

アジレント

miRNA マイクロアレイシステム (miRNA Complete Labeling and Hyb kit) プロトコル



8x15K, 8x60K アジレント miRNA マイクロアレイ用

Protocol Version 3.1 対応

[2019 年 12 月版プロトコル]

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. 実験に使用する器具・試薬・ソフトウェアの確認.....	4
3. 実験を始める前に.....	8
4. 実験の流れ	9
5. 実験の操作手順〈1日目〉	10
6. 実験の操作手順〈2日目〉	29
7. ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイの画像化.....	43
8. Feature Extraction ソフトウェアで数値化を行う前に	45
9. Feature Extraction ソフトウェアによる数値化	48
Appendix 1 Feature Extraction 用デザインファイルのダウンロードサイト.....	56
Appendix 2 Feature Extraction 用 Protocol のダウンロードサイト	57
Appendix 3 Total RNA の評価	58
Appendix 4 スキャナの詳細な起動手順	62
Appendix 5 データのノーマライゼーションに関しての推奨.....	64
Appendix 6 よくある質問	65
Appendix 7 Agilent 社ゲノミクス製品ホームページ.....	66

1. はじめに

アジレント・テクノロジーでは、マイクロアレイ実験をされる実務者の方を対象に [DNA マイクロアレイ カストマニユース](#)を配信しています。実験プロトコルのアップデート・新製品のご案内・実験に関するトラブルシュート・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 カストマニユース配信希望」と明記して、お名前・ご所属・配信を希望する E-mail アドレスを下記宛先までお知らせください。

email_japan@agilent.com

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

【更新履歴】

Ver.2.4 から ver.3.1 への変更点

- ・ 保証期間の記述を変更しました。
- ・ オープンの校正方法を記載しました。

Ver.2.3 から ver.2.4 への変更点

- ・ Agilent SureScan Microarray Scanner に対応しました。

Ver.2.2 から ver.2.3 への変更点

- ・ 実験手順は同一のまま、より多くのコンテンツで解析可能な SurePrint G3 8x60K マイクロアレイフォーマットに対応しました。SurePrint G3 8x60K フォーマットマイクロアレイのスキャンには、高解像度仕様のアジレント C スキャナが必要です。

Ver.1.x および ver.2.x の違い

- ・ Ver.2.x ではサンプルのラベル化と、miRNA マイクロアレイへのハイブリに必要な試薬全てが含まれた、Agilent miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (p/n 5190-0456)が使用されています
- ・ Ver.1.x に比べて ver.2.x は反応 Volume がより少ない、新しいラベリングプロトコルに変更になりました

2. 実験に使用する器具・試薬・ソフトウェアの確認

2-1. 試薬

※指定: 必ず指定されたものをご使用ください。指定品以外を使用し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した場合、アプリケーションサポートの対象外になります。							
※相当: コメント欄に記載された条件を満たすものなら、何を使用されてもかまいません。							
『ver.番号』は、お使いの実験プロトコルのバージョンに対応しています						青文字はAgilent製品です	
【実験に必要な試薬】							
用途	実験に必須	オプションとして 使用	品名	製造メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当 (1スライド=8アレイ分+α)	備考
アレイ	必須		アジレントmiRNAマイクロアレイ	Agilent		指定	8x15Kまたは8x60Kフォーマット
ラベル化& ハイブリ	必須		miRNA Complete Labeling and Hyb Kit	Agilent	5190-0456	指定	24反応分のCIPとBuffer、LigaseとBuffer、DMSO、Nuclease Free Water、Cy3-pCp、GE Blocking Agent、Hi-RPM Hybridization Bufferが含まれます
		ver.2.2以降/ 1.7で使用	MicroRNA Spike-In Kit	Agilent	5190-1934	指定	384アレイ分のLabeling Spike-InとHyb Spike-Inと希釈バッファが含まれます。オプションとして使用できます。
	必須		DNase/RNase-free Distilled Water 500mL	Thermo Fisher Scientific	10977-015	推奨	Spike-Inの希釈やハイブリダイゼーション溶液の調製に使用します。DEPC処理水は使用しないでください。
ラベル化サンプル 精製		ver.2.2以降/ 1.7で使用	MicroBioSpin 6 Columns	BioRad	732-6221	指定	8本/スライド ラベル化サンプルの精製（オプション）に使用します。
洗浄	Wash buffer単品 およびTriton X-102、あるいは Wash Packのい ずれかが必須		Gene Expression Wash Pack	Agilent	5188-5327	指定	Buffer1が2個、Buffer2が1個、 Triton X-102 (1.35 ml)6本のセット
			(10% Triton X-102 50ml)	Agilent	5185-5975	指定	Buffer 4Lに対して2ml使用 上記5188-5327に含まれます
			(Gene Expression Wash Buffer1)	Agilent	5188-5325	指定	1回の洗浄で約700ml使用 4L(上記5188-5327に含まれます)
			(Gene Expression Wash Buffer2)	Agilent	5188-5326	指定	1回の洗浄で約350ml使用 4L(上記5188-5327に含まれます)

■Agilent miRNA Complete Labeling and Hyb Kitには、ラベリングとハイブリダイゼーションに必要な以下の試薬が、全て含まれます。

- Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)
- 10X Calf Intestinal Phosphatase Buffer
- T4 RNA Ligase
- 10X T4 RNA Ligase Buffer
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Nuclease-Free Water
- Cyanine 3-pCp
- 10X GE Blocking Agent
- 2X Hi-RPM Hybridization Buffer

■microRNA Spike-In Kitには、アレイ実験の成否判断に有用な以下の試薬が含まれます。

- Labeling Spike-In
- Hyb Spike-In
- Dilution Buffer

【試薬・消耗品の保管について】

■miRNA Complete Labeling and Hyb Kitに含まれる試薬の保存は以下に従って下さい。

2x Hi-RPM Hybridization Buffer と調製前の 10xBlocking Agent 室温

調製後の 10xBlocking Agent とそれ以外の全ての試薬 -20℃

■Cyanine 3-Cytidine Bisphosphate と Spike-In kit の Hyb-Spike In は蛍光色素を含むため遮光に注意して保存して下さい。

■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。開封後は外気との接触を極力避けて下さい。

2-2. ラベル化・ハイブリダイゼーションに必要な器具・消耗品

【実験に必要な機器・器具・消耗品】								
用途	実験に必須	必要に応じて使用	品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当点	必要量	備考
ラベル化	必須		UV分光光度計	NanoDrop	ND-2000	相当	1台	
			卓上遠心器	日本ミリポア	チビタンII 5355	相当	1台	
			ヒートブロック(ライゲーション: 16℃)	エッペンドルフ	000.046(本体のみ)	相当	1台	確実に16℃を保てるもの
			ウォーターバス(脱リン酸化: 37℃)			相当	1台	
ラベル化 & ハイブリ	必須		ドライブロックバス(熱変性100℃)	アズワン	EB-303	相当	1台	温度を測って、確実に100℃に加熱できるもの
			パウダーフリー手袋 SAFE SKIN グローブ PRE (S, M, L サイズ)	Kimberly・Clark	220, 330, 440 (S, M, Lサイズ)	相当		
			ピペット(1ul-1ml)			相当		
			ピペットチップ			相当		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。
			1.5ml Rnase-free Microfuge Tubes	Ambion Eppendorf	12400 22363204	推奨		RNase FreeでRNAの吸着がないことを確認した製品をお使い下さい。オートクレープ処理はお勧めしません。
			アイスバケツ					氷水を入れておけるもの
			高速遠心機			相当	1台	
			濃縮遠心機 (Speed-vac centrifugal concentrator)	Savant SpeedVac	SPD111V	相当	1台	本体は45℃から55℃で加温が可能なもの/ローターは1.5mlチューブが入るもの
			ボルテックスミキサー			相当	1台	
			Cap Lock for 1.5 ml Tube				同時にラベル化する反応数分	1.5 mlチューブでラベル化反応を行う際は必須です。耐熱性(100℃)が必要です(参考商品: フナコシ、1003-39)。
ハイブリ	必須		オリゴDNAマイクロアレイ用ハイブリダイゼーションチャンバ	Agilent	G2534A	指定		以下の消耗品が別途必要です。
			8x15K, 8x60K Agilent microarray gasket 5 slides	Agilent	G2534-60014	指定		5枚セット。
			8x15K, 8x60K Agilent microarray gasket 20 slides	Agilent	G2534-60015	指定		20枚セット。
			8x15K, 8x60K Agilent microarray gasket 100 slides	Agilent	G2534-60016	指定		100枚セット。
			ハイブリダイゼーションオープン	Agilent	G2545A	指定	1台	別途専用ローターが必要です。(下記)
			ハイブリダイゼーションオープンローター	Agilent		指定	1個	最大24チャンバーまで載せることができます
		必要に応じて使用	ハイブリエイド	アジレントにお問合せ下さい	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できます。
Wash Buffer 2 とガラス容器の保温	必須		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の洗浄開始までWash Buffer 2(5188-5326.4Lまたは分注した約350 ml)および Wash Buffer 2用 ガラス容器を37度で保温します。

【実験に必要な機器・器具・消耗品(続き)】									
洗浄		いずれかを 選択	クリーンガード ブルーニトリルグローブ	Kimberly Clark	57371, 57372, 57373 (S, M, Lサイズ)	相当			事前にビーカーに入れたWash buffer1で手袋を洗い、手袋から垂れるbufferが白濁していないこと、ビーカー内のbufferに微粒子がないことを確認してください。ニトリルグローブと超精密ピンセット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個		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。
		必要に応じて	密閉容器			相当	1個		4Lの洗浄パッド2を恒温乾燥機で保温することが難しい場合は、洗浄パッド2を必要量を密閉容器に移し、保温します。
			洗浄用ガラス容器の必要数について スライド解体用1個、Wash1と2用に2個必要です。 洗浄用ガラス容器のサイズについて 1回の洗浄が5枚以下なら小、6から8枚なら中を選択します。						
			《スライドガラス解体用》						
			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個入りです)		ガスケットスライドとアレイを解体するときに使います。 Wheaton900201やPyrexも使用可能ですが、作業しやすいため、Wheaton900201や小さい容器を使う場合は超精密ピンセット33Aも含めて使用することをお勧めします。
			《1回の洗浄が5枚以下の場合: 必要なものを組み合わせて購入ください》						
		必須 (1回に実験する スライドガラス枚 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(1セット3個入りです)		スライドラック109 (Thermo Shandon)に対応しています。Wash buffer1, 2に各1個ずつ使用します。
			スライド洗浄ガラス容器 (Dish)	Thermo Shandon	102	相当	2個 (1個単位での販売です)		スライドラック109 (Thermo Shandon)に対応しています。Wash buffer1, 2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。
			《1回の洗浄が8枚以下の場合: 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 (1個単位での販売です)		スライドラック113 (Thermo Shandon)を使用してください。Wash buffer1, 2に各1個ずつ使用します。
		必須	回転子			相当	2個		ラック小には3cm、ラック大には5cm程度の長さのもの
			スターラー			相当	1個		Wash Buffer1用に使用します
			恒温槽付スターラー	日伸理化	SW-500NT	相当	1個		Wash Buffer2を37℃に保温したまま5分間、アレイの洗浄が行える器具があれば、この製品でなくても使用可能です。
ハイブリ/洗浄	必須		ブロワー				1個		スライドガラス表面に付着したほこり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ください。
スキャン	必須		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	1台		8x60Kフォーマットのスキャンは、3umの解像度が必要です。
		必要に応じて	オゾンバリアカバー	Agilent	G2509-60550	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。AgilentアレイおよびAgilentBあるいはCスキャナの組み合わせで使用可能です。SureScanでは使用できません。
アレイ保存		必要に応じて	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)、あるいは窒素バーン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バイラルチューブが必要です。
			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。

【試薬・消耗品の保証期間について】

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

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

2-3. スキャン・数値化に必要なスキャナ・ソフトウェア

本プロトコルでは、8x15K マイクロアレイもしくは 8x60K マイクロアレイのいずれかにラベル化 miRNA をハイブリダイゼーションする手順について説明しています。使用予定のマイクロアレイのフォーマット、また Spike-In Control を使用するか否かに応じて、以下のバージョンのスキャナ及びソフトウェアが必要になります。

Microarray Format	Scanner version	Scan Control version	Scan settings/profile	Spike-In	Feature Extraction version	GeneSpring version
8x60K	SureScan	9.X	AgilentG3_HiSen_miRNA	Yes	10.7.3 or later	11.5 or later
8x60K	SureScan	9.X	AgilentG3_HiSen_miRNA	No	10.7.3 or later	10.0 or later
8x15K	SureScan	9.X	AgilentHD_miRNA*	Yes	10.7.3 or later	11.5 or later
8x15K	SureScan	9.X	AgilentHD_miRNA*	No	10.7.3 or later	10.0 or later
8x60K	C	8.X	AgilentG3_HiSen_miRNA	Yes	10.7.3 or later	11.0 or later
8x60K	C	8.X	AgilentG3_HiSen_miRNA	No	10.5 or later	10.0 or later
8x15K	C	8.X	AgilentHD_miRNA*	Yes	10.7.3 or later	11.0 or later
8x15K	C	8.X	AgilentHD_miRNA*	No	10.5 or later	10.0 or later
8x15K	B	7.X	36 ページを参照してください。	Yes	10.7.3 or later	11.0 or later
8x15K	B	7.X	36 ページを参照してください。	No	9.5.3 or later	10.0 or later

* Resolution を”5 um”から”5 um high sensitivity”に変更してください。

【スキャナについて】

8x15K miRNA マイクロアレイは、いずれのスキャナでも読み込むことができますが、8x60K miRNA マイクロアレイのスキャンには 3um で読み取り可能な SureScan、または高解像度 C スキャナが必要です。

【Feature Extraction のバージョンについて】

8x15K miRNA マイクロアレイの数値化には、Feature Extraction ソフトウェアバージョン 9.5 以上が必要です。8x60K miRNA マイクロアレイの画像の数値化には、FE10.5 以上が必要です。

マイクロアレイのフォーマットに関わらず、Agilent microRNA Spike-In の結果を自動的に QC レポートに表示させるには FE10.7.3 以上が必要です。

3. 実験を始める前に

＜＜実験上のご注意＞＞

- ・ 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。
- ・ 実験を確実に成功させるために、ラベリングとハイブリダイゼーションに使う input RNA の分解度合いをチェックして下さい。
- ・ 清潔に保たれた空間で、作業をして下さい。
- ・ 凍結している試薬を使用する場合は、次のことを守って下さい。
 1. 室温以上への過熱を避け、出来るだけ素早く溶解する
 2. 素早く混合し、5-10 秒 Flash して壁やふたの試薬を底に集める
 3. 使用直前まで、氷上か Cold Block に保つ
- ・ Cyanine 3-pCp 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。
- ・ 全般的に、Biosafety Level 1 (BL1) の Safety Rules に従って下さい。
- ・ 実験に使用する全ての試薬・消耗品のロット番号と Expiration Date を記録して下さい。お問い合わせ頂く際はこれらの情報を添えて、お問い合わせ下さい。

安全上のご注意

- ・ スライドガラスの縁は鋭利です。手袋をはめ、十分注意して取り扱ってください。
- ・ 本実験では、毒性のある試薬を使用します。操作時の安全には、十分ご注意ください。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。
- ・ ジメチルスルホキシド(DMSO)は吸入、皮膚接触、誤飲により、害を引き起こす恐れがあります。DMSO の蒸気・霧は、目・粘膜や上気道に対して刺激性です。皮膚の炎症や呼吸器・皮膚にアレルギー反応を起こすことがあります。実験動物試験の結果より、過曝露により生殖不全を起こす可能性があります。
- ・ 2x Hi-RPM Hybridization Buffer は OSHA Hazard Communication Standard (29CFR 1910.1200)によって有害だとされています。誤飲により、害を引き起こす恐れがあります。このバッファには、皮膚や中枢神経系に害を及ぼす可能性のある物質が含まれています。安全情報については MSDS を参照して下さい。

4. 実験の流れ

Total RNA (100ng) + Labeling Spike-In (オプション)

↓ 脱リン酸化反応 ※

37°Cで 30 分間インキュベーションする

脱リン酸化 RNA

↓ DMSO を加える

↓ 熱変性、氷冷

↓ ラベル化反応※

16°Cで 2 時間インキュベーション

ラベル化 RNA

↓ カラム精製 (オプション) ※

↓ 濃縮 ※

45°Cから 55°Cで約 2 時間～3 時間

(カラム精製した場合は約 1 時間)

↓ ハイブリダイゼーション溶液調製 + Hyb Spike-In (オプション)

↓ 熱変性、氷冷

↓ ハイブリダイゼーション

55°Cで 20 時間インキュベーション (20 rpm)

↓ 洗浄、スキャニング

miRNA のプロファイリング

必要であれば、※印の操作の後、-80°Cで保存することができます。

本ラベリングシステムでは、**100 ng** の **Total RNA サンプル** から miRNA を蛍光標識します。本法では、**90%以上の効率**で RNA 分子の3'末端に 1 分子の Cyanine 3-pCp を付加します。

