

マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

担当：内藤、西

レポートの提出期限・場所：7月10日・417号室

【目的】

網羅的に遺伝子の発現を解析する手法であるマイクロアレイの原理、操作手順、解析方法について学ぶ。マイクロ RNA を導入した細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイを行うことで、全 mRNA の変動量を解析する。

【背景】

●マイクロ RNA (microRNA: miRNA)

マイクロ RNA は、長さ約 22 塩基の 1 本鎖 RNA であり、線虫からヒト、植物などの多くの生物種で同定されている。線虫やショウジョウバエ、哺乳類では、マイクロ RNA は、標的 mRNA の 3'UTR に部分的に相補的に対合し、翻訳抑制や mRNA の分解を引き起こす。2009年3月現在、ヒトでは 885 種類のマイクロ RNA が miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) に登録されている。また、配列解析により、ヒトの遺伝子のうち 3 分の 1 は、マイクロ RNA による発現制御をうけるという報告もなされている。

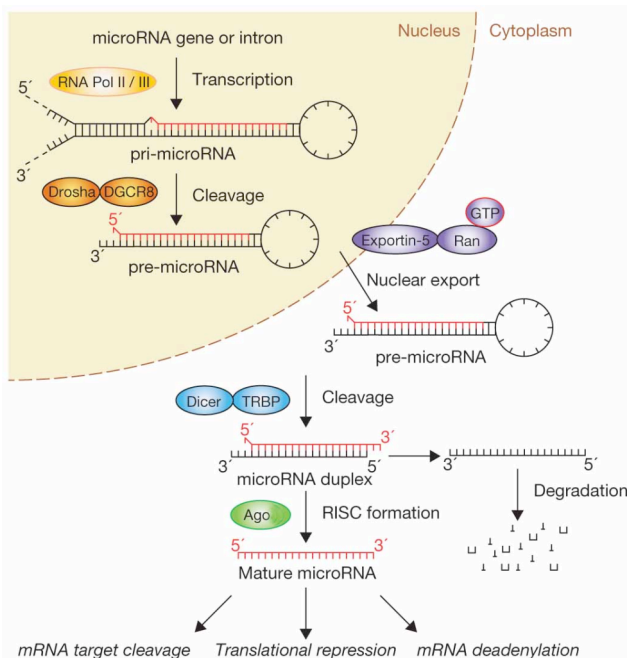


図1 マイクロ RNA の生合成の概略
Nature Cell Biol. 11 228 (2009) より改変

マイクロ RNA の生合成経路は、図1に示した通りである。マイクロ RNA はゲノム DNA にコードされていて、ヘアピンループ構造を持つ primary-miRNA (pri-miRNA) として転写される。pri-miRNA は、核内に存在する Drosha と呼ばれる 2 本鎖 RNA 切断酵素とそのパートナー分子 DGCR8 を含むマイクロプロセッサー複合体によって切断され、precursor-miRNA (pre-miRNA) になる。pre-miRNA はキャリアタンパク質である Exportin-5 により、核から細胞質へ輸送され、Dicer という 2 本鎖 RNA 分解酵素によって loop 部分が切断され、長さ約 22 塩基の 2 本鎖の成熟型マイクロ RNA (mature miRNA) になる。最終的に、1 本鎖の mature miRNA となって

Argonaute タンパク質に取り込まれ、数種類のタンパク質と miRNA-induced silencing complex (miRISC) と呼ばれるタンパク質複合体を形成する。そして、標的となる mRNA の 3'UTR を、マイクロ RNA の 5'末端から 2-8 塩基の部位の長さ 7 塩基のシード配列によって識別し、翻訳抑制や mRNA の分解を引き起こすとされている。しかし、この抑制段階の分子機構は未だに不明な点が多い。

今回の実習で細胞に導入したマイクロ RNA の配列を図 2 に示す。



図 2 本実習で細胞に導入した 2 本鎖 RNA

●マイクロアレイ

マイクロアレイは DNA チップとも呼ばれ、あらかじめ塩基配列の分かっている 1 本鎖 DNA を、基盤上に高密度に配置したものである。そこに、蛍光標識した RNA をハイブリダイゼーションさせることで、サンプルで発現している mRNA を網羅的に検出・定量できる (図 3)。なお、今回の実習に用いるアジレント社の Whole Human Genome (4x44K) には、1 区画あたり 60mer の合成オリゴ DNA が 41000 プローブ載っている。

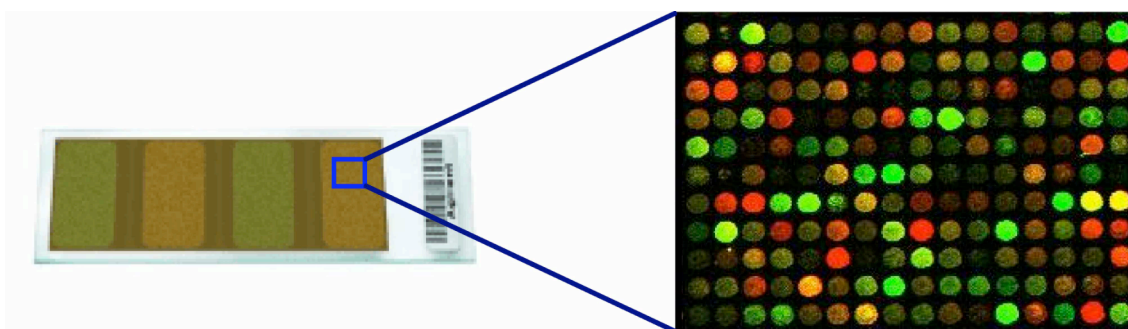


図 3 マイクロアレイとスポットの拡大図

マイクロアレイ実験は、

- (1) RNA 抽出
- (2) ラベル化
- (3) ハイブリダイゼーション
- (4) 洗浄
- (5) スキャン
- (6) 数値化

(7) データ解析

といった過程からなる。ラベル化の方法として、1色法と2色法がある。1色法では、全てのサンプルを同じ蛍光色素で標識して、1サンプル1アレイでシグナル強度を測定し、アレイ間でシグナル強度を比較する。2色法では、2サンプルを異なる蛍光色素で標識して、それらを同一のアレイ上にハイブリダイゼーションし、シグナル強度の比を測定する。今回の実習では1色法で実験を行う。1色法での実験の概略を図4に示した。

