

アジレント

Low Input Quick Amp **WT** Labeling Kit

実験プロトコル 1 色法対応

Exon マイクロアレイ

原核生物マイクロアレイ



Agilent Exon マイクロアレイ:1x1M、2x400K、4x180K、8x60K

Agilent 原核生物マイクロアレイ:8x15K

Protocol Version 1.0_JP 対応

[2019 年 11 月改訂版テキスト]

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

Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

目次

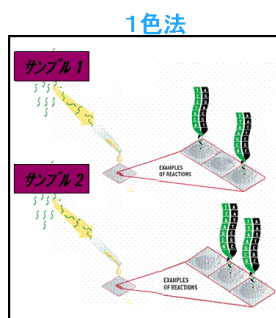
目次	2
1. はじめに	3
2. 実験に使用する Agilent キットの確認	5
3. 実験に必要な消耗品など	8
4. 実験に必要な機器・器具	10
5. 実験を始める前に	11
6. プロトコルの全体図	12
7. 実験の操作手順	14
8. 実験: 1日目	15
9. 実験: 2日目	35
10. Agilent スキャナを用いたスキャニング	40
11. ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイ画像確認	46
12. Feature Extraction ソフトウェアで数値化を行う前に	48
13. Agilent Feature Extraction ソフトウェアによる数値化	49
Appendix1 : total RNA の品質チェック	60
Appendix2 : サーマルサイクラーを用いた実験プロトコル	62
Appendix3 : 詳細なスキャナの起動手順	63
Appendix4 : Feature Extraction 用デザインファイルのダウンロードサイト	65
Appendix6 : 1 color 実験の Normalization	67
Appendix7 : マイクロアレイのレイアウト	72
Appendix8 : 弊社 DNA マイクロアレイサポート用ホームページ	73

1. はじめに

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 カストマニユース](#)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 カストマニユース配信希望」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

本操作テキストは、アジレント Exon マイクロアレイあるいは原核生物マイクロアレイを用いた 1 色法解析における、推奨ラベル化、ハイブリダイゼーション、洗浄、スキャニングと数値化の手順を記載しています。Low Input Quick Amp WT Labeling Kit, One-color（製品番号 5190-2943）は、弊社のマイクロアレイにあわせて最適化されています。他プロトコルで調製したラベル化サンプルをハイブリダイゼーションに用いた場合、問題の生じるケースがあります。その場合はサポートの対象外になりますことをご了解ください。



1 サンプル 1 アレイで、シグナル強度を測定

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、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い。

本プロトコルは Gene Expression 1 色法対応 Low Input Quick Amp Labeling Kit Protocol ver6.5 に基づいていますが、以下の点が異なります。

- Low Input Quick Amp Labeling Kit の代わりに新しい Primer を含んだ Low Input Quick Amp **WT** Labeling Kit を使用します。
- Exon マイクロアレイと原核生物マイクロアレイ、Whole Transcript labeling に対応しました。
- T7 promoter primer の代わりに WT Primer Mix を使用します。
- 必要 Total RNA 量は Low Input Quick Amp Labeling kit と異なります。
- 本プロトコルでは、cRNA の Cyanine-3 取込率推奨値は 15pmol/ug です。
- アジレントの Exon マイクロアレイは SurePring G3 フォーマットのみの製品なので、読み取りには高解像度仕様の C スキャナまたは SureScan が必要です。

原核生物マイクロアレイは本プロトコルを用いて 8x15K フォーマットでのみ実験検証を行っております。他フォーマットに関してはお問い合わせください。原核生物マイクロアレイの実験に関してはアプリケーションノート(5991-0879EN)もご参照ください。

Ver.1.0_JP での更新点

- 実験に使用する Agilent キット fragmentation buffer のチューブに含まれる内容量の記載を改訂しました。
- 必要なものリストを見やすくしました。
- ラベル化 cRNA の NanoDrop による評価の記述を簡便化しました。
- QC レポートの解像度を改善しました。
- ハイブリエイドの使い方の絵を一部修正しました。
- オープンの写真を型番 G2545A のものに変更しました。
- Appendix: FE 用 Protocol のダウンロードサイトページのリンクを修正し、「現在」の日付を 2017 年 4 月に変更しました。
- デザインファイルのダウンロード方法のリンクや情報を修正し、「現在」の日付を 2017 年 4 月に変更しました。

2. 実験に使用する Agilent キットの確認

■ Low Input Quick Amp WT Labeling Kit, one-color 24 反応分

(製品番号 5190-2943) (※本キットは、WT Primer Mix および Cyanine 3-CTP を含みます)

<内訳>

- WT Primer Mix
- Cyanine 3-CTP, 8uL (24 反応分チューブ×1 本)
- Low Input Quick Amp Labeling Kit 単品(製品番号 5190-2308、24 反応分
この製品番号の商品は WT primer, Cyanine 色素が含まれません)

Component	Volume
T7 Promoter Primer(本プロトコルでは使用しません)	24 µL
5xFirst Strand Buffer	100 µL
0.1M DTT	70 µL
10mM dNTP Mix	20 µL
AffinityScript RNase Block Mix	36 µL
5x Transcription Buffer	160 µL
NTP mix	35 µL
T7 RNA polymerase Blend	10 µL
Nuclease Free Water	250 µL

※本キットは-20℃で保存してください。

※Cy3-CTP は、開封前は-20℃、融解後は 4℃で保存してください。

※WT Primer Mix のみ、Cyanine 色素のみの販売はしておりません。

※本キットでは 25ng~100ng の total RNA から、ラベル化反応をスタートすることができます。

ただし、マイクロアレイのフォーマットにより推奨量が異なりますのでご注意ください(後述)。

※WT Primer Mix は梱包時にラベル化キットのボックスに
含まれておりません。WT Primer Mix のみが入った袋が
一緒に届くので、見落とさないようにご注意ください。

※遺伝子発現アレイ用ラベル化キット Low Input Quick Amp
Labeling Kit には WT Primer Mix が含まれません。



Exon マイクロアレイあるいは原核生物マイクロアレイの実験には必ず Low Input Quick Amp WT Labeling Kit をご使用ください。 Cyanine 色素なしのラベル化キットをお求めの場合、以下の製品をご購入下さい。

Low Input Quick Amp WT Labeling Kit, (No dye) 24 反応分

(製品番号 5190-2942) (※本キットは、WT Primer Mix を含みますが色素を含みません)

■ アジレント RNA Spike-In キット (1 カラー用) (製品番号 5188-5282)

- One-Color Spike-Mix (10 uL)
- Dilution buffer (1.2 mL)

※全ての試薬は-80℃で保存してください。

■ アジレント Gene Expression Hybridization Kit (製品番号 5188-5242)

Component	
25x Fragmentation Buffer	(400-500 uL)
2x GE Hybridization Buffer HI-RPM	(1.25mL x 2 本)
10 X Blocking Agent (凍結乾燥)	

※ 本キットは開封するまでは室温で保存してください。

※ 10x Blocking Agent を調製した後は、この試薬のみ-20℃で保存してください。

※ 本キットの使用可能アレイ数は下記のようになります。

1x1M	10 アレイ
2x400K	20 アレイ
4x180K	45 アレイ
8x60K, 8x15K	100 アレイ

※ 下記 2 つの試薬は個別に購入可能です。Gene Expression Hybridization Kit に含まれる試薬の 10 倍量となります。

2 x Hi-RPM Hybridization Buffer	(5190-0403)
10 x Blocking Agent	(5188-5281)

■ アジレント Gene Expression Wash Buffer

Gene Expression 洗浄バッファ 1 4L (5188-5325)

Gene Expression 洗浄バッファ 2 4L (5188-5326)

■ アジレント Gene Expression Wash Pack (製品番号 5188-5327)

Gene Expression 洗浄バッファ 1 (5188-5325) が 2 個、Gene Expression 洗浄バッファ 2 (5188-5326) が 1 個および TritonX-102(1.35mL のチューブ 6 本)のセットです。

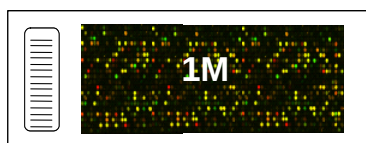
必要なソフトウェア

アレイ フォーマット	スキャナ	スキャンコントロール ソフト	Feature Extraction	GeneSpring GX
8x60K, 4x180K, 2x400K, 1x1M	C スキャナ (高解像度仕様) または SureScan	v8.4.1 以降 (SureScan は v9.1)	v10.7 以降	11.5 以降
8x15K	B スキャナ、 C スキャナ、 または SureScan	V7.0.1 以降 (SureScan は v9.1)	V9.5 以降	

アジレント マイクロアレイ

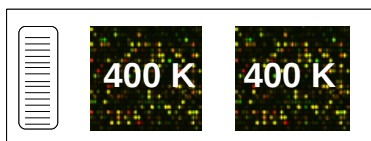


1x1M フォーマットは、
1枚のスライドグラスに1枚のアレイが載っています。



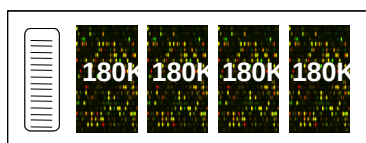
1x1M フォーマット

2x400K フォーマットは、
1枚のスライドグラスに2枚のアレイが載っています。



2x400K フォーマット

4x180K フォーマットは、1枚のスライドグラスに4枚のアレイが載っています。



4x180K フォーマット

8x60K フォーマットおよび 8x15K フォーマットは、1枚のスライドグラスに8枚のアレイが載っています。



8x60K フォーマット



8x15K フォーマット

※ アレイは室温で保存して下さい。フォイル開封後は暗所・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。

3. 実験に必要な消耗品など

アジレント Exon アレイ実験に必要な消耗品および器具のリスト(実験プロトコル Exon v1.0 対応)

(2019 年 11 月作成)

対応マイクロアレイフォーマット: 1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K

※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。

※推奨: 安定した結果を得るために推奨品の使用をお奨めします。

推奨品以外の製品を使用された場合、アプリケーションサポートの対象外になります。

※相当: 備考欄に記載された条件を満たすものなら、他製品をご使用されてもかまいません。

■消耗品 (青文字は Agilent 製品です)

問い合わせ先: アジレント・テクノロジー株式会社 (電話 0120-477-111)

用途	実験に必須	必要に応じて選択	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
total RNA の QC		○ (サンプル濃度によりいずれかを選択)	Agilent RNA 6000 ナノキット	Agilent	5067-1511	指定	1		total RNA の分解度をバイオアナライザで確認するための試薬です。Total RNA の濃度に合わせ、ナノキットおよびピコキットのどちらかをご利用ください。バイオアナライザをお持ちでない場合は、ゲル電気泳動等で total RNA の分解度を確認してください。またラベル化 cRNA の泳動にも用います。
			Agilent RNA 6000 ピコキット	Agilent	5067-1513	指定	1		
ラベル化反応・ラベル化 cRNA 精製・ハイブリダイゼーション共通	○		1.5ml 通心チューブ (Nuclease-free, 耐熱性)						RNase Free の物をお使いください。オートクレープ処理はお勧めしません。
	○		ビベット各種 (0.5ul-1ml)						
	○		ビベットチップ (Nuclease-free)			相当	適宜		使用するビベットに適合する RNase Free の物をお使いください。オートクレープ処理はお勧めしません。
	○		パウダーフリー手袋 SAFE SKIN グローブ PRE (ラベル化・ハイブリ操作に使用。パウダーフリーのものをご使用ください。)	Kimberly Clark	220	相当	適宜		S サイズ
					330				M サイズ
					440				L サイズ
ラベル化反応		○	DNase/RNase-free Distilled Water 500mL	Thermo Fisher Scientific	10977-015	推奨	適量		Low Input Quick Amp WT Labeling Kit に含まれる Nuclease Free Water が足りない場合はこちらをご使用ください。
	○ 実験手法に応じていずれかを選択		RNA Spike In Kit (1カラー用)	Agilent	5188-5282	指定	1		1色法用のスパイクイン
			RNA Spike In Kit (2カラー用)	Agilent	5188-5279	指定	1		2色法用のスパイクイン
	○ 実験手法に応じていずれかを選択	Exon 用遺伝子発現原核生物用	Low Input Quick Amp WT Labeling Kit, One-Color	Agilent	5190-2943	指定	1	24 反応	1 反応/1 アレイ、24 反応分 (Cyanine3-CTP が 24 反応分含まれます)
			Low Input Quick Amp WT Labeling Kit, Two-color	Agilent	5190-2944	指定	1	48 反応	2 反応/1 アレイ、48 反応分 (Cyanine3-CTP が 24 反応分、Cyanine5-CTP が 24 反応分含まれます)
			Low Input Quick Amp WT Labeling Kit, No Dye	Agilent	5190-2942	指定	1	24 反応	24 反応分。色素は含まれていません。
	○ 実験手法に応じていずれかを選択		Absolutely RNA Nanoprep Kit	Agilent	400753	指定	1	50 精製分	ラベル化 cRNA の精製に用います。1 ラベル化反応に 1 本使用します。推奨は Qiagen RNeasy mini kit です。
			Qiagen RNeasy mini kit	Qiagen	74104	指定	1	50 精製分	
					74106			250 精製分	
	○		エタノール (95-100%), Molecular biology grade			相当			分子生物学実験に用いる純度の高いエタノールを準備してください。
		○	99% Sulfolane	Sigma-Aldrich	T22209	指定	1		ラベル化 cRNA の精製に Absolutely RNA Nanoprep Kit を使用する場合のみ必要です。

ハイブリダイゼーション	○		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		ガasketスライドが別途必要です。
	○ フォーマット や実験数 に応じて選 択		8x15K, 8x60Kフォー マット用ガasketスライ ド	Agilent	G2534-60014	指定	1		5スライドセット
					G2534-60015	指定	1		20スライドセット
					G2534-60016	指定	1		100スライドセット
				Agilent	G2534-60011	指定	1		5スライドセット
					G2534-60012	指定	1		20スライドセット
					G2534-60013	指定	1		100スライドセット
			2x105, 2x400Kフォー マット用ガasketスライ ド	Agilent	G2534-60002	指定	1		5スライドセット
					G2534-60009	指定	1		20スライドセット
					G2534-60008	指定	1		100スライドセット
			1x244K, 1x1M フォー マット用ガasketスライ ド	Agilent	G2534-60003	指定	1		5スライドセット
					G2534-60008	指定	1		20スライドセット
					G2534-60005	指定	1		100スライドセット
	○		Gene Expression Hybridization Kit	Agilent	5188-5242	指定	1	8x15K, 8x60K: 100アレイ分 4x44K, 4x180K: 45アレイ分 2x105K, 2x400K: 20アレイ分 1x244K, 1x1M: 10アレイ分	
	○	2 x Hi-RPM Hybridization Buffer (25ml)	Agilent	5188-5242	指定	1			5188-5242に含まれるHybridization Buffer、Blocking Agentsの大容量製品です。
	○	10 x Blocking Agents	Agilent	5188-5281	指定	1			
	○	ハイブリエイド	アジレントにお問い合わせください	HYB-100		1セット			オプションとして使用できます。ハイブリダイゼーションの際、マイクロアレイスライドをガasketスライドに乗せる作業を補助する器具です。ハイブリダイゼーション作業を安定して行うことが出来ます。

洗浄	○ Wash buffer単品 および Triton X-102、 あるいは Wash Pack のいずれ かを選択		Gene Expression Wash Buffer 1 (4L)	Agilent	5188-5325	指定	1	500 mL程度	
			Gene Expression Wash Buffer 2 (4L)	Agilent	5188-5326	指定	1	250 mL程度	
			Gene Expression Wash Pack	Agilent	5188-5327	指定	1		5188-5325が2個5188-5326が1個と Triton X-102(1.35 mL 6本)のセット
			10% Triton X-102 (50mL)	Agilent	5185-5975	指定	1		GE Wash Packをご購入の場合は添付で納品されます。
	○		Stabilization and Drying Solution (500ml)	Agilent	5185-5979	推奨	250ml程度		2色法で実験室に高濃度のオゾンが存在する場合のみ必要。オゾンフリーブースが設置してある場合は必要ありません。
	○		Acetonitrile, anhydrous 99.8%, 1L	Sigma-Aldrich	271004	推奨	250ml程度		2色法でStabilization and Drying solutionを使う際は、必要です。
	○		イソプロパノール (molecular biology grade)			相当			ガラス容器やラックなどの洗浄に用います。アセトニトリルでの洗浄も可能です。
	○		密閉容器			相当	1個		4Lの洗浄パッド2を保温することが難しい場合は、洗浄パッド2を必要量を密閉容器に移し、保温します。
	○ 操作法により、いずれ かを選択		ニトリルグローブなど			相当			事前にビーカーに入れた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、ビーカー内の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。
			フラットピンセット 33A	アズワン	7-160-13	相当	2本		マイクロアレイの洗浄ステップでニトリルグローブとフラットピンセット33Aのどちらかを使用することを勧めます。

洗浄	洗浄用ガラス容器の必要数について 1色法ではスライド解体用1個、Wash1と2用に各1個ずつ(解体用含めて計3個)、2色法でS&D溶液を使用する場合は、アセトニトリル用も含めさらに2個(解体用含めて計5個)必要です。								
	洗浄用ガラス容器のサイズについて 1回の洗浄がスライドグラス5枚以下なら小、5〜8枚なら中を選択します。								
	《スライドグラス解体用》								
	○		スライド洗浄ガラス容器 (Dish) (中)、Pyrex容器でも可	Wheaton	900301	相当	1個	1セット3個入り	ガasketスライドとマイクロアレイスライドを解体するときに使います。 Wheaton900201やPyrex等の小さな容器を使用する場合は、作業をしやすするため、ピンセット33Aも合わせて使用することをお勧めします。
	○ 1回に実験するスライドグラス枚数により大きさを選択	《一回の洗浄が5スライド以下の場合:必要なものを組み合わせて購入ください》							
		スライドラック 小 (ステンレス製)	Thermo Shandon	109	相当	1個			ガラス容器900201 (Wheaton) または 102 (Thermo Shandon) を使用してください。最大洗浄枚数は5枚です。 メーカーが販売を終了していますが、お持ちの物がありましたら使用可能です。
		スライド洗浄ガラス容器 (Dish) (小)	Wheaton	900201	相当	2個あるいは4個	1セット3個入り		スライドラック109 (Thermo Shandon) に対応しています。Wash buffer1, 2 (およびアセトニトリル, S&D溶液) に各1個ずつ使用します。
			Thermo Shandon	102	相当	2個あるいは4個	1個単位での販売		スライドラック109 (Thermo Shandon) に対応しています。Wash buffer1, 2 (およびアセトニトリル, S&D溶液) に各1個ずつ使用します。 メーカーが販売を終了していますが、お持ちの物がありましたら使用可能です。
		《一回の洗浄が8スライド以下の場合:必要なものを組み合わせて購入ください》							
		スライドラック 中 (ステンレス製)	Thermo Shandon	113	相当	1個			ガラス容器122に対応するサイズです。最大洗浄枚数は8枚です。
		スライド洗浄ガラス容器 (Dish) (中)	Thermo Shandon	122	相当	2個から4個	1個単位での販売		スライドラックは113(Thermoshandon)を使用してください。Wash buffer1, 2 (およびアセトニトリル, S&D溶液) に各1個ずつ使用します。
	《その他洗浄に必要な器具》								
	○		回転子			相当	2個あるいは4個		小Dishには3cm, 大Dishには4.5cm程度のもの。2色法の実験で、洗浄にアセトニトリルおよびS&D溶液も使用する場合は4個必要です。
	○		漏斗			相当	1個		アセトニトリルおよび S&D溶液は数回繰り返し使うことが出来ます。使用済みのアセトニトリルおよびS&D溶液を保存するために使用します。
	○		500mLの褐色または透明なガラス瓶			相当	1個		
	○		ブローワー						スライドグ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ローワーをご使用ください。
ハイブリダイゼーションおよび洗浄	○								
スキャン	○		オゾンバリアカバー	Agilent	G2505-60550	推奨			スキャン時のオゾンによる蛍光色素の褪色を軽減します。アジレントアレイおよびアジレントBあるいはCスキャンの組み合わせで使用可能です。SureScanには使用できません。

