

アジレント遺伝子発現マイクロアレイ 2色法プロトコル

Low Input Quick Amp Labeling Kit



Agilent 遺伝子発現マイクロアレイ

1x244K、2x105K、4x44K、8x15K、1x1M、2x400K、4x180K、8x60K

Protocol Version 6.9_JP 対応

[2019年9月改訂プロトコル]

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.....	3
2. 使用するキットの確認.....	5
3. 実験に必要な試薬・消耗品など.....	8
4. 実験に必要な機器・器具.....	11
5. 実験を始める前に.....	12
6. プロトコルの全体図.....	13
7. 実験の操作手順.....	15
8. 実験: 1日目.....	16
9. 実験: 2日目 スライドガラス洗浄の前準備.....	37
10. Agilent スキャナを用いたスキャンニング.....	45
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.....	54
12. Feature Extraction ソフトウェアで数値化を行う前に.....	57
13. Feature Extraction ソフトウェアによる数値化.....	60
Appendix1: total RNA の品質チェック.....	71
Appendix2: サーマルサイクラーを用いた実験プロトコル.....	73
Appendix3: 詳細なスキャナの起動手順.....	74
Appendix4: Feature Extraction 用デザインファイルのダウンロードサイト.....	75
Appendix5: Feature Extraction 用 Protocol のダウンロードサイト.....	76
Appendix6: マイクロアレイのレイアウト.....	77
Appendix7: 弊社 DNA マイクロアレイサポート用ホームページ.....	78

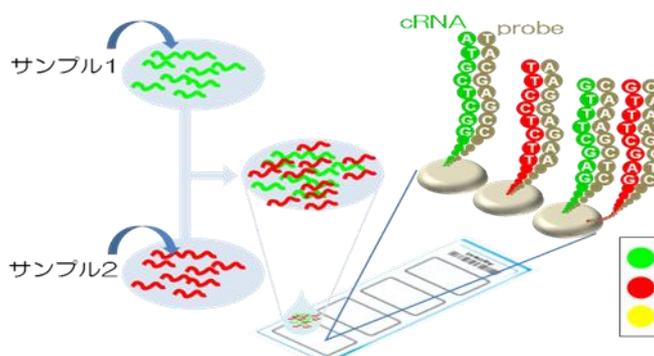
1. はじめに

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

email_japan@agilent.com

本プロトコルは、アジレント遺伝子発現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。

2 色法



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

Ver.6.9_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「現在」の日付を 2017 年 4 月に変更しました。

Ver.6.9 での更新点

- 保証期間の記述を変更しました。

Ver.6.7 での更新点

- 実験上の注意点を追加しました。

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。

2. 使用するキットの確認

■ Low Input Quick Amp Labeling Kit, two-color 48 反応分

(製品番号 5190-2306) (※本キットは、Cyanine 3-CTP および Cyanine 5-CTP を含みます)

<内訳>

- 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 (製品番号 5190-2308、24 反応分
この製品番号の商品は Cyanine 色素が含まれません。)

Component	Volume
T7 Promoter Primer	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°Cで保存してください。

※ Cy3-CTP・Cy5-CTPは開封前-20°C、融解後4°Cで保存してください。実験間隔があく場合は-20°Cでも保存できます。

※ Cyanine色素のみの販売はしておりません。

※ 本キットでは10ng~200ng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)。

Low Input Quick Amp Labeling Kit, Two-color (製品番号 5190-2306)は、アジレント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。その場合サポート対象外になることをご了承ください。

■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°C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°C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。

1x244K、1x1M	10 アレイ
2x105K、2x400K	20 アレイ
4x44K、4x180K	45 アレイ
8x15K、8x60K	100 アレイ

※ 下記 2 つの試薬は個別に購入することが可能ですが、Gene Expression Hybridization kit (5188-5242)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 (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 (1.35 mL 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)

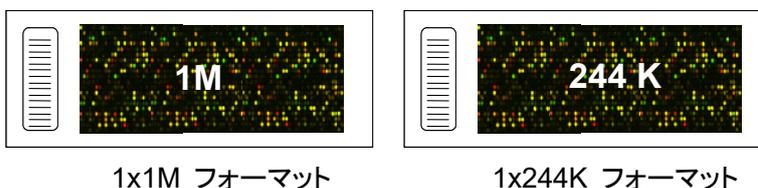
※ オゾンフリーブースがない場合にご使用ください。

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下さい。

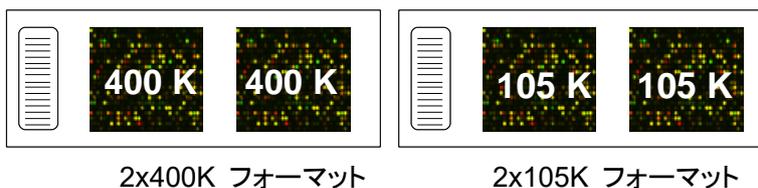
アジレント遺伝子発現マイクロアレイ



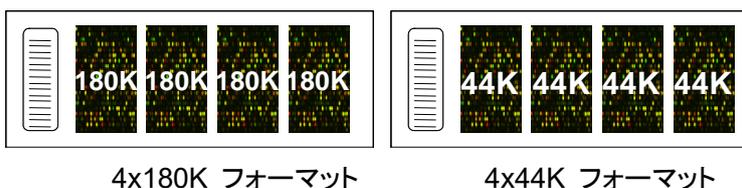
1 パック(1M、244K フォーマット)は、
1枚のスライドグラスに1枚のアレイが載っています。



2 パック(2x400K、2x105K 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。



4 パック(4x180K、4x44K 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。



8 パック(8x60K、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。



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
8x15K, 4x44K, 2x105K, 1x244K	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
8x60K, 4x180K, 2x400K, 1x1M	高解像度使用の C スキャナまたは SureScan	v8.4.1 以降 (SureScan は v9.1)	v10 以降

3. 実験に必要な試薬・消耗品など

アジレント遺伝子発現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 v6.7 対応)

(2019年12月作成)

対応マイクロアレイフォーマット: 1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K, 1x244K, 2x105K, 4x44K, 8x15K

※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		○	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。オートクレープ処理はお勧めしません。
	○		ピペット各種 (0.5ul-1ml)						
	○		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	220 330 440	相当	適宜		Sサイズ Mサイズ 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。
		○	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
		○	Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color	Agilent	5190-2305	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 Labeling Kit, Two-color	Agilent	5190-2306	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 Labeling Kit, No Dye	Agilent	5190-2308	指定	1	24反応	24反応分。色素は含まれていません。
		○	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 74106	指定	1	50精製分 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		ガセット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フォーマット用ガセットスライド	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
			4x44K, 4x180Kフォーマット用ガセットスライド	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フォーマット用ガセットスライド	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
					G2534-60006	指定	1		100スライドセット
1x244K, 1x1Mフォーマット用ガセットスライド			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	5190-0403	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セ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。	

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%, 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。	
	○		イソプロパノール (molecular biology grade)						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					1個	4Lの洗浄パフファ2を保温することが難しい場合は、洗浄パフファ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							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お勧めします。

<p>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に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。</p> <p>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。</p>									
【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	ガスケツ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。Wheaton900201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、ピンセット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: 必要なものを組み合わせて購入ください】									
○	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	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			
ハイブリダイゼーションおよび洗浄	○	ブロー						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をご使用ください。	
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スキャナの組み合わせで使用可能です。SureScanには使用できません。	

【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。開封後は高温・温度変化・外気との接触を極力避けて下さい。保管に必要な設備がない場合、全てのマイクロアレイスライドは受注製造によって1スライドパッケージで納品することが可能です。納期はお問い合わせください。

【試薬・消耗品の保管について】

Cyanine 3-CTP・Cyanine 5-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。実験間隔があく場合は、-20℃でも保存可能です。

【試薬・消耗品の保証期間について】

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

4. 実験に必要な機器・器具

■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)

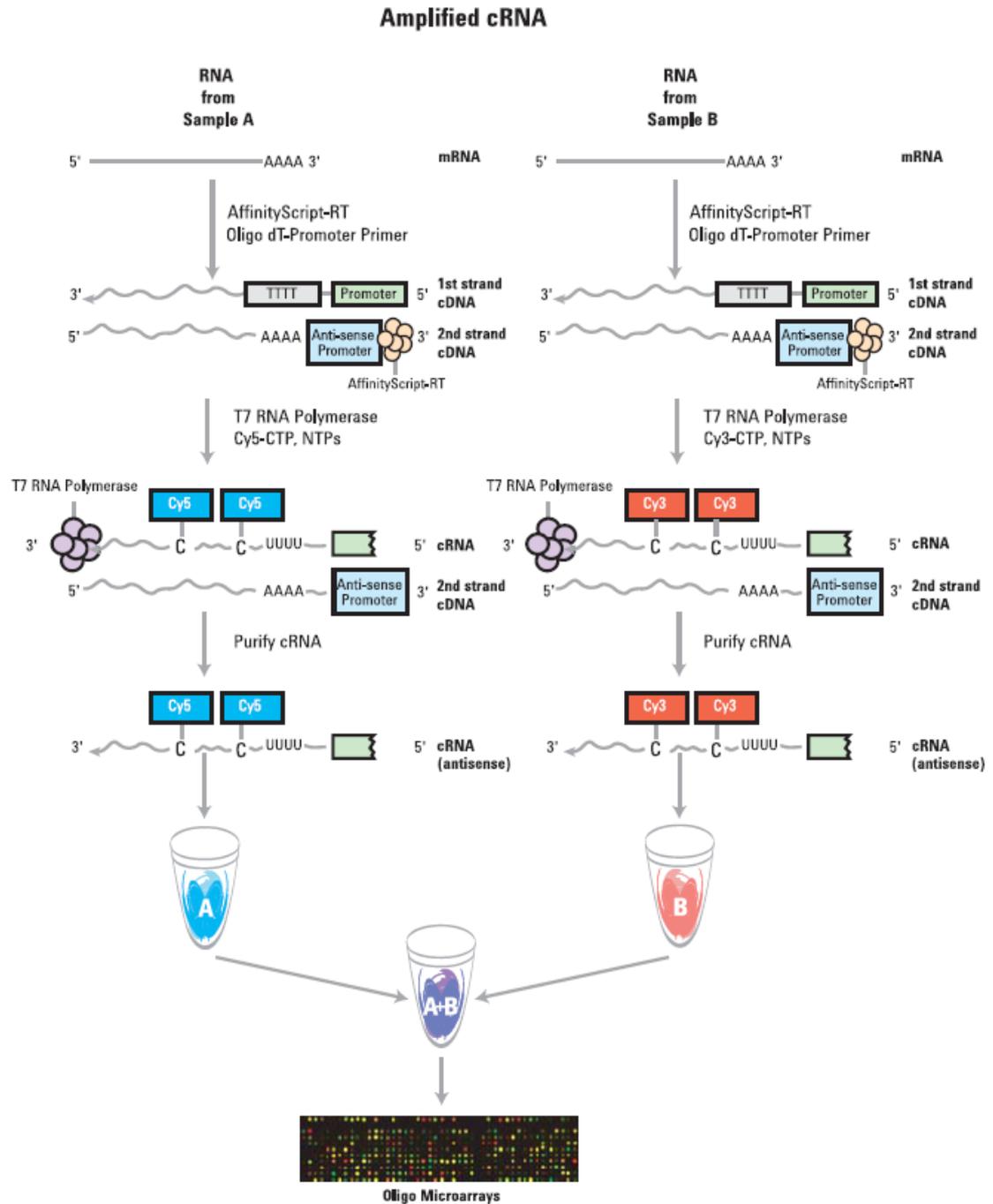
用途	実験に必須	必要に応じて選択	品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当	最少必要数	1キット容量	備考
total RNA のQC	○		Agilent 2100 バイオアナライザ	Agilent	お問い合わせください	相当	1		total RNAおよびラベル化cRNA確認用
	○		UV分光光度計	NanoDrop	ND-2000	相当	1		サンプル定量・純度確認用、ラベル化cRNA確認用
ラベル化反応およびハイブリダイゼーション準備	○		ヒートブロックあるいはウォーターバス (37°C、40°C、60°C、65°C、70°C、80°C)			相当	3		3つの温度を同時に使うので、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。
		○	卓上遠心器	日本ミリオア	テビタンII	相当			
		○	アイスバケツ						
		○	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。
		○	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	G2530-80029	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)、あるいは窒素バ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。

5. 実験を始める前に

<実験中の注意>

- 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、各自で十分ご注意くださいよう、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。
- 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または 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 (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。下記の表を参照し、以下の手順で希釈します。

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)	PolyA ⁺ RNA (ng)	1 st	2 nd	3 rd	4 th	
10	-	1:20	1:40	1:16	1:20	2
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
200	-	1:20	1:40	1:16	-	2
-	5	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、スピンド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 希釈液作製: 2uL の Spike A or 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、スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。
- 2nd 希釈液作製 : 2uL の 1st 希釈液(Spike A or Spike B)に 78uL の Dilution Buffer を加えます (1:40)。ボルテックスで混合し、スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。
- 3rd 希釈液作製 : 2uL の 2nd 希釈液(Spike A or Spike B)に 30uL の Dilution Buffer を加えます (1:16)。ボルテックスで混合し、スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。
- 4th 希釈液作製 : ___uL の 3rd 希釈液(Spike A or Spike B)に ___uL の Dilution Buffer を加えます (1:___)。ボルテックスで混合し、スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集めます。

注意 **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、希釈の際は 2 uL 以上の量を扱うようにして下さい。**

注意 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、3rd、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 Quick Amp Labeling Kit は、10 ng から 200ng の total RNA または、5 ng 以上の poly A⁺ 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、4 パック(4x44K および 4x180K)および 8 パック(8x15K および 8x60K)の場合は **25ng 以上**、1 パック(1x244K および 1x1M)および 2 パック(2x105K および 2x400K)の場合は **50ng 以上** の total RNA を用いることをお勧めします。
- ・得られる total RNA 量が少ない場合は、8 パック使用時のみ **10ng** までスタート total RNA 量を下げることができます。
- ・スタート量の異なる同じサンプルのアレイデータを比較すると、スタート量が多い方が検出できるプローブ数は多くなります。total RNA 量が十分にある場合は、上記下限量ではなく 100ng 弱~200ng の total RNA を用いることをお勧めいたします。
- ・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、10ng から 200ng の totalRNA を最終量が 1.5uL 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。

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. 各チューブに希釈した 3rd あるいは 4th Spike-Mix を 2uL 加えます。**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間違えないように加えてください。合計 3.5uL となります。

注意 total RNA および希釈した Spike-Mix の混合物は 3.5 uL を超えないようにしてください。

3. 下記表に従い **T7 Promoter Primer Mix** を調製します。T7 Promoter Primer Mix はラベル化する色素に関わらず、同一のマスターミックスを用います。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、10 反応分のマスターミックスを 1 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)
T7 Promoter Primer(緑キャップ)	0.8	4	8
Nuclease-free water(白キャップ)	1	5	10
トータル量	1.8	9	18