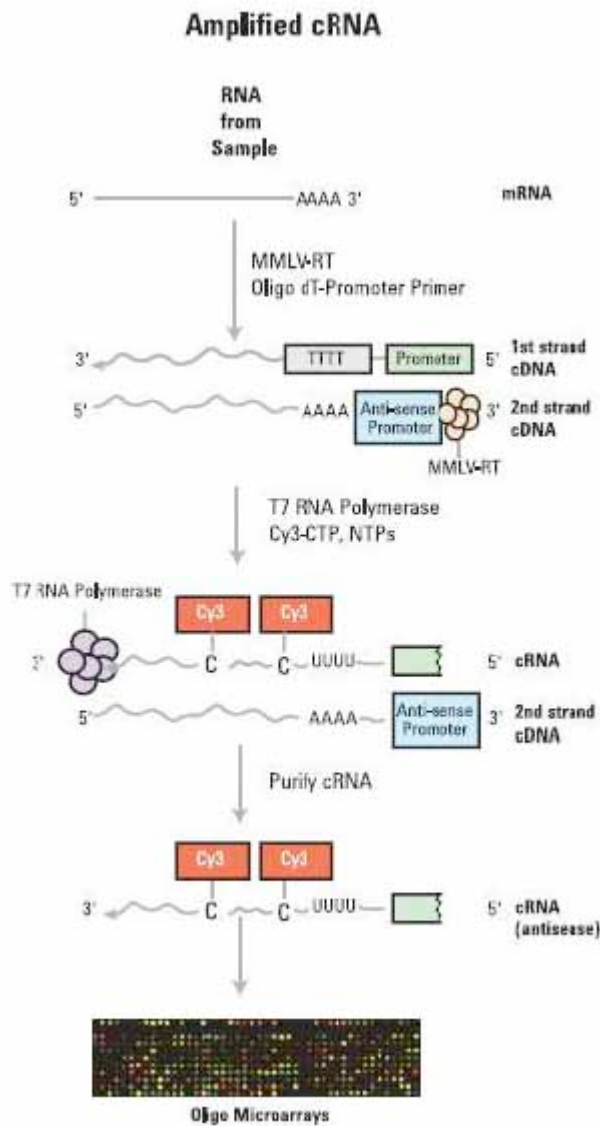


図4 ラベル化反応の概略図

【用意するもの、機器等】

マイクロアレイ Whole Human Genome (4x44K), Agilent
DNA マイクロアレイ用ハイブリダイゼーションオープン, Agilent

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
DNA マイクロアレイスキャナシステム C2565CA 高解像度仕様, Agilent
4x44K フォーマット用消耗品 (ガスケットスライド) , Agilent

Quick Amp Labeling Kit, One-Color, Agilent
Agilent One Color Spike Mix Kit, Agilent
Gene Expression Hybridization Kit, Agilent
Gene Expression Wash Buffer 1, Agilent
Gene Expression Wash Buffer 2, Agilent
10% Triton X-102, Agilent

RNeasy mini kit, Qiagen

DNase/RNase-free Distilled Water, Invitrogen
100%エタノール

パウダーフリー手袋
RNA 実験用ピペットマン P2、P20、P200、P1000
RNA 実験用チップ
1.5ml エッペンチューブ
50ml コニカルチューブ
ヒートブロック (ラベル化 65°C, 70°C)
UV 分光光度計 NanoDrop
Agilent2100 バイオアナライザ
卓上遠心器
ウォーターバス (ラベル化 40°C、断片化 60°C)
アイスバケツ
遠心機
ボルテックスミキサー
スライド洗浄ガラス容器 3 個
スライドラック
スターラー
ウォーターバスつきスターラー
回転子相当 2 個から 4 個
超精密ピンセット T-S
六角レンチ
エアダスター

【注意事項】

RNAは分解されやすく、RNA分解酵素も至る所に存在する。

研究室では、RNAを用いる実験は、RNA実験専用の部屋を設け、RNaseフリーな環境で行う場合が多い。その上で、実験器具、材料等もRNaseフリーなものを用いる。今回は、学生実習室でRNAを取り扱うことになるが、以下の点に留意する。

- ・手袋を常に着用して実験を行う（RNA用の器具、材料には素手で触らないように注意する）。これは、汗などにRNaseが含まれるためである。
- ・RNAを扱うときは、RNA専用のピペットマン、チップを用いる（他のピペットマンと混ざらないように注意）。
- ・唾液にはRNaseが含まれるため、実験中の会話は慎む（特にエッペンの蓋があいているとき）。
- ・サンプルの中にホコリ等が入らないように注意する。
- ・実験台の実験に使うスペースには、ラップもしくはアルミホイルを敷き、その上でRNA用のピペットマンやサンプルを取り扱う。
- ・水は市販のRNaseフリーWaterを用いる。

【日程の概要】

〈1日目〉

- ・RNA実験の注意点などの説明
- ・培養細胞からのtotal RNA抽出
- ・RNAの濃度、品質チェック

〈2日目〉

- ・マイクロRNA、マイクロアレイなどの説明
- ・total RNAからのcDNA合成
- ・Cy-3ラベル化cRNAの合成

〈3日目〉

- ・Cy-3ラベル化cRNAの品質チェック
- ・スライドガラスを扱う練習
- ・断片化
- ・ハイブリダイゼーション開始（19時以降）

※ハイブリダイゼーションにかかる時間は、17時間±15分

〈4日目〉

- ・スライドガラスの洗浄（12時〜）
- ・スキャニング
- ・数値化

- データ解析 (情報基盤センター 1 階大演習室 2)

〈5 日目〉

- データ解析 (情報基盤センター 1 階大演習室 2)

