アジレント Low Input Quick Amp WT Labeling Kit 実験プロトコル 2 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 [2017 年 5 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

1. はじめに
2. 使用するキットの確認
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
9. 実験:2日目
10. Agilent スキャナを用いたスキャニング 42
11. ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイの画像化48
12. Feature Extraction ソフトウェアで数値化を行う前に51
13. Agilent Feature Extraction ソフトウェアによる数値化52
Appendix1:total RNA の品質チェック63
Appendix2:サーマルサイクラーを用いた実験プロトコル65
Appendix3:詳細なスキャナの起動手順66
Appendix4:Feature Extraction 用デザインファイルのダウンロードサイト68
Appendix5:マイクロアレイのレイアウト7(
Appendix6 : 弊社 DNA マイクロアレイサポート用ホームページ

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 ルシュート・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

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2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。 弊社の Low Input Quick Amp WT Labeling Kit, Two-color (製品番号 5190-2944)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。



2 サンプルを1 アレイにハイブリダイズし、アレイ内のシグナル強度比を測定

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 2 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。
- 本プトロコルでは、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。
- ハイブリエイドの使い方の絵を一部修正しました。
- オーブンの写真を型番 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. 使用するキットの確認

Low Input Quick Amp WT Labeling Kit, two-color 48 反応分 (製品番号 5190-2944)

(※本キットは WT Primer Mix、Cyanine 3-CTP および Cyanine 5-CTP を含みます)

<内訳>

- WT Primer Mix
- Cyanine 3-CTP および Cyanine 5-CTP(24 反応分チューブ×各1本)
- Low Input Quick Amp Labeling Kit 単品 x2(製品番号 5190-2308、24 反応分 この製品番号の商品は WT Primer Mix, 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およびCy5-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。



<u>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</u> <u>WT Labeling Kitをご使用ください。</u>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(2 カラー用) (製品番号 5188-5279)

- Spike A Mix (10uL)
- Spike B Mix (10uL)
- Dilution buffer(1.2mL) ※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)
※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 5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

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 (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。

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

※オゾンフリーブースがない場合にご使用ください。

必要なソフトウェア

スキャナ	スキャンコントロール	Feature	GeneSpring
	ソフト	Extraction	GX
高解像度仕様の	v8.4.1 以降	v10.7 以降	11.5 以降
C スキャナまたは	(SureScan は v9.1)		
SureScan			
Bスキャナ、	V7.0.1 以降	V9.5 以降	
C スキャナまたは	(SureScan は v9.1)		
SureScan			
	スキャナ 高解像度仕様の C スキャナまたは SureScan B スキャナ、 C スキャナまたは SureScan	スキャナスキャンコントロール ソフト高解像度仕様のv8.4.1 以降C スキャナまたは(SureScan は v9.1)SureScanV7.0.1 以降C スキャナまたは(SureScan は v9.1)SureScanいろ.1 以降	スキャナスキャンコントロールFeatureソフトExtraction高解像度仕様のv8.4.1 以降v10.7 以降C スキャナまたは(SureScan は v9.1)SureScanV7.0.1 以降V9.5 以降C スキャナまたは(SureScan は v9.1)SureScan



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。

180K	180K	180K	180K

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。



※ 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)

(2014 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		0 (サンプル	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業です。 Total RNAの濃度に合わせ、 ナノキットおよびビコキットのどちらかをご利用くだ
တရင		濃度により いずれか を選択)	Agilent RNA 6000 ピコキット	Agilent	5067-1513	指定	1		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。
	0		1.5ml遠心チューブ (Nuclease-free, 耐熱性)						RNase Freeの物をお使いください。オートクレー ブ処理はお勧めしません。
ラベル化反応・	0		ピベット各種(0.5ul-1ml)						
ラベル化cRNA 精製・ ハイブリダイ ゼーション共通	0		ピペットチップ (Nuclease-free)			相当	適宜		使用するピペットに適合するRNase Freeの物をお 使いください。オートクレーブ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		220		相当適宜		Sサイズ
	0		(ラベル化・ハイブリ操作 に使用。パウダーフリー	Kimberly Clark	330	相当			Mサイズ
			のものをご使用くださ い。)	ļ	440				Lサイズ
		0	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。
	〇 実験手法		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
	に応じてい ずれかを選 択		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
	0	Exec	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ーCTPが24反 応分含まれます)
ラベル化反応	実験手法 に応じてい ずれかを選	遺伝子発 現原核生 物用	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)
7' יייאנטויערי "ל	択		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。
	0		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
	実験手法に応じていたわかた		Oisson Rhossy mini kit	Qiagon	74104	***		50精製分	に1本使用します。推奨はQiagen RNeasy mini kit です。
	選択		Qiagen RNeasy mini kit	Giagen	74106	加ル	<u> </u>	250精製分	Ī
	0		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。
		0	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。