注意 本ラベリングシステムでは、標識分子を Ligation するためターゲット miRNA の 3'端に Accessible な水酸基を必要とします。(植物など)3'端が修飾を受けている生物種には本ラベリングシステムは使用できませんのでご注意ください。

5. 実験の操作手順〈1日目〉

実験の前準備

①実験を始める前に、以下の器具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 (RNase Free)
- ☐ アイスボックス (クラッシュアイスの間隙を水で満たしたもの)
- ☐ ヌクレアーゼフリー水
- ☐ タイマー
- ☐ Vortex ミキサー
- ☐ パーソナル遠心機
- ☐ 油性ペン

②あらかじめ使用する機器の温度設定をしておきます。

1. ウォーターバスを 37°C に設定。
2. ヒートブロックを 16°C、100°C に設定

注意 使用する器具は、確実に設定温度になっていることを事前に温度計で確認して下さい。

Step	Temperature	Time
脱リン酸化 30min		
脱リン酸化	37°C	30 min
熱変性 10min		
熱変性	100°C	5 min
冷却	氷上	2 min
ライゲーション 120min		
ライゲーション	16°C	120 min
ハイブリダイゼーション 約120min		
サンプルの濃縮	45°C	1~2 h
熱変性	100°C	5 min
冷却	氷上	5 min
ハイブリダイゼーション	55°C	20 h

③実験に使う Total RNA サンプルを用意します。

吸光光度計による濃度測定と、電気泳動による品質チェックを、あらかじめ行ってください。

ノート

Total RNA の抽出法および品質チェックに関する推奨方法につきましては、巻末の『Total RNA の評価』をご参照下さい。実験を進める前に本プロトコル全体を読んで下さい。

5-1. Spike-In 溶液の調製(オプション)

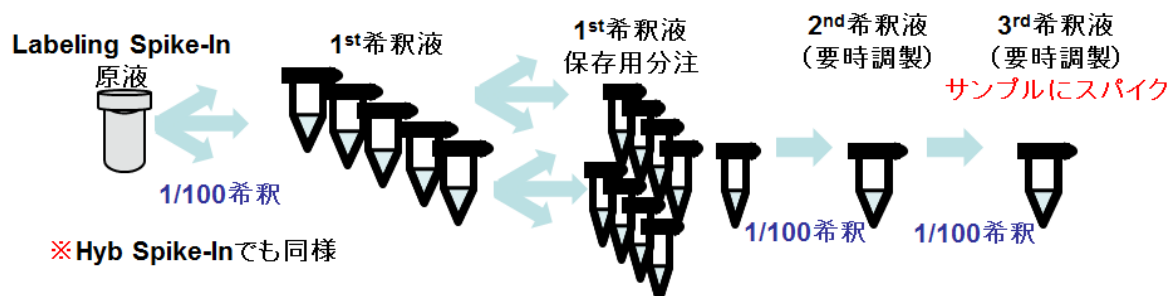
Agilent microRNA Spike-In キット(p/n 5190-1934)は、実験プロセスのコントロールのための 2 種類の microRNA Spike-In 溶液から成ります。Spike-In 溶液は、有意な生物学的データと実験プロセスでの問題を区別するためのツールとして使用します。**Labeling Spike-In** 溶液はラベル化反応前にスパイクし、**Hyb Spike-In** 溶液はハイブリ反応前にスパイクします。一連のプロジェクト内で、Spike-In を使用するかどうか統一することをお勧めいたします。

注意 Hyb Spike-In は蛍光色素を含みます。保管および作業時は遮光を心がけて下さい。

注意 原液及び 1st 希釈液の凍結融解は **2 回までにとどめて下さい**。また希釈済みの 1st 希釈液は **-80℃で 6 カ月まで保存が可能です**。

注意 この Spike-In はアレイデータの Normalization 目的には使用できません。

注意 Drosophila Melanogaster の miRNA マイクロアレイには使用できません。Spike-In の配列は Drosophila Melanogaster の配列に由来しています。



① Spike-In 溶液 1st 希釈作製と保存 (Spike-In キット開封時にのみ必要な作業)

1. 全ての試薬を溶解し、軽く遠心する
2. チューブを 10 本用意し、5 本に”1st 希釈 Labeling Spike-In”、残り 5 本に”1st 希釈 Hyb Spike-In”と記入する
3. 各チューブに 198 uL の Dilution バッファを分注する
4. “Labeling Spike-In”用チューブには Labeling Spike-In 溶液を 2uL、“Hyb Spike-In”用チューブには Hyb Spike-In 溶液を 2uL 加える
5. よく混ぜて軽く遠心する
6. (オプション)凍結融解の繰り返しを避けるため、各 1st 希釈液を 20～50uL ずつの小分けにし、それぞれ新しいチューブに分注する
(少量に分けるほど 1 キットで処理できるサンプル数が多くなりますが、6 ヶ月以内に実施予定の実験回数に応じて分注の量を加減して下さい)
7. 保存用小分け 1st 希釈液は1つずつ使い、残りは-80℃で保存する

②それぞれ使用直前に、Labeling 及び Hyb Spike-In 溶液を希釈

(毎回の実験時に必要な作業)

1. チューブを Labeling 及び Hyb Spike-In 用にそれぞれ 2 本ずつ準備する
-2nd 希釈 Labeling Spike-In -3rd 希釈 Labeling Spike-In
-2nd 希釈 Hyb Spike-In -3rd 希釈 Hyb Spike-In
2. 各チューブに 198uL の DNase/RNase free 水を分注する
3. それぞれ使用直前に、2nd 希釈液を作製する
-1st 希釈 Labeling Spike-In を、2nd 希釈 Labeling Spike-In のチューブに 2uL 加える
-1st 希釈 Hyb Spike-In を、2nd 希釈 Hyb Spike-In のチューブに 2uL 加える
4. よく混ぜて軽く遠心する
5. それぞれ使用直前に、3rd 希釈液を作製する
-2nd 希釈 Labeling Spike-In を、3rd 希釈 Labeling Spike-In のチューブに 2uL 加える
-2nd 希釈 Hyb Spike-In を、3rd 希釈 Hyb Spike-In のチューブに 2uL 加える
6. よく混ぜて軽く遠心する
(※この 3rd 希釈液が、ラベル化反応もしくはハイブリ反応に使用されます)
7. 2nd 希釈液と 3rd 希釈液は使用後すぐ廃棄し、1st 希釈液は-80℃で保存する

5-2. Total RNA の濃度調整

実験を始める直前に、実験に使用するサンプルを適切な濃度に希釈します。

注意 低濃度の RNA はサンプルチューブに吸着する恐れがあります。保管は 100 ng/uL 以上の濃度で行い、希釈は実験を始める直前に開始して下さい。また、一旦希釈した RNA は、保存できません。必ず要時調製して下さい。

- ① Total RNA の濃度を測定します。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、“**Nucleic Acid Measurement**”のタブを選択します。
1.5 uL の DNase/RNase free 水で、NanoDrop でブランクを設定します。
1.0 uL の Total RNA を濃度測定に用います。

- ② Total RNA を、**50ng/uL** の濃度になるように、DNase/RNase free 水または 1xTE(pH7.5)で希釈します。
- ③ 希釈した Total RNA を 2uL(100ng)、1.5mL チューブに分注し、氷上に保存します。

注意 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。ここで使用する水は、必ず、**Agilent miRNA Complete Labeling and Hyb Kit** に含まれる水か、Invitrogen 社の DNase/RNase-free water (10977015)をお使いください。

5-3. 脱リン酸化反応

- ①使用直前に、**CIP マスターミックス**を作ります。CIP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)と 10X CIP Buffer、Labeling Spike-In 3rd 希釈液(もしくは水)を以下の表 1 の組成で混合し、調製後使用までは氷上で保存して下さい。

表 1 Labeling Spike-In 溶液を使用する場合の CIP マスターミックスの調製

	1反応分の必要量(μL)	8(+1)反応分の必要量(μL)
10x CIP Buffer	0.4	3.6
Labeling Spike-In (3rd希釈液)	1.1	9.9
CIP	0.5	4.5
トータル量	2.0	18.0

(Option) Drosophila の miRNA の発現プロファイルを取りたい場合など、**Spike-In を使用せずに**実験をしたい場合は、Spike-In を水で置き換えた以下表 2 に従って下さい。

表 2(Option) **Lablineg Spike-In 溶液をしない場合**の CIP マスターミックスの調製

	1反応分の必要量(μL)	8(+1)反応分の必要量(μL)
10x CIP Buffer	0.4	3.6
DNase/RNase free水	1.1	9.9
CIP	0.5	4.5
トータル量	2.0	18.0

* 本プロトコル中の表には、1 サンプル分の必要量と、8xフォーマット 1 枚に必要な 8 サンプル分 (+1 反応分=計 9 サンプル分)の必要量を示します。一度に反応を行うサンプル数によって調節して下さい。

- ②各サンプル(Total RNA 100 ng)に CIP マスターミックスを 2μL 加え、ピペッティングで穏やかに混合します。
- ③37℃のウォーターバスかヒートブロックで 30 分間インキュベーションします。

ノート

直ちに実験を続けない場合、この後、-80℃で保存することが可能です。

ノート

カラム精製のステップまで、同一チューブを使用しサンプルを移し替えないでください。96 well plate とサーマルサイクラーを用いる際は、PCR キャップを使用しシールは使用しないでください。またサーマルサイクラーと整合性のある 96 well plate をご利用ください。

5-4. 熱変性

- ① サンプルに 2.8 μ L の DMSO を加えて混合し、チューブの蓋を隙間がないようにきっちりと閉めます。

表 3 熱変性反応液の調製

1サンプル中の量(μ L)	
現在のサンプル量	4.0
DMSO	2.8
トータル量	6.8

- ② 加熱中に蓋が開いてしまわないようにチューブキャップカバーをはめて 100°C のヒートブロックかウォーターバスで 5 分から 10 分間インキュベーションします。

注意 加熱中チューブの蓋が開かないように、キャップカバーなどをご使用下さい。

注意 このステップでは 5 分以上、しかし 10 分を超えないように注意して下さい。ラベリング効率に影響が出る恐れがあります。

- ③ 待ち時間に、アイスボックスにクラッシュアイスを入れ、そこに水を加えた氷水を準備します。クラッシュアイスに加える水の量は、チューブが水に浮いてしまわない程度に少なく、かつ氷に挿したチューブの壁が水に浸る程度に多く、加減して下さい。適切な水量では、1.5 mL のチューブを氷水に挿した際に、チューブの先端から 2/3 程度が氷水に浸り、蓋部分は氷の上に出ている状態となります。

注意 変性した状態を保つために、確実にサンプルが冷えることが重要となります。そのため、氷ではなく、水を満たした氷水をご使用下さい。

- ④ **直ちに**、キャップカバーをはめたまま、氷水を満たしたアイスボックスにサンプルを移し、2 分冷却します。この際、蓋とチューブの隙間から氷水が入ってしまうのを避けるために、チューブの本体の壁は下部 2/3 程度は氷水に浸し、チューブの蓋は氷水に浸けてしまわないようにご注意下さい。

注意 サーマルサイ클ラーをご利用の際も必ず水を満たした氷水で 2 分冷却してください。

- ⑤ 冷却後、キャップカバーを外してからサンプルチューブをスピンドウンし、氷上に置きます。アイスボックス内の氷水を廃棄し、ただちに次のステップに進んで下さい。

5-5. ライゲーション

- ① 10x T4 RNA Ligase Buffer を、**沈殿が完全に溶けるまで** 37℃で加温しボルテックスで撹拌します。

注意 撹拌後、確実にBufferが室温に冷えてから次のステップに進んで下さい。T4 RNA Ligaseの活性、およびラベリング効率に影響する可能性があります。

注意 Cyanine 色素は光で分解します。以後のステップは可能な限り遮光を心がけて下さい。

注意 ライゲーションマスターミックスは調製後 15 分以内に使用するようして下さい。15 分を超えるとラベリング効率に影響が出る恐れがあります。

- ② 新しい 1.5 mL チューブを用意し、下表に従ってライゲーションマスターミックスを調製します。

表 4 ライゲーションマスターミックスの調製

	1反応分の必要量 (uL)	8(+1)反応分の必要量 (uL)
10x T4 RNA Ligase Buffer	1.0	9.0
Cyanine3-pCp	3.0	27.0
T4 RNA Ligase	0.5	4.5
トータル量	4.5	40.5

- ③ 各サンプルに、ライゲーションマスターミックスから 4.5uL ずつを加えて穏やかにピペッティンで混合し、スピンドウンします。

表 5 ライゲーション反応液の調製

	1サンプル中の量 (uL)
現在のサンプル量	6.8
ライゲーションマスターミックス	4.5
トータル量	11.3

- ④ 16℃のウォーターバスかヒートブロックで 2 時間インキュベーションします。

ノート 直ちに実験を続けない場合、この後、-80℃で保存することが可能です。

5-6. サンプルの精製 (オプション)

ラベル化したサンプルから DMSO および未反応の Cyanine3-pCp を除去するために、Micro Bio-spin6 カラムで精製することができます。精製を行うと、実験ステップは一つ増えますが、後の濃縮にかかる時間を短縮することができます。(このステップの待ち時間に、『6-7 サンプルの濃縮』で使用する濃縮遠心機の準備を済ませて下さい)

このオプションのカラム精製を行わない場合、ライゲーション終了後すぐ 6-7 に進んで下さい。

- ①BioRad 社の MicroBioSpin6 を、直前に 4℃の冷蔵庫から出してキットに添付の 1.5mL チューブにサンプル名を記入し、以下の要領でゲル(充填剤)の調製を行います。(4℃では蓋つきチューブの蓋が折れやすいため、蓋つきチューブのみ、先に冷蔵庫から出して室温状態で使うこともできます)

- 1). カラムを素早く数回転倒混和し、ゲルをバッファ中でよく懸濁する。カラム下方に気泡ができた場合、タッピングにて泡を消す
- 2). カラム下方の先端を手でちぎり、キットに含まれる 2.0mL チューブにセットする
- 3). 緑色のキャップをはずし、バッファが重力によってカラムから滴り落ちるのを確認する。もし液体が全く落ちて来ない場合、緑色のキャップを再びカラムにかぶせてきゅっと押し、もう一度キャップをはずしてから液が滴り落ちるのを確認する
- 4). バッファの液面がゲルベッドの最上部程度に下がるまで、約 2 分間、バッファが自然に流れ出るのを待つ
- 5). 全てのカラムで同様にバッファが流れ出たのを確認した後、2.0mL チューブ内に流れ出たバッファを捨て、再びカラムをセットする
- 6). カラムを 1000g で 2 分間遠心する (遠心後、カラム下部が 2.0mL チューブ内の廃液に接していないこと、カラムは半透明ではなく白い不透明な状態であることを確認)
- 7). 2.0mL チューブを捨て、キットに含まれる新しい 1.5mL チューブにカラムを移す。

注意 遠心速度は正確に設定して下さい(1000rpm ではなく 1000g)。遠心速度が遅すぎると、サンプルがゲルベッドに残って溶出されない恐れがあります。遠心速度が速すぎると、精製が不十分になる、もしくはカラムが壊れてしまう恐れがあります。

- ②ライゲーションが終了したサンプルに、RNase-free 水を 38.7uL 加え、混合してスピンドウンします。

表 6 精製溶液の調製

1サンプル中の量 (uL)	
現在のサンプル量	11.3
DNase/RNase free水	38.7
トータル量	50.0

- ③サンプル 50uL をステップ1で調製したカラムに静かに移し、1000g で 4 分間遠心します。

- ④カラムから溶出された液が精製されたサンプルです。カラムを捨て、サンプルを氷上に置きます。サンプル溶液は透明で薄いピンク色をしています。溶出量は各サンプル間でほぼ等しく、約 50uL になります。この後ハイブリダイゼーションまで、この Micro Bio-Spin6 に付属のチューブを使用します。

ノート 直ちに実験を続けない場合、この後、-80℃で保存することが可能です。

5-7. サンプルの濃縮

サンプルを完全乾固させて下さい。濃縮遠心機を 45℃から 55℃もしくは中高温設定にして下さい。チューブの蓋を閉め、チューブを数回はじくことによって完全に乾燥したかを確認してください。はじいた際にペレットが動く、あるいは液体が飛び散る状態だと乾燥は十分ではありません。

注意 カラム精製を行わない場合、サンプル中には DMSO が存在しています。乾燥が不十分で DMSO が残存すると、ハイブリダイゼーションに悪影響を与えシグナル強度が低下するため、このステップではラベル化後のサンプルを完全に乾燥させるようにして下さい。

注意 カラム精製を行った場合は完全に乾燥するまで 1 時間程度、カラム精製を行わない場合、完全に乾燥するまで 2,3 時間必要ですが、45℃以下に設定した場合さらに時間がかかります。

注意 濃縮中はサンプルに光が当たらないように、注意して遮光して下さい。

ノート 直ちに実験を続けない場合、この後、-80℃で保存することが可能です。

6-8. ハイブリダイゼーションの準備

濃縮を行っている間に、次のものを準備してください。

- ☐ アジレント オリゴ DNA マイクロアレイ
- ☐ オリゴ DNA マイクロアレイ用 ハイブリダイゼーションチャンバ
- ☐ 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
- ☐ マイクロピペット 1-10 uL, 10-100 uL, の 2 本
- ☐ ピペットチップ 上記各サイズ対応
- ☐ 1.5 mL エッペンチューブ（ヌクレアーゼフリー）
- ☐ チューブ立て
- ☐ 高速遠心機
- ☐ ボルテックスミキサー
- ☐ アイスボックス（クラッシュアイスの間隙を水で満たしたもの）
- ☐ タイマー

