温、調製後は-20°C**

* 2x Hi-RPM Hybridization Buffer を冷蔵・冷凍保存しないでください。

** 開封して、10x aCGH Blocking Agent を調製後は、この試薬のみ**-20°Cで保存**してください。**アジレント Cot-1 Human DNA (製品番号 5190-3393)**

Component	Volume	保存条件
Cot-1 Human DNA	625 ug	-20°C

アジレント Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer Kit (製品番号 5188-5226)

Component	Volume	保存条件
Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1	4L/pack, 2 packs	室温
Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2	4L/pack, 1 pack	室温

※個別にご購入することが可能です。

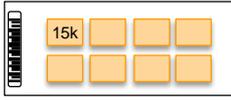
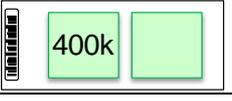
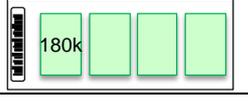
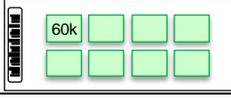
・Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1(製品番号 5188-5221)

・Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 (製品番号 5188-5222)

アジレント Stabilization and Drying Solution - 500 mL (オプション) (製品番号 5185-5979)

5. CGH マイクロアレイフォーマット(2020 年 10 月現在)

アジレントの CGH マイクロアレイのフォーマットは 8 種類

	1-pack	2-pack	4-pack	8-pack
HD	1x244K ~244,000 プローブ/ アレイ 	2x105K ~105,000 プローブ/ アレイ 	4x44K ~44,000 プローブ/ アレイ 	8x15K ~15,000 プローブ/ アレイ 
G3	1x1M ~1,000,000 プローブ/ アレイ 	2x400K ~400,000 プローブ/ アレイ 	4x180K ~180,000 プローブ/ アレイ 	8x60K ~60,000 プローブ/ アレイ 

カスタムアレイ

1M、2x400K、4x180K、8x60K、244K、2x105K、4x44K、8x15K フォーマット対応*

弊社ウェブサイト Sure Design (<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002474>) より、Agilent デザインの CGH 用および SNP 領域プローブデータベースから、研究のターゲットとする領域に、任意の分解能でプローブを選択してカスタムアレイを作成する事が可能です。

生物種:ヒト・マウス・ラット・ニワトリ・イヌ・ウシ・チンパンジー・アカゲザル・線虫(2020 年 10 月 現在)

* CGH+SNP マイクロアレイは 1M、2x400K、4x180K、8x60K にのみ対応

マイクロアレイ保存上の注意: マイクロアレイは熱・湿気・オゾンにより劣化します。

- アレイは室温で保存して下さい。
- 開封後は暗所・室温で、真空デシケータ中か、窒素パージした箱の中で保管して下さい。
- 開封後は、マイクロアレイスライドを外気にさらさないで下さい。

6. 必要なスキャナおよびソフトウェア

	スキャナ コントロール ソフトウェア	Feature Extraction ソフトウェア		
		CGH+SNP	G3-CGH 1x1M、2x400K、 4x180K、8x60K	HD-CGH 1x244K、2x105K、 4x44K、8x15K
SureScan	9.1	10.10*以降	10.5 以降	10.5 以降
C Scanner	8.3 以降	10.10*以降	10.5 以降	10.5 以降
B Scanner	7.0.03 以降	–	–	9.5 以降
A Scanner	7.0.01 以降	–	–	9.5 以降
GenePix 4000B	–	–	–	9.5

*Feature Extraction ソフトウェア v10.10 は Agilent Genomic Workbench v6.5 Standard インストーラ (64bit 対応のみ) および CytoGenomics v1.5 以降 (32bit, 64bit 対応) に含まれています。

※ CGH+SNP マイクロアレイの解析には、Agilent Genomic Workbench 6.5 以降または CytoGenomics 1.5 以降が必要です。

※ Cancer CGH+SNP マイクロアレイの解析には CytoGenomics 2.0 以降が必要です。

解析ソフトウェア、Feature Extraction の PC システム要件などの情報は弊社ホームページをご参照下さい。

7. DNA サンプルの調製

アジレントのアレイ CGH アプリケーションは”2色法”を用いて、対照 (reference) サンプルに対する被検査 (experimental) サンプルの DNA のコピー数変化(CNC)(CGH+SNP マイクロアレイを使用時は copy-neutral Loss of Heterozygosity や Uniparental Disomy)を検出します。Reference として用いるサンプルは実験内容に依存しますが、SureTag DNA Copmplete Labeling Kit [p/n 5190-4240] に含まれる Human Reference DNA (Male、Female) のような市販の正常ゲノム DNA が用いられることも多いです。

本チャプターでは、アジレントが推奨するゲノム DNA 調製の推奨方法(血液・細胞・凍結組織から DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて、ゲノム DNA を調製する方法)が記載されています。

FFPE サンプル抽出 DNA など、分解・ダメージがあるゲノム DNA を使用する場合は、別途 Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomics DNA Analysis (ULS Labeling for Blood, Cells, Tissues, or FFPE) Protocol (p/n G4410-90020)をご参照ください。SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイを使用する場合、FFPE サンプルはサポートいたしておりませんのでご注意ください。

【CGH+SNP マイクロアレイの Reference サンプルの推奨】

SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイを使用する場合、reference サンプルは ”genotype された個体サンプル” を用いる必要があります(pool DNA は不可)。以下のいずれかの DNA サンプルを reference にご使用いただけます。

1. SureTag Complete DNA Labeling Kit [p/n 5190-4240] に含まれる Human Reference DNA
2. 以下5種の推奨 HapMap サンプルのうち1つ:NA18507 (Yoruba Male)・NA18517 (Yoruba Female)・NA12891 (European Male)・NA12878 (European Female)・NA18579 (Chinese Female)。HapMap サンプルは Coriell Institute for Medical research からオーダー可能です。

3. 上記以外の reference サンプル(single individual より調製) を genotype して使用

方法:それぞれ上記推奨5種の Coriell DNA とハイブリシ CGH+SNP マイクロアレイデータを取得
(初めに1度だけでよい)

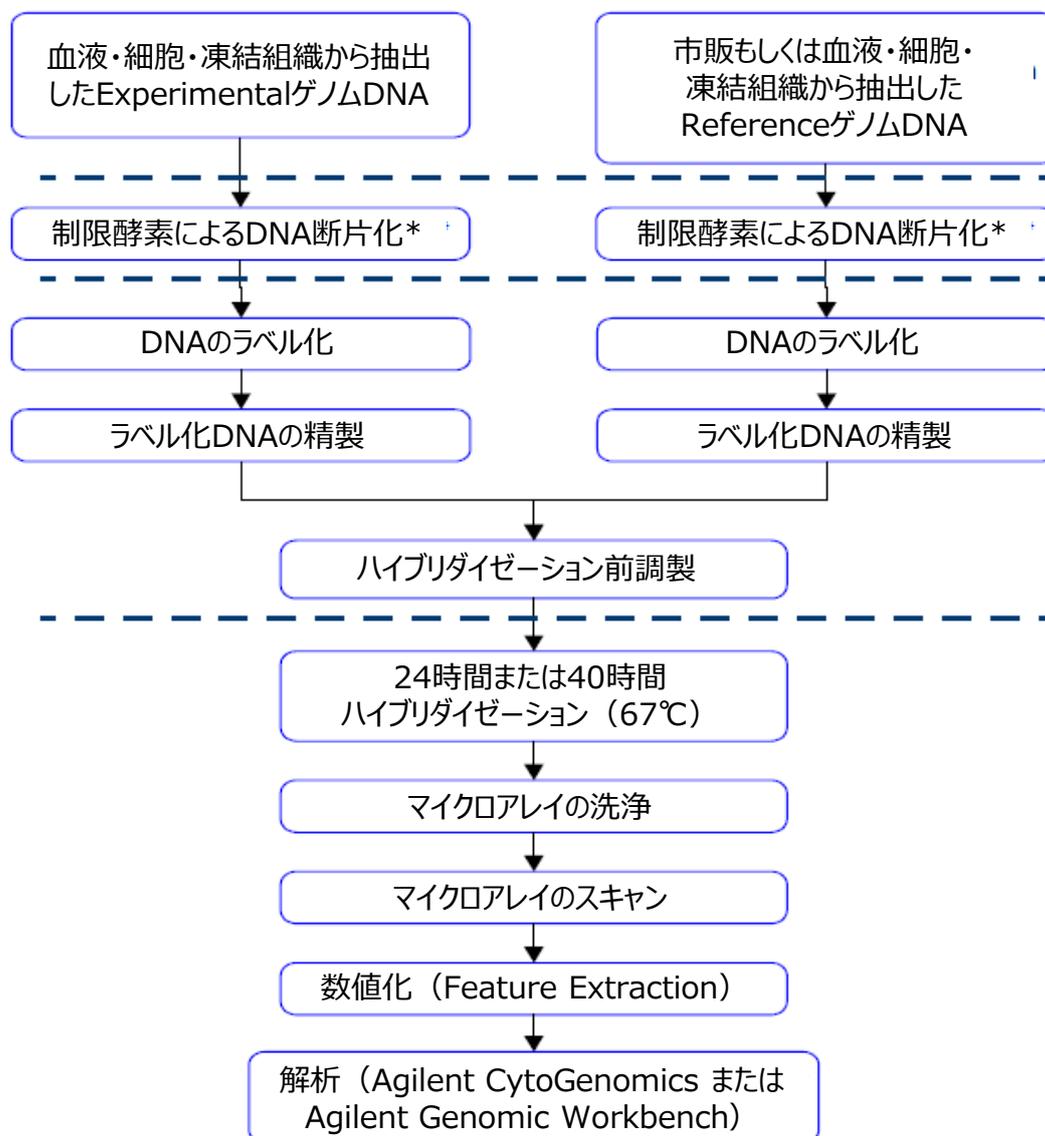
Array #1	Cy3: NA18507	Cy5: 新規 reference
Array #2	Cy3: NA18517	Cy5: 新規 reference
Array #3	Cy3: NA12891	Cy5: 新規 reference
Array #4	Cy3: NA12878	Cy5: 新規 reference
Array #5	Cy3: NA18579	Cy5: 新規 reference

#1 から#5 の genotype のデータを 1 つにまとめて新規 reference genotype file を作成し、解析ソフトウェア (Agilent Genomic Workbench v6.5 以降または CytoGenomics v1.5 以降)にインポートして使用

ラベル化反応に使用する experimental サンプルのゲノム DNA 量は、reference サンプルのゲノム DNA 量と同じにする必要があります。DNA の定量が不正確であると、ラベル化に使用する experiment と reference の DNA 量に差が生じ、その結果アッセイノイズ (DLRSD) を増加させます。サンプルの抽出方法が異なる場合も、定量におけるアーチファクトを生じさせることがあります。アッセイノイズを最小にとどめるために、二本鎖 DNA を高く選択的に定量する蛍光分析法 (例 Qubit) を用いることをアジレントは推奨いたします。NanoDrop 分光計 はゲノム DNA の純度の確認に使用できます。Agilent Human Reference DNA Male+Female は 200 ng/μL で、分光計と蛍光光度計の両方で測定されているので、濃度を再測定する必要はありません。

また、GenetiSure Cancer Research CGH+SNP 2×400K または GenetiSure Postnatal Research CGH+SNP 2×400K は、弊社では Agilent Human Reference DNA Male または Female でのみ検証を行っておりますため、これらのリファレンスサンプルをご使用下さい。

ダイレクト法 (p.33~) のサンプル調製とマイクロアレイ操作
調製にはゲノムDNA 0.5 μ g (1-pack, 2-pack, 4-pack) または
0.2 μ g (8-pack) が必要です。



* SurePrint HD・G3 CGHマイクロアレイ使用時はオプション。
SurePrint G3 CGH+SNPマイクロアレイ使用時は必須。

7-1. ゲノム DNA の調製

DNeasy Blood & Tissue Kit をご使用ください。

注：DNeasy Mini Spin Column と溶出液が接触するのを避けるために、1回目の溶出で用いたマイクロチューブをそのまま2回目の溶出ステップで用いないでください。

注：DNeasy のカラムはアプライ量の上限を守って使用することが重要です。

1. 前もって、サーモミキサーを 56°C、ヒートブロックあるいは循環温浴槽を 56°C に設定します。
無核赤血球からなる血液は**ステップ 2**、有核赤血球からなる血液は**ステップ 3**、培養細胞は**ステップ 4**、凍結組織は**ステップ 5**、抽出した DNA の再精製は**ステップ 6** に進む。

2 無核赤血球血液 (哺乳動物)

- 2.1 20 μ l の Proteinase K を 1.5 mL RNase-free Microfuge Tube の底の方にピペットで入れる。
- 2.2 抗凝血処理された 50~ 100 μ l の血液を添加する。
- 2.3 Phosphate Buffered Saline pH 7.4 (PBS) で容量を 220 μ l に調節する。
- 2.4 **ステップ 7** に進む。

3 有核赤血球血液 (chicken など)

- 3.1 20 μ l の Proteinase K を 1.5 mL RNase-free Microfuge Tube の底の方にピペットで入れる。
- 3.2 抗凝血処理された血液 5~10 μ l を添加する。
- 3.3 Phosphate Buffered Saline pH 7.4 (PBS) で容量を 220 μ l に調節する。
- 3.4 **ステップ 7** に進む。

4 培養細胞

- 4.1 適切な数の細胞(最大 5×10^6 個)を 300 x g で 5 分間遠心分離する。ペレットを Phosphate Buffered Saline pH 7.4 (PBS) 200 μ l で再懸濁する。
- 4.2 20 μ l の Proteinase K を添加する。
- 4.3 **ステップ 7** に進む。

5 凍結組織

- 5.1 25 mg (脾臓は 10 mg まで)を細かくカットし、1.5 mL RNase-free Microfuge Tube に入れる。
- 5.2 180 μ l の Buffer ATL(Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit に添付)を添加する。
- 5.3 Proteinase K 20 μ l を添加する。
- 5.4 ボルテックス操作して混和する。
- 5.5 組織が完全に溶解するまで、サーモミキサーで 450rpm 混和しながら 56°C でインキュベートする。溶解時間は使用する組織タイプにより変動します。溶解は通常 1~3 時間で完了します。溶解を一晩中行なっても調製には影響しません。
- 5.6 サンプルを室温にまで冷やしたあと、6,000 x g で 30 秒間遠心し、壁面のサンプルをすべてチューブの底部に集める。
- 5.7 **ステップ 7** に進む。

6 抽出した DNA の再精製

- 6.1 最大 25 μg の DNA を準備する。
 - 6.2 Phosphate Buffered Saline pH 7.4 (PBS)で容量を 220 μl に調節する。
 - 6.3 Proteinase K (Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit に添付) 20 μl を添加する。
 - 6.4 [ステップ 7](#) に進む
-
- 7 4 μl の RNase A (100 mg/ml) を添加し、ボルテックス操作して混和し、室温 (15~25°C) で 2 分間インキュベートする。6,000 x g で 30 秒間遠心し、壁面のサンプルをすべてチューブの底部に集める。
 - 8 200 μl の Buffer AL (Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit に添付) を各サンプルに添加し、ボルテックス操作で完全に混和後、ヒートブロックまたは循環温浴槽により 56°C で 10 分間インキュベートする。6,000 x g で 30 秒間遠心し、壁面のサンプルをすべてチューブの底部に集める。
 - 9 100% Ethanol 200 μl をサンプルに添加し、ボルテックス操作で十分にミックスする。6,000 x g で 30 秒間遠心し、壁面のサンプルをすべてチューブの底部に集める。
 - 10 ステップ 9 の混合液を新しい 2 ml コレクションチューブ (添付) 中の DNeasy Mini Spin Column に移す。6,000 x g で 1 分間遠心操作する。ろ液およびコレクションチューブを捨てる。DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (添付) に移す。
 - 11 Buffer AW1 を最初に使用する前に、容器に記載されている様に適切な量の 100% Ethanol を加え調製する。蓋のエタノール添加を示すチェックボックスに印をつける。
 - 12 500 μl の Buffer AW1 を添加し、6,000 x g で 1 分間遠心分離する。ろ液およびコレクションチューブを捨てる。DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (添付) に移す。
 - 13 Buffer AW2 を最初に使用する前に、容器に記載されている様に適切な量の 100% Ethanol を加え調製する。蓋のエタノール添加を示すチェックボックスに印をつける。
 - 14 500 μl の Buffer AW2 を添加し、20,000 x g で 3 分間遠心して DNeasy カラムメンブレンを乾燥させる。ろ液およびコレクションチューブを捨てる。
 - 15 DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブ (別途準備) に移し、200 μl の Buffer AE を DNeasy メンブレン上の中央に直接添加する。
 - 16 室温 (15~25°C) で 1 分間インキュベートした後、6,000 x g で 1 分間遠心分離し、DNA を溶出する。
 - 17 DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 mL RNase-free Microfuge Tube に移し、[ステップ 15](#)、[16](#) をもう一度繰り返す。1 回目の溶出液と 2 回目の溶出液を一緒にする。(最終容量 400 μl)

7-2. ゲノム DNA の定量・品質確認

ゲノム DNA の定量と質を正確に確認することはアジレント CGH マイクロアレイ実験を成功させるために重要です。高品質のゲノム DNA として、炭水化物やたんぱく質、残存有機溶媒などの混入がなく、分解が最小の Intact なものであるものを推奨します。

FFPE 組織からゲノム DNA を抽出する方法につきましては、別途 Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomics DNA Analysis (ULS Labeling for Blood, Cells, Tissues, or FFPE) Protocol (p/n G4410-90020)中の "FFPE Tissues" の項目をご参照ください。SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイを使用する場合、FFPE サンプルはサポートいたしておりませんのでご注意ください。

- Qubit dsDNA BR Assay Kit を使い蛍光分析法で二本鎖 DNA の濃度を測定してください。
- NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer (もしくはその相当品)を使いゲノム DNA の濃度と純度を確認してください。
- アガロースゲル電気泳動を使い、各サンプルについてゲノム DNA が分解していないことや平均分子量を確認してください。

Note 高質なデータを得るために、蛍光分析法による定量方法を推奨します。

蛍光分析法

Qubit dsDNA BR Assay Kit は室温 (22°C から 28°C) で使用します。温度が変動する環境ではアッセイの精度に影響するおそれがあります。

1. 専用の Thin wall, clear 0.5mL PCR tubes をスタンダード用 2 つとサンプル数用意します。
2. Qubit Working Solution を調製します。
スタンダードと測定するサンプルの数(+余剰分)に応じて右表の内容の混合物を調製し、ボルテックスミキサーで 2-3 秒撹拌します。

1 測定物辺りの量	
Qubit dsDNA BR Reagent	1 μ L
Qubit dsDNA BR Buffer	199 μ L
3. スタンダード用 (Standard 1、Standard 2) に準備した 2 つの Thin wall, clear 0.5 mL PCR tubes に 190 μ L の Qubit Working Solution を入れます※注意 1。
4. サンプル用のチューブに 180~199 μ L の Qubit Working Solution を入れます※注意 1。
5. 10 μ L の Qubit dsDNA BR standard #1 と Qubit dsDNA BR standard #2 を、3で準備したチューブにそれぞれ加えます。
6. 1~20 μ L のサンプルを4で準備したサンプル用のチューブに加えます。(トータル 200 μ L に調製します。)
7. ボルテックスミキサーで全てのチューブを 2 から 3 秒間撹拌します。泡ができないように注意してください。
8. 室温で 2 分間チューブを静置します。
 - Qubit のキャリブレーションは次のように行います。
 - a. Qubit 1.0 のホームスクリーンで上矢印または下矢印を使ってアッセイタイプに dsDNA Broad Range Assay を選択し、GO を押します。標準のスクリーンが自動で表示されます。

- b. Run new calibration を選択し、GO を押します。
 - c. standard 1 のチューブを Qubit Fluorometer に入れ、蓋を閉じ、GO を押します※注意 2。測定が終わったらチューブを取り出してください。
 - d. standard 2 のチューブを Qubit Fluorometer に入れ、蓋を閉じ、GO を押します※注意 2。測定が終わったらチューブを取り出してください。
- これでキャリブレーションは完了です。
- サンプル濃度の測定は次のように行います。
 - a. サンプルのチューブを Qubit Fluorometer に入れ、蓋を閉じ、GO を押します※注意 2。
 - b. 測定(約 5 秒)が終わったら測定値を記録してください。
 - c. 結果はスクリーンに表示されます。表示された数値はアッセイチューブ内の核酸の濃度です。
 - d. 装置からサンプルを取り出し、次のサンプルを入れ、GO を押します※注意 2。
 - e. 全てのサンプルの測定が終わるまでくりかえしてください。
 - f. 元のサンプルの濃度を計算してください。(下の「**サンプル濃度の計算**」を参照ください)
 - g. 各サンプルのレプリケートの平均濃度を計算してください。

サンプル濃度の計算

Qubit Fluorometer の Qubit dsDNA BR assay では、測定値は $\mu\text{g/mL}$ で与えられます。この測定値はアッセイチューブ内で希釈されたサンプル濃度に相当します。サンプルの元の濃度を計算するためには、次の式を使います。

サンプル濃度 = 測定値 \times (200/y) (y はアッセイチューブに加えたサンプルの容量です。)

※注意 1: Qubit Working Solution は粘性が高いため、分注時に正しく測り取るよう注意します。(例: リバース(インバース)ピペッティングの使用)

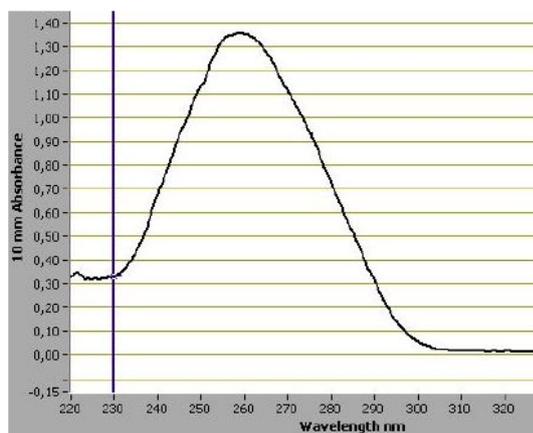
※注意 2: チューブを Qubit 本体に挿入した後、速やかに測定してください。

UV-VIS 分光測定法

NanoDrop による測定時の操作

濃度が $>350 \text{ ng/uL}$ のときは Buffer AE や $1 \times \text{TE}(\text{pH } 8.0)$ で 2 倍に希釈し測定します。

1. Nucleic Acid Measurement モードで、Sample Type を DNA-50 に設定して測定します。
2. ゲノム DNA 抽出時の溶出バッファや、ゲノム DNA を溶解しているバッファを $1.5 \mu\text{L}$ 、blank として測定。
3. 各ゲノム DNA を $1.5 \mu\text{L}$ 用いて測定します。
4. DNA 濃度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) と A260/280 と A260/A230 を記録します。高品質のゲノム DNA は A260/A280 値は 1.8~2.0 で、タンパク質の混入が低いことを示します。220~320nm の吸光を連続スキャンすることで 260nm の吸光に影響する混入物がないことも確認できます。下図のように 260nm にピークがあり、全体がなだらかな形あることを確認します。純度の高い DNA の理想的な 260/230 値は >1.0 です。



A260	DNA濃度測定
A230	有機化合物(フェノール、アルコール、guanidinium isothiocyanates 等)、炭水化物(糖質)等の混入物
A280	タンパク質

典型的な pure DNA のスペクトル図

アガロースゲル電気泳動

DNA の Intactness を調べるためにアガロースゲル電気泳動を行うことを推奨します。

例: 1.2% Clear E-Gel (20ng DNA を使用)、SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain* による手順

* SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain, Invitrogen 社 [S11494]