	0		マイクロアレイ用ハイブリ ダイゼーションチャンパ	Agilent	G2534A	指定	2		ガスケットスライドが別途必要です。
			8x15K、8x60Kフォー マット用ガスケットスライ	Agilent	G2534-60014 G2534-60015	指定	1		5スライドセット 20スライドセット
	_		K K		G2534-60016	指定	1		100スライドセット
	0		4x44K、4x180Kフォー マット田ガスケットスライ	Agilent	G2534-60011 G2534-60012	指定 指定	1		<u>5スライドセット</u> 20スライドセット
	フォーマット		K	·	G2534-60013	指定	1		100スライドセット
	や実験数に応じて選		2x105、2x400Kフォー マット用ガスケットスライ	Agilent	G2534-60002 G2534-60009	指定	1		5スライドセット 20スライドセット
	択		K	-	G2534-60006	指定	1		100スライドセット
			1x244K、1x1M フォー マット用ガスケットスライ	Agilent	G2534-60003 G2534-60008	指定	1		20スライドセット
			F		G2534-60005	指定	1		100スライドセット
ハイブリ ダイゼーション	0		Gene Expression Hybridization Kit	Agilent	5188-5242	指定	1	8x15K,8x00x: 100アレイ分 4x44K,4x180K: 45アレイ分 2x105K,2x400K: 20アレイ分 1x244K,1x1M: 10アレ <u>イ分</u>	
		0	2 x Hi-RPM Hybridization Buffer (25ml)	Agilent	5190-0403	指定	1		5188-5242に含まれるHybridization Buffer、 Blocking Agenteの大容量製品です。
		0	10 x Blocking Agents	Agilent	5188-5281	指定	1		Diopynik Ukonovy z II. W KKW K 2 A
	~	0	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		オブ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スケットス 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。
	O Wash		Gene Expression Wash Buffer 1 (4L)	Agilent	5188-5325	指定	1	500 mL程度	
	buffer単品 および Triton x-		Gene Expression Wash Buffer 2 (4L)	Agilent	5188-5326	指定	1	250 mL程度	
	102、 あるいは Wash Pack		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
	のいずれ かを選択		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。
		0	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ソンか好せ9の場中 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。
洗浄		0	Acetonitrile, annydrous 99.8%, 1.L	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。
	0		イソフロバノール (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。
		0	密閉容器			相当	1個		4Lの洗浄バッファ2を保温することが難しい場合 は、洗浄バッファ2を必要量を密閉容器に移し、保 温します。
	O 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。ニトリルグロープとフラッドビンセット 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。
	M.C. M. W.		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フでソルクローノ とフラットピンセット33Aのどちらかを使用すること をお勧めします。
	洗浄用カフ さらに2個(修	ス容器の 必 群 <u>体用含め</u>	シ要数について 1色法では て計5個)必要です。	スライド解体用に1個	、Wash1と2用に谷	1個すつ(解体用含6	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
	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	枚なら中る	選択しま	す。	
	0		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	ガスケット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。 WPaston90201やPyrex等の小さな 容器を使用する場合は、作業をしやすくするため、 ビンセット33Aも合わせて使用することをお勧めし ます。
			《一回の洗浄が5スライド	以下の場合:必要な	のを組み合わせ	て購入くた	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。
	0		スライド洗浄ガラス容器	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。
洗浄	1回に実験 するスライ ドグラス枚 数により大		(Dish) (//\`)	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
	2657231		《一回の洗浄が8スライド	以 <u>下の場合:必要な</u>	ものを組み合わせて	て <u>購入くた</u>	さい》		がめりましたり欧田町肥とす。
			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	ーーー 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〉					
	0		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。
	ı	0	漏斗 500mLの褐色または透明			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
ハイブリダイ ゼーションおよ	0	0	なガラス瓶 ブロワー			相当	7 個		びS&D溶液を保存するために使用します。 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ワーをご使用
ひ洗浄									ください。 スキャン時のオゾンによる蛍光色素の褪色を軽減
スキャン		0	オゾンバリアカバー	Agilent	G2505-60550	推奨			します。アンレントアレイおよひアジレントBあるい はCスキャナの組み合わせで使用可能です。 SureScanには使用できません。

Low Input Quick Amp WT Labeling Kit 2 色法実験プロトコル

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	0		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
のQC	0		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
	0		ヒートブロックあるいは ウォーターバス (37°C、40°C、60°C、 65°C、70°C、80°C)			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。
ラヘル化反応		0	卓上遠心器	日本ミリポア	チビタンII	相当			
わよい ハイブロダイ	0		アイスバケツ						
ゼーション 準備	0		高速遠心機			相当			4°C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。
	0		ボルテックスミキサー			相当			
ハイブリダイ	0		ハイブリダイゼーション オーブン	Agilent	G2545A	指定	1台		別途下記専用ローターが必要です。
ゼーション	0		ハイブリダイゼーション オーブンローター	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	0		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。
	0		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
l i		0	スターラー付恒温槽	株式会社日伸理化	SW-500NT	相当	1台		ターフーは2台必要です。
法海	0		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。
2017		0	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ワーで代用可 能)、あるいは窒素パージしてスライドグラスを保 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	0		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		0	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(50-0099)またします

【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°C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°C、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に計画して下さい。

5. 実験を始める前に

- 実験室内では必ず白衣、手袋、必要に応じてマスク、眼鏡をご着用ください。
- スライドグ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。弊社でも留意しておりますが、操作時の安全には、
 各自で十分ご注意いただきますよう、お願い申し上げます。
- 毒性のある溶液に触れたチップやチューブの廃棄場所は、弊社担当者にご確認ください。
- Cyanine 3-CTP と Cyanine 5-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。
- 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。
- Cyanine 3-CTP と Cyanine 5-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。
- 本キット中の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



Step	Temper	ature Time
c	DNA合成 155 m	in
プライマーとテンプレートの	⊃熱変性 65º	C 10 min
急冷	氷_	E 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		
c	RNA合成 120 m	in
cRNA合成	40°	C 120 min
C	RNA精製 30 mi	n
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(スピンダウン用)
 - ▶ 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℃、40℃に設定。cRNA 増幅&ラベル化反応後 60℃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撹拌し、5~10 秒スピンダウンして液を底に集めます。
 - ▶ 酵素は軽くスピンダウンします。
 - 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 (10mM) および Cyanine 5-CTP (10mM) を各 0.24 uL ずつ 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. RNA Spike A および B 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	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	1:40	1:16	1:8	2
50	1:20	1:40	1:16	1:4	2
100	1:20	1:40	1:16	1:2	2