☐ ヒートブロックを 100℃に設定

☐ ハイブリダイゼーションオープン（55℃に設定、ローターを取り付けておきます。）

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

＜＜ハイブリダイゼーションオープン温度の校正法＞＞

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

1. オープンのローターと、使用するスライド数とバランスをあわせてチャンバをセットします。
2. 温度を 55℃、回転数を 20 にセットし、温度が安定するまで 3 時間ほど待ちます。
3. 校正済みの温度計をセットします。 温度センサー部位をとりつけます。この時センサー部位がオープン壁につかないように、空間の温度をはかるようにして下さい。
4. 3 時間程度、温度計の温度が安定するまで待ちます。
5. 実測温度と設定温度を比較し、0.2℃以上異なるようであれば、次の手順で合わせます。
6. オープンの ▲ ボタンと ▼ ボタンを同時に押し、温度表示が点滅するまで待ちます。あるいは ▲ ボタンと ▼ ボタンを同時に長押し、温度両側の「.」が点滅するまで待ちます。
7. 点滅しているうちに、▲ボタンと▼ボタンで、表示温度を温度計が示す温度にあわせします。
8. その後再度表示を 55℃にあわせ 3 時間ほど待ち、表示温度が実測値と合うか確認します。

詳細は弊社サポートサイトの「Agilent G2545A ハイブリダイゼーションオープン校正方法」をご覧ください。

10x Gene Expression Blocking Agent の準備

- ・スピンドウンしてペレットをチューブの底に集めた後、DNase/RNase free 水 **125 uL** を、Agilent miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (5190-0456)に含まれる 10x Gene Expression Blocking Agent のチューブに直接加えます。穏やかにボルテックスをして、溶解させます。
- ・Blocking Agent が完全に溶解しない場合は、37℃で 4-5 分温めて完全に溶解させて下さい。
- ・もしチューブの壁やキャップに固着している物質がある場合、17,000g で 5～10 秒遠心し、チューブの底に集めて下さい。
- ・水に溶解した状態では、**-20℃**で**約 2 ヶ月**まで保存できます。
- ・使用前に凍結した溶液を溶かした時には、軽くボルテックスをして完全に溶解してください。

- ① 1.5mLチューブにハイブリダイゼーション溶液を調製します。Spike-Inを使用する場合は以下**A**の手順で、使用しない場合はSpike-Inを水で置き換えた次ページ**B**(Option)の手順に従って下さい。マスターミックスは調製せずに、各チューブに順番通りに試薬を加えてください。

A. 【Hyb Spike-Inを使用する場合】

- A-1. **DNase/RNase free水17uL**をサンプルに加え、乾固したRNAを完全に溶解させます。
- A-2. Hyb Spike-In溶液3rd希釈液を1uL、各サンプルに加えます。
- A-3. **10x Gene Expression Blocking Agent 4.5uL**と**2x Hi-RPM Hybridization Buffer22.5uL**を加え、ボルテックスで穏やかに混合してスピンドウンします。

表7 Hyb Spike-In溶液を使用する場合のハイブリダイゼーション溶液の調製

1サンプル中の量(μL)	
現在のサンプル量	17
Hyb Spike-In (3rd希釈液)	1
10x Gene Expression Blocking Agent	4.5
2x Hi-RPM Hybridization Buffer	22.5
トータル量	45

B.(Option)【Hyb Spike-Inを使用しない場合】

- B1. DNase/RNase free水18μLをサンプルに加え、乾固したRNAを完全に溶解させます。
 B2. 10x Gene Expression Blocking Agent 4.5μLと2x Hi-RPM Hybridization Buffer22.5μLを加え、ボルテックスで穏やかに混合してスピンドウンします。

表8 Hyb Spike-In 溶液を使用しない場合のハイブリダイゼーション溶液の調製

1サンプル中の量(μL)	
現在のサンプル量	18
10x Gene Expression Blocking Agent	4.5
2x Hi-RPM Hybridization Buffer	22.5
トータル量	45

ノート

サンプルが 8 サンプルより多い場合、最善の結果のためには、以下の作業は **8 サンプルを 1 セット**として、順番に行ってください。次のステップに進む前に、ハイブリチャンバ・ガスケットスライド・マイクロアレイをすぐに組み立てられるようにご準備下さい。

②チューブの蓋を、隙間がないようにしっかりと閉めます。加熱中に蓋が開いてしまわないようにチューブキャップカバーをはめて、100℃のヒートブロックで5分間インキュベーションします。

③待ち時間に、アイスボックスにクラッシュアイスを入れ、そこに水を加えた氷水を準備します。クラッシュアイスに加える水の量は、チューブが水に浮いてしまわない程度に少なく、かつ氷に挿したチューブの壁が水に浸る程度に多く、加減して下さい。適切な水量では、1.5 mL のチューブを氷水に挿した際に、チューブの先端から 2/3 程度が氷水に浸り、蓋部分は氷の上に出ている状態となります。

④加熱終了後、ヒートブロックからサンプルチューブを取り出します。この際、チューブが膨張してヒートブロックのウェルから抜けにくい状態となっていますが、チューブ本体を持ち、蓋が開いてしまわないように注意して引き抜きます。

⑤**直ちに**氷水を満たしたアイスボックスにキャップをしたまま移し、遮光状態でサンプルを 5 分間冷却します。この際、蓋とチューブの隙間から氷水が入ってしまうのを避けるために、チューブの本体の壁は下部 2/3 程度は氷水に浸し、チューブの蓋は氷水に浸けてしまわないようにご注意ください。

注意 加熱中チューブの蓋が開いてしまわないようにキャップカバーなどをご使用下さい。加熱・冷却の過程で、キャップは大変開きやすい状態となっています。

注意 冷却は15分を超えないようにご注意ください。長過ぎるとハイブリダイゼーションの結果に影響が出る恐れがあります。

⑥素早くスピンドウンしてチューブの壁やキャップについた水滴を落とし、直ちに次のステップに進んでください。

5-9. 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ください。



■ スライドグラスを取り扱う際はパウダー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ください。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にはなるべく障害物がない状態を作ってから次ページ以降の操作を行ってください。

■ ハイブリダイゼーションは水平な実験台で行ってください。下記ハイブリエイドをお持ちの場合は、内蔵の水準器で水平が確認できます。ハイブリダイゼーション作業を始める前に、予めご確認ください。

■ 手でアレイスライドをガasketスライドに乗せるのが難しい場合、オプションとして、ハイブリエイドを用いてアレイスライドに乗せることができます。

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



5-10. ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションチャンバを組み立てるにあたり、以下が必要になります。

■ハイブリダイゼーションチャンバ (G2534A)



■ガasketスライド: 8 パック用(G2534-60014)



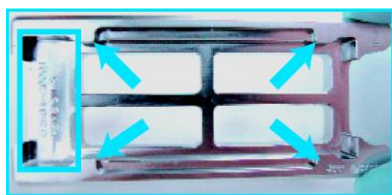
■(オプション)ハイブリエイド



- ① ガasket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。ピンセットを使ってガasket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。パウダーフリーの手袋を着用した手でガasketスライドの縁を持ち、ブローでスライド表面をまんべんなく吹き飛ばして下さい。

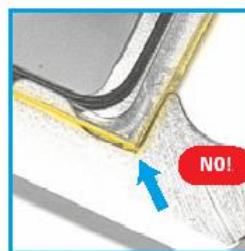


- ② チャンバベースの上に、ガasketスライドをラベルに"Agilent"の文字あるいはバーコード番号が書かれている面を上にして載せます。ガasketスライドは、ハイブリダイゼーション溶液を介して直接アレイに触れますので、ほこり等がつかないようにすばやくセットしてください。チャンバベースの4つの突起(図の矢印の部分)にしっかりとハマるようにします。

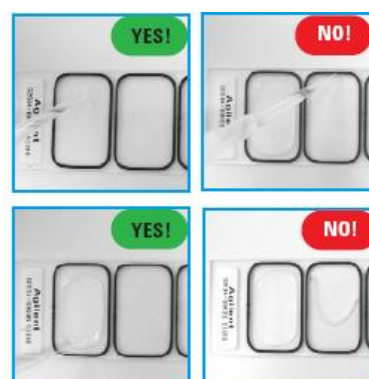


ガasketスライドがしっかりとチャンバベースにセットされているか確認し、正しくされていない場合は、再度セットし直してください。

(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)



- ③ 卓上遠心機でしっかりとスピンドアウンした後、ハイブリダイゼーション溶液全量(蒸発の程度によって42~45uL 程度になります)をガasketスライド上にアプライします。ガasketの壁にまで液が広がらないよう注意して下さい。



注意 熱変性・冷却の過程で、蒸発などにより、各サンプルの最終量はそれぞれ異なる場合があります。アプライ時に気泡の導入を防ぐ目的で、ピペットの吸引量をその都度調節して下さい。ハイブリダイゼーション溶液に気泡が導入されると、その後洩れが生じる危険があります。

注意 もしスライドガラス上のアレイ8個のうち使用しないアレイがある場合、バーコードから最も遠いアレイを空けるようにして下さい。また、使用しないアレイには、水で希釈をした1xHybridization bufferを45uLアプライして下さい。

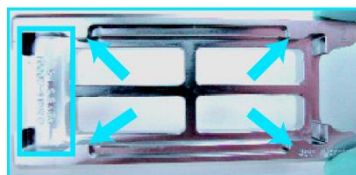
注意 こぼれたり洩れたりするのを防ぐために、ハイブリダイゼーション溶液は、ガasketスライドのウェルの中央にアプライしてください(上図参照)。ガasketスライドのゴム製スペーサーに液が触れると、漏れの可能性が高くなります。

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

- ④ アレイ面(ラベルに"Agilent"と書かれている面)を下にして(ラベルに数字が書かれている面は上に)、マイクロアレイスライドをチャンバベースにセットされているガasketスライド上に載せます。アレイスライドの縁からラベル部分を持つようにしてください。マイクロアレイスライドを**水平に**保ったままガasketスライドにのせます。**アレイを正しくセットした後、チャンバや重なっているスライド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 アレイスライドの向きを間違えないようにして下さい。正しい向きであれば、ガasketスライドのラベルに記載の Agilent の文字とアレイスライドのラベルに記載の Agilent の文字が向かい合うように重なります。

注意 マイクロアレイスライドを水平に保ったままガasketスライドに乗せるために、アレイスライドがサンプルに接する直前、下写真のチャンバベースの4か所の突起でスライドの水平を確認して下さい。



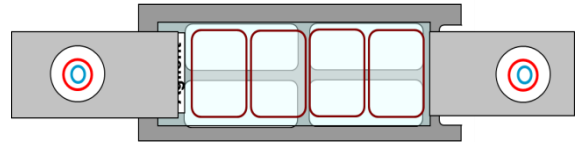
注意 チャンバカバーをセットする前、“サンプル溶液が接しているアレイ”と“接していないアレイ”があるように見える場合がありますが、問題ありません。アレイスライドに乗せた後は、位置の微調整などは行わず、すぐチャンバカバーを乗せて下さい。

※参考手法

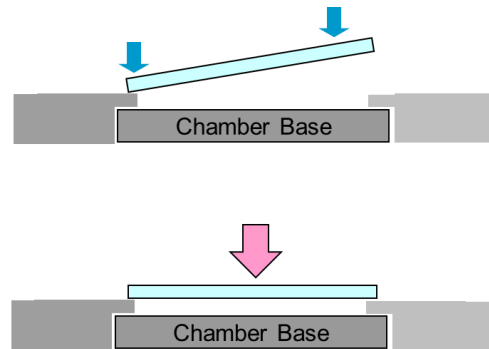
ハイブリエドを用いることにより、手作業では水平に降ろしづらいマイクロアレイスライドを、サンプルをアプライしたガスケットスライド上に安定して乗せることが出来ます。

使用器具： ハイブリエド (HYB-100)

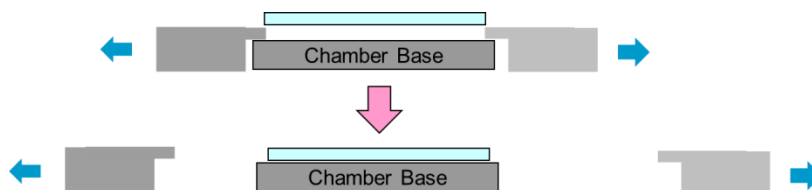
- ① ガスケットスライドにサンプルをアプライし終わった時点でチャンバベースの両端から各ハイブリエドを差し込み、突き当たるまで動かします。ガスケットスライドの端を、ハイブリエドの突起部分が覆うような形となります。



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



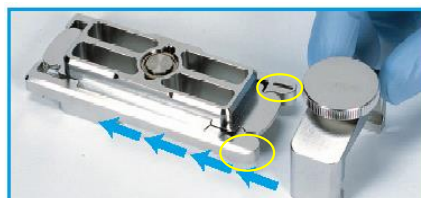
- ③ 左右のハイブリエドを同時に引き抜いて下さい。アレイスライドが水平に落ち、ガスケットスライドと正しい位置で重なります。アレイスライドを乗せた後は、位置の微調整などは行わず、すぐチャンバカバーを乗せて下さい。引き抜く先に障害物などが無いようにして下さい。



- ⑤ 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。



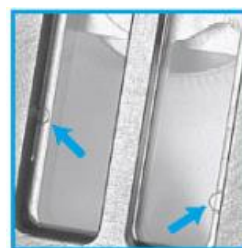
- ⑥ クランプアセンブリを、チャンバベースの丸くなっているコーナー側から差し込み、完全にストップする位置まで移動させます。ストップする位置はチャンバの中央部になります。



- ⑦ チャンバが水平に保たれていることをご確認した後、手でスクリューをしっかりと締めます。チャンバにダメージを与える可能性があるため、ペンチなどの道具は決して使用しないでください。



- ⑧ 組み立て終了後、チャンバを垂直方向にして2,3回、回転させて、ハイブリ溶液がスライドガasketの全面に行き渡るようにします。次に、チャンバ内の泡が自由に動くことができるか確認してください。ハイブリ溶液が行き渡っていない部分や、固定している泡により、ハイブリむらが起きる場合がありますので、泡が動かない場合には、チャンバを手にもって振ることで、泡を移動させます。
- ⑨ 残りのスライドも同様に、上記の作業を行ってください。



- ⑩ チャンバの組み立てが終わりましたら、予め 55℃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。必ず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。チャンバ数が奇数である場合、バランスを取るためにブランクのチャンバをローターにセットして下さい。



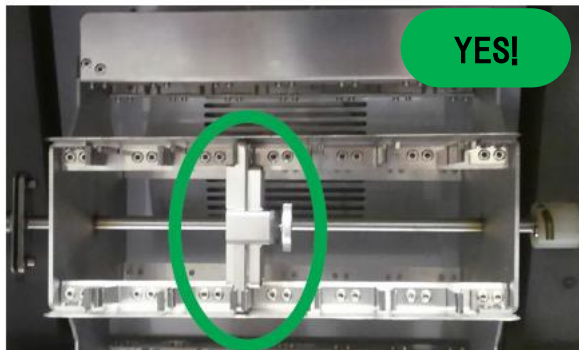
Agilent ハイブリダイゼーション
オープン (G2545A)



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.