4. 実験に必要な機器・器具

用途	実験に必須	必要に応じて選択	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
total RNAのQC	○		Agilent 2100 バイオアナライザ	Agilent	お問い合わせください	相当	1		total RNAおよびラベル化cRNA確認用
	○		UV分光光度計	NanoDrop	ND-2000	相当	1		サンプル定量・純度確認用、ラベル化cRNA確認用
ラベル化反応およびハイブリダイゼーション準備	○		ヒートブロックあるいはウォーターバス (37℃、40℃、60℃、65℃、70℃、80℃)			相当	3		3つの温度を同時に使うので、ヒートブロックおよびウォーターバスを合わせて3台ご用意ください。1.5mlチューブを温めます。
	○	○	卓上遠心器	日本ミリポア	デビタンII	相当			
			アイスバケツ						
	○		高速遠心機			相当			4℃あるいは室温で13,000rpmあるいは12,000gでの遠心が可能であること。バイオアナライザを使用する場合は、室温で1,500gあるいは13,000gで遠心可能なこと。1.5mlチューブを遠心します。
	○		ボルテックスミキサー			相当			
ハイブリダイゼーション	○		ハイブリダイゼーションオープン	Agilent	G2545A	指定	1台		別途下記専用ローターが必要です。
	○		ハイブリダイゼーションオープンローター	Agilent	G2530-60029	指定	1個		最大24チャンバまで載せることができます。
wash buffer 2とガラス容器の保温	○		恒温乾燥器	SANYO	MOV-112 (U)	相当	1台		ハイブリダイゼーション開始後から二日目洗浄開始まで、Wash buffer 2 (4Lあるいは密閉ボトルに移し替えたもの)、Wash buffer 2用 ガラス容器を37度で保温します。
洗浄	○		スターラー			相当	1台または2台		スターラーおよび恒温槽付スターラーが1台ずつ必要です。恒温槽付スターラーがない場合は、スターラーは2台必要です。
		○	スターラー付恒温槽	株式会社日伸理化	SW-500NT	相当	1台		
	○		オゾンフリーブース	アズワン	2-M005-01B	推奨	1台		洗浄およびスキャン時のオゾンによる蛍光色素の褪色を防ぎます。2色法の実験には必須です。
		○	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	推奨	1台		窒素ガスボンベに装着して使用します。スライドガラスに付着したほこりを除く(ブローで代用可能)、あるいは窒素パージしてスライドガラスを保存する際に使用します。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。
スキャン	○		Agilent DNAマイクロアレイスキャナ	Agilent	お問い合わせください	指定			8x60K、4x180K、2x400K、1x1Mフォーマットのスキャンは、3umの解像度が必要です。
アレイの保存		○	スーパードライ 小型	SANSYO	59-0090 (2段タイプ)	相当	1台		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。

【マイクロアレイの保管について】

- 開封前のマイクロアレイは、室温で保存をして下さい。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。

【試薬・消耗品の保管について】

- Cyanine 3-CTP は、使用するまで-20℃以下での保存を推奨しています。一旦融解して使用を開始した後は、凍結融解の繰り返しを避けるために、開封後は4℃、遮光状態で保管してください。

【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。

5. 実験を始める前に

- ※ 必ず白衣、手袋、必要に応じてマスク、眼鏡をご着用ください。
- ※ 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。
- ※ Cyanine 3-CTP は発癌性物質を含んでいます。吸引、誤飲、皮膚への直接の接触は避けてください。
- ※ Cyanine 3-CTP は光で分解します。出来る限り光にあたらないように注意して使用してください。保管時、反応時は必ず遮光してください。
- ※ RNase 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、ヌクレアーゼフリーの溶液およびピペットチップを使用してください。
- ※ 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、十分ご注意ください。
- ※ ハイブリダイゼーションバッファには塩化リチウム(LiCl)が含まれています。

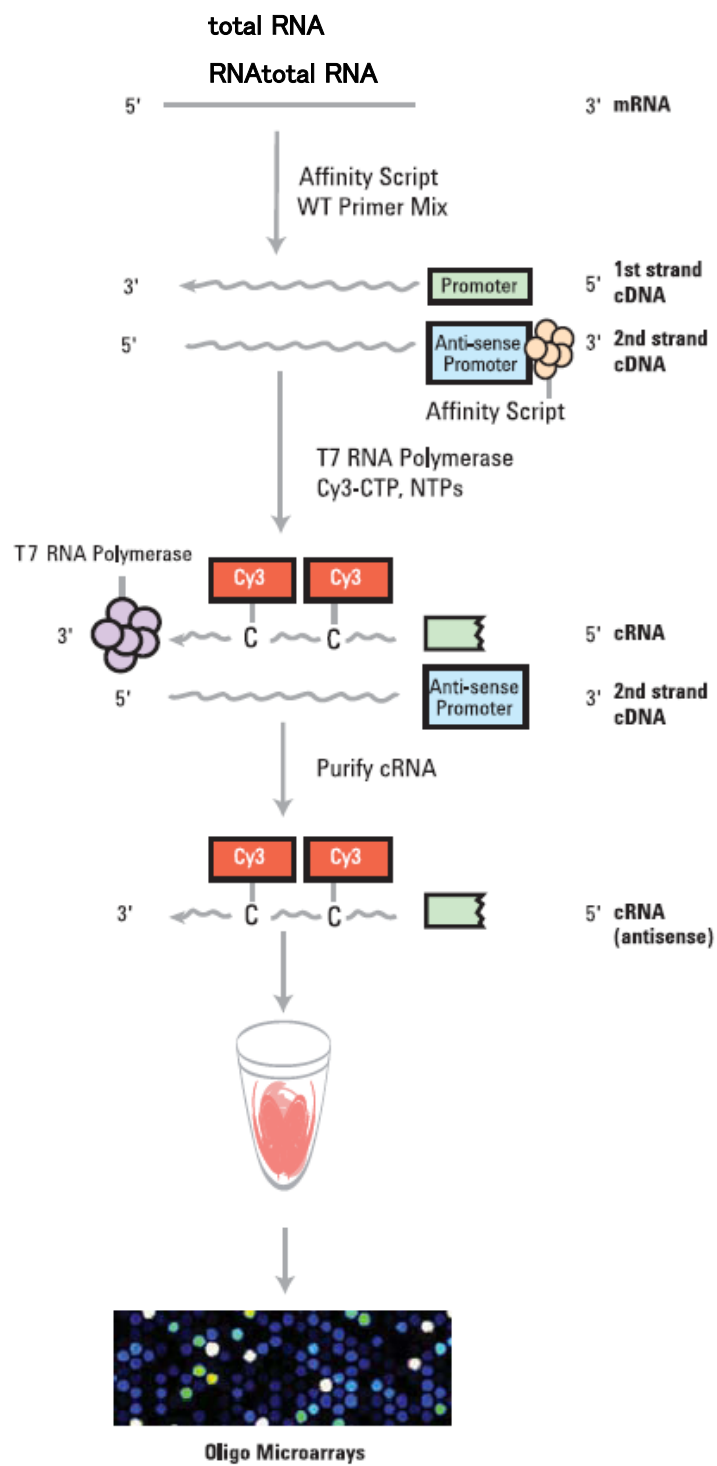
塩化リチウム(LiCl)には中枢神経系への毒性があります。催奇性があり、乳児に悪影響を与える可能性があります。不妊を誘発する可能性があります。吸入、皮膚接触、誤飲により、害を引き起こします。必ず適切な白衣、手袋、マスク、防護めがね等を着用してください。
- ※ ハイブリダイゼーションバッファにはラウリル硫酸リチウム(LLS)が含まれています。

ラウリル硫酸リチウム(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。
- ※ ハイブリダイゼーションバッファには Triton が含まれています。誤飲により害を引き起こします。また、目に入った場合深刻なダメージを与えます。

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。また、有機溶媒を含んでいますので、HPLC 廃液およびフェノール廃液と同様な廃棄処理を行ってください。

アセトニトリルは引火性と揮発性があります。吸引、皮膚接触、誤飲により肝臓、腎臓、循環器、中枢神経系害を引き起こします。
- ※ 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。

6. プロトコルの全体図



ラベル化ステップのタイムテーブル

Step	Temperature	Time
cDNA合成 155 min		
プライマーとテンプレートの熱変性	65°C	10 min
急冷	氷上	5 min
二本鎖cDNA合成	40°C	120 min
逆転写酵素の失活	70°C	15 min
急冷	氷上	5 min
cRNA合成 120 min		
cRNA合成	40°C	120 min
cRNA精製 30 min		
cRNA精製	RT	30 min

7. 実験の操作手順

1日目:実験の前準備

※ 実験を始める前に、以下のものを準備してください。

- マイクロピペッター(RNA 用) 1-10 uL, 10-100 uL, 100-1000 uL の3本
- ピペットチップ(RNA 用) 上記各サイズ対応
- チューブ立て
- 1.5 mL チューブ(RNaseFree)
- アイスボックス
- Nuclease-free water
- 96-100% エタノール
- タイマー
- ボルテックスミキサー
- パーソナル遠心機(スピンドウン用)
- 油性ペン

※ あらかじめ使用する機器の温度設定をしておきます。

- ウォーターバスを 37°C、40°Cに設定。cRNA 増幅 & ラベル化反応後 60°Cに設定
- ヒートブロックを 65°C、80°Cに設定。cDNA 合成後 70°Cに設定

● 使用する試薬を解凍しておきます。

- 酵素以外の試薬は、指定がない限り室温より高い熱をかけずにできるだけ早く溶かします。ボルテックスミキサーで攪拌し、5~10 秒スピンドウンして液を底に集めます。
- 酵素は軽くスピンドウンします。
- 全ての試薬は使用直前まで氷上においておきます。

※ 反応には、Cyanine 3-CTP (10 mM)を 1 反応あたり 0.24 uL 使用します。事前に反応数を確認し、十分な Cyanine Dye が手元にあるようにします。

8. 実験: 1日目

(必ずプロトコルを参照ください。)

8-1. One-Color Spike-Mix の調製(オプション)

Spike-In kit に含まれる Spike-Mix を Dilution Buffer で希釈し、希釈物をスタート RNA に添加します。ラベル化に用いるスタート RNA 量によって、**Spike-Mix** の希釈率が変わります。

実験に使用する total RNA は、____ng です。下記の表を参照すると、今回の希釈手順は、それぞれ、以下の通りになります。

スタート RNA 量	希釈手順				3 rd あるいは 4 th Spike- Mix の 必要量(uL)/反応
total RNA (ng)	1 st	2 nd	3 rd	4 th	
25	1:20	1:25	1:20	1:4	2
50	1:20	1:25	1:20	1:2	2
100	1:20	1:25	1:20	-	2

37°C、5 分間の加温を行い、Spike-Mix (原液)を溶かします。ボルテックスで混合し、スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。

1st : 2 uL の Spike-Mix に 38 uL の Dilution Buffer を加えます (1:20)

- ボルテックスで混合し、スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。

2nd : 2 uL の 1st 希釈液に 48 uL の Dilution Buffer を加えます (1:25)

- ボルテックスで混合し、スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。

3rd : 2 uL の 2nd 希釈液に 38uL の Dilution Buffer を加えます (1:20)

- ボルテックスで混合し、スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。

4th : ____uL の 3rd 希釈液に ____uL の Dilution Buffer を加えます (1:____)

- ボルテックスで混合し、スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。

最終希釈産物(3rd あるいは 4th 希釈液)の調製量は、1 回の実験の反応数により異なります。ピペットエラーを考慮し、必要量よりも多めに調整してください。

注意 Spike-in 量の精度を確保するため、Spike-Mix を調製する場合は、2 uL 以上の量を扱うようにしてください。

※ 調製した 1st 希釈液は、-70 ~ -80°C で約 2 ヶ月まで保存できます。さらに、8 回までの凍結融解を繰り返すことが可能です。2nd 希釈液、3rd 希釈液および 4th 希釈液は凍結融解して再使用することができないので、実験の都度調製してください。

8-2. total RNA からのラベル化 cRNA 合成

Low Input Quick Amp WT Labeling Kit は、25ng から 100ng の範囲の total RNA からラベル化 cRNA を合成することができます。

ただし

- 十分量のラベル化 cRNA を得るためには、2x400K、4x180K、8x60K および 8x15K フォーマットの場合は **50ng 以上**、1x1M フォーマットの場合は **100ng 以上** の total RNA を用いることをお勧めします。
- RNA 量は一連の実験系では揃えることをお勧めします。

※ 反応チューブにサンプル名を書いてください。

※ 1 反応あたりに使用する試薬量は 1uL 以下になるので、必ずマスターミックスを調製後、各チューブに分注してください。

各マスターミックスは、4 反応の場合は 5 反応分、8 反応の場合は 10 反応分を調製してください。

1. 1.5mL のチューブに、25ng から 100ng の total RNA を最終量が 2.3uL になるよう加えます。濃度が濃い場合は希釈してください。2.3uL を超えないようにしてください。

注意 チューブへの吸着を防ぐために、total RNA は 100ng/uL 以上で保存してください。100ng/uL 以下にする場合は、使用直前に調製しすぐ使用してください。

2. 下記表に従い **WT Primer Master Mix** を調製します。

	1反応分の必要量(uL)	5反応分(uL)	10反応分(uL)
WT Primer Mix	1	5	10
希釈したSpike Mix	2	10	20
トータル量	3	15	30

注意 Low Input Quick Amp WT Labeling Kit には、WT Primer Mix と T7 Promoter Primer が含まれています。**ここでは必ず WT Primer Mix をご使用ください**(本プロトコルでは T7 Promoter Primer は使用しません)。

3. 各チューブに **WT Primer Master Mix** を 3uL ずつ加え、ピペッティングあるいはタッピングで良く混合後、スピンドウンします。合計 5.3uL になります。
4. 65°C で 10 分インキュベーションします(熱変性)。
5. 氷で急冷、そのまま 5 分間冷却します。
6. 5X First Strand Buffer は事前に 80°C のウォーターバスで 3-4 分間温めます。ボルテックスでよく混合し、スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。使用するまで室温で置いておきます(氷上に置くと、析出する場合があります)。使用直前に再度析出物がないか確認してください。ロットによって析出し易い場合があります。室温にもどすとすぐ析出する場合は、以下の手順で溶解してください。

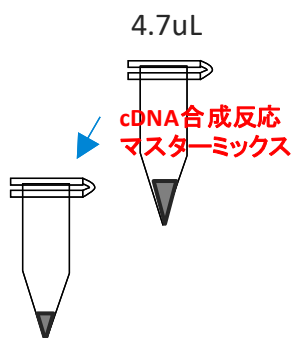
- a. 5xFirst Strand Buffer を 80℃のウォータバスで 5 分間加熱し、10 秒以上ボルテックスにかけスピンドウンします。5 分間室温におきます。
 - b. 5 分後、析出物が確認されない場合は、速やかにマスターミックスを調製します。
 - c. 5 分以内に析出物が確認された場合は再び 80℃のウォータバスで 4 分ほど加熱し、10 秒間ボルテックスしてスピンドウンします。
 - d. 室温におき、5 分以内にマスターミックスを調製します。
7. 下記表に従い **cDNA マスターミックス**を室温で調製します。ピペッティングで混合しスピンドウンします。

AffinityScript RNase Block mix は酵素の混合物です。使用直前まで氷上に置いておきます。

AffinityScript RNase Block mix を添加後もマスターミックスは氷上ではなく室温に置き、添加後すぐに使用してください。

	1反応分の必要量(uL)	5反応分(uL)	10反応分(uL)
5xFirst Strand Buffer(緑キャップ)	2	10	20
0.1M DTT(緑キャップ)	1	5	10
10mM dNTP mix(緑キャップ)	0.5	2.5	5
AffinityScript RNase Block Mix (紫キャップ)	1.2	6	12
トータル量	4.7	23.5	47

8. 氷上で冷やしていた各チューブをスピンドウンし、チューブ蓋などについた水滴を落とします。
9. **cDNA マスターミックス** 4.7uL を各チューブに加え、ピペッティングで良く混合し、スピンドウンします。総量は 10uL になります。



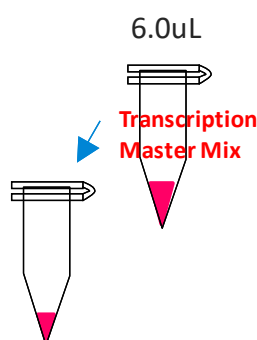
10. 40℃のウォータバスで 2 時間インキュベーションします。
11. 70℃で 15 分間インキュベーションし、酵素を失活させます。
12. サンプルチューブを氷上に移し、5 分間冷却します。
13. 各チューブをスピンドウンし、チューブ蓋などについた水滴を落とします。
- ※ ただちに実験を進めない場合、サンプルを－80℃で保存することができます。

14. 下記表の上から順に加え、**Transcription Master Mix** を室温で調製します。

T7 RNA Polymerase Blend は酵素の混合物です。使用直前まで氷上に置きおきます。T7 RNA Polymerase Blend を添加後もマスターミックスは氷上ではなく室温に置き、添加後すぐに使用してください。

	1反応分の必要量(uL)	5反応分(uL)	10反応分(uL)
Nuclease-free water(白キャップ)	0.75	3.75	7.5
5xTranscription Buffer(青キャップ)	3.2	16	32
0.1M DTT(緑キャップ)	0.6	3	6
NTP mix(青キャップ)	1	5	10
T7 RNA Polymerase Blend (赤キャップ)	0.21	1.05	2.1
Cyanine3-CTP	0.24	1.2	2.4
トータル量	6	30	60

15. 各チューブに **Transcription Master Mix** を 6uL 加え、ピペッティングで穏やかに混ぜた後、スピンドウンします。総量は 16uL になります。



16. 40℃で 2 時間インキュベーションします。

ウォーターバスあるいはヒートブロックにアルミをかぶせ、遮光してください。

※ ただちに実験を進めない場合、インキュベーション終了後サンプルを-80℃で保存することができます。

ハイブリダイゼーションを引き続き当日中に行う場合には、インキュベーション終了後、以下の設定をしておきます。

- ウォーターバスまたはヒートブロックを60℃に設定
- ハイブリダイゼーションオープンを65℃に設定(ローターを取り付けておきます)。
オープン庫内が表示温度で安定するまでに1時間~1時間半かかります。

8-3. Cyanine3-ラベル化 cRNA の精製

StratageneのAbsolutely RNA Nanoprep KitあるいはQiagenのRNeasy Mini Kitを使ってラベル化cRNAを精製します。この精製ステップにより、ラベル化の際に取り込まれなかったラベル化ヌクレオチド(モノマー)を除去することができます。モノマーが、ハイブリダイゼーション液中に存在すると、マイクロアレイのバックグラウンドの蛍光が著しく高くなります。

ラベル化cRNAの精製には、Qiagen RNeasy Mini Kitの使用を推奨します。

Stratagene Absolutely RNA Nanoprep KitはQiagen RNeasy Mini Kitに比べて溶出量が少ないので、ラベル化cRNAをより高濃度で精製することができます。少量サンプルからラベル化をスタートした場合は、Stratagene Absolutely RNA Nanoprep Kitをお勧めします。

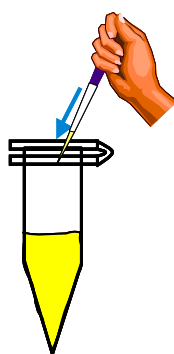
データの相互比較が必要なプロジェクト内では、精製キットはどちらかに統一することをお勧めします。

【Qiagen RNeasy Mini Kitを用いて精製する場合】

以下に記載してある手順に従って実験を進めてください(Qiagenのプロトコルを一部変更しています)。

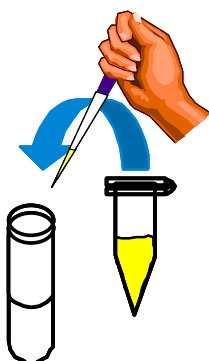
- 使用前に、**RPEバッファ**にエタノール(96-100%)を必要量加えてください。RPEバッファは次のページの洗浄ステップで使用します。調製が終わりましたら、フタのラベルのethanolの項目にチェックマークを付けてください。
- 全ての遠心のステップは、13,000rpm(10,000g)以上の回転数で行ってください。
- 遠心を**4℃**で行うことにより、cRNAの収率が上がることを確認されております。以下の遠心ステップを**4℃**で行うことを強くお勧めします。
- RLTバッファに β -メルカプトエタノール(β -ME)を加える必要はありません(β -MEが入っていても問題ありません)。