- ※ 37°C、5分間の加温を行ない、Spike A および Spike B Mix (原液)を溶かします。ボルテックスで 混合し、スピンダウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。以下の手順に従い、Spike A および Spike B をそれぞれ希釈します。
- 1st: 2uL の Spike A あるいは Spike B Mix に 38uL の Dilution Buffer を加えます(1:20) ・ボルテックスで混合し、スピンダウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。
- 2nd: 2uL の 1st 希釈液(Spike A あるいは Spike B)に 78uL の Dilution Buffer を加えます(1:40) ・ボルテックスで混合し、スピンダウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。
- 3rd: 2uL の 2nd 希釈液(Spike A あるいは Spike B)に 30uL の Dilution Buffer を加えます(1:16) ・ボルテックスで混合し、スピンダ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(Spike A あるいは Spike B)に____uLのDilution Bufferを加えます(1:____) ・ボルテックスで混合し、スピンダウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。
- 重要 Spike A は Cy3 でラベル化するサンプルに、Spike B は Cy5 でラベル化するサンプルに加えま す。絶対に間違いの無いようにして下さい。

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℃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、3rdおよび 4th 希釈液は保存、再利用できないので実験の都度調 製します。

8-2. total RNA からのラベル化 cRNA の合成

Low Input QuickAmp WT Labeling Kit は、25 ng 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、マイクロアレイフォーマットに関わらず 50ng 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 totalRNA 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、totalRNA 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 Spike MixA あるいは Spike MixB を使用した2種の WT Primer Master Mix を調製し ます。WT Primer Mix はを調製します。例えば Cy3 あるいは Cy5 でラベル化するサンプルが各4チ ューブずつある場合、それぞれのマスターミックスを5反応分ずつ調製してください。

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

- 注意 Low Input QuickAmp 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)。
- Spike MixA を含む T7 Promoter Primer Mix を Cy3-CTP でラベル化する total RNA に 3uL ずつ加え、Spike MixB を含む T7 Promoter Primer Mix を Cy5-CTP でラベル化する total RNA に 3uL ずつ加えます。ピペッティングあるいはタッピングで良く混合後、スピンダウンします。合計 5.3uL になります。Spike Mix と蛍光色素の組み合わせを間違えないようにしてください。
- 4. 65℃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℃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、スピンダ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 スピンダウンします。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ダウンします。
 - 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調製します。ピペッティングで混合し、スピンダウンします。使用するまで室温に置いておきます。

AffynityScript 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。 AffynityScript 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ダウンし、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、スピンダウンしま す。総量は 10uL になります。



10.40℃のウォーターバスで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。
- 各チューブをスピンダウンし、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。
- 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。

注意 Cy3-CTP 用および Cy5-CTP 用のマスターミックスをそれぞれ調製します。

各 Transcription Master Mix に Cy3-CTP または Cy5-CTP のどちらか一方を加えます。例えば Cy3 あるいは Cy5 でラベル化するサンプルが各 4 チューブずつある場合、それぞれのマスターミックスを 5 反応分ずつ調製してください。

	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または	0.24	1 2	24
Cyanine5-CTP	0.24	1.2	2.7
トータル量	6	30	60

スキャン後の蛍光の色と、色素自体の色が異なりますので、十分に注意してください。 色素が光にさらされる時間を極力短くしてください。



- 各チューブにそれぞれの Transcription Master Mix を 6uL 加え、ピペッティングで穏やかに混ぜた 後、スピンダウンします。ラベル化するサンプルと色素の組み合わせを間違えないようにしてくださ い。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°Cに設定
- ハイブリダイゼーションオーブンを65℃に設定(ローターを取り付けておきます)。
 オーブ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-あるいは Cyanine5-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 KitlはQiagen RNeasy Mini Kitl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パ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の収率があがることが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奨めします。
- 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 uLのNuclease-free waterをcRNAに加え、液量を100 µLにします。



- 2. 350 uLのRLTバッファを加え、混合します。
- 3. 250 uLのエタノール(96-100%)を加え、ピペッティングで静かに混合します。 スピンダウンを含め遠心はしないで下さい。
- 4. 700 uL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 uLの調製済みのRPEバッファ(エタノール 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。



- コレクションチューブはそのまま使用し、再度500 uL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1分間遠心し、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のコレクションチューブに移します。



- 30 uL 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℃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℃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 ダウンします。
- 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 ダウンします。
- 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。
- 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】

通常500 ngのトータルRNAからスタートした場合、2.0 - 4.0 ugのcRNAを合成できますが、トータル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、通常の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のヌクレアーゼフリー水で、NanoDropでブランクを設定します。
- 1 uLの増幅(ラベル化) cRNAを測定し、A260とA550とA650を記録します。
- 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。
 cRNA conc. (ng/uL) * = A260 x 40 ug/mL x 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。

cRNA yield(ug) = cRNA conc(ng/uL) \times 30(uL) / 1000

(3) NanoDrop 計測結果より、CyDye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 (Cy3)、A650(Cy5)の値から以下の式で算出して下さい。

Cy3-CTP conc (pmol/ul) * = A550 x 1000 ÷ 150 mM⁻¹cm⁻¹ x dilution factor** Cy5-CTP conc (pmol/ul) * = A650 x 1000 ÷ 250 mM⁻¹cm⁻¹ x 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、CyDyeの濃度と取込率を算出します。