2 本鎖核酸に対する極めて高い感度のインターカラーター色素のため、少量サンプルでのゲノム DNA の電気泳動を行うことが可能です。

1. 20ng ゲノム DNA を DNase/RNase-free distilled water にて 10 μ L に調製し、1.2% Clear E-Gel にアプライする。(loading buffer を加える必要はありません)
2. コントロールとして、市販ヒトゲノム DNA 20ng を、DNase/RNase-free distilled water にて 10 μ L に調製し、同じ gel のウェルのひとつにアプライする。
3. TrackIt 1kb DNA Ladder 5 μ L を DNase/RNase-free distilled water 95 μ L に加え、そのうち 10 μ L を同じ gel のウェルのひとつにアプライする。
4. Invitrogen 社 操作説明書に従い 30 分間電気泳動を行う。
5. Invitrogen 社 操作説明書に従い E-Gel Opener にてゲルカセットをあける。
6. ゲルを SYBR Gold Nucleic Acid Stain (DNase/RNase-free distilled water にて 1:10,000 に希釈*)で 15 分間染色する。
※10 μ L SYBR Gold Nucleic Acid Stain を 100mL Nuclease-free 水に加える
7. UV-transilluminator (SYBR Gold photographic filter 使用)にてゲルを確認する。

8. ラベル化前の反応

この項目では、アジレントが推奨する2つのラベル化前の実験工程が記述されています。

ダイレクト法 (p.33) か増幅法 (p.27) のいずれかをお選びいただけます。(ワークフロー図: p.18、p.26)

注意 SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイには増幅法はご使用いただけません。

注意 制限酵素反応、ラベル化、ハイブリダイゼーションサンプル準備の全てのインキュベーションステップで、サーマルサイクラーの使用を推奨します。

ヒートブロックの使用はサンプル間差を大きくする可能性があり、また、温浴槽の使用は特に高温において温度が変動します。特に 98°C のインキュベーションでは、ヒートブロックや温浴槽ではなくサーマルサイクラーを使用する効果が大きくなります。

8-1. 増幅法 (オプション)

注意 増幅法でクオリティのいいデータを取得するためには、高品質の、断片化の進んでいないゲノムを使用します。もし推奨以外の方法にてゲノム DNA を調製する場合は、ゲノム DNA に RNA やタンパク質が混入しないように注意します。必要に応じて DNA の再精製を行ってください (p.19)。

増幅法では reference DNA も増幅をおこない、分解度が Test サンプルと同様であることを確認します。ピペティングによりゲノム DNA が完全に溶解していることを確認します。必要に応じて 37°C 30 分加熱します。

GenomePlex を使用した本法は、サイズ >500bp の DNA も使用可能ですが、その場合十分なラベル化のための DNA を得るにはスタート量を極力増やすことを推奨します (100ng まで)。FFPE サンプルなど、ゲノム DNA に、断片化だけでなくダメージ (核酸のクロスリンク・ヒストンなど核酸結合タンパク質への影響・核酸の脱プリン化など) の可能性がある場合、本増幅法に適さない場合があります。

ゲノム DNA の量が限られているとき、増幅法を用いることにより 50ng から実験が可能です。ゲノム DNA が 0.5 µg 以上 (1-, 2-, 4-pack マイクロアレイの場合) もしくは 0.2 µg 以上 (8-pack マイクロアレイの場合) ある場合は、p. 33 のダイレクト法の手順をご覧ください。

【原理】

Sigma 社 GenomePlex Whole Genome Amplification kit (WGA2) を用いて、ゲノム DNA を増幅します。このキットは熱によるランダムなゲノム DNA 断片化の後、小さな断片を、両側に universal priming site を持つ PCR 増幅可能な OmniPlex Library 分子に変換することによる、「リンカーを介したプライマーPCR 増幅技術」を用いています。OmniPlex library は universal oligonucleotide primer を用いて PCR で増幅されます。凍結組織や培養細胞を含めた多様なサンプル種からの抽出したゲノム DNA に適しております。

【使用機器・消耗品】

- 機器
- サーマルサイクラー (ふたを加熱できるもの)
 - 真空濃縮装置 (例 Speed Vac) (増幅後の DNA の濃度が低い場合のみ必要)

- 遠心機(1.5mL チューブ対応、12,000～16,000xg で回転可能なもの)
- 消耗品 200 μ L Thin-Wall Tube もしくは 96-well PCR plate
- DNase/RNase-free distilled water
- Ethanol
- GenomePlex Complete Whole Genome Amplification Kit
- GenElute PCR Clean-Up Kit

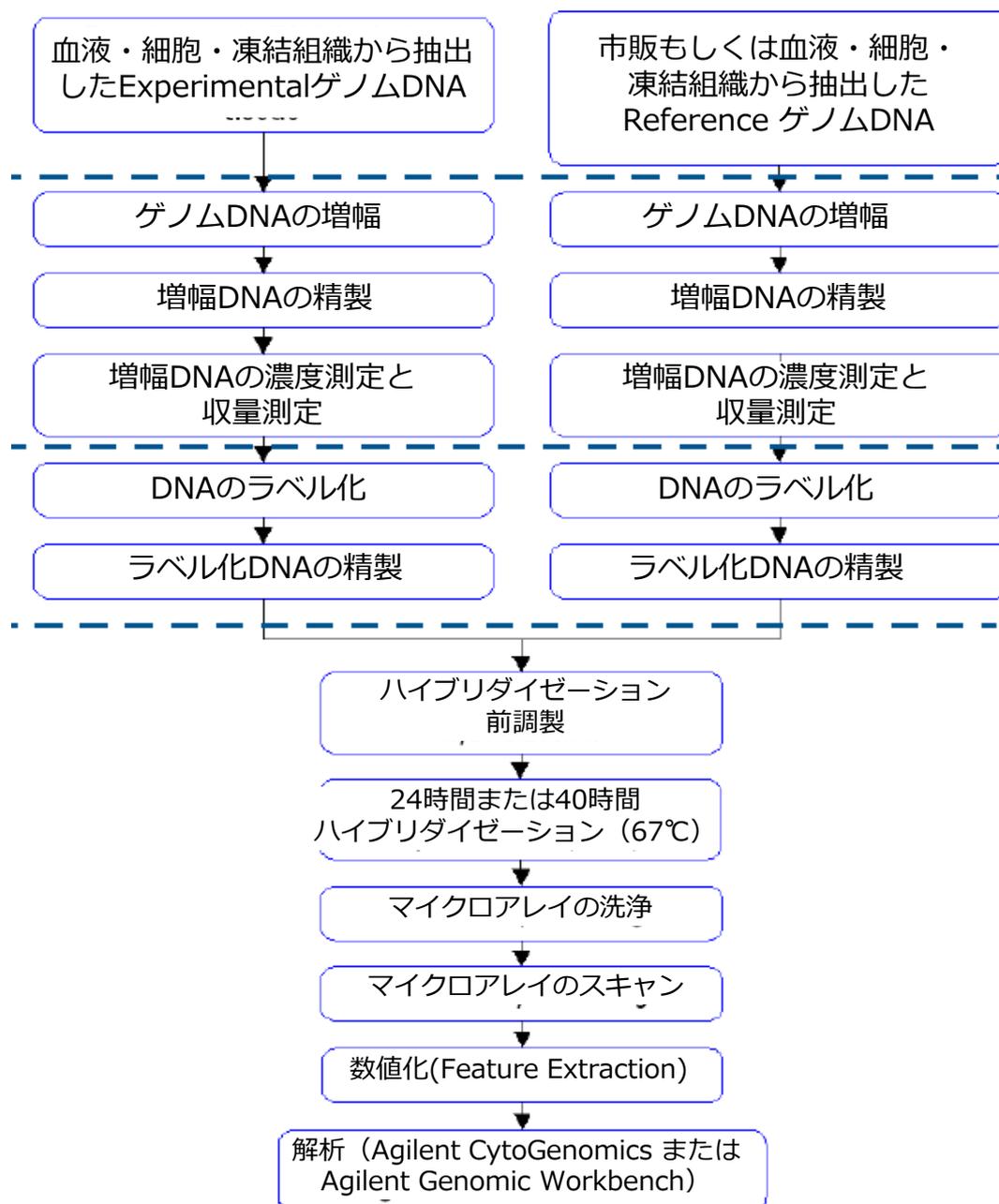
【参考資料】

GenomePlex Whole Genome Amplification (WGA) Kit. Technical Bulletin. Sigma-Aldrich. 2006.

TR/PHC 06/05-1

増幅法 (p.27~) のサンプル調製とマイクロアレイ操作

調製にはゲノム DNA 50 ng が必要です。



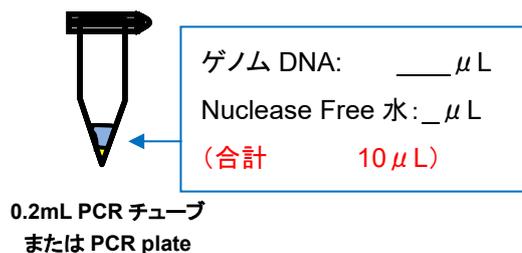
8-1-1. 断片化

- ① 50ng のゲノム DNA を、200 μ L Thin-Wall Tube または 96-well PCR plate に入れ、最終容量 10 μ L になるように DNase/RNase-free distilled water を加えます。

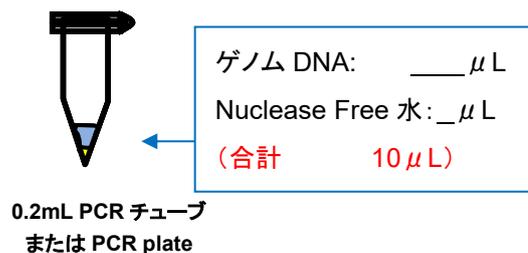
(Reference と Experimental ゲノム DNA、それぞれ準備してください。)

※断片化されたゲノム DNA の場合ゲノム DNA 量を増やすことをお勧めします。(上限 100 ng)

Reference ゲノム DNA (50~100ng)



Experimental ゲノム DNA (50~100ng)



- ② 10X Fragmentation Buffer Control Human Genomic DNA 1 μ L を加えます。ピペッティングでよく混合します。

- ③ 95 $^{\circ}$ C、4 分加熱します。(サーマルサイクラーを用品。ふたの加熱 ON) **4 分間は厳守してください。**

注意 この加熱操作は時間に強く影響します。加熱時間が変わると結果に影響することがあります。

- ④ すぐに氷上に移します。遠心により壁面の水滴を底に集めます。**速やかに次のステップに進んでください。**

注意 速やかに【ライブラリ調製】に進む必要があります。ライブラリ DNA の末端が分解することがあります。

8-1-2. ライブラリ調製

- ① 1X Library Preparation Buffer 2uL を加えます。
- ② Library Stabilization Solution 1uL を加えます。
よく混合します。遠心により液を底に集めます。
- ③ 95°C、2 分間加熱します。(サーマルサイクラーを用います。ふたの加熱: ON)
- ④ 氷上で急冷。遠心により液を底に集めます。
- ⑤ Library Preparation Enzyme 1uL を加えます。
よく混合します。遠心により液を底に集めます。
- ⑥ 下記表のとおり加熱します。(サーマルサイクラーを用います。)

Step	温度	時間(分)
1	16°C	20
2	24°C	20
3	37°C	20
4	75°C	5
5	4°C	Hold

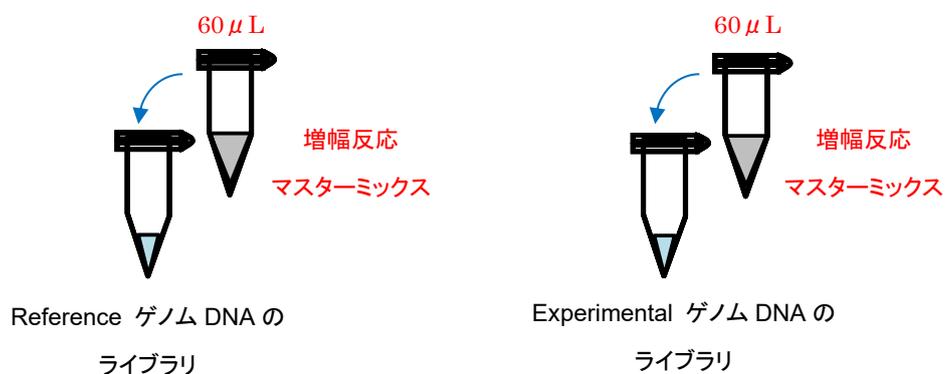
- ⑦ 反応終了後、チューブをサーマルサイクラーから出し、遠心により液を底に集めます。
(速やかに次のステップ「3. 増幅」に進むか、もしくは-20°Cで3日間まで保存可能。)

8-1-3. 増幅

- ① 下記のように増幅反応マスターミックスを調製します。

	Volume (uL)	X6 (+0.2反応)	x12 (+0.4反応)	x48 (+2反応)	x96 (+4反応)
10X Amplification Master Mix	7.5	46.5	93	375	750
Nuclease-Free water	47.5	294.5	589	2,375	4,750
WGA DNA Polymerase	5	31	62	250	500
total	60	372	744	3,000	6,000

- ② 各反応チューブに 60 uL の増幅反応マスターミックスを加えます(合计量が 75uL になります)。十分に混合し、遠心により液を底に集めます。



- ③ 下記のプログラムで加熱します。(サーマルサイクラーを使用します。ふたの加熱:ON)

Step		温度	時間
1	Initial Denaturation	95°C	3分
2-3 step を 14サイクル			
2	Denature	94°C	15秒
3	Anneal/Extend	65°C	5分
4	サイクル後	4°C	Hold

- ④ 反応終了後、チューブを4°Cに置きます。
(あるいは-20°Cで3日間まで保存可能です)

8-1-4. PCR反応物の精製

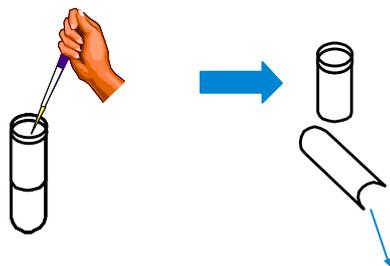
GenElute PCR Clean-Up Kit を使用します。

操作を始める前に

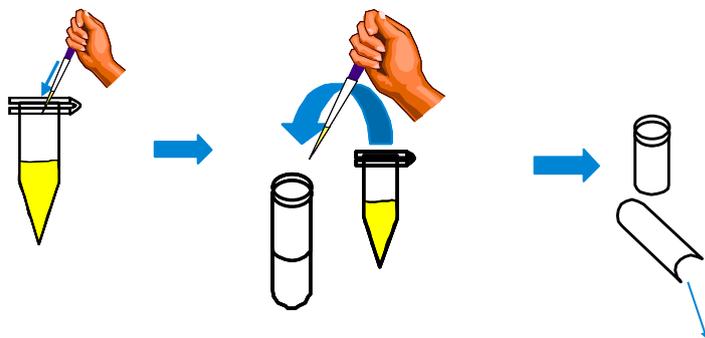
- ・ **Wash Solution Concentrate** のボトルに48mLのEthanol(96-100%)を加え、よく混合してください
- ・ 全ての遠心のステップは、室温で行ってください。

- ① GenElute MiniPrep Bindingカラムを Collection チューブにセットします。

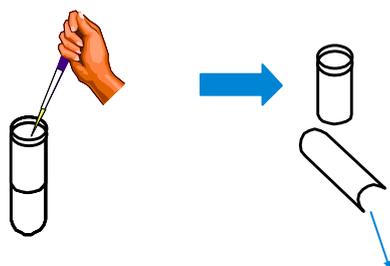
500 μ Lの**Column Preparation Solution**を加え、12,000xgで30秒～1分間遠心します。カラムを素通りした液は捨てます。Collectionチューブは引き続き使います。



- ② 375 μ Lの**Binding Solution**をPCR反応サンプル(75 μ L)に加えます。全量をカラムに移し、12,000～16,000xgで1分間遠心します。カラムを素通りした液は捨てます。Collectionチューブは引き続き使います。

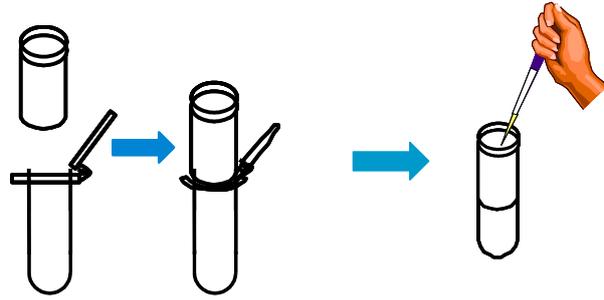


- ③ カラムをチューブに戻し、500 μ Lの調製済みの**Wash Solution** (Ethanol が加えられたもの)をカラムに加えます。カラムチューブを12,000～16,000xgで1分間遠心します。カラムを素通りした液は捨てます。Collectionチューブは引き続き使います。



- ④ カラムを2mLコレクションチューブに戻し、カラムから Ethanol を完全に除去するために、さらに12,000～16,000xg、2分間の遠心を行います。

- ⑤ 注意しながらカラムを新しい **Collectionチューブ**に移します。50 μ Lの**Elution Solution** (10mM Tris, pH8.0)をカラムの中央に加え、室温で1分間静置します。静置後、12,000~16,000xg、1分間の遠心を行います。PCR増幅物が溶出されます。



※精製した DNA は、NanoDrop ND-1000 などの UV-VIS Spectrophotometer を利用して、濃度定量を行います。精製した DNA はラベリング反応まで -20°C で保管することが可能です。

8-1-5. 増幅・精製ゲノムDNAの濃度測定

NanoDrop ND-1000(UV-VIS Spectrophotometer)を使って、精製した増幅 DNA の濃度測定を行います。

- ① Nucleic Acid Measurement を選択し、Sample Type を DNA-50 に設定します。
- ② 1.5 uL の **Elution Solution** を使って、Blank の測定を実行します。
- ③ 精製した DNA を 1.5 uL を使って、DNA 濃度を測定します。各サンプルの DNA 濃度(ng/ul)を記録します。
- ④ 増幅収量(ug)を計算します。
増幅収量(ug) = DNA 濃度(ng/uL) × 50(uL) / 1000(ng/μL)

8-1-6. ラベル化前の増幅DNA調製

2ug をラベル化に用います。

- ① 増幅 DNA 2μg を新しい 200 μL Thin-Wall Tube(96-well PCR plate)に移します。
それぞれ Nuclease-free 水で 26uL (1-, 2-, 4-pack)もしくは 13uL (8-pack)に調製します*。
ラベル化には Test サンプルと Reference サンプルは同じ量が必要です。
- ② ゲノム DNA が上記容量を超える場合、真空濃縮装置(例 Speed Vac)でサンプルを濃縮します。
※再溶解しにくくなるため、乾燥させすぎないように注意してください。
- ③ゲノム DNA のラベル化ステップ(p.36)へ進んでください。(制限酵素反応(p.34)は不要です)
DNA は-20°Cで保管する事ができます。

8-2 ダイレクト法

注意 最適なパフォーマンスのために、高品質の、分解の進んでいないゲノムを使用します。もし本プロトコルに記載されているゲノム抽出方法以外の方法にてゲノム DNA を調製する場合は、ゲノム DNA に RNA やタンパク質が混入しないように注意します。必要に応じて、前の項目に記載されている方法にて抽出済みの DNA を再精製してください。

ゲノム DNA はピペッティングにより完全に溶解されていることを確認してください。必要に応じて、37°C で 30 分インキュベーションしてください。濃度が >350 ng/μL のときは Buffer AE や 1×TE (pH 8.0) で 2 倍に希釈したあと、再度測定し濃度が正確かどうか確認します。

スタートゲノム DNA を少なくとも 0.5 μg (1-, 2-, 4-pack マイクロアレイ) もしくは 0.2 μg (8-pack マイクロアレイ) お持ちの場合はダイレクト法をお使いください。Experimenta と reference の両方で同じ量のゲノム DNA をお使いください。必要なゲノム DNA の量と容量は、使用するマイクロアレイのフォーマットと、制限酵素反応をラベル化反応の前に実施するかどうかによって依存します。下表をご参照ください。

Note ラベル化反応の前に制限酵素反応を行う方法により、多様なサンプルにおいてクオリティのいい CGH データが得られます。しかし制限酵素反応の代わりに random primer を加えた後の 98°C の加熱時間を長くする方法でも高質のデータが得られます。(制限酵素反応を省略する場合は p.36 から開始してください)

注意: SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイをお使いの場合は制限酵素反応を省くことはできません。

お手持ちのゲノム DNA の量が 50 ng ~ <0.5 μg (1-, 2-, 4-pack マイクロアレイ) もしくは <0.2 μg (8-pack マイクロアレイ) の場合は、増幅法 (p.24) をご覧ください。

サンプル必要量および上限容量 (HD と G3 マイクロアレイで共通です。)

アレイフォーマット	1-pack	2-pack	4-pack	8-pack
start ゲノム容量	0.5~1.0 μg	0.5~1.0 μg	0.5~1.0 μg	0.2~0.5 μg
Start 容量上限 制限酵素反応を行う場合	20.2 μL			10.1 μL
Start 容量上限 制限酵素反応を省略する場合	26 μL			13 μL

【必要な機器・消耗品】

機器 □サーマルサイクラー(ふたを加熱できるもの)

消耗品 □1.5mL RNase-free Microfuge Tube (98°Cに耐性のあるもの)

200 μL Thin-Wall Tube もしくは 96-well PCR plate

□SureTag Complete DNA Labeling Kit もしくは SureTag DNA Labeling Kit

Rsa I, Alu I, 10X Restriction Enzyme Buffer, BSA

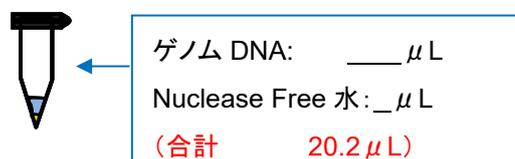
□DNase/RNase-free distilled water

8-2-1. ゲノムDNAの制限酵素反応

注意 制限酵素反応の前に DNA の濃縮が必要な場合、高濃度の塩・EDTA・混入物を制限酵素反応に持ち込まないでください。

- ① SureTag Complete DNA Labeling Kit または SureTag DNA Labeling Kit に含まれる 10X Restriction Enzyme Buffer および BSA を溶かし、それぞれチューブを指ではじき攪拌し、遠心機で液をチューブの底に集めておきます。各試薬は使用時すべて氷上に置きます。使用が終わったら速やかに-20℃にもどします。
- ② 各反応の reference および Experimental ゲノム DNA を必要量(p.33 の表参照)200 μL Thin-Wall Tube もしくは 96 well PCR plate にいれ、DNase/RNase-free distilled water で 20.2 μL(1-, 2-, 4-pack マイクロアレイ)もしくは 10.1 μL(8-pack マイクロアレイ)になるように調製します。

Reference ゲノム DNA



0.2mL PCR チューブ
または PCR plate

Experimental ゲノム DNA



0.2mL PCR チューブ
または PCR plate

- ③ 使用するマイクロアレイフォーマットに応じて、表に記載されている内容と順番で、制限酵素反応マスターミックスの調製を行います。マスターミックスを氷上に置き、氷上で下記の順に試薬を加え、ピペッティングでよく混合します。 **※注意:フォーマットにより容量が異なります。**