1. 84 μ LのNuclease-free waterをcRNAサンプルに加え、液量を100 μ Lにします。

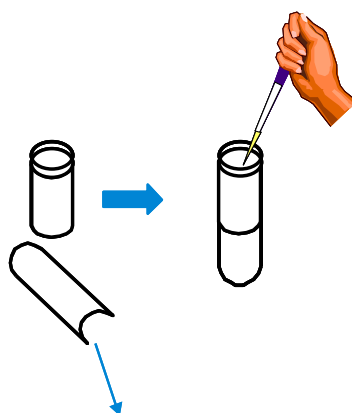


2. 350 μ Lの**RLTバッファ**を加え、混合します。
3. 250 μ Lのエタノール(純度96-100%)を加え、ピペッティングで静かに混合します。スピンドウンを含め遠心はしないでください。

4. 700 μ LのcRNAサンプルを2 mLのコレクションチューブをつけたRNeasy miniカラムに移します。カラムチューブを13,000 rpmで30秒間遠心します。カラムを素通りした液は捨てます。

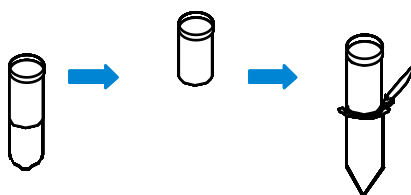


5. RNeasyカラムを新しいコレクションチューブに移し、500 μ Lの調製済みのRPEバッファ(エタノールを加えたもの)をカラムに加えます。カラムチューブを13,000 rpmで30秒間遠心します。カラムを素通りした液は捨てます。



6. コレクションチューブはそのまま使用し、再度500 μ LのRPEバッファをカラムに加えます。カラムチューブを13,000 rpmで1分間遠心します。カラムを素通りした液は捨てます。
もしカラムのフリットにRPEバッファが残っていれば、カラムを新しい1.5mLチューブに移し、13,000 rpmで30秒間遠心し、残っているRPEバッファを完全に取り除きます

7. RNeasyカラムを新しい1.5 mLチューブに移します。



8. 30 μ LのNuclease-free waterをカラムのフィルター中央に加え、1分間おきます。カラムチューブを13,000 rpmで30秒間遠心します。カラムを通った液はそのまま残します(液を捨てないように注意してください)。

9. チューブは氷上においておきます。使用済みのカラムは捨てます。回収したcRNAの濃度、収量および品質をUV測定とバイオアナライザを用いて確認します。

【Stratagene Absolutely RNA Nanoprep kitを用いて精製する場合】

事前準備

1. 80%スルフォランの調製

- a. 100%スルフォランを溶けるまで37°Cで温めます。100%スルフォランは室温で固体ですが、80%スルフォランは室温で液体のまま、最低1ヶ月は保存できます。
- b. 1mLのRNase-free水を4mLの100%スルフォランに添加し、5mLの80%スルフォランを調製します。5mLの80%スルフォランで50回精製できます。

2. 1 x high-salt wash bufferの調製

- a. 16mLの100%エタノールを1.67 x High-Salt Wash Bufferに添加します。
- b. ふたを閉め、よく振って混合します。ふたの1x(Ethanol Added)にチェックを入れます。室温で保存します。

3. 1 x low-salt wash bufferの調製

- a. 68mLの100%エタノールを5 x Low-Salt Wash Bufferに添加します。
- b. ふたを閉め、よく振って混合します。ふたの1x(Ethanol Added)にチェックを入れます。室温で保存します。

精製操作

遠心は4°Cで行ってください。

1. 100uLのLysis BufferをcRNAサンプルに加え、116uLにします。ピペッティングでよく混合し、スピンドウンします。
2. 等量(116uL)の80%スルフォランを加え、cRNAサンプルと混ざるまでボルテックスで混合し、スピンドウンします。
3. RNA-binding nano-spin cupを2mLのコレクションチューブに入れます。
4. 80%スルフォランとcRNAサンプルの混合物をRNA-binding nano-spin cupに全量移し、RNA-binding nano-spin cupにキット付属のキャップをはめます。
5. 12,000g以上で、60秒遠心します。
6. 遠心後、溶液がRNA-binding nano-spin cupに残っている場合は、素通りした液を捨て再度遠心してください。溶液が残っていない場合は、カラムを素通りした液は捨て、RNA-binding nano-spin cupをコレクションチューブに戻します。
7. 300uLのHigh-Salt Wash BufferをRNA-binding nano-spin cupに加え、キャップをはめ、12,000g以上で60秒遠心します。
8. 遠心後、溶液がRNA-binding nano-spin cupに残っている場合は、素通りした液を捨て再度遠心してください。溶液が残っていない場合は、カラムを素通りした液は捨て、RNA-binding nano-spin cupをコレクションチューブに戻します。

9. 300uLのLow-Salt Wash BufferをRNA-binding nano-spin cupに加え、キャップをはめ、12,000g以上で60秒遠心します。
10. ステップ8およびステップ9をもう一度繰り返します。
11. 遠心後、溶液がRNA-binding nano-spin cupに残っている場合は、素通りした液を捨て再度遠心してください。溶液が残っていない場合は、カラムを素通りした液は捨て、RNA-binding nano-spin cupをコレクションチューブに戻します。
12. 300uLのLow-Salt Wash BufferをRNA-binding nano-spin cupに加え、キャップをはめ、12,000g以上で3分遠心します。
13. RNA-binding nano-spin cupを新しい2mLのコレクションチューブに移します。
14. 20uLのElution BufferをRNA-binding nano-spin cupに加えます。キャップをはめ、室温で2分間静置します。60°Cに温めたElution Bufferを用いると収量が上がります。
15. 12,000g以上で5分遠心します。
16. 収量を上げたい場合、ステップ14およびステップ15を繰り返します。ただし、ハイブリダイズに必要な濃度を下回る可能性があります。
17. 溶出された液をふた付きのチューブに移します。チューブは氷上におき、回収したcRNAの濃度、収量及び品質をUV測定とバイオアナライザを用いて確認します。

8-4. ラベル化 cRNA の分析

【NanoDropによる評価】

ラベル化cRNAの収量は、total RNAの純度や質(分解度)によっても異なります。合成したcRNA量は、キュベットを使った分光光度計で測定するには少なすぎる場合がほとんどです。濃度決定に使用するRNA量を最小限に抑えるために、本プロトコルではNanoDrop分光光度計を推奨しています。

- NanoDrop のソフトウェアを起動し、“Microarray Measurement”のタブを選択します。
Sample Type は RNA-40 と選択します。
- 1 uL の Nuclease-free water で、ブランクを設定します。
- 1 uLのラベル化(増幅)cRNAを測定し、**A260**と**A550**を記録します。

- (1) NanoDrop 計測結果より、**cRNA濃度** (ng/uL)を記録します。

RNA濃度が自動算出されない分光光度計をご使用の場合、A260の値から以下の式で算出して下さい。

$$\text{cRNA conc. (ng/uL)} * = A260 \times 40 \text{ ug/mL} \times \text{dilution factor}^{**}$$

*光路長10 mmの測定器を使用した場合の式です。ご使用の機器の光路長をご確認下さい。

**希釈せずに濃度を測定した場合は、Dilution Factorは1を用います。

- (2) (1) のcRNA濃度(ng/uL)に溶出量(使用した精製キットにより30 ul あるいは20 ul)を乗じ、以下の式で**cRNA収量**を算出します。

$$\text{cRNA yield(ug)} = \text{cRNA conc(ng/uL)} \times 30(\text{uL}) / 1000$$

- (3) NanoDrop 計測結果より、**Cy3色素の濃度** (pmol/ul)を記録します。

色素濃度が自動算出されない分光光度計をご使用の場合、A550の値から以下の式で算出して下さい。

$$\text{Cy3-CTP conc (pmol/ul)} * = A550 \times 1000 \div 150 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times \text{dilution factor}^{**}$$

*光路長10 mmの測定器を使用した場合の式です。ご使用の機器の光路長をご確認下さい。

**希釈せずに濃度を測定した場合は、Dilution Factorは1を用います。

- (4) 以下の式で、**Cy3色素の取込率**を算出します。

$$\text{Cy3-CTP incorporation (pmol/ug)} = \frac{\text{Cy3-CTP conc. (pmol/ul) x1000}}{\text{cRNA conc. (ng/ul)}}$$

cRNAの収量およびCy3-CTPの取り込み率が下記基準を満たしているか確認します。基準を満たさない場合には、再度cRNAの調製をされる事をお勧めいたします。ただしスタートtotal RNA量によっては十分量得られない場合があります。

また測定した濃度から、マイクロアレイへのハイブリダイゼーションに必要な cRNA 量を計算します。アレイフォーマットによって必要量が異なるのでご注意ください。

マイクロアレイフォーマット	収量 (ug)	Cy3-CTP 取り込み率 (pmol/ug)
1x1M	5	15
2x400K	3.75	15
4x180K	1.65	15
8x60K、8x15K	0.825	15

【バイオアナライザによる評価】

- 1.5 mL エッペンチューブに 1.5 μ L のラベル化 cRNA を移します。熱変性(70°C 2分)を行い、氷上に置きます。1 μ L をバイオアナライザの測定に使用します。
- バイオアナライザでラベル化 cRNA を泳動する際は、mRNA assay を選択します。バイオアナライザのエレクトロフェログラムから cRNA の品質を確認します。



バイオアナライザの分析例

ラベル化サンプルのシグナルの大部分が、200 から 2000 塩基長のサイズ範囲に位置しているかを確認して下さい。これ以外の領域にピークの大部分がある場合、正確なデータが出ない可能性があります。データ分析時に、ツールバーのアイコン  をクリックすると、横軸の表示を秒あるいは nt に切り替えられます。

ラベル化 cRNA の保存

cRNA を直ぐに使用しない場合には、少量に分注し、暗所-80°Cで保存します。長期保存の場合は、チューブに 1 回分の分量を分注して保存して下さい。

サンプルの冷凍、解凍のサイクルを繰り返すと cRNA が分解しやすくなります。保管している cRNA の品質がわからない時は、バイオアナライザおよび UV 計で再度品質を確認することをお勧めします。

8-5. ハイブリダイゼーションの準備

増幅反応を行っている間に、次のものを準備してください。

マイクロアレイやガスケットスライド、試薬の Expire date を確認してください。古いものを使用するとノイズが上がる等トラブルが発生する可能性があります。

- アジレント Exon マイクロアレイ
- 遺伝子発現ハイブリダイゼーションキット
- ハイブリダイゼーションチャンバ
- ガスケットスライド
- ピンセット(清潔なもの)
- パウダーフリー手袋
- マイクロピペッター(RNA 用) 1-10uL, 10-100uL, 100-1000uL およびピペットチップ(RNA 用)
- 1.5 mL チューブ(RNase Free)
- チューブ立て(RNA 用)
- 高速遠心機
- ボルテックスミキサー
- アイスボックス
- タイマー
- ウォーターバス(60℃)
- ハイブリダイゼーションオープン(65℃)

使用する機器の温度設定を確認しておきます。

- ウォーターバスを 60℃に設定 (増幅反応終了後に変更します)
- ハイブリダイゼーションオープンを 65℃に設定(ローターを取り付けておきます)

庫内が表示温度で安定するまでに1時間~1時間半かかります。早めに設定をしておいて下さい。

《ハイブリダイゼーションオープン温度の校正法》

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3ヶ月に1度は確認し、0.2℃以上異なる場合は下記手順で校正してください。

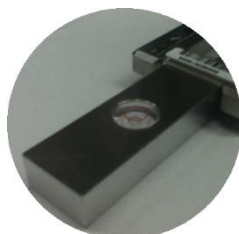
1. オープンのローターと、使用するスライド数とバランスをあわせてチャンバをセットします。
2. 温度を 65℃、回転数を 10 にセットし、温度が安定するまで3時間ほど待ちます。
3. 校正済みの温度計をセットします。温度センサー部位をとりつけます。この時センサー部位がオープンの壁につかないように、空間の温度をはかるようにして下さい。
4. 3時間程度、温度計の温度が安定するまで待ちます。
5. 実測温度と設定温度を比較し、0.2℃以上異なるようであれば、次の手順で合わせます。
6. オープンの ▲ ボタンと ▼ ボタンを同時に押し、温度表示が点滅するまで待ちます。あるいは ▲ ボタンと ▼ 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 65℃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。

8-6. マイクロアレイの取り扱い上の注意

- 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面が 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 サイドです。
- ハイブリダイゼーションを行う際は、アレイがプリントされている Active サイドに、必ず溶液をアプライするように注意してください。
- 各マイクロアレイのレイアウトやサイズなどの詳細な情報については、付録をご参照ください。
- 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。
- 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。
- ハイブリダイゼーションを行う前に、**実験机を整理整頓**して下さい。ハイブリダイゼーション器具の周りにはなるべく障害物がない状態を作ってから次ページ以降の操作を行って下さい。
- ハイブリダイゼーションは**水平な実験台**で行って下さい。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。
- 手でアレイスライドをガasket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。

※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。



8-7. ハイブリダイゼーション

8-7-1. 10x Blocking Agent の準備

1. スピンドアウンしてペレットをチューブの底に集めます。
2. Nuclease-Free Water を 0.5ml, Blocking Agent に加えます。
3. 穏やかにボルテックスをして溶解します。溶解しない場合は 37℃で 4, 5 分温めます。
4. 5~10 秒スピンドアウンし、チューブの蓋や壁についた液を集めます。
5. 調製した 10x Blocking Agent は-20℃で 2 か月間保存できます。凍結融解が 5 回以内になるように分注して保存してください。融解後は上記ステップ3、4を行って下さい。

8-7-2. ハイブリダイゼーションサンプルの準備

1. 下表に従い、Cy3 ラベル化 cRNA、10x Blocking Agent、Nuclease-free water、25x Fragmentation Buffer を 1.5 mL エッペンチューブに加え、緩やかにボルテックスをしてサンプルを十分に攪拌してください。複数のサンプルチューブがある場合は、全てのチューブにラベル化 cRNA、10x Blocking Agent および Nuclease-free water を調製し、最後に Fragmentation Buffer を各チューブに添加してください。

1 パックおよび 2 パック使用時に十分量の cRNA がない場合は、1.65ug まで下げることができます。ただし比較したいサンプル同士は同じ量をハイブリダイズに用いてください。

Fragmentation mix				
アレイフォーマット	8pack	4x180K	2x400K	1x1M
Cyanine3-labeled cRNA	600ng	1.65ug	3.75ug	5.00ug
10xBlocking Agent	5uL	11uL	25uL	50uL
Nuclease-free water	適量	適量	適量	適量
25xFragmentation	1uL	2.2uL	5uL	10uL
トータル量(マイクロアレイあたり)	25uL	55uL	125uL	250uL

8pack: 8x60K および 8x15K

2. 60°Cのウォーターバスで30分インキュベーションします。必ず遮光してください。
断片化(インキュベーション)が30分を超えない事が重要です。
3. 30分後、ただちにサンプルを氷水上に移し、1分間冷却します。その後速やかに、断片化をストップさせるため、下表に従って2XGE Hybridization Buffer HI-RPMを加えます。

Hybridization mix				
アレイフォーマット	8pack	4x180K	2x400K	1x1M
Fragmentation mix	25uL	55uL	125uL	250uL
2xGE Hybridization Buffer HI-RPM	25uL	55uL	125uL	250uL
トータル量 (マイクロアレイあたり)	50uL	110uL	250uL	500uL

4. ピペットでゆっくりと液を混合させます。泡を立てないように十分に気をつけてください。泡が発生しますので、ボルテックスは使用しないようにしてください。
5. 高速遠心機でスピンドウンして(13,000 rpm、1分、室温)、蓋や壁についた液を底に集めます。
6. サンプルを氷上に置き、直ちにハイブリダイゼーションに使用してください。**保存はできません。**

8-8. ハイブリダイゼーションチャンバの組み立て

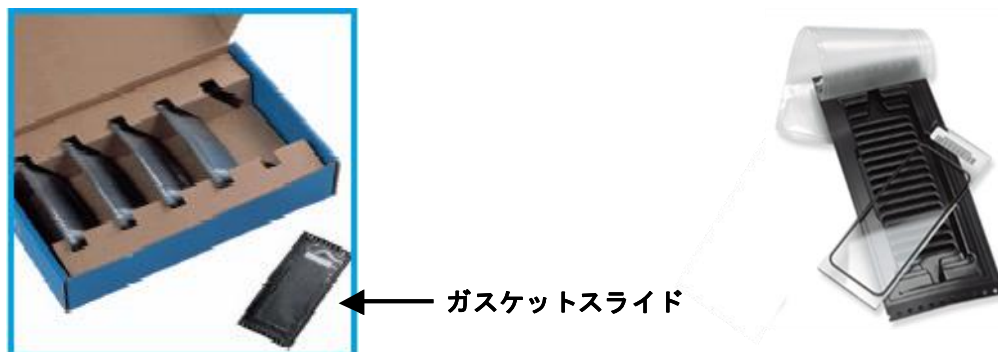
ハイブリダイゼーションチャンバを組み立てるにあたり、以下が必要になります。

ハイブリダイゼーションチャンバ (G2534A)

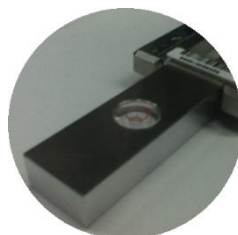


ガスケットスライド:

1x1M 用 (G2534-60003), 2x400K 用 (G2534-60002), 4x180K 用(G2534-60011), 8x60K および 8x15K 用(G2534-60014)



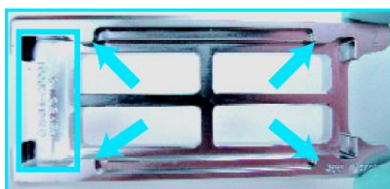
■(オプション)ハイブリエイド



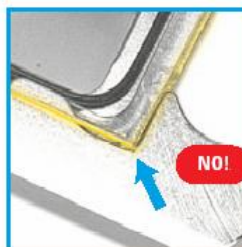
1. ピンセットを使ってガスケットスライドのプラスチックカバーの端をつまみ、ゆっくりとはがします。ガスケットスライドをパッケージから取り出します。この時、スライドの縁以外には触れないようにしてください。必ずパウダーフリーの手袋を着用してください。



2. チャンバベースの上に、ガスケットスライドを “Agilent” の文字あるいはバーコード番号が書かれている面を上にして載せます。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。
チャンバベースの 4 つの突起(図の矢印の部分)にしっかりとハマるようにします。



3. 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【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。アレイスライドのバーコード番号およびアプライしたサンプル位置を記録しておきます。

アレイフォーマット	調製した量(1アレイあたり)	アプライする量(1アレイあたり)
8pack	50uL	40uL
4pack	110uL	100uL
2pack	250uL	240uL
1pack	500uL	490uL

5. ハイブリダイゼーション溶液がガasketのふちまで広がらないように、ガasketの中央部分にアプライしてください。スライドグラス上の全てのウェル間で、液面の高さが揃うように、ゆっくりと均等に液を配置します。



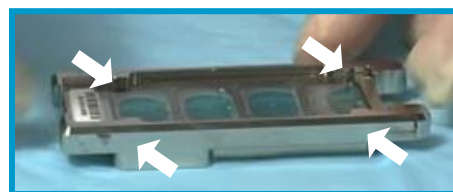
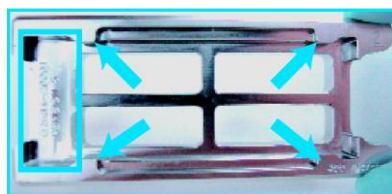
サンプルをアプライしないウェルがある場合、空白ウェルには、水で 1x の濃度に希釈をした 2x GE Hybridization Buffer HI-RPM を、アレイのフォーマットに応じて、上の表の量アプライして下さい。

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

6. 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チャンバベースにセットされているガasketスライド上に載せます。このとき、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ください。**マイクロアレイスライドを水平に保ったままガasket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グ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。

注意 2 枚のスライドのバーコードが、正しい位置で重なり合うようにセットしてください。チャンバベースの 4 つの突起(図の矢印の部分)にしっかりとハマるようにします。



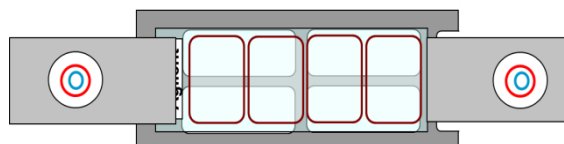
注意 1 スライドに複数のアレイが搭載されているタイプで、チャンバカバーをセットする前、“ハイブリ溶液が接しているアレイ”と“接していないアレイ”があるように見える場合がありますが、問題ありません。アレイスライドを乗せた後は、位置の微調整などは行わず、すぐチャンバカバーを乗せて下さい。