〈6 日目〉

- total RNA の電気泳動
- データ解析

【手順】

〈実験の前準備〉

マイクロ RNA による mRNA 全体の発現量の変動をみるために、HeLa 細胞に以下のマイクロ RNA をトランスフェクションし、細胞溶解液を準備した。

- mock(トランスフェクション操作のみを行ったもの)
- miR-548c
- miR-643
- miR-373

それぞれのマイクロ RNA は 50 nM でリポフェクタミン 2000 を用いて HeLa 細胞にトランスフェクションした。細胞は、トランスフェクション 24 時間後に Buffer RLT で溶解した。細胞溶解液は 80°C で保存した。

HeLa 細胞: ヒト由来の最初の培養細胞株、子宮頸癌由来

Buffer RLT: RNeasy というキットについての細胞を溶解するグアニジンチオシアネート含有の Buffer。グアニジンチオシアネートは、タンパク質の強力な変性剤であり、RNase を失活させる。

〈1日目〉

i) 培養細胞から total RNA の抽出

RNeasy Mini を用いて行う。

遠心は室温で行う。

1. 各班に、600 μ l の Buffer RLT に溶解した細胞溶解液を 1 つずつ配布する。自分の班がどのサンプルなのかを記録しておくこと。

- mock → 「サンプル 1 (班)」「サンプル 2 (班)」
- miR-548c → 「サンプル 3 (班)」「サンプル 4 (班)」
- miR-643 → 「サンプル 5 (班)」「サンプル 6 (班)」
- miR-373 → 「サンプル 7 (班)」「サンプル 8 (班)」

2. 600 μ l の 70%エタノールを加えた後、溶液が均一になるまで十分にピペッティングで混合する。

※ 混ざりにくいため、10 回以上のピペッティングが必要。目で見て、完全に均一にな

るまでピペッティングする。このとき沈殿物が見えることがあるが、以降の操作に問題はない。凍結した細胞溶解液を使う場合は、完全に室温に戻してから70%エタノールを加える。遠心機を使ってスピンドウンしないこと。

3. 2ml コレクションチューブ中にセットされた RNeasy スピンカラムに 600 μ l のサンプルをアプライし、ふたをして、13,000 rpm で 30 秒間遠心して、カラムを素通りした液を捨てる。

※カラムが、素通りした液に触れないように注意する。コレクションチューブから液を除くときは、ピペットマンを用いて完全に液を除くと良い。以下の遠心後のカラムを素通りした液を除く操作でも同様。

4. スピンカラムを元の 2ml コレクションチューブにセットし、残りのサンプルをアプライする。ふたをして、13,000 rpm で 30 秒間遠心して、カラムを素通りした液を捨てる。

5. 350 μ l の Buffer RW1 をスピンカラムにのせる。ふたを閉め、13,000rpm で 30 秒間遠心し、カラムを素通りした液を捨てる。

6. 10 μ l の DNase I stock solution を 70 μ l の Buffer RDD に加え[※]、80 μ l をスピンカラム上にのせて、室温で 15 分間放置する。

注) 今回 4 班分まとめて調製する。

4.4 反応分

- DNase I stock solution 44 μ l
- Buffer RDD 308 μ l

7. 350 μ l の Buffer RW1 をスピンカラムにのせる。ふたを閉め、13,000rpm で 30 秒間遠心する。カラムを素通りした液を捨てる。

8. スピンカラムに 500 μ l の Buffer RPE (エタノール添加済) を添加し、ふたを閉め、13,000rpm で 30 秒間遠心し、カラムを素通りした液を捨てる。さらに、スピンカラムに 500 μ l の Buffer RPE (エタノール添加済) を添加し、ふたを閉め、13,000rpm で 2 分間遠心する。

9. スピンカラムを新しい 2ml コレクションチューブに移し、ふたを閉め、16,000rpm で 1 分間遠心する。この操作によって、カラムに残った Buffer RPE を完全に除く。

10. スピンカラムを新しい 1.5 ml コレクションチューブにセットし、50 μ l の RNase フリー水を添加し、ふたを閉めて、13,000rpm で 1 分間遠心することによって、RNA を

溶出する。

ii) RNA の定量

1. 溶出した RNA 溶液を新しいエッペンに、1.5 μ l 分注する。

2. NanoDrop を用いて、吸光スペクトルをとる。

ソフトを起動後、“Nucleic Acid”→“RNA”で測定。ブランクは、RNA の溶出に用いた水 1.0 μ l でとる。測定にも RNA 溶液を 1.0 μ l 使用する。260 nm のサンプルの吸光度を濃度計算に用いる。A₂₆₀/A₂₈₀ の値が 2.0 程度であれば、純度の高い RNA が抽出されていると考えられる。また、A₂₆₀/A₂₃₀ の値が 2.0 以下の場合、グアニジン塩やその他の不純物の混入が疑われる。