1-pack・2-pack・4-pack マイクロアレイの場合

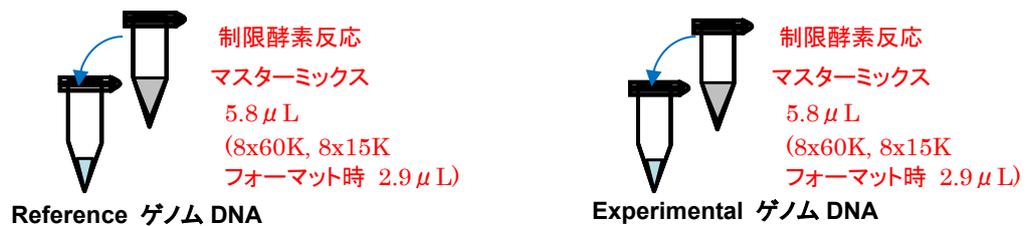
Component	1 反応	x4 反応 (+0.25 反応)	x8 反応 (+0.5 反応)	x48 反応 (+2 反応)	X96 反応 (+4 反応)
Nuclease-free water	2.0	8.5	17	100	200
10X Restriction Enzyme Buffer†	2.6	11.05	22.1	130	260
BSA†	0.2	0.85	1.70	10	20
Alu I†	0.5	2.125	4.25	25	50
Rsa I†	0.5	2.125	4.25	25	50
最終量	5.8	24.65	49.3	290	580

8-pack マイクロアレイの場合

Component	1 反応	x8 反応 (+0.5 反応)	x16 反応 (+1 反応)	x48 反応 (+2 反応)	x96 反応 (+4 反応)
Nuclease-free water†	1.0	8.5	17	50	100
10X Restriction Enzyme Buffer†	1.3	11.05	22.1	65	130
BSA†	0.1	0.85	1.70	5	10
Alu I†	0.25	2.125	4.25	12.5	25
Rsa I†	0.25	2.125	4.25	12.5	25
最終量	2.9	24.65	49.3	145	290

† SureTag Complete DNA Labeling Kit および SureTag DNA Labeling Kit に含まれます。

- ④ ゲノム DNA サンプルが入った各反応チューブに 5.8 μL(1-, 2-, 4-pack マイクロアレイ)もしくは 2.9 μL(8-pack マイクロアレイ)の制限酵素反応マスターミックスを加えます。ピペッティングでよく混合します。



- ⑤ サンプルをインキュベーションします。

サンプルチューブまたは plate をサーマルサイクラーに移します。サーマルサイクラーのプログラムを下記のように設定し、反応を行います。反応終了後、チューブを氷上に移します。

Step I	Step II	Step III
37°C	65°C	4°C
2時間	20分	forever

- ⑥ オプション:制限酵素消化物 2 uL を使って 0.8% agarose 電気泳動を行い、SYBR Gold (Invitrogen p/n S-11494)にて染色します。断片化されたゲノム DNA の大部分が 200~500bp であることを確認します。
- ⑦ p.36 の「ゲノム DNA のラベル化」にすむか、サンプルを-20°Cで保存します。

制限酵素処理 DNA は-20°Cで1ヶ月まで保管する事ができます。

9. ゲノム DNA のラベル化

アジレント SureTag DNA Labeling Kit または SureTag Complete DNA Labeling Kit には

- ・ 25 スライド 1-pack, 2-pack, 4-pack マイクロアレイ
- ・ 50 スライド 8-pack マイクロアレイ

の2色法のラベル化反応に相当する試薬が含まれます。

アジレント SureTag DNA Labeling Kit と SureTag Complete DNA Labeling Kit には、Cy3・Cy5 各蛍光25反応(合計50反応分)に相当するclean-up columnが含まれます。8-pack マイクロアレイ使用时、追加でcolumnをご発注ください。

本キットでは、ランダムプライマーとExo-Klenow fragment を用いた反応で、ゲノムDNAを蛍光ラベル化Nucleotide (Cyanine 3-dUTP、Cyanine 5-dUTP)により標識します。アジレント オリゴaCGHアプリケーションでは、Experimentalを片方の蛍光で、Referenceサンプルをもう片方の蛍光で標識します。基本的にExperimentサンプルをCyanine 5で、ReferenceサンプルをCyanine 3でラベル化します。

9-1 ゲノム DNA のラベル化反応

【前準備および注意】

- ・ 5x Reaction Buffer をなるべく光にさらさないようにしてください。5x Reaction Buffer の性能には影響しませんが、buffer の色が黄色くなります。
- ・ 使用前にキットに含まれる各試薬を溶かし、それぞれよく攪拌して均質に氷上に置きます。Exo-Klenow fragment 酵素は使用时以外冷凍庫に保存してください。

【使用機器および消耗品】

機器 サーマルサイクラー(ふたを加熱できるもの)

消耗品 SureTag DNA Labeling Kit または SureTag Complete DNA Labeling Kit
Random Primer、5X Reaction Buffer、10X dNTPs、
Cyanine 3-dUTP、Cyanine 5-dUTP、Exo (-) Klenow

Note Cyanine3-dUTP および Cyanine5-dUTP は露光による影響があり、繰り返し凍結融解で分解します。ラベル化反応の工程では、光にあてる時間を最小にとどめてください。

注意 Experiment / Reference サンプルペアは反応時同様に処理される必要があり、そうでないとデータの質に悪影響を及ぼすことがあります。熱変性の際、確実にサンプルペアを同じ温度で処理する最良の方法はサーマルサイクラーを使うことです。

- ① 反応サンプル溶液を 6,000 xg、1分間遠心し、チューブ内のふたや側面に付着したサンプルをすべて底に集めます。
- ② Random Primer を下記の量加え、静かにピペッティングを行いよく混合します。

アレイフォーマット	1-pack	2-pack	4-pack	8-pack
増幅法・ダイレクト法: 加える Random Primer 量	5 μ L			2.5 μ L

合計のサンプル容量は 31 μ L(1-pack, 2-pack, 4-pack の場合。35 ページのアガロースゲル電気泳動を行った場合は 29 μ L)または 15.5 μ L(8-pack の場合。35 ページのアガロースゲル電気泳動を行った場合は 13.5 μ L)になります。

- ③ サーマルサイクラーのプログラムを下記のように設定しスタートボタンを押し 98°Cになったら Pause ボタンを押します。

	温度	時間(ダイレクト法で制限酵素反応を行った場合 および増幅法の場合)	時間(ダイレクト法で制限酵素反応を省略した場合)
Step 1	98°C	3 分	10 分
Step 2	4°C	hold	hold

- ④ サンプルチューブまたはプレートをサーマルサイクラーに移し反応を開始します。
- ⑤ 反応が終了したらサンプルを 6,000xg、1 分間遠心を行い、チューブ内のふたや側面に付着したサンプルをすべて底に集め、氷上におきます。
- ⑥ 使用するマイクロアレイフォーマットに応じて、氷上で表に記載されている内容と順番で試薬を混合し、Cy3 用と Cy5 用のラベル化マスターミックスをそれぞれ調製します。

※ダイレクト法で制限酵素消化後に電気泳動(p.35)を行わなかった場合、2uL の Nuclease-free water は加えないでください。(その場合、反応最終量は 19 uL もしくは 9.5 uL となります)。

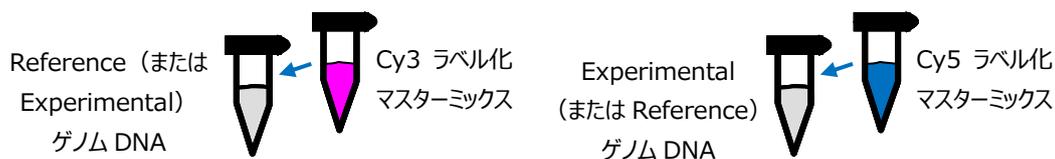
1-pack・2-pack・4-pack マイクロアレイの場合

Component	1 反応	x4 反応 (+0.25 反応)	x8 反応 (+0.5 反応)	X24 反応 (+1 反応)	X48 反応 (+2 反応)
Nuclease-free water 注意※	2.0	8.5	17	50	100
5x Reaction Buffer	10.0	42.5	85	250	500
10x dNTPs	5.0	21.25	42.5	125	250
Cyanine 3-dUTP or Cyanine 5-dUTP	3.0	12.75	25.5	75	150
Exo (-) Klenow	1.0	4.25	8.5	25	50
最終量 (*水を加えたとき)	19.0 (*21.0)	80.75 (*89.25)	161.5 (*178.5)	475 (*525)	950 (*1050)

8-pack マイクロアレイの場合

Component	1 反応	x8 反応 (+0.5 反応)	X24 反応 (+1 反応)	x48 反応 (+2 反応)
Nuclease-free water 注意※	2.0	17	50	100
5x Reaction Buffer	5.0	42.5	125	250
10x dNTPs	2.5	21.25	62.5	125
Cyanine 3-dUTP or Cyanine 5-dUTP	1.5	12.75	37.5	75
Exo (-) Klenow	0.5	4.25	12.5	25
最終量 (*水を加えたとき)	9.5 (*11.5)	80.75 (*97.75)	237.5 (*287.5)	475 (*575)

- ⑦ 各反応チューブ(ゲノム DNA サンプルが入ったチューブ)にラベル化マスターミックスを加え、静かにピペッティングを行いよく混合します。



合計のサンプル容量は 50 uL(1-pack, 2-pack, 4-pack の場合)または 25 uL(8-pack の場合)になります。

- ⑧ サーマルサイクラーのプログラムを下記のように設定し、スタートボタンを押し 37°Cになったら Pause ボタンを押します。

Step I	Step II	Step III
37°C	65°C	4°C
2時間	10分	forever

- ⑨ サンプルチューブまたは plate をサーマルサイクラーに移し、反応を開始します。
- ⑩ 反応が終了したらサンプルを 6,000xg、1 分間遠心を行い、チューブ内のふたや側面に付着したサンプルをすべて底に集めます。チューブを氷上に移します。

※反応液は、暗所、-20°Cにて、1ヶ月まで保管することが可能です。

9-2 ラベル化 DNA の精製

SureTag Complete DNA Labeling Kit または SureTag DNA Labeling Kit に含まれている Purification Column を用いて、ラベル化 DNA を精製します。

Purification Column には以下のものが含まれています。

- ・ Column
- ・ 2-mL collection tube

High-throughput の際の、AutoScreen A, 96-well plate [GE Healthcare 社製] を用いてラベル化 DNA を精製する方法(オプション)につきましては英語版 Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis Protocol [G4410-90010] をご参照ください。

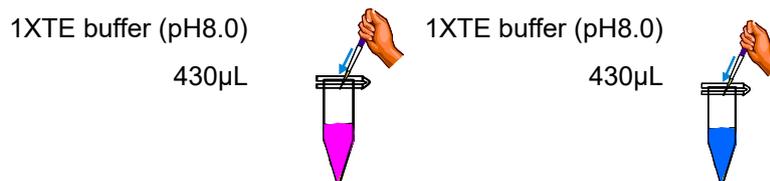
Note Cyanine3、Cyanine5 でラベル化された DNA は(混合せずに)それぞれ別に精製を行います。

【必要な機器・消耗品】

- 機器 1.5mL チューブ対応の遠心機 (14,000 xg で遠心可能なもの)
 真空濃縮装置 (例 Speed Vac) (4x および 8x フォーマット使用時に必要)
- 消耗品 Agilent Purification Column
 1xTE (pH8.0)
 1.5mL RNase-free Microfuge Tube (98°Cに耐性のあるもの)、200 μ L Thin-Wall Tube*、Tall Chimney PCR plate、96-well PCR plate* (*4x, 8x フォーマットのみ) のいずれか

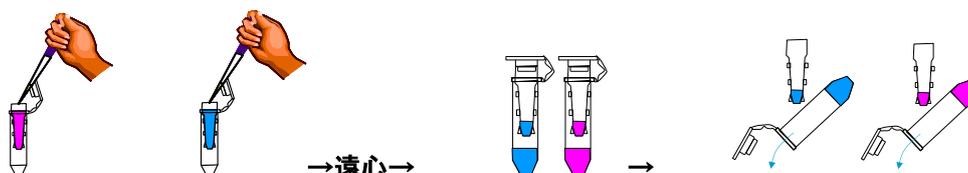
① 各反応チューブを 6,000 xg、1 分間遠心を行い、チューブ内ふたや側面のサンプルを底に集めます。

② 各反応チューブに 430 μ L の 1 x TE (pH 8.0) を加えます。



③ Column を 2-mL collection tube に入れ、サンプル名を記入します。各ラベル化 DNA 全量を column に移します。

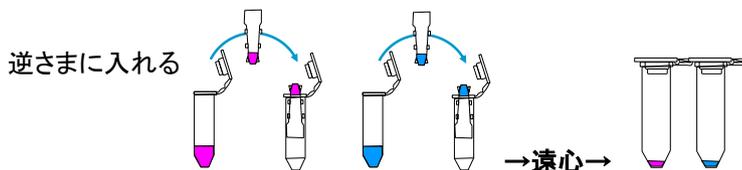
④ Column に蓋をし、チューブを室温 14,000 xg で 10 分間遠心します。カラムを素通りした液を捨て、column を今使用した 2-mL collection tube に戻します。



- ⑤ 480 μL の1 x TE (pH 8.0) をcolumnに加えます。チューブを室温14,000 xgで10分間遠心します。



- ⑥ 新しい2-mL collection tube にcolumnを逆さまにセットします。室温1,000 xgで1分間遠心し、精製サンプルを回収します。(サンプル容量: 約20~32 μL)



- ⑦ 回収したサンプルに1 x TE (pH8.0)を加える、もしくは真空遠心濃縮装置で濃縮することで、下表に記載されている容量に調製します。(過剰な乾燥は溶解困難になるためご注意ください。)

※マイクロアレイのフォーマットごとに最終液量が異なります。

アレイフォーマット	精製後のラベル化 DNA 容量	NanoDrop 測定後に混合した(Cy3+Cy5)ラベル化 DNA 容量	推奨調製容器
1-pack	80.5 μL	158 μL	1.5mL RNase-free Microfuge Tube
2-pack	41 μL	79 μL	1.5mL RNase-free Microfuge Tube または Tall chimney PCR plate
4-pack	21 μL	39 μL	1.5mL RNase-free Microfuge Tube, 200 μL Thin-Wall Tube, Tall chimney PCR plate または 96-well PCR plate
8-pack	9.5 μL	16 μL	1.5mL RNase-free Microfuge Tube, 200 μL Thin-Wall Tube, Tall chimney PCR plate または 96-well PCR plate

- ⑧ よく混合します。⑦で完全に乾燥させた場合もしくは沈殿が生じた場合は、ゲノム DNA サンプルを氷上に5分間置いた後、10回ピペティングします。
- ⑨ 収量と色素取り込み率を確認するため、精製したラベル化 DNA 1.5 μL を使用します。p.41の「UVによるラベル化DNAの収量・蛍光取り込み率の確認」をご参照ください。高品質のゲノム DNA を用いた場合の期待されるラベル化 DNA の収量および Specific Activity (色素取り込み率)は p.41の表をご覧ください。
- ⑩ 新しい1.5mL RNase-free Microfuge Tube (98°Cに耐性のあるもの)もしくは200 μL Thin-Wall Tubeなどに、正しい組み合わせのCyanine-3 標識サンプルとCyanine-5 標識サンプルにより、Experiment と Reference サンプルの混合を行います。混合後の容量および推奨する調製容器につきましては上の表をご参照下さい。

※精製、濃縮したラベル化 DNA サンプルは、暗所、-20°Cにて、1ヶ月保管することが可能です。

9-3. UV によるラベル化DNAの収量・蛍光取り込み率の確認

UV-VIS Spectrophotometer (NanoDrop 8000 または 2000、もしくはその相当品)を用いて、ラベル化 DNA の収量・蛍光取り込み率の確認を行います。

- ① NanoDrop使用時はNanoDropのソフトウェアを起動し、“Microarray Measurement”を選択します。
Sample Typeは**DNA-50**を選択します。
- ② 1 x TE (pH8.0)を使って、Blank の測定を実行します。(NanoDrop 使用時は 1.5 μL 使用)
- ③ それぞれのラベル化 DNA を 1.5 μL 使って、**A260nm (DNA 測定)**、**A550nm (Cyanine 3)**、**A650nm (Cyanine 5)**を測定します。
- ④ A260 値から以下の式を使って **DNA 濃度**を計算します (NanoDrop 使用時は計算不要)
ラベル化DNA 濃度 [ng/μL] = A260 × 50 [μg/mL] ÷ 光路長 [cm] * × 希釈率 …①
※NanoDrop の光路長は 1 mm
- ⑤ A550, A650 値から以下の式を使って **Dye 濃度**を計算します (NanoDrop 使用時は計算不要)
Cy3 濃度 [pmol/μL] = A550 ÷ (150 [mM⁻¹cm⁻¹] × 光路長 [cm]) × 1000 × 希釈率 …②
Cy5 濃度 [pmol/μL] = A650 ÷ (250 [mM⁻¹cm⁻¹] × 光路長 [cm]) × 1000 × 希釈率 …③
- ⑥ DNA 濃度(①)および Cy3 濃度(②)・Cy5 濃度(③)から、**Cy3-dUTP および Cy5-dUTP の取り込み率 (Specific Activity)**を計算します。
Specific Activity [pmol/μg] = Dye 濃度 [pmol/μL] / ラベル化 DNA 濃度 [ng/μL] × 1000
- ⑦ DNA 濃度から**収量**を計算します。
DNA収量 [μg] = DNA濃度 [ng/μL] × サンプル容量 [μL] ÷ 1000

高品質のゲノム DNA を用いた場合の期待されるラベル化 DNA の収量および Specific Activity (色素取り込み率)は、下の表をご参照ください。

制限酵素反応を「98°Cのインキュベーション時間を長くする方法」に変更した場合、cyanine 3 標識サンプルと cyanine 5 標識サンプルの Specific Activity は下の表の値から約 5 低くなります。収量やマイクロアレイのシグナルノイズ比は同じになります。

SureTag Complete DNA Labeling Kit または SureTag DNA Labeling Kit を使用した場合

Input gDNA (μg)	Yield (μg)	Specific Activity of Cyanine-3 and Cyanine-5 Labeled Sample (pmol/μg)
0.2*	3 to 6	15 to 50
0.5	8 to 13	20 to 60
1	9 to 14	20 to 60

* 8x フォーマットマイクロアレイのラベル化反応時。8x フォーマットにて 500ng でラベル化した場合も含む。

Cyanine-3 標識サンプルと Cyanine-5 標識サンプルの収量はほぼ同じになることが予想されます。もし大きく異なる場合は [p.89](#) トラブルシューティングをご覧ください。

10. マイクロアレイ操作

マイクロアレイ操作には、ハイブリダイゼーション、洗浄、スキャンが含まれます。

ハイブリダイゼーションの練習をする際は、2x HI-RPM Hybridization Buffer と水を 1 : 1 で混合した溶液を準備し、使用済みのマイクロアレイスライドとガスケットスライドを使用して下さい。同じスライドを洗浄操作やスライドホルダへの挿入の練習に使用することができます。

操作を始める前に、p88 Secure Fit スライドボックスの開け方を参照してください。

10-1. ハイブリダイゼーション

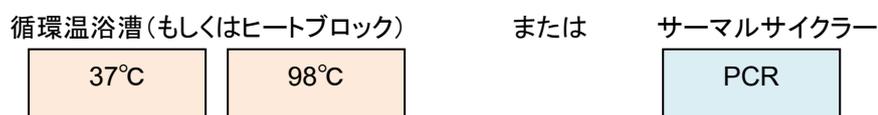
【必要な機器・消耗品】

- 機器
- ヒートブロック(98°C、37°C)もしくはサーマルサイクラー(ふたを加熱できるもの)
(サーマルサイクラーは x4, x8 フォーマットのみ使用可能)
 - ハイブリダイゼーションオープン(67°C)20rpm で使用します
 - ハイブリダイゼーションチャンバ
 - アジレントハイブリダイゼーションチャンバ用ハイブリダーゼーションロータ
 - 遠心機(使用プレートもしくはチューブの 6000 xg 回転が可能なもの)
- 消耗品
- ガスケットスライド
1x1M, 1x244K 用 [G2534-60003], 2x400K, 2x105K 用 [G2534-60002],
4x180K, 4x44K 用 [G2534-60011], 8x60K, 8x15K 用 [G2534-60014]
 - アジレント マイクロアレイ
 - Cot-1 (生物種に対応したものを使用)
 - Agilent aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit [5188-5220]
 - DNase/RNase-free distilled water



【前準備】

- 循環温浴槽(ヒートブロック)を 37°Cに、ヒートブロックを 98°Cに設定しておきます。もしくはサーマルサイクラーのプログラムを設定しておきます。



- ハイブリダーゼーションオープンを 67°Cに設定(ロータを取り付けておきます)

10-1-1. 10x aCGH Blocking Agent の準備

- ① 軽くスピンドウンしてペレットをチューブの底に集めた後、DNase/RNase-free distilled water を 1,350 μL、10x aCGH Blocking Agent に加えます。(Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Hybridization Kit に含まれ

ます。)

- ② 60 分間、室温において、そのあとボルテックスで混合し、溶解させます。

Note 調製後の 10 x aCGH Blocking Agent は、-20°Cで 120 日安定です。凍結融解は 3 回以内にしてください。

10-1-2. ハイブリダイゼーション溶液の調製

- ① ヒートブロックもしくは循環温浴槽の温度を 98°Cと 37°Cにします。もしくはサーマルサイクラーを使用します。
- ② 使用するマイクロアレイのフォーマットに応じて、Hybridization Master Mix を調製します。2x Hi-RPM Hybridization Buffer は粘性が高く泡立ちやすいので、吸うときや混ぜるときはゆっくり実施してください。
サンプルの生物種に合った Cot-1 をご使用ください。(推奨 Cot-1 については p.7~参照)

注意 2x Hi-RPM Hybridization Buffer を冷蔵・冷凍保存しないでください

1-pack マイクロアレイ

Component	1 反応 (μ L)	X8 反応 (+0.5 反応) (μ L)	X24 反応 (+1 反応) (μ L)	X48 反応 (+2 反応) (μ L)
Cot-1 DNA (1.0 mg/mL) (Human, Mouse, Rat)	50	425	1,250	2,500
10X aCGH Blocking Agent	52	442	1,300	2,600
2X Hi-RPM Hybridization Buffer	260	2,210	6,500	13,000
Master Mix 量	362	3,077	9,050	18,100

2-pack マイクロアレイ

Component	1 反応 (μ L)	X8 反応 (+0.5 反応) (μ L)	X24 反応 (+1 反応) (μ L)	X48 反応 (+2 反応) (μ L)
Cot-1 DNA (1.0 mg/mL) (Human, Mouse, Rat)	25	212.5	625	1,250
10X aCGH Blocking Agent	26	221	650	1,300
2X Hi-RPM Hybridization Buffer	130	1,105	3,250	6,500
Master Mix 量	181	1,538.5	4,525	9,050

4-pack マイクロアレイ

Component	1 反応 (μ L)	X8 反応 (+0.5 反応) (μ L)	X24 反応 (+1 反応) (μ L)	X48 反応 (+2 反応) (μ L)
Cot-1 DNA (1.0 mg/mL) (Human, Mouse, Rat)	5	42.5	125	250
10X aCGH Blocking Agent	11	93.5	275	550
2X Hi-RPM Hybridization Buffer	55	467.5	1,375	2,750
Master Mix 量	71	603.5	1,775	3,550

8-pack マイクロアレイ

Component	1 反応 (μL)	X8 反応 (+0.5 反応) (μL)	X24 反応 (+1 反応) (μL)	X48 反応 (+2 反応) (μL)
Cot-1 DNA (1.0 mg/mL) (Human, Mouse, Rat)	2	17	50	100
10X aCGH Blocking Agent	4.5	38.25	112.5	225
2X Hi-RPM Hybridization Buffer	22.5	191.25	562.5	1,125
Master Mix 量	29	246.5	725	1,450

- ③ 正しい量の Hybridization Master Mix をラベル化 DNA の入った容器 (1.5 mL RNase-free Microfuge Tube, 200 μL Thin-Wall Tube, Tall Chimner PCR plate, 96-well PCR plate) に加えます。
加えた後の容量は下の表をご参照ください。