※参考手法

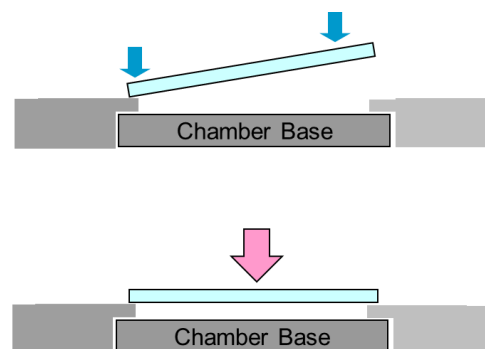
ハイブリエドを用いることにより、手作業では水平に降ろしづらいマイクロアレイスライドを、サンプルをアプライしたガスケットスライド上に安定して乗せることができます。

使用器具： ハイブリエド (HYB-100)

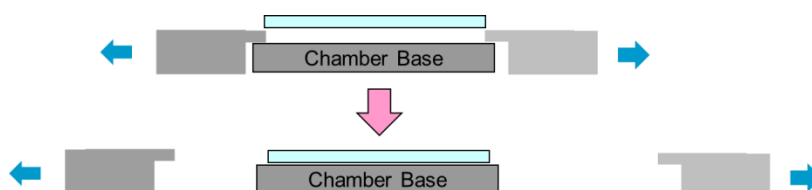
- ① ガスケットスライドにサンプルをアプライし終わった時点でチャンバベースの両端から各ハイブリエドを差し込み、突き当たるまで動かします。ガスケットスライドの端を、ハイブリエドの突起部分が覆うような形となります。



- 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。



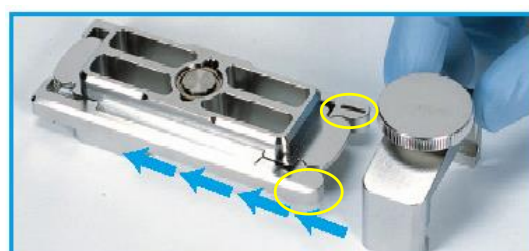
- ③ 左右のハイブリエドを同時に引き抜いて下さい。アレイスライドが水平に落ち、ガスケットスライドと正しい位置で重なります。アレイスライドを乗せた後は、位置の微調整などは行わず、すぐチャンバカバーを乗せて下さい。引き抜く先に障害物などが無いようにして下さい。



7. 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。



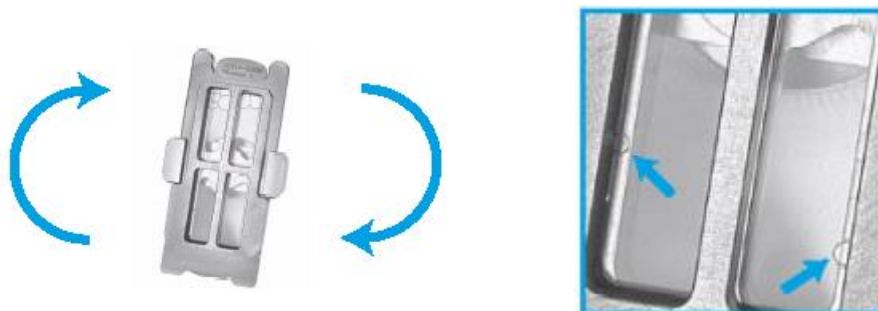
8. クランプアセンブリを、チャンバベースの丸くなっているコーナー側から差し込み、完全にストップする位置まで移動させます。ストップする位置は、ちょうどチャンバの中央部になります。



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と締めます。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asket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。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、ハイブリむらが起きる場合がありますので、泡が動かない場合には、チャンバを手にもって振ることで、泡を移動させます。



10. 残りのスライドも同様に、上記の作業を行ってください。

11. チャンバの組み立てがすべて終わりましたら、予め 65°C にセットしたオーブンのローターに差し込みます。ハイブリダイゼーション中に外れることがないように、両端をしっかりと差し込んで固定してください。複数のスライドグラスをハイブリダイズするときは、必ずローターのバランスをとってチャンバをセットするようにしてください。奇数枚の時は、スライドグラスなしでチャンバを組み立て、ローターの対面にセットしてください。



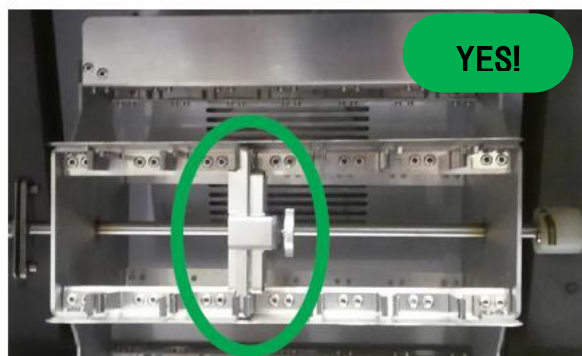
Agilent ハイブリダイゼーション
オープン (G2545A)



ハイブリダイゼーション オープンローター
(G2530-60029)

組み立てたチャンバは、下図 a のようにチャンバのねじが横向きになるように差し込みます（左右どちらでも構いません）。下図 b のようにねじが正面あるいは背面に向いた状態では、ハイブリダイゼーションが不均一となります。

a.



b.



12. ハイブリダイゼーションオープンの扉を閉め、回転数 10 rpm に設定します。

13. 65°C で 17 時間ハイブリダイゼーションさせます。

8-9. 洗浄の準備

1. Triton X-102 の Gene Expression Wash Buffer への添加

Wash Buffer の Expire date を確認してください。古い Buffer を使用するとノイズが上がる等トラブルが発生する可能性があります。

最終濃度 0.005%になるように、Triton X-102 を Gene Expression Wash Buffer1 と 2 に添加することで、マイクロアレイの洗浄におけるアーティファクトの可能性を軽減することができます。

10% TritonX-102 は Gene Expression Wash Pack (5188-5327)に含まれています。単体でもご購入いただけます(50mL、5185-5975)。

Gene Expression Wash Buffer 1 と 2 の開封時に、以下の方法で 10%Triton X-102 を加えます。

この操作は、Wash Buffer1と 2 両方行います。

開封時に添加すれば、その後洗浄時に添加する必要はありません。

- 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、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).Wash Buffer の容器に『Triton X-102 添加済』と記載し、日付を記録する

Gene Expression Wash Buffer 中の Triton X-102 の最終濃度が 0.005%になれば、開封済みのより少ない量の Buffer にも添加することができます。

2. Wash2 の保温

洗浄前日から、**Gene Expression Wash Buffer 2**とスライドグラス洗浄用ガラス容器(1 個)を 37℃で保温しておきます。Wash Buffer 2 を別容器に移して少量温める場合は、蒸発を防ぐため密閉容器を使用してください。

9. 実験: 2日目

スライドガラス洗浄の前準備

洗浄を始める前に、以下の機器・器具を準備してください。

- スライドガラス洗浄用ガラス容器(中 3)
- スライドラック(サーモエレクトロン 109)
- スターラー(2)
- 回転子(ラック小(サーモエレクトロン 109)の場合 3.0cm 程度のもの 2
ラック中(サーモエレクトロン 113)の場合 4.5cm 程度のもの 2)
※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。
- タイマー
- ピンセット
- パウダーフリーの手袋

※ 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、確実に手袋から微粒子が発生しないことをご確認ください。ビーカーに入れた洗浄バッファ 1 で手袋を事前に洗い、手袋から垂れる洗浄バッファが白濁していないこと、および手袋をあらった後の、ビーカー内の洗浄バッファ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。なるべく手袋を洗浄バッファに浸さないで操作することをお勧めします(P.36)。

スライドガラスの洗浄操作

洗浄条件

ガラス容器	洗浄バッファ	温度	用途	洗浄時間
1	1	RT	ガasketスライドと アレイスライドの分離	
2	1	RT	洗浄	1min
3	2	37°C	洗浄	1min

※GC%の高い原核生物の場合は、ガラス容器 2 および 3 の洗浄をもう一度繰り返します。弊社では GC 含量が 65.6%の *Mycobacterium tuberculosis* で洗浄を繰り返すことが有効であることを確認しております(アプリケーションノート 5991-0879EN)。

1. 以下の洗浄バッファを用意します。

A : 洗浄バッファ 1: Agilent Gene Expression Wash Buffer 1

B : 洗浄バッファ 2: Agilent Gene Expression Wash Buffer 2 (37°Cで保温してあるもの)

洗浄バッファの Expire date を確認してください。古い洗浄バッファを使用するとノイズが上がる等トラブルが発生する可能性があります。

37°Cのウォーターバスまたはオーブンで溶液を加温します。洗浄直前時まで 37°Cで保温して下さい。弊社では、37°Cで保温可能なスターラー付恒温槽(アズワン株式会社(品番: 1-5088-01、P35 の写真参照)あるいは株式会社日伸理化(SW-500NT))の利用を推奨しております。

2. 下記の通り、3つの洗浄用ガラス容器を準備します。

注意 ハイブリダイゼーションチャンバの分解を始める前に、全ての必要な洗浄バッファとガラス容器の準備を行ってください。洗浄・乾燥のステップは、できるだけ効率的に行ってください。

注意 注意深く洗浄プロトコルに従ってください。また指定の器具を使用してください。洗浄時間を守るとは非常に重要です。洗浄時間がプロトコルの時間から外れた場合には、結果がばらついてしまう場合があります。また、スライド洗浄を行う際の攪拌には、シェーカーを使わずに、必ずマグネットスターラーを使用して下さい。

ガラス容器 1: 洗浄バッファ 1, ガスケットの解体用

ガラス容器 2: 洗浄バッファ 1, スライドラックと回転子の中に入れておきます

ガラス容器 3: 洗浄バッファ 2 (37℃に保温したもの), 回転子の中に入れておきます

スターラー付恒温槽がある場合には、37℃に設定して、ガラス容器 3 をセットします(写真参照)。

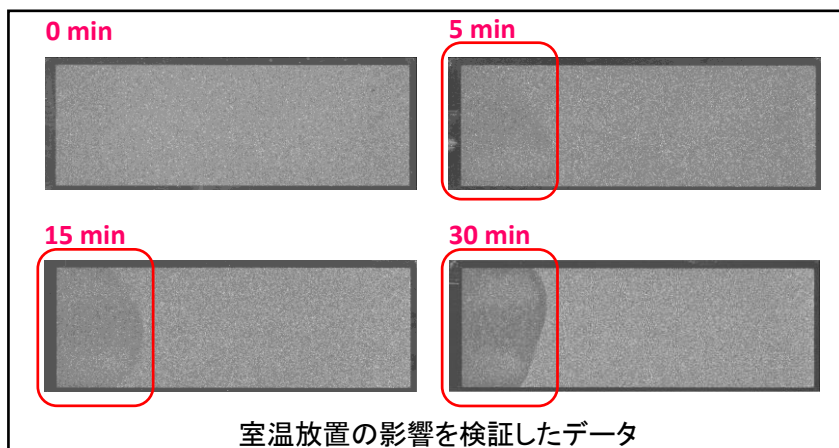
注意 スターラー付恒温槽を利用しない場合、洗浄バッファ1の洗浄を開始するまで、37℃で保温してある洗浄バッファ2を加えないで下さい。



スターラー付恒温槽

3. ハイブリオープンから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**、アレイスライドを洗浄バッファ 1 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洗浄する場合、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。



4. チャンバの分解

- 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。
- クランプアッセンブリを外し、チャンバカバーを取り除きます。
- 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（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**ガラス容器 1**内の洗浄バッファ 1 にいれます。この時なるべく手袋が洗浄バッファ 1 に浸からないようにしてください。

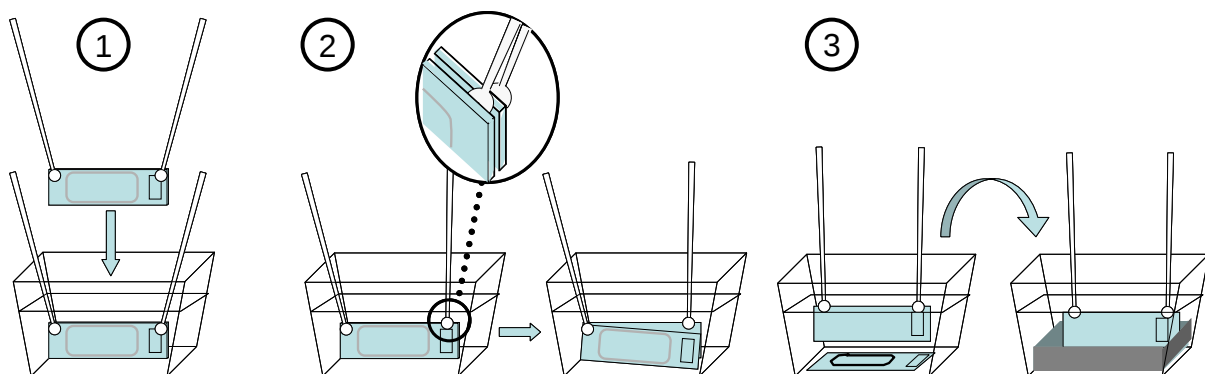
5. 2 枚のスライドが完全に洗浄バッファ 1 に浸かった状態で、スライドのバーコード側から 2 枚のスライドを離します。フラットピンセットを用いることにより、洗浄液に手袋を浸さないでアレイを洗浄することができます。フラットピンセットがない場合は、参考手法の手順に従ってください。

使用器具：フラットピンセット 33A (品番は p.9 参照)

注意 丸い部分の半分以上でガラス面を持たないよう注意が必要。



- 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 枚のスライドグラス間に
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 両手でスライドグラスを
しっかりはさみ、
ガラス容器 2 中の
ラックに運ぶ。



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。できる限り洗浄バッファにアレイが浸った状態で操作し、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

フラットピンセット 33A がない場合は、下記方法で 2 枚のスライドグラスを離します。2 枚のスライドが完全に洗浄バッファ 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。

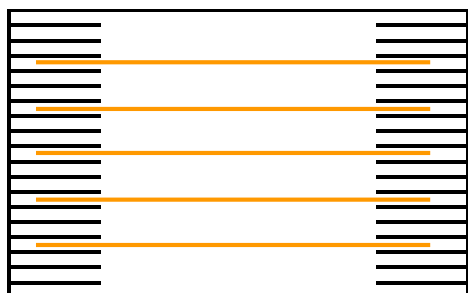
- チャンバに付属の白いピンセットの先端を 2 枚のスライドの間に差し込み、ゆるやかにピンセットを上側か下側に回転させてスライド同士を離します。
- ガスケットスライドのみを容器の底に落としてください。
- アレイスライドをすばやく取り出し、洗浄バッファ 1 を入れた**ガラス容器 2**にセットされているラックにそっと差し込みます。



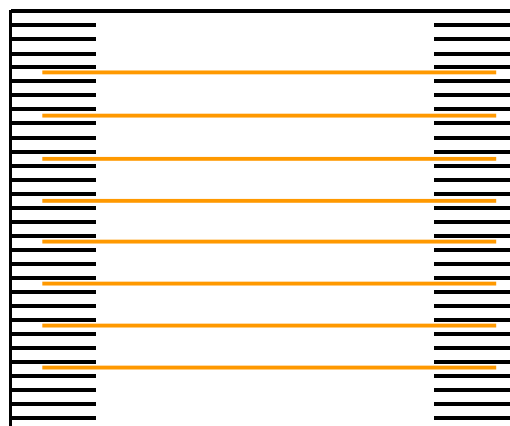
6. 残りのチャンバも同様に解体して、すべてのスライドをラックに差し込みます。一度に洗浄するアレイは **8 枚以下** にするようにしてください。

注意 スライドグラスをラックに差し込む際は、洗浄の効率を保つために**端は 3 つ以上、スライドグラス間は 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。全てのスライドで、**アレイ面がラックの中心を向く向き**に揃えます。

19 スライドラック (Thermo Shandon109)



30 スライドラック (Thermo Shandon 113)



7. 全てのアレイをスライドラックにセットできたら、**中程度の回転速度で室温のまま 1 分間** 攪拌します。

注意 アレイスライドおよびスライドラックを入れた状態で、**液面が波立つ程度の速さで攪拌**してください。スライドグラスの枚数、液量によって回転数は異なるので、その都度調節してください。回転速度が十分でない場合、洗浄力が弱まる恐れがあります。

注意 スターラー付恒温槽を利用しない場合、洗浄バッファ 1 でスライドグラスを洗浄している間に、**ガラス容器 3** に 37℃で保温してある洗浄バッファ 2 を注ぎます。

8. スライドラックを **37℃の洗浄バッファ 2 (ガラス容器 3)** にすばやく移します。**中程度の回転速度 (液面が波立つ程度の速さ) 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。**

《オプション》 GC%が高い原核生物をハイブリダイズした場合は、再度洗浄バッファ 1 (ガラス容器 2) で室温 1 分間、洗浄バッファ 2 (ガラス容器 3) で 37℃1 分間洗浄を行います。

9. **洗浄バッファ 2 (ガラス容器 3)** からスライドラックを取り出します。この時、スライドラックを平行に保ち、スライド上に水滴が残らないように注意しながら、**5-10 秒** かけて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。

10. 9 の操作でスライドグ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)。すぐにスキャンをしない場合には、窒素パージして暗所で保管してください。必要でしたらスキャン後に、スライドグラスはポリプロピレンスライドボックスに入れ (コルクなどの詰め物をしないでください)、真空デシケータまたは窒素パージボックスに入れて暗所で保存します。真空デシケータの方が色素の退色が見られるため、窒素パージボックスをお勧めしています。

注意 アレイの洗浄は、オゾン濃度が 50ppb 以下の環境で行なってください。実験室内のオゾン濃度が著しく高い場合には、弊社までご相談ください。

《ガラス容器およびチャンバの洗浄法》

洗浄に使用するガラス容器やラック、回転子等はマイクロアレイの洗浄専用にしてください。使用後は**洗剤を使わずに**水洗いをしてください。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。

1. チャンバ、ガラス容器、回転子およびラックを水道水ですすぎます。汚れが気になる場合は、**洗剤がついていない**スポンジでこすってください。
2. 超純水でよくすすぎます。5 回ほどすすいでください。
3. 埃がつかないように乾燥させます。

《ガラス容器などのメンテナンス》

正しく操作されていても、汚れが洗浄器具に蓄積されるとアレイスライドに影響がでることがあります。スキャン画像にムラや粒上の汚れが観察されるなどの問題が起こった場合は、洗浄器具をクリーニングすると改善する場合があります。以下の手順に従い、クリーニングをしてください。

ガラス容器の洗浄には、アセトニトリルあるいは IPA(イソプロパノール)を用います。

アセトニトリルは劇物なのでドラフト内で使用するなど取扱いにご注意ください。

1. ステンレスラック、スターラー、使用している場合はピンセットなどの洗浄器具をガラス容器に入れ、アセトニトリルあるいは IPA を満たした状態で数時間おきます。
2. アセトニトリルあるいは IPA を廃棄した後ミリ Q 水で洗浄器具全てを徹底的にリンスしてください。
3. 洗浄器具をホコリがつかない環境で自然乾燥してください。

《ミリ Q システムのメンテナンス》

ガラス容器などをミリ Q 水でリンスする際、高い水質であることを確認してください。ミリ Q システムのフィルターや UV ランプなどの使用期限が過ぎていると水質が悪くなり、ガラス容器などを介し、洗浄したスライドグラスに影響を与えることがあります。