- RNA conc. (ng/ μ l) = A₂₆₀ x 40

- スペクトルを見て、230 nm に谷があるか？

※230 nm にはっきりした谷が見られない場合は、RNeasy を用いて RNA の Cleanup を行う。

iii) バイオアナライザを用いた total RNA の品質チェック

※あらかじめヒートブロックを 70°C に設定しておく。

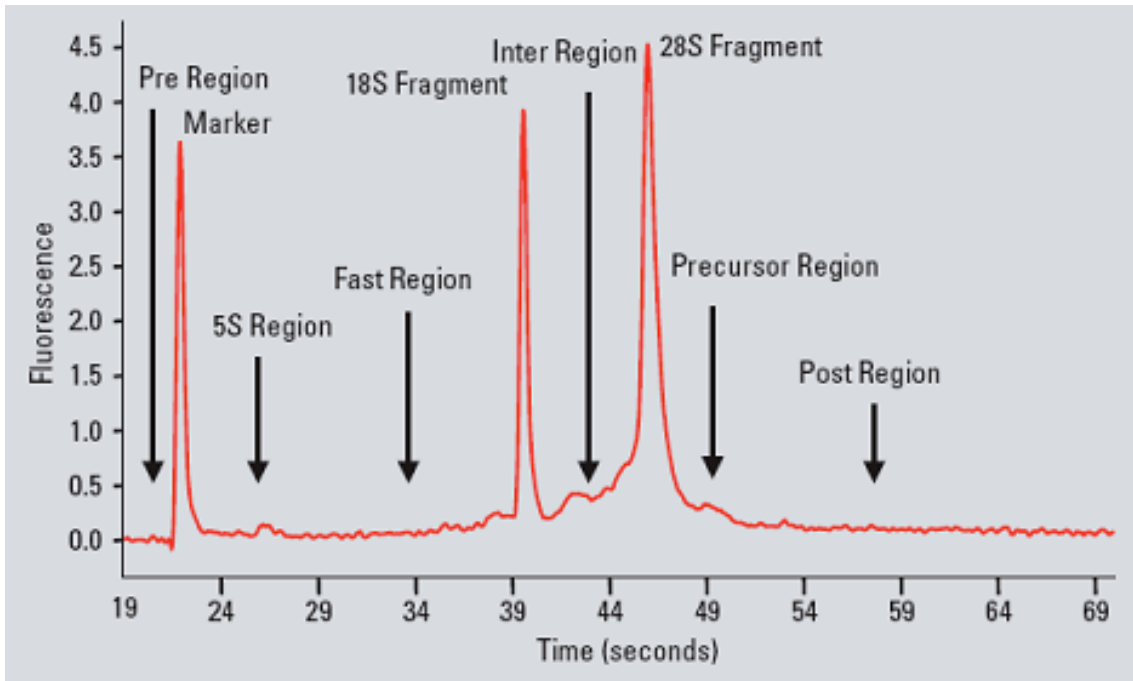
1. 溶出した RNA 溶液 1.5 μ l を別のエッペンに分取し、70°C で 2 分間熱変性する。

2. 氷上で急冷する。

3. マニュアルに従って、操作する。Eukaryote total RNA のモードで測定する。

4. 以下の点に注して結果をみる。

- 28S リボソーム RNA と 18S リボソーム RNA の比が約 2:1 になっているか？
- 28S リボソーム RNA と 18S リボソーム RNA の間に分解物によるピークはあるか？
- 18S リボソーム RNA の前に分解物によるピークはあるか？



※RNA の品質をみる指標: RIN (RNA Integrity Number)
 1~10 の値をとる。10 が非分解。

〈2日目〉

※あらかじめウオーターバスを 40°C に、ヒートブロックを 65°C に設定しておく。

i) total RNA からの cDNA 合成

1. 250 ng の total RNA 量をラベル化に用いるので、使用する total RNA 溶液の容量を計算しておく。

※今回の実習では、下記の 2~5 は事前に行っているなので、準備された 3rd 希釈液を渡す。

2. 37°C のウオーターバスで、Spike-Mix を溶かす (5 分程度)。

3. 2 μ l の Spike-Mix に 38 μ l の Dilution Buffer を加え、ボルテックスで混合する (1st 希釈液)。スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集める。

4. 2 μ l の 1st 希釈液に 48 μ l の Dilution Buffer を加え、ボルテックスで混合する (2nd 希釈液)。スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集める。

5. 2 μ l の 2nd 希釈液に 18 μ l の Dilution Buffer を加え、ボルテックスで混合する (3rd 希釈液)。スピンドウンしてチューブの蓋、壁に付いた液を集める。

6. total RNA 溶液 x μ l、T7 Promoter primer 0.6 μ l、3rd 希釈液 2.5 μ l、水 y μ l を混合し、全量 5.75 μ l の T7 Promoter Mix を調製する。

7. 65°C で 10 分間、熱変性させる。

7. 熱変性をさせている間に、cDNA マスターミックスを調製する。ここで用いる 5x First Strand Buffer は、あらかじめ 80°C のウオーターバスで 3-4 分間温め完全に溶かし、室温に置いておく^{注1)}。2 μ l の 5x First Strand Buffer、1 μ l の 0.1 M DTT、0.5 μ l の 10mM dNTP mix の順に加えていく^{注2)}。混ぜ終わったら、室温に置く。

注 1) 今回の実習ではあらかじめ温めておいた Buffer を使用する。氷にささないこと。

注 2) 4 班分まとめて作製する。

4.4 反応分

- | | |
|--------------------------|-------------|
| • 5x First Strand Buffer | 8.8 μ l |
| • 0.1 M DTT | 4.4 μ l |
| • 10mM dNTP mix | 2.2 μ l |

8. 7を氷上で急冷。そのまま5分間置く。

8'. 氷上で冷やしている間に、7のエッペンに0.5 µlのMMLV-RTと0.25 µlのRNase Inhibitorを加える。混ぜ終わったら、室温に置く^{注)}。

注) 4班分まとめて作製する。

4.4 反応分

- MMLV-RT 2.2 µl
- RNase Inhibitor 1.1 µl

9. 8で急冷していたエッペンに、8'で調製したcDNAマスターミックス4.25 µlを入れ、ピペッティングでよく混合する。

10. 40°Cのウオーターバスで、2時間インキュベーションする。

ii) Cy-3 ラベル化 cRNA の合成

1. エッペンをウオーターバスから取り出し、65°Cで15分間インキュベーションして、反応を停止する。

1'. 反応停止中に、Transcription Master Mixを調製する。50% PEGは粘性を低下させるために、65°Cのヒートブロックで温めておき、ボルテックスでよく混合し、室温に置いておく。7.65 µlの水、10 µlの4xTranscription Buffer、3 µlの0.1 M DTT、4 µlのNTP、3.2 µlの50% PEGをボルテックスでしっかり混合する^{注)}。

注) 4班分まとめて作製する。

4.4 反応分

- RNase フリー水 33.66 µl
- 4xTranscription Buffer 44 µl
- 0.1 M DTT 13.2 µl
- NTP 17.6 µl
- 50% PEG 14.08 µl

2. 1のエッペンをウオーターバスから取り出し、氷で急冷し、5分間氷上に置く。

2'. 1'のエッペンに、0.25 µlのRNase Inhibitor、0.3 µlのInorganic Pyrophosphatase、0.4 µlのT7 RNA Polymerase、1.2 µlのCy3-CTPを加え、ピペッティングで穏やかに混合する^{注)}。