アレイ フォーマット	Hybridization Master Mix の容量	NanoDrop 測定後に 混合した (Cy3+Cy5) ラベル化 DNA の溶液量	混合後の前容量
1-pack	362 μL	158 μL	520 μL
2-pack	181 μL	79 μL	260 μL
4-pack	71 μL	39 μL	110 μL
8-pack	29 μL	16 μL	45 μL

- ④ ピペッティングでゆっくりとサンプルを混合した後、遠心器でスピンドウンを行い、液を反応容器の底に集めます。

サンプルチューブを98°Cの循環温浴槽またはヒートブロックに移し、98°Cで3分間インキュベーションします。その後**速やかに**サンプルのチューブを37°Cの循環温浴槽またはヒートブロックに移します。37°Cで30分間インキュベーションします。**※インキュベーション中は必ず遮光をして下さい。**

もしくは

サンプルチューブまたはplateをサーマルサイクラーに移します。サーマルサイクラーのプログラムを下記のように設定し、反応を行います。

Step	温度	時間(分)
1	98°C	3
2	37°C	30

- ⑤ 反応終了後、サンプルチューブを循環温浴槽・ヒートブロック・サーマルサイクラーからとりだします。遠心機で6,000 g、1分間スピンドウンして、蓋や壁についた液を底に集めます。

直ちにハイブリダイゼーションのステップに進んでください。**保存はできません。**

注意 サンプルはすぐにハイブリダイゼーションする必要があります。直後にハイブリダイゼーションできない場合は、ヒートブロックやサーマルサイクラー、オープンなどでハイブリダイゼーションサンプルミックスを極力37°Cに近い温度で保ってください。(15分以内にハイブリダイゼーションを完了してください。一度に操作するサンプル数を増やしすぎないようにします。)

10-1-3. ハイブリダイゼーションチャンパの組み立て

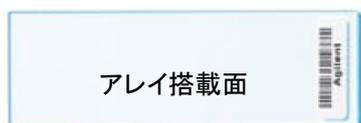
注意 ハイブリダイゼーションの温度はマイクロアレイのシグナル強度やノイズレベルに大きな影響を及ぼします。表示温度と実測値が一致するかどうか 3 ヶ月に 1 度は確認し、0.2 °C 以上異なる場合は下記手順で校正してください。

《ハイブリダイゼーションオープン温度の校正法》

1. オープンのロータと、使用するスライド数とバランスをあわせてチャンパをセットします。
2. 温度を 67°C、回転数を 20 にセットし、温度が安定するまで 3 時間ほど待ちます。
3. 校正済みの温度計をセットします。温度センサー部位をとりつけます。この時センサー部位がオープンの壁につかないように、空間の温度をはかるようにして下さい。
4. 3 時間程度、温度計の温度が安定するまで待ちます。
5. 実測温度と設定温度を比較し、0.2 °C 以上異なるようであれば、次の手順で合わせます。
6. オープンの ▲ ボタンと ▼ ボタンを同時に押し、温度表示が点滅するまで待ちます。あるいは ▲ ボタンと ▼ ボタンを同時に長押し、温度両側の「.」が点滅するまで待ちます。
7. 点滅しているうちに、▲ ボタンと ▼ ボタンで、表示温度を温度計が示す温度にあわせます。
8. その後再度表示を 67°C にあわせ 3 時間ほど待ち、表示温度が実測値と合うか確認します。
詳細は弊社サポートサイトの「Agilent G2545A ハイブリダイゼーションオープン校正方法」をご覧ください。

【ハイブリダイゼーション前の注意】

- マイクロアレイはバーコードラベルに“Agilent”の文字が入っている面に載っています。 Agilent の文字が入っているほうが Active サイド、数字だけのバーコードラベルが付いている面は Inactive サイドになります。



- スライドグラスを取り扱う際は手袋をはめ、スライドグラスの縁を注意深く持って取り扱って下さい。スライド表面には両側とも決して触らないで下さい。
- スライドグラスを取り扱う際は、必ずパウダーフリーの手袋を着用してください。
- 水平な机の上で操作してください。下記ハイブリエイドをお持ちの場合は、内蔵の水準器で水平が確認できます。ハイブリダイゼーション作業を始める前に、予めご確認ください。
- ハイブリダイゼーション、洗浄のステップでアレイを乾燥させないように注意して下さい。
- 手でアレイスライドをガスケツトスライドに乗せるのが難しい場合、オプションとして、ハイブリエイドを用いてアレイスライドに乗せることができます。(p.49 をご参照ください。)

※ハイブリエイドはハイブリダイゼーション作業を補助するオプションの器具です。

操作を始める前に、p88 Secure Fit スライドボックスの開け方を参照してください。

①ハイブリダイゼーションチャンバを解体します

クランプアセンブリのスクリューを緩め、横にスライドさせチャンバベースからはずしたあと、チャンバカバーをはずします。



②ピンセットを使ってガスケットスライドのプラスチックカバーの端をつまみ、ゆっくりとはがします。ガスケットスライドをパッケージから取り出します。この時、スライドの縁以外には触れないようにしてください。必ずパウダーフリーの手袋を着用してください。



③ ガスケットスライドを、ガスケットのラベルシールが貼られている面(ガスケットが搭載されている面)を上にして、チャンバベースの上に載せます。ガスケットスライドは、ハイブリダイゼーション溶液を介して直接アレイに触れますので、ほこり等がつかないようにすばやくセットしてください。



ガスケットスライドがしっかりとチャンバベースにセットされているか確認し、正しくされていない場合は、再度セットし直してください。

(オプションのハイブリエイドを用いる場合、ここで次々ページの p.49 【参考手法】を参照下さい)



④ ハイブリダイゼーション溶液をガスケットスライド上にアプライします。

※マイクロアレイのフォーマットごとにハイブリダイゼーション量が異なります。

アレイフォーマット	1-pack	2-pack	4-pack	8-pack
ハイブリダイゼーション量	490 μ L	245 μ L	100 μ L	40 μ L

ハイブリダイゼーション溶液が均一に広がるように、以下の方法でアプライしてください。チップの先をガスケットスライドから少し離し、一方のガスケットの端から逆の端に向かって移動しながらアプライします。この時、チップの先がスライドの表面になるべく触れないように注意してください。



注意 サンプルはすぐにハイブリダイゼーションする必要があります。直後にハイブリダイゼーションできない場合は、ヒートブロックやサーマルサイクラー、オープンなどでハイブリダイゼーションサンプルミックスを極力 37°C に近い温度で保ってください。(15 分以内にハイブリダイゼーションを完了してください)

- ⑤ アレイ面(Agilent と書かれているバーコード面) を下にして、アレイスライドのラベルシールとガスケットスライドのラベルシールが向かい合うようにし、アレイスライドをチャンバベースにセットされているガスケットスライド上に載せます。このとき、アレイスライドのふちまたはバーコードシール部分を持つようにしてください。アレイスライドを**水平**に保ったままガスケットスライドにのせます。



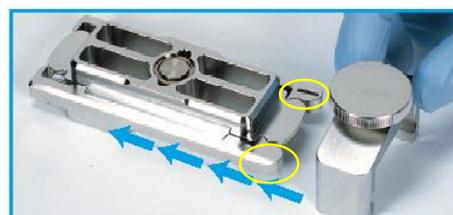
アレイを正しくセットした後、チャンバや重なっているスライドガラスを動かさないようにしてください。ハイブリダイゼーション溶液が漏れる原因になります。(オプションのハイブリエイド用いる場合、ここで p.49【参考手法】を参照下さい)

注意 ・2枚のスライドのラベルシールが、正しい位置で重なり合うようにセットしてください。
・1スライドに複数のアレイが搭載されているタイプで、チャンバカバーをセットする前、“サンプル溶液が接しているアレイ”と“接していないアレイ”があるように見える場合がありますが、問題ありません。アレイスライドを乗せた後は、位置の微調整などは行わず、すぐチャンバカバーを乗せて下さい。

- ⑥ チャンバカバーを、チャンバベースの上にセットします。カバーの向きを間違えないように注意してください。



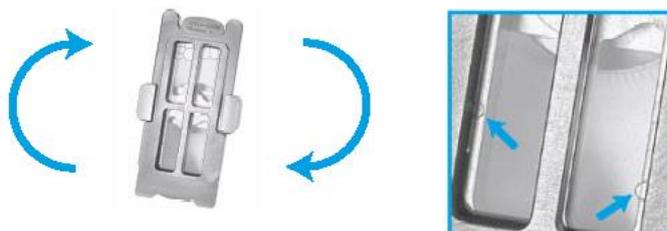
- ⑦ クランプアセンブリを、チャンバベースの丸くなっているコーナー側から差し込み、完全にストップする位置まで移動させます。ストップする位置は、ちょうどチャンバの中央部になります。



- ⑧ チャンバが水平に保たれていることをご確認した後、手でスクリューをしっかり締めます。チャンバにダメージを与える可能性があるため、ペンチなどの道具は決して使用しないでください。



- ⑨ 組み立て終了後、チャンバを垂直方向にして2,3回、回転させて、ハイブリ溶液がスライドガスケットの全面に行き渡るようにします。次に、チャンバ内の泡が自由に動くことができるか確認してください。泡が動かない場合には、チャンバを軽くタッピングして、泡を移動させます。ハイブリ溶液が行き渡っていない部分や、固定している泡により、ハイブリむらがる場合があります。

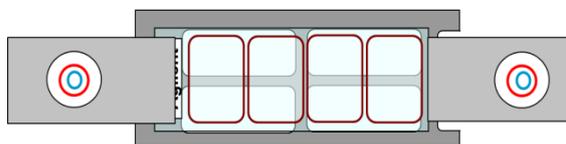


※参考手法

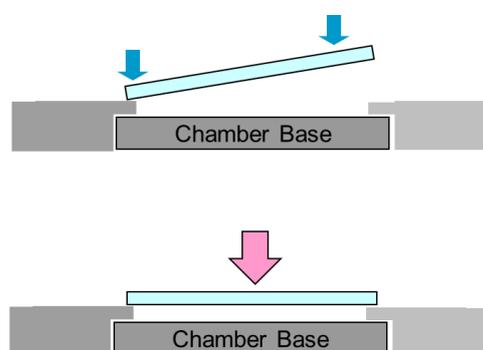
ハイブリエイドを用いることにより、手作業では水平に降ろしづらいマイクロアレイスライドを、サンプルをアプライしたガスケットスライド上に安定して乗せることができます。

使用器具： ハイブリエイド (HYB-100)

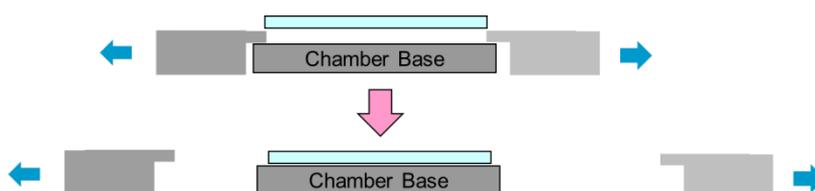
- ① ガスケットスライドにサンプルをアプライし終わった時点でチャンバベースの両端から各ハイブリエイドを差し込み、突き当たるまで動かします。ガスケットスライドの端を、ハイブリエイドの突起部分が覆うような形となります。



- ② アレイ面(Agilent と書かれているバーコード面) を下にして(数字が書かれている方のバーコード面は上に)、マイクロアレイスライドをハイブリエイド上に乗せます。アレイスライドの縁またはバーコードシール部分を持つようにして下さい。バーコードシール側を先にハイブリエイドの上に置き、そこを押さえながらもう片方をゆっくり下に倒すと作業が容易です。チャンバベースの4つの突起に当たらないように注意して下さい。この時、アレイスライドはハイブリエイドに支えられてハイブリ液には接していません。

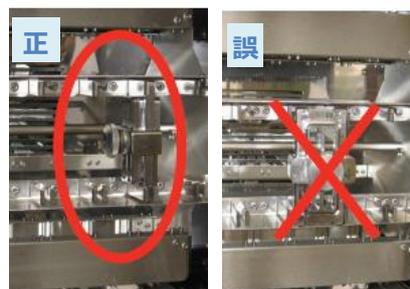


- ③ 左右のハイブリエイドを**同時に**引き抜いて下さい。アレイスライドが水平に落ち、ガスケットスライドと正しい位置で重なります。アレイスライドを乗せた後は、位置の微調整などは行わず、すぐチャンバカバーを乗せて下さい。引き抜く先に障害物などが無いようにして下さい。



10-1-4. ハイブリダイゼーション

- ① チャンバの組み立てが終わりましたら、予め 67°C にセットしたハイブリダイゼーションオープンのロータのラックに差し込みます。真ん中位置のラック(左から 3-4 番目)からチャンバを入れます。



注意 オープンのモータに負荷をかけないためにバランスをとるよう向かい側のラックにもチャンバをセットします。

ハイブリダイゼーションオープンの扉を閉め、回転数を 20 に設定します。

- ② 67°C で下記の時間ハイブリダイゼーションさせます。

※マイクロアレイのフォーマットによりハイブリダイゼーションの時間が異なります。

アレイフォーマット	1-pack	2-pack	4-pack	8-pack
ハイブリダイゼーション回転速度・温度	67°C、20 rpm			
ハイブリダイゼーションの時間	40 時間		24 時間	

Note 洗浄工程で使用する Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 は終夜で予め温めておく必要があります。マイクロアレイをハイブリしている間に p.52 の内容を実施して下さい。

10-2. マイクロアレイの洗浄

Note Cyanine 5 シグナルの分解が、環境・ラボ内機器などからのオゾンもしくは窒素酸化合物により起こることがあります。低オゾン濃度 (<5ppb) の環境において洗浄・スキャンを行ってください。(推奨: オゾン除去フィルタの使用)

※オゾン除去フィルタの採用が難しい場合、Stabilization and Drying Solution を使用する。かつ1度に処理するスライドの数を少なくし、空気にさらされる時間を極力短くする。(約 40 分以内)

【必要な機器・消耗品】

- 機器
- スライドラック(小または中) 1個
 - スライド洗浄ガラス容器(小または中) 3個 (Stabilization and Drying Solution 使用時は5個)
 - 回転子2個 (Stabilization and Drying Solution 使用時は4個)
 - スライドラック小(ガラス容器小)で洗浄する場合 3.0cm 程度のもの
 - スライドラック中(ガラス容器中)で洗浄する場合 4.5cm 程度のもの
 - 回転子の大きさが十分でない場合、洗浄力が弱くなる恐れがあります。
 - フラットピンセット 33A(オプション)
 - オゾン除去フィルタ(強く推奨)
 - スターラー
 - スターラー付恒温槽(株式会社日伸理化、品番: SW-500HT)
 - タイマー
 - 99.9%窒素ガスもしくはブローワー
 - スライドガラス表面に付着したホコリを吹き飛ばすのに使用
 - ヒュームフード(ドラフト)(Stabilization and Drying Solution 使用時)
- 消耗品
- Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 [5188-5226 もしくは 5188-5221]
 - Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 [5188-5226 もしくは 5188-5222]
 - Agilent 10% Triton X-102 [5185-5975](オプション)
 - Agilent Stabilization and Drying Solution [5185-5979] (オプション)
 - アセトニトリル(Stabilization and Drying Solution 使用時)
 - アセトニトリルによるアレイ洗浄により、Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 および 2 からの残渣の Stabilization and Drying Solution への持ち込みを低減します。
 - パウダーフリーの手袋(ニトリルグローブ)
 - パウダーフリーの表示があっても、蛍光を持つ粒子が手袋についている場合があります。事前に、ビーカーに入れた Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 で手袋を事前に洗い、手袋から垂れる液が白濁していないこと、および手袋を洗った後の、ビーカー内の溶液に微粒子がないことを確認してください。手袋から発生する微粒子は、アレイの表面に吸着して結果に大きな影響を及ぼします(手袋から粒子が生じる場合は、p.57 をご参照ください。ニトリルグローブとフラットピンセット 33A のどちらかをアレイの洗浄ステップで使用することをお勧めします)。

マイクロアレイ洗浄用器具類(スライドラック・スライド洗浄ガラス容器・回転子・フラットピンセット)は、CGH 実験用に新たにご購入いただいた上、他のアプリケーション(遺伝子発現、miRNA など)から使用を分けてください。また、各ステップで使用する容器は、同じステップでお使い続けることをお勧めします。

Triton X-102 の Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 および 2 への添加(オプション)

これまでに他のアプリケーション(遺伝子発現、miRNA など)に使用していた器具類を CGH 用に使用される場合、バックグラウンドのむらなど、マイクロアレイの洗浄におけるアーチファクトの影響が出る場合があります。その場合は容器のアセトニトリル洗浄を行ってください。それでも軽減されないようであれば新規 CGH 用としての器具類をご購入いただくか、最終濃度 0.005%になるように、Triton X-102 [5185-5975]を Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 と 2 を加えることにより、その影響を軽減することができます。

Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 と 2 の開封時に、以下の方法で Agilent 10% Triton X-102 [5185-5975] を加えます。

- 1-1).ダンボール箱中の容器の、外蓋と中蓋を注意深く開ける
- 1-2).ピペットで **2mLの 10% Triton X-102** を容器中の Wash Buffer に加える
- 1-3).中蓋・外蓋をきっちり戻し、5・6 回容器全体を転倒混和して、注意深くかつしっかり混ぜる。
- 1-4).中蓋・外蓋を外し、Buffer に添付の蛇口を取り付ける
- 1-5). Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer の容器に『Triton X-102 添加済』と記載し、日付を記録する

Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer が開封済みの場合、同じ割合で(終濃度 0.005%)添加してご使用ください。

洗浄工程を実施する際はいつも清潔な洗浄器具をご使用ください。(購入直後も洗浄してご使用ください。)

BG Noise が高いときや定期的な洗浄容器のメンテナンスなど、(Stabilization and Drying Solution を使用しない場合でも)必要に応じて Milli-Q ultrapure water による洗浄(p.53 10-2-2)以外に、アセトニトリルによる洗浄を実施してください(p.53 10-2-3)

注意 界面活性剤の中には蛍光が洗浄器具に残るものもあるため、洗浄器具を洗浄する際、界面活性剤を使用しないでください。

10-2-1. Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2の加温(終夜)

最適な条件として Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 の温度が 37°Cである必要があります。Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 の必要な量を Sterile storage bottle に分注し、インキュベータや循環温浴槽などで 37°Cに予め終夜温めておきます。(もしくは Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 の容器ごとエアインキュベータで終夜 37°Cに温めておきます。)

Wash Buffer 2 での洗浄時にスライド洗浄ガラス容器を、milli-Q ultrapure water が入った 1.5 L ガラス容器に入れて保温する場合は、1~2L の milli-Q ultrapure water と洗浄用ガラス容器も 37°Cで温めておきます。

10-2-2. 洗浄器具の洗浄

1. 洗浄器具(スライドラック・スライド洗浄ガラス容器・回転子・フラットピンセット)を Milli-Q ultrapure water でよく洗います。(洗剤を使わない。洗剤が残っている器具を使用すると、マイクロアレイに洗剤が付着し蛍光を発する場合があります。)
 2. Milli-Q ultrapure water でよくすすぎます。5 回ほどすすいでください。
 3. ほこりがつかないように乾燥させてください。
- ※各洗浄ガラス容器は各使用洗浄試薬専用を使用することを推奨します。

10-2-3. 洗浄器具のアセトニトリルによる洗浄(Stabilization and Drying Solution 使用時)

アセトニトリル洗浄によりスライドラック・スライド洗浄ガラス容器・回転子・フラットピンセットに残った Stabilization and Drying Solution 残渣を除去します。

警告 アセトニトリル洗浄はヒュームドラフト内で実施してください。アセトニトリルは揮発性、引火性の溶液ですので、取り扱いにご注意ください。

1. スライド洗浄ガラス容器にスライドラック・回転子・フラットピンセットを入れ、スターラーの上に置きます。
2. スライド洗浄ガラス容器に 100 % アセトニトリルを満たします。
3. スターラーの回転速度を中程度の速度に設定します。(もしくは 350 rpm)
4. 室温で5分間洗浄します。
5. アセトニトリルを施設内の規定に則り廃棄します。
6. 1～5の工程を再度実施します。
7. ヒュームドラフト内ですべての器具を乾燥させます。
8. 続いて 10-2-2 の内容にしたがって Milli-Q ultrapure water で洗浄します。

10-2-4. Stabilization and Drying Solutionの加温(Stabilization and Drying Solution使用時)

Agilent Stabilization and Drying Solution はアセトニトリルに溶解させたオゾン除去剤を含みます。オゾン除去剤は飽和状態になっているため、沈殿物を生じる場合があります。目に見える沈殿があった場合には、以下の手順で溶液を加温して、沈殿物を再溶解してください。

警告 Stabilization and Drying Solution は、揮発性、引火性の溶液ですので、取り扱いに注意を要して下さい。

警告 警告に従わず火事、爆発による個人的な傷害を負った場合、アジレントの補償対象外になりますので、充分注意して取り扱って下さい。

警告 Stabilization and Drying Solution 溶液の加温は**必ず下記の方法**に従って行ない、ホットプレート・電子レンジ(オープン)・インキュベーター(孵卵器)などでは行わないでください。温度を急激に上げないで下さい。さらに、引火性物質を近くに置かないで下さい。インキュベーター(孵卵器)などを使用して密閉空間で加温すると溶剤であるアセトニトリルが気化して充満し、爆発事故や高濃度のアセトニトリルの吸引による健康被害の原因となる可能性があります。

- ① ヒュームフード(ドラフト)内で **40 - 45°C**の循環温浴槽を用いてゆっくりと溶液を加温します。十分な空気のヘッドスペース容量がある容器に溶液をいれ、密閉した状態で加熱してください。

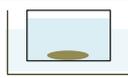
出荷時に Stabilization and Drying Solution 溶液が入っていたオリジナル容器は加温にお使いいただけます。オリジナル容器は 700 mL サイズで、500 mL の溶液が入っています。オリジナルと異なる容器を使う場合には、この空気部分のヘッドスペースと溶液の割合がオリジナル時以上になることをご確認ください。沈殿物を完全に再溶解させるのに必要な時間は、沈殿物の量によって異なります。**沈殿量が多い場合には、オーバーナイトでの加温が必要になることもあります。**

- ② 溶液を均一に溶解するために、緩やかな攪拌が必要になる場合があります。必要に応じて、ヒュームフード(ドラフト)内で火気を避けて行ってください。
- ③ 沈殿が溶解しましたら、室温に戻してから洗浄に使用してください。

注意 Stabilization and Drying Solution は決して過しなさいでください。オゾンスカベンジャーの濃度に影響します。

10-2-5. マイクロアレイの洗浄

1連の洗浄工程ごとに、新しい Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 と Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 をお使いください。

Step	容器	洗浄液	温度	時間	
チャンバ分解	#1	Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1	室温		
洗浄1	#2	Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1	室温	5分	
洗浄2	#3	Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2	37°C	1分	
アセトニトリル洗浄 (Stabilization and Drying Solution 使用時)	#4	アセトニトリル	室温	10秒	
洗浄3 (Stabilization and Drying Solution 使用時)	#5	Stabilization and Drying Solution	室温	30秒	

① 洗浄容器 #1 に Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 を入れます(室温)。

② 洗浄容器 #2 を準備します。

A) スライドラックを洗浄容器#2 に入れます。

B) 回転子を中に入れます。Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 を、スライドラックが十分に浸かるくらい入れます(室温)。



③ 洗浄容器 #3 を準備します。

A) 洗浄容器 #3 に Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 (37°C)を入れます。(容器 80%程度の量)

B) 回転子を中に入れます。

C) スターラー付恒温槽がある場合には 37°Cにしておき、洗浄容器 #3 を入れます(右の写真参照)。



温度調節機能付きのスターラーを使用する場合は、スターラーの上にあらかじめ 37°Cで温めておいた milli-Q ultrapure water が入った 1.5 L ガラス容器を乗せ、そこに洗浄容器 #3 を入れます。