参考値: 比抵抗 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$, TOC<4

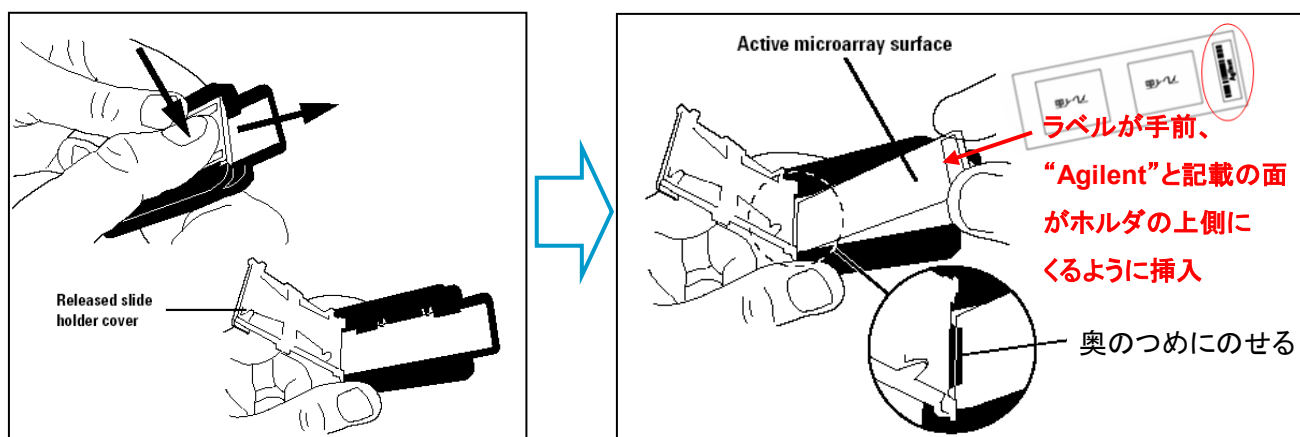
10. Agilent スキャナを用いたスキャンング

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、PC、スキャナおよびスキャナコントロールソフトをこの順に起動しておきます。詳細な手順は、Appendix を参照してください。

1. スキャンングの準備

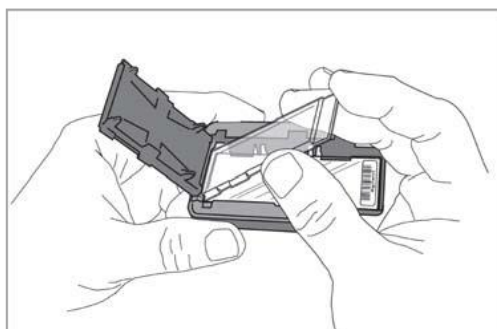
1. スライドをスライドホルダにセットします。スライドホルダをカローセルにセットした際に、数字のバーコード面が見えるような向きで挿入します。

a. B スキャナまたは C スキャナをお使いの場合



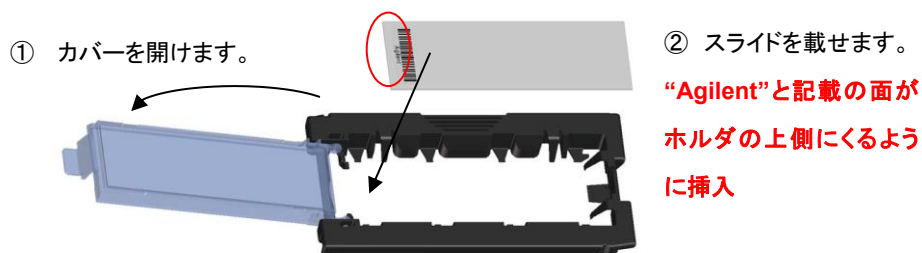
《オプション: オゾンバリアスライドカバーの使用》

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、オゾンバリアスライドカバーを置き、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、オゾンバリアスライドカバーの向き(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。

b. SureScan をお使いの場合



- ① スライドホルダのカバーを開けます。
- ② ‘Agilent’ と記載の面が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。

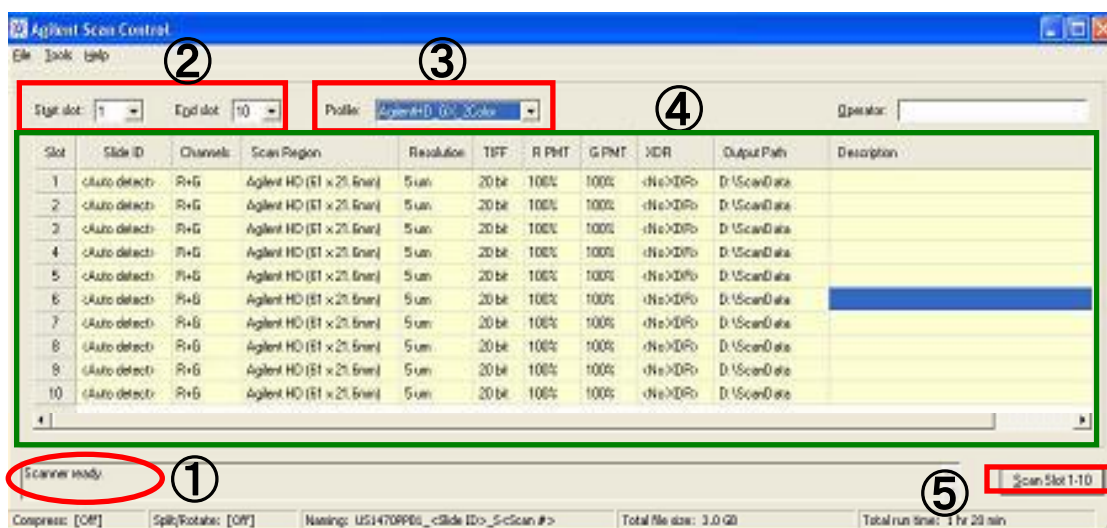
③ スライドホルダのカバーを閉めます。閉める際カチッと音がし、固く閉まっていることを確認して下さい。カバーのしまりが緩い場合は他のホルダを使用してください。スライドホルダは1台のスキヤナに24個ついています(足りなくなりましたら購入も可能です。お問い合わせください)。

- スライドホルダをスキヤナのカラーセル(SureScan の場合はカセット)にセットします。複数のスライドグラスをスキヤンする場合は、隣り合うスロットにセットしてください。また、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ヤ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ヤンを開始すると、スキヤ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。

2. スライドのスキヤン

スキヤナコントロールソフト ver.8(Cバージョンスキヤナ)の操作

- 画面下の“Scanner status”が『Scanner ready』になっていることを確認します。
- スライドを入れたスロット番号を、“Start slot”と“End slot”で指定します。



- “Profile”リストから、ご使用のマイクロアレイフォーマットに適したProfileを選択します。アジレントExonマイクロアレイの場合は、“AgilentG3_GX_1Color”、原核生物 8x15K フォーマットの場合は“AgilentHD_GX_1Color”を選択します。

Profile リストの選択肢

<default> プログラムインストール後に現れるデフォルト設定

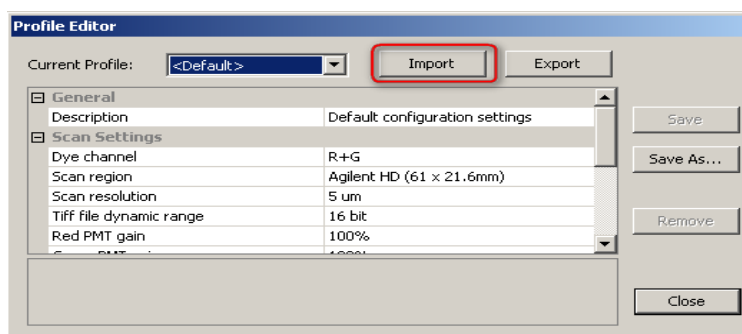
- AgilentHD_GX_1Color** : 遺伝子発現アレイ 1 カラー(8x15K, 4x44K, 2x105K, 1x244K)
- AgilentG3_GX_1Color** : 遺伝子発現アレイ/Exon アレイ 1 カラー(8x60K, 4x180K, 2x400K, 1x1M)
- AgilentHD_GX_2Color** : 遺伝子発現アレイ 2 カラー(8x15K, 4x44K, 2x105K, 1x244K)
- AgilentG3_GX_2Color** : 遺伝子発現アレイ/Exon アレイ 2 カラー(8x60K, 4x180K, 2x400K, 1x1M)
- AgilentHD_CGH** : CGH/ChIP マイクロアレイ(8x15K, 4x44K, 2x105K, 1x244K)
- AgilentG3_CGH** : CGH/ChIP マイクロアレイ(8x60K, 4x180K, 2x400K, 1x1M)
- AgilentHD_miRNA** : miRNA マイクロアレイ

選択肢に“**AgilentG3_GX_1Color**”がない場合は、ウェブからダウンロードしコントロールソフトにインポートするか、上記プロファイルのいずれかを選択後各項目を個別に変更してください。

	For 1x1M, 2x400K, 4x180K and 8x60K G3 Microarray Formats
Dye channel	Green
Scan region	Scan Area (61 x 21.6 mm)
Scan resolution (μm)	3
Tiff	20 bit

【プロファイルの入手およびインポート】

1. 下記サイトから AgilentG3_GX_Profiles.zip をダウンロードし、PC に保存します（スキャナに付属の PC ではなくて結構です）。
<https://www.genomics.agilent.com/GenericA.aspx?PageType=Custom&SubPageType=Custom&PageID=2074>
2. ダウンロードしたファイルを右クリック＞Open with(プログラムから開く)＞Compressed zipped folders あるいは Winzip と選択し、解凍します。
3. 解凍したファイル(AgilentG3_GX_Profiles.pfl)をスキャナに付属の PC にコピーしてください。
4. コントロールソフトの Tool> Profile Editor...と選択します。
5. 現れた Profile Editor 画面で Import をクリックし、保存した解凍ファイル(AgilentG3_GX_Profiles.pfl)を指定します。



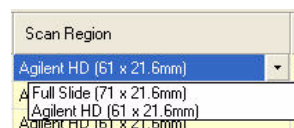
6. Yes をクリックし、Profile Editor 画面の Close をクリックします。
4. 選択したプロファイルの項目で、個別に変更する必要がある場合はプルダウンで変更します。

変更できる項目(太字が default です)

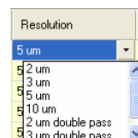
- 1). **Dye Channel**: Red (1 カラー (Cy5))
Green (1 カラー (Cy3)),
Red+Green (2 カラー)



- 2). **Scan Region**: Full Slide
Agilent HD (アジレントアレイ)

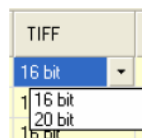


- 3). **Scan Resolution:** 2um, 3um, 5um, 10um,
double path (2um, 3um, 5um)



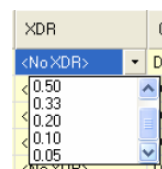
※ C バージョンのスキナでも 2um および 3um が選択肢にない場合は高密度タイプのマイクロアレイ(8x60K, 4x180K, 2x400K, 1x1M)に対応していません。

- 4). **TIFF file dynamic range:** 20bit, 16bit



- 5). **R/G PMT gain:** 100% ~ 1%

- 6). **XDR ratio:** 0.5, 0.33, 0.2, **0.1**, 0.05,
NoXDR



- 7). **Output Path:**

※ 変更した設定は Profile に保存することができます。 [Profile>Save as]

5. スキャン設定が確認できたら、“**Scan Slot n-m**”をクリックしスキャンを開始します。
6. スキャンが終了したら、Scan Progress 画面の右下にある Close ボタンをクリックします。
スキナのロックがはずれ、スライドホルダを取り出せるようになります。
7. コントロールソフトを閉じた後にスキナおよび PC の電源を消してください。

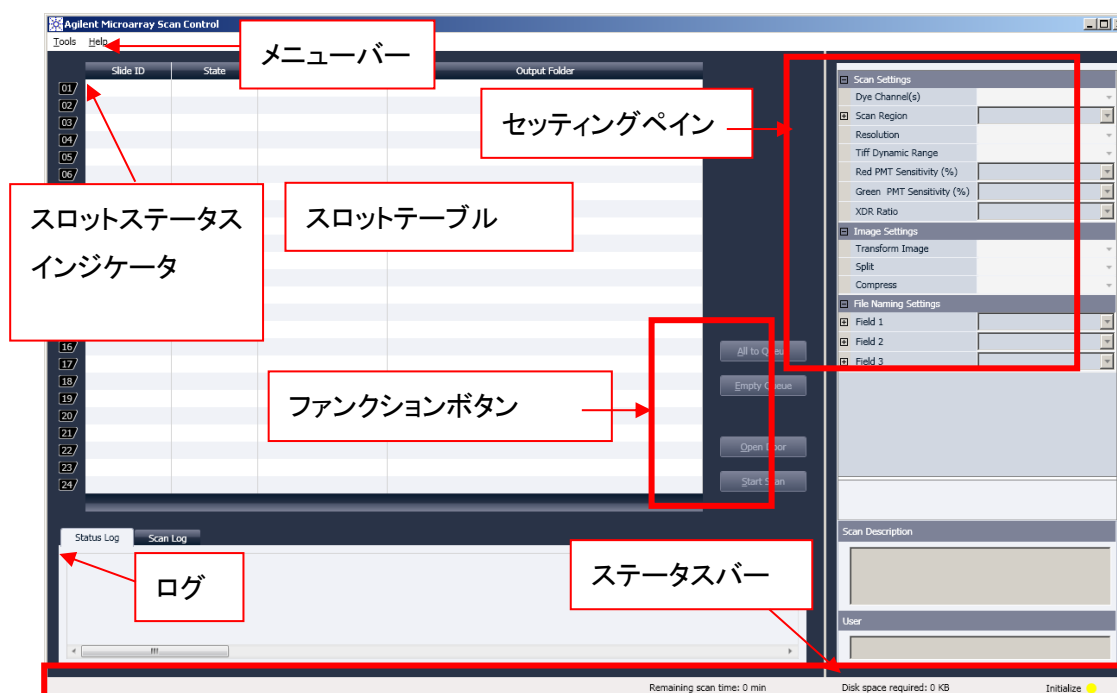
スキナコントロールソフト ver.9.1 (SureScan マイクロアレイスキナ)をお使いの場合

注意 ドアを手で開けないでください。エラーが発生します。

カセットを手で動かさないでください。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。

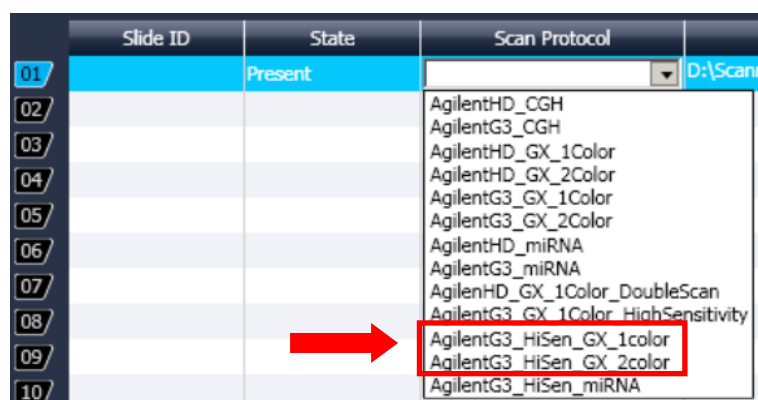
1. 起動すると次の画面になります。



2. 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。



3. Scan Protocolから適切なプロトコルファイルを選択します。AgilentG3_HiSen_GX_1Color(1x1M、2x400K、4x180K、8x60Kの場合)あるいは、AgilentHD_GX_1Color(1x244K、2x105K、4x44K、8x15Kの場合)を選択します。
ウィンドウ右側のセッティングペインでスキャン設定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。AgilentHD_GX_1Colorを選択した場合はResolutionを”5 um”から”5 um high sensitivity”に変更してください。この設定をScan Protocolとして保存する場合は次ページをご参照ください。



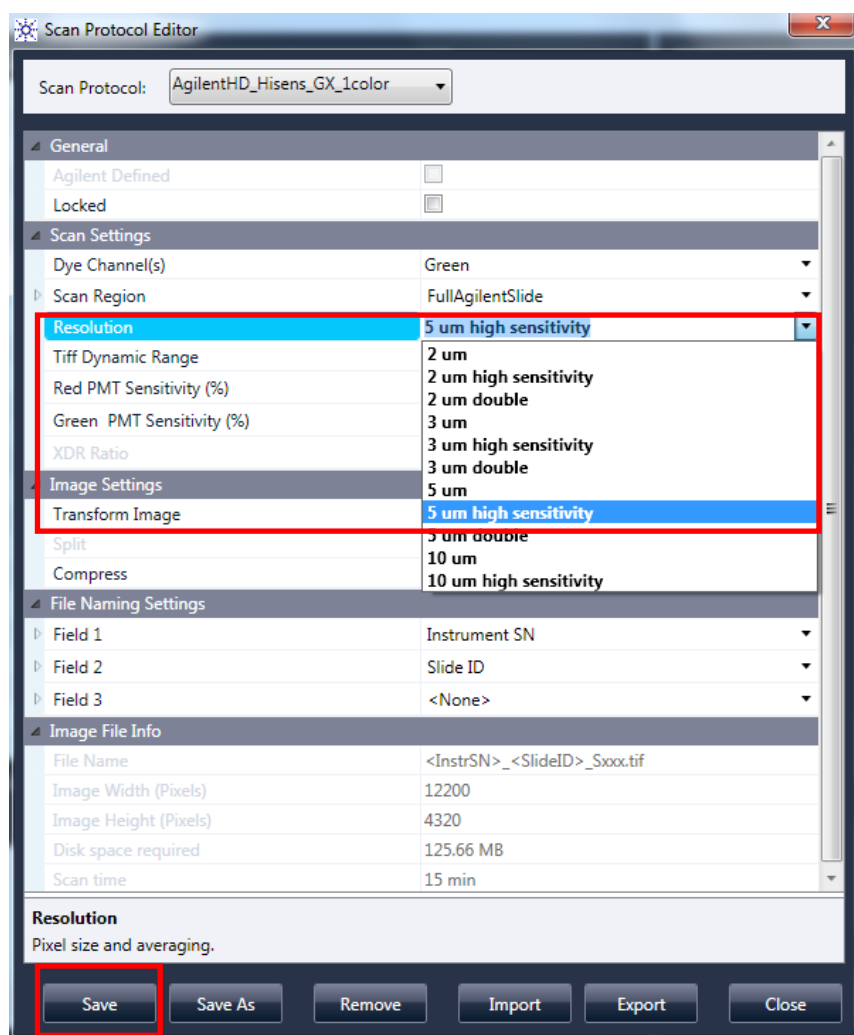
4. 必要があればデータの保存先を変更します。※D drive内のフォルダを指定してください。



5. 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。
6. 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。
7. スキャンが終了し、Open Doorボタンがアクティブになったら、クリックします。
8. スライドホルダを取り出します。
9. 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。

《変更したプロトコルをScan Protocolとして保存する場合》

1. メニューバーの **Tools** から「**Scan Protocol Editor...**」を選択します。
2. AgilentHD_GX_1Color または AgilentHD_GX_2Color を選択し Scan Protocol Editor 画面下部の「**Save As**」をクリックし、「**Save As New Name**」ボックスで、今から設定する新しい Protocol Editor に分かりやすい名前(例: AgilentHD_HiSens_GX_1color)をつけて保存します。
3. 設定した新しい名前の Protocol が選択されているのを確認した後、**Resolution** という項目のプルダウンメニューを展開し、「5 um」から「5 um high sensitivity」に変更してください。



4. Resolution が間違いなく **High Sensitivity** に設定されており、その他の項目に変更が加えられていないことを確認した後、ボックス下部の **Save** をクリックします。

今後のスキャン時には、この新規作成した Protocol を **Scan Protocol** として選択するだけで、高感度設定でスキャンをすることが出来ます。

11. ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイ画像確認

ここでは、Feature Extraction ソフトウェアによる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、Feature Extraction 英語版マニュアルをご覧ください。