注意 ここで使用する水は、必ずラベル化キットに含まれている Nuclease-free water か、Invitrogen 社の DNase/RNase-free water (10977015)をお使いください。DEPC 処理水を使用した場合、この後の反応を阻害する恐れがあります。

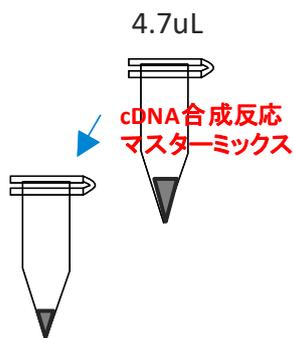
4. 各チューブに **T7 Promoter Primer Mix** を 1.8uL ずつ加え、ピペッティングあるいはタッピングで良く混合後、スピンドウンします。合計 5.3uL になります。
5. 65°Cで 10 分インキュベーションします(熱変性)。
6. 氷で急冷、そのまま 5 分間冷却します。
7. 5x First Strand Buffer は事前に 80°Cのウォータバスで 3-4 分間温めます。ヒートブロックを使用する場合はヒートブロックの well に Nuclease-free water を適量入れ、確実にチューブの底に熱が伝わるようにします。ボルテックスでよく混合し、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下さい。ロットによって析出し易い場合があります。室温に戻すとすぐに析出する場合は、以下の手順で溶解してください。
 - a. 5x First Strand Buffer を 80°C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。5 以内に析出物が確認された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°C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。
8. 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、スピンドウンします。使用するまで室温に置いておきます。

注意 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

9. 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。

10. 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。



11. 40°Cのウォーターバスで2時間インキュベーションします。
 12. 軽くスピンドウンした後、70°Cで15分間インキュベーションし、酵素を失活させます。
 13. サンプルチューブを氷上に移し、5分間冷却します。
 14. 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。

Note ただちに実験を進めない場合、サンプルを-80°Cで保存することができます。

15. 下記表の試薬を上から順に加え、Transcription Master Mix を室温で調製します。

注意 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。

16. 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。

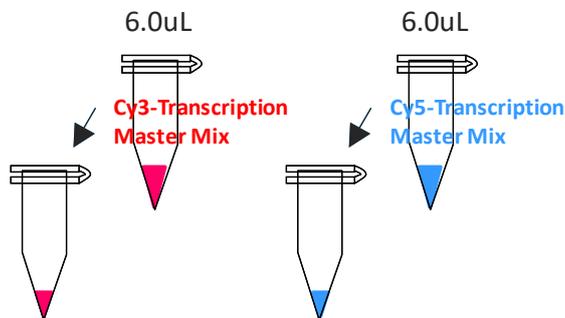
	1反応分の必要量(uL)	5反応分(uL)	10反応分(uL)
Nuclease-free water(白キャップ)	0.75	3.75	7.5
5xTranscription Buffer(青キャップ)	3.2	16	32
0.1M DTT(緑キャップ)	0.6	3	6
NTP mix(青キャップ)	1	5	10
T7 RNA Polymerase Blend (赤キャップ)	0.21	1.05	2.1
Cyanine3-CTPまたは Cyanine5-CTP	0.24	1.2	2.4
トータル量	6	30	60

注意 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。

注意 色素が光にさらされる時間を極力短くしてください。

17. 各チューブにそれぞれの **Transcription Master Mix** を 6.0 μ L 加え、ピペ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 16.0 μ L になります。

注意 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。



18. 40°Cのウォーターバスで 2 時間インキュベーションします。

注意 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。ヒートブロックを使用する際、ヒートブロックのウェル形状とチューブが合わない場合は、ウェルに対して水を少し入れて、チューブ全体へ熱が均一に伝わるようにしてください。

19. 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。

- ウォーターバスを60°Cに設定
- ハイブリダイゼーションオープンを65°C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-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。

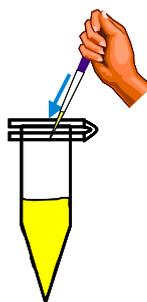
- ラベル化cRNAの精製には、Qiagen RNeasy Mini Kitの使用を推奨します。
- Stratagene Absolutely RNA Nanoprep KitはQiagen RNeasy Mini Kitに比べて溶出量が少ないので、ラベル化cRNAをより高濃度で精製することができます。少量サンプルからラベル化をスタートした場合は、Stratagene Absolutely RNA Nanoprep Kitをお勧めします。
- データの相互比較が必要なプロジェクト内では、精製キットはどちらかに統一することをお勧めします。

【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)。

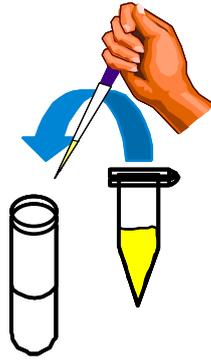
- 使用前に、RPEバッファにエタノール(96-100%)を必要量加えてください。RPEバッファは次のページの洗浄ステップで使用します。調製が終わりましたら、フタのラベルのethanolの項目にチェックマークを付けてください。
- 全ての遠心のステップは、13,000rpm(10,000g)以上の回転数で行ってください。
- 遠心を4°Cで行うことにより、cRNAの収率が上がることを確認されています。以下の遠心ステップを4°Cで行うことを強くお勧めします。
- RLTバッファにβ-メルカプトエタノール(β-ME)を加える必要はありません(β-MEが入っていても問題ありません)。

1. 84 uLのNuclease-free waterをcRNAに加え混合し、液量を100 μLにします。

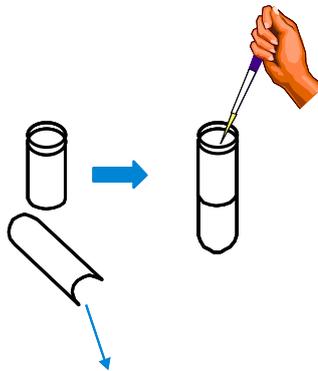


2. 350 uLのRLTバッファを加え、混合します。
3. 250 uLのエタノール(96-100%)を加え、ピペティングで静かに混合します。スピンドウンを含め遠心はしないで下さい。

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。

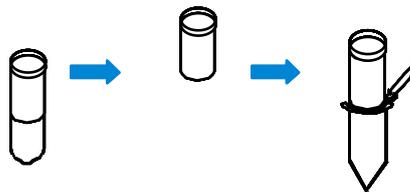


5. RNeasyカラムを新しいコレクションチューブに移し、500 uLの調製済みのRPEバッファ(エタノールが加えられたもの)をカラムに加えます。カラムチューブを13,000 rpmで30秒間遠心します。カラムを素通りした液は捨てます。



6. 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。カラムを新しい2 mLのコレクションチューブに移し、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のコレクションチューブに移します。



8. 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°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】

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。

(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。

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

*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、**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。

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

$$\text{Cy5-CTP conc (pmol/ul)}^* = \text{A650} \times 1000 \div 250 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times \text{dilution factor}^{**}$$

*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、**CyDyeの濃度**と**取込率**を算出します。

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

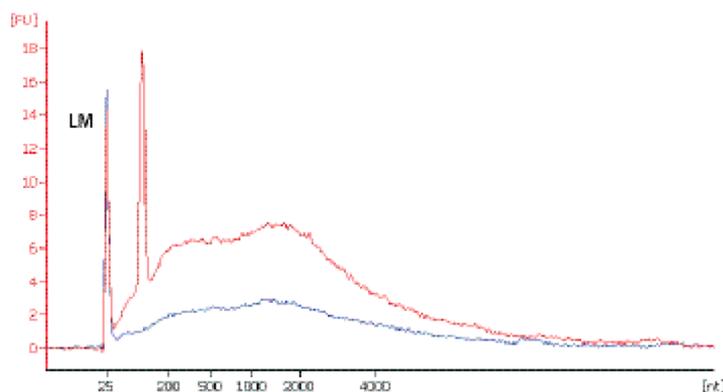
$$\text{Cy5-CTP incorporation (ng/uL)} = \frac{\text{Cy5-CTP conc.(pmol/uL)} \times 1000}{\text{cRNA conc. (ng/uL)}}$$

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)
1パック (1x244K, 1x1M)	2.5	6
2パック (2x105K, 2x400K)	1.875	6
4パック (4x44K, 4x180K)	0.825	6
8パック (8x15K, 8x60K)	0.825	6

【バイオアナライザによる評価】

- 1.5 mLチューブに1.5 uLのラベル化cRNAを分注します。熱変性(70°C2分)を行い、氷上に置きます。1 uL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ンネルは 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、120nt 付近に高いピークが出ることがあります。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 をす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 遺伝子発現マイクロアレイ
 - 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°C)
 - ハイブリダイゼーションオープン(65°C)
 - アジレントチャンバ用ハイブリダイゼーションローター
- 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°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プンを 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 °C 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°C、回転数を 10 にセットし、温度が安定するまで1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、空間の温度を測るようにしてください。
4. 1 時間程度、温度計の温度が安定するまで待ちます。
5. 実測温度と設定温度を比較し、0.2 °C 以上異なるようであれば、次の手順で合わせます。
6. オープンの ▲ ボタンと ▼ ボタンを同時に押し、温度表示が点滅するまで待ちます。あるいは ▲ ボタンと ▼ ボタンを同時に長押し、温度両側の「.」が点滅するまで待ちます。
7. 点滅しているうちに、▲ ボタンと ▼ ボタンで、表示温度を温度計が示す温度にあわせます。
8. その後再度表示を 65°C にあわせ1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「Agilent G2535A 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. ハイブリダイゼーション

8-6-1. 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。
※ Large Volume キットをお使いの場合は、Nuclease-free water 1.25 ml で溶解して下さい。
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°C 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°C で保存できます。凍結融解が 5 回以内になるように分注して保存して下さい。融解後は上記ステップ 3, 4 を行って下さい。

8-6-2. マイクロアレイの取り扱い上の注意

- マイクロアレイのプローブは、アレイスライドのラベルに **"Agilent"** の文字が入っている面 (アクティブ面) に載っています。マイクロアレイスライドに貼ってあるラベルに **"Agilent"** の文字が入っている方が **Active サイド** (プローブが搭載されている側)、数字のみが記載されたバーコードラベルが付いている面は **Inactive サイド** になります。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、必ずハイブリ溶液が接するように注意して下さい。



- スライドグラスを取り扱う際はパウダフリーの手袋をはめ、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。

- ハイブリダイゼーション開始後は洗浄終了まで、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、実験機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ツトスライドに乗せるのが難しい場合、オプションとして、ハイブリエイドを用いてアレイスライド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。



8-6-3. フラグメンテーション溶液の調製

1. 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、合計 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	8パック	4パック	2パック	1パック
Cy3-labeled cRNA	300ng	825ng	1.875ug	2.5ug
Cy5-labeled cRNA	300ng	825ng	1.875ug	2.5ug
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

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。その後スピンドウンし、断片化をストップさせるため、下表に従って速やかに2x GE Hybridization Buffer HI-RPMを加えます。
各チューブはバッファを加えるまで氷上においておきます。

注意 以前販売していた2x GE Hybridization Bufferと2x GE Hybridization Buffer HI-RPM は別の試薬です。必ず2x GE Hybridization Buffer HI-RPMをご使用下さい。

Hybridization mix

アレイフォーマット	8パック	4パック	2パック	1パック
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。**

8-7. 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asketスライド:

1 パック用 (G2534-60003), 2 パック用 (G2534-60002), 4 パック用(G2534-60011),
8 パック用 (G2534-60014)



■(オプション)ハイブリエイド

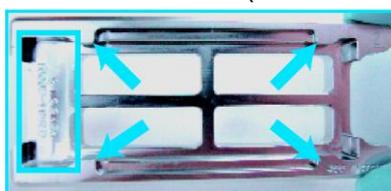


1. ピンセットを使ってガスケットスライドのプラスチックカバーの端をつまみ、ゆっくりとはがします。ガスケットスライドをパッケージから取り出します。この時、スライドの縁以外には触れないようにしてください。必ずパウダーフリーの手袋を着用してください。

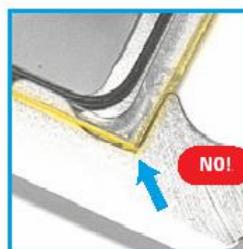


2. チャンバベースの上に、ガスケットスライドを“Agilent”の文字あるいはバーコード番号が書かれている面を上にして載せます。ガスケットスライドは、ハイブリダイゼーション溶液を介して直接アレイに触れますので、ほこり等がつかないようにすばやくセットしてください。

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。



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。スライドガ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、Nuclease-free water 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。

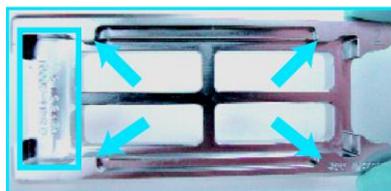
(オプションのハイブリエイド用いる場合、ここで p 32 の【参考手法】を参照下さい)



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ガラスを動かさないようにしてください。ハイブリダイゼーション溶液が漏れる原因になります。

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。



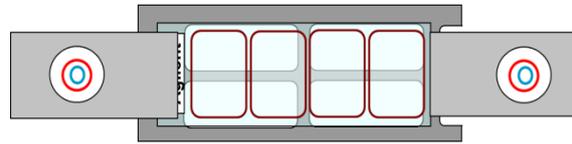
注意 1スライドに複数のアレイが搭載されているタイプで、チャンバカバーをセットする前、“サンプル溶液が接しているアレイ”と“接していないアレイ”があるように見える場合がありますが、問題ありません。アレイスライドを乗せた後は、位置の微調整などは行わず、すぐチャンバカバーを乗せて下さい。

※参考手法

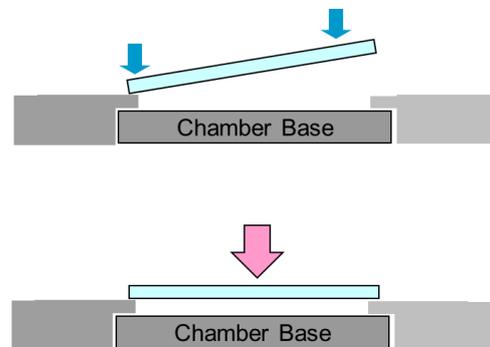
ハイブリエイドを用いることにより、手作業では水平に降ろしづらいマイクロアレイスライドを、サンプルをアプライしたガスケットスライド上に安定して乗せることができます。

使用器具： ハイブリエイド (HYB-100)