- ⑪ ハイブリダイゼーションオープンの扉を閉め、回転数を 20rpm に設定します。
- ⑫ 55℃で 20 時間ハイブリダイゼーションさせます。

注意 ハイブリダイゼーションは必ず20時間以上行うようにして下さい。20時間を少し超えるような場合も、比較をする結果同士は同じハイブリダイゼーション時間を保つように心がけてください。ハイブリダイゼーション時間が異なると結果に悪影響を及ぼす危険性があります。

注意 ハイブリダイゼーションオープンのローターには、バランスを取るようにチャンバをセットして下さい。

5-11. 洗浄(2日目)の準備

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

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)に必要量含まれています。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. Gene Expression Wash Buffer2 の予熱

アレイの洗浄に用いる **Gene Expression Wash Buffer 2** は、オーバーナイトで 37℃に加温する必要があります。1 日目の実験終了後、恒温槽内などで、必要量の **Gene Expression Wash Buffer 2** と、それを入れるための**洗浄ディッシュ**の加温を始めて下さい。洗浄バッファ2を別容器に移して温める場合は、蒸発を防ぐため密閉容器を使用してください。

6. 実験の操作手順〈2 日目〉

6-1. 洗浄の用意

・洗浄を始める前に、以下の機器・器具を準備してください。洗浄・乾燥のステップは、できるだけ効率的に行うために、洗浄用器具は、37℃のウォーターバスを含めてすべて近くに準備して下さい。

- ・スライドグラス洗浄用ガラス容器(小 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
- ・スターラー付恒温槽(アズワン株式会社 1-5088-01 あるいは株式会社日伸理化 SW-500NT)
- ・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。確認のためには、ビーカーに入れた Wash1 の溶液で手袋を事前に洗ってみて、手袋から垂れる Wash 溶液が白濁していないこと、および手袋をあらった後の、ビーカー内の溶液に微粒子がないことを確認してください。手袋から発生する微粒子は、アレイの表面に吸着して結果に大きな影響を及ぼします。

注意 洗剤の中には、ディッシュに蛍光が残留するものがあります。いかなる洗剤も、ディッシュの洗浄には使用しないようにして下さい。

注意 miRNAマイクロアレイの洗浄は、オゾン濃度が50ppb以下の環境で行ってください。オゾン濃度が50ppbを超える場合、オゾンフリーブース内で洗浄・スキャンを行うか、洗浄後にオゾンバリケーパーを使用するか、いずれかの対策を施して下さい。

6-2. マイクロアレイの洗浄

表 9 洗浄の概要

Step	ガラス容器	温度	時間
バスケットスライドと アレイスライドの分離	1	室温	
洗浄バッファ1	2	室温	5 min
洗浄バッファ2	3	37℃	5 min

1. 洗浄パuffaと洗浄用ガラス容器の準備

1-1) スターラー付恒温槽を、37℃に設定します。

1-2) 下記の通り3つの洗浄用ガラス容器を準備し、パuffaを容器に注ぎます。

ガラス容器1：洗浄パuffa 1: ガスケットスライドとアレイスライドの分離

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

ガラス容器3：洗浄パuffa 2: 回転子の中に入れておきます

注意 洗浄パuffa 2 は、恒温槽が確実に 37℃になったことを確認した後に、容器 3 に注ぎ、直ちに恒温槽内にセットして下さい(下右写真参照)。

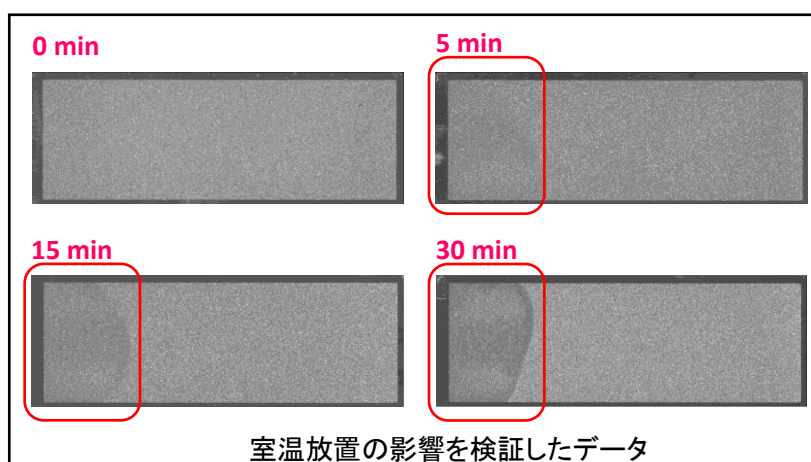


注意 注意深く洗浄プロトコルに従ってください。また指定の器具を使用してください。洗浄時間を守
ることは非常に重要です。洗浄時間がプロトコルの時間から外れた場合には、結果がばらつ
いてしまう場合があります。また、スライド洗浄を行う際の攪拌には、シェーカーを使わずに、
必ずマグネットスターラーを使用して下さい。

2. ハイブリオープンからチャンバを取り出します。複数のアレイをハイブリダイゼーションしている場合も、**チャンバは必ず1つずつ取り出す**ようにしてください。各チャンバを取り出した時刻・ハイブリ時間を記録して下さい。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。ハイブリダイゼーション溶液に、明らかな減少があった場合は、その量を記録して下さい。

＜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 Wash1 中のスライドラックに移すことが重要です。また複数枚のスライドを一度に wash する場合も、1スライドずつ取り出し、**解体の直前まで、規定の温度で回転**していることが重要です。



3. 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と持つようにしてください。すぐに、アレイスライドを上にした状態で(数字が書かれているバーコード面を上にして)、2枚のスライドが重なっている状態で**ガラス容器1**内の洗浄バッファ1に浸けます。

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

※参考手法

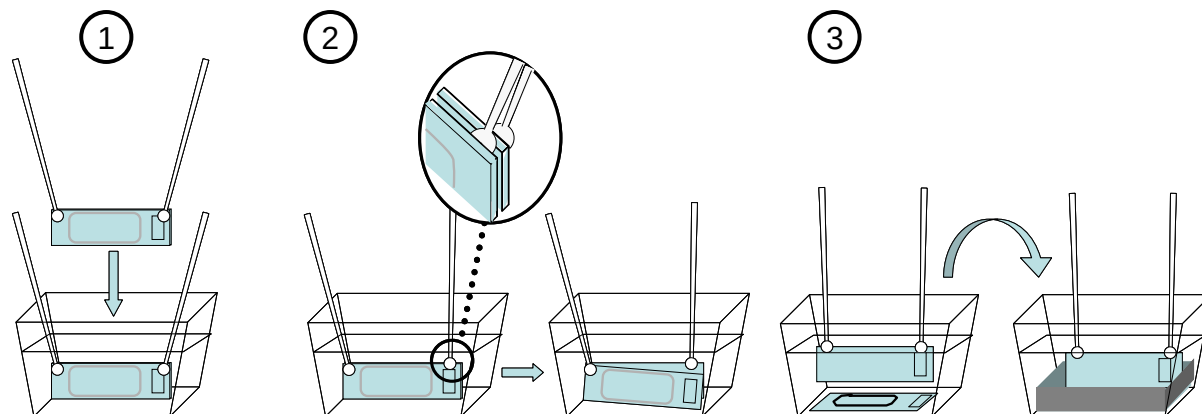
ピンセットを用いることにより、洗浄液に手袋を浸さないでアレイを洗浄することができます。

使用器具：フラットピンセット 33A (品番は p.6 参照)



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

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



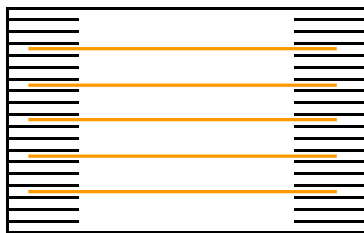
5. アレイスライドをすばやく取り出し、洗浄パuffa1を入れた**ガラス容器 2** にセットされているラックに差し込みます。

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

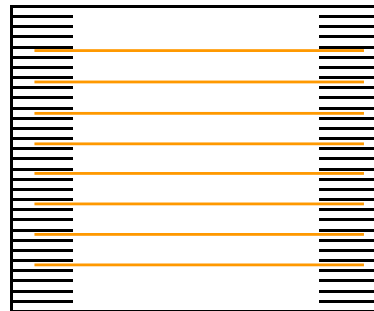
6. 残りのチャンバも同様に解体して、すべてのスライドをラックに差し込みます。全てのスライドで、**アレイ面がラックの中心を向く向きに揃えます**。一度に洗浄するアレイは5枚もしくは8枚以下にするようにしてください。

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。

19 スライドラック(Thermo Shandon109)



30 スライドラック(Thermo Shandon113)



7. すべてのアレイがスライドラックにセットできたら、**中程度の回転数で室温のまま 5 分間** 攪拌します。この時、スターラーや洗浄ディッシュ全体を覆うように、遮光をして下さい。

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。

8. スライドラックを**洗浄パuffa2(ガラス容器 3)**にすばやく移します。**中程度の回転数で 37℃に保った状態で、5 分間** 攪拌します。この時、スターラーや洗浄ディッシュ全体を覆うように、遮光をして下さい。

注意 このステップを 37℃に保つことは非常に重要です。温度管理を行わないと、洗浄の厳しさが変化する事になり、実験結果が変動する危険性があります。

9. **洗浄パuffa 2(ガラス容器 3)**からスライドラックを取り出します。この時、スライドラックを水平に保ち、スライド上に水滴が残らないように注意しながら、**5-10 秒**かけて引き上げてください。

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

ノート 9 枚以上を同じ日にハイブリさせた場合など、1 日の洗浄が 2 回以上になる場合は、洗浄パuff はその都度新しいものに交換してください。

ノート カラム精製をしなかった場合、ガasket スライドとアレイスライド分離に用いた Wash Buffer は、取り込まれなかった Cyanine 3 色素のために、ピンク色をしていることがあります。所属機関の適切なガイドラインに沿って廃棄してください。活性炭フィルターなどを利用し使用済みの Wash Buffer から取り込まれなかった色素を吸着させることもできます。

《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。

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。

アセトニトリルあるいは AIP 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。

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。

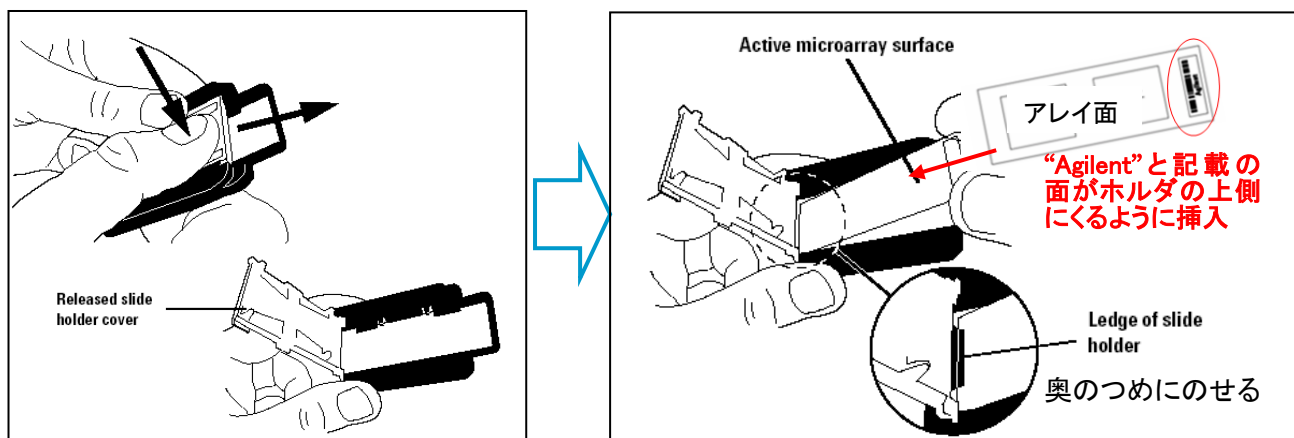
《ミリ Q システムのメンテナンス》

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、洗浄したスライドガラスに影響を与えることがあります。参考値：比抵抗 18.2MΩ・cm, TOC<4

6-3. Agilent スキャナを用いたスキャンニング

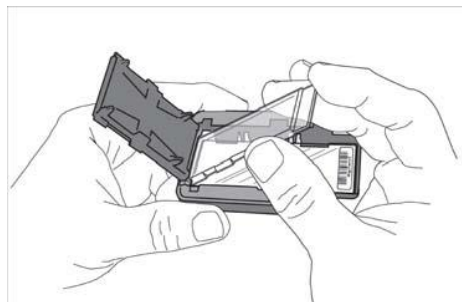
マイクロアレイに貼られたラベルの数字の面が露出し、Agilent と記載のアレイ面がカバーに覆われている向きで挿入します。

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》

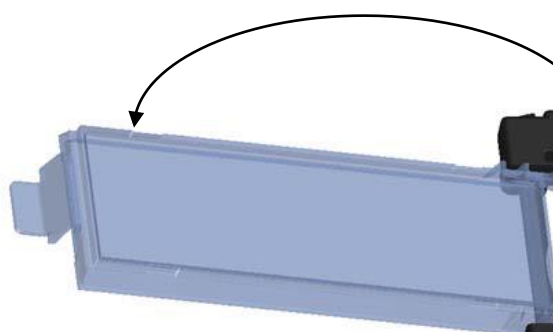
オゾン濃度が 50ppb 以上の環境であれば、オゾン対策が必要です。すぐにスキャンを行う場合、オゾンバリアスライドカバーを使用すると、スキャン中のオゾンによる蛍光色素の退色を抑えることができます。下図のように、スライドホルダに挿入したアレイスライドに重なるように、オゾンバリアスライドカバーを置き、スライドホルダのカバーを閉めます。



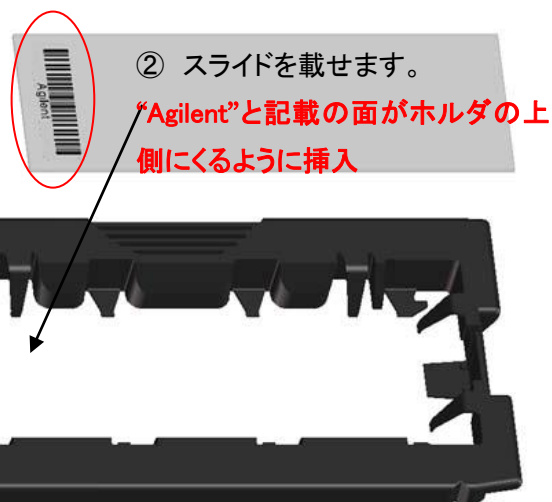
- ・スポット面を傷つける恐れがあるので、オゾンバリアスライドカバーの向き(裏表、左右の向き)に気を付けてください。
- ・スキャン中の退色のみ有効です。洗浄・乾燥時の退色はオゾンバリアスライドカバーのみでは防ぐことはできません。
- ・オゾンフリーブースをご利用の場合は、使用する必要はありません。

b. SureScan をお使いの場合

① カバーを開けます。



② スライドを載せます。



- 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)。

表 10 スキャナ・Feature Extractino・GeneSpring のバージョン情報

Microarray Format	Scanner version	Scan Control version	Scan settings/profile	Spike-In	Feature Extraction version	GeneSpring version
8x60K	SureScan	9.X	AgilentG3_HiSen_miRNA	Yes	10.7.3 or later	11.5 or later
8x60K	SureScan	9.X	AgilentG3_HiSen_miRNA	No	10.7.3 or later	10.0 or later
8x15K	SureScan	9.X	AgilentHD_miRNA*	Yes	10.7.3 or later	11.5 or later
8x15K	SureScan	9.X	AgilentHD_miRNA*	No	10.7.3 or later	10.0 or later
8x60K	C	8.X	AgilentG3_HiSen_miRNA	Yes	10.7.3 or later	11.0 or later
8x60K	C	8.X	AgilentG3_HiSen_miRNA	No	10.5 or later	10.0 or later
8x15K	C	8.X	AgilentHD_miRNA*	Yes	10.7.3 or later	11.0 or later
8x15K	C	8.X	AgilentHD_miRNA*	No	10.5 or later	10.0 or later
8x15K	B	7.X	36 ページを参照してください。	Yes	10.7.3 or later	11.0 or later
8x15K	B	7.X	36 ページを参照してください。	No	9.5.3 or later	10.0 or later

* Resolution を"5 um"から"5 um high sensitivity"に変更してください。

注意 マイクロアレイフォーマット、スキャナのバージョン、Spike-In 使用か否かなどによってスキャン設定・コントロールソフトウェアの操作画面、必要な数値化ソフトウェアのバージョンが異なりますのでご注意ください。

【スキャナについて】

8x15K miRNA マイクロアレイは、いずれのスキャナでも読み込むことができますが、8x60K miRNA マイクロアレイのスキャンには高解像度仕様の SureScan また C スキャナが必要です。

【Feature Extraction のバージョンについて】

8x15K miRNA マイクロアレイの数値化には、Feature Extraction ソフトウェアバージョン 9.5 以上が必要です。SureScan、または C スキャナでスキャンした 8x60K miRNA マイクロアレイの画像の数値化には、FE10.5 以上が必要です。

マイクロアレイのフォーマットに関わらず、Agilent microRNA Spike-In の結果を自動的に QC レポートに表示させるには FE10.7.3 以上が必要です。

B スキャナまたは C スキャナをお使いの場合

(SureScan をお使いの場合は P. 40 を参照してください)

1. 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、右図のアイコンをダブルクリックしてスキャナコントロールソフトを立ち上げます。詳細は巻末を参照してください。