 $Cy3-CTP \text{ incorporation (ng/uL)} = \frac{Cy3-CTP \text{ conc.(pmol/uL)} \times 1000}{cRNA \text{ conc. (ng/uL)}}$ $Cy5-CTP \text{ incorporation (ng/uL)} = \frac{Cy5-CTP \text{ conc.(pmol/uL)} \times 1000}{cRNA \text{ conc. (ng/uL)}}$

cRNAの収量およびCy3-CTPあるいはCy5-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 あるいは Cy5-CTP 取り込み率 (pmol/ug)
1x1M	2.5	15
2x400K	1.875	15
4x180K	1.65	15
8x60K、8x15K	0.825	15

【バイオアナライザによる評価】

- 1.5mLチューブに1.5uLのラベル化cRNAを分注します。熱変性(70℃2分)を行い、氷上に置きます。
 1uLをバイオアナライザの測定に用います。
- 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。 バイオアナライザの検出チャネルは Cy5も励起するため、Cy5 でラベル化したサンプルのデータは Cy3 に比べてピークが高くなる傾向があります。

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。

<u>ラベル化 cRNA の保存</u>

cRNA を直ぐに使用しない場合には、少量に分注し、暗所-80℃で保存します。長期保存の場合は、チューブに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 計で品質を再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
- ▶ ヒートブロック、またはウォーターバス(60°C)
- > ハイブリダイゼーションオーブン(65℃) 使用する機器の温度設定を確認しておきます。
- ▶ ウォーターバスまたはヒートブロックを 60°C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ブンを65°C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ブン温度の校正法≫

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. オーブンのローターと、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 ブ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. オーブンの ▲ 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。
- その後再度表示を 65°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ブン校正方法」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。

60K	60K	60K	60K
60K	60K	60K	60K

- 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。
- 各オリゴ DNA 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スケッ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を乗せることが出来ます。

※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. ハイブリダイーゼーション溶液の調製

8-7-1. 10x Blocking Agent の準備

- 1. スピンダ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 秒スピンダウンし、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. フラグメンテーション溶液の調製

下表に従い、Cy3 ラベル化及び Cy5 ラベル化 cRNA、10x Blocking Agent、Nuclease-free water および 25x Fragmentation Buffer を 1.5 mL 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
Cy3-labeled cRNA	300ng	825ng	1.875ug	2.5ug
Cy5-labeled cRNA	300ng	825ng	1.875ug	2.5ug
10xBlocking Agent	5uL	11uL	25uL	50uL
Nuclase-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

- 60℃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。

Hvbridization mix				
アレイフォーマット	8pack	4x180K	2x400K	1x1M
Fragmentation溶液	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ダウンして(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. ハイブリダイーゼーションチャンバの組み立て

ハイブリチャンバを組み立てるにあたり、以下のキットが必要になります。 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)<u>ハイブリエイド</u>



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)にしっかりはまるようにします。





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スケットのふちまで広がらないように、ガスケット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 GE Hybridization Buffer HI-RPM を、アレイのフォーマットに応じて、上の表の量に従いアプライして下さい。

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

 7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)にしっかりはまるようにします。





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、"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。

※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出来ます。 使用器具: ハイブリエイド (HYB-100)

- 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。



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. クランプアッセンブリを、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締めます。チャンバに ダメージを与える可能性があるので、ペンチなどの道具は決して使用しないでください。



 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。 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るので、泡が動かない場合にはチャンバを手で軽く振り、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。

チャンバの組み立てがすべて終わりましたら、予め 65℃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。チャンバが奇数の場合は、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、バランスをとるようにしてください。





Agilent ハイブリダイゼーション オーブン (G2545A)

ハイブリダイゼーション オーブンロータ (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。



- 12. ハイブリダイゼーションオーブンの扉を閉め、回転数を10 rpm に設定します。
- 13. 65℃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にも2にも行います。

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).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

スライドグラス洗浄の前準備

- 洗浄を始める前に、以下の機器・器具を準備してください。
 - スライドグ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.37)。

スライドグラスの洗浄操作

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	ガスケットスラ	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 : 洗浄液 1: Agilent Gene Expression Wash Buffer 1
 - B : 洗浄液 2: Agilent Gene Expression Wash Buffer 2(37℃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℃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℃で保温して下さい。

弊社では、37℃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、P36 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。

C : アセトニトリル:下記 S&D 溶液を使う場合のみ使用します。ドラフト内で扱ってください。

D : S&D 溶液: Agilent Stabilization and Drying Solution ドラフト内で扱ってください。

取り扱い方法

Agilent S&D 溶液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。

注意 Agilent S&D 溶液は、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、アジレントの保証対象外に なりますので、充分注意して取り扱って下さい。

S&D 溶液加温手順

- **注意** S&D 溶液を扱う際は、火気は厳禁です。また電子レンジ(オーブン)は使用しないで下さい。 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。
- 37-40℃のウォーターバスまたはオーブンでゆっくりと溶液を加温します。S&D 溶液はビニル 袋に入れてからウォーターバスに入れると、ラベルがはがれません。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。
- 注意 出荷時に S&D 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。S&D 溶液は決してろ過しないでください。
- 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、室温に戻してから使用してください。洗浄に使用する際は、マニュアルの詳細に従って、ヒュームフード(ドラフト)内で行って下さい。
- 2 下記の通り、3 つあるいは 5 つの洗浄用ガラス容器を準備します。