スターラー付恒温槽を利用しない場合は、洗浄1が開始した後に(洗浄2の直前に)③の準備を開始します。

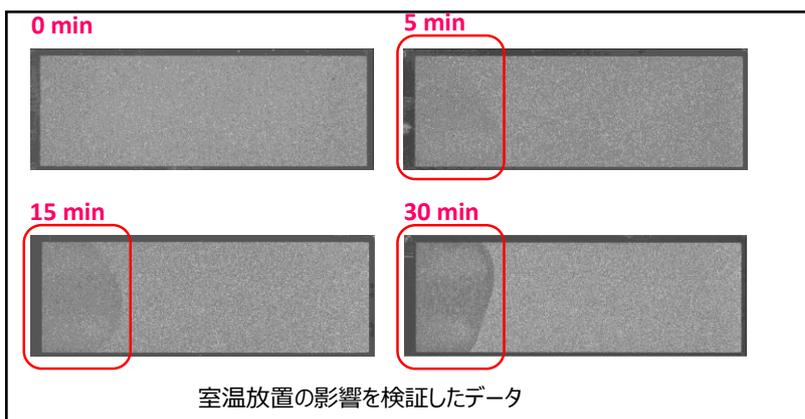
④ (Stabilization and Drying Solution 使用時) ヒュームドラフト内で洗浄容器 #4 にアセトニトリルを入れます(室温)。回転子を中にいれておきます。

⑤ (Stabilization and Drying Solution 使用時) ヒュームドラフト内で洗浄容器 #5 に Stabilization and Drying Solution を入れます(室温)。回転子を中にいれておきます。

警告 アセトニトリルおよび Stabilization and Drying Solution を使う場合、ヒュームフード(ドラフト)内に洗浄容器 #4 と #5 を準備します。

- ⑥ ハイブリダイゼーションオープンからハイブリダイゼーションチャンバを取り出します。複数のアレイをハイブリダイゼーションしている場合も、**チャンバは必ず1つずつ取り出す**ようにしてください。泡が形成されているか、また泡が自由に動いているか確認してください。

注意 チャンバをハイブリダイゼーションオープンから取り出し、室温で静置すると、放置時間に応じて、ハイブリ液の覆っている部分と気泡の部分で、シグナル強度に差異を生じます(下図参照)。オープンから取り出したチャンバは、**必ずすぐに解体し**、アレイスライドを Wash1 中のスライドラックに移すことが重要です。また複数枚のスライドを一度に wash する場合も、1 スライドずつ取り出し、**解体の直前まで、規定の温度に保温**されていることが重要です。



- ⑦ チャンバを分解します。
- A) チャンバを水平な台の上に置き、スクリューを逆時計回りにまわしてゆるめます。
 - B) クランプアセンブリを外し、チャンバカバーを取り除きます。
 - C) 手袋をはめた手で、チャンバベースから重なっている 2 枚のスライドを同時に取り出します。この時、スライドの両端をしっかり持つようにしてください。すぐに、アレイスライドを上にした状態で(数字が書かれているバーコード面を上にして)、2 枚のスライドが重なっている状態で Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 の入っている洗浄容器 #1 に浸けます。

- ⑧ **2 枚のスライドが完全に Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 に浸かった状態で**、スライドのバーコード側から 2 枚のスライドを離します。

- A) ピンセットの先端を2枚のスライドの間に差し込み、ゆるやかにピンセットを上側または下側に回転させてスライド同士を離します。
- B) ガスケットスライドのみを容器の底に落としてください。



注意 Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 中で解体することが重要です。

- C) アレイスライドをすばやく取り出し、Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 の入っている洗浄容器 #2 にセットされているラックにそっと差し込みます。

注意 スライドグラスを扱う時は、バーコード部分かスライドグラスの縁を持つようにします。決してマイクロアレイに触れることがないように注意してください。アレイが空気に触れる時間を最小限に押さえてください。

参考手法(推奨)

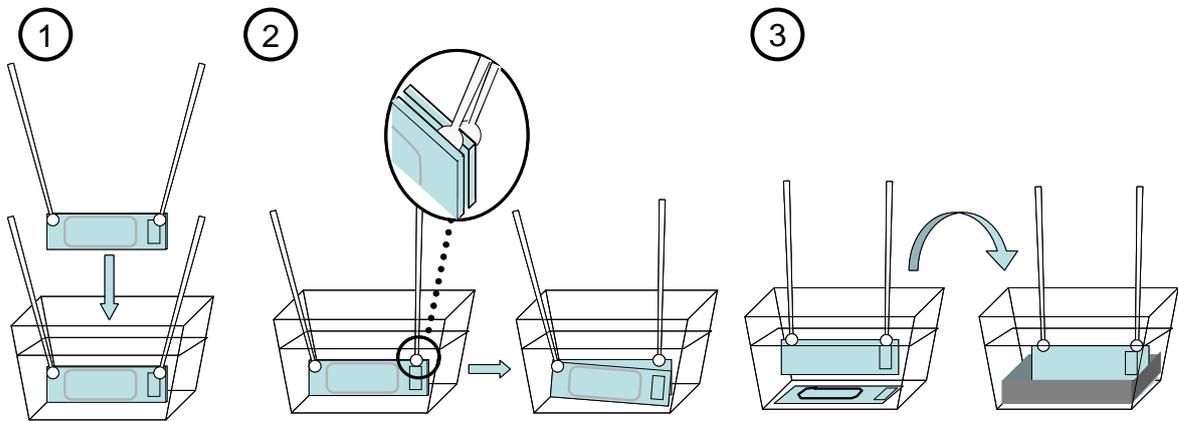
ピンセットを用いることにより、洗浄液に手袋を浸さないでアレイを解体することができます。

使用器具：フラットピンセット 33A (品番は p.10 参照)



注意：従来の超精密ピンセット No.T よりも先の丸い部分が大きい
ため、丸い部分の半分以上でガラス面を持たないように注意が必要。

- ① 2枚のスライドをピンセットで挟み、立てた状態でガラス容器1に入れる。
- ② バーコード側のピンセットを2枚のスライドガラス間に入れアレイ面を傷つけないようにガスケットスライドをはがす。
- ③ 両手でスライドガラスをしっかりとはさみ、ガラス容器2中のラックに運ぶ。

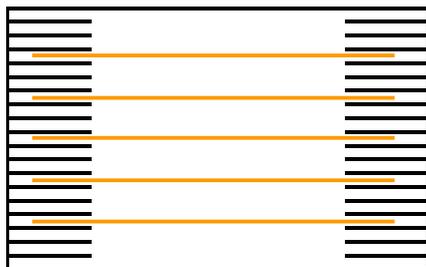


- ⑨ 残りのチャンバも同様に解体して、すべてのスライドをラックに差し込みます。全てのスライドで、アレイ面 (Agilent と書かれたほうの面) がラックの中心を向く向きに揃えます。一度に洗浄するアレイは 19 スライドラック(スライドラック小)のときは 5 枚以下にしてください。

注意 スライドガラスをラックに差し込む際は、洗浄の効率を保つ持つために端は 3 つ以上、スライドガラス間は 2 つ以上空けてください。19 スライドラックは最大 5 枚、30 スライドラックは最大 8 枚洗浄可能です。

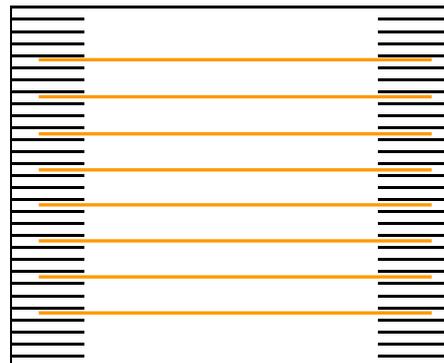
19 スライドラック(Thermo Shandon109)

スライドラック小



30 スライドラック(Thermo Shandon113)

スライドラック中



すべてのアレイが洗浄容器 #2 内のスライドラックにセットできたら、**中程度の回転数(もしくは 350 rpm)**で**室温のまま 5 分間** 攪拌します。

注意 スターラー付恒温槽を利用しない場合、Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 でスライドガラスを洗浄している間に、ガラス容器 #3 に、37°Cで保温してある Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2を注ぎます。(ガラス容器も予め 37°Cで保温することを推奨します。)

- ⑩ スライドラックを 37°Cの Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 の入っている洗浄容器 #3 にすばやく移します。**中程度の回転数で 1分間** 攪拌します。実験を成功させるために、**この洗浄時間を厳守**してください。(2分を超えてはいけません。)
- ⑪ スターラーの回転速度を最低速まで落とし、回転させたままの状態、洗浄容器 #3 から。スライドラックをできるだけ水平に保ったまま、**5-10 秒ほどかけてゆっくりと一定の速度**で引き上げます。

オゾン除去フィルタによる Cy5 蛍光退色の対策が行われている場合はここで洗浄操作は終了です。P.60 にすすんでください。

【以下は **Stabilization and Drying Solution** 使用時のみの操作です。】

- ⑫ スライドラックをアセトニトリルの入った洗浄容器 #4 に移します。中程度(もしくは 350 rpm)で**室温のまま 10 秒間**攪拌します。
- ⑬ スライドラックを Stabilization and Drying Solution の入った洗浄容器 #5 に移します。中程度(もしくは 350 rpm)で**室温のまま 30 秒間**攪拌します。
- ⑭ スターラーの回転速度を最低速まで落とし、回転させたままの状態、スライドラックをできるだけ水平に保ったまま、スライドラックを **5-10 秒ほどかけてゆっくりと一定の速度**でスライドラックを引き上げてください。スライドラックを溶液から出したり戻したりしないように注意して下さい。スライドラックを取り出すのが早すぎる場合、スライドガラス上に白い粒子が生じることがあります。その場合には、直ちにスライドラックを Stabilization and Drying Solution 中に沈めて、再度極めてゆっくりかつ一定の速度で取り出してください。

この操作でスライドガラスは乾燥しますので、その後ただちにスキャンを行うことができます(窒素ガスによる乾燥は必要ありません)

注意 Stabilization and Drying Solution の滴がスライドラック下側のスライドガラスの端に残る場合がありますが、オリゴ DNA がプリントしてあるアレイエリア内に液滴がなければ問題ありません。決してスライドを振らないで下さい。スライドガラスのアレイエリア内に滴がついている場合は、すぐにスライドラックを Stabilization and Drying Solution に再度浸し、それから再度極めてゆっくりと一定の速度で取り出してください。

注意 Stabilization and Drying Solution およびアセトニトリルの繰り返し利用回数は 3 回までになります。ただし繰り返し利用できる回数は Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 の持ちこみ量によって異なります。

注意 Stabilization and Drying Solution には、オゾン除去剤が含まれていますが、長時間のオゾン暴露によりシグナルは退色していきます。オゾン暴露を最小限にするために、洗浄とスキャンは早朝または夕方遅い時間に行ってください。大気中のオゾン濃度は日中、特に交通量が多い時間帯に最大になります。Agilent 社のスキャナをお使いいただく場合には、一度にセットするスライドガラスを 10 枚までにしてください。このようなスキャン操作を行うことで、大気中のオゾン暴露を最小限にすることが可能です。

【Stabilization and Drying Solution の保存】

ヒュームフード(ドラフト)内で、手袋を用いて、Stabilization and Drying Solution を褐色または透明なガラス容器に移します。液を移した後、少なくとも 30%以上のヘッドスペースがある大きさのガラス容器をお使いください。漏斗を使用すると、簡単に溶液を移すことができます。Stabilization and Drying Solution を移した褐色あるいは透明なガラス容器は、暗所で保存して下さい。Stabilization and Drying Solution は初回使用後、2 回まで、合計 3 回まで繰り返し使用できます。Stabilization and Drying Solution の繰り返し使用を終了した後は、HPLC 廃液およびフェノール廃棄と同様の方法にて揮発性の溶剤として処分して下さい。

10-3. Agilent スキャナを用いたスキャンニングと解析

10-3-1. マイクロアレイスライドのスキャン

環境中のオキシダントがシグナル強度へ与える影響を最小にするために、マイクロアレイスライドをすぐにスキャンします。

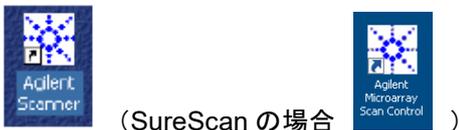
レーザーを安定させるために、スキャンを開始する 20 分前までにスキャナの電源を入れます (SureScan の場合は直前でも可能)。

PC を起動した後にスキャナの電源を入れ、スキャナコントロールソフトウェアを立ち上げます。

スキャナおよびスキャナコントロールソフトウェアのバージョンについては [p.15](#) 必要なスキャナおよびソフトウェアを参照してください。

① スキャナコントロールソフトウェアの立ち上げ

A) デスクトップ上のアジレントスキャナのアイコンをダブルクリックして、ソフトウェアを起動します。



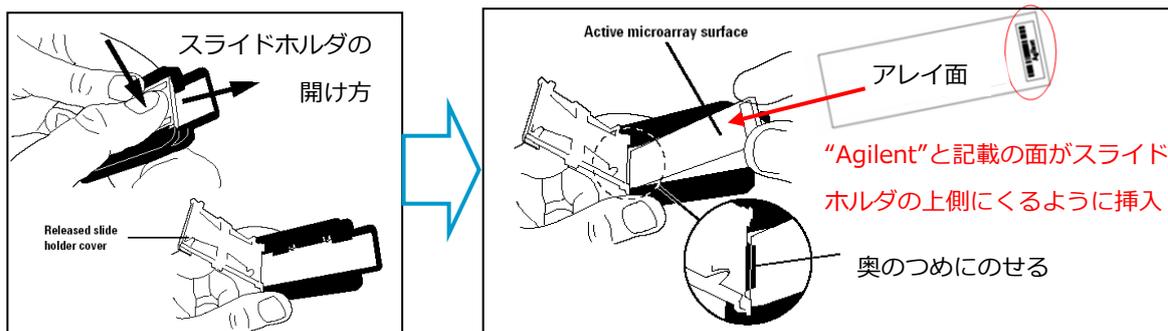
B) スキャンコントロール画面が表示され、スキャナのイニシャライズが始まります。C スキャナはイニシャライズが始まると、メイン画面の下方欄に“Initializing Scanner” というメッセージが表示され、スキャナの蓋(Lid)はロックされます。イニシャライズ後、蓋のロックが解除されます。レーザーのウォームアップが終了していない場合は、“Lasers are warming up...” と表示されます。レーザーのウォームアップには、数分から 20 分程度かかります。ウォームアップが完了すると、表示が“Scanner ready.” に変わり、スキャン可能な状態になります。

SureScan で Initialize logger failed とエラーが出た場合は、巻末のトラブルシューティングを参照してください。

② スライドをスライドホルダにセットします。スライドホルダをセットした際に、数字のバーコード面が見えるような向きで挿入します。

B スキャナまたは C スキャナをお使いの場合

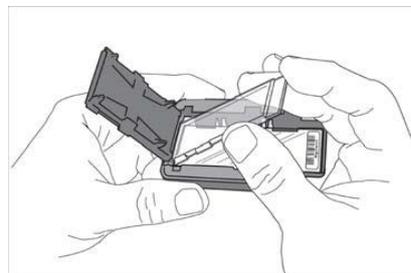
オゾン濃度が 5 ppb 以下の環境で、“Agilent”と記載のある面がスライドホルダの上に向くようにスライドを入れます。オゾンレベルが 5 ppb を超える環境では迅速に Ozone-barrier slide cover をアレイの上に乗せませす ([p.61](#))。



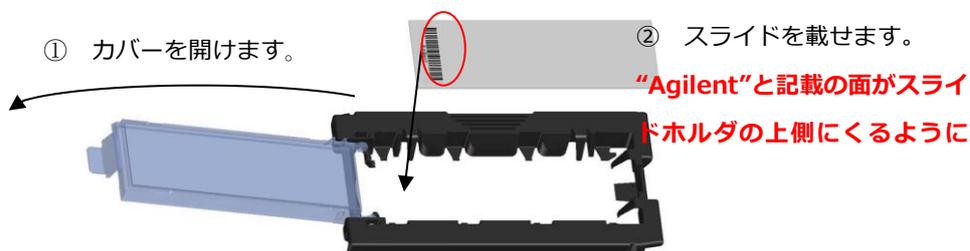
(オプション) Ozone-barrier slide cover [型式 G2505-60550]の使用

オゾンバリアスライドカバーを使用すると、スキャン中のオゾンによる蛍光色素の退色を抑えることができます。下図のように、スライドホルダに挿入したアレイスライドに重なるように、(アレイ表面に触れないように注意しながら) Ozone-barrier slide cover を置き、スライドホルダのカバーを閉めます。

- ・スポット面を傷つける恐れがあるので、Ozone-barrier slide cover の向き(裏表、左右の向き)に気を付けてください。
- ・スキャン中の退色のみ有効です。洗浄・乾燥時の退色はオゾンバリアスライドカバーのみでは防ぐことはできません。
- ・オゾンフリーブースをご利用の場合は、使用する必要はありません。



SureScan をお使いの場合



アレイスライドをスライドホルダに挿入する前に、スライドホルダにほこりや指紋が付いていないことを確認してください。もしほこりや指紋が付いている場合は、圧縮空気か柔らかい布で取り除いてください。スライドホルダにひっかき傷や壊れている場所がある、カバーが閉まらない、カバーが動きにくいなどの場合は、他のスライドホルダを使用してください。

- スライドホルダのカバーを開けます。
 - 'Agilent' と記載の面がスライドホルダの上側になるように、'Agilent' の文字が奥側になるようにスライドを載せます。
 - スライドホルダのカバーを閉めます。閉める際カチッと音がし、固く閉まっていることを確認して下さい。
 - カバーのしまりが緩い場合は他のスライドホルダを使用してください。スライドホルダは 1 台のスキヤナに 24 個ついています(足りなくなりましたら購入も可能です。お問い合わせください)。
- ③ スライドホルダをスキヤナのカローセル(SureScan の場合はカセット)にセットします。

注意 アセトニトリルをご利用の場合、アセトニトリルがスライドホルダに付着しないようにご注意ください。アセトニトリルが、スライドホルダを侵します。

- ④ 複数のスライドガラスをスキャンする場合は、隣り合うスロットにセットしてください。また、Bスキヤナ・Cスキヤナ使用時は H と書かれている Home スロットにはセットしないでください。SureScan の場合は、どの位置にセットしても構いません。

また、どちらのタイプのスキャナでも**スライドホルダのカバーはきちんと閉めて下さい**。完全に閉まっていない状態でスキャンを開始すると、スキャナ内でスライドホルダが引っかかってしまい、エンジニアによる修理が必要となることがあります。

⑤ スキャナの設定

C スキャナの場合

注意: C スキャナには

Agilent Scan Control Software v8.0 以降
が必要です

注意: CGH+SNP マイクロアレイのスキャン
には C スキャナが必要です。



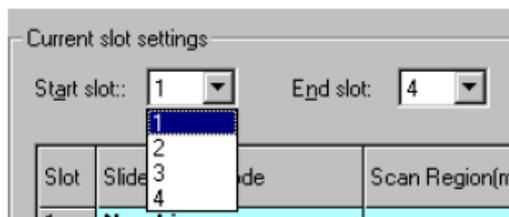
A) Operator の欄にユーザ名を入力します。

B) Start Slot と End Slot を設定します。

Start slot: ボックスのドロップダウン ▼ をクリックし、
最初にスキャンするスロットの番号を選択します。

End Slot: ボックスのドロップダウン ▼ をクリックし、
最後にスキャンするスロットの番号を選択します。

ここで入力したスロットの番号に基づき、スキャンコントロールのメイン画面の表示が変更されます。



C) Profile 欄から Agilent G3_CGH(1x1M、2x400K、4x180K、8x60K の場合)または AgilentHD_CGH
(1x244K、2x105K、4x44K、8x15K の場合)を選択します。

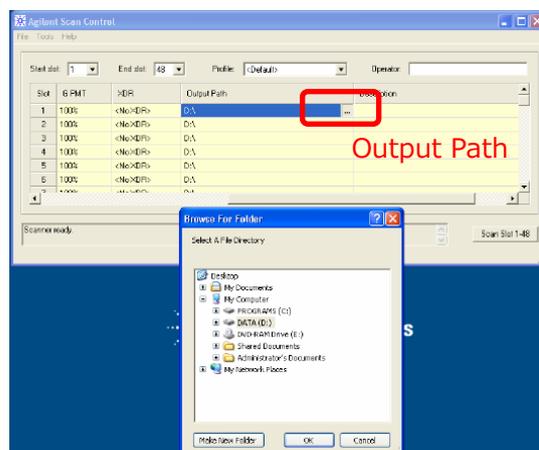
スキャン設定が以下の条件になっているか確認します。(フォーマットについては p.14 参照)

	HD マイクロアレイフォーマット	G3 マイクロアレイフォーマット
Dye channel	R+D (red and green)	R+D (red and green)
Scan region	Agilent HD (61 x 21.6 mm)	Agilent HD (61 x 21.6 mm)
Scan resolution	5 μm	3 μm
Tiff file dynamic range	16 bit	16 bit
Red PMT gain	100%	100%
Green PMT gain	100%	100%
XDR	<No XDR>	<No XDR>

D) Output Path Browse: ... をクリックして保存先を
設定します。

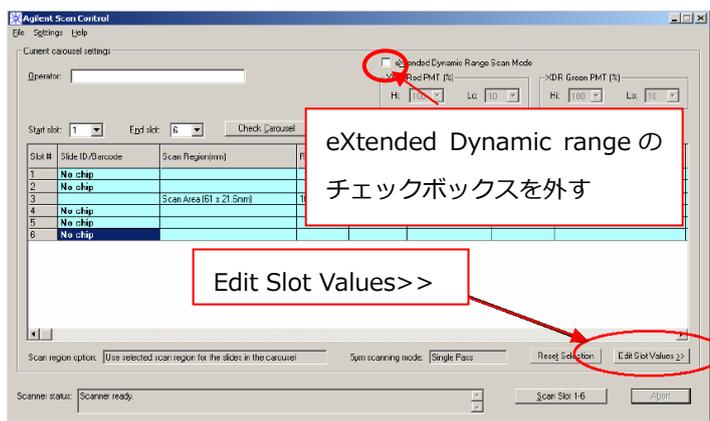
E) Scanner Status が Scanner Ready になっている
ことを確認します

F) メイン画面の右下「Scan Slot m-n」をクリックします。
(m は最初のスライドが位置するスロット番号、
n は最後のスライドが位置するスロット番号)



B スキャナの場合

注意: B スキャナで Agilent CGH マイクロアレイ 1x244K、2x105K、4x44K、8x15K フォーマットをスキャンする場合、Agilent Scan Control Software v7.0 推奨。

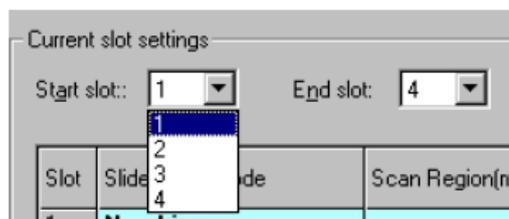


A) Start Slot と End Slot を設定します。

Start slot: ボックスのドロップダウン ▼ をクリックし、最初にスキャンするスロットの番号を選択します。

End Slot: ボックスのドロップダウン ▼ をクリックし、最後にスキャンするスロットの番号を選択します。

ここで入力したスロットの番号に基づき、スキャンコントロールのメイン画面の表示が変更されます。



B) eXtended Dynamic range のチェックボックスを外します。(上図参照)

C) スキャン設定が以下の条件になっているか確認します。(デフォルト条件の設定→p.61)