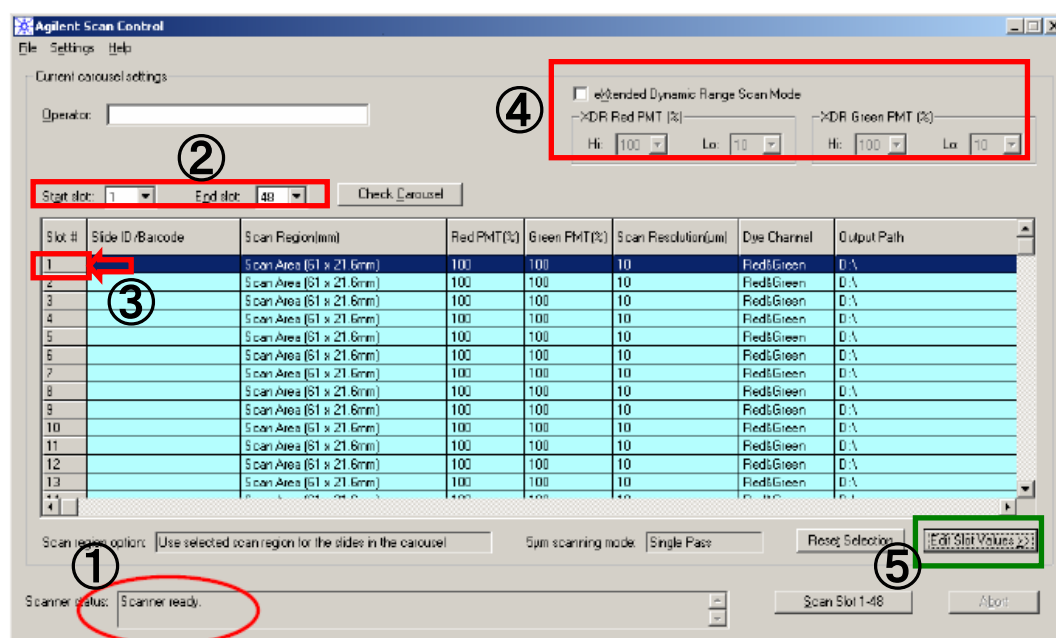


スライドホルダにセットされたマイクロアレイをスキャナのカローセルにセットします。複数のスライドグラスをスキャンする場合は、隣り合うスロットにセットしてください。また、H と書かれている Home スロットにはセットしないでください。スライドホルダのカバーがきちんと閉まっていることを確認してください。完全に閉まっていない状態でスキャンを開始すると、スキャナ内でスライドホルダが引っかかってしまい、エンジニアによる修理が必要となることがあります。

2. スキャナの蓋を閉じます。

スキャナコントロールソフト ver.7(B スキャナ)をお使いの場合

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 5%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。



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。

Slot #	Slide ID/Barcode	Scan Region(mm)	Red PMT(%)	Green PMT(%)	Scan Resolution(μm)	Dye Channel	Output Path
1	No chip						
2	No chip						
3		Scan Area (61 x 21.6mm)	100	100	10	Red&Green	D:\
4	No chip						
5	No chip						
6	No chip						

Scan region options: ☐ Use selected scan region for the slides in the carousel

Sum scanning mode: ☐ Single Pass

Buttons:

Edit values:

Slot	Slide ID/Barcode	Scan region (mm)	Red PMT(%)	Green PMT(%)	Scan Resolution(μm)	Dye channel
3		Scan Area (61 x 21.6mm)	100	100	10	Red&Green

Buttons:

Output path:

Scanner status:

Buttons:

注意 8x15K マイクロアレイの場合は Scan resolution が 5μm になっていることを確認してください
B スキャナは最高解像度が 5μm であるため、8x60K マイクロアレイはスキャンできません。

注意 miRNA の XDR Lo PMT 値は 5% で、遺伝子発現の 10% と異なるため注意して下さい。

Scan Setting	Values for 8x15K Formats
Scan region	Scan Area (61 x 21.6 mm)
Scan resolution (μm)	5
5μm scanning mode	Single Pass
eXtended Dynamic range	(selected)
Dye channel	Green
Green PMT	XDR Hi 100% XDR Lo 5%

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。

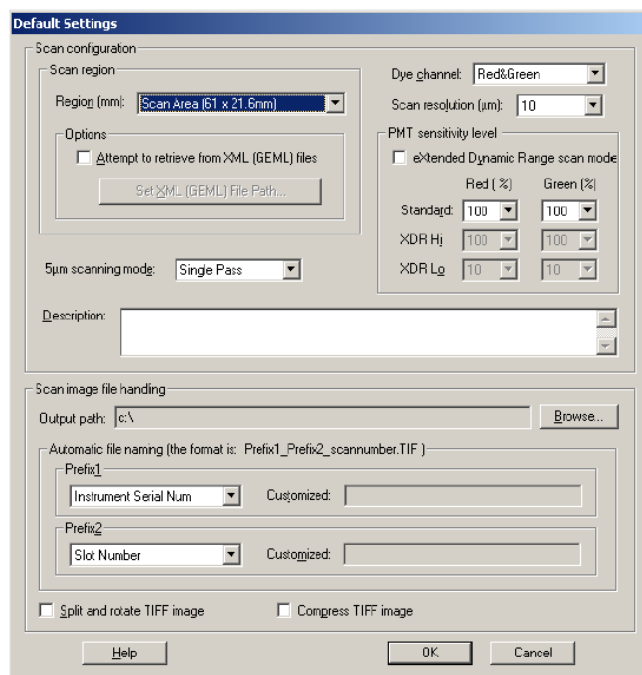
11. コントロールソフトを閉じた後にスキャナおよび PC の電源を消してください。

【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、異なった PMT (miRNA アレイの場合、デフォルト設定高 PMT:XDR Hi 100%、低 PMT:XDR Lo 5%) 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。

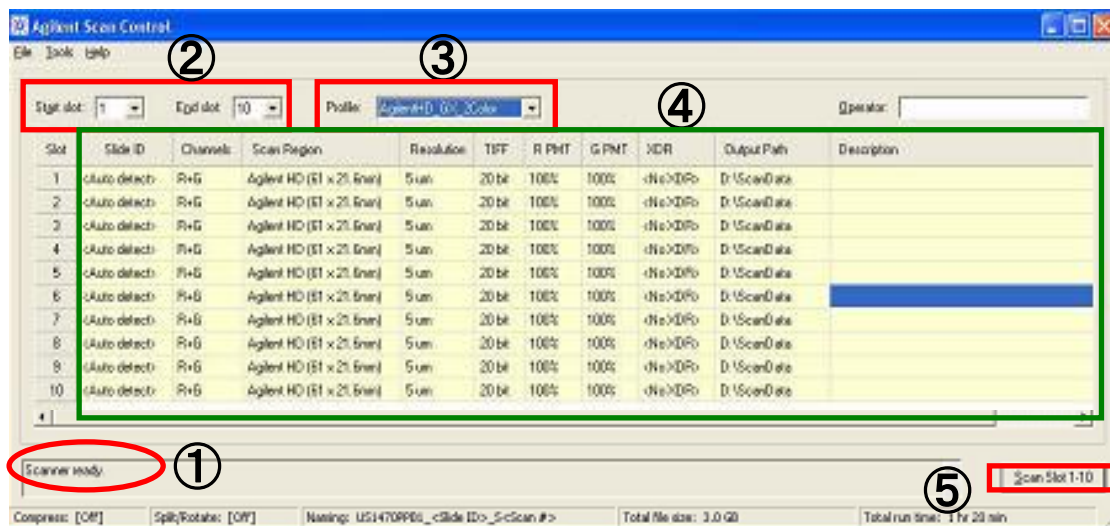
《スキヤンのデフォルト設定変更法》

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 スキャナ)をお使いの場合

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. “Profile”リストから、以下のプロファイルを選択します。

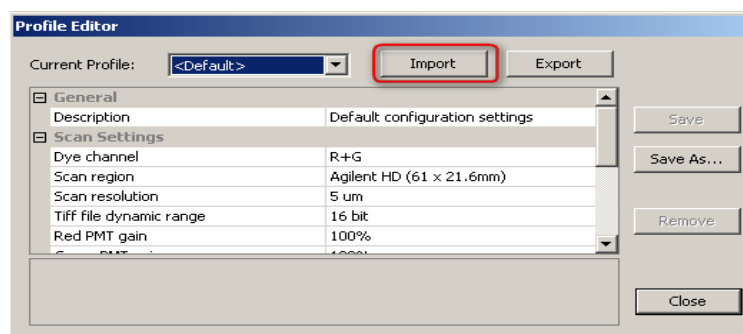
■8x15K miRNA マイクロアレイ→**AgilentHD_miRNA**

■8x60K miRNA マイクロアレイ→**AgilentG3_miRNA**

もし G3 のプロファイルがない場合、次の方法でインポートします。

【プロフィールの入手およびインポート】

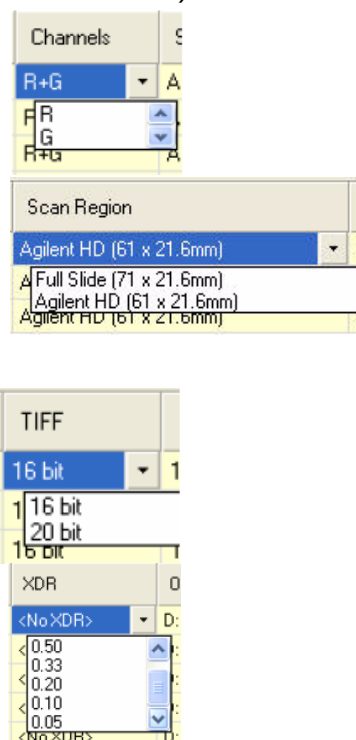
1. 下記サイトから AgilentG3_Profiles.zip をダウンロードし、PC に保存します。
<https://www.genomics.agilent.com/GenericA.aspx?PageType=Custom&SubPageType=Custom&PageID=2074>
2. ダウンロードしたファイルを右クリック>Open with(プログラムから開く)>Compressed zipped folders あるいは Winzip と選択し、解凍します。
3. 解凍したファイル(AgilentG3_Profiles.pfl)をスキャナに付属の PC にコピーしてください。
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_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. 選択したプロフィールの項目で、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。
 下記■で示した項目が、Agilent miRNA マイクロアレイ(8x15K もしくは 8x60K)の用の初期設定です
変更できる項目

- 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**, (8x60K)
☒ **5um** (8x15K), ☐ 10um
- 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。

【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 miRNA 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。miRNA のデフォルトの XDR ratio は 0.05 です。

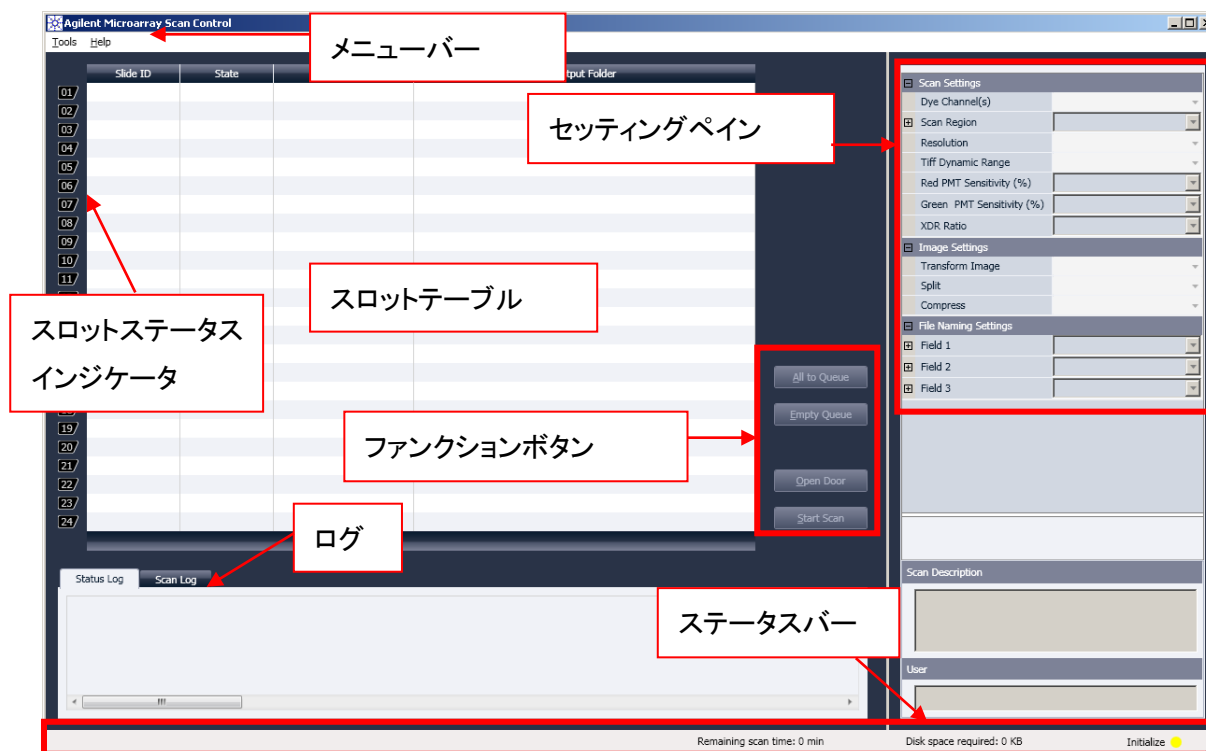
20bit で1 回スキャンしたデータと16bit でXDR スキャンをしたデータは、結果にほぼ違いはありません。

SureScan をお使いの場合

1. PC を起動し、ログインします。
2. スキャナの電源を入れます。
3. スキャナの Status Indicator Light が消えるまで 1～2 分待ちます。



4.  をダブルクリックして Agilent Microarray Scan Control を起動します。
5. ソフトウェアでスキャナが認識されるとスキャナの初期化(Initialize)が始まります。ウィンドウ右下のステータスをご確認ください。

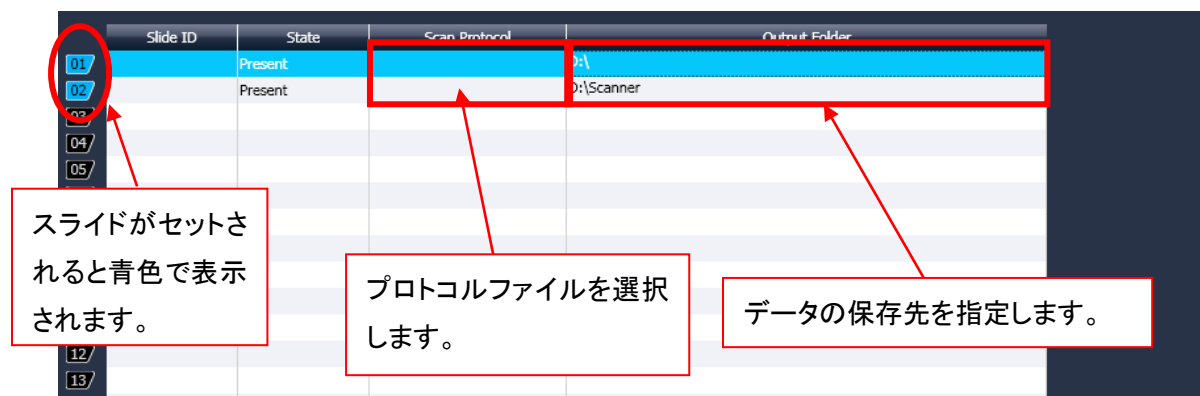


6. 初期化が終了すると、ファンクションボタンのOpen Doorボタンがアクティブになります。クリックし、カセットにスライドをセットします。どの位置にセットしても構いません。

スライドホルダのカバーはきちんと閉まっていることを確認して下さい。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。

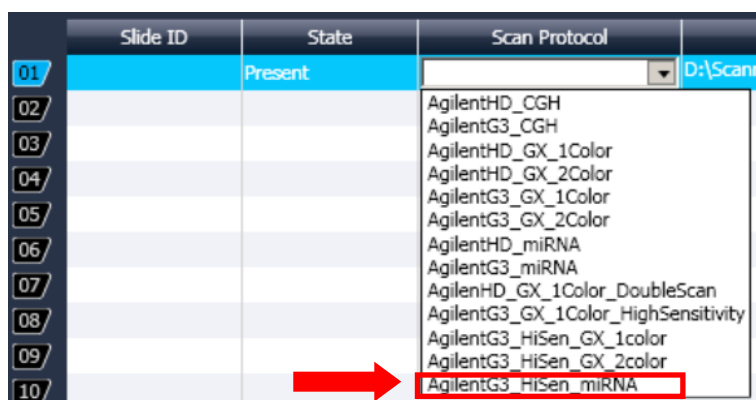
スライドがセットされているカセットは青色で表示されます。また、各パラメーターの編集ができるようになります。