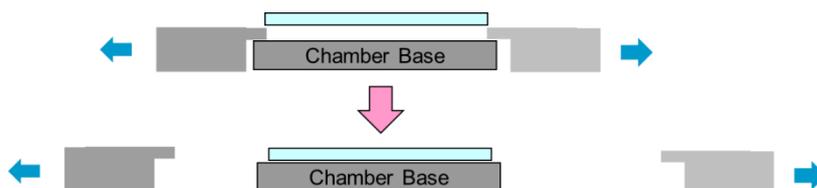
- ① ガスケットスライドにサンプルをアプライし終わった時点でチャンバベースの両端から各ハイブリエイドを差し込み、突き当たるまで動かします。ガスケットスライドの端を、ハイブリエイドの突起部分が覆うような形となります。



- ② アレイ面(Agilent と書かれているバーコード面) を下にして(数字が書かれている方のバーコード面は上に)、マイクロアレイスライドをハイブリエイドに乗せます。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。



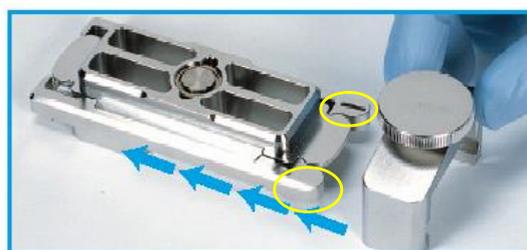
- ③ 左右のハイブリエイドを同時に引き抜いて下さい。アレイスライドが水平に落ち、ガスケットスライドと正しい位置で重なります。アレイスライドを乗せた後は、位置の微調整などは行わず、すぐチャンバカバーを乗せて下さい。引き抜く先に障害物などが無いようにして下さい。



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。



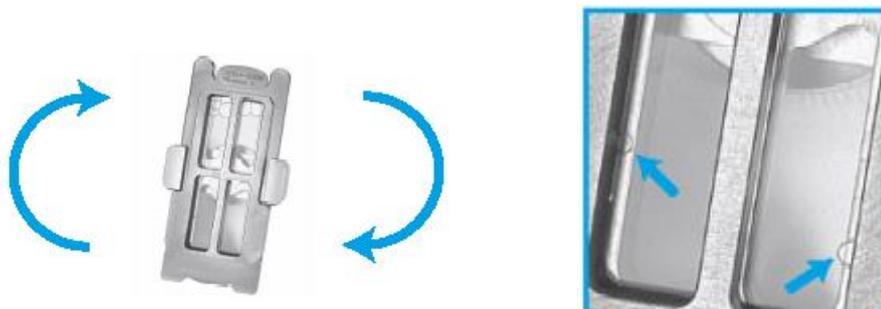
8. クランプアセンブリを、チャンバベースの丸くなっているコーナー側から差し込み、完全にストップする位置まで移動させます。ストップする位置は、ちょうどチャンバの中央部になります。



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。

11. チャンバの組み立てが終わりましたら、予め 65°C にセットしたオープン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、回転数を 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。

8-8. 洗淨の準備

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。Expire Date が不明の場合は、Expire Date を調べますのでロット番号を弊社にお知らせください。

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淨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、その後洗淨時に添加する必要はありません。

- 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
- 2).ピペットで **2mL の 10% Triton X-102** を容器中の Wash Buffer に加える
- 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。
- 4).中蓋・外蓋を外し、Buffer に添付の蛇口を取り付ける
- 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

洗淨前日から、**Gene Expression Wash Buffer 2**とスライドグラス洗淨用ガラス容器(1個)を 37°C で保温しておきます。Wash Buffer 2 は白い箱ごと加温することをおすすめします。37 °C のインキュベータに入らない場合は、必要量の Wash Buffer 2 を蒸発を防ぐため必ず密閉容器に入れて温めてください。インキュベータの表示温度と実測値が一致するか定期的にご確認ください。

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個
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個)
 - ※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。

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	ガセットスライドと アレイスライドの分離	
2	1	RT	洗浄	1min
3	2	37°C	洗浄	1min

1. オゾンフリーブースを使用している場合はスイッチを入れます。スキャンがおわるまでスイッチは切らないでください

注意 性能を保つため、オゾンフリーブースのチャコールフィルタは年に一回は交換してください。

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

37°Cのウォーターバスまたはオープンで洗浄バッファ 2 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(1-5088-01、P38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。

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。

注意 オゾンフリーブースなどのオゾン対策をしていない場合、以下 C・D も用意します。
また S&D 溶液の取り扱いについては次ページをご参照下さい。

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。

《Agilent S&D 溶液取り扱い方法》

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、アジレントの補償対象外になりますので、充分注意して取り扱って下さい。

警告 S&D 溶液の加温は必ず下記の方法に従って行ない、インキュベーター(孵卵器)などでは行わないでください。インキュベーター(孵卵器)などを使用して密閉空間で加温すると溶剤であるアセトニトリルが気化して充満し、爆発事故や高濃度のアセトニトリルの吸引による健康被害の原因となる可能性があります。

《S&D 溶液加温手順》

必ず下記手順に従って加温してください。

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(オープン)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。

① ヒュームフード(ドラフト)内で 37-40°C のウォーターバスを用いて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 溶液は決して過熱しないでください。

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。

3. 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。それぞれのガラス容器は回転子やラックを入れた状態で各 Wash Buffer で共洗いをしてください。

■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)。

■オゾンフリーブースがあり、アセトニトリルおよび S&D 溶液を使わない場合は洗浄をヒュームフード内で行う必要はなく、またガラス容器は3つ準備します。

■アセトニトリルおよび S&D 溶液を使う場合は、洗浄をヒュームフード内で行って下さい。

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°C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°C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°Cで保温したある洗浄バッファ 2 を加えないで下さい。



スターラー付恒温槽

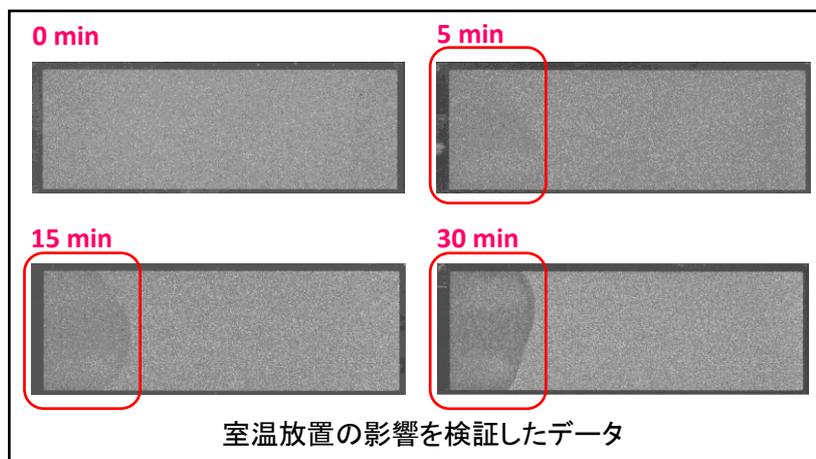
注意 オゾンフリーブースなどのオゾン対策をしていない場合、以下容器 4・5 も用意します。

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 溶液専用にするをお勧めします。

4. オープンからハイブリダイゼーションチャンバを取り出します。複数のスライド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。



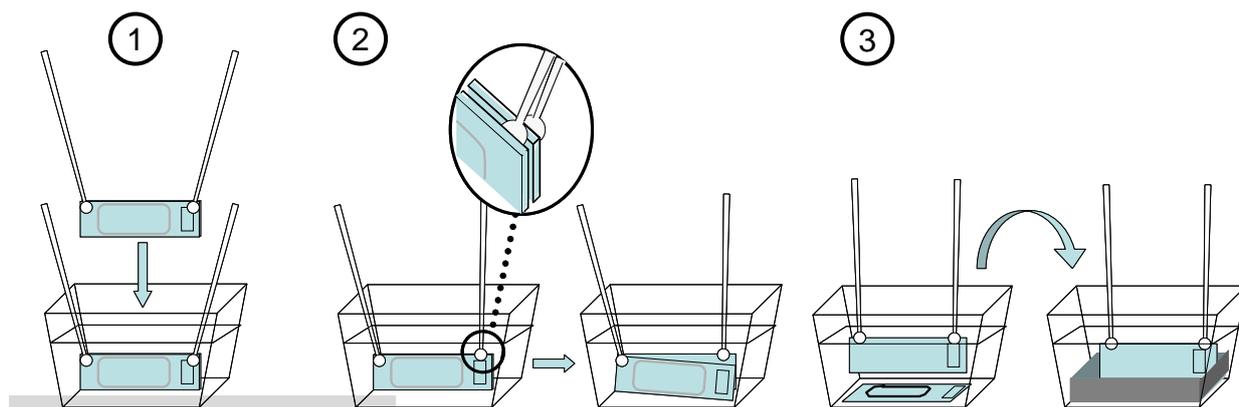
5. チャンバを水平な台の上に置き、スクリューを逆時計回りにまわしてゆるめます。
6. クランプアセンブリを外し、チャンバカバーを取り除きます。
7. チャンバベースから、重なっている 2 枚のスライドを同時に取り出します。この時、スライドの両端をしっかりつかむようにしてください。すぐに、アレイスライドを上にし(数字が書かれているバーコード面を上にして)、2 枚のスライドが重なっている状態で**ガラス容器 1** 内の洗浄バッファ 1 に入れます。この時なるべく手袋が洗浄バッファ 1 に浸からないようにしてください。
8. 2 枚のスライドが完全に洗浄バッファ 1 に浸かった状態で、スライドのバーコード側から 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を持たないように注意が必要。



- ① 2 枚のスライドをピンセットで挟み、
 - 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
 - ③ 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アレイ面を傷つけないように
- しっかりはさみ、 ガラス容器 2 中の
- はがす。 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1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。

1) 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。



2) 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。

3) 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。

注意 必ずパウダーフリーであることを確認した手袋をご使用ください。パウダーフリーの表示があっても粒子がついている場合があります。これらの粒子が洗浄バッファに混入すると、洗浄中にアレイに吸着し、スペckルとしてアレイに残る恐れがあります。

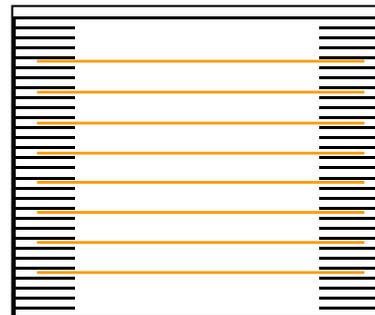
9. 残りのチャンバも同様に解体して、すべてのスライドをラックに差し込みます。一度に洗浄するスライドは8枚以下にするようにしてください。

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)



30スライドラック(Thermo Shandon113)



10. 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 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°Cで保温してある洗浄バッファ2を注ぎます。

11. スライドラックを 37°C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。

※ オゾンフリーブースなど、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

12. 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。スキャンを行って下さい。

※ 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

13. 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少し回転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。
14. 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。

15. 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、スライドガラス上に白い粒子が生じることがあります。その場合には、直ちにスライドラックを S&D 溶液中に沈めて、再度極めてゆっくりかつ一定の速度で取り出してください。

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

16. この操作でスライドガラスは乾燥しますので、その後ただちにスキャンを行うことができます。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、スライドガ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ガラスを10枚までにしてください。このようなスキャン操作を行うことで、大気中のオゾン暴露を最小限にすることが可能です。

スキャン中の退色をより確実に防ぐ場合は、P.44 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回までにとどめて下さい。ただし繰り返し利用できる回数は、洗浄バツファ2の持ちこみ量によって異なります。

《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**スポンジあるいはキムワイプ（ペーパータオルは使用しないでください）でこすってください。
2. 超純水ですすぎます。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イソプロパノール(IPA)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5分～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5回以上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。

《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。

《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、アセトニトリ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。

1. 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**スポンジあるいはキムワイプ(ペーパータオルは使用しないでください)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。

《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、洗浄したスライドガ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

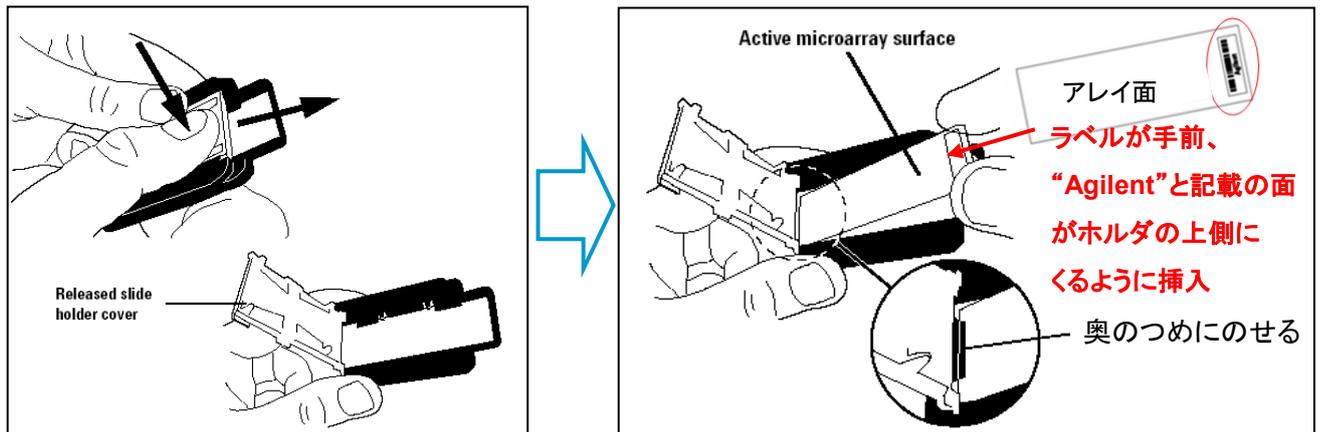
10. Agilent スキャナを用いたスキャンニング

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、Appendix3 を参照してください。

1. スキャンニングの準備

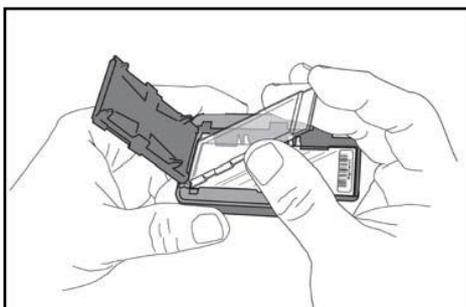
1. スライドをスライドホルダにセットします。スライドホルダをカラーセルにセットした際に、数字のバーコード面が見えるような向きで挿入します。