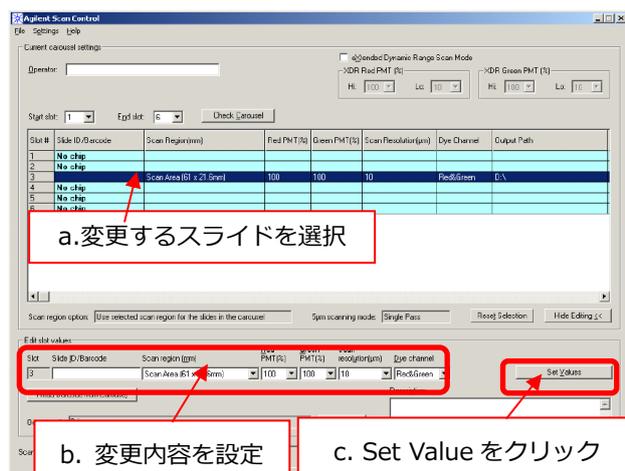
	HD マイクロアレイフォーマット
Scan region	Scan Area (61 x 21.6 mm)
Scan resolution (μm)	5
Dye Channel	Red & Green
Red PMT	100%
Green PMT	100%

なっていない場合、Edit Slot Values>>(上図参照)をクリックしてメイン画面を拡張し、設定を所定の値に変更します。

a. 設定を変更するスライドをテーブル内で選択します(複数枚選択できます)。選択されると青くハイライトされます。

b. 各項目の設定を変更し、Set Values をクリックします (Set values をクリックしないと変更が反映されません)。右図はスキャン解像度を変更する例です。

c. テーブル内の設定値が変更されたことを確認してください。



D) メイン画面の左下にある Scanner status が **Scanner Ready** になっている事を確認してください。

E) すべて設定が終了したら、メイン画面上「Scan Slot m-n」をクリックします(スキャンが開始されます)。

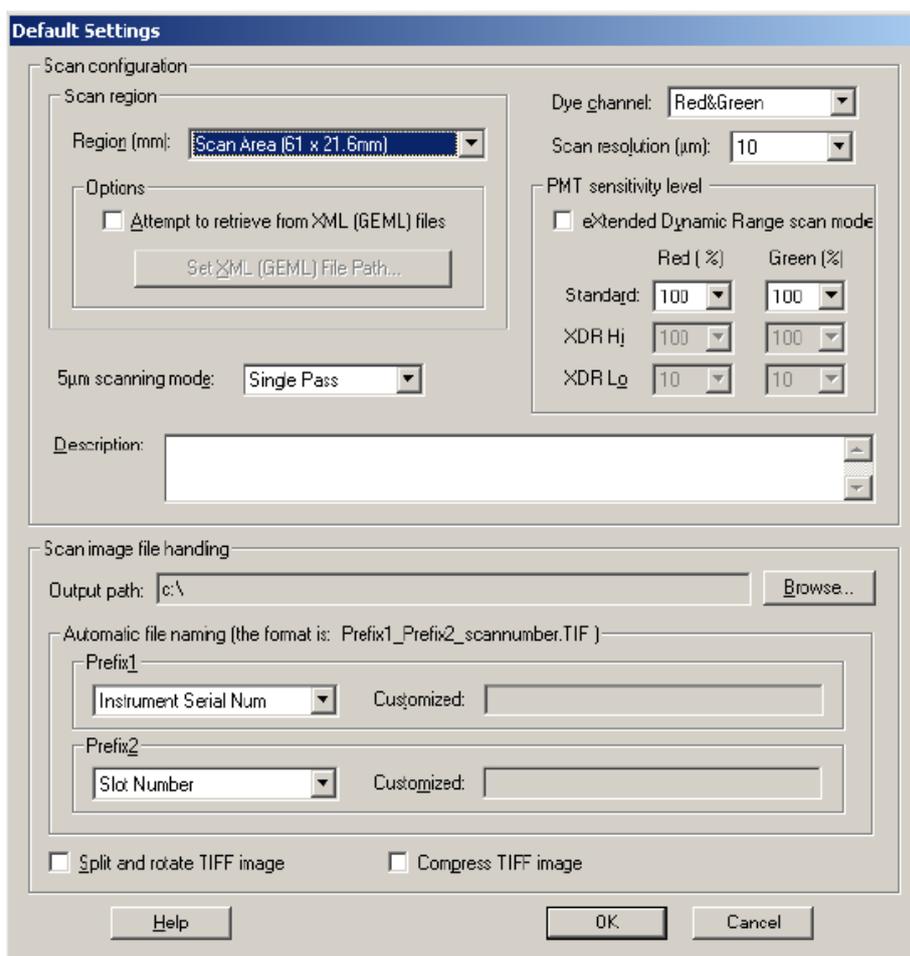
参考: スキャンのデフォルト設定変更法

- (1) ScanControl を立ち上げます)
- 2) Settings>Modify Default Settings を選択します
- 3) 表示された”Default Setting”ボックスにて、変更を行います。

例: ファイル名自動作成の設定

- ・ Prefix 1 : Instrument Serial Number
- ・ Prefix 2 : Array barcode

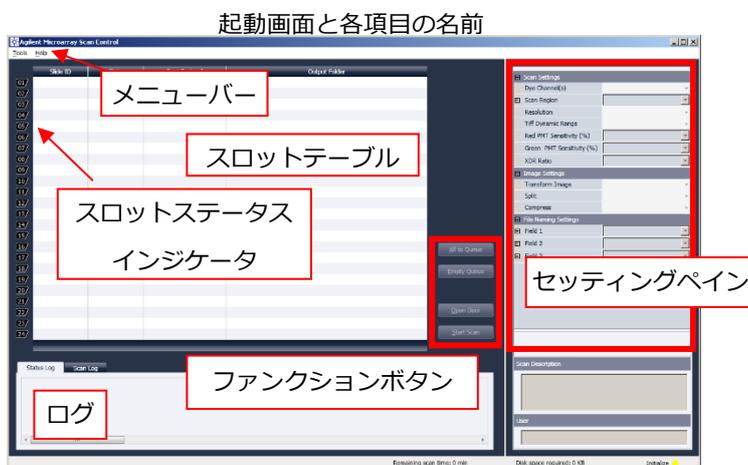
- 4) OK ボタンを押してボックスを閉じます



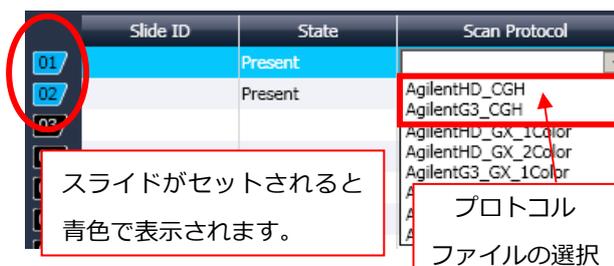
SureScan マイクロアレイスキャナの場合

注意 ドアを手で開けたり、カセットを手で動かしたりしないでください。エラーが発生します。
エラーが発生したら、スキャナコントロールソフトウェアを再起動する必要があります。

- A) 初期化が終了すると、ファンクションボタンのOpen Doorボタンがアクティブになります。クリックし、カセットにスライドをセットします。スライドがセットされているカセットは青色で表示されます。また、各パラメータの編集ができるようになります。



- B) Scan Protocolからプロトコルファイルを選択します。
- 1x1M、2x400K、4x180K、8x60Kの場合
Agilent G3_CGH
 - 1x244K、2x105K、4x44K、8x15Kの場合
AgilentHD_CGH



ウィンドウ右側のセッティングペインでスキャン設定(p.59参照)を確認してください。変更する必要がある場合は個別にプルダウンメニューで変更できます。

- C) 必要があればデータの保存先を変更します。※D drive内のフォルダを指定してください。



- D) ステータスバーでScannerのステータスがReadyであることを確認し、ファンクションボタンのAll to Queueボタンをクリックします。
- E) ファンクションボタンのStart Scanボタンをクリックするとスキャンを開始します。
- F) スキャンが終了し、Open Doorボタンがアクティブになったら、クリックしスライドホルダを取り出し、Close Doorボタンをクリックしてドアを閉じます。
- G) コントロールソフトを閉じた後にスキャナおよびPCの電源を消してください。

10-3-2. マイクロアレイ画像データの解析

スキャンが完了したあと、数値化と解析を行います。

数値化のソフトウェア Feature Extraction は、スキャンで得られた画像データ(拡張子 .tif)からデータを抽出し、log ratioに変換します。得られた Log Ratio の値をもとに解析を行い、Aberrationを検出します。

アジレントは Feature Extraction ソフトウェアを、単独のプログラムとして、また CytoGenomics に統合されている内容の一部(Windows 版のみ)として提供いたしております。

(CytoGenomics ソフトウェアは生物種としてヒトのみに対応いたしております。)

Feature Extraction ソフトウェアによる数値化につきましては、[p.72](#) 以降をご覧ください。

- ・ ヒト生物種の場合、Agilent CytoGenomics の Window 版をお使いいただけます。数値化と解析プロセスの間に、CytoGenomics は数値化データファイルと QC・Aberration レポートを作成します。
- ・ Mac コンピュータ上で Agilent CytoGenomics をお使いになる場合は、まず Windows 上で Feature Extraction を用いて数値化データを抽出します。Feature Extraction ソフトウェアは Mac コンピュータ上では動作いたしません。
- ・ ヒト以外の生物種の場合、Feature Extraction(Windows にのみ対応)にて数値化データを抽出し、そのあと Agilent Genomic Workbench で解析を行ってください。

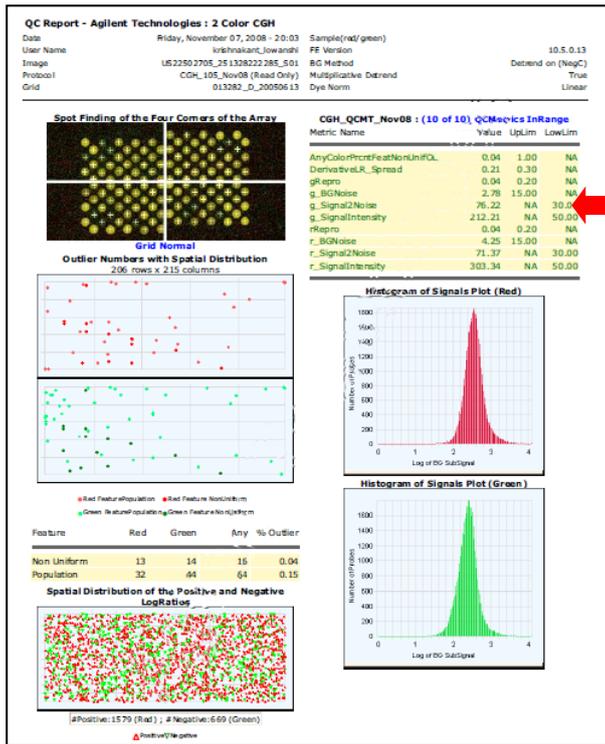
高品質のサンプルを用いた場合のマイクロアレイの QC メトリクス

これらのメトリクスは高品質の DNA サンプルを、本プロトコルに記載されている標準実験プロトコルを用いて CGH マイクロアレイで解析した場合に適応可能です。これらのメトリクスは、Feature Extraction (単体のソフト、もしくは Agilent CytoGenomics ソフトウェアに含まれているもの)で作成される QC レポート上に記載されています。アッセイ中のマイクロアレイデータセットにおけるデータの質の確認に使用いただけます。これらの値から実験上のエラーの可能性も示唆されることがあります。マイクロアレイフォーマット(1-pack、2-pack、4-pack、8-pack)・生物サンプルソース・使用ゲノム DNA の質・実験過程・スキャナの感度・画像解析を含む多くの要素がこれらのメトリクスの値に影響します。下に示しました数値のガイドラインは Ailent が本プロトコルでサンプルを解析して得られた閾値です。

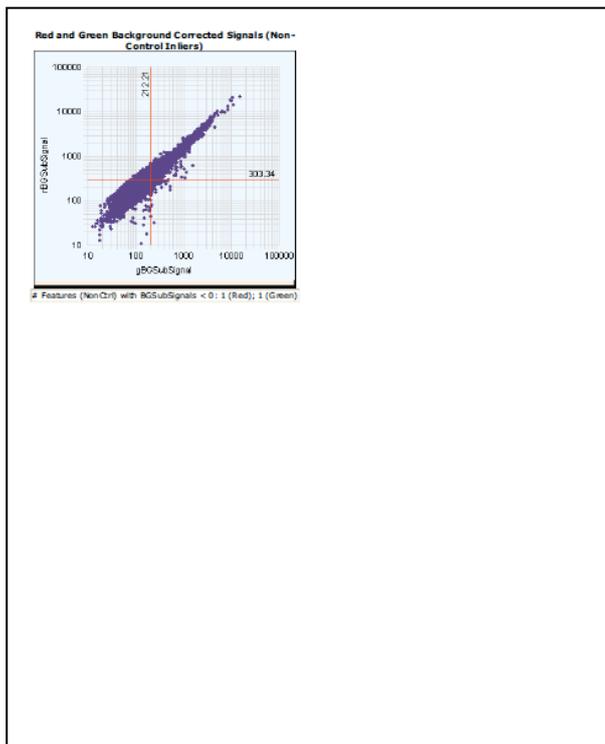
Metric	Excellent	Good	Evaluate
BGNoise	< 10	10 to 20	> 20
Signal Intensity	> 150	50 to 150	< 50
Signal to Noise	> 100	30 to 100	< 30
Reproducibility	< 0.05	0.05 to 0.2	> 0.2
DLRSpread	< 0.2	0.2 to 0.3	> 0.3

CGH+SNP マイクロアレイで高い SNP call rate と accuracy を得るには **DLR Spread が <0.2** であることが大切です。

- FE10.5 QC report



CGH QC Metrics



QC Reportは、以下の項目を示します。

(各項目の詳細は、Help > Reference Guide で確認することができます。)

FE9.5 QC report

- QC Report Header
- Spot Finding of Four Corners
- Outlier Stats
- Spatial Distribution of All Outliers
- Net Signal Statistics
- Negative Control Stats
- Plot of Background-Corrected Signals
- Local Background Inliers
- Foreground Surface Fit
- Reproducibility Statistics (%CV Replicated Probes)
- Spatial Distribution of Up- and Down-Regulated Features
- Plot of LogRatio vs Average Log Signal

FE10.5 QC report

- QC Report Header
- Spot Finding of Four Corners
- Spatial Distribution of All Outliers
- Outlier Stats
- Spatial Distribution of Significantly Up-Regulated and Down-Regulated Features (Positive and Negative Log Ratios)
- QC reports with metric sets※
- Histogram of Signals Plot
- Plot of Background-Corrected Signals

※ **AnyColorPrcntFeatNonUnifOL**: The percentage of features that are feature non-uniformity outliers in either channel

DerivativeLR_Spread: measures the standard deviation of the probe-to-probe difference of the log ratios. This is a metric used in CGH experiments where differences in the log ratios are small on average. A smaller standard deviation here indicates less noise in the biological signals.

g(r)Repro: median CV% of BGSubSignal of the NonControl replicated sequences

g(r)_BGNoise: standard deviation of negative control probes after rejecting feature nonuniform outliers, saturated features, and feature population outliers

g(r)_Signal2Noise: Signal Intensity divided by BGNoise

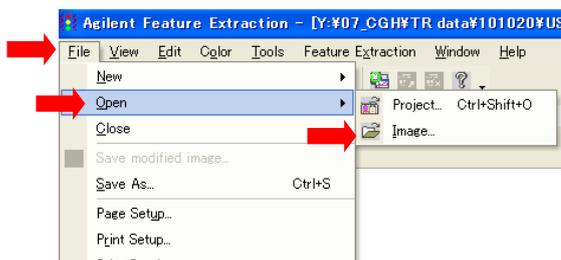
g(r)_SignalIntensity: median background-subtracted signal after rejecting nonuniform outliers and saturated features.

11. Feature Extraction による tif 画像(スキャン画像データ)の確認

実習では、アジレントマイクロアレイスキャナーを使用した画像化と、イメージの簡単な確認法をご紹介します。より詳細については、スキャナに付属の日本語簡易版マニュアルまたは英語版イメージアナリシス・マニュアルをご覧ください。

【Feature Extraction ソフトウェアでスキャンした画像ファイルを開く方法】

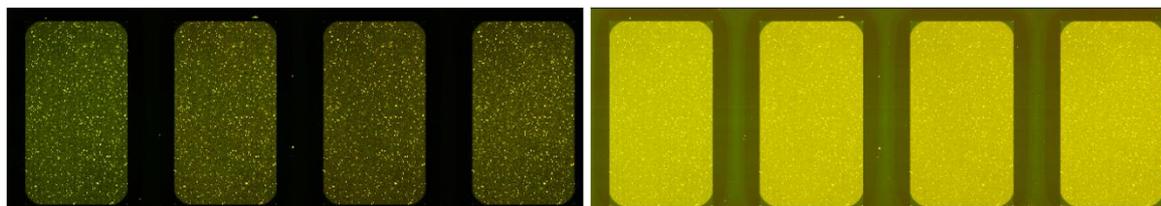
- ・ tif 画像ファイルをデスクトップの **Feature Extraction** ショートカット  にドラッグ & ドロップ。
- ・ Feature Extraction ソフトウェアを起動し、File > Open > Image をクリックし、表示させる tif データを選択



① バックグラウンドのむらの確認

ログスケール表示によりバックグラウンドのむらを確認します。ログスケール・リニアスケール切り替えボタンをクリックします()

リニアスケール ログスケール



② 画像の一部を切り取る(クロップモードの ON/OFF)

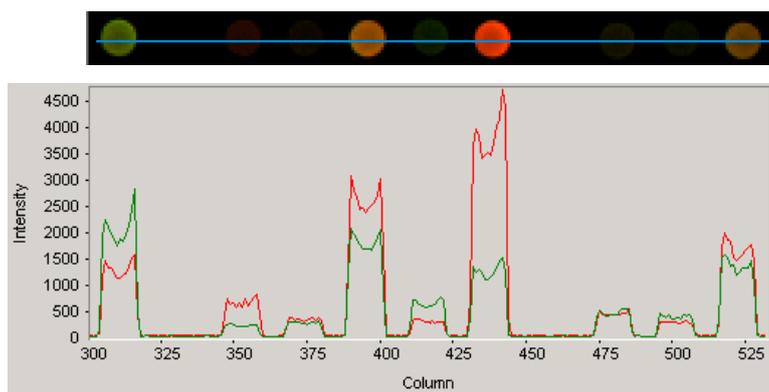
画面のクロップモードボタン () をクリックすることで ON/OFF の切り替えができます。クロップモードが ON の場合、ポインタの横にひし形のマークが表示されます。イメージをクロップすると新しいウィンドウで切り取った画像が表示されます。OFF の場合、クロップ時にその大きさに合わせてウィンドウが拡大表示されます。

③ 画像の拡大・縮小

画面の    をクリックすることで画像を拡大・縮小することができます。②のクロップ機能との組み合わせにより、見たい領域の拡大・縮小がよりスムーズになります。

④ ラインプロット

異常スポットやバックグラウンドなど、特定の領域のシグナルをラインプロットにより確認することができます。



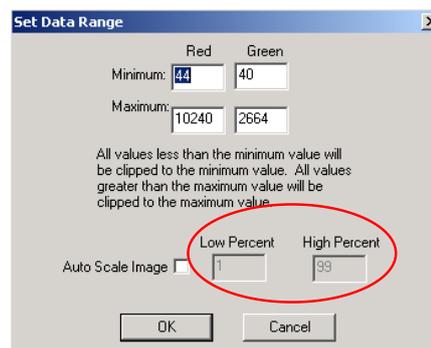
ラインプロットを見たい位置(上の図の場合、青線上のどこでも構いません)にポインタを合わせてダブル左クリックします。縦軸方向でラインプロットを作成するときはライン上をダブル右クリックします。

④ イメージデータのスケールの確認

両チャンネルのデータレンジを確認します。  をクリックします。イメージデータ全体に対し、1%から99%の設定(デフォルト)における最大値・最小値を確認します。

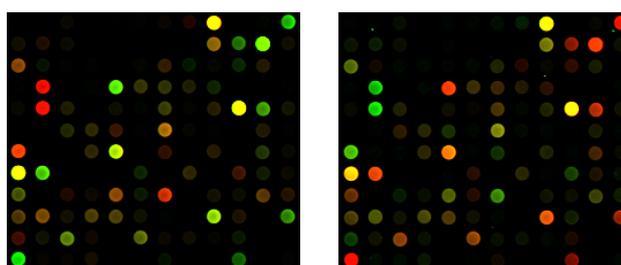
<注意>ここでの確認はイメージデータ全体に対するものとなります(スポット以外のエリアも含まれます)。

スポットレベルで確認する(例:コントロールスポットを除く全遺伝子スポットに対してデータスケールを確認する)ためには、スポット定量が必要になりますので御注意ください。



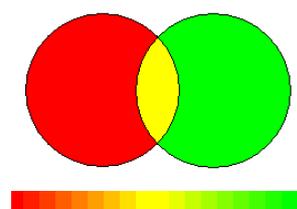
⑤ カラーズワップの確認

色素交換を行ったアレイがある場合、2枚のアレイイメージを比べて大まかなスワップ傾向が見られるかを調べます。



この傾向を適正に見る為に、カラーレンジの設定を1%から99%の設定(デフォルト)にしてください。

設定に応じて、Cy3の発現量が多い場合に緑色、Cy5の発現量が多い場合に赤色になるように表示されます。



12. Feature Extraction ソフトウェアによる数値化

【注意】

- ・ CGH+SNP マイクロアレイのスキャンデータ(.tif)の数値化には Feature Extraction ソフトウェア v10.10 以降が必要です。
- ・ Agilent C スキャナでスキャンした Agilent CGH マクロアレイ TIFF 画像の数値化には Feature Extraction ソフトウェア v10.5 以降が必要です。また、GenePix 4000B スキャナでスキャンされた Agilent CGH マイクロアレイの TIFF 画像を Feature Extraction v10.5 以降で数値化することができません。
- ・ Agilent B スキャナおよび GenePix 4000B にてスキャンした Feature Extraction ソフトウェア v9.5 以降が必要です。

【数値化の原理】

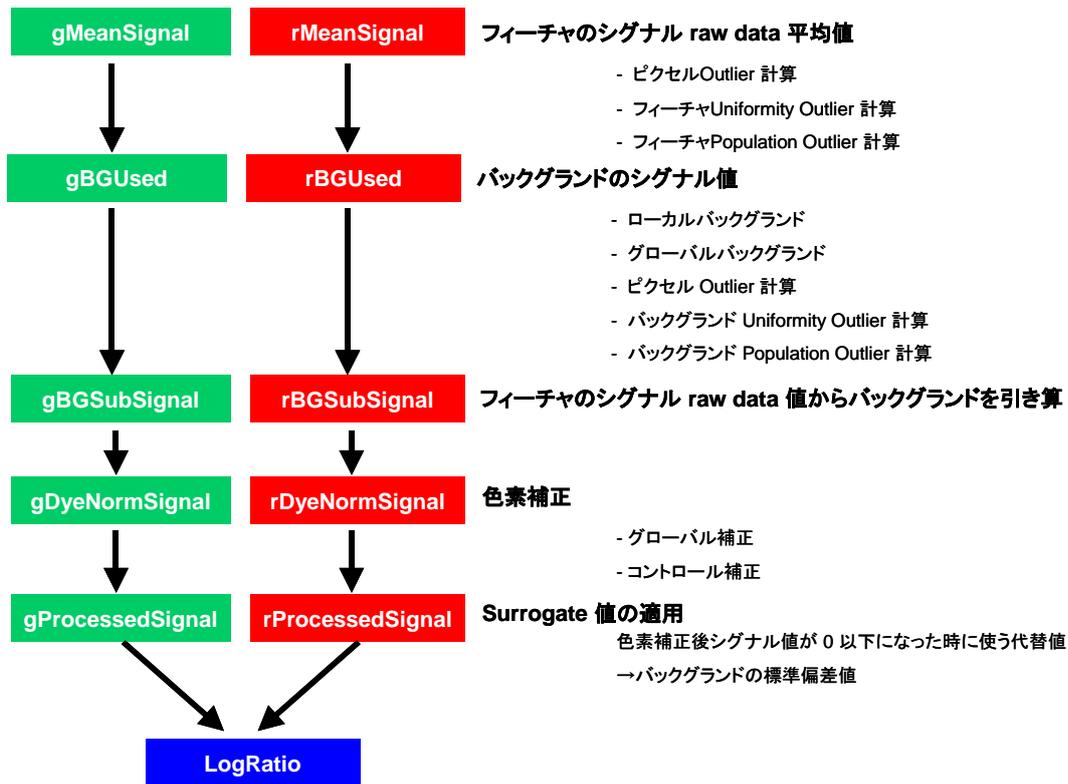
数値化により、スポットのシグナル強度、ローカルバックグラウンドのシグナル強度などが算出されます。Agilent スキャナに付属する Feature Extraction ソフトウェアはこれに加えてバックグラウンドの引き算、色素補正を行い、最終的な2サンプルの発現比(LogRatio)および統計処理されたエラー値とP値を決定します。