注意 SureScanの蓋は手動で開けることが出来ません。必ずソフトウェア上で「Open Door」もしくは「Close Door」から操作して下さい。



7. Scan Protocolからプロトコルファイルを選択します。AgilentG3_HiSen_miRNA(8x60Kの場合)またはAgilentHD_miRNA(8x15Kの場合)を選択します。

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



8. 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。

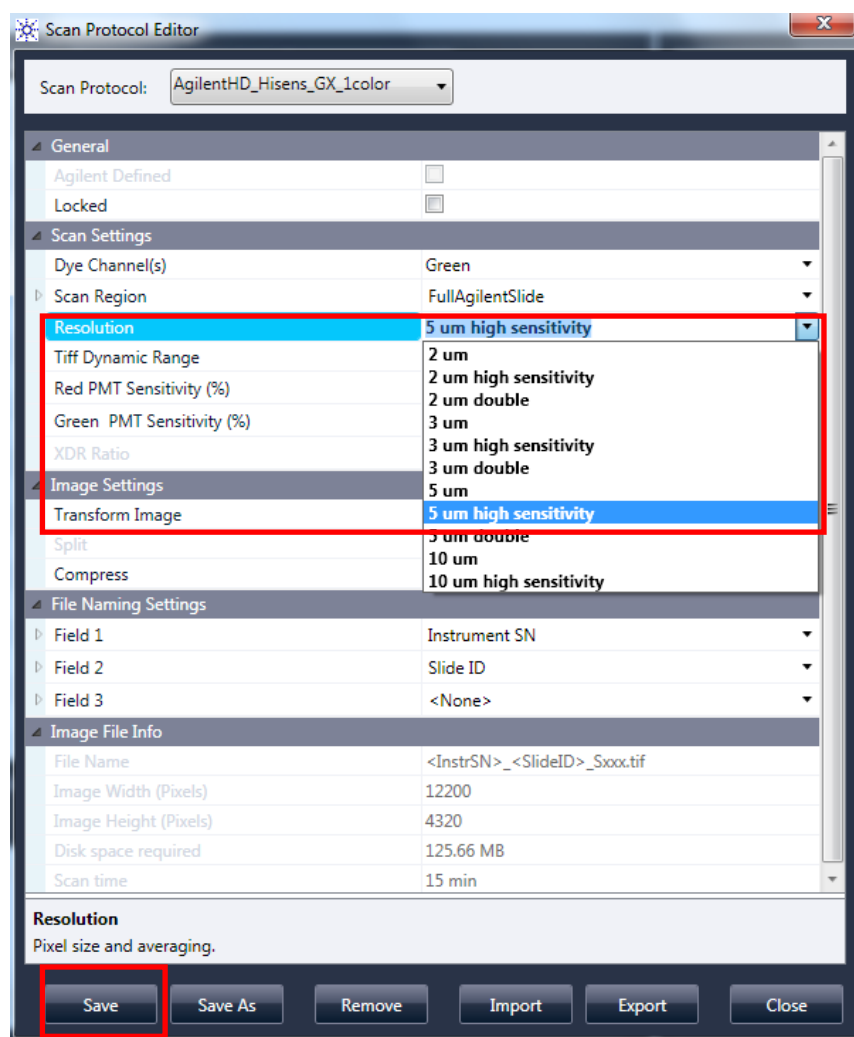


9. ScannerのステータスがReadyであることを確認し、All to Queueボタンをクリックし、Queueに追加します。
10. Start Scanボタンをクリックするとスキャンを開始します。

11. 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。
12. スライドホルダを取り出します。
13. コントロールソフトを閉じた後にスキャナおよびPCの電源を消してください。

《変更したプロトコルをScan Protocolとして保存する場合》

1. メニューバーの **Tools** から「**Scan Protocol Editor...**」を選択します。
2. AgilentHD_miRNA 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_HiSen_miRNA）をつけて保存します。
3. 設定した新しい名前の Protocol が選択されているのを確認した後、**Resolution** という項目のプルダウンメニューを展開し、「5 um”から”5 um high sensitivity”に変更してください。



4. Resolution が間違いなく **High Sensitivity** に設定されており、その他の項目に変更が加えられていないことを確認した後、ボックス下部の **Save** をクリックします。
- 今後のスキャン時には、この新規作成した Protocol を **Scan Protocol** として選択するだけで、高感度設定でスキャンをすることが出来ます。

7. 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。

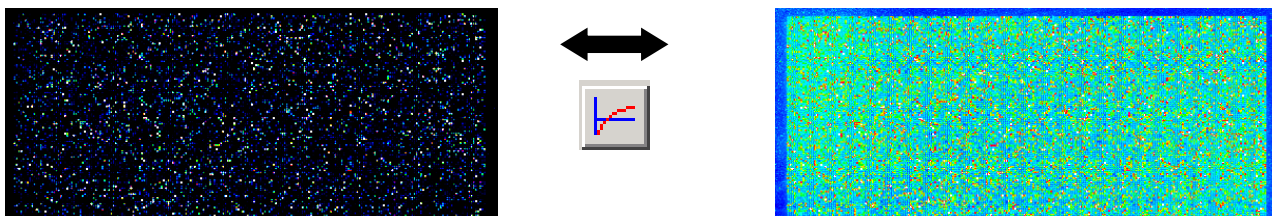
① Feature Extraction ソフトウェアの起動

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

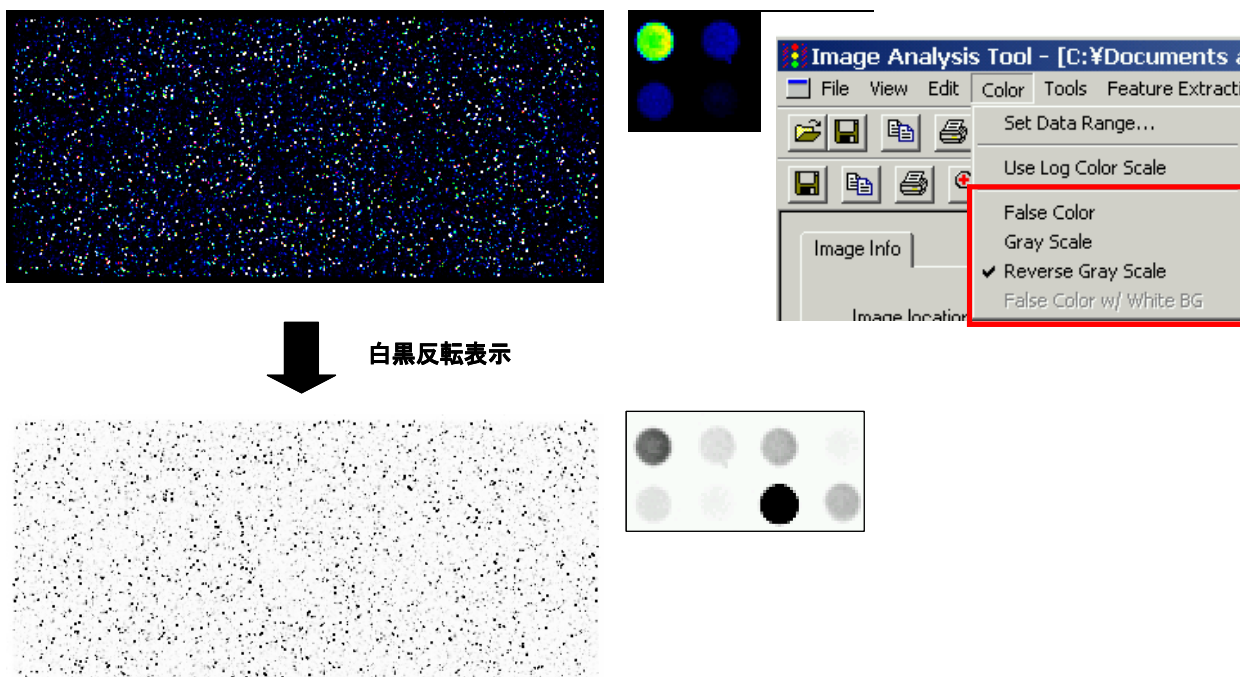
ログスケール表示によりバックグラウンドのむらを確認します。



③ 表示カラーの変更

Color > xxxxx を選択すると表示カラーが変更します。

例: メニューバーの【Color > Reverse Gray Scale】を選択すると、白黒反転表示になります。



④ イメージデータのスケールの確認

Green 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)。

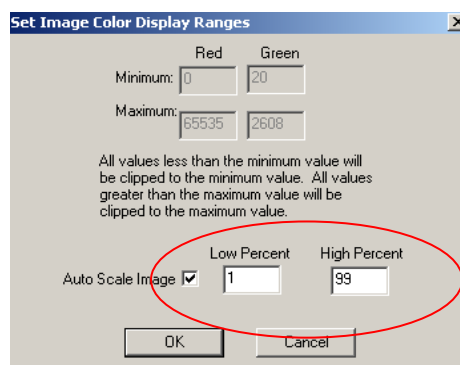
スポットレベルで確認する(例:コントロールスポットを除く全遺伝子スポットに対してデータスケールを確認する)ためには、スポット定量が必要になりますので御注意ください。

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。



⑤ クロップモードの ON/OFF

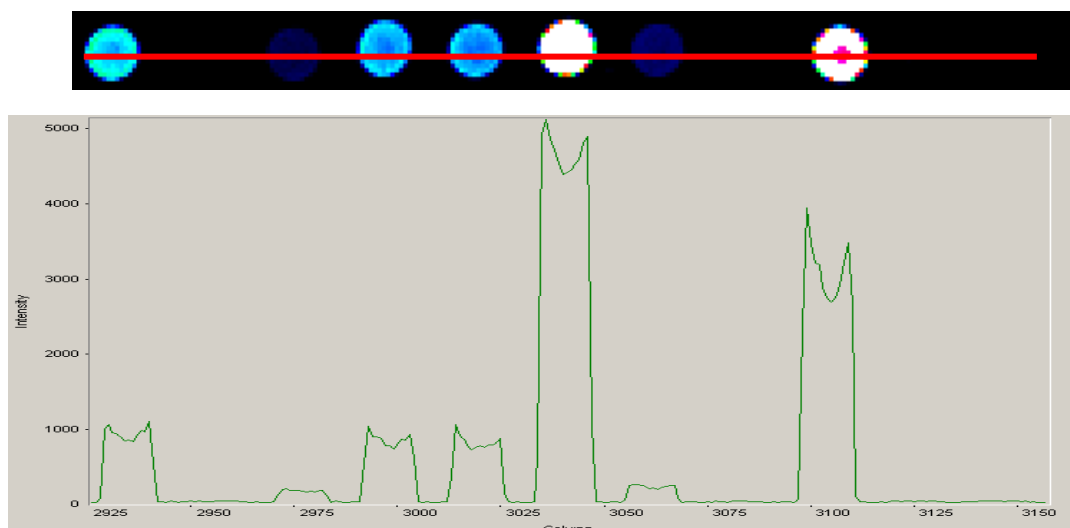
クロップモードが ON の場合、ポインタの横にひし形のマークが表示されます。イメージをクロップすると新しいウィンドウで切り取った画像が表示されます。OFF の場合、クロップ時にその大きさに合わせてウィンドウが拡大表示されます。



をクリックすることで ON/OFF の切り替えができます。

⑥ ラインプロット

スポットの形状を確認します。



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

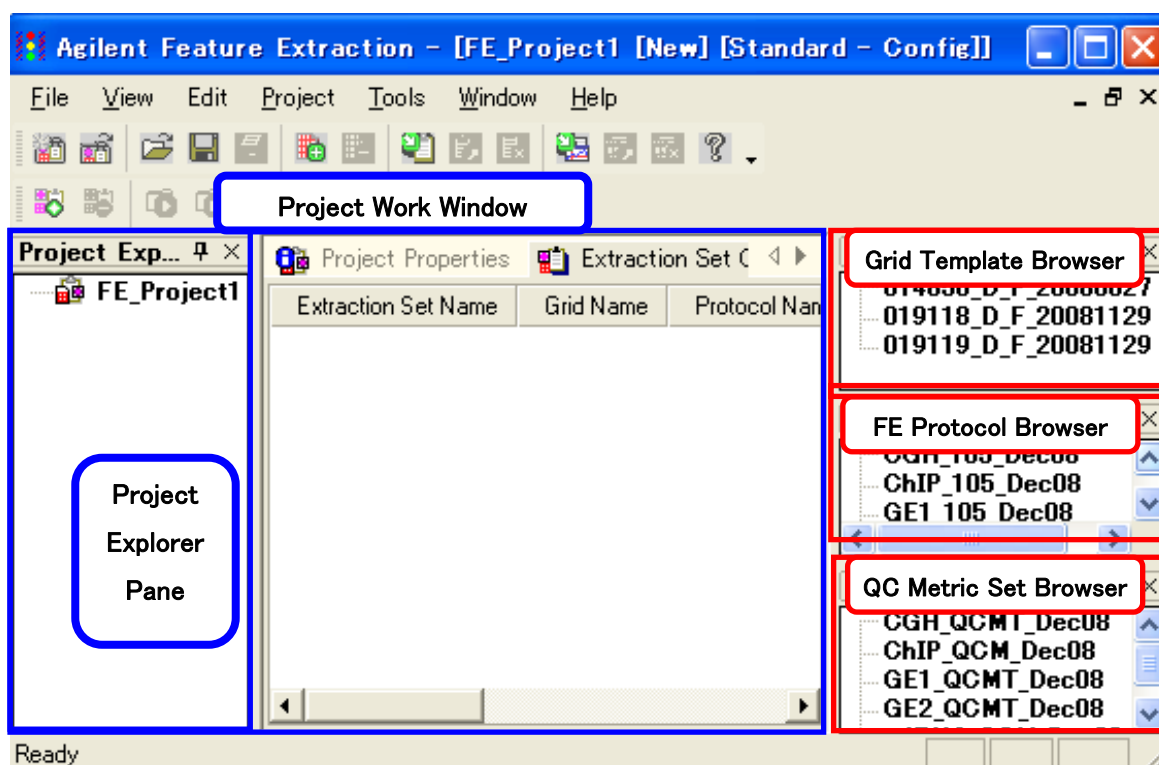
このように、Feature Extraction する前に、ヒストグラムやラインプロットを使ってデータ抽出の妨げの可能性となる異常スポットやバックグラウンドの確認をすることができます。

8. Feature Extraction ソフトウェアで数値化を行う前に

①Project 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。ここに今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(25**28004**10025 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 Appendix1 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 Appendix2 参照)。

QC Metric Set Browser: 各アプリケーションの 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する。

必要なメトリックセットファイルがなければ、下記 Web Site からダウンロードする

<https://www.agilent.com/en/qc-chart-tool-metric-sets>

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 Appendix1 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(zippped)Folders と選択)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)

- (1)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)

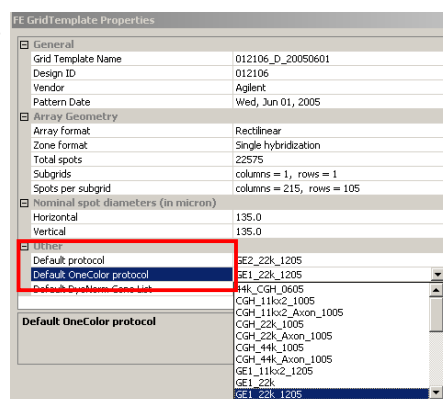
■インポートしたデザインファイルに、適切な FE プロトコルを設定する方法

(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。



9. 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。

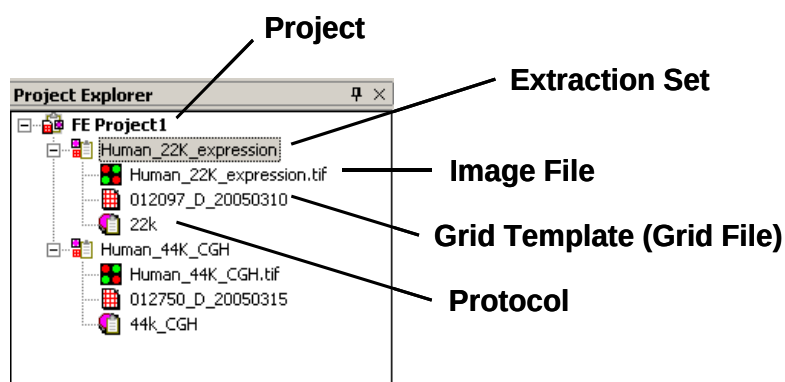
Extraction Set : 解析する tif 画像ごとに作成されます。

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。

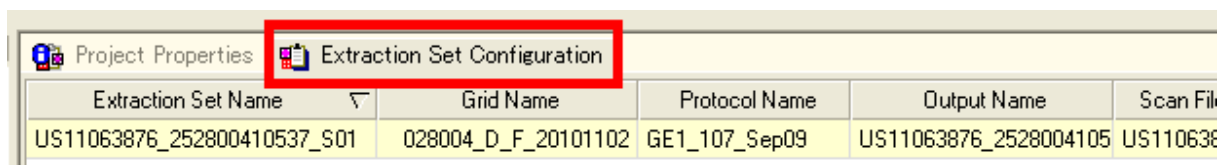
Protocol : イメージの数値化の際、適用する解析アルゴリズムの設定です。



STEP3. 数値化設定の確認とProjectの設定

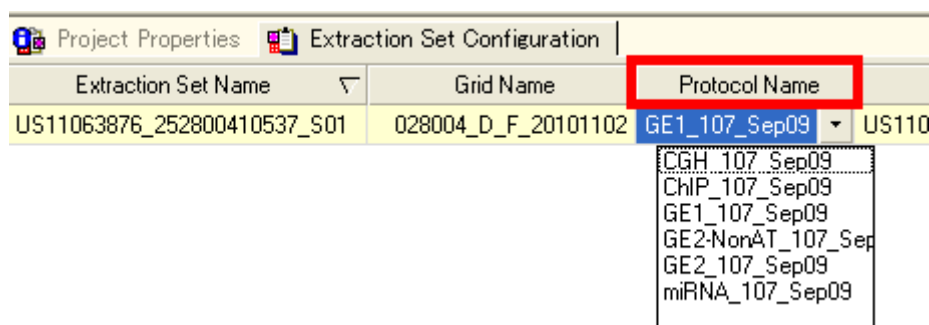
1. 数値化設定の確認をします。

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



Extraction Set Name	Grid Name	Protocol Name	Output Name	Scan File
US11063876_252800410537_S01	028004_D_F_20101102	GE1_107_Sep09	US11063876_2528004105	US11063876_252800410537_S01

- 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.48を参照の上必要なファイルをインポートして下さい。