a. B スキャナまたは C スキャナをお使いの場合



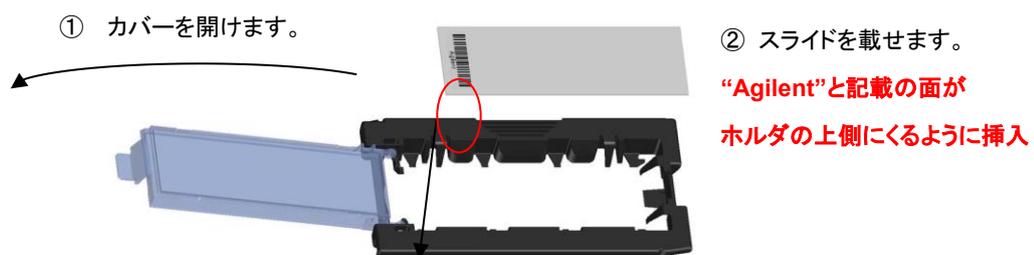
《オプション: オゾンバリアスライドカバーの使用》

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)。

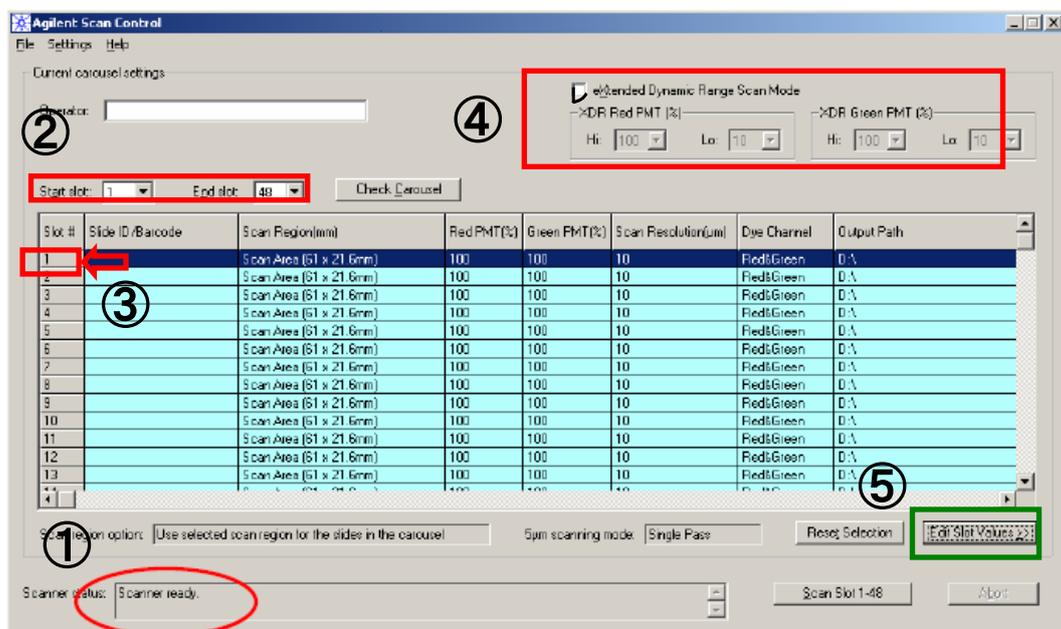
2. スライドホルダをスキヤナのカロセル(SureScan の場合はカセット)にセットします。複数のスライドグラスをスキヤンする場合は、隣り合うスロットにセットしてください。また、H と書かれている Home スロットにはセットしないでください。SureScan の場合は、どの位置にセットしても構いません。

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

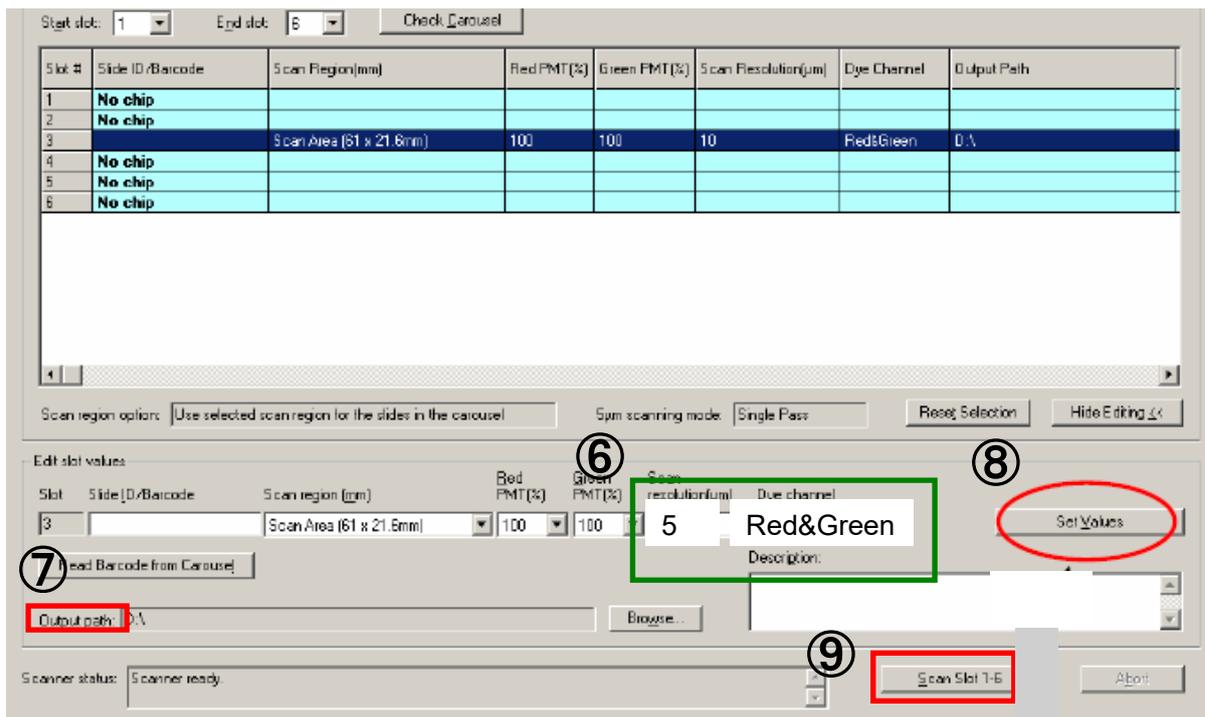
スキヤナコントロールソフト ver.7(Bバージョンスキヤナ)をお使いの場合 (8x15K, 4x44K, 2x105K, 1x244K フォーマットのスキヤン)

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。
3. 設定を変更するスライドをテーブル内で選択してください(複数枚選択できます)。選択されると青くハイライトされます。
4. “eXtended Dynamic Range Scan Mode”にチェックを入れ“Hi”を 100%に、“Lo”を 10%にします。
5. “Edit Slot Values>>”をクリックしてメイン画面を拡張します。



(次項につづく)

6. 拡張された画面で、下の表に従って各種設定変更を行います。



注意 Scan resolution が 5 ミクロンになっていることを必ず確認してください。

	For 1x244K, 2x105K Formats	For 4x44K, 8x15K Formats
Scan region	Scan Area (61 x 21.6 mm)	Scan Area (61 x 21.6 mm)
Scan resolution (μm)	5	5
5μm scanning mode	Single Pass	Single Pass
eXtended Dynamic range		(selected)
Dye channel	Red&Green	Red&Green
Green PMT	100%	XDR Hi 100% XDR Lo 10%
Red PMT	100%	XDR Hi 100% XDR Lo 10%

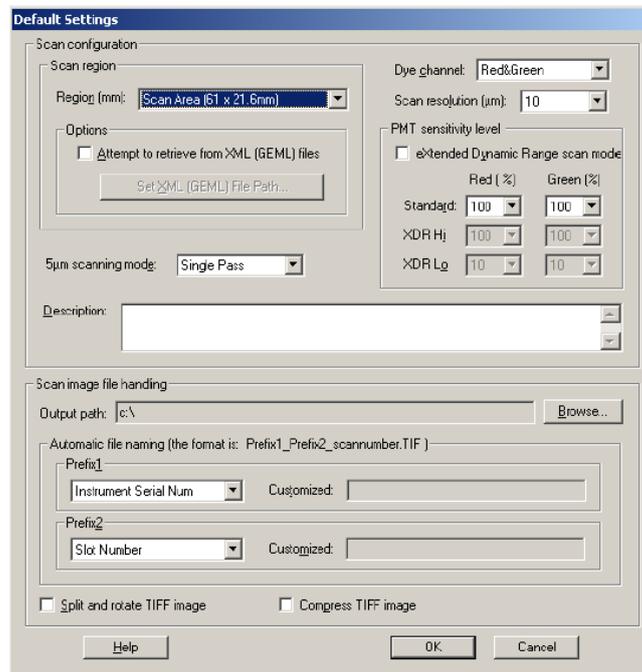
7. “Output path”で、スキャン画像を出力したいフォルダを指定します。
8. 設定が終了したら、“Set Values”をクリックします (Set Values をクリックしないと変更が反映されません)。テーブル内の設定値が変更されたことを確認してください。
9. スキャン設定が確認できたら、“Scan Slot n-m”をクリックするとスキャンが開始します。
10. スキャンが終了したら、Scan Progress 画面の右下にある Close ボタンをクリックします。スキャナのロックがはずれ、スライドホルダを取り出せるようになります。
11. コントロールソフトを閉じた後にスキャナおよび PC の電源を消してください。

【参考】XDR スキャン

※ eXtended Dynamic range: XDR スキャンは、1枚のスライドガラスを、異なる PMT (4x44K フォーマットの場合、高 PMT: XDR Hi 100%、低 PMT: XDR Lo 10%) に変え、自動的に連続スキャンする機能です。Feature Extraction 9.1 以降はこの 2 つのスキャンを自動的に 1 つにまとめ、広いダイナミックレンジが得られる結果を自動的に出力することが可能です。

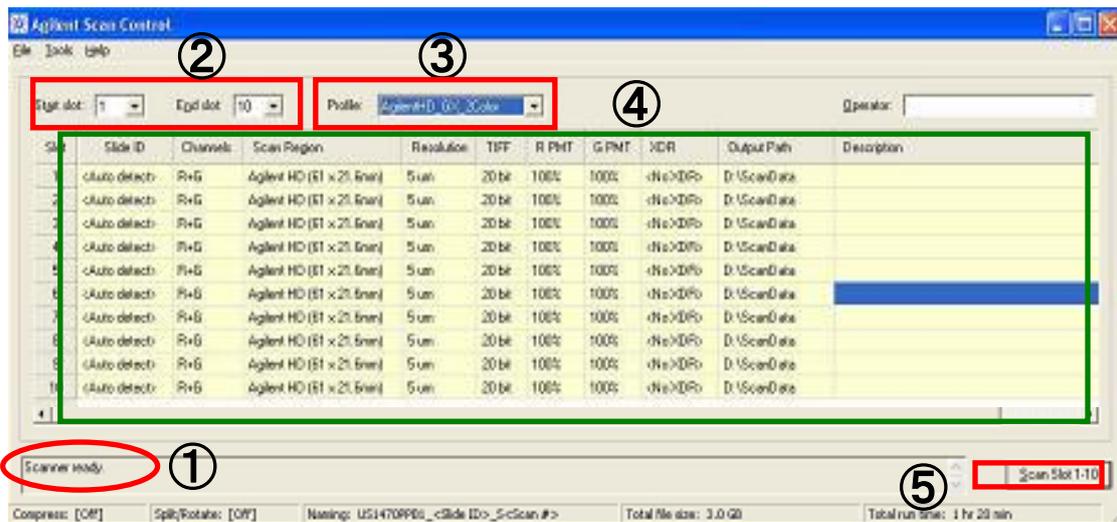
《スキャンのデフォルト設定変更法》

1. スキャナコントロールソフトを立ち上げ、ツールバーの **Settings > Modify Default Settings** を選択します。
2. 表示された Default Setting ボックス内で、変更したい項目を変更し、OK をクリックします。



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 (8x60K, 4x180K, 2x400K, 1x1M, 8x15K, 4x44K, 2x105K, 1x244K フォーマットのスキャン)

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。



(次項につづく)

3. “Profile”リストから、既存のプロファイルを選択します。

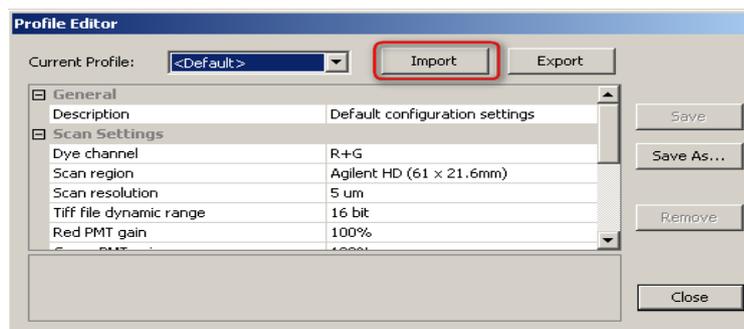
<default> プログラムインストール後に現れるデフォルト設定	
AgilentHD_GX_1Color	遺伝子発現アレイ 1 カラー(8x15K, 4x44K, 2x105K, 1x244K)
AgilentG3_GX_1Color	遺伝子発現アレイ 1 カラー(8x60K, 4x180K, 2x400K, 1x1M)
AgilentHD_GX_2Color	遺伝子発現アレイ 2 カラー(8x15K, 4x44K, 2x105K, 1x244K)
AgilentG3_GX_2Color	遺伝子発現アレイ 2 カラー(8x60K, 4x180K, 2x400K, 1x1M)
AgilentHD_CGH	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

選択肢に適切なプロファイルがない場合は、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 1x244K, 2x105K, 4x44K and 8x15K HD Microarray Formats	For 1x1M, 2x400K, 4x180K and 8x60K G3 Microarray Formats
Dye channel	Red&Green	Red&Green
Scan region	Scan Area (61 x 21.6 mm)	Scan Area (61 x 21.6 mm)
Scan resolution (µm)	5	3
Tiff	20 bit	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。

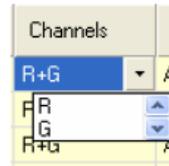


6. Yes をクリックし、Profile Editor 画面の Close をクリックします。

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)

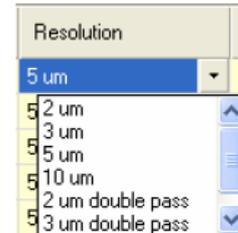


- 2). **Scan Region**: Full Slide
Agilent HD (アジレントアレイ)

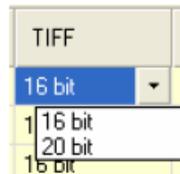


- 3). **Scan Resolution**: 2um, 3um, 5um, 10um,
double path (2um, 3um, 5um)

※ Cバージョンのスキヤナでも 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。
スキヤ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ヤナおよび PC の電源を消してください。

【参考】 16bit スキャンと 20bit スキャン

※ TIFF ファイルに保存されるシグナル強度範囲を指定します。

20bit スキャンは、1 回のスキャンで 5 桁のダイナミックレンジでシグナル強度を保存できます。XDR スキャンは不要なため、20bit スキャンを選択すると XDR 機能はオフになります。