ヒュームフード(ドラフト)内で、下記の通り、5 つのガラス容器を準備します。 アセトニトリルおよび S&D 溶液を使わない場合はヒュームフード内で扱う必要はなく、またガラス容 器は 3 つ準備します。

オゾンフリーブースがある場合は、オゾンフリーブース内で洗浄の準備・作業を行ってください(アセト ニトリルおよび S&D 溶液は必要ありません)。
- **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、すべての必要な洗浄液とガラス容 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下さい。
- 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 を守るこ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。

以下のようにガラス容器を3個あるいは5個用意します。

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を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)、回転子を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の洗浄が開始するまで、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

ガラス容器 4:アセトニトリル(S&D 溶液を使うときのみ使用)、回転子を中に入れておきます。 ガラス容器 5:S&D 溶液(オプション)、回転子を中に入れておきます。このガラス容器は S&D 溶液専 用にすることをお勧めします。

- オーブ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、チャンパは必ず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** チャンバをオーブンから取り出し、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)。オーブ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 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。



Low Input Quick Amp WT Labeling Kit 2 色法実験プロトコル

- 4. チャンバの分解
 - 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. クランプアッセンブリを外し、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(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。

2枚のスライドをピンセットで挟み、
 バーコード側のピンセットを
 両手でスライドグラスを
 立てた状態でガラス容器1に入れる。
 2枚のスライドグラス間に入れ
 しっかりはさみ、

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。 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。

- a. 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。
- 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。
- c. 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。

- 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、洗浄の効率を保つ持つために端は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)

	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
<u> </u>	

L	

30 スライドラック(Thermo Shandon113)

- 7. すべてのスライドグラスをスライドラックにセットできたら、スターラーで中程度の回転数で、室温の まま1分間</u>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。 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≫ <u>GC%が高い原核生物をハイブリダイズした場合</u>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。

※S&D 溶液以外のオゾンによる Cy5 蛍光退色の対策が行われている場合

 スライドラックを極めてゆっくりかつ一定の速度で洗浄バッファ 2 から引き上げます。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ください。このステップで洗浄 は終了です。ステップ 16 以降をご覧ください。

※オゾンによる Cy5 蛍光退色の対策として S&D 溶液を用いる場合

10. 洗浄バッファ2からスライドラックを取り出します。この時、少しだけスライドラックを傾け、ラックから洗 浄バッファ2をできるだけ除きます。洗浄バッファ2のアセトニトリル、S&D 溶液への持ちこみは最小 限にして下さい。アセトニトリル、S&D 溶液を含むガラス容器4、5は、あらかじめスターラーが開始し ている状態にしておきます。できるだけすばやくスライドラックをアセトニトリルが入ったガラス容器に 移動させることが重要です。その後、ラックを移したアセトニトリル中で、室温、10秒間攪拌します。回 転速度は中程度あるいはそれよりも強い程度(液面が波立つ程度の速さ)にします。

Low Input Quick Amp WT Labeling Kit 2 色法実験プロトコル

- 11. アセトニトリルからスライドラックを取り出します。できるだけすばやくスライドラックを S&D 溶液が入ったガラス容器に移動させて下さい。その後、S&D 溶液中で、室温、30 秒間攪拌します。回転速度は中程度あるいはそれよりも強い程度(液面が波立つ程度の速さ)にします。
 - 注意 ラックを S&D 溶液の中に置いた時、白濁が数秒の間生じる可能性があります。これはラッ クから持ちこされた洗浄バッファ 2 によるもので、パフォーマンスには影響しません。

注意 次のステップで、スライドラックをゆっくりかつ一定の速度と方向で取り出します。

- 12. スライドラックを極めてゆっくりかつ一定の速度で S&D 溶液から引き上げます。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、スライドグ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 S&D 溶液中に沈め、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。
 - 注意 S&D 溶液の滴がスライドラック下側のスライドグラスの端に残る場合がありますが、プロー ブ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。スライドグ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 S&D 溶液に再度浸し、それから再度極めてゆっくりとかつ一定の速度で取り出し てください。

13 こ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。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 S&D 溶液には、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 の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。弊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グラス を 10 枚までにしてください。このようなスキャニグ操作を行うことで、大気中のオゾン暴露を 最小限にすることが可能です。スキャン中の退色をより確実に防ぐ場合は、P.41 のオゾン バリアスライドカバーをご利用ください。

S&D 溶液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、洗浄バッファ 2 の持ちこみ量によって異なります。

≪S&D 溶液の保存≫

ヒュームフード(ドラフト)内で手袋を着用し、S&D 溶液を密閉できる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。S&D 溶液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。S&D 溶液は初回使用後、2回まで、合計3回まで繰り返し使用できます。 S&D 溶液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。 ≪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。

≪S&D 溶液を使用した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。

アセトニトリルあるいは S&D 溶液と接した器具は、ヒュームフード(ドラフト)内で手袋を着用し、水溶性の 有機溶媒(アセトニトリル、アセトン、エタノール)を使って洗浄します。その後、チャンバや洗浄バッファ用 のガラス容器と同様に、超純水でさらによく洗浄して下さい。

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。

- チャンバ、ガラス容器、回転子およびラックを水ですすぎます。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。

参考值:比抵抗 18.2MΩ·cm, TOC<4

10. Agilent スキャナを用いたスキャニング

レーザーを安定させるために、スキャンを開始する 20 分前までにスキャナの電源を入れます。 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を立ち上げます。詳細な手順は、 Appendix を参照してください。