Extraction Set Name	Grid Name	Protocol Name	Output Name
US11063876_252800410537_S01	028004_D_F_20101102	GE1_107_Sep09	US11063876_2528004105

CGH_107_Sep09

ChIP_107_Sep09

GE1_107_Sep09

GE2-NonAT_107_Sep09

GE2_107_Sep09

miRNA_107_Sep09

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)。

Project Properties

Extraction Set Configuration

General

Operator

Unknown

Input

Number of Extraction Sets

10

Output and Data Transfer

Outputs

MAGE

None

JPEG

None

TEXT

Local file only

Visual Results

Local file only

Grid

None

QC Report

Local PDF file only

FTP Send Tiff File

False

Local File Folder

Same As Image

True

Results Folder

FTP Setting

Automatic Protocol Assignment

Highest Priority Default Protocol

Grid Template Default

Project Default Protocol

Automatic Grid Template Assignment

Use Grid file if available

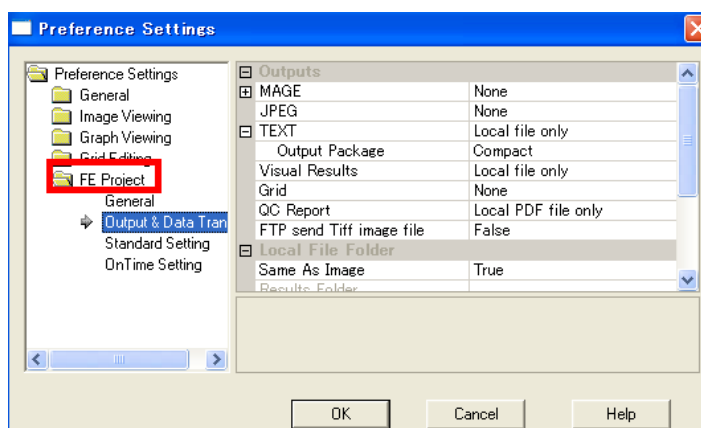
False

External DyeNorm List File

Overwrite Previous Results

False

(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**の結果を出力されるよう、これらの項目の設定が**Local file only**、それ以外の項目（MAGE、JPEG、Grid等）は、**None**となっています。

(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

“miRNA_QCMT_Jan09”を選択します。

プルダウンに“miRNA_QCMT_Jan09”が表示されない場合

<https://www.agilent.com/en/qc-chart-tool-metric-sets>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。

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。

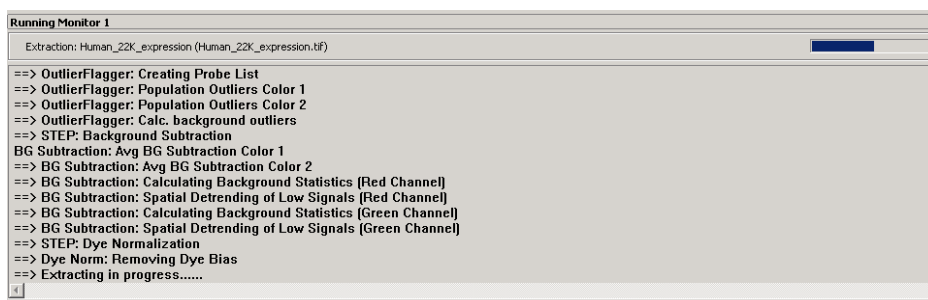
STEP4. Feature Extraction Project をスタート (数値化の実行)

・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。

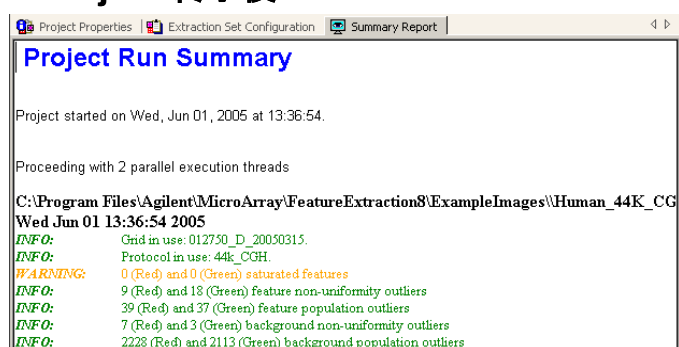


進行状況は、Running Monitorに表示されます。Project終了後、Summary Reportタブを選択していると、Project Work Windowに、Project終了を示すSummaryが現われます。

Running Monitor

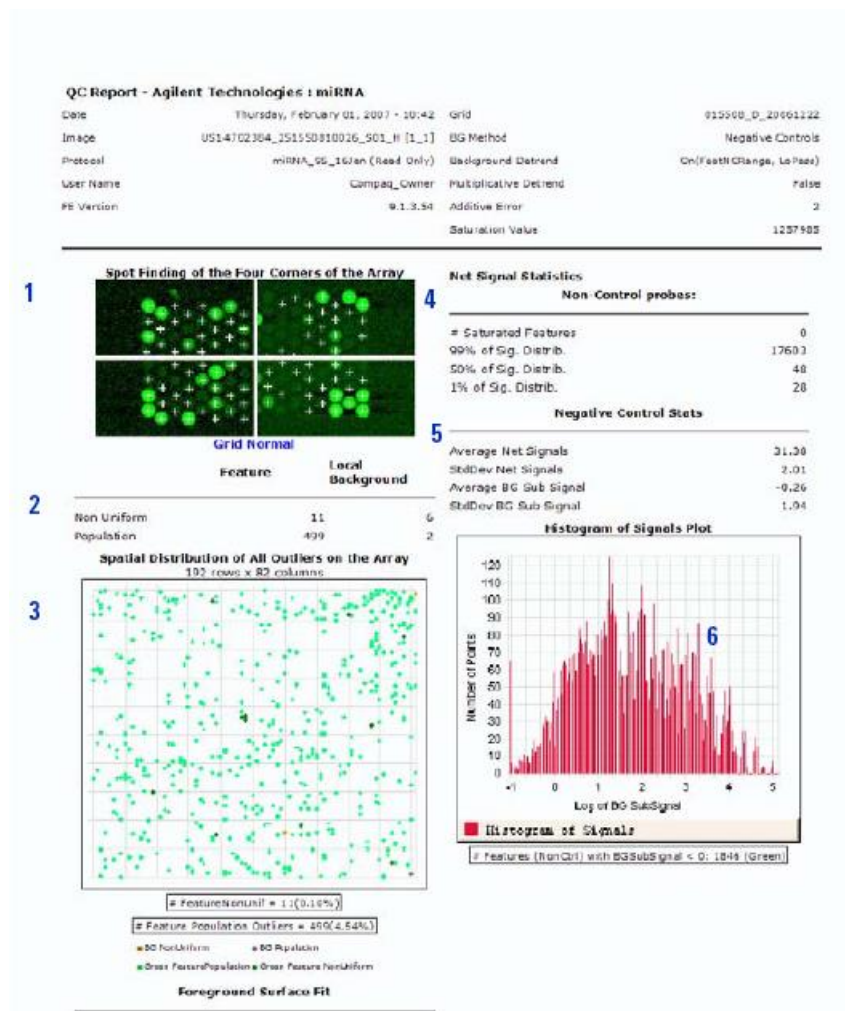


Project 終了後

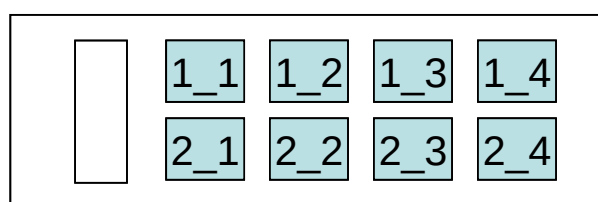


STEP5. QC Reportの確認

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



※8x15Kおよび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サイトが手前の状態)。



QC Metricsは、以下の項目と閾値を示します。(FE10.7以降)

(各項目の詳細は、メニューバー【Help > Reference Guide】で確認することができます。)

Evaluation Metrics for miRNA_QCMT_29Sep09 :

Excellent (4) ; Good (2)

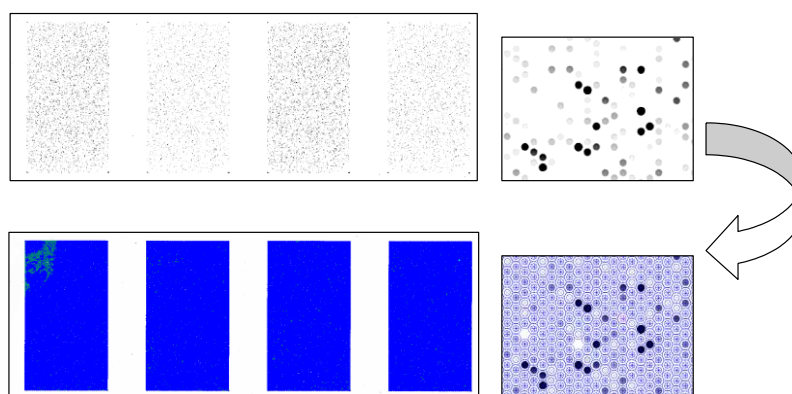
Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00	>1	NA	<1
AddErrorEstimateGreen	4.32	<5	5 to 12	>12
AnyColorPrcntFeatPopnOL	6.97	<8	8 to 15	>15
gNonCtrlMedPrcntCVBGsu...	5.79	0 to 10	10 to 15	<0 or >15
gTotalSignal75pctile	248.45			
LabelingSpike-InSignal	3.63		>2.50	<2.50
HybSpike-InSignal	5.99		>2.50	<2.50
StringencySpike-InRatio	0.23			

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

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、ファイル名の末尾に_Hが付いた画像を開きます。
2. メニューバー【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. メニューバー【View > Extraction Results】からVisual Resultsの表示法を選択できます。
メニューバー【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。

Step 7. 出力ファイルの確認

GeneView(miRNA マイクロアレイデータ特有のテキストファイル)について

miRNA FE protocolでは、タブ区切りテキストファイル・MAGE-MLファイル・QCレポート
などに加え、**GeneView**という名前のmiRNA分析に特有のタブ区切りテキストファイルを
出力します。

GeneViewファイル名例 **2516436XXXXX_S01_1_1_GeneView.txt**
(↑アレイバーコード ↑スライド上のアレイの位置)

このファイルは、以下の5つの項目を含みます。

内容	項目
Systematic Name	プローブがハイブリするように設計されたターゲット配列のID (非コントロールプローブではmiRNAのID)
Control Type	フィーチャーのコントロールタイプ 0 コントロール以外のプローブ 1か-1 コントロールプローブ (グリッド合わせやSpike-Inの評価に使うもので、解析には使用しません)
gTotal Gene Signal	各miRNAについて計算されたシグナル値
gTotal Gene Error	シグナル強度のエラー値
gIs Gene Detected	シグナル値がエラー値よりも十分高く検出されているかの判定 1 シグナル値がエラー値の3倍以上である 0 シグナル値がエラー値の3倍より低い

Microsoft Excel - 251643610172_S01_1_1_GeneView.txt

ファイル(F) 編集(E) 表示(V) 挿入(I) 書式(O) ツール(T) データ(D) ウィンドウ(W) ヘルプ(H)

MS Pゴシック 11

D11 0.658981

	A	B	C	D	E
1	text	integer	float	float	boolean
2	SystematicName	ControlType	gTotalGeneSignal	gTotalGeneError	gisGeneDetected
3	DarkCorner	-1	1.888001	8.1150	
4	NC1_00000197	-1	7.29536	8.43373	
5	NC1_00000215	-1	1.18085	8.3791	
6	NC2_00079215	-1	0.121326	8.38398	
7	NC2_00092197	-1	-0.309608	8.37845	

GeneView ファイルをエクセルで開いた例

※解析ソフトウェア GeneSpring GX v10 以降では、テキストファイル (Compact あるいは Full) を取り込みます (GeneSpring 内で自動的に gTotalGeneSignal が計算されます)。それ以外の解析ソフトウェアを用いる際は、GeneView ファイルを使います。

TotalGeneSignal の算出方法について

miRNA マイクロアレイでは、1つの miRNA に対応する複数のプローブがデザインされており、それぞれのプローブに複数の繰り返し Feature が存在します。GeneView ファイルでは、1行が1つの"Gene"(=mature miRNA)に対応し、その miRNA の発現レベルを TotalGeneSignal としてレポートします。

※"Gene"=アレイ上にある、固有の 556 個 (Human ver.1) の Systematic Name に対応
miRNA アレイには、470 種類のヒト miRNA と 64 種類のウィルス miRNA、またコントロールを含んだ 556 種類の"Gene"に対する約 15,000 のスポットが搭載されています。

1. 以下のステップで、TotalProbeSignal を算出する

Step1. EffectiveFeatureSizeFraction を算出する

(スポットの中の、シグナル抽出計算に用いられたエリアの割合)

Step2. シグナル強度の平均値を算出する

(同じ配列をもつ全ての繰り返しプローブのうち、フラグの立っていないプローブの ProcessedSignal 間の Mean 値)

Step3. スポットの面積値を算出する

($=\pi \times (\text{スポットの幅} \div 2) \times (\text{スポット高さ} \div 2)$)

Step4. TotalProbeSignal を算出する

TotalProbeSignal = シグナル強度の平均値 (Step2 より)

× スポットの面積値 (Step3 より)

× 総繰り返し Feature 数

× EffectiveSizeFraction (Step1 より)

× Weight (1/30000)

1. 下の点以外は1と同様に、TotalProbeSignalError を算出する

Step2. エラー値の RMS (Root Mean Square) を算出する

(同じ配列をもつ全ての繰り返しプローブのうち、フラグの立っていないプローブの ProcessedSignalError 間の RMS)

2. TotalGeneSignal を算出する

(1つの遺伝子に対してデザインされた全 Probe の、TotalProbeSignal の和)

3. TotalGeneSignalError を算出する

(1つの遺伝子に対してデザインされた全 Probe の、TotalProbeSignalError の和の RMS)

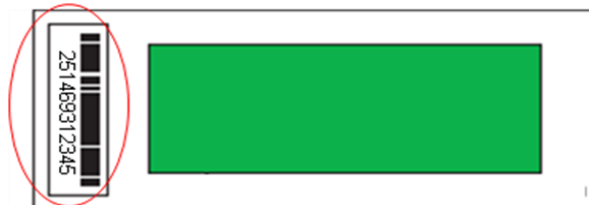
Appendix 1 Feature Extraction 用デザインファイルのダウンロードサイト

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>

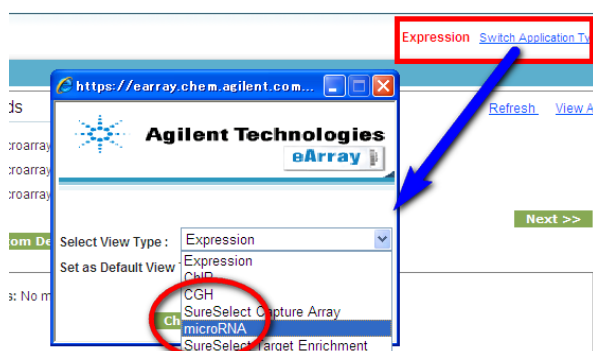
1. お使いのマイクロアレイのデザイン番号 (Design ID)を確認します。

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。

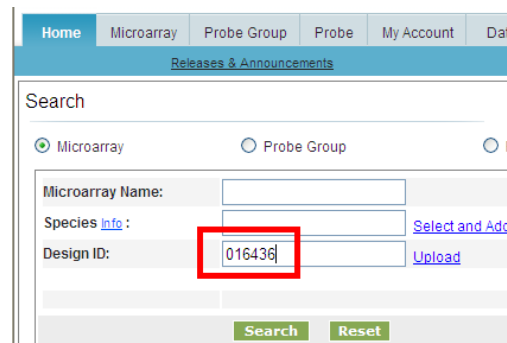


例) 12 桁の番号が **251469312345** の場合... [14693]の頭に「0」を付けた **014693**

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



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



4. Search 結果から「Download」を選択

Search Results: 1 matching results found

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

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

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

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

Appendix 2 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。

<https://www.agilent.com/en/download-protocols-feature-extraction-software>

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 12.1	Protocol Use	Protocol Revision Table
------------------------------	------------------------------	---

Archives

Version 12.0	Protocol Use	Protocol Revision Table
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

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures

- ※ **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。

Appendix 3 Total RNA の評価

推奨の Total RNA の抽出方法

Total RNA の抽出方法は、収量、Total RNA 中に含まれる Small RNA の量、Total RNA の定量結果のような点で、サンプルに影響を及ぼします。

次の4つは、Agilentがアレイによるプロファイリングに使用できることを確認した方法です。

- Agilent Absolutely RNA miRNA Kit - catalog number 400814
- Qiagen miRNeasy Mini Kit - catalog number 217004
- Applied Biosystem mirVana miRNA Isolation Kit - catalog number AM1560
- Invitrogen TRIzol Reagent (100 mL) - catalog number 15596-026

これらのキットを使用する際は、Total RNA 抽出法のみを使い、Small RNA Enrichment 法を使わないようにご注意ください。また、比較したいサンプルには、同じ抽出法を使うことが非常に重要です。抽出法が変わると、miRNA のプロファイリングに影響を及ぼす可能性があります。