注) 4 班分まとめて作製する。

4.4 反応分

• RNase Inhibitor	1.1 μ l
• Inorganic Pyrophosphatase	1.32 μ l
• T7 RNA Polymerase	1.76 μ l
• Cy3-CTP	5.28 μ l

3. 2 のエッペンに Transcription Master Mix を 30 μ l 加え、混合する。

4. 40°C のウォーターバスで、2 時間インキュベーションする。このとき、ウォーターバスにアルミホイルをかぶせて遮光する。

iii) Cy-3 ラベル化 cRNA の精製

RNeasy を用いて精製する。今回は遠心を 4°C で行うことに注意。

1. ウォーターバスからエッペンを取り出し、スピンドウンする。60 μ l の水を加えて液量を 100 μ l にする。
2. 350 μ l の Buffer RLT を加え、混合する。
3. 250 μ l の 100% エタノールを加えた後、溶液が均一になるまで十分にピペッティングで混合する。遠心はしない。
4. 2 ml コレクションチューブ中にセットした RNeasy スピнкаラムにサンプルをアプライし、ふたをして、13,000 rpm で 30 秒間遠心する。
5. カラムを新しいコレクションチューブに移し、500 μ l の Buffer RPE (エタノール添加液) を加える。ふたを閉め、13,000 rpm で 30 秒間遠心し、カラムを素通りした液を捨てる。
6. コレクションチューブはそのまま使用し、カラムに再度 500 μ l の Buffer RPE (エタノール添加液) を加え、ふたを閉め、13,000 rpm で 1 分間遠心する。
7. カラムを新しい 1.5 ml チューブに移し、30 μ l の水をカラムの中央に添加して、ふたを閉め、1 分間静置する。13,000 rpm で 30 秒間遠心することで、cRNA を溶出する。
8. 溶出した cRNA 溶液は、-80°C で保存する。

〈3 日目〉

i) NanoDrop を用いた cRNA の分析

1. NanoDrop のソフトウェアを起動し、”Microarray Measurement”のタブを選択する。
2. 1.5 μl の水 1. NanoDrop のソフトウェアを起動し、”Microarray Measurement”のタブを選択する。
2. 1.0 μl の水でブランクを取る。
3. 1.0 μl の cRNA 溶液を測定する。
4. cRNA 濃度、Cy3 濃度は、NanoDrop で測定された値を用いる。cRNA の収量と Cy3 取り込み効率を計算する。

$$\bullet \text{ cRNA yield } (\mu\text{g}) = \text{cRNA conc. (ng}/\mu\text{l}) \times 30 (\mu\text{l}) / 1000$$

$$\bullet \text{ Cy-3 incorporation (pmol } / \mu\text{g}) = \text{Cy-3-CTP conc. (pmol } / \mu\text{l}) \times 1000 / \text{cRNA conc. (ng } / \mu\text{l)}$$

※cRNA の収量が 1.65 μg 以上、Cy-3 の取り込み効率は 9 pmol / μg 以上あれば OK。

ii) バイオアナライザを用いた cRNA の分析

1. 1.5 μl の cRNA を別のエッペンに取り、70°Cのヒートブロックで2分間熱変性する。
2. 1 μl をバイオアナライザの測定に用いる。
3. 以下の操作は1日目と同様。mRNA のモードで測定する。

※ ラベル化サンプルのシグナルの大部分が、200 から 2000 塩基長に位置していることを確認する。

iii) 断片化

※ヒートブロックを 60°Cに設定する。

※ハイブリダイゼーションオープン を 65°Cに設定する。

1. Cy-3 ラベル化 cRNA を 1.65 μg 分 (x μl)、11 μl の 10 x Blocking Agent、2.2 μl の

25 x Fragmentation Buffer、水を加えて最終量を 55 μ l にする。緩やかにボルテックスをして十分に攪拌する。

2. 60°Cのヒートブロックで 30 分間インキュベーションする。30 分を超えないように注意する。

3. 直ちにサンプルを氷上に移し、1 分間冷却する。その後、速やかに、断片化を停止するために、55 μ l の 2 x GE Hybridization HI-RPM を加え、ピペットマンでゆっくりと液を混合する。泡を立てないように注意する。

4. 13,000 rpm、1 分、室温で遠心する。

5. サンプルは氷上に置いておく。

iv) ハイブリダイゼーション

※バーコードラベルに”Agilent”の文字が入っている面にプローブが載っている。

※スライドガラスを取り扱う際は手袋をはめて、縁を注意深くもって取り扱う。スライドガラスの表面には両面とも決して触らない。

※ハイブリダイゼーション、洗浄のステップでアレイを乾燥させないように注意する。

1. ガasketスライドのプラスチックカバーの端をつまみ、ゆっくりとはがす。ガasketスライドをパッケージから取り出す。スライドの縁以外に触れないように注意する。

2. チャンバベースの上に、ガasketスライドを”Agilent”の文字が書かれている面を上にし、裏からアレイ面全体がみえるような向きにのせる。ほこり等がつかないように素早くセットする。

3. iii)で調製済みのハイブリダイゼーション溶液をガasketスライド上に 100 μ l アプライする。ハイブリダイゼーション溶液がガasketのふちまで広がらないように、ガasketの中央部分にアプライする。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（面積が揃うように）、ゆっくりと均等に液を配置する。

4. マイクロアレイスライドをアレイ面（Agilent と書かれている面）を下にして、チャンバベースにセットされているガasketスライド上に載せる。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。チャンバベースの 4 つの突起部分を参考にして、マイクロアレイスライドは水平に保ったままガasketスライドにのせる。

※アレイをセットした後は、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注意する。

5. アレイスライドを載せた後は、すぐにチャンバカバーをチャンバベースの上にセットする。
6. クラップアセンブリを、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る。手でスクリューをしっかりと締める。
7. 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全面に行き渡るようにする。次に、チャンバ内の泡が自由に動くことができるか確認する。泡が動かない場合は、チャンバを軽く手に打ち付けて衝撃を与え、固定している泡やハイブリ液が行き渡らない部分がないようにする。また、小さい泡は途中で止まってしまうことがあるので、六角レンチでたたいて泡を一つにまとめる。
8. 予め65°Cにセットしたオープンローターに、両端をしっかりと固定して差し込む。バランスのとれる位置にチャンバをセットしていく。
9. 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に設定する。
10. 65°Cで17時間ハイブリダイゼーションする。

