

マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

担当：程研究室

【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。siRNA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】

●RNAi とオフターゲット効果

RNA interference (RNAi) とは、二本鎖 RNA が、それと相補的な配列をもつ mRNA を配列特異的に切断することで遺伝子の発現を抑制する現象である(図1)。その機構は、ヒトやマウスを含む哺乳類から線虫、ショウジョウバエなど多くの生物種で保存されており、簡便に遺伝子機能を抑制する手法として広く利用されている。線虫やショウジョウバエでは、数百塩基長の長い二本鎖 RNA を用いて RNAi を誘導できるが、哺乳類細胞では、そのような長い二本鎖 RNA が細胞に入るとインターフェロン応答と呼ばれる自己防御機構がはたらき細胞死が引き起こされてしまう。そのため、哺乳類細胞で RNAi を誘導するときには、一般的に、長さ 21 塩基程度の二本鎖 RNA (small interfering RNA; siRNA) が用いられている。また、哺乳類細胞では、RNAi による遺伝子発現抑制の程度は、siRNA の配列によって大きく異なることが知られている。

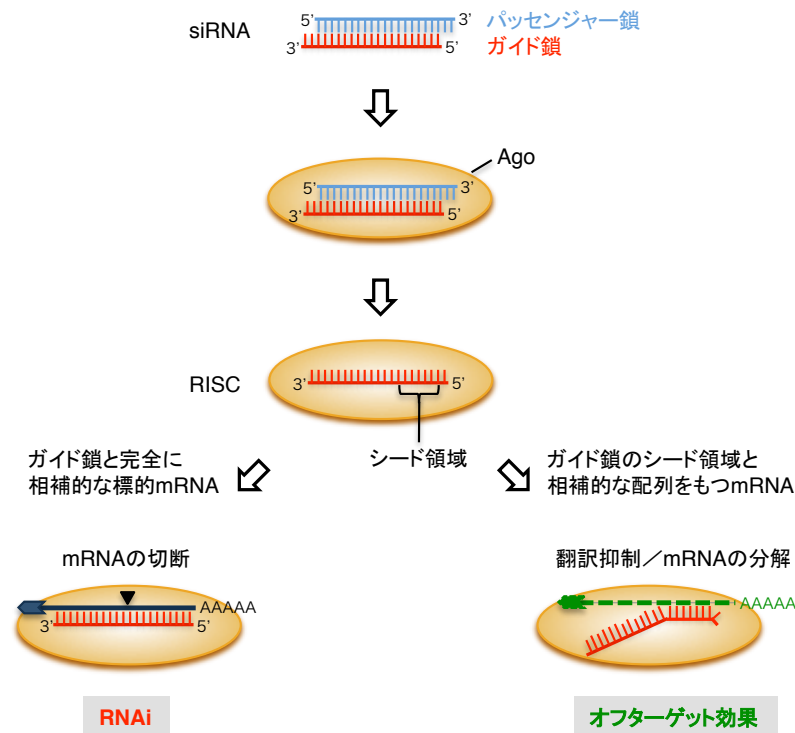


図1 RNAi とオフターゲット効果

細胞に導入された siRNA は、Argonaute (Ago) タンパク質に取り込まれた後、どちらかの鎖が除去され、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成する (図1)。そして、RISC 中のガイド RNA と完全に相補的な配列をもつ標的 mRNA が、Ago タンパク質のもつ触媒活性により切断され、標的遺伝子の発現が抑制される。

さらに、RNAi において、標的遺伝子だけでなく、siRNA のシードと呼ばれる領域 (ガイド鎖の 5' 末端から 2~8 塩基目の領域) と相補的な配列をもつ多数の mRNA 群に対しても抑制効果が認められ、オフターゲット効果と呼ばれている。オフターゲット効果による遺伝子抑制の程度は siRNA のシード領域の塩基配列によって大きく異なるが、その主要な決定要因は、シード領域が、それと相補的な RNA と塩基対合するときの対合エネルギーの強さであることが明らかになっている。すなわち、対合エネルギーが大きいシードをもつ siRNA はオフターゲット効果が強く、対合エネルギーが小さいシードをもつ siRNA はオフターゲット効果が弱い。

今回の実習では、ビメンチンを標的とした siRNA (siVIM-270) 及び siVIM-270 のガイド鎖のシード領域に化学修飾を導入した siRNA を用いて、siRNA が標的とするビメンチンの発現量及びオフターゲット効果の程度に、どれくらいの