抽出後は、以下に示すような方法で、RNA の品質チェックを行ってください。

Step1. UV-Vis による Total RNA の評価

・少なくとも、以下の 4 つの波長における吸光度を測定して下さい。

A230	グアニジンイソチオシアネートや塩類・糖類、その他有機溶媒などの混入を検出します
A260	TotalRNA の濃度を測定します
A280	タンパク質・フェノールの混入を検出します
A320	異常な吸収がないかをチェックします

・以下の基準を満たしているかをチェックして下さい。

$$A_{260}/A_{280}=1.8\sim 2$$

この基準を満たしていない場合、RNA を正確に定量することができないため、マイクロアレイデータに影響を及ぼします。サンプリングをやり直すか、混入物を除去するための追加の精製を行ってください。また、可能であれば 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。

※ $A_{260}/A_{230}>2$ という基準も、コンタミネーションの程度を知るために有効です。Trizol のような有機溶媒を使用する抽出法では、その有機溶媒のサンプルへの混入により、230nm の吸光度が上がってしまうことがあります。また、260nm の吸光度にも影響して Total RNA の定量値を不正確にする危険性があります。Trizol などの混入を除去するには、Trizol の抽出プロトコルの後に、クロロフォルム抽出を更に 1・2 回追加してから、アルコール沈殿を行ってください。

Step2. Agilent 2100 Bioanalyzer による Total RNA の評価の準備

以下は miRNA マイクロアレイ実験の中では任意のステップとなりますが、Agilent は **Total RNA** と、**Total RNA 中の small RNA の画分**の評価をされることをお勧めいたします。この章では、ラベリングとハイブリダイゼーションに先立って、Total RNA と Total RNA 中の small RNA の画分を評価するための一般的なガイドラインについてご説明します。

・Total RNA の評価

Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて Total RNA の評価を行うと、ラベリングとハイブリダイゼーションの前に**サンプルの質についての情報**が得られます。サンプルの濃度に応じて、**RNA6000 Nano/Pico kit** をそれぞれの assay と共に用います。

Agilent 2100 Expert Software は、Total RNA の質の指標として **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。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 の各々の閾値を決定することができます。

・Small RNA の評価

Small RNA assay では Total RNA 中の、miRNA が存在する **Small RNA の領域**に注目した評価を行います。Agilent 2100 Bioanalyzer の **Small RNA Kit** を Small RNA assay と共に用います。

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

- このステップでは、以下の機器・試薬キットが必要になります。

Description	Company and part no.
Agilent 2100 bioanalyzer	Agilent p/n G2938C or G2939A
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent p/n 5067-1511
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent p/n 5067-1513
Agilent Small RNA Kit	Agilent p/n 5067-1548

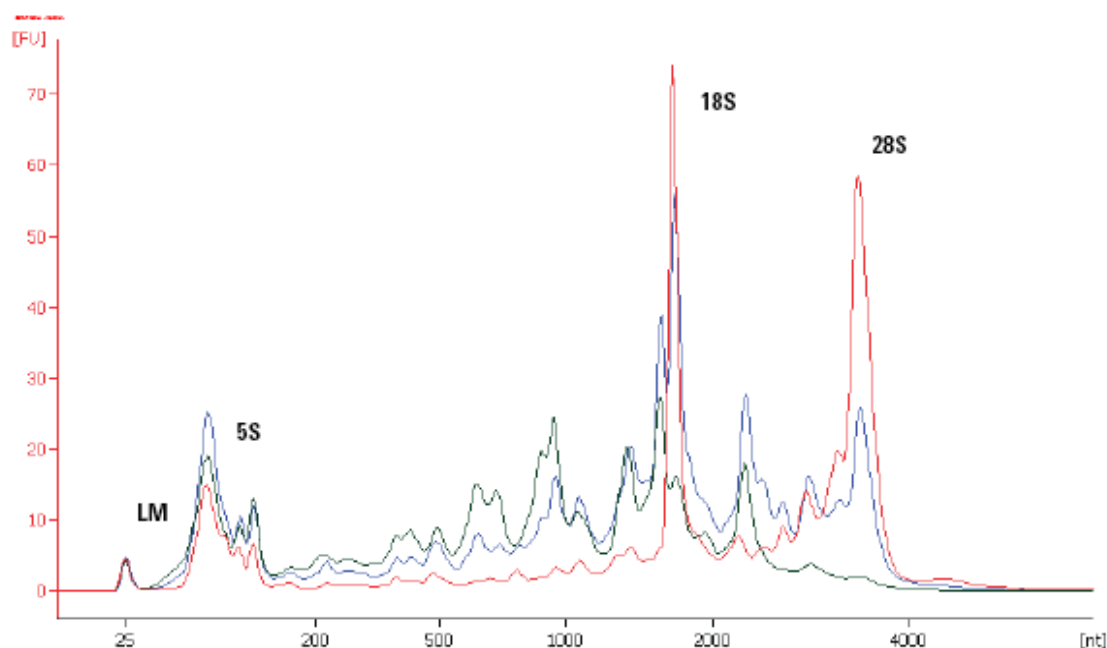
- それぞれの試薬キットは、以下のサンプルに対応いたします。

Description	Compatible Assay
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Eukaryote Total RNA Nano Assay Qualitative range 5 to 500 ng/μL
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Eukaryote Total RNA Pico Assay Qualitative range 50 to 5000 pg/μL in water
Agilent Small RNA Kit	Small RNA Assay • 50 to 200 pg miRNA • 1 to 10 ng/μL of purified small RNA < 200 nt • 10 to 50 ng/μL of total RNA

Step3. Agilent2100 Bioanalyzer を用いた RNA サンプルの評価

Total RNA の評価

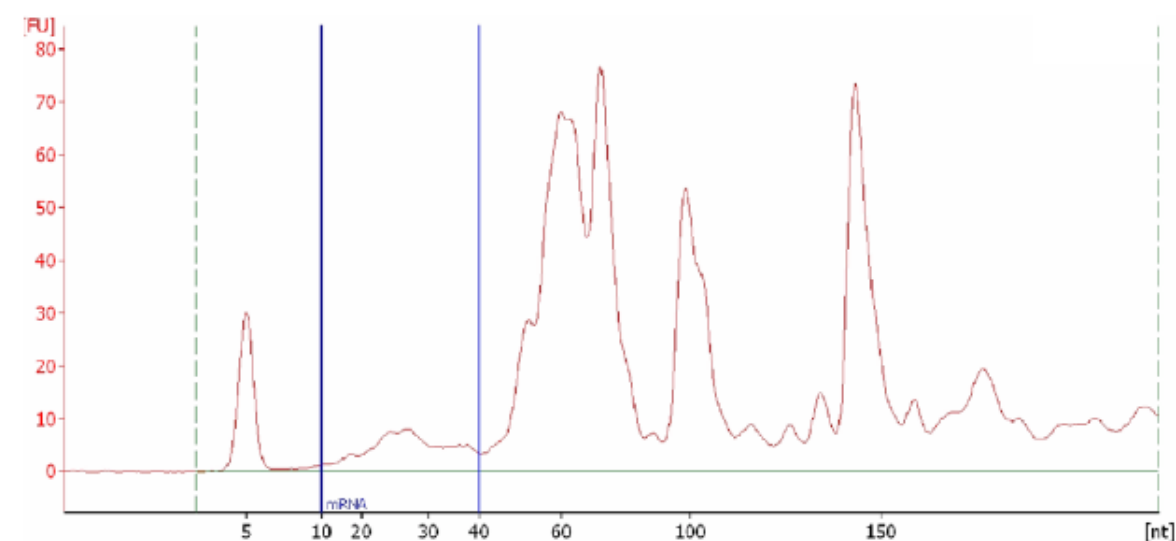
- Total RNA の評価には、Agilent RNA 6000 kit を用い、キットの説明書に沿って下さい。
- この分析によって得られるエレクトロフェログラムでは通常、18S と 28S リボソーマル RNA の、少なくとも二つの区別できるピークが見られます。5S リボソーマル RNA は RNA の精製法によって高さが変わります。カラムを用いて Total RNA を精製した場合、これは通常低くなります。LM (Lower Marker) は、サンプル間の泳動時間のずれを調節するための標準物質のピークです。
- 下の図では、分解具合の異なる、3 種類の Total RNA を分析し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

Small RNA の評価

- Small RNA の評価には、Agilent Small RNA kit を用い、以下の方法に沿って分析をして下さい。
 - 1) 試薬キットの説明書にあるとおり、2100Bioanalyzer の電極が洗浄されてあることを確認する
 - 2) Agilent 2100 Expert Software(ver. B.02.04 以上)を立ち上げ、2100 Bioanalyzer の電源を入れ、通信を確認する
 - 3) 試薬キットの説明書に従い、サンプル・ラダー・チップを準備する
 - 4) 5 分以内に 2100Bioanalyzer にチップをセットし、分析を開始する
 - 5) 結果を評価する
- この分析によって得られるエレクトロフェログラムでは通常、10nt から 150nt の範囲の Small RNA の、複数のピークまたはバンドが見られます。miRNA は 10nt から 40nt の範囲に位置し、この位置のピークまたはバンドの存在量は、miRNA の総量によって変わります。下の図は、Total RNA サンプルを Small RNA assay によって分析したエレクトロフェログラムの例です。
- miRNA のマイクロアレイ実験の結果と関連づけるため、泳動結果を記録しておくことができます。しかしながら、マイクロアレイの方が本キットより感度が高いため、この Small RNA assay の結果が必ずしもサンプル中の miRNA の指標になるとは限りません。
(セルラインなどでは、この領域にピークが検出されなくても、アレイでは十分なシグナル強度が得られる場合があります)



Total RNA 中の Small RNA の分析によるエレクトロフェログラム例

Small RNA に分類される 10nt から 150nt の領域のうち、miRNA は通常 10nt から 40nt の範囲に位置する

Appendix 4 スキャナの詳細な起動手順

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

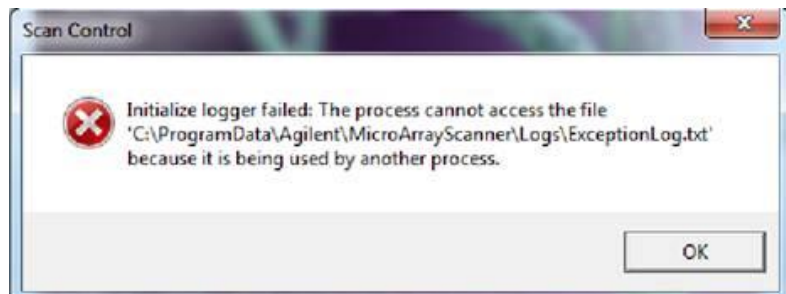
1. PC の電源を入れログインし、スキャナの電源を入れます。
2. スキャナ前面右上にある LED がオレンジ→白色の順に光り、しばらくすると消灯します。LED が消灯するまで待ちます。（電源を入れてから数分かかります。）
3. スキャンコントロールソフトを立ち上げます。
4. スキャナの初期化が始まりますので、初期化が終わるまで待ちます。
5. スキャンコントロールソフトの画面右下にある Scanner Status が Ready になることを確認します。
※デフォルト設定では、Ready の状態で 5 分間、スキャン開始せずに待機すると、省電力のためレーザーが OFF になります。スキ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

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

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



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

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

【Windows 7】

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

【Windows 10】

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

Appendix 5 データのノーマライゼーションに関する推奨

miRNA のプロファイリングの研究者の中では、現時点で『一般的に推奨できる、miRNA のデータのノーマライゼーション法はない』という考えが共通認識となっています。

それは、miRNA の発現では、ほとんどの遺伝子発現ノーマライゼーション法が前提としている、以下の仮説が成り立たないと考えられているためです。

- サンプル間で、遺伝子の大多数は発現が変化していない
- サンプル間で、発現上昇と発現減少は全体として同等である
- サンプル間で、総発現量は一定である
- ・ miRNA では、どのサンプルでも一定の発現レベルを示す『真のハウスキーピング遺伝子』というものは知られていない
- ・ サンプル間で、他の small RNA (rRNA, snRNAs, 5S tRNA など) も miRNA 同様に変化しうる

アジレントのプラットフォームを使って得られた miRNA のプロファイルは、実験が理想的に行われたという仮定のもとで、以下の理由から、“実質上”total RNA の量によってノーマライズされていると考えられます。

- ・ 等量の total RNA が、それぞれの実験に使用されている
- ・ 標識されたサンプル全量が、アレイ上にハイブリダイゼーションされる

全遺伝子のシグナル強度の 90 パーセンタイルの強度でノーマライズするなどの、グローバルノーマライゼーション法を使うと、アレイの繰り返し実験間でのシグナル強度をより良く一致させることができる場合もあります。このようなノーマライゼーション方法は、比較するサンプルが極めて似た性質をもち、サンプル間での miRNA の発現レベルの差が小さいことが予想される場合に使用することができます。

そのようなサンプルではない場合は、どのようなタイプのノーマライゼーションでも、その適用には注意されることをお勧めいたします。たとえ単純なグローバルノーマライゼーションであっても、それを適用することによって、本当のサンプル間での発現差を見えなくしてしまう可能性があります。Quantile ノーマライゼーションのような、より条件の厳しいノーマライゼーション法は、使用されないようにお勧めいたします。このようなノーマライゼーションの前提となる条件はより厳しく、miRNA 実験ではこれらの前提は成立しない可能性が高いためです。

Appendix 6 よくある質問

Q1. なぜ実験開始直前に Total RNA サンプルを 50ng/uL に希釈するのですか？

A1. 約 50ng/uL にまで希釈することで、サンプルの液量を増やすことになり、ピペット操作のばらつきによる実験誤差を軽減することができます。マイクロチューブの壁へ RNA が吸着すると、濃度が正確に保たれないため、50ng/uL に希釈された状態では、保存をしないで下さい。

Q2. DMSO を加えて熱した後、またハイブリダイゼーションバッファを加えて熱した後の冷却は、氷水の代わりに氷を使用してもいいのですか？

A2. このステップの目的は、RNA を変性された状態に保つことです。氷のみを使用するよりも、氷水を使用することで、チューブと氷水がより効率よく接触し、チューブがよりよく冷却できます。より再現性のある結果のために、氷水をご使用下さい。

Q3. このラベリング反応に、サーマルサイクラーを使用できますか？

A3. インキュベーションと加熱にサーマルサイクラーを使用することはできます。ただし、100℃で変性後の急冷にはお使いいただけません。RNA が再アニールするのを防ぐために、冷却は瞬時に行わなければなりませんが、サーマルサイクラーではそれができません。

Q4. CIP マスターミックスやライゲーションマスターミックスを、混合後に保存することはできますか？

A4. これらのミックスは希釈された酵素を含んでおり、保存をすると最適な活性が保たれません。酵素は一旦希釈をした後は直ちにお使い下さい。酵素を含む全てのミックスは、ご使用直前に調製して下さい。

Q5. ラベリング過程のサンプルは、いくつかのステップで-80℃で保存可能ということですが、少しの間であれば-20℃でも保存はできますか？

A5. 少しの間であれば、可能です。

Q6. 1 サンプルのみ、ラベル反応を行っています。CIP やライゲーションはマスターミックスを調製するべきでしょうか？

A6. いいえ。1 反応分の試薬を、マスターミックス用の表にある順番で直接加えて下さい。酵素は常に最後に加えて下さい。

Q7. ハイブリダイゼーションは 20 時間以下でも大丈夫ですか？

A7. いいえ。安定したシグナルを得るためには、必ず 20 時間は必要です。長い分(40 時間までは確認されております)には問題ありませんが、比較するサンプル間のハイブリダイゼーション時間は一致させるということが極めて重要となります。

Appendix 7 Agilent 社ゲノミクス製品ホームページ

弊社のゲノミクス関連製品の日本語ホームページでは、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。

アジレント ゲノミクスウェブサイト: <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

キャンペーン

- キャンペーン一覧
- 【発売記念特別企画】Agilent 4150 TapeStation デモンストレーションキャンペーン
期間：2019年6月3日(月)～7月31日(水) お申し込み分まで

イベント

- 最新のイベント情報
- <オンデマンド>ウェビナー
- 演題：新製品！スマートになったエ

製品

- マイクロアレイ
 - GeneExpression
 - miRNA
 - CGH
 - 機器
- SureSelect/HaloPlex
- データ解析
- TapeStation
- バイオアナライザ
- オリゴヌクレオチドライブラリ
- リアルタイムPCR
- CRISPR/Cas
- ストラタジーン試薬
 - 核酸の精製とサンプルの調製
 - クローニングとライブラリー
 - PCR と逆転写酵素
 - タンパク質の発現、変異導入、機能解析
 - タンパク質の分離、精製、QC
 - 細胞レベルでの解析とトキシコロジー

サービス・サポート

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

こちらのページにて、最新版のマニュアルをダウンロードしていただくことができます。

Copyright Agilent Technologies 2015

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

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

ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

本書は、内容について細心の注意をもって作成いたしましたが、万一ご不審な点や誤り、記載もれ等、お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

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

本プロトコル以外の方法または試薬を用いたことによる性能上のトラブル、損害。

分析結果に基づく損失

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

本製品パッケージとして提供した本マニュアル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、本品に関しても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。**