上記のスポット解析を行った数値データを用いて、高度なデータ解析を別のソフトウェアで行います。一番身近なものではエクセルが挙げられますが、エクセルはアレイごとの結果を解析するには適していませんが、複数アレイの結果の比較には適していません。データ解析を行うソフトウェアは数多く製品化されていますが、本トレーニングではエクセルで基本的な解析を行い数値化のアウトプットデータを理解した上で、Agilent Genomic Workbench を使ったデモを行い、さらに生物学的意義を付け加えていきます。



スポットの数値化は以下の手順で行われます。

- ① スポットのシグナル強度計算
- ② バックグラウンドのシグナル強度計算
- ③ バックグラウンド補正 ※1
- ④ 色素補正 ※2
- ⑤ 発現差計算



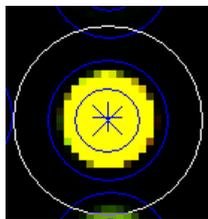
※1 バックグラウンド補正

アレイのイメージ結果によって、以下の減算法が挙げられます。

- ローカルバックグラウンド
- 全ローカルバックグラウンドの平均値
- ネガティブコントロールのバックグラウンド
- アレイイメージの最低シグナル値(スポット、バックグラウンド含む)
- スポットの最低シグナル値

ローカルバックグラウンドはスポットの周囲でプローブがスポットされていない部分になります。

例: ローカルバックグラウンドの使用



また、以下の補正法が挙げられます。

- Spatial Detrend
- Global Adjustment

現在の Agilent CGH マイクロアレイではネガティブコントロール値を Surface fit することに基づく Spatial Detrend が採用されています。

※2 色素補正

Cyanine3、Cyanine5 色素のラベル化 DNA への取り込み率の違い(色素バイアス)を解消するために色素補正を行います。色素補正は次の2つのステップから成ります。

- ① 色素補正に使うスポットの選択
- ② 色素補正法の選択

① 色素補正に使うスポットの選択には以下の4方法があります。

- Use all probes: フラグがたっていない全てのスポットで補正
Up、または Down と判定されるスポットの数が少ない場合、または Up、Down と判定されるスポットの数が同じくらいであると予想される場合はグローバル補正(全スポット)を使います。
- Use Rank Consistent Probes: Rank Consistency 法を使ってスポットを選択
基本的にはグローバル補正ですが、全スポットを使用するのではなく、スポットのなかでも Cyanine3 と Cyanine5 が central tendency に載っているスポットを選択して、補正に使用します。選択されるスポットはアレイによって異なります。
- Use List of Normalization Genes
実験系で変動がないとわかっているプローブセットがある場合は、それらに関して補正を使います。
- Use Rank Consistent List of Normalization Genes
ユーザ定義による"Normalization Genes"のなかで Rank Consistency 法を使ってスポットを選択

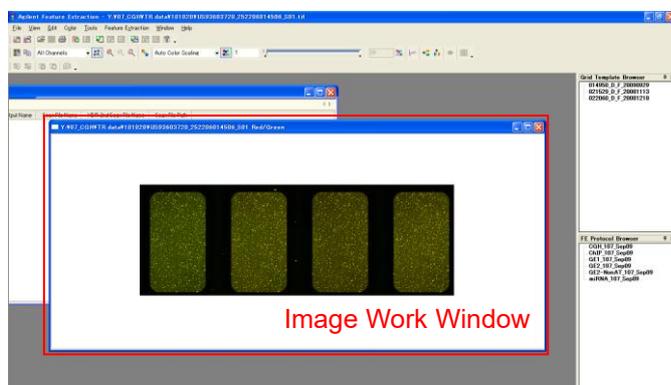
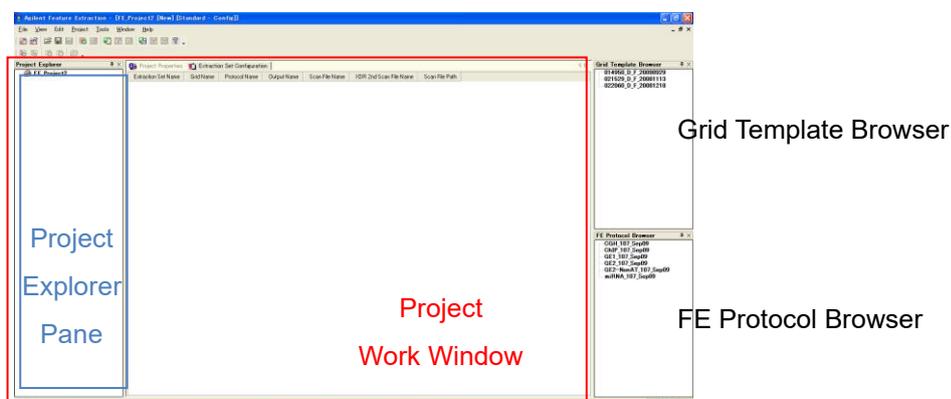
② 色素補正法には大きく分けて以下の2方法があります。

- Linear 法
バックグラウンドをひいたシグナル強度に色素バイアス係数をかけて計算します。
- Linear&LOWESS 法 (Locally Weighted Linear Regression)
Linear 法を適応した後、シグナル強度ごとに色素バイアス係数を計算します。
- LOWESS 法
シグナル強度ごとに色素バイアス係数を計算します。

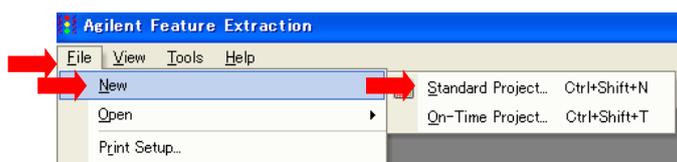
現在の Agilent CGH マイクロアレイでは Use Rank Consistent Probes により選抜された補正プローブをもとに Linear 法により色素補正が行われています。

12-1. Feature Extraction 画面(ウインドウの構成)の説明

Feature Extraction Ver.8 以降の画面は、Project Work Window(スポットの数値化の画面)と Image Work Window(イメージ確認の画面)があります。



Project Work Window が表示されていない場合は
File > New > Standard Project を選択すると表示されます



Grid Template Browser や FE Protocol Browser が表示されていない場合は
View > Grid Template Browser および FE Protocol Browser の左を選択します。

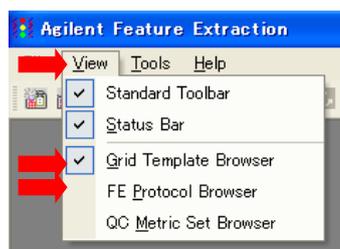


Image Work Window は、tif イメージファイル Feature Extraction で表示させるときに、画面に表示されます。

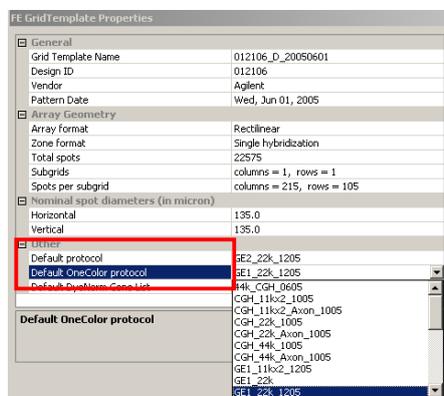
- Grid Template Browser
インストール済みの Design File または Grid File のリスト

Grid Template Browser内に、新規Design Fileを加える場合は

Grid Template Browser Pane 上で右クリック→Add...を選択後、目的の Design File を選択して下さい。
(または、Tools > Grid Template > Add...を選択後、目的の Design File を選択)

※各 Design File に Default の **Protocol** を設定する方法

Grid Template Browser Pane に格納されている目的の Design File を選択します。左ダブルクリック(または、Tools > Grid Template > Properties を選択)後、FE Grid Template Properties の window が開きます。FE Grid Template Properties window 内の Other に含まれる Default Protocol、Default One Color Protocol から適切な Protocol を選択します。



- FE Protocol Browser
各数値化ステップのアルゴリズムのパラメータを含む、アプリケーションごとのファイル。ダブルクリックで開いて変更・保存可能。

FE Protocol Browser内に、新規Protocolを加える場合

FE Protocol Browser Pane 上で右クリック → Import...を選択後、目的の Protocol を選択して下さい。
(または、Tools > FE Protocol > Import...を選択後、目的の Protocol を選択)

※Agilent カタログアレイの Design File、Agilent が推奨している Default 設定の Protocol は、Feature Extraction 9.5 をインストールする際に、自動的にインストールされます。しかしながら、最新版の Design File、Agilent が推奨している Default 設定の Protocol は更新される場合があります。最新版 Design File、Protocol は後述の弊社 Web サイト Sure Design からダウンロード可能です(p.85)。

12-2. Agilent Feature Extraction ソフトウェアによる数値化

Step 1— Feature Extraction ソフトウェアの起動

Project Work Windowを以下の方法で立ち上げて、スポットの数値化を行っていきます。

- デスクトップのFeature Extractionショートカット  をダブルクリックします。このショートカットは Feature Extraction ソフトウェアをインストールした時に自動的に作成されます。
- Start>Programs>Agilent-Life Sciences>Feature Extraction からソフトウェアを開始させます。

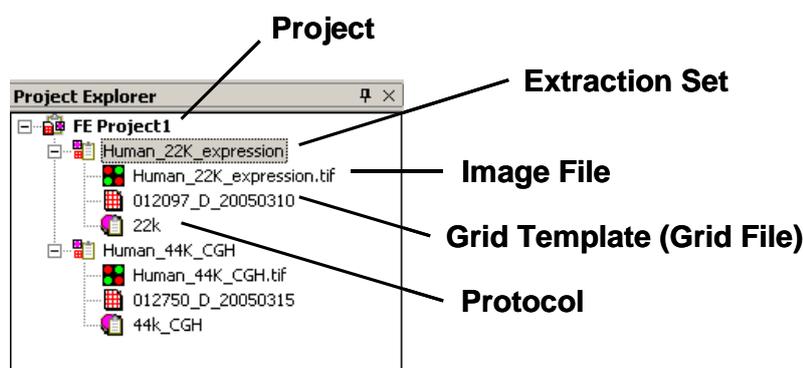
Step 2—FE projectへ数値化するイメージ(.tif)を追加

1. ツールバーにあるAdd New Extraction Set(s)のアイコン  をクリックします。あるいは、Project Explorer内で、右クリックをします。そして、Add Extraction...を選択します。

2. tifファイルを選択して、Openをクリックします。複数のファイルを指定するときには、ShiftまたはCtrlキーを押しながら選択します。

※XDR設定でスキャンしたtif画像は、2種類(1stおよび2nd)のScan Fileがイメージファイルとして認識されます。その際、1stおよび2ndのScan Fileが、同一フォルダ内に存在する必要があります。

3. Project Explorer内のProject下の階層にExtraction Setが、さらにExtraction Set下の階層にImage File、Grid Template(あるいはGrid File)、Protocolが現われることを確認して下さい。必要に応じて、適切なGrid TemplateとProtocolを選択してください。



Project : Feature Extraction の Run 設定全体をまとめた情報です。1 つ以上の Extraction Set から構成されています。

Extraction Set : 解析する tif 画像ごとに作成されます。Image File、Grid Template (Grid File)、Protocol から構成されています。

Image File : 解析対象のマイクロアレイ画像のことです。

Grid Template (Grid File) : Grid 情報です。Agilent アレイのお客様は、Design File を意味します。

Protocol : イメージの数値化の際、適用する解析アルゴリズムの設定です。

Step 3—Project PropertiesおよびExtraction Set Configurationタブシートでの設定および確認

1. Extraction Set Configuration タブシートの確認をします。

- Extraction Set Configurationタブシートを選択。

Extraction Set Configurationタブシート

Extraction Set Name	Grid Name	Protocol Name	Output Name	Scan File Name	XDR 2nd Scan File Name	Scan File Path
US45102874_25120974_D_20060331	D_20060331	GE1-v1_91	US45102874_25	US45102874_2512	<None>	C:\Ando\GE T
US45102874_25120974_D_20060331	D_20060331	GE1-v1_91	US45102874_25	US45102874_2512	<None>	C:\Ando\GE T

- Extraction Setで用いる構成(イメージ、Design File、Protocolなど)を設定、確認します。

※Protocol は

Feature Extraction v 9.1の場合: CGH-v4_91

Feature Extraction v 9.5の場合: CGH-v4_95_日付

Feature Extraction v 10.5の場合: CGH_105_日付

Feature Extraction v 10.7の場合: CGH_107_日付

Feature Extraction v 11.5の場合: CGH_1105_日付

Feature Extraction v 12.0の場合: CGH_1200_日付

を選択して下さい。最新のDesign FileおよびProtocol入手方法はp.80, 81をご参照ください。

プルダウンメニューに適したDesign Fileがない場合、まずDesign FileをGrid Template Browserに追加して(p.76)再度プルダウンメニューから選択してください。最新のDesign FileはeArrayから入手可能です(p.85)。もしくはGrid Template Browserの枠内で右クリックをして、Online Updateを選択することでも可能です(アップデート完了までに若干時間がかかります)。

2. Project Properties タブシートでの設定確認、および設定を行います。

- Project Propertiesタブシートを選択する、あるいは、Project Explorer内の解析に用いるProjectをダブルクリック。
- Projectの設定を確認、変更をします(解析結果ファイルのOutputフォルダの設定、結果としてOutputするファイル種類の設定など)。

Project Propertiesタブシート

Property	Value
Operator	Unknown
Number of Extraction Sets Included	0
Outputs	Local file only
MAGE	Local file only
SPEC	Local file only
TEXT	Local file only
Output Package	Full
Visual Results	Local file only
Grid	Local file only
QC Report	Local file only
FTP Send TIF File	False
Local File Folder	True
Same As Image	True
Results Folder	
Automatic Protocol Assignment	Grid Template Default
Highest Priority Default Protocol	Grid Template Default
Project Default Protocol	
Automatic Grid Template Assignment	False
Use Grid file if available	False
QC Metric Set	
External DyeNorm List File	
Overwrite Previous Results	False

- 出力方法の設定

出力方法は以下の4つから選択することができます。

None (出力しない)
Local file only (ハードディスクに出力する)
FTP send only (外部にファイルを転送する)
Both local file and FTP send (両方に出力する)

本実習では、TEXT、Visual Results、QC Reportの結果を出力します。これらの項目の設定を、Local file onlyと選択します。また、それ以外の項目(MAGE、JPEG、Grid)は、Noneを選択します。

- 出力ファイルの設定

<u>MAGE</u>	アレイの結果をXML形式で出力。解析にロゼッタ社のリゾルバー/ルミネーターを使用する場合、Array Expressにデータを転送する場合などに必要。
<u>JPEG</u>	各アレイ画像をJPEG形式で出力。この画像ファイルからは数値化はできないので注意。
<u>TEXT</u>	アレイの結果をタブ区切りテキスト形式で出力。解析にGeneSpring、エクセルなどを使用する場合に必要。 ※TEXTファイルのOutput設定は、以下のOutput Package設定が可能です。 Full :数値化項目全ての結果を出力します。 Compact :数値化項目の一部(通常、データ解析に用いられると考えられる項目)の結果を出力します。Fullに比べ、約1/3のファイルサイズとなります。 GeneSpring, DNA Analyticsを使用する場合はCompact推奨。
<u>Visual Results</u>	数値化結果のTIFF画像へ重ね描きするのに必要な.shpファイルを出力。
<u>Grid</u>	グリッド合わせの詳細(スポット位置情報など)をCSV形式で出力。
<u>QC report</u>	実験の成否をチェックするための項目を含んだレポートを出力。 ※QC reportはPDFファイルあるいはHTMLファイルで出力できます。 PDFファイルは”Local PDF file only”を、HTMLファイルは”Local HTML file only”を選択してください。HTMLファイルの場合は数値化後、必ずQCReport_Graphsというフォルダと同じフォルダにHTMLファイルを保存してください。

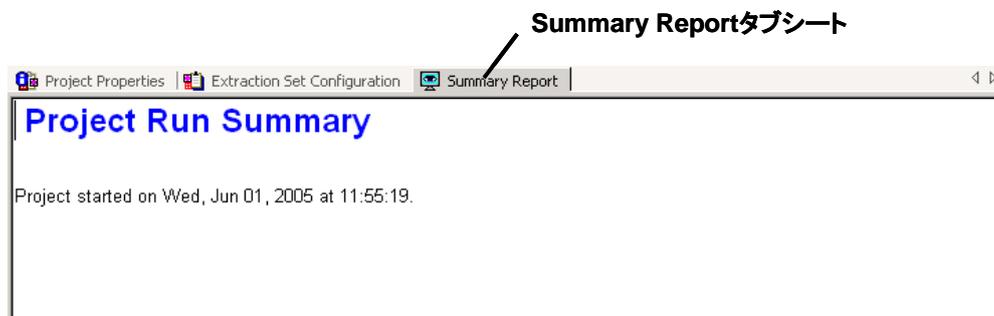
3. 設定を確認したら、Projectの保存を行います。

- File > Save As後、Save Asのダイアログ画面が出てきますので、FE Project Data Files (.fep)ファイルを保存するための適切なフォルダを選択および作成して下さい。
- フォルダ指定後、名前を付けて保存して下さい。

Step 4—Feature Extraction Projectをスタート

Project > Start Extractingを選択すると、Projectがスタートします。

スタート後、Summary ReportタブとRunning Monitorが現われます。

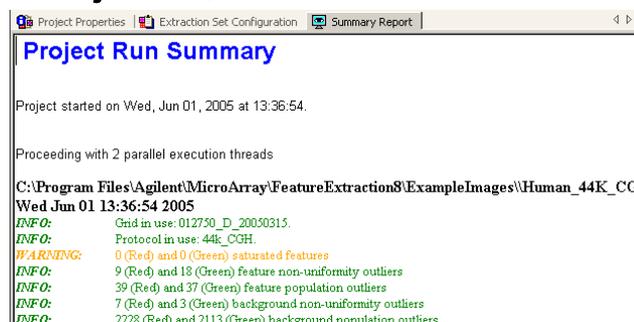


進行状況は、Running Monitorに表示されます。Project終了後、Summary Reportタブを選択していると、Project Work Windowに、Project終了を示すSummaryが現われます。

Running Monitor



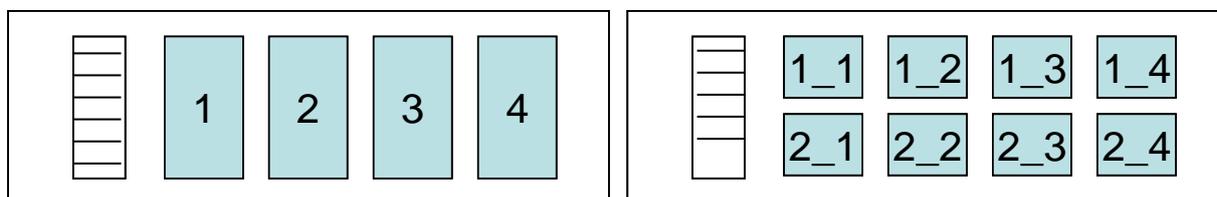
Project 終了後



※4x44K、4x180K フォーマットの出力結果は、ファイル名末尾 "..._1" ~ "..._4" の4つのデータが得られます。

8x60K、8x15K フォーマットの出力結果は、ファイル名末尾 "..._1_1" ~ "..._2_4" の8つのデータが得られます。

それぞれ、下図の位置のレイに対応しています(バーコードラベルを左側、Inactiveサイトが手前の状態)。



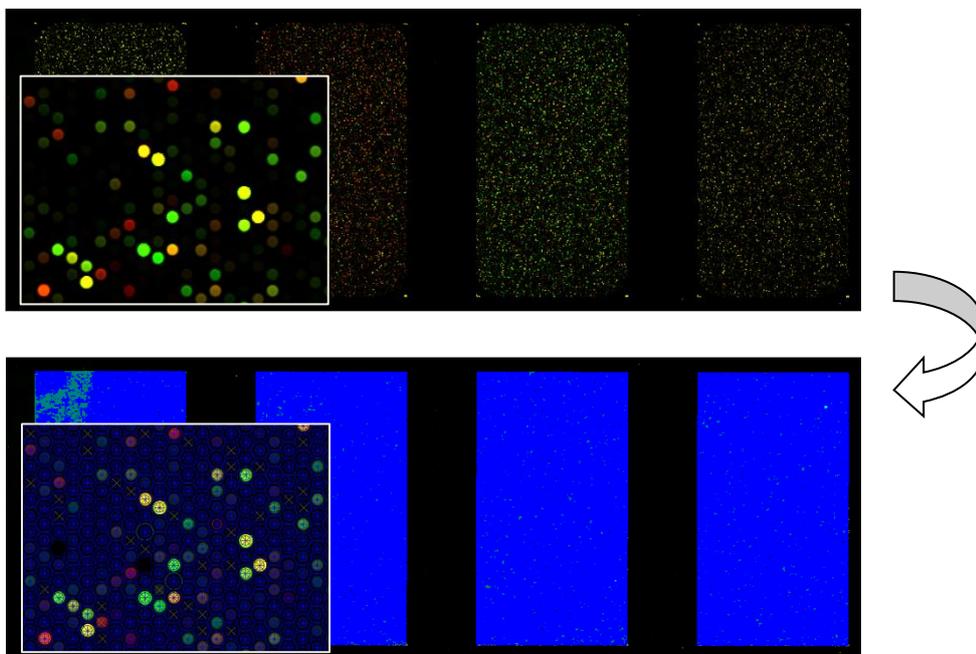
Step 5—QC Reportの確認

1. 出力された結果ファイルに、“pdf形式のQCReportファイル”があることを確認して下さい。
2. “pdf形式のQCReportファイル”を開いて下さい。QC Reportを確認することができます。

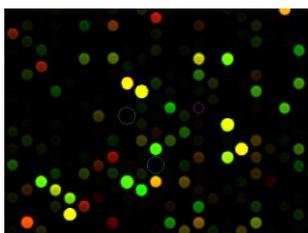
Step 6—Visual Resultの確認

Step3で選択したVisual Resultファイルを使ってフラグ等の確認をします。

1. Feature Extraction内に、画像(拡張子 .tifのデータ)を表示させます。
2. メニューバーのFeature Extraction > Load Visual Resultを選択します。
3. 該当するVisual Resultファイル(.shp)を選択します。このとき表示させている画像に対応するファイルを選択してください。
4. 画像にVisual Resultが重ね描きされます。
5. クロップモードやズームイン機能、ログスケール表示機能を使って表示を調節します。