※ハイブリダイゼーションの時間は17時間±15分。

v) 洗浄の前準備

1. Wash Buffer 1 と 2 に 2 ml の 10% Triton X-102 を加える。
2. 中蓋、外蓋をきっちり戻して、5、6回転倒混和して、注意深くしっかりと混ぜる。
3. 中蓋、外蓋を外し、Buffer に添付の蛇口を取り付ける。
4. 洗浄前日から、Wash Buffer 2 とスライドガラス洗浄用のガラス容器1個を37°Cで保温しておく。

※洗浄に使用するガラス容器やラック、回転子等は、使用後に洗剤を使わず水洗いする。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るため。

〈4日目〉

※乾燥状態のアレイ上では、空気中のオゾンにより、蛍光の退色が起こるため、洗浄、

乾燥、スキャンは簡易式オゾンクリーンブース内で行う。洗浄を始める 30 分位前に、オゾンクリーンブースを ON にしておく。

i) スライドガラスの洗浄

1. ハイブリダイゼーションチャンバの分解を始める前に、全ての洗浄 Buffer とディッシュの準備を行う。

ガラス容器 1: 洗浄 Buffer 1 ガasketの解体用

ガラス容器 2: 洗浄 Buffer 1 スライドラックと回転子を中に入れておく

ガラス容器 3: 洗浄 Buffer 2 回転子を中に入れておき、37°Cに設定したスターラー付き恒温槽に入れる。

※ 2以降は1スライドずつ行う。

2. ハイブリオープンからチャンバを取り出す。泡が自由に動いているか確認する。

3. 室温に置く時間が長くなると、ハイブリ液の湿っている部分と気泡の部分でシグナル強度に差異が生じるので、チャンバはすぐに解体する。

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る。

b. クランプアッセンブリを外し、チャンバカバーを取り除く。

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す。このときスライドの両端をしっかりと持つようにする。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 Wash Buffer 1 に浸ける。

※ スライドガラスを扱うときは、バーコード部分かスライドガラスの縁を持つようにする。

4. 2枚のスライドを2本のピンセットで挟み、立てる。

5. バーコード側のピンセットを2枚のスライドガラスの間に入れ、アレイ面を傷つけないようにガasketスライドをはがす。

6. 両手でスライドガラスをしっかりとはさみ、ガラス容器 2 の中のラックに運ぶ。

7. 残りのチャンバも同様に解体する。

※スライドガラスをラックに差し込むときは、洗浄効率を保つために、端は3つ以上、

スライドガラス間は2つ以上あける。全てのスライドでアレイ面 (Agilent と書かれている面) がラックの中心を向くように揃える。

8. 全てのアレイがラックにセットできたら、中程度の回転数 (表面に渦、アレイが動く程度の回転数) で、室温のまま1分間、攪拌する。

9. スライドラックを37°Cの Wash Buffer 2 にすばやく移す。中程度の回転数で1分間攪拌する。

※この洗浄時間は厳守。

10. Wash Buffer 2 からスライドラックを取り出す。このとき、スライドラックを平行に保ち、スライド上に水滴が残らないように注意しながら、5-10秒かけて引き上げる。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する。

11. スライド上に水滴が残っている場合は、エアダスターで飛ばす。

ii) 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分前までにスキヤナの電源を入れる。PCを起動した後にスキヤナの電源を入れ、スキヤナコントロールソフトを立ち上げる。

1. スライドをスライドホルダにセットする。その際、裏が露出するような向きでセットする。

2. スライドホルダをカローセルにセットする (Hにはスライドを入れない)。

3. 画面下の”Scanner status”が『Scanner ready』になっていることを確認する。

4. スライドを入れたスロット番号を、”Start slot”と”End slot”で指定する。

5. “Profile”リストから、『AgilentHD_GX_1Color』を選択する。

6. スキャン設定を確認し、“Scan Slot n-m”をクリックしてスキャンを開始する。

※ 設定

- Dye Channel : Green
- Scan Region : Agilent HD
- Scan Resolution : 5 μm

- TIFF file dynamic range : 20bit
- R/G PMT gain : 100%
- XDR ration : No XDR

ii) スキャン画像の確認

※以降は情報基盤センター1階大演習室2でおこなう。事前にセンター1階の受付に学生証を持参して教育用計算機システム (ECC システム) のパスワードを受け取り、ログインできるか確認しておくこと。

1. 講師がスキャン画像 (TIFF 形式) を配布するので各自コピーする。
 - 画像はダブルクリックで開ける。拡大してスポットを確認してみる。
 - 4つの角には、位置と方向を検出できるように特別なスポットが配置されている。
 - スポットの間隔はどのくらいの長さか。
 - 1つの区画にだいたい何個のスポットがあるか。

iii) 数値化

※ 数値化はスキャナ付属の PC で講師が行う。手順のみ以下に示す。

1. Feature Extraction という数値化ソフトを用いてスポットの検出・数値化をおこなう。
 - Grid Template: 014850_D_F_20080627
(Whole Human Genome Microarray 4x44K アレイ)
 - FE Protocol: GE1_105_Dec08
(Gene Expression, 1色法)

2. 数値化 (数分かかる) の結果 (TEXT 形式) を配布するので各自コピーする。

iv) Excel による数値化データの確認

1. 数値化データを Excel で開く。
 - 開く → すべての読み込み可能なファイル → 数値化データを選択 → 開く
 - 設定画面がでるが、とくに変更せず「完了」を選択して開ける。
 - まず、コントロール (サンプル1) を開いてみる。
2. 内容の確認。
 - それぞれの列の意味は、下の表を参照。
 - もっとも発現量のシグナルが高いプローブを5個あげよ。ただしポジコンのプローブは除く。
 - どのような遺伝子か。