1. スキャニングの準備

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に有効です。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台のスキャナに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ャナのカローセル(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、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。

c. <u>スライドのスキャン</u> <u>スキャナコントロールソフト ver.8(C バージョンスキャナ)をお使いの場合</u>

- 1. 画面下の"Scanner status"が『Scanner ready』になっていることを確認します。
- 2. 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。

yr do	1 .	Epd dot	10 · Polle 🖉	ner#HD_6/_3	Color			(4)		gperator
lot	Slide ID	Overvels	Scar Region	Resolution	TIFF	R PHT	GPMT	XDR	Output Path	Description
1	cluto detecto	8+5	Aglevt HD (61 x 21.6nm)	5 uni	20 bit	100%	100%	diaber	D: \ScanData	
2	chuto delecto	R+6	Agilent HD (K1 × 21. Enan)	5 un	20 bit	100%	100%	dis20Rb	D: \ScanDate	
2	cluito delecti-	R+6	Aglent HD (\$1 x 21.5nm)	5un	20.58	100%	1001	(No)DPb	D \ScanData	
4	Auto delecti-	R+G	Aglent HD (\$1 x 21. Enm)	5un	20.68	108%	1001	(Na)Dito	D: VScanData	
5	Auto detects	R+6	Aglent HD (81 x 21 finer)	5un	20 br.	105%	1001	(Na)DPb	D. ScanData	
6	Auto detectiv	R+6	Agilent HD (61 x 21.6nm)	Sum	20 bit	108%	100%	(No)@Pb	D: \ScanData	
ř.	(Auto detect)	8+8	Agilent HD (81 x 21.6nm)	Sum	20 bit	108%	100%	(No)(PD	D. (ScanData	
8	(Auto detect)	B+0	Agilent HD (61 x 21, 5nm)	5um	205e	100%	100%	(Ne)(DFb	D. \ScenDiele	
9	Clube delect)	R+6	Agilent HD (61 x 21, 6nm)	Sum	20.64	100%	1004	(Na)/DRo	D. VScanD ata	
0	clare detecto	8+6	Aglent HD (81 x 21,6 mm)	5um	20.64	108%	100%	diaber	D.\ScenDiete	
27			Alter and State Dates	3.569		100.00	X1075	122200	1205121012	

 "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_2Color"、原核生物 8x15K フォーマットの場合は "AgilentHD_GX_2Color"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_2Color"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	Red&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】

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=Cu stom&PageID=2074

- 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。

General			•
Description		Default configuration settings	Save
Scan Setting	5		
Dye channel		R+G	Save As
Scan region		Agilent HD (61 × 21.6mm)	
Scan resolution		5 um	
Tiff file dynamic	range	16 bit	Remove
Red PMT gain		100%	•
		40000	-

- 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ればプルダウンで変更します。 変更できる項目(太字が defalt です)

1). <u>Dye Channel</u> :	Red(1 カラー(Cy5)) Green(1 カラー(Cy3)), <u>Red+Green(2 カラー)</u>	Channels S R+G A F R G R+G A
2). <u>Scan Region</u> :	Full Slide <u>Agilent HD (アジレントアレイ)</u>	Scan Region Agilent HD (61 x 21.6mm) Full Slide (71 x 21.6mm) Agilent HD (61 x 21.6mm) Agilent HD (61 x 21.6mm)

F 3 にない場合は高密度タイプのマイクロアレイ(8x60K,

3). Scan Resolution: 2um, 3um, 5um, 10um,

4x180K, 2x400K, 1x1M)に対応していません。

※ C バージョンのスキャナでも 2um および 3um が選択肢

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

5). <u>R/G PMT gain</u>: 100% ~ 1%

6). <u>XDR ratio</u>: 0.5, 0.33, 0.2, <u>0.1</u>, 0.05, No XDR

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]

double path (2um, 3um, 5um)

- 5. スキャン設定が確認できたら、"Scan Slot n-m"をクリックするとスキャンが開始します。
- 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。 スキャ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ャナおよび PC の電源を消してください。
- <u>スキャナコントロールソフト ver.9.1 (SureScan マイクロアレイスキャナ)をお使いの場合</u>
 - 注意 ドアを手で開けないてください。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。
- 1. 起動すると次の画面になります。

Agilent Microarray Scan Control				_0,
Tools Hob Sides 10 State 017 State 027 State 037 State 040 State	メニューバー	^{ロル Foldor} セッティングペイン	Dye Channel(s) E Scan Ragion Resolution Tiff Orymanic Tange Red PMT Sensitivity (%)	× × ×
スロットステータス インジケータ	スロットテー	-ブル Atto Quase Empty Quase	Green PMT Sensitivity (%) XDR Ratio Transform Image Settings Transform Image Sett Compress Co	× × × ×
10 20 21 22 23 23 23 5tatus Log Scan Log	ファンクシ	ョンボタ Gen box Start Scan	San Deregiption	
		ステータスバー Remaining scan time: 0 min	User Dick space required: 0 1/8 Initial	ze 🦲

Resolution		
5 um	•	1
5 2 um 3 um 5 5 um 5 10 um 2 um double pass 5 3 um double pass		<



TIFF

16 bit <mark>1 16 bit</mark> 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。



 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_2Color(1x1M、 2x400K、4x180K、8x60Kの場合)あるいは、AgilentHD_GX_2Color(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。変更する必要があれば個別 にプルダウンメニューで変更できます。AgilentHD_GX_2Color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。