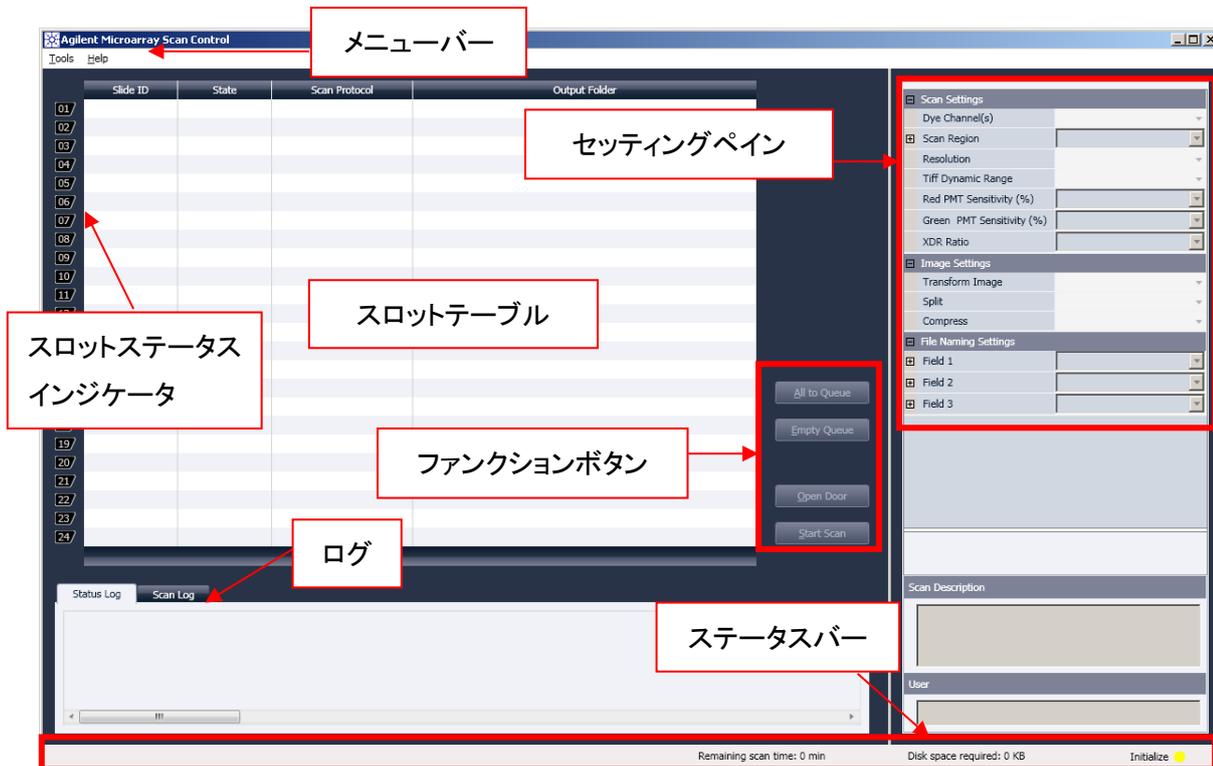
16bit スキャンは、1 回のスキャンでは遺伝子発現のダイナミックレンジをカバーしきれないため、XDR 機能を使って 2 回の PMT gain の異なる連続スキャンを行ない、その結果を統合して使います。この場合、XDR ratio を指定する必要があります。遺伝子発現のデフォルトの XDR ratio は 0.1 です。

20bit で 1 回スキャンしたデータと 16bit で XDR スキャンをしたデータは、結果にほぼ違いはありません。

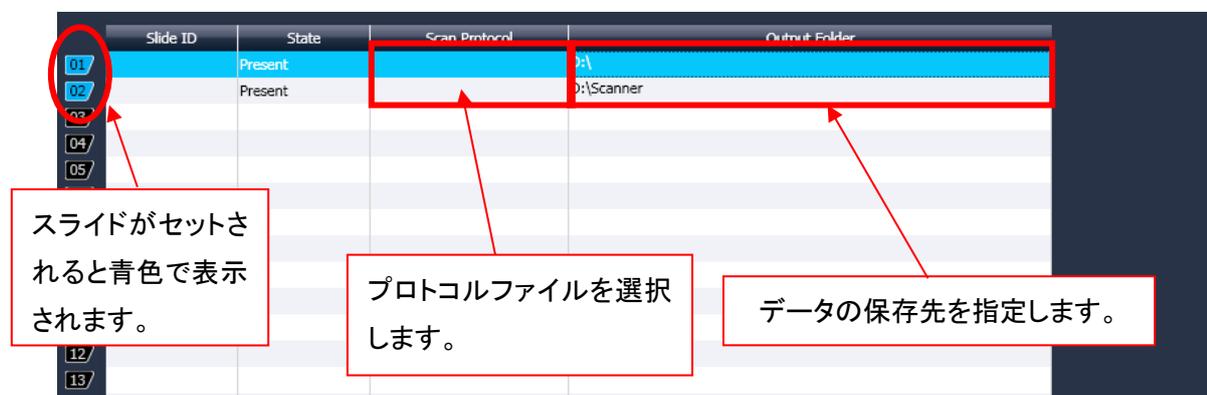
スキャナコントロールソフト ver.9.1 (SureScan マイクロアレイスキャナ)をお使いの場合

- 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。

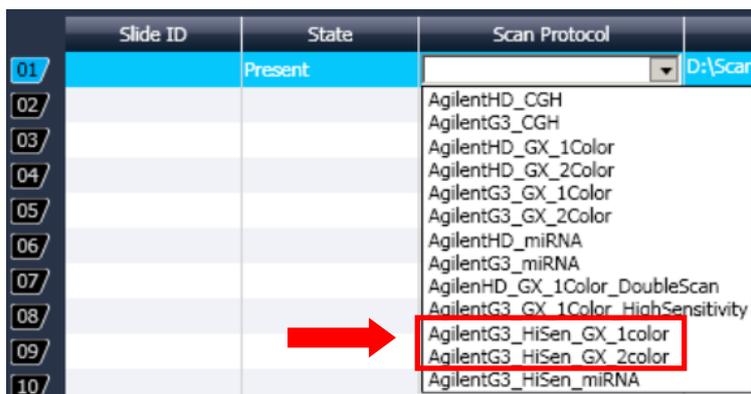


2. 初期化が終了すると、ファンクションボタンのOpen Doorボタンがアクティブになります。クリックし、カセットにスライドをセットします。スライドがセットされているカセットは青色で表示されます。また、各パラメータの編集ができるようになります。

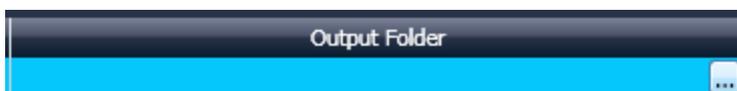


- Scan Protocolから適切なプロトコルファイルを選択します。AgilentG3_HiSen_GX_1ColorまたはAgilentG3_HiSen_GX_2Color(1x1M、2x400K、4x180K、8x60Kの場合)あるいは、AgilentHD_HiSen_GX_1ColorまたはAgilentHD_HiSen_GX_2Color(1x244K、2x105K、4x44K、8x15Kの場合)を選択します。

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。プルダウンにAgilentHD_HiSen_GX_1ColorまたはAgilentHD_HiSen_GX_2Colorがない場合や、設定を変更する必要がある場合は、ウィンドウ右側のセッティングペインで個別にプルダウンメニューで変更できます。AgilentHD_GX_1Colorまたは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下記をご参照ください。



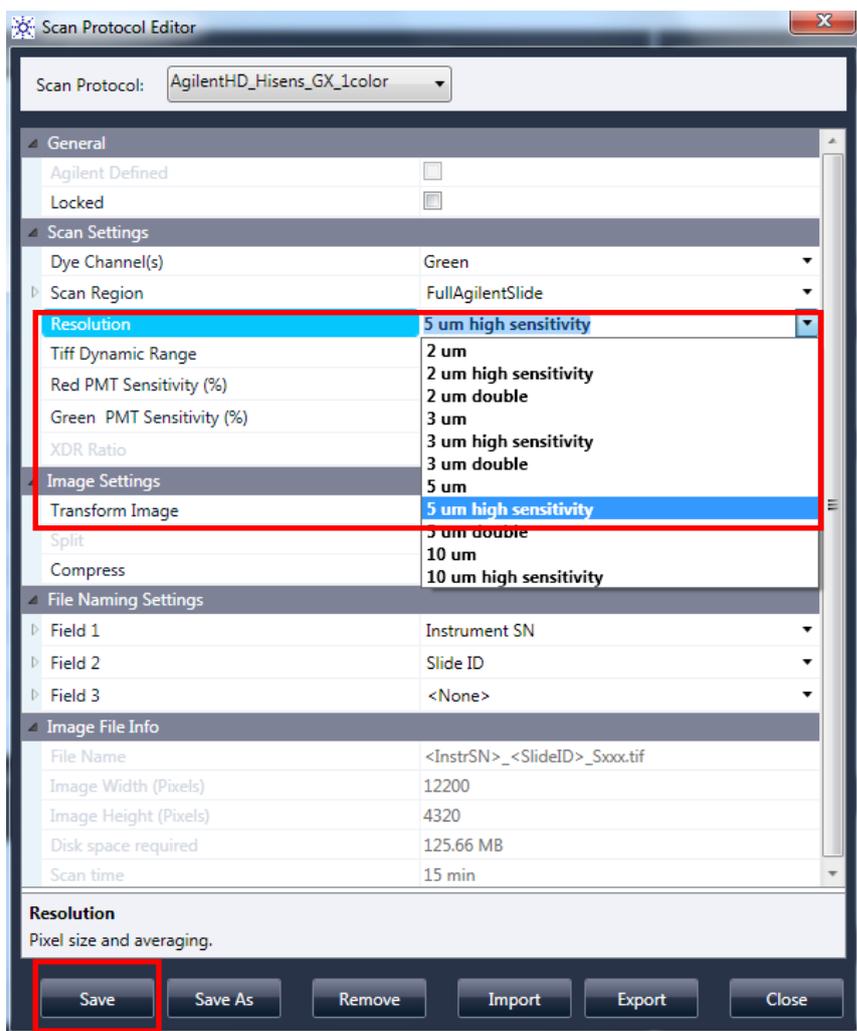
- 必要があればデータの保存先を変更します。※D drive内のフォルダを指定してください。



- ファンクションボタンのAll to Queueボタンをクリックし、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ます。
- 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。
- 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。
- スライドホルダを取り出します。
- 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》

- 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。
- 設定した新しい名前前の 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。



- 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

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。

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。

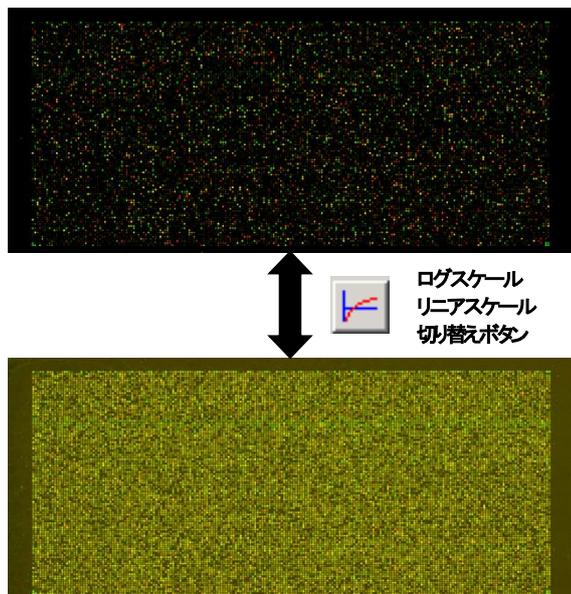
① Feature Extraction ソフトウェアの起動

以下のいずれかの方法で、**Image Work Window**を開き、TIFF イメージを確認します。

- 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
- **Feature Extraction** ショートカット  をダブルクリックしてソフトを起動後、メニューバーの【File>Open > Image】で開きたいファイルを指定