- ・プローブはそれらの遺伝子のどこにハイブリダイズすると考えられるか。

列の名称	値の例	説明
FeatureNum	33780	フィーチャ (スポット) 番号
ControlType	0	0 → 遺伝子のプローブ 1 → ポジコンのプローブ -1 → ネガコンのプローブ
ProbeName	A_24_P213503	プローブ名
SystematicName	NM_006504	遺伝子のアクセッション番号
gProcessedSignal	2.05E+00	発現量の数値、gはgreenのこと。 2色法ではrProcessedSignalという列もできる。
gIsWellAboveBG	1	シグナルがバックと区別できる程度に高いか。 今回は1となっているものを解析の対象にする。

v) 参考

1. 遺伝子の検索 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 - ・ Search 「Nucleotide」 で遺伝子名やアクセッション番号から検索可能。
 - ・ 数値化データにあるアクセッション番号から遺伝子名を調べてみる。
 - ・ 各自思いつく遺伝子のアクセッション番号を調べ、発現量を調べてみる。
2. プローブの配列 : 講師が配布するので各自コピーすること。
 - ・ プローブが遺伝子のどの場所とハイブリダイズするのか調べてみる。

〈5日目〉

i) Excelによる解析

1. 全サンプルのデータを1つのワークシートにまとめる

行番号とプローブ番号の関係は、どのサンプルも同じ。したがってサンプルXのデータの隣にサンプルYのデータをコピー&ペーストすれば1枚のワークシートにまとまる。上記を繰り返して、全サンプルの **gProcessedSignal**, **ControlType**, **gIsWellAboveBG** の値を1枚のワークシートにまとめる。

2. 発現量が少なくアレイで検出できなかったものは、**gIsWellAboveBG** の値が0となっている。今回は、全てのサンプルで **gIsWellAboveBG** の値が1となっているもののみを解析の対象とする。また、**ControlType** が0以外のものはコントロールのプローブなので、解析の対象からはずす。各自、関数を利用したり「並べ替え」機能を用いて解析の対象となる行を抽出すること。

3. X-Yプロット

サンプルXの **gProcessedSignal** の値(以下、X)を横軸、サンプルYの **gProcessedSignal** の値(以下、Y)を縦軸にプロット。

4. MAプロット

$\log_{10}(XY)$ を横軸、 $\log_2(Y/X)$ を縦軸にプロット。

- ・縦軸が0とはどういう意味か。
- ・縦軸が1とはどういう意味か。
- ・縦軸が-1とはどういう意味か。

5. 解析

replicate間(例: サンプル1対サンプル2)でX-YプロットおよびMAプロットを作成。

- ・fold changeが1以上のものはいくつか。
- ・fold changeが-1以下のものはいくつか。
- ・fold changeが0.1以上のものはいくつか。
- ・fold changeが-0.1以下のものはいくつか。

control-miRNA間(例: サンプル1対サンプル3)でX-YプロットおよびMAプロットを作成。

- ・fold changeが1以上のものはいくつか。
- ・fold changeが-1以下のものはいくつか。
- ・fold changeが0.1以上のものはいくつか。
- ・fold changeが-0.1以下のものはいくつか。

1'. アレイ間の normalization (参考)

アレイ間の全体的なシグナル強度の差を補正するために必要な操作で、方法もいくつかあるが、ここでは75%tile法でおこなう。

各サンプルごとに、コントロールを除く全プローブでの発現量の値を順番に並べ替え、順位75%に位置するもの(発現量が高いほうから数えて25%目の遺伝子)の値を求める。この75%tileの値は通常サンプルごとに異なるが、それらの相乗平均値 a を求める。各サンプルごとに、全プローブの値に ($a /$ そのサンプルにおける75%tile 値) を掛ける。全サンプルで75%tileの値を a に揃える。

ii) GeneSpring GXによる解析

1. データの読み込み

GeneSpring GX を起動

Create new project → 適当な名前をつける

Create new experiment

Experiment name → 適当な名前をつける

Experiment type → Agilent Single Color

Workflow type → Advanced Analysis

Experiment notes → 空欄でも可

Load Data → Choose Files から数値データ (TXT) を全部選択

Use spot information in data files to flag the data のみにチェック。以下推奨設定。

Feature is not positive and significant → Absent

Feature is not Uniform → Marginal

Feature is not above background → Absent

Feature is Saturated → Marginal

Feature is population outlier → Absent

Normalization algorithm → Quantile

Baseline Options → Do not perform baseline transformation

2. replicate の指定

画面右側の Experiment Setup タブ → Experiment Grouping → Add Parameter

Parameter name → (例) miRNA name などと入れておく。

Samples に表示されているデータファイルに対応する miRNA の名前を、Parameter Values に入力していく (mock, miR-548c, ...)。同じ Parameter Value を入力したものが自動的に replicate として扱われる。

続いて、画面右側の Experiment Setup タブ → Create Interpretation

先ほど入力したパラメータをチェックして Next → Average over replicates in conditions がチェックされていることを確認。他は変更せず終了。この操作で、replicate 間の平均の値が算出され、以降その値を利用して解析を進めることができる。

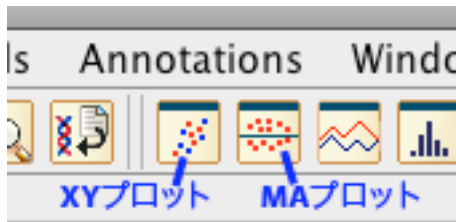
3. バックに近い値や、異常な値を除去

画面右側の Quality Control タブ → Filter Probesets by Flags → Next

at least [8] out of 8 samples have acceptable values

=1 サンプルでも Absent と判定された値があるものは除外。

4. X-Yプロット、MAプロットを、Excelと同様に作成する。



※GeneSpring GXにおける MA プロットでは、たとえば X-Axis に miR-548c、Y-Axis に mock を選択すると、miR-548c のサンプルで増加している遺伝子が上方 (> 0) に、減少している遺伝子が下方 (< 0) にプロットされる。

5. 注目している遺伝子の抽出

遺伝子 (アクセッション番号) リストを読み込み、その遺伝子に色をつける。

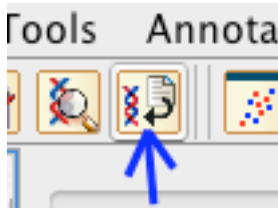
遺伝子リストの例 :

```
Accession
NM_003380
NM_014616
NM_000368
NM_177402
.....
```