6. View > Extraction Results からVisual Resultsの表示法を選択できます。

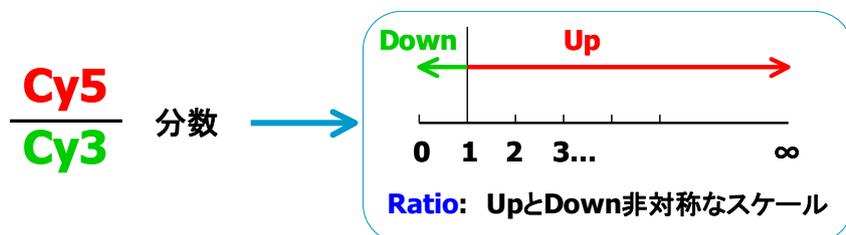


View outliers onlyにチェックを入れた状態

Help > Feature Extraction Output Quick Referenceで各リングの色が示すアウトライヤーを確認できます。

12-3. Feature Extracation の結果解析

サンプル間の発現差を求めるもっとも単純な方法は、Cyanine3 と Cyanine5 の色素強度の比 (FoldChange) になりますが、この方法では以下の図に示したように、Up と Down のスケールが非対称になってしまいます。コンピュータを用いたデータ解析を進めるためには適切ではありません。



そこで一般的に、Up と Down が対称なスケールになるように、色素強度比の対数(LogRatio)が計算されています。



フィーチャエクストラクションでは、LogRatio として底が 10 の対数(\log_{10})が用いられています。

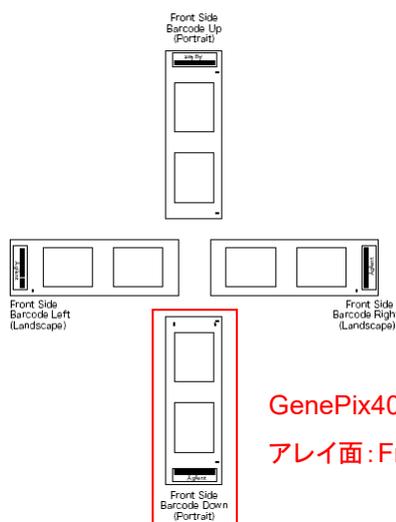
$$\text{LogRatio} : \log_{10} \frac{\text{Cyanine5色素強度}}{\text{Cyanine3色素強度}}$$

12-4. Feature Extraction 由来のフラグ

- コントロールスポットの排除: **ControlType**→0にします。
Agilent コントロールは1または-1、SNP プローブは-15000
- サチュレーションのフラグ: **glsSaturated**、**rlsSaturated**
サチュレーションしたスポットは1、していないスポットは0で表示されています。
- 各種フラグ:
 - ① スポットのフラグ **glsFeatNonUnifOL**、**glsFeatPopnOL**
rlsFeatNonUnifOL、**rlsFeatPopnOL**
 - ② バックグラウンドのフラグ **glsBGNonUnifOL**、**glsBGPopnOL**
rlsBGNonUnifOL、**rlsBGPopnOL**
 - **NonUnifOL** は各スポット(バックグラウンド)内のむら、均一性をみた項目です(1がフラグ、0がフラグのたっていないスポット)。
 - **PopnOL** はあるプローブが複数アレイにプリントされている場合、それらのプローブスポット間で均一性があるかをみる項目です(1がフラグ、0がフラグのたっていないスポット)。
- バックグラウンドと有意差がないシグナルスポットのフラグ:
両側 t 検定により有意差判定を行います。
glsPosAndSignif、**rlsPosAndSignif**
シグナルが有意である場合は1、差がない場合は0で表示されています。
- ある閾値よりも低いシグナルスポットのフラグ:
BGSubSignal の値が、バックグラウンドの標準偏差*を各アレイフォーマットの最適値倍(2.6 あるいは 13xBGSD: 低密度フォーマットは 2.6、高密度フォーマットは 13 が Default)した値よりも大きい小さいか、で判定を行います。
*標準偏差は、1)低密度フォーマット:ピクセルレベルのばらつきを考慮した値、2)高密度フォーマット:エラーモデルから算出された値を用いております。
glsWellAboveBG、**glsWellAboveBG**
(このクライテリアよりもシグナルが高い場合は1、低い場合は0で表示されています)。
glsPosAndSignif、**rlsPosAndSignif**よりもクライテリアが高くなり、カットオフされる低シグナルのスポット数が多くなります。

13. マイクロアレイのレイアウト・デザインファイル

デザインファイルには、アレイの各プローブの位置情報(レイアウト)やアノテーション情報が含まれております。このデザインファイルは、アジレント社製 DNA マイクロアレイスキャナで読み取った向きを基準として作成されております。アジレント社のスキャナはアレイ面を裏側(Back side)から、またバーコードを左位置で読み取るので、ほとんどの他社製品のスキャナで読み取ったイメージと向きが異なります。数値化データとプローブ情報を組み合わせる際には、お使いのスキャナの読み取り方向にあわせて並び替えたデザインファイルをお選び頂く必要があります。並び変えたデザインも Sure Design からダウンロードいただけますので、次の点をよくご確認の上、適切なデザインファイルをお使いください。



GenePix4000B のスキャンの向き(バーコード: bottom、アレイ面: Front side、Scan: Portrait)

- 1) アレイの表側 (front side)スキャンしているか。(Agilentの文字がある側が表側)
- 2) 得られたイメージ画像が、スライドグラスを横方向(landscape)にスキャンしたものか。縦方向(portrait)にスキャンしたものか。バーコードが得られたイメージに対して、上下左右のどこに位置しているかでご判断ください。

Design File名には、Design ID (アレイの種類を示します)とファイル更新日の情報が含まれております。

Design File名の例: 014693_D_20070207

Design ID 更新日

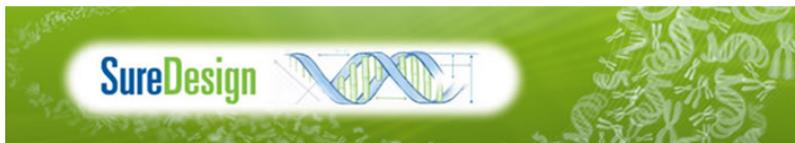
なお最新のデザインファイルは Sure Design から入手可能です。

14. SureDesign

最新のデザインファイルは SureDesign から入手可能です。

- SureDesign 紹介サイト <http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002474>

SureDesign の登録方法やデザインファイルダウンロード方法などのマニュアルダウンロードサイト



カスタムデザインをより簡単に。

SureDesign は、SureSelect や HaloPlex のカスタムデザインを設計するための無償のウェブツールです。研究に最適なカスタムデザインを簡単に迅速に設計いただけるように開発しました。カタログ製品の情報もダウンロードいただけます。SureDesign へのログイン、登録は[こちら](#)。

ログインサイト

【お知らせ】

2013年11月19日より、SureDesignからCGH, ChIP-on-chip, DNAメチレーションの各マイクロアレイのデザインを作成して頂けるようになりました。

SureDesign の資料

◆ SureDesignの使い方

■ SureDesign 概要

SureDesign とは / 機能紹介 / ご利用について / 運営法

■ SureDesign の登録法

登録の前に / 登録法 / 各タブの説明

■ カタログ製品各種ファイルダウンロード法

2種のファイルダウンロード法 / Favorites 設定

■ コラボレーションスペース

ご利用前に / Collaboration スペース作成 / デザインの移動 / Member の確認

■ 購入方法

見積もり依頼 / オーダー

SureDesign の登録方法

デザインファイル等のダウンロード方法

◆ アレイ CGH

- CGHマイクロアレイ [カスタムマイクロアレイ作成ガイド](#)

- Sure Design ログイン <https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>



15. Feature Extraction 用 Protocol のダウンロードサイト

弊社スポット数値化ソフトウェア、Feature Extraction によるスポットの数値化を行う際、イメージの数値化に適用する解析アルゴリズムを設定した **Protocol** ファイルが必要です。

Agilent が推奨している Default 設定の **Protocol** ファイルは、下記のサイトからダウンロードが可能です。

<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=2037>

Download Protocols - Feature Extraction Software

How to load Feature Extraction protocols

1. Download the desired protocols
2. Unzip the protocols
3. Start Feature Extraction
4. Go to the Tools menu, Feature Extraction protocol submenu, import submenu
5. Select the unzipped protocol files to import

Download the current version of protocols

Version 12.0	Protocol Use	Protocol Revision Table
------------------------------	------------------------------	---

Archives

Version 11.5	Protocol Use	Protocol Revision Table
Versions 10.7.1 and 10.7.3	Protocol Use	Protocol Revision Table
Version 9.5.3	Protocol Use	Protocol Revision Table

※ 2015 年 10 月現在、上記の **Protocol** のダウンロードが可能です。

※ プロトコルファイルは、最新のものではなく、お使いの **Feature Extraction Software** と一致したバージョンをお使い下さい。

※ 各 Protocol の詳細は、Protocol Use のリンク先をご参照下さい。

16. Agilent 社の DNA マイクロアレイサポート用ホームページ

Agilent 社の DNA マイクロアレイサポート用ホームページでは、上記のほかにも新製品や最新プロトコル、アプリケーションノートなど様々情報を掲載しております。

<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=23129>

製品 ソリューション トレーニングとイベント サービス サポート ライブラリ お見積り

HOME > 分野別ソリューション > ゲノミクス

DEMAND PRECISION

Bring clarity to the complex. Get solutions for oncology, human and reproductive genetics, and life sciences with precision that outperforms.

ホットニュース

キャンペーン

[キャンペーン一覧](#)

NEW Agilent 2100 Bioanalyzer QC スピードアップキャンペーン
キャンペーン期間：2020年11月2日(月)～2021年1月29日(金)ご注文分まで
キャンペーン対象製品：Agilent 2100 Bioanalyzer System 型番 (G2938A/B/C, G2939AA)
*購入後 5 年以上経過

イベント

[最新のイベント情報](#)

製品

- マイクロアレイ**
 - GeneExpression
 - miRNA
 - CGH
 - 機器
- SureSelect/HaloPlex
- NEW** Magnis NGS Prep システム
- データ解析
- TapeStation
- バイオアナライザ
- リアルタイムPCR**
 - 【リアルタイム PCR (qPCR) 関連製品の販売およびサポート先の変更のご案内 (2019/08 より)】
- CRISPR/Cas
- ストラタジーン試薬**
 - 核酸の精製とサンプルの調製
 - クローニングとライブラリー
 - PCR と逆転写酵素
 - タンパク質の発現、変異導入、機能解析
 - タンパク質の分離、精製、QC
 - 細胞レベルでの解析とトキシロジー

サービス・サポート

- 受託解析サービスプロバイダー
- カスタムデザイン
 - SureDesign
 - eArray
- 実験前に必要な情報のダウンロードサイト**
- お客様専用サポートページ
- トレーニングコース**
- 論文・技術資料・アプリケーション等
- メール配信登録

17. Secure Fit マイクロアレイスライドボックスの開け方

マイクロアレイスライドは専用のスライドボックスで納品されます。ここではスライドガラスの取り出し方を紹介します。

1. 写真のようにはさみを使って真空状態のフォイルを開封し、スライドボックスを取り出します。

真空のフォイルを開封した後、未使用のスライドガラスはスライドボックスに入れ遮光し室温で、真空デシケータか窒素パージしたボックスで保管します。



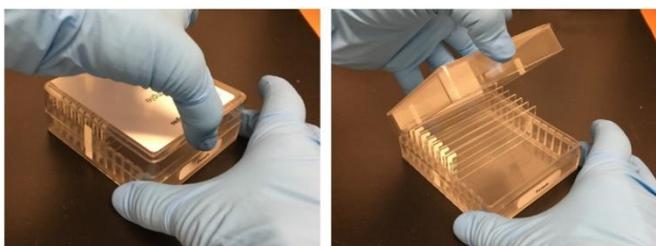
2. スライドボックスを平らな場所に置きます。ふたを開ける前に、片手で箱のふたを抑えながら箱側面のシールテープをカッターなどで切ります。



3. 片方の手で、スライドボックスの箱部分の側面のくぼみをしっかりと持ちます。



4. もう片方の手でふたを持ち静かに持ち上げます。



18. トラブルシューティング

■ OD260/230、OD260/280 の値が低い

OD260/230 の値が低い場合、塩や有機溶媒などが混入している可能性があります。OD260/280 の値が低い場合、タンパク質の混入の可能性があります。いずれの場合にも Specific activity が低くなる可能性があります (specific activity については p.41 参照)。

推奨操作

- DNA を Qiagen DNeasy プロトコルで再精製する (p.20~参照)。この再精製操作には Proteinase K 処理も含まれます。
- Phenol/chloroform 法による DNA 抽出が必須の場合、有機層の表面の近くを回収しないよう気をつけてください。
Phenol は 270-275nm で最大吸光度を示します。DNA の定量に用いられる 260nm に近いことより、Phenol の混入から DNA の品質が高く見積もられることが起こり得ます。
- Spectrophotometer で測定するとき、正しい buffer でキャリブレーションしてください。

■ DNA に RNA が残存している

ラベル化に用いる DNA の量は experiment と reference を同じにすることが重要です。RNA の吸収波長は DNA と同じであるため、RNA が混入しているサンプルの DNA 濃度を UV で正しく測定することは困難です。

推奨操作

- DNA を Qiagen DNeasy プロトコルで再精製する (p.20~参照)。この再精製操作には RNase A 処理も含まれます。

■ DNA が分解している

1~1.5%アガロースゲル上で、分解していないゲノム DNA はコンパクトな、高分子量のバンドとして検出されます (低分子量領域へのスミアバンドは検出されない)。DNA の分解はラベル化に影響します。

推奨操作

- DNA を 1~1.5%アガロースゲル電気泳動で確認します。DNA が分解している場合は Qiagen DNeasy プロトコルで再精製してください (p.20~参照)。
 - 制限酵素反応を省く操作の場合、98°C で加熱しすぎないようにします。誤った温度や加熱時間、蒸発 (ふたが加熱されるサーマルサイクラーの使用推奨) に注意してください。熱により断片化を行ったゲノム DNA は 1000~3000 bp 程度の長さになります。
- ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 試料を使用する場合、Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis (ULS Labeling for Blood, Cells, Tissues or FFPE) Protocol v3.3 参照ラベル化に用いる DNA の濃度が高すぎる (低すぎる)

ラベル化に用いる DNA の量は experiment と reference を同じにすることが重要です。DNA に沈澱が生

じている場合や、DNA 濃度が高すぎる場合、正確に DNA の濃度を測定することが難しくなります。

また、有機溶媒や RNA などの混入物は、260nm に吸収をもつため、DNA 濃度の正確な測定を困難にします。

推奨操作

- ピペティングにより、ゲノム DNA が完全に溶解していることを確認します。37°C で 30 分間の加熱も有効です。ゲノム DNA の濃度が 350 ng/ μ L 以上の場合、Nuclease-free 水などにより2倍に希釈し、再度測定してください。
- DNA の精製方法が異なると、異なる定量アーチファクトを生じることがあるため、Experimental と Reference サンプルが違うソースから精製されている場合にアッセイノイズのリスクが高くなります。DNA の濃度を 2 種類以上の異なる方法で測定することをお勧めします。例えば Spectrophotometer (例 NanoDrop) で測定している場合は、二本鎖 DNA 検出する蛍光分析法 fluorometer (例 Qubit) でも測定することをお勧めします。
- 必要に応じて DNA を Qiagen DNeasy プロトコルで再精製してください(p.20~参照)。

■ Specific activity が低い場合(サンプルの品質には要因がないことが予測される場合)

Specific activity (p.41 参照)が低い場合、ラベル化反応に要因がある可能性があります。(Cyanine dUTP の劣化(繰り返し凍結融解など)、酵素の劣化(長時間の室温放置など)、異なった反応温度や時間、容量、ラベル化の際の過剰な露光 など)

推奨操作

- 融解後の Cyanine dUTP は4°Cで保存してください。酵素は使用の際は必ず氷上に置き、使用後は速やかに-20°Cに保存してください。
- 反応温度を再度ご確認ください。
- ヒートブロックを使用している場合、熱伝導を良くするため、予めチューブをセットする穴に少量の水を入れてください。

■ ラベル化 DNA の yield が低い場合(サンプルの品質には要因がないことが予測される場合)

ラベル化ステップで Random Primer, Exo-Klenow Fragment, dNTP 等が添加されているか確認して下さい。

ラベル化 DNA の Clean-up 操作でサンプルが失われている可能性があります。

推奨操作

- p.39~に示された方法によりラベル化 DNA を Clean-up してください。(推奨以外の精製カラムでは短い fragment が失われることがあります。)
- カラム不良の可能性があります。万が一のため clean-up 終了後の UV 測定の結果を確認するまで、column の through 画分の保存を推奨します。必要に応じて、新しい column を用いて through 画分からの再 clean-up をご検討ください。

■ Signal が低い場合（ラベル化には問題ない場合）

洗浄またはハイブリダイゼーションの stringency が高すぎる、もしくは Cyanine 5 シグナルの分解が予想されます。

Cyanine 5 シグナルの分解は、環境・ラボ内機器などからのオゾンもしくは窒素酸化化合物により起こることがあります。Cyanine 5 シグナルの分解により、マイクロアレイ feature のふちの red シグナルが低くなり、Cy5/Cy3 Positive ratios に勾配が生じ、Cy5/Cy3 Negative ratio が増加します。特にスライドの左側ほど、また同時にスキャンしたアレイスライドセットのうちあとにスキャンしたものほど、上記の現象がみられません。

推奨操作

- ハイブリダイゼーションオープンの温度が 67°Cであることを確認して下さい。必要に応じてハイブリダイゼーションオープンの校正を実施して下さい(p.48 参照)。
- 洗浄 2 の温度が 37°Cであることを確認して下さい。
- 洗浄 1 のかわりに間違えて洗浄 2 が使われていないか確認して下さい。
- 低オゾン濃度 (<5ppb) の環境において洗浄・スキャンを行ってください。(例 オゾン除去フィルタの採用)。
- オゾン除去フィルタの採用が難しい場合、Stabilization and Drying Solution を使用する。かつ1度に処理するスライドの数を少なくし、空気にさらされる時間を極力短くする。(約 40 分以内)

■ BGNoise が高い場合

BGNoise が高いと、signal-to-noise 値が低くなり、DLRSD 値が高くなることがあります(p.73 QC metrics 参照)。BGNoise はネガティブコントロールの Background-subtracted シグナルの標準偏差を表しています。BGNoise が高い場合は、アレイの TIFF 画像で non-uniformity な現象がみられていないか確認してください。多くは洗浄操作に起因します。

推奨操作

- ハイブリダイゼーションオープンの温度が校正されていることを確認して下さい(p.48 参照)。
- 洗浄に用いる器具類(スライドラック・スライド洗浄ガラス容器・回転子・超精密ピンセット)が清潔であることを確認して下さい。水道水で洗浄する場合は、その後水道水が残らないように Milli-Q ultrapure water でよくすすいでください。洗浄の際、洗剤を使用しないでください。また必要に応じて、アセトニトリルによるリンス後、Milli-Q ultrapure water で十分にすすぎます。(洗浄の方法は p.58 参照)

■ 再現性が低い場合

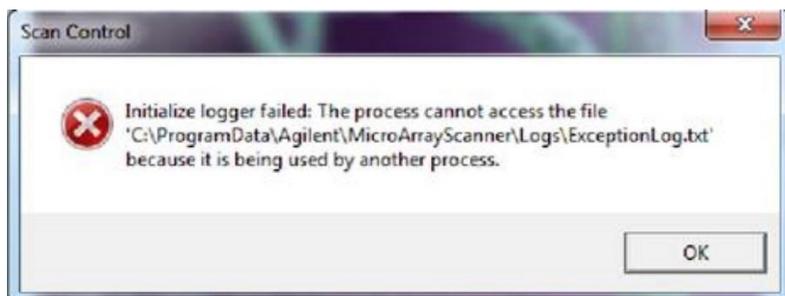
QC Metrics の Reproducibility 値(p.73 QC metrics 参照)が高いことは、マイクロアレイ上の繰り返しプローブのシグナルの CV 値が高いことを示し、ハイブリダイゼーションの容量が少なすぎることや、ハイブリダイゼーションの際にハイブリダイゼーションオープンの回転が途中で停止していることが考えられます。この数値が非常に高い場合、DLRSD に影響します。

推奨操作

- ハイブリダイゼーションチャンバの組み立ての際(p.48)、ハイブリダイゼーション溶液をゆっくり吸うように気をつけてください。
- ハイブリダイゼーションオープンの回転を確認してください。

■ SureScan で 'Initialize logger failed' のエラーが出た場合

SureScan の場合、スキャンコントロールソフト を立ち上げた際に以下のエラーメッセージが出て、スキャナ本体と通信できない事がありますが、次の手順でエラーを解消することができます。



1. 上記のエラーメッセージの OK を押します。
2. スキャンコントロールソフトで Tool > Log files と選択し、ログファイルのフォルダを開きます。
3. スキャンコントロールソフトを終了し、装置の電源もオフにします(PC の再起動は必要ありません)。
4. 上記 2 で開いたフォルダ、C:\ProgramData\Agilent\MicroArrayScanner\Logs 中にある、ExceptionLog.txt というファイルをデスクトップなど別のフォルダに移します。
5. 再度、スキャナ本体の電源をオンにし、スキャナ右上の LED ランプが黄色に点灯し消灯後、スキャンコントロールソフトを立ち上げてください。
6. 移動した ExceptionLog.txt は元の場所には戻さず、破棄して下さい(スキャンコントロールを立ち上げた際に Log のフォルダには既に新しい ExceptionLog.txt が作成されています)。

Cドライブ中に ProgramData がない場合、ProgramData が隠しファイルになっていますので、下記の方法で表示ください。

【Windows 7】

- a) スタートメニューから [Control Panel] を選択
- b) [Appearance and Personalization] を選択
- c) [Folder Option]を選択
- d) [Folder Option] ダイアログが表示されるので、[View] タブを選択
- e) [Advanced Settings] の[Hidden files and folders]の中で [Show hidden files, folders, and drives] を選択し、apply

【Windows 10】

- a) スタートメニューから Explore を選択、またはスタートメニューを右クリックし File Explore を選択
- b) 現れた Explore ウィンドウで View タブ を選択
- c) File name extensions および Hidden items にチェックを入れる

Copyright Agilent Technologies 2015

すべての権利は留保されています。著作権法で認められている場合を除き、本書を許可なく複製、改作、翻訳することは禁止されています。

本和文操作実習テキストの著作権は全て Agilent Technologies, Inc.が所有しています。

ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

本書は、内容について細心の注意をもって作成いたしました。万が一不審な点や誤り、記載もれ等、お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザーの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

本キットの本来の用途以外の使用に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

本プロトコルに以外の方法または試薬を用いたことによる性能上のトラブル、損害。

分析結果に基づく損失

本書の内容の一部または全部を無断で複製、転載したり、他の言語に翻訳することは法律で禁止されています。複製、転載などの必要が生じた場合は、当社にお問い合わせください。

本製品パッケージとして提供した本マニュアル等の媒体は本製品用にだけお使いください。

保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

Agilent Technologies は、本品に関していかなる保証も行いません。これには暗黙の保証、または商品性および特定目的への適合性が含まれますが、それらに限定されません。

Agilent Technologies は、本書に含まれている誤植、あるいは本品の性能、または使用に関する偶発的ないし間接的な損害に関して責任を負いません。

マイクロアレイに関するサポートお問い合わせ窓口

Tel : 0120-477-111

E-mail : email_japan@agilent.com

***DNAマイクロアレイのテクニカルな質問と明示ください。**

***価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。**