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 イメージデータのスケールの確認

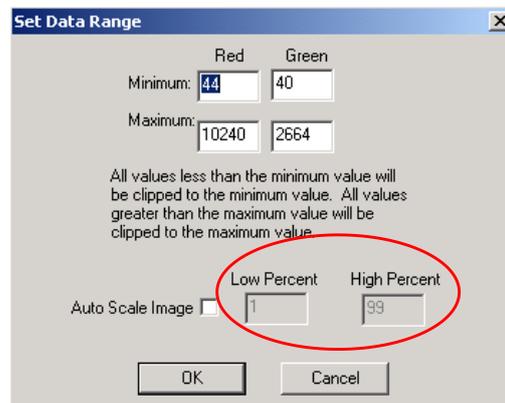
両チャンネルのデータレンジを確認します。

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。



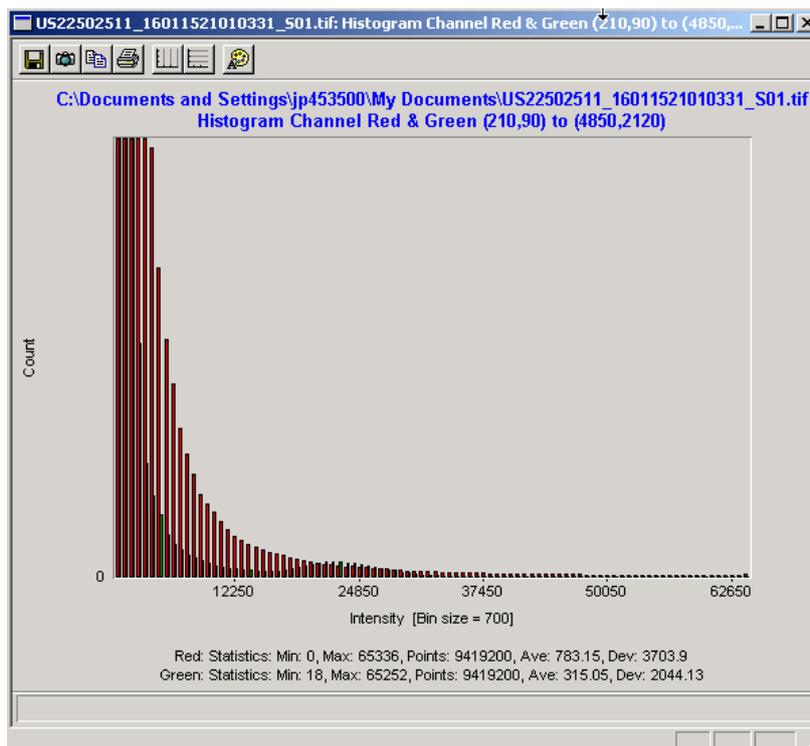
③—2: ヒストグラムの作成

 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るか確認します。



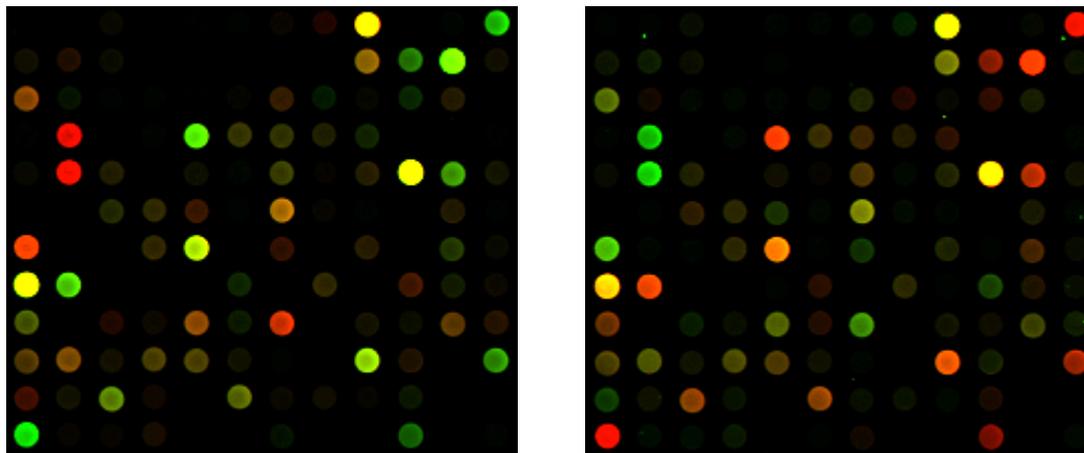
④ クロップモードの ON/OFF

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。

 をクリックすることで ON/OFF の切り替えができます。

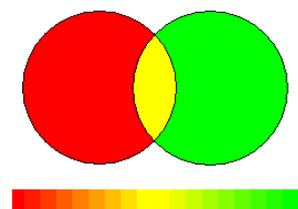
⑤ カラースワップの確認

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。



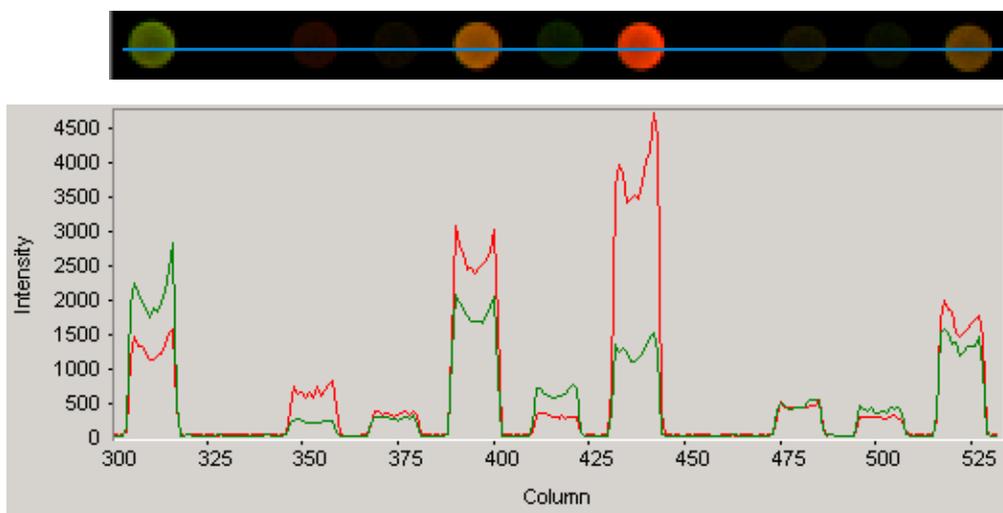
この傾向を適正に見る為に、カラーレンジの設定を1%から99%の設定(デフォルト)にしてください。

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。



⑥ ラインプロット

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、そのままポイント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)にポイントを合わせてダブル左クリックします。

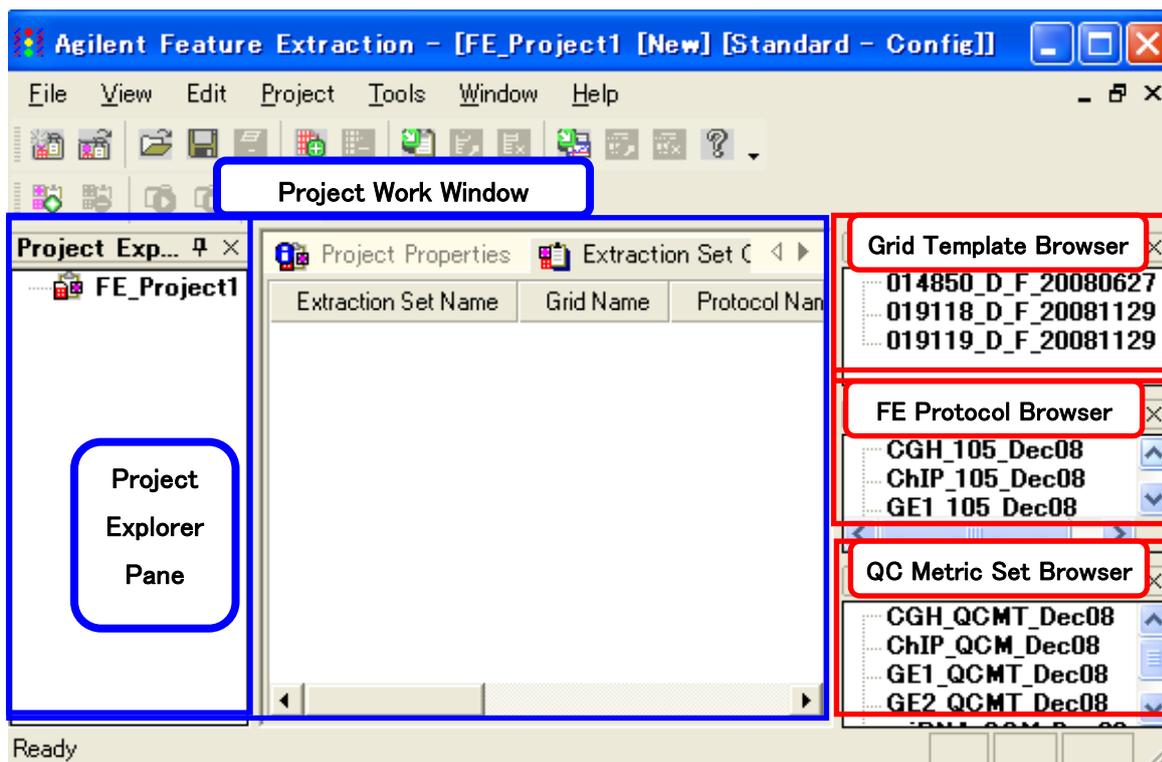
このように、Feature Extraction する前に、ヒストグラムやラインプロットを使ってデータ抽出の妨げの可能性となる異常スポットやバックグラウンドの確認をすることができます。

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

① Project Work Window を開く

以下のいずれかの方法で、Project Work Window(スポットの数値化の画面)を開き、必要なファイルがあるかどうかを確認します。

- メニューバーの【File > New > Standard Project】を選択
- Feature Extraction ショートカット  をダブルクリック



② 必要なファイルの確認

Grid Template Browser: インストール済みのデザインファイルまたは Grid File のリスト表示。ここにこれから数値化するマイクロアレイの種類に対応したデザインファイルがあるか確認する。

確認方法: (1) マイクロアレイのデザイン ID を確認する

デザイン ID …アレイスライドのラベルに印字されている、または TIFF ファイルのファイル名に記載の 25 から始まる 12 桁の番号の、25 に続く 5 ケタの番号に 0 を付けた 6 桁の番号(**252800410025** であれば **028004** がデザイン ID)

(2) Grid Template Browser に目的のデザイン番号のファイルがあるかを確認する。

(**028004_D_F_20110524** 等)

➤ 必要なデザインファイルがなければ、eArray からダウンロードする(巻末の Appendix3 参照)。

デザインファイルは、各プローブのマイクロアレイ上の位置情報と、対応する遺伝子の情報を含んだファイルです。ファイル名の末尾の日付はファイルの更新日付で、更新されると遺伝子の Annotation 情報は変更されることがあります。より新しい情報でデータ解析をしたい場合、既にデザインファイルが存在しても、eArray からダウンロードした最新のデザインファイルをお使い下さい。(GeneSpring で解析をする場合、Annotation 情報はデザインファイルの情報に依存しないため、更新日付は古くても問題ありません)

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

FE プロトコル例) **GE1 107 Sep09**

GE1 … 遺伝子発現 1 カラーアレイ用

GE2 … 遺伝子発現 2 カラーアレイ用

CGH … アレイ CGH 用

ChIP … ChIP-on-chip 用

miRNA… miRNA アレイ用

107 … このプロトコルファイルが対応している Feature Extraction のバージョン

(お使いのソフトウェアのバージョンに合った FE プロトコルを使って下さい)

Sep09 … ファイルの更新時期(より新しいものを使って下さい)

NonAT … アジレント製以外のアレイデータを数値化する時に必要。

➤ 必要な FE プロトコルファイルがなければ、ダウンロードする(巻末の Appendix4 参照)。

QC Metric Set Browser: 各アプリケーションでの QC メトリック(実験の成否判断の閾値)のセット。Feature Extraction10 以降で数値化すると、いくつかの実測値が、アプリケーションごとに設定された閾値の範囲内かどうかを QC レポートに自動出力されます。

➤ 必要なメトリックセットファイルがなければ、下記 Web Site からダウンロードことが可能です。

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

③必要なファイルのインポート

■ Grid Template Browser 内に新規デザインファイルを加える場合

(この操作は Feature Extraction に必要なデザインファイルがない場合、もしくはより新しいデザインファイルで数値化したい時のみ必要になります)

- (1) eArray から必要なデザインファイルをダウンロードする(巻末の Appendix3 参照)。
- (2) ダウンロードしたデザインファイルを解凍し、XML ファイルを“日本語が入らないパス”のフォルダに保存する。

※ 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(XP) または Explorer(Windows7)) を選択)を使用してください。

- (3) **Grid Template Browser Pane** 上で右クリック→Add...を選択後、目的のデザインファイルを選択。(または、メニューバー【Tools > Grid Template > Add...】を選択後、目的のデザインファイルを選択)

■ FE Protocol Browser 内に新規 Protocol を加える場合

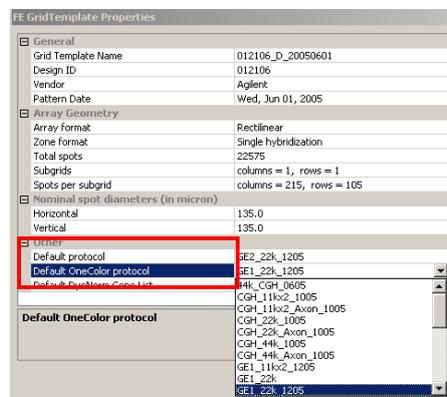
(この操作は Feature Extraction に必要な FE プロトコルがない場合のみ必要になります)

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、メニューバー【Tools > FE Protocol > Import...】を選択後、目的の Protocol を選択)

■ インポートしたデザインファイルに、適切な FE プロトコルを設定する方法

(この操作は新しいデザインファイルをインポートした時のみ必要になります。必要な FE プロトコルが数値化時に毎回自動で割り当てられるようになるため便利です)

- (1) Grid Template Browser Pane に格納されている目的のデザインファイルを選択する。
- (2) **ダブルクリック**(または、メニューバー【Tools > Grid Template > Properties】を選択)して、**FE Grid Template Properties** (右図)の window を開く。
- (3) **Default Protocol** (2 カラーデータ用)、**Default One Color Protocol** に適切な Protocol を指定します。



13. Feature Extraction ソフトウェアによる数値化

STEP1. Feature Extraction ソフトウェアの起動

以下のいずれかの方法でProject Work Windowを立ち上げて、スポット数値化を行います。

- デスクトップのFeature Extractionショートカット  をダブルクリック
- 【Start>Programs>Agilent >Feature Extraction】 からソフトウェアを開始

STEP2. 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  をクリックします。あるいは、Project Explorer内で、右クリックをし、Add Extraction...を選択します。

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

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

2. 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 File、Protocolが現われることを確認して下さい。空欄の項目がある場合、適切なGrid TemplateとProtocolを選択してください(次頁参照)。

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。

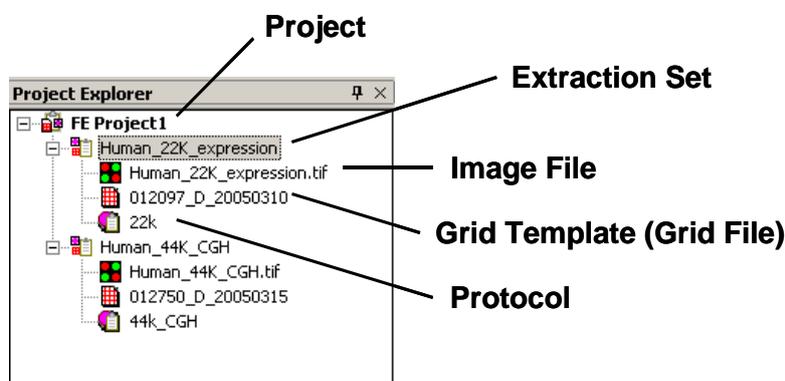
Extraction Set : 解析する tif 画像ごとに作成されます。

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 アレイの場合はデザインファイルを意味します。

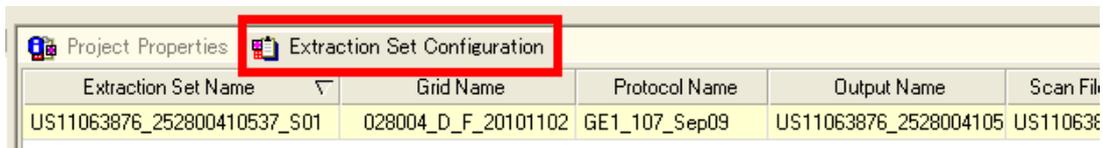
Protocol : イメージの数値化の際、適用する解析アルゴリズムの設定です。



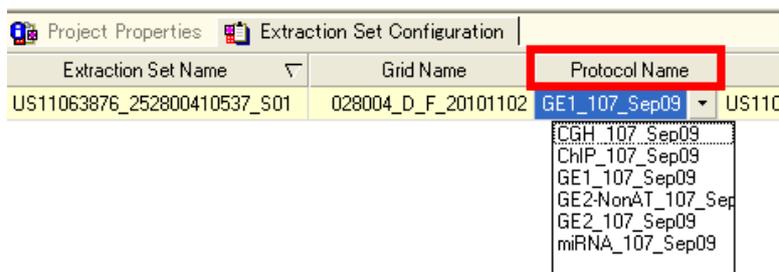
STEP3. 数値化設定の確認とProjectの設定

1. 数値化設定の確認をします。

- Project Work Window中央の**Extraction Set Configuration**タブシートを選択。

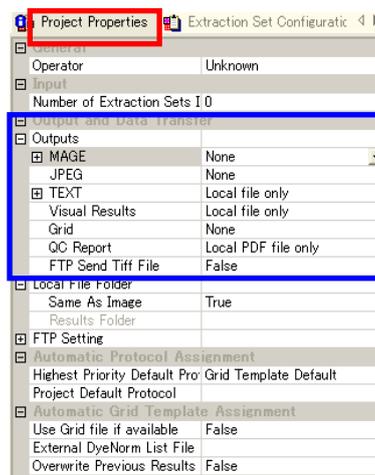


- Extraction Setで用いる構成(TIFFイメージ、デザインファイル、Protocol)を確認します。空欄になっている場合、プルダウンから選択することができます。またプルダウン内にも必要なファイルが表れない場合、p.55を参照の上必要なファイルをインポートして下さい。