1 行目にタイトル、2 行目以降にアクセッション番号を 1 行につき 1 個記載。

上記をテキストファイルに保存する。

Import entity list from file ボタンを押す。



Choose file → 遺伝子リストのテキストファイルを選択

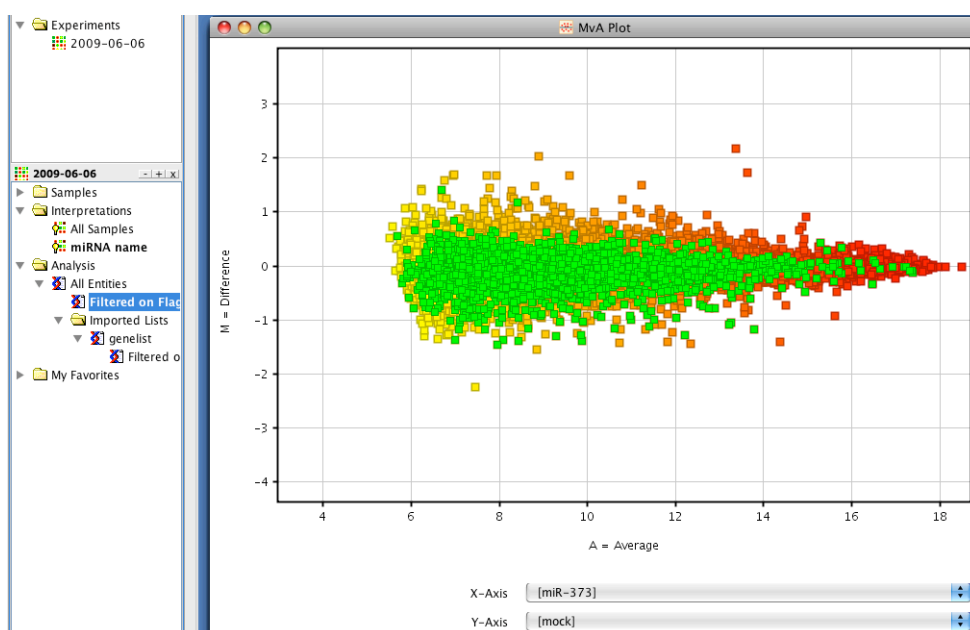
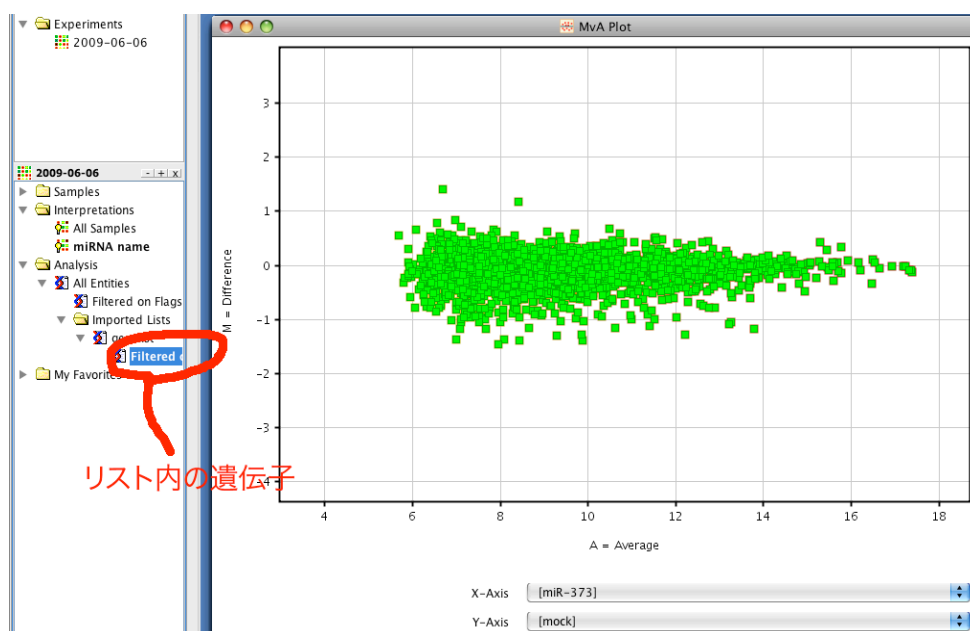
Choose file column to match → 読み込ませた遺伝子リストの1行目

Choose technology column to match → GenBank Accession

(アレイのプローブ ID や遺伝子名など、他の項目のリストを読むことも可能)

画面左側の Analysis フォルダ内に Imported Lists フォルダができ、その中に読み込んだリストが保存されている。それを選択すると、リスト内の遺伝子のみがプロットされる。この状態で、「3. バックに近い値や、異常な値を除去」と同じ操作をおこなう。

すべての点を選択した状態で、All Entities 内の Filtered on Flags Present or Marginal を選択すると、全体のなかでリスト内の遺伝子がどこにプロットされているかわかる。



6. miRNA の seed 部分(*)と相補的な配列が 3'UTR に存在する遺伝子は、miRNA の標的となりうることが報告されている。今回の実験でそのような遺伝子が抑制されているか検証せよ。

iii) 参考

1. miRBase <http://microrna.sanger.ac.uk/>
miRNA のデータベース。

2. 入力した配列を 3'UTR にもつ遺伝子 (アクセッション番号) のリストを表示するページ : <http://atlas.RNAi.jp/seedmatch/>

〈6日目〉

i) アガロースゲル電気泳動による total RNA のチェック

1. total RNA 1 μg 相当と等量以上の RNA loading buffer を加えてよく混ぜる。
2. 65°Cで5分間インキュベートする。
3. 氷上で急冷し、5分間インキュベート。
4. 0.5×TBE-1%アガロースゲルで電気泳動をおこなう。
4. エチジウムブロマイドで30分間染色。
5. UVトランスイルミネーターでバンドを確認する。

ii) データ解析

1. 空き時間を利用して、各自情報基盤センター1階の自習室で解析の続きをする。