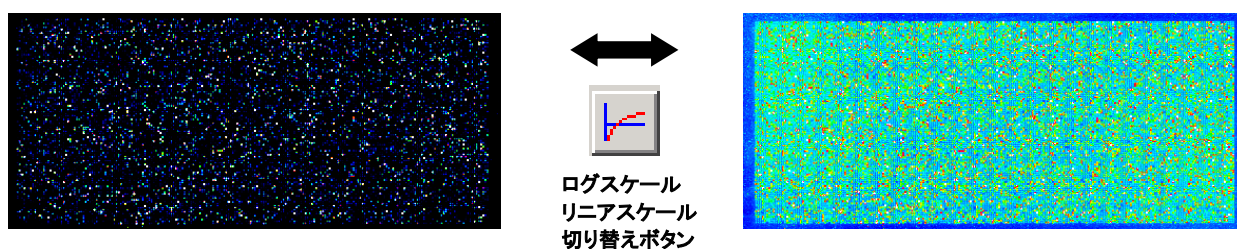
① Feature Extraction ソフトウェアの起動

スキャンした画像ファイルを開きます。

- ・tif イメージ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。

② バックグラウンドのむらの確認

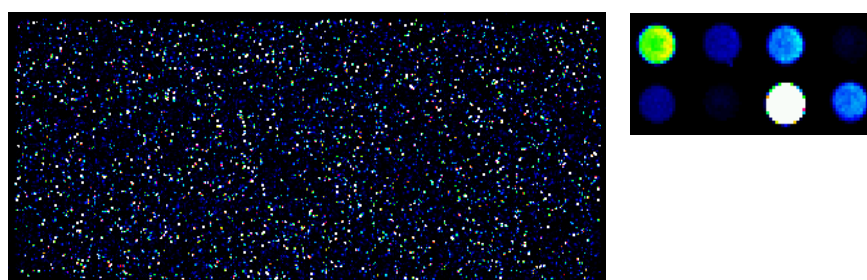
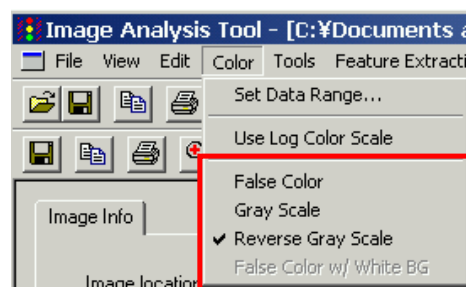
ログスケール表示によりバックグラウンドのむらを確認します。



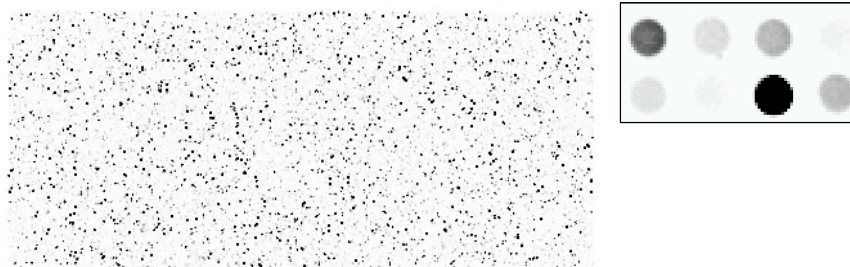
③ 表示カラーの変更

Color > xxxxx を選択すると表示カラーが変更します。

例: Color > Reverse Gray Scale を選択すると、白黒反転表示になります。



白黒反転表示



④ クロップモードの ON/OFF

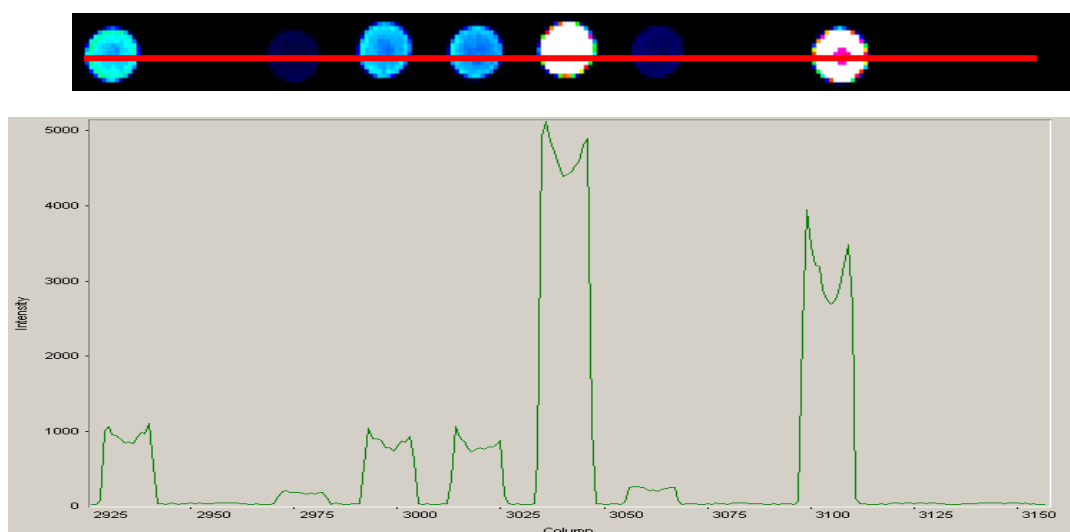
クロップモードが ON の場合、ポインタの横にひし形マークが表示されます。イメージをクロップすると新しいウィンドウで切り取った画像が表示されます。OFF の場合、クロップ時にその大きさに合わせてウィンドウが拡大表示されます。



をクリックすることで ON/OFF の切り替えができます。

⑤ ラインプロット

スポットの形状を確認します。



クロップモードを ON にしたまま、ラインプロットを見たい領域の左上隅で左クリックし、そのままポインタを領域の右下隅までドラッグさせます。次にクロップモードを OFF にし、ラインプロットを見たい位置(上の図の場合、赤線上のどこでも構いません)にポインタを合わせて左ダブルクリックします。

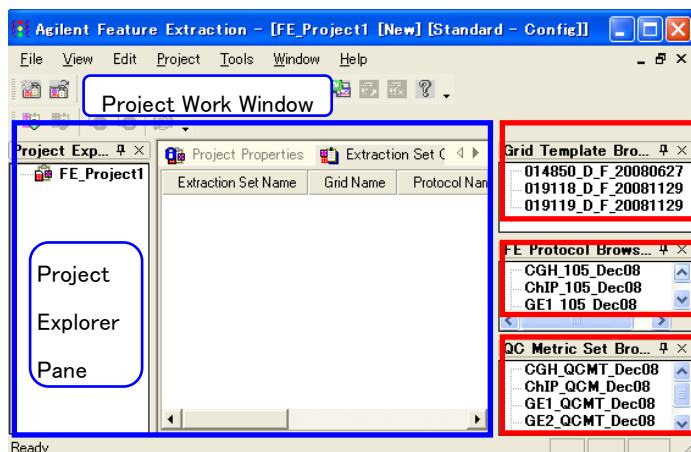
このように、Feature Extraction する前に、ヒストグラムやラインプロットを使ってデータ抽出の妨げの可能性となる異常スポットやバックグラウンドの確認をすることができます。

12. Feature Extraction ソフトウェアで数値化を行う前に

- Feature Extraction 画面(ウインドウの構成)の説明

Feature Extraction 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 の画面構成(デスクトップ上の Feature Extraction ショートカット から立ち上げた場合の初期画面)



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

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、アプリケーション毎のファイル。ダブルクリックで開いて変更・保存可能。

QC Metric Set Browser 各アプリケーションでの QC メトリックのセット。

※Agilent が推奨している Default 設定の Protocol は、Feature Extraction 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、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。最新の Protocol および Design File は後述の弊社 Web サイトからのダウンロードが可能です(巻末参照)。

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

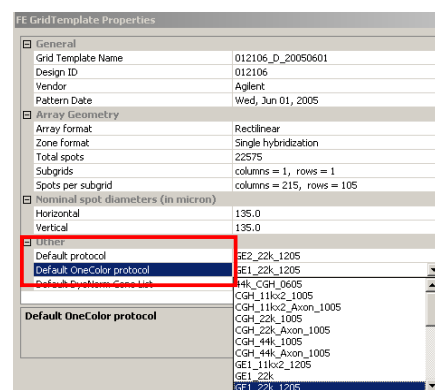
ダウンロードした Design File を解凍し、XML ファイルを“日本語が入らないパス”のフォルダに保存します。

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)。

※圧縮ファイルを解凍する際は、Winzip あるいは Windows XP 以降に付属のソフト(解凍するファイル上で右クリック>Open with(プログラムから開く)>Compressed(zipped)Folders と選択)を使用してください。

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**(右図)の window が開きます。**Default Protocol**、**Default One Color Protocol**に適切な Protocol を指定します。



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)

13. Agilent Feature Extraction ソフトウェアによる数値化

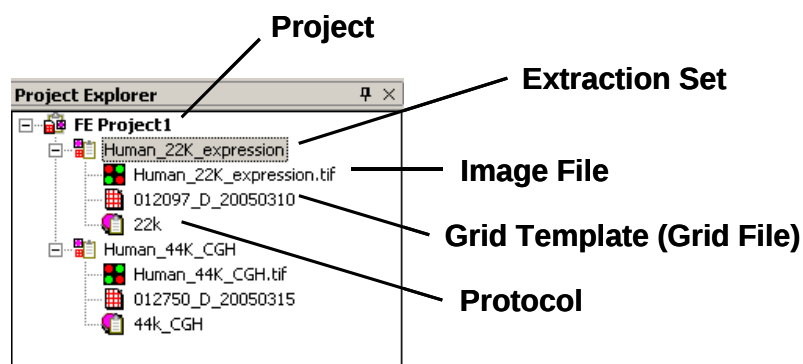
Step 1— Feature Extraction ソフトウェアの起動

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います。

- 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 >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。
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— Extraction Set Configuration および Project Properties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1色法の数値化には、**GE1_107_日付**を選択してください。
- Design FileおよびProtocolについては巻末をご参照ください。

Extraction Set Configurationタブシート

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

プルダウンメニューにgrid templateがない場合に、grid templateをGrid Template Browserに追加してください。Grid Template Browserの枠内で右クリックをして、Addを選択します。追加したいデザインファイル(.xml)をブラウズし、Openをクリックしてデータベースにインポートします。

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 | Extraction Set Configuratic

General

Operator: Unknown

Input

Number of Extraction Sets I/O

Output and Data Transfer

Outputs

MAGE	None
JPEG	None
TEXT	Local file only
Visual Results	Local file only
Grid	None
QC Report	Local PDF file only
FTP Send Tiff File	False

Local File Folder

Same As Image: True

Results Folder

FTP Setting

Automatic Protocol Assignment

Highest Priority Default Pro: Grid Template Default

Project Default Protocol

Automatic Grid Template Assignment

Use Grid file if available: False

External DyeNorm List File

Overwrite Previous Results: False

①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。

②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/Agilent Genomic Workbench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。64bitのPCをお使いの場合は、“Local PDF file only”を選択してもHTMLファイルが出力されます。 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。

Same As ImageをTrueにしておくでスキャン画像が保存されているフォルダに、出力ファイルが保存されます。スキャン画像と別のフォルダにファイルを出力する場合は、Same As ImageをFalseにし、Result Folderの欄で保存先を指定します。

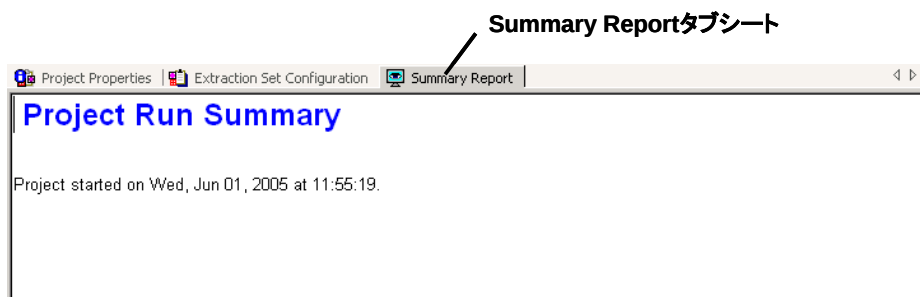
3. 設定を確認したら、**Project**の保存を行います。

- **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

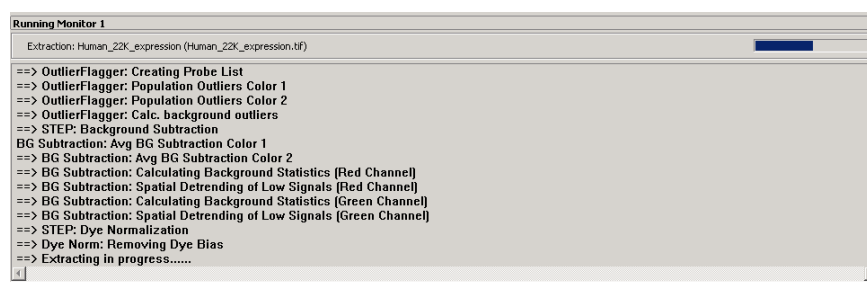
Project > Start Extractingを選択すると、Projectがスタートします。

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

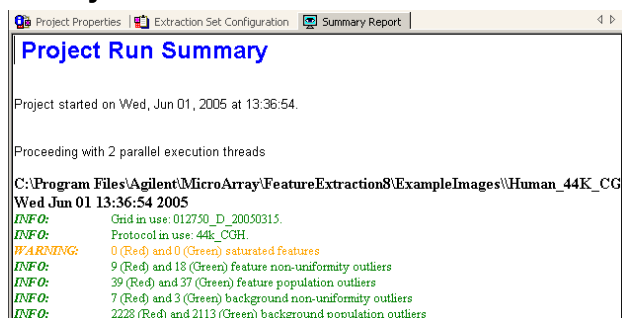


進行状況は、Running Monitorに表示されます。Project終了後、Summary Reportタブを選択していると、Project Work Windowに、Project終了を示すSummaryが現われます。

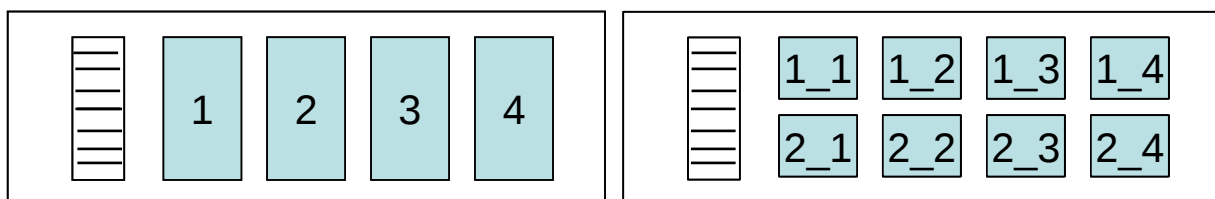
Running Monitor



Project 終了後



※ 4x180K フォーマットの出力結果は、1スライドあたりファイル名末尾 “..._1” ~ “..._4” の4つのデータ、
2x400K フォーマットの出力結果は、1スライドあたりファイル名末尾 “..._1” ~ “..._2” の2つのデータ、
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、下図の位置のア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)。

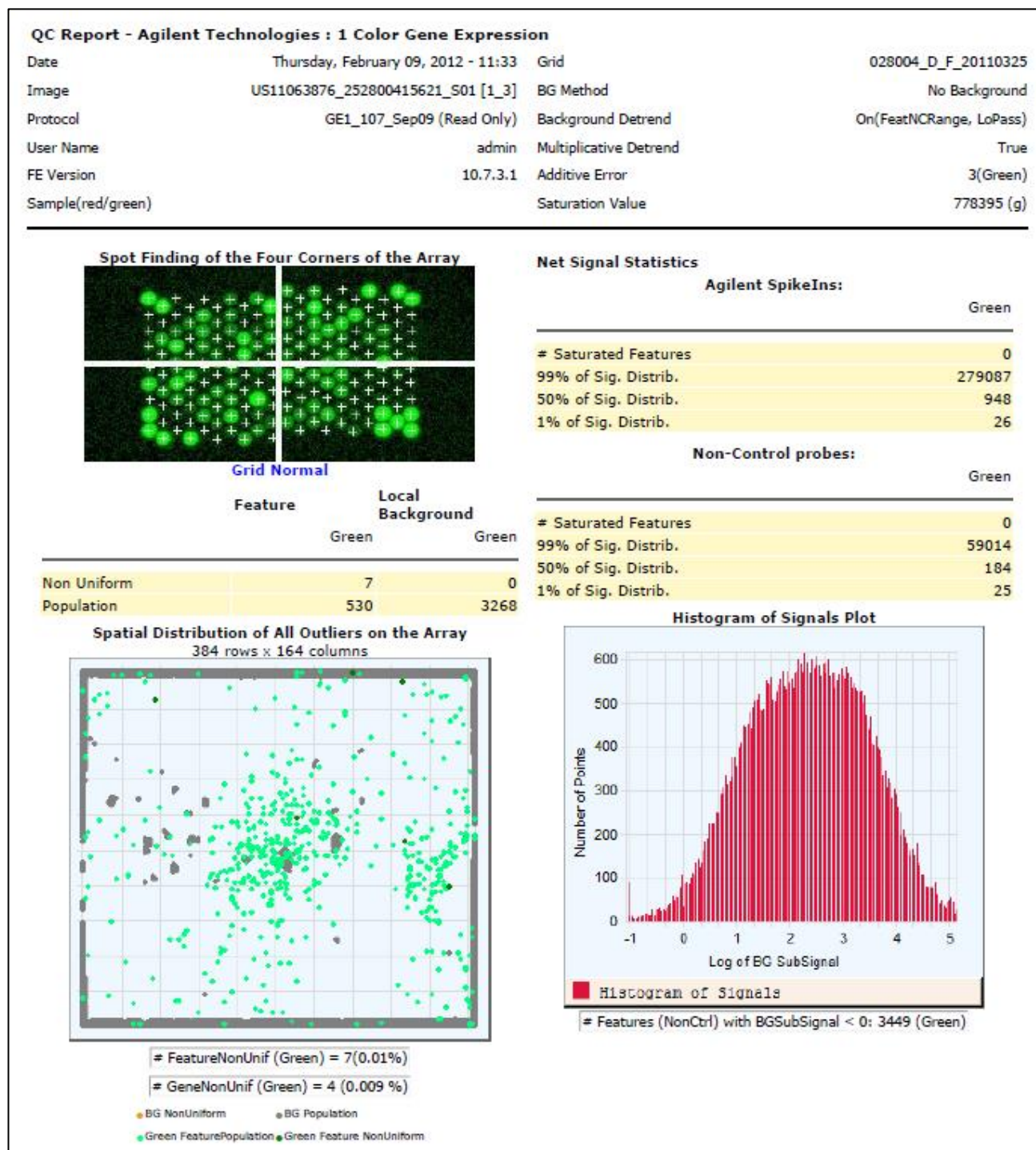


Step 5—QC Reportの確認

1. 出力ファイルの設定で、QC Reportを選択した場合に自動でQC Reportが作成されます。
2. “pdf形式のQC Report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。

QC Reportは、以下の項目を示します。

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



Negative Control Stats

Green

Average Net Signals	26.44
StdDev Net Signals	2.64
Average BG Sub Signal	-3.44
StdDev BG Sub Signal	2.23

Local Bkg (inliers)

Green

Number	59708
Avg	26.99
SD	1.60

Foreground Surface Fit

Green

RMS_Fit	1.28
RMS_Resid	2.70
Avg_Fit	36.50

Multiplicative Surface Fit

Green

RMS_Fit	0.09
---------	------

Reproducibility: %CV for Replicated Probes

Median %CV Signal (inliers)

Non-Control probes

Agilent SpikeIns

Green

Green

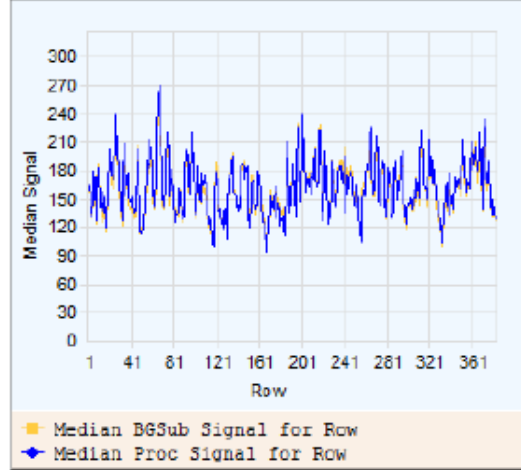
BGSubSignal	11.01	9.47
ProcessedSignal	4.47	2.92

Agilent SpikeIns Signal Statistics

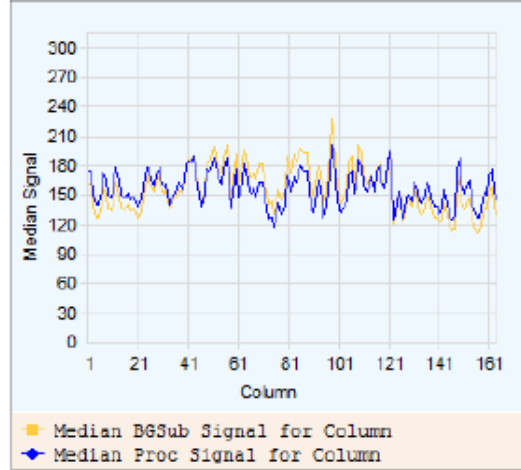
Probe Name	Log (Relative Conc.)	Median (Log Proc. Sig.)	% CV	StdDev
(+)E1A_r60_3	0.30	0.46	38.21	0.13
(+)E1A_r60_a104	1.30	0.45	82.23	0.19
(+)E1A_r60_a107	2.30	1.45	15.49	0.07
(+)E1A_r60_a135	3.30	2.36	5.67	0.02
(+)E1A_r60_a20	3.83	2.86	3.58	0.02
(+)E1A_r60_a22	4.30	3.34	2.84	0.01
(+)E1A_r60_a97	4.82	3.88	2.81	0.01
(+)E1A_r60_n11	5.30	4.55	2.74	0.01
(+)E1A_r60_n9	5.82	4.99	2.92	0.01
(+)E1A_r60_1	6.30	5.42	4.18	0.02