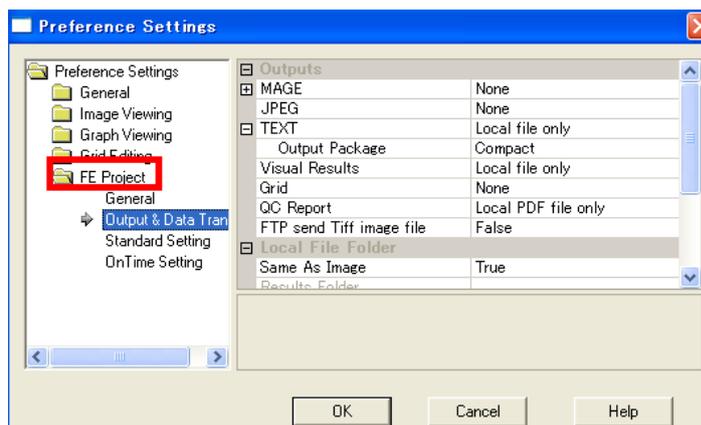


2. Projectの設定、出力ファイルの設定を行います。

- **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)。



(ソフトウェアのデフォルト設定を変更したい場合は、メニューバー【Tools > Preference】で設定画面を開き、【FE Project> Output & Data Transfer】を選択して下さい)



(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)

デフォルトでは、**TEXT**、**Visual Results**、**QC Report**の結果が出力されるよう、これらの項目の設定が**Local file only**、それ以外の項目(MAGE、JPEG、Grid)は、**None**が選択されています。

(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。
JPEG	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。
TEXT	アレイの結果をタブ区切りテキスト形式で出力。解析にGeneSpring、エクセルなどを使用する場合に必要。 ※ TEXTファイルのOutput設定は、以下のOutput Package設定が可能です。 Full : 数値化項目全ての結果を出力します。 Compact : 数値化項目の一部(通常、データ解析に用いられると考えられる項目)の結果を出力します。Fullに比べ、約1/3のファイルサイズとなります。 GeneSpring, DNA Analyticsを使用する場合はCompact推奨。
Visual Results	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。
Grid	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。
QC report	実験の成否をチェックするための項目を含んだレポートを出力。 ※ QC reportはPDFファイルあるいはHTMLファイルで出力できます。 PDFファイルは"Local PDF file only"を、HTMLファイルは"Local HTML file only"を選択してください。HTMLファイルの場合は数値化後、必ずQCReport_Graphsというフォルダと同じフォルダにHTMLファイルを保存してください。

(3) QCメトリックの設定(ver.10.7より前のバージョンをお使いの場合)

Project Propertiesタブシート一番下部"Other"の"QC metric set"プルダウンから"**GE2_QCMT_Jan09**"を選択します。

プルダウンに"GE2_QCMT_Jan09"が表示されない場合、下記Web Siteからファイルをダウンロードし、QC Metric Set Browser上で右クリックしてファイルを追加して下さい。

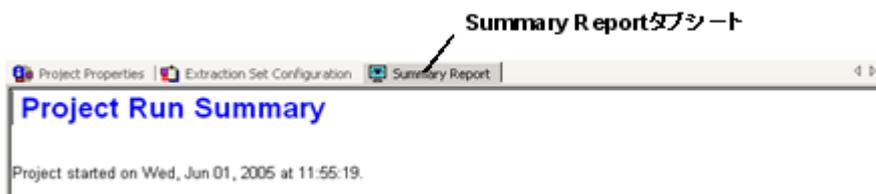
<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=2041>

3. 設定を確認したら、**Projectの保存**を行います。

- メニューバー【File > Save As】を選択し、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もしくは作成して下さい。
- フォルダ指定後、Projectに名前を付けて保存して下さい。

STEP4. Feature Extraction Project をスタート (数値化の実行)

メニューバー【Project > Start Extracting】またはProject Run Mode On/Offボタン  を選択すると、Projectがスタートします。スタート後、Summary ReportタブとRunning Monitorが現われます。

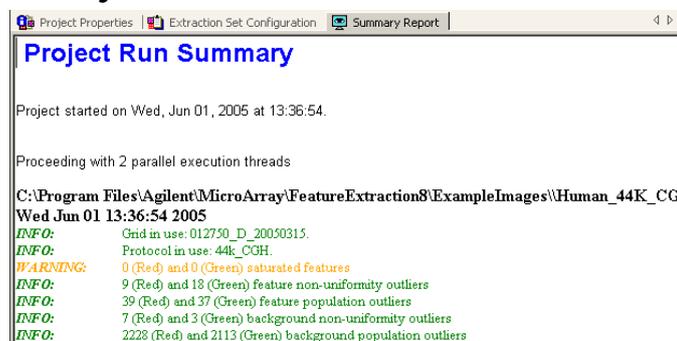


進行状況は、Running Monitorに表示されます。Project終了後、Summary Reportタブを選択していると、Project Work Windowに、Project終了を示すSummaryが現われます。

Running Monitor

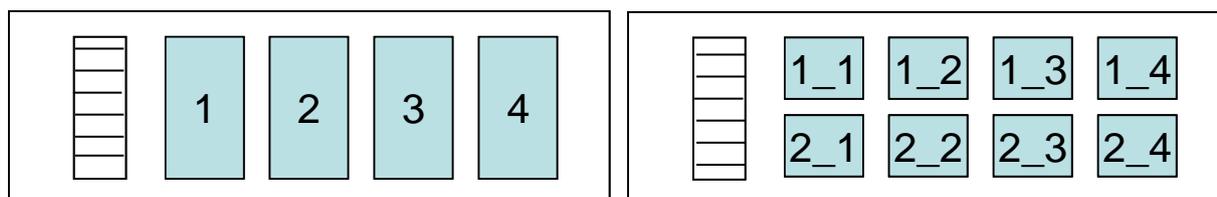


Project 終了後



※ 4x44K及び4x180K フォーマットの出力結果は、ファイル名末尾 "..._1" ~ "..._4" の4つのデータが得られます。8x15K及び8x60K 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サイドが手前の状態)。

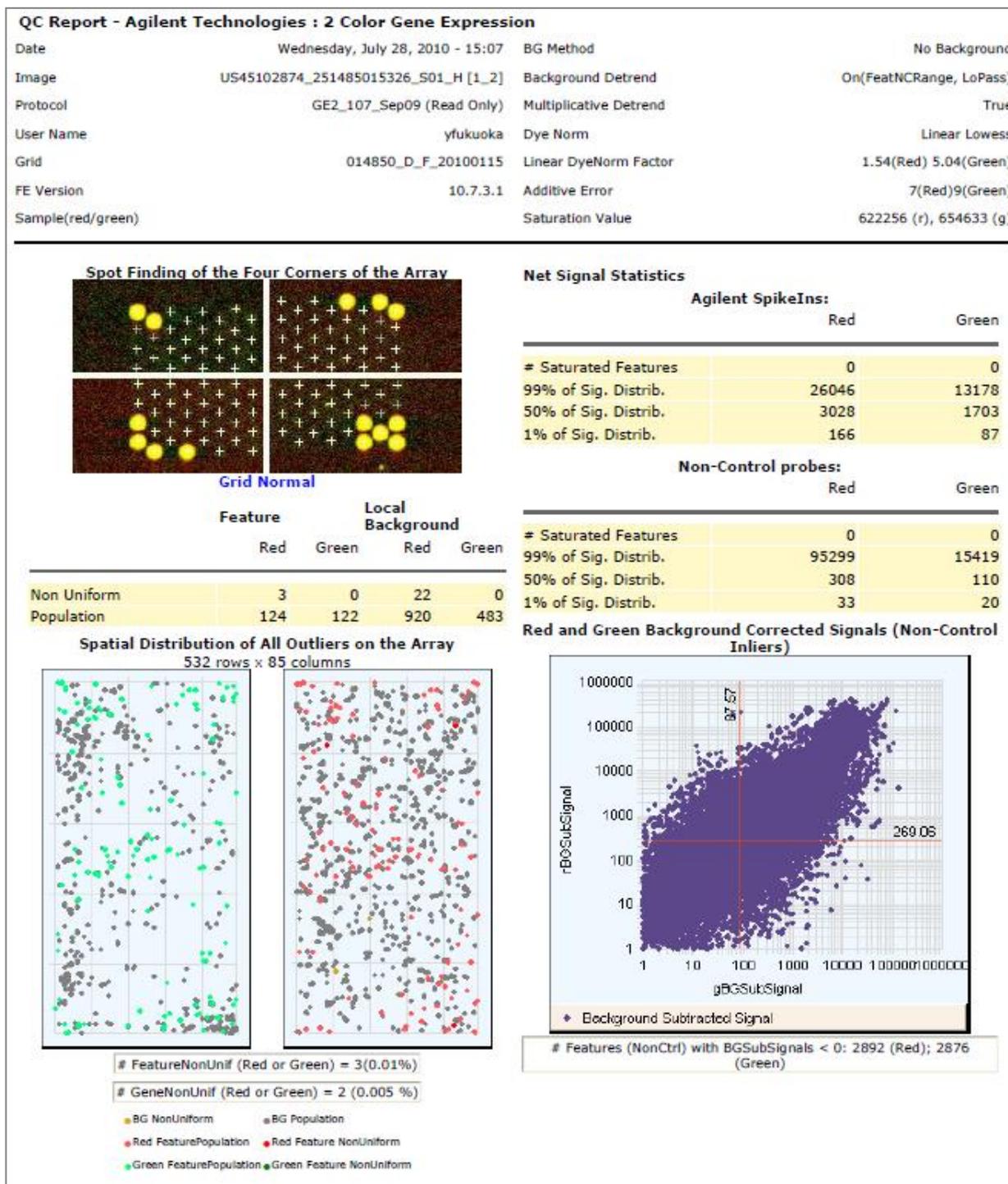


Step 5—QC Reportの確認

- 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。
- “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。

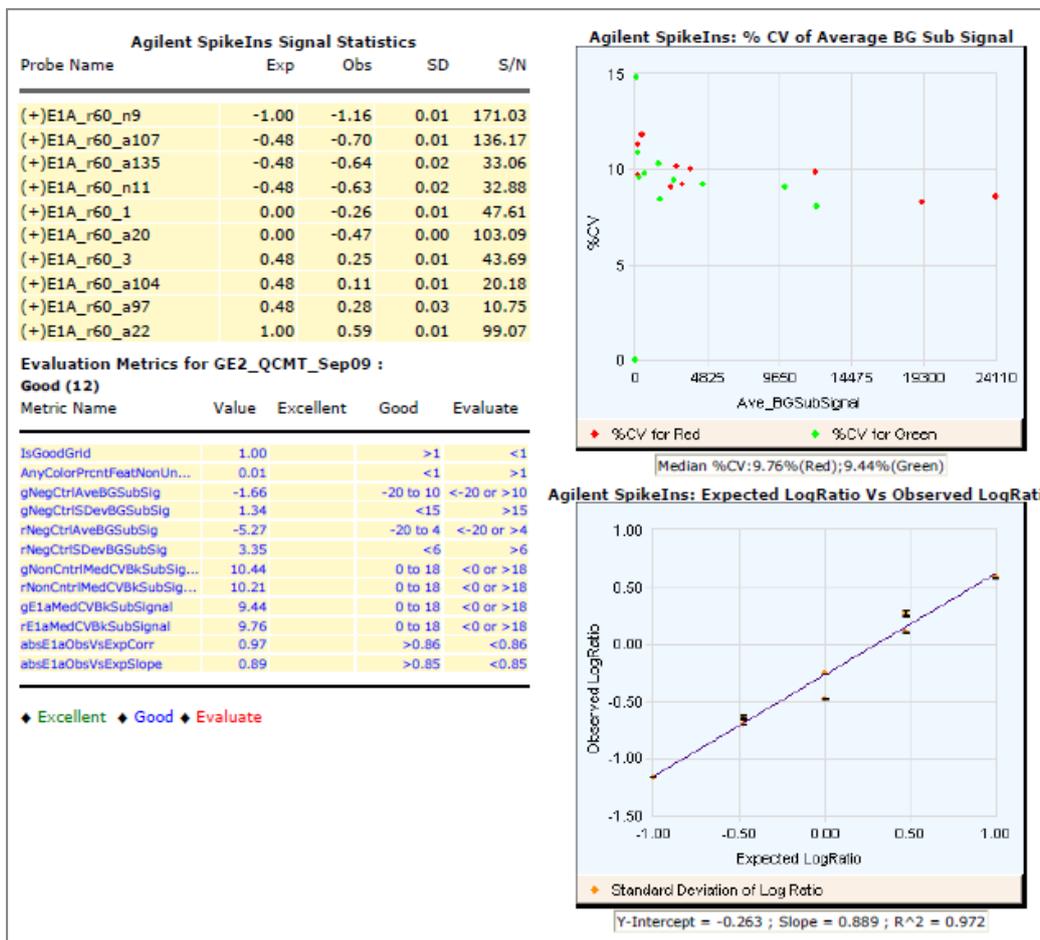
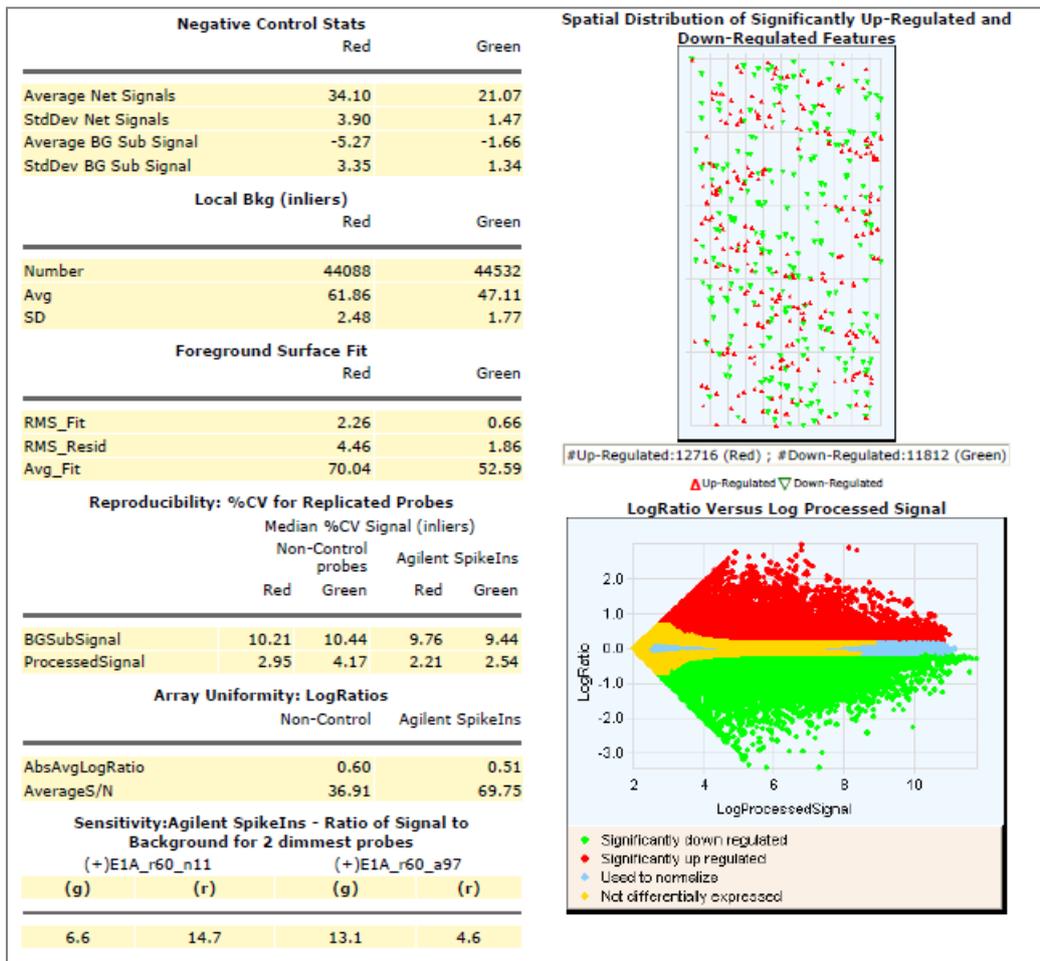
(各項目の詳細は、[Help > Reference Guide](#) で確認することができます。)