	Slide ID	State	Scan Protocol
01		Present	D:\Scanr
02/			AgilentHD_CGH AgilentG3_CGH
03/			AgilentHD_GX_1Color
04/			AgilentHD_GX_2Color
05/			AgilentG3_GX_2Color
067			AgilentHD_miRNA
07/			AgilentG3_miRNA AgilenHD_GX_1Color_DoubleScan
087			AgilentG3 GX 1Color HighSensitivity
097			AgilentG3_HiSen_GX_1color AgilentG3_HiSen_GX_2color
107			AgilentG3_HiSen_miRNA

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。
- 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。

🔆 Scan Protocol Editor	×
Scan Protocol:	
⊿ General	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Agilent Defined	
Locked	
▲ Scan Settings	
Dye Channel(s)	Green 🔻
Scan Region	FullAgilentSlide 🔹
Resolution	5 um high sensitivity
Tiff Dynamic Range	2 um
Red PMT Sensitivity (%)	2 um double
Green PMT Sensitivity (%)	3 um
XDR Ratio	3 um high sensitivity 3 um double
· Image Settings	5 um
Transform Image	5 um high sensitivity
Split	10 um
Compress	10 um high sensitivity
File Naming Settings	
Field 1	Instrument SN 🔹
Field 2	Slide ID 👻
Field 3	<none></none>
▲ Image File Info	
File Name	<instrsn>_<slideid>_Sxxx.tif</slideid></instrsn>
Image Width (Pixels)	12200
Image Height (Pixels)	4320 125.55 MD
Disk space required	120,00 MB
Scan une	13 11111
Resolution	
Pixel Size and averaging.	
Save Save As Remove	Import Export Close

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の画像化

実習では、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。

にドラッグ&ドロップ。

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 🇾

② バックグランドのむらの確認

ログスケール表示によりバックグランドのむらを確認します。



③ 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。

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みます)。

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。

③―1:カラーレンジの設定
● をクリック。
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。



③—2: ヒストグラムの作成

 をクリック。Cropping Mode
 をOff にします。

アレイの左上隅で右クリックし、そのままポインタをアレイの右下隅までドラッグさせます。

上述のカラーレンジの設定と併せ て、両チャンネルの分布が極端に 異ならないか確認します。



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。



⑤ カラースワップの確認

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の発現が多い場 合に赤色になるように表示されます。



<u>⑥ ラインプロット</u>

スポットの形状を確認します。



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、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。

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



<u>Grid Template Browser</u> 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 ションごとのファイル。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 GridTemplate Properties**(左図)の window が開きます。**Default Protocol、 Default One Color Protocol** に適切な Protocol を指定しま す。

🖻 General	
Grid Template Name	012106 D 20050601
Design ID	012106
Vendor	Agilent
Pattern Date	Wed, Jun 01, 2005
Array Geometry	
Array format	Rectilinear
Zone format	Single hybridization
Total spots	22575
Subgrids	columns = 1, rows = 1
Spots per subgrid	columns = 215, rows = 105
 Nominal spot diameters (ii) 	n micron)
Horizontal	135.0
Vertical	135.0
🗉 Uther	
Default protocol	GE2_22k_1205
Default OneColor protocol	5E1_22k_1205
Default Dualiarm Cone List	14k CGH 0605
	CGH_11kx2_1005
	CGH_11kx2_Axon_1005
Default UneLolor protocol	CGH_22k_1005
	CGH_22k_Axon_1005
	CGH_44k_1005
	CGH_44k_Axon_1005
	GE1_11K02_1205
	GE1_ZZK
	GE1 ZZK 1205

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 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

- ツールバーにあるAdd New Extraction Set(s)のアイコン
 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。
- 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. <u>Extraction Set Configurationタブシート</u>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2色法の数値化には、GE2_107_日付を選択してください。 Design FileおよびProtoco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				4 ⊳
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></none>	C:\Ando\GE T
US45102874_25120974	_D_20060331	GE1-v1_91	US45102874_25	US45102874_2512	<none></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)。

g	🛊 Project Properties 🛛 🖺 Ex	traction Set Configuratic 🤌 🕨	
Ξ	General		
	Operator	Unknown	
Ξ	Input		
	Number of Extraction Sets I	0	
Ξ	Output and Data Transf	er	
⊡	Outputs		
		None	1
	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		
Ŧ	FTP Setting		
Ξ	Automatic Protocol Ass	ignment	
	Highest Priority Default Pro-	Grid Template Default	
	Project Default Protocol		
Ξ	Automatic Grid Templat	e 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

MAGE	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 Res</u>	<u>ults</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。

Same As ImageをTrueにしておくと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。

Summary Reportタブシート	
🎲 Project Properties 📲 Extraction Set Configuration 👳 Summary Report	4 ⊳
Project Run Summary	
Project started on Wed, Jun 01, 2005 at 11:55:19.	

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

Running Monitor 1	
Extraction: Human_22K_expression (Human_22K_expression.tif)	
==> OutlierFlagger: Creating Probe List	
==> OutlierFlagger: Population Outliers Color 1	
==> OutlierFlagger: Population Outliers Color 2	
==> OutlierFlagger: Calc. background outliers	
==> STEP: Background Subtraction	
BG Subtraction: Avg BG Subtraction Color 1	
==> BG Subtraction: Avg BG Subtraction Color 2	
==> BG Subtraction: Calculating Background Statistics (Red Channel)	
==> BG Subtraction: Spatial Detrending of Low Signals (Red Channel)	
==> BG Subtraction: Calculating Background Statistics [Green Channel]	
==> BG Subtraction: Spatial Detrending of Low Signals (Green Channel)	
==> STEP: Dye Normalization	
==> Dye Norm: Removing Dye Bias	
==> Extracting in progress	
al a state of the	

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。

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。)