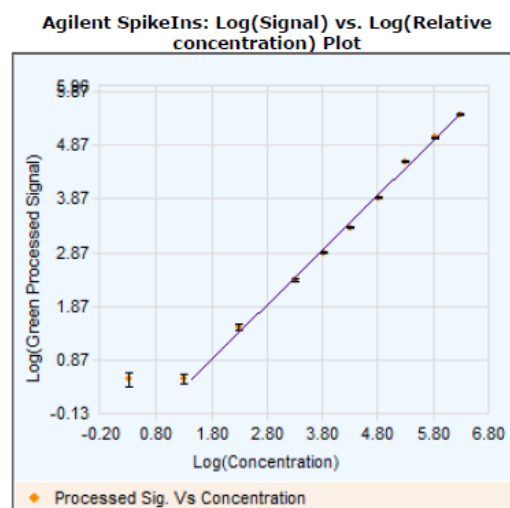
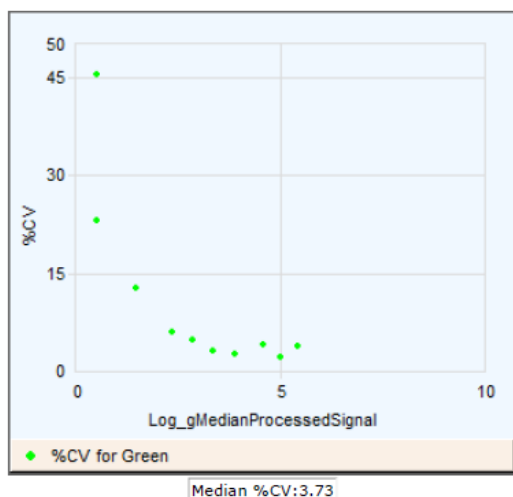
Agilent SpikeIns: %CV of Avg. Processed Signal Plot

Spatial Distribution of Median Signals for each Row



Spatial Distribution of Median Signals for each Column





Evaluation Metrics for GE1_QCMT_Sep09 :

Good (10)

Metric Name Value Excellent Good Evaluate

IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrcntFeatNonUn...	0.01		<1	>1
gNegCtrlAveNetSig	27.70		<40	>40
gNegCtrlAveBGSubSig	-4.25		-10 to 5	<-10 or >5
gNegCtrlSDevBGSubSig	2.55		<10	>10
gSpatialDetrendRMSFilt...	3.10		<15	>15
gNonCntrlMedCVProcSign...	4.67		0 to 8	<0 or >8
gE1aMedCVProcSignal	3.73		0 to 8	<0 or >8
absGE1E1aSlope	1.02		0.90 to 1.20	<0.90 or >1.20
DetectionLimit	0.64		0.01 to 2	<0.01 or >2

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

出力された
QC metrics
のテーブル

Agilent Spike-In Concentration-Response Statistics

Linear Range Statistics:

Low Signal	0.52
High Signal	5.76
Low Relative Concentration	1.46
High Relative Concentration	6.61
Slope	1.02
R^2 Value	1.00

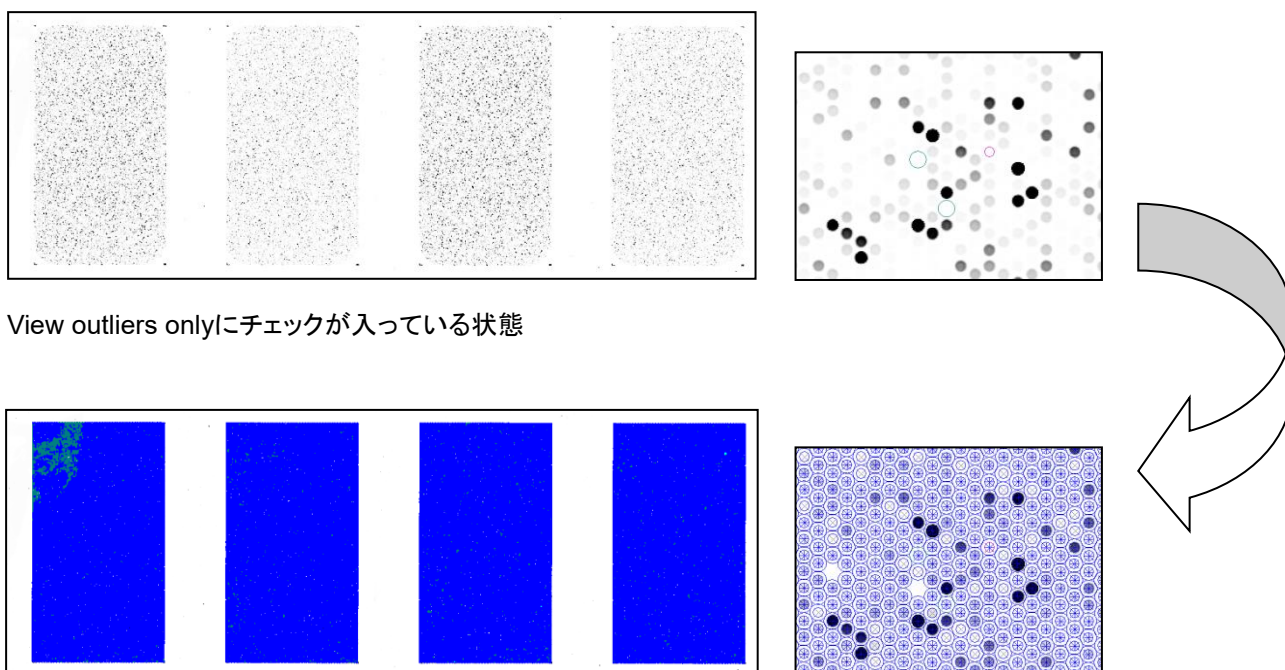
Signal Detection Limit Statistics

Saturation Point	5.89
Low Threshold	0.22
Low Threshold Error	0.16
Spike-In Detection Limit	0.64

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、画像を表示させます。メニューバーのFeature Extraction > Load Visual Resultを選択します。
2. 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。
3. 画像にVisual Resultが重ね描きされます。
4. 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。
5. View > Extraction Results からVisual Resultsの表示法を選択できます。



View outliers onlyにチェックが入っている状態

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。

Step7. テキストファイルの確認

以下の表は、Compact 設定で出力されたテキストファイルの主な項目です。

通常データ解析では **gProcessedSignal** をシグナル値、**ProbeName** を ID として使用します。

これらの項目は数値化テキストファイルをエクセルで開くと、10 行目に表示されます。**GeneSpring GX** をご使用の際は、出力ファイルの内容は変更せず、出力テキストファイルをそのまま GeneSpring に認識させてください。

項目(Green)	項目(Red)	内容
FeatureNum		フィーチャ番号
ControlType		フィーチャのコントロールタイプ ネガティブおよびポジティブコントロールは数値化の際に Feature Extraction が各種補正係数などを計算する際に使用します。生物学的な解析には必要ありません。 0 コントロールプローブ以外のプローブ -1 ネガティブコントロール 1 ポジティブコントロール
ProbeName		各 60mer の配列に対応した Probe ID
SystematicName		各プローブがターゲットとしている配列の ID。可能な限り公的なデータベースの ID を使用。
gProcessedSignal	rProcessedSignal	全ての数値化プロセスを経たシグナル強度。1 色法の場合は、Surrogate 後の値、2 色法の場合は色素補正後の値。
gBGSubsignal	rBGSubsignal	バックグラウンド補正を行った後、各種補正を行う前のシグナル強度。

Feature Extraction 由来のフラグ

項目(Green)	項目(Red)	内容
glsSaturated	rlsSaturated	0 サチュレーションしていないフィーチャ 1 サチュレーションしているフィーチャ
glsFeatNonUnifOL	rlsFeatNonUnifOL	各フィーチャ内のシグナルの均一性を検証。 0 フラグが立っていないフィーチャ 1 フラグが立った不均一なフィーチャ
glsFeatPopnOL	rlsFeatPopnOL	アレイ内に繰り返し搭載されている同じ配列を持つプローブシグナルの均一性を検証。1 回しか搭載されていないプローブは対象外。 0 フラグが立っていないフィーチャ 1 フラグが立ったフィーチャ
glsPosAndSignif		rlsPosAndSignif フィーチャのシグナルがバックグラウンドと有意に差があるかを判定。判定法は両側 t 検定。 0 バックグラウンドと差がないフィーチャ 1 バックグラウンドと差があるフィーチャ
glsWellAboveBG	rlsWellAboveBG	フィーチャのシグナルがバックグラウンドと有意に差があるかを判定。BGSubsignalの値が、バックグラウンドの標準偏差(エラーモデルから算出)を各アレイフォーマットの最適値倍(デフォルトは13倍)した値よりも大きいかどうかで判定。 PosAndSignifよりも厳しい判定法。 0 バックグラウンドと差がないフィーチャ 1 バックグラウンドと差があるフィーチャ

スポット数値化と解析

DNA マイクロアレイの解析には 2 種類のソフトウェアを使用します。

まずスキャンで得た TIFF イメージからスポットの数値化を行うソフトウェアが必要になります。ここでは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 はこれに加えてバックグラウンドの引き算を行い、最終的なシグナル強度 (Processed Signal) を結果として出力します。

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。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数値化のアウトプットデータを理解した上で、GeneSpring GX 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。

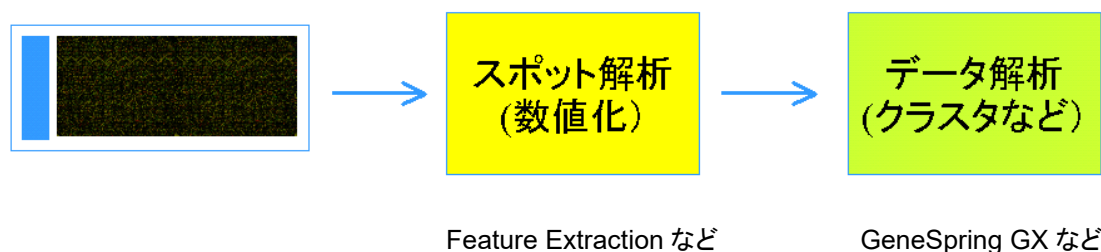


図: スポット解析、データ解析の流れ

スポットの数値化は以下の手順で行われます。

- ① スポットの中心位置の決定
- ② スポット (Feature) およびバックグラウンド領域の決定
- ③ スポット (Feature) のシグナル強度計算
- ④ バックグラウンドのシグナル強度計算
- ⑤ バックグラウンド補正
- ⑥ Multiplicative Detrending

これらのステップ後、最終的なシグナル強度 (Processed Signal) が出力されます。

Appendix1 : total RNA の品質チェック

Step1. UV-Vis による total RNA の評価

本プロトコルでは、測定に用いるサンプル量を抑えるため、NanoDrop の使用をお勧めいたします。NanoDrop を使用する場合は、メニュー画面で Nucleic Acid Measurement をクリックし、Sample Type は RNA-40 と選択します。

- 少なくとも、以下の 4 つの波長における吸光度を測定して下さい。
 - A₂₃₀ グアニジンイソチオシアネートや塩類・糖類、その他有機溶媒などの混入を検出します
 - A₂₆₀ TotalRNA の濃度を測定します
 - A₂₈₀ タンパク質・フェノールの混入を検出します
 - A₃₂₀ 異常な吸収がないかをチェックします
- 以下の基準を満たしているかをチェックして下さい。
 - $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$ $A_{260}/A_{230} > 2.0$

この基準を満たしていない場合、タンパク質や有機溶媒の混入が疑われ、ラベル化反応がうまくいかないことが予想されます。また、RNA を正確に定量できていない可能性もあります。抽出をやり直すか、混入物を除去するための追加の精製を行って下さい。

UV スペクトルを採取し、スペクトルパターンを記録して下さい。

純度の高い核酸のスペクトルは、230nm に谷、260nm に吸収極大があり、長波長側の吸光度は 0 で安定しています。

Step2. Agilent 2100 Bioanalyzer による total RNA の評価

UV-vis の測定結果からは RNA がどのぐらい分解しているかを知ることができません。必ず電気泳動で RNA が分解していないか、確認してください。本プロトコルでは、Agilent 2100 Bioanalyzer を推奨しています。

Agilent 2100 Bioanalyzer を用いる場合は、サンプルの濃度に応じて、RNA6000 Nano kit あるいは Pico kit を使用してください。実際の操作は各キットの説明書に従ってください。

電気泳動の結果から下記 3 点を確認し、分解していないか評価してください。

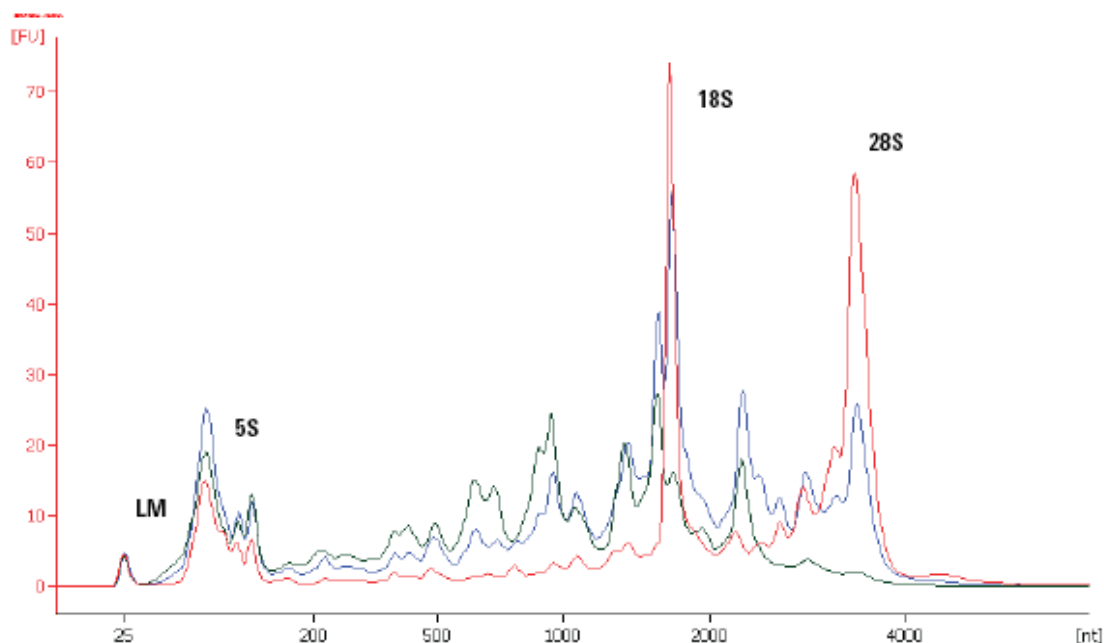
- 18S および 28S リボソーマル RNA (あるいは生物種特有の rRNA) の明確なピークが確認できる
- 18S および 28S リボソーマル RNA のピーク間に分解物がない
- 18S リボソーマル RNA ピークと Lower Marker 間に分解物がない
(5S リボソーマル RNA は精製法によって高さが変わります。カラムを用いて total RNA を精製した場合、通常低くなります。)

Agilent 2100 Expert Software は、total RNA の品質の指標として **RNA Integrity Number (RIN)** を自動で算出します。RIN を使うと、RNA の分解具合などの品質の標準化が容易になります。

RIN や Bioanalyzer に関するより詳細な情報は、以下のウェブサイトより、“RNA integrity number(RIN)-Standardization of RNA quality control” (part number 5989-1165EN) をご覧下さい。

www.agilent.com/chem/labonachip

下の図では、分解具合の異なる3種類の total RNA を分析した結果のエレクトロフェログラムを示しています。お客様が、品質の悪い total RNA による実験結果の偏りを排除するために、RIN の各々の閾値を実験系ごとに決定することが重要となります。



状態の異なる(ヒト)total RNA を Eukaryote Total RNA Nano assay によって分析した結果
赤…RIN 8.1 青…RIN 5.9 緑…RIN 3.6

Appendix2: サーマルサイクラーを用いた実験プロトコル

ウォーターバスの数に限りがある場合、サーマルサイクラーを用いて実験をすることも可能です。ただし、ウォーターバスを使用した場合と比べると、cRNA の収量は少し下がる傾向があります。

Step1.サーマルサイクラーのプログラム設定

下記のようにプログラムを設定します。

プログラム 1: 65°C 10 分、4°C hold

プログラム 2: 40°C 2 時間、70°C 15 分、4°C hold

プログラム 3: 40°C 2 時間、4°C hold

4°Cのステップは 5 分で十分です。次のステップの準備が整っていない場合は、4°Cに置いてください。

Heat Lid の設定にしてください。

Step2.total RNA からの cDNA 合成

1. p.14 に従い Spike-Mix を希釈します。
2. 25ng から 100ng の total RNA を PCR チューブあるいは 96 穴 PCR プレートに 2.3uL 加えます。十分量のラベル化 cRNA を得るためには、88x15K、8x60K、4x180K、2x400K フォーマットの場合は 50ng 以上の total RNA、1x1M フォーマットの場合は 100ng の total RNA を用いることをお勧めいたします。
3. p.15 の表に従い、を調製します。
4. 3uL の WT primer Mix を各チューブに加え、よく混ぜます。総量は 5.3uL になります。
5. サーマルサイクラーに PCR チューブあるいは 96 穴 PCR プレートをセットします。プログラム 1 を走らせ、熱変性を行います。
6. 65°C 10 分の過程が終了したら、氷上に移します。
7. p.16 の表に従い、cDNA Master Mix を調製します。
8. 4.7uL の cDNA Master Mix を各サンプルに加え、ピペティングで良く混合します。総量は 10uL になります。
9. サーマルサイクラーに PCR チューブあるいは 96 穴 PCR プレートをセットします。プログラム 2 を走らせ、cDNA 合成反応をスタートします。

Step3.ラベル化 cRNA の合成

1. 1.5mL のチューブに、p.17 の表に従い Transcription Master Mix を調製します。使用直前に T7 RNA polymerase Blend をマスターミックスに加えます。ピペティングで良く混合します。
2. サンプルはマスターミックスを添加するまで、サーマルサイクラー中で 4°C、あるいは氷上に置きます。
3. 各サンプルに、6uL の Transcription Master Mix を加え、ピペティングで良く混ぜます。
4. サーマルサイクラーに PCR チューブあるいは 96 穴 PCR プレートをセットします。プログラム 3 を走らせ、cRNA 合成反応をスタートします。
5. p.18 に従い、ラベル化 cRNA を精製します。その後の操作は、1.5mL チューブでラベル化を行った場合と同じです。

Appendix3: 詳細なスキヤナの起動手順

B スキヤナまたは C スキヤナをお使いの場合

1. PC の電源を入れログインします。
2. PC が完全に立ち上がってからスキヤナの電源を入れます。
3. スキヤナ前面の LED が緑とオレンジに点灯している(点滅ではありません)ことを確認します。電源を入れてから数分かかります。
4. スキャンコントロールソフトを立ち上げます。スキヤナと PC の通信が始まってから、レーザーが安定するまで 20 分ほどかかります。