Red and Green Background Corrected Signals (Non-Control Inliers)

◆ Background Subtracted Signal

Features (NonCtrl) with BGSubSignals < 0: 2892 (Red); 2876 (Green)

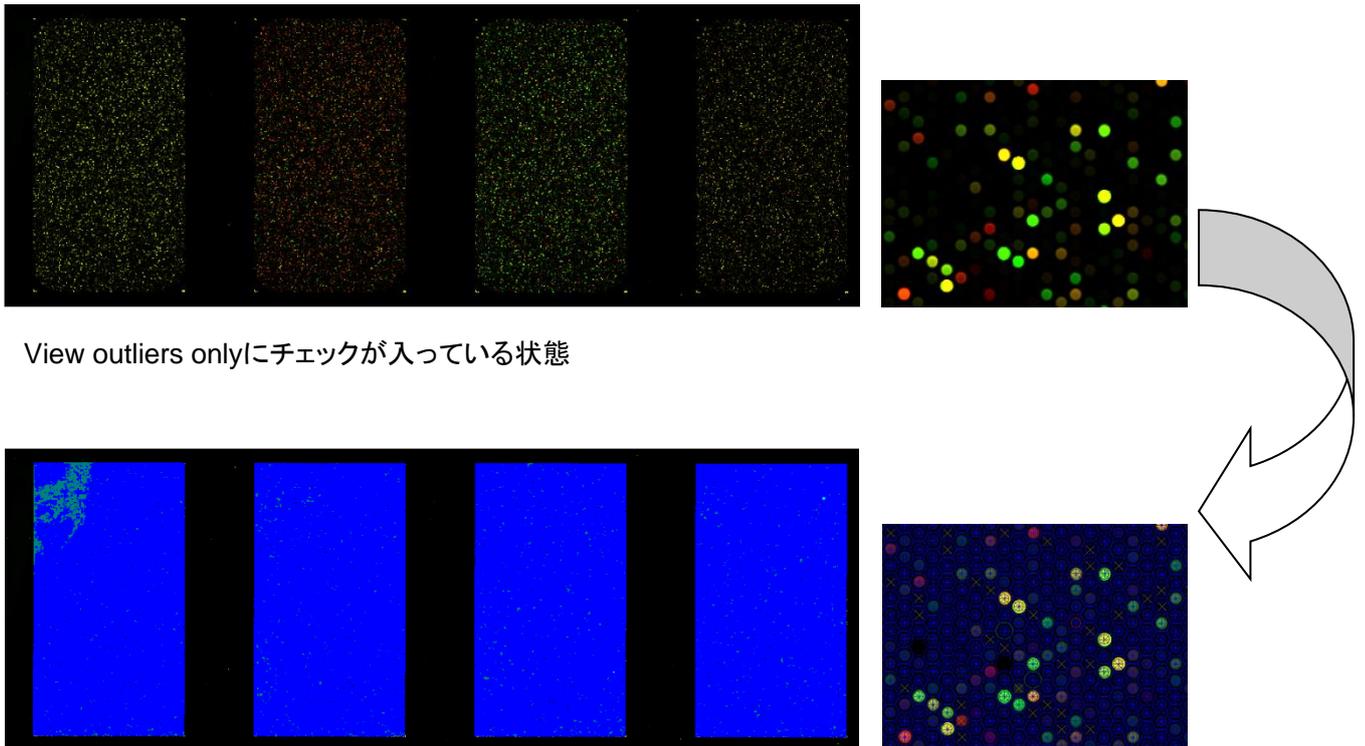


出力された →
QC metrics
のテーブル

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。XDRスキャンをした場合は、1stの画像(ファイル名の末尾に_Hが付いた画像)を表示させます。
2. メニューバーのFeature Extraction > Load Visual Resultを選択します。
3. 該当するVisual Resultファイル(.shp)を選択します。このとき表示させている画像に対応するファイルを選択してください。
4. 画像にVisual Resultが重ね描きされます。
5. クロップモードやズームイン機能、ログスケール表示機能を使って表示を調節します。



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

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
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。 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、色素補正を行い、最終的な 2 サンプルの発現比(LogRatio)および統計処理されたエラー値と P 値を決定します。

上記のスポット解析を行った数値データを用いて、高度なデータ解析を別のソフトウェアで行います。一番身近なものではエクセルが挙げられますが、エクセルはアレイごとの結果を解析するには適していませんが、複数アレイの結果の比較(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。



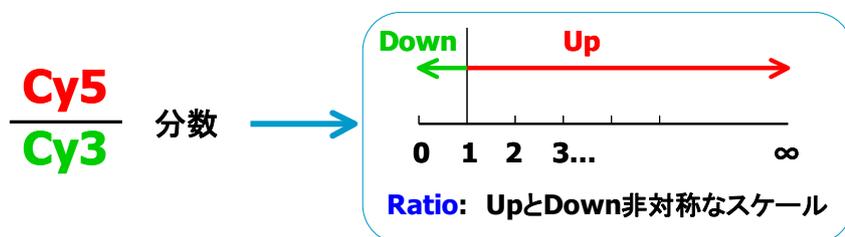
図:スポット解析、データ解析の流れ

スポットの数値化は以下の手順で行われます。

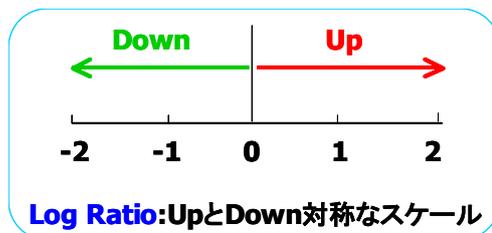
- ① スポットの中心位置の決定
- ② スポット(Feature)およびバックグラウンド領域の決定
- ③ スポット(Feature)のシグナル強度計算
- ④ バックグラウンドのシグナル強度計算
- ⑤ バックグラウンド補正
- ⑥ Multiplicative Detrending
- ⑦ 色素補正
- ⑧ 発現差計算

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(\log_{10})が用いられています。

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

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。
 - $A260/A280=1.8\sim 2.0$ $A260/A230>2.0$

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。

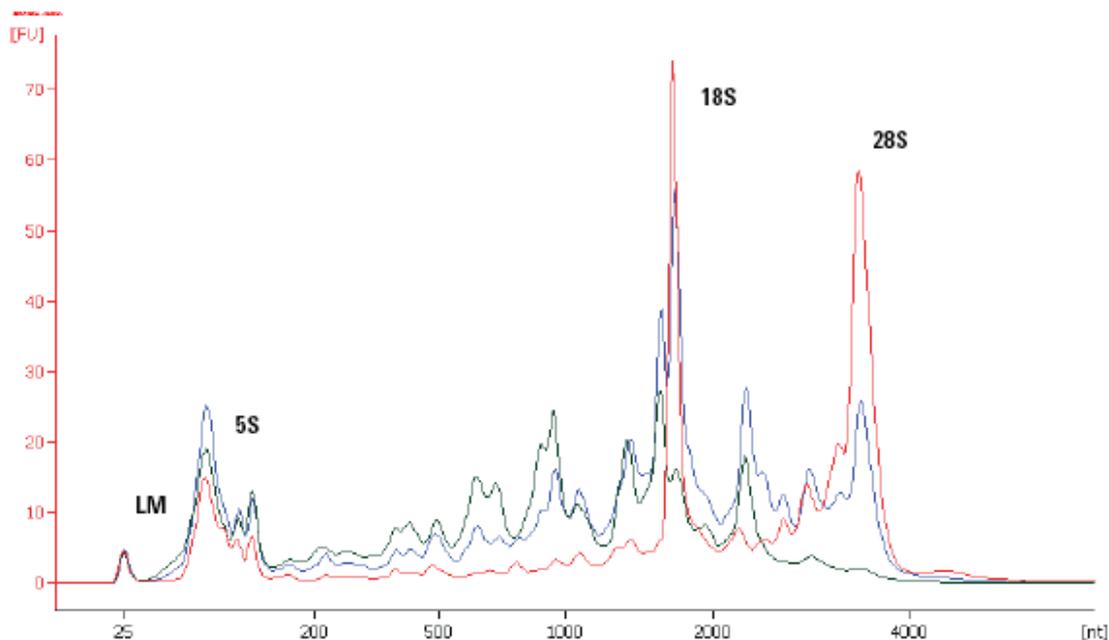
- 18S および 28S リボソーマル RNA (あるいは生物種特有の rRNA) の明確なピークが確認できる
- 18S および 28S リボソーマル RNA のピーク間に分解物がない
- 18S リボソーマル RNA ピークと Lower Maker 間に分解物がない
(5S リボソーマル RNA は精製法によって高さが変わります。カラムを用いて total RNA を精製した場合、通常低くなります。)

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、PCR チューブ及び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、1.5 mL チューブ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.totalRNA からの cDNA 合成

1. 25ng から 200ng の totalRNA を PCR チューブあるいは 96 穴 PCR プレートに加えます。最低 25ng の totalRNA を用いてください。
2. 2uL の希釈した 2 カラー用 Spike-Mix を加えます。Spike-Mix の希釈手順には、p.17 をご覧ください。
3. p.18 の表に従い、T7 Promoter Primer Mix を調製します。
4. 1.8uL の T7 Promoter 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.19 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.20 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.22 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た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。
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。

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>

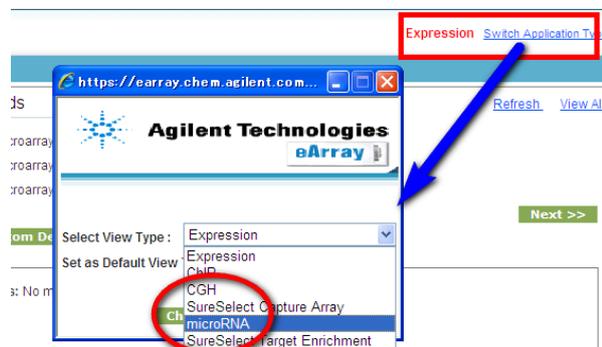
1. お使いのマイクロアレイのデザイン番号 (Design ID)を確認します。

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。

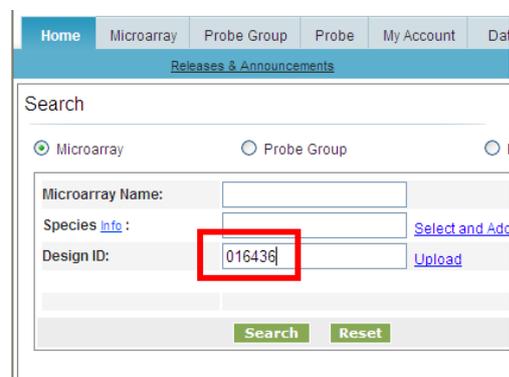


例) 12桁の番号が **251469312345** の場合
 [14693]の頭に「0」を付けた **014693**

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](#)

<input type="checkbox"/>	Microarray Name ▲	Microarray Set Name	Folder Name	Status	Design ID	Created Date	Actions
<input type="checkbox"/>	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.

<input type="checkbox"/>	Category	File Type
<input type="checkbox"/>	BED	BED
<input type="checkbox"/>	CROSSSPECIESHITS	CrossSpeciesHits
<input type="checkbox"/>	EXTERNALFULLGEML	GEML 1.0
<input type="checkbox"/>	EXTERNALFULLGEML2	GEML 2.0
<input type="checkbox"/>	FASTA	FASTA
<input type="checkbox"/>	GAL	GAL
<input type="checkbox"/>	GENELIST	List
<input type="checkbox"/>	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?pagelId=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

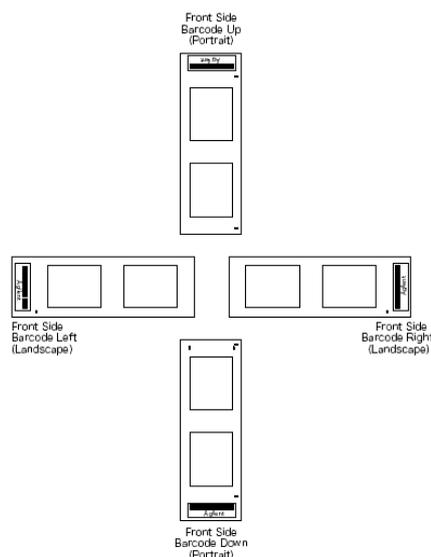
※ 2017 年 4 月現在、上記の **Protocol** のダウンロードが可能です。

※ **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。

Appendix6: 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 eArray からダウンロードできますので、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。



- 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、スライドガラスを横方向(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)

Appendix7: 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、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.

ホットニュース	製品	サービス・サポート
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 最新のイベント情報	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	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、万が一不審な点や誤り、記載もれ等、お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザーの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

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

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

分析結果に基づく損失

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

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

保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

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

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

マイクロアレイに関するサポートお問い合わせ窓口

Tel : 0120-477-111

E-mail : email_japan@agilent.com

***DNAマイクロアレイのテクニカルな質問と明示ください。**

***価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。**