Y-Intercept = -0.263 ; Slope = 0.889 ; R^2 = 0.972

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。

- 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。

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 および rProcessedSignal をシグナル値、両シグナル値の比を ratio、 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
Featur	eNum	フィーチャ番号
Contro	olType	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。 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
Probe	Name	各 60mer の配列に対応した Probe ID
 IDSystema ID。可能な	aticName 限り公的なデータベー	 各プローブがターゲットとしている配列の 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	バックグランド補正を行った後、各種補正 を行う前のシグナル強度。

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 バックグランドと差がないフィーチャ 1 バックグランドと差があるフィーチャ
gIsWellAboveBG	rlsWellAboveBG	フィーチャのシグナルがバックグランドと 有意に差があるかを判定。BGSubsignal の値が、バックグランドの標準偏差(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 バックグランドと差がないフィーチャ 1 バックグラ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のには適 していますが、複数アレイの結果の比較(クラスター解析など)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。



Feature Extraction など

GeneSpring GX など

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 バックグランドのシグナル強度計算
- ⑤ バックグランド補正
- 6 Multiplicative Detrending
- ⑦ 色素補正
- ⑧ 発現差計算

Feature Extraction 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(log10)が用いられています。

LogRatio:log10 Cyanine5色素強度 Cyanine3色素強度

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 を選択します。

- 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 total RNA 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。
- 以下の基準を満たしているがをアエックして下る A260/A280=1.8~2 A260/A230>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はできません。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 Maker 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℃ 10 分、4℃ hold

プログラム 2:40℃ 2 時間、70℃ 15 分、4℃ hold

プログラム 3:40℃ 2 時間、4℃ hold

4℃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℃に置いてください。 Heat Lid の設定にしてください。

<u>Step2.totalRNA からの cDNA 合成</u>

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、8x15K、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℃ 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、ピペッ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。

<u>Step3.ラベル化 cRNA の合成</u>

- 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。ピペッ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℃、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、ピペッ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:詳細なスキャナの起動手順

Bスキャナまたは Cスキャナをお使いの場合

- 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ャナの電源を入れます。
- 3. スキャナ前面の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。スキャナと 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、スキャナの電源を入れます。
- 2. スキャナ前面右上にある 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. スキャ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。
- 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。

いずれのスキャナでも、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 スキャナおよび 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 とスキャナの電源を切った後 10~15 分ほど待ち、上記手順で PC とス キャ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 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。

 Initialize logger failed: The process cannot access the file 'C:\ProgramData\Agilent\MicroArrayScanner\Logs\Exception because it is being used by constructions. 	nLog.txt'
--	-----------

- 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。

				Expression	Switch Appli	cation Type
1c	🌈 https://earray	chem.agilent.c	om 🔳 🗖 🔀		Pofrach	View All
xoarray xoarray	🔆 Ag	ilent Tech	eArray		Keiresit	<u>view All</u>
xoarray	Select View Type :	Expression	~		Ne	xt >>
3: No m	Set as Default View	Expression CHP CGH SureSelect Chp microRNA SureSelect Targ	ture Array et Enrichment			

Dat

- 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。
- Microarray Probe Group Probe My Account ises & Anr Search Microarray O Probe Group 01 Microarray Name: Species Info: Select and Add 016436 Design ID: Upload Search Reset

Home

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	<u>Status</u>	<u>Desiqn</u> <u>ID</u>	Created Date		Actions
Hu	uman miRNA Microarray		AgilentCatalog	Submitted	016436	26-Apr-2007	Order Viev	Download

Download

5. Internet Explorer の Pop Up Blocker を Off ICL, [EXTERNALFULGEML] (= Feature Extraction 用デザインファイル) をダウンロード

If you have	difficulty	downloadin	ig the	desired file,	hold	down the	<ctrl> key</ctrl>	until a File
Download	dialog b	ox annears	This	hynasses ni	on-un	blocking	software	

	Category	File Type
BED		BED
		CrossSpeciesHits
EXTERNALFULLGEML		GEML 1.0
EXTERNALFULLGEML2		GEML 2.0
FASTA		FASTA
GAL		GAL
GENELIST		<u>List</u>
GEO GEO		<u>GEO</u>

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 と一致したパ 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

Appendix5: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にから、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)
- 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:



Appendix6: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

製品 ソリューション フラント トレー 分野別ソリューション ゲノミクス	ニンクとイベント サービスとサホート ライン・	フリ お見積り
ゲノミクス DEMAN Bring clarity to the complex human and reproductive gu precision that outperforms.	D PRECISION C. Get solutions for oncology, enetics, and life sciences with	
 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 テーマの詳細はこちら ■ 最新のイベンド情報 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 ■ キャンペーン 	 マイクロアレイ - GeneExpression - miRNA - CGH - 機器 - 機器 SureSelect/HaloPlex マ データ解析 マ パイオアナライザ ・ マ パイオアナライザ ・ マン・ ・ マン・ アン・ マン・ アン・ マン・ マン・	サービス・サポート 受託解析サービスプロバイダー 受託解析サービスプロバイダー プラリー マラリー 愛教師に必要な情報のダウンロード サイト ジェル 多客様専用サポートページ 愉文・技術資料・アプリケーション 奈 ボール配信登録
	 eArray 実験に必要なものリスト サポートページ 	お聞い合わせ先 お電話: 0120-477-111 E-mail : email_ipan@aglient.com GeneSpring 副品のお問合せ: genespring_D_support@aglient.com

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版権は全て 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写、転載したり、他の言語に翻訳したりすることは法律で禁止されています。複写、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。