SureScan をお使いの場合

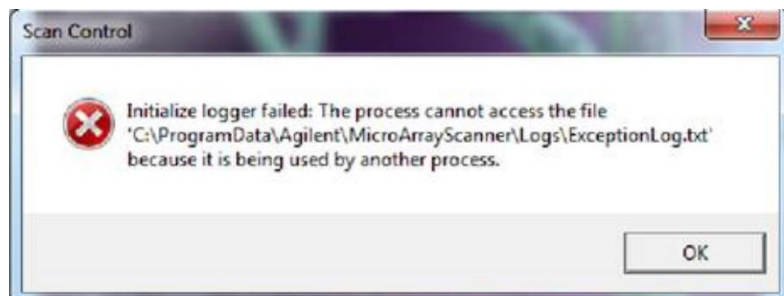
1. PC の電源を入れログインし、スキヤナの電源を入れます。
2. スキヤナ前面右上にある LED がオレンジ→白色の順に光り、しばらくすると消灯します。LED が消灯するまで待ちます。(電源を入れてから数分かかります。)
3. スキャンコントロールソフトを立ち上げます。
4. スキヤナの初期化が始まりますので、初期化が終わるまで待ちます。
5. スキャンコントロールソフトの画面右下にある Scanner Status が Ready になることを確認します。
※デフォルト設定では、Ready の状態で 5 分間、スキャン開始せずに待機すると、省電力のためレーザーが OFF になります。スキャンのために Queue に入れるとレーザーが自動点灯し、Status が Ready になります。

いずれのスキヤナでも、スキャン後はスライドフォルダを取り出し、コントロールソフトを閉じてください。その後スキヤナおよび PC の電源を落としてください。

通信エラーが起きた場合などは、PC とスキヤナの電源を切った後 10～15 分ほど待ち、上記手順で PC とスキヤナの再起動をお試しください。それでも改善しない場合は、エラー内容を弊社サポート窓口までお知らせください。

SureScan で 'Initialize logger failed' のエラーが出た場合の対処法

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 の中にある、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

Appendix4 : Feature Extraction 用デザインファイルのダウンロードサイト

デザインファイルは eArray からダウンロードすることができます(ご使用の際、ご登録が必要となります)。

【eArray】 <http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=29443>

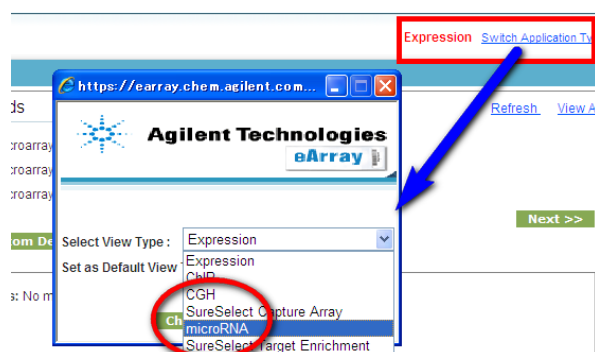
1. お使いのマイクロアレイのデザイン番号 (Design ID)を確認します。

デザイン番号: マイクロアレイのラベルに記載されている 12 桁の番号の「25」に続く 5 桁の番号の頭に「0」を付けた 6 桁の番号。この 12 桁の番号は Feature Extraction の出力ファイルからも確認できます。

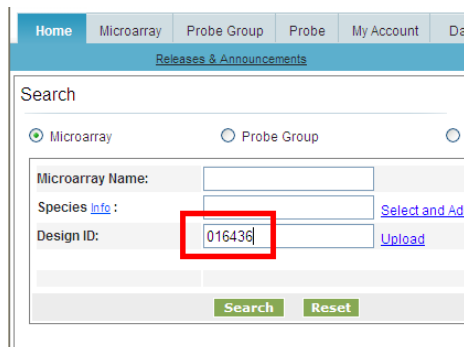
例) 12 桁の番号が **251469312345** の場合… [14693] の頭に「0」を付けた **014693**



2. eArray にログイン後、画面右上の「Application Type」を Expression に変更。



3. HomeタブでMicroarrayにチェックを入れ、Design ID 欄にデザイン番号を入れてSearch。



4. Search 結果から「Download」を選択

Search Results: 1 matching results found

[Move](#) [Share](#)

☐	Microarray Name ▲	Microarray Set Name	Folder Name	Status	Design ID	Created Date	Actions
☐	Human miRNA Microarray		AgilentCatalog	Submitted	016436	26-Apr-2007	Order View Download

5. Internet Explorer の Pop Up Blocker を Off にし、「EXTERNALFULLGEML」(= Feature Extraction 用デザインファイル) をダウンロード

Download		If you have difficulty downloading the desired file, hold down the <Ctrl> key until a File Download dialog box appears. This bypasses pop-up blocking software.
☐	Category	File Type
☐	BED	BED
☐	CROSSSPECIESHITS	CrossSpeciesHits
☐	EXTERNALFULLGEML	GEML 1.0
☐	EXTERNALFULLGEML2	GEML 2.0
☐	FASTA	FASTA
☐	GAL	GAL
☐	GENELIST	List
☐	GEO	GEO

Appendix5 : 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

※ 2017 年 4 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。

QC Metric Set のダウンロードサイト

最新の QC Metric Set は下記サイトからダウンロードできます。Feature Extraction 9.1 以降に対応しています。

<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=2041>

Appendix6 : 1 color 実験の Normalization

1 color 実験で得られた複数のアレイデータを相互比較するためには、Normalization (正規化) が必要です。

2 つのサンプルを異なる色素でラベル化し、競合ハイブリダイゼーションさせる 2color 実験では、基本的に **Dye Normalization (色素補正)** が適用されますが、1 color 実験では、データの特徴と実験の目的 (実験デザイン) を考慮して、適切な Normalization 方法を選択する必要があります。

ここでは、1 color 実験の Normalization の基本的な考え方を理解するために、GeneSpring GX の設定を例として、代表的な Normalization シナリオを紹介します。

Normalization Step

Normalization を行う Step は、大きく分類すると、**Data Transformation**、**Normalization**、**Baseline Option** の 3 種類あります。

- **Data Transformation** の例としては、バックグランド補正の結果生じたデータのマイナス(－)値をプラス(＋)値に変換することが挙げられます。
- **Normalization** は、アレイ間のシグナル強度の 系統的な誤差を補正して、生物学的な変動を抽出することが目的です。
- **Baseline Option** は、サンプル間の遺伝子発現の 絶対値ではなく、発現パターンの違いに着目して解析し、生物学的な意味を引き出すために行います。実験デザインにあわせた設定をする必要があります。

これらの Normalization Step 中には、様々な Normalization のアルゴリズムが存在します。

下記に、Normalization Step に含まれる代表的な Normalization アルゴリズムを示します。

実験デザインに応じて、適切な Normalization アルゴリズムを含んだ Step を組み合わせ、Normalization シナリオを作成します。

Data Transformation

【Threshold raw signals to XX】－ バックグランド補正の結果生じ、生物学的に意味のない負(マイナス)の値を引き上げます。GeneSpring のデフォルト設定では、以下の数値を1の値に置き換えます。

Normalization

- 【Percentile Shift】－ アレイごとに、測定値の Median または特定の Percentile の値を1に揃えます。
- 【Quantile】－ 発現値をランキングし、同じランクの値の平均値を発現量として使用します。
- 【Scale】－ サンプルの中央値を使って補正します。
- 【Normalize to Control Genes】－ アレイごとに、ポジティブコントロールの測定値の Median で補正します。この補正は、ポジティブコントロールのターゲットとプローブが、いかなる条件下でも一定量のハイブリダイゼーションを示し、かつハイブリダイゼーションの効率がポジティブコントロールの遺伝子群と、その他の遺伝子群で同等であるという前提に基づいています。

Baseline Option

- 【Do not perform baseline transformation】:補正しません。
- 【Baseline to median of all samples】: 発現の絶対量にかかわらず、発現量の変化(発現パターン)に着目して解析する場合に使用します。明確なコントロールサンプルが存在しない場合に使用します。
- 【Baseline to median of control samples】:コントロールサンプルに対する各遺伝子の発現量の増減に着目して解析する場合に使用します。

—解説

Normalization

図1に示した Raw Data の分布を表したヒストグラム(シグナル強度を縦軸においたヒストグラム)では、他の Sample に比べて、Sample 4 (S4)のシグナル強度が、全体的に高くなっています。この場合、Sample 4の真の遺伝子発現が全体的に高いことも考えられますが、この仮定が妥当なものともみなされない場合は、このシグナル強度の違いは、RNA 抽出・ラベル化・ハイブリ・洗浄・スキャニングのムラなどの実験誤差による影響だと考えられます。

Normalization は、1枚のアレイ全体のシグナルレベルを補正し、実験誤差による影響をキャンセルすることで、生物学的な変動を抽出することを目的としています。

【Scale】・【Percentile Shift】は、**多数の遺伝子を網羅的に搭載したアレイデータを使った場合、大多数の遺伝子の発現量に変化がなく、その中央値や Percentile 値は各アレイ間でほとんど変動しない**という仮定に基づいています。その仮定をもとに、各アレイでの発現強度の Median 値などを使い、全遺伝子の発現強度(シグナル強度)を割って補正を行います。いわゆるグローバルノーマライゼーションになります。

この Normalization の結果、Median 値や Percentile 値が 1.0 となる Normalization 値が算出され、各アレイ(Sample)間のシグナル強度を相互比較することが可能になります(図 1)。

※ アジレントのカタログアレイでは、コントロールプローブを除いた全プローブの **75%tile** の値が Median の値よりも堅牢であり、この目的の補正には 75%tile の値を使うことを推奨しています。

(<http://www.nature.com/nbt/journal/v24/n9/full/nbt1241.html> をご参照下さい)

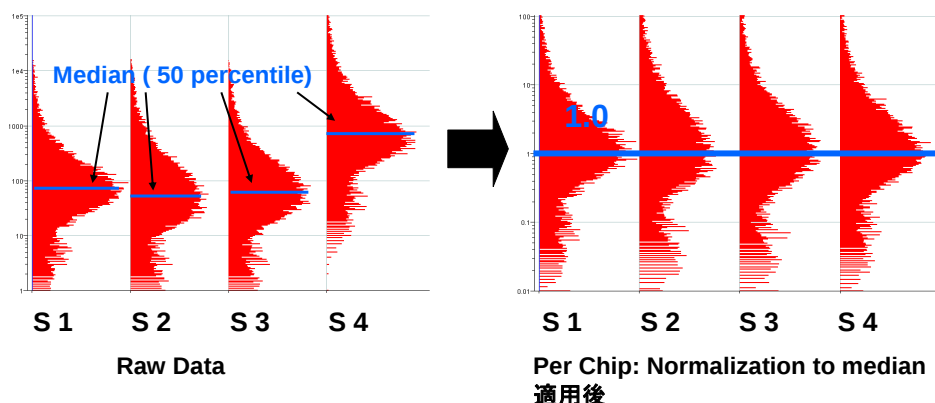


図1. Per Chip: Normalize to median (50 percentile)

注意 対象となる生物種の遺伝子を網羅することを目的としてデザインされたアレイでは、搭載されているプローブ数に比べて、実験に用いる Sample で真に発現している遺伝子が少ない場合があります。この場合、真に発現していない遺伝子プローブが、シグナル強度が低い領域に多数存在し、その割合の違いが Median の値に影響を与えます。

この影響を避けるには、発現していないとみなされる遺伝子に absent のフラグがたったプローブを除いて、Median を計算する方法があります。またフラグが自動的に付かない数値化ソフトウェアを使用している場合は、各 Sample で適切な Percentile (例: 75 percentile) 値を検討してもよいでしょう。

(参考)

比較したいサンプル間で、遺伝子の発現量の Median 値が一定であるという仮定が成立しない場合、Normalization 【Percentile Shift】や【Scale】は適切なアルゴリズムではありません。

仮定が成立しない例として、下記の場合が考えられます。

1. 遺伝子数が少なすぎる (Median や Percentile 値が信頼できない)
2. 特定の遺伝子のみを意図的に集めたテーマアレイ (大部分の遺伝子の発現が変化する)
3. 大多数の遺伝子の発現を変えるような状態、あるいは処理を行った

このような場合には、【Normalize to Control Genes】が選択肢のひとつとして考えられます。Control Gene は、ハウスキーピング遺伝子に代表される遺伝子群 (常に一定のレベルで発現していることが期待される遺伝子群) や、一定量に調製されたスパイクコントロールサンプルに対応するプローブなどがあります。ただし、この方法は個々の Control Gene の発現レベルが変動した場合、結果に大きな影響を与えます。ハウスキーピング遺伝子群を用いる場合は、できるだけ多くの Control Genes を設定し、その Median 値を使うと、より保守的な Normalization になります。

Baseline Option

Normalization の後に、サンプル間の遺伝子の発現量の違いではなく、発現パターンの変化に注目して、生物学的な意味を抽出するのを助ける目的で行います。発現量の多少にかかわらず、同じときに発現量が増えたり減ったりしている遺伝子は、①機能的に近い関係にある、②同じ転写制御の元にある、③同じカスケードの下流にある、といった仮定にもとづいて解析を行う場合に有効です。逆に、この Transformation により、すべての遺伝子が1の周りの変動に収束するので、発現量の絶対値に注目した解析を行う場合は、この Transformation Step は必要ない、もしくは不適切な場合があります。

例1 明確なコントロールサンプルがない場合

【Baseline to Median of all samples】は、特にコントロールサンプルが存在しない実験デザインの場合に用います。

Baseline to Median of all samples の計算例を図2で示します。図2は、5つの Sample 中での、遺伝子 A と遺伝子 B の動きを示しています。遺伝子 A では S5 の値が、遺伝子 B では S3 の値が Median になります。よって、遺伝子 A では S5 の Normalization 後の Normalized 値で各 Sample の値を、遺伝子 B では S3 の Normalized 値で各 Sample の Normalized 値を割ります。結果として、遺伝子 A では S5 の値が 1.0、遺伝子 B では S3 の値が 1.0 となります。

Normalization を適用した段階では、発現量の絶対レベルによって、Normalized 値が示されます。次に、Baseline to Median of all samples を適用すると、全ての遺伝子が1の周りの変動に収束してきます。

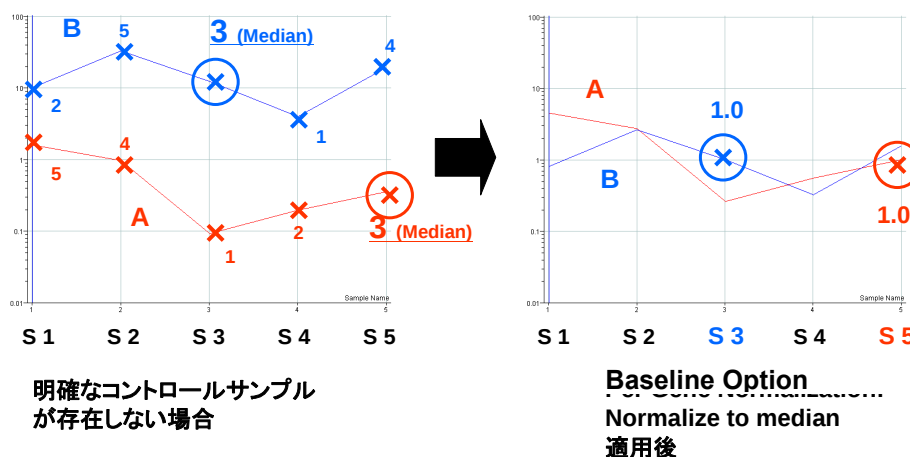


図2. Baseline Option
明確なコントロールサンプルがない場合

例 2 コントロールサンプルに対する比較実験の場合

コントロールサンプルに対する比較実験の場合は、【Baseline to median of control samples】を適用します。コントロールサンプルの各遺伝子の Normalization 後の Normalized 値で、全 Sample の Normalized 値を割ります。コントロールサンプルの Normalized 値は1になります。それ以外の Sample で1より大きな(小さな)Normalized 値を得れば、その Sample ではコントロールサンプルよりも発現が高い(低い)ということができます。Baseline to median of control samples の例を図 3 に示します。この例では、S1 がコントロールサンプルであり、遺伝子 A、B ともに S1 の値で各 Sample の値を割ります。その結果、遺伝子 A、B は S1 の値が 1.0 になっています。

Median もしくは Specific Sample のどちらを使用した場合も、Baseline Transformation の適用により、全ての遺伝子の Normalized 値は1の周りに収束してきます。

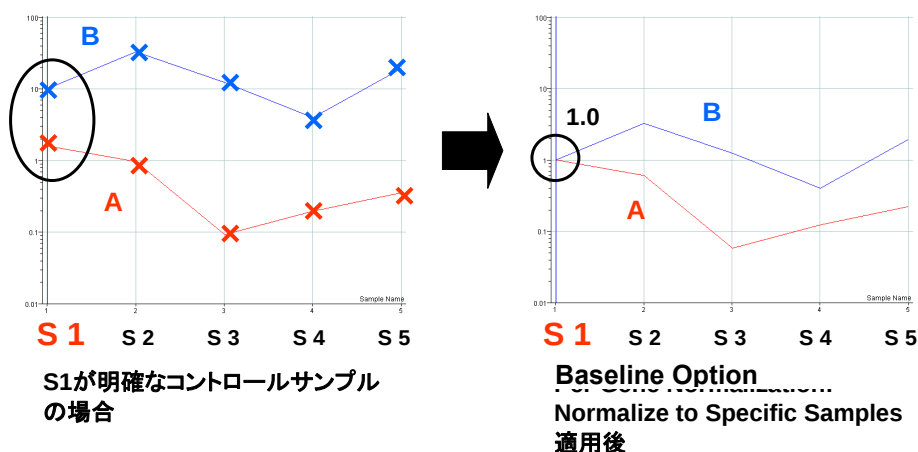
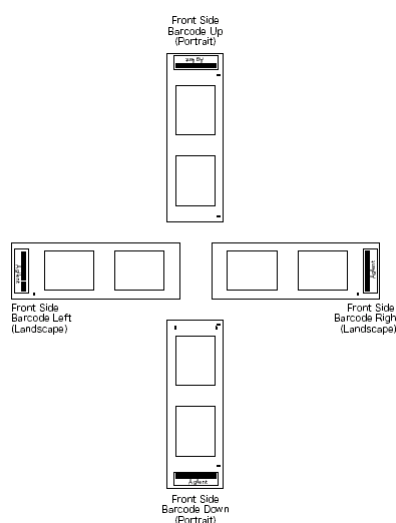


図3. Baseline Option
明確なコントロールサンプルがある場合

Appendix7 : マイクロアレイのレイアウト

キットに付属の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 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。弊社のスキャナはアレイ面を裏側から、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。並び替えたデザインファイルもマイクロアレイキットに付属の DVD に含まれておりますので、次の点をよくご確認したうえ、適切なデザインファイルをお使いください。

※カスタムアレイに付属の DVD にはデザインファイルは含まれません。カスタムアレイのデザインファイルは、eArray からダウンロードしてください。



- 1) アレイの表面側(front side)からスキャンしているか(バーコードにAgilentの文字がある側からスキャン)。
- 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。

デザインファイル名には、アレイ種類(Design ID)とファイル更新日の情報が含まれております。

デザインファイル名の例:

014850_D_20060725

└──────────┘ └──────────┘

アレイ種類 更新日
(Design ID)

Appendix8 : 弊社 DNA マイクロアレイサポート用ホームページ

弊社の 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な情報を掲載しております。

(アメリカ本社ウェブサイト) <http://www.genomics.agilent.com/en/home.jsp#>

本社のサイトに掲載してありますキャンペーンの中には、日本国内ではご利用いただけないものもございますことをご了承ください。

アジレントゲノミクス 日本ウェブサイト

<http://www.agilent.com/chem/genomics.jp>

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.

HOME > 分野別ソリューション > ゲノミクス

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

ゲノミクス

ホットニュース

イベント

- NGS 現場の会 第五回研究会
2017年5月22日(月)~24日(水)
宮城 / 仙台国際センター 展示棟
★展示
★スポンサードセッション
5月22日(月)14:30-15:15
デモの詳細はこちら
- 最新のイベント情報

キャンペーン

- 4200 TapeStation システム 研究支援キャンペーン
- キャンペーン一覧

製品

- マイクロアレイ
 - GeneExpression
 - miRNA
 - CGH
 - 機器
- SureSelect/HaloPlex
- データ解析
- TapeStation
- バイオアナライザ
- リアルタイムPCR
- 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ランスクリプトーム

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

お問い合わせ先

お電話 : 0120-477-111
E-mail : email_japan@agilent.com
GeneSpring 製品のお問合せ : genespring_jp_support@agilent.com

- ゲノミクス製品はこちら
- ストラタジーン製品はこちら
- GeneSpring 製品はこちら

- eArray
- 実験に必要なもののリスト
- サポートページ

サポートページにて、最新版の和文マニュアルをダウンロードすることができます。

Copyright Agilent Technologies 2017

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が、万一ご不審な点や誤り、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、CD-ROM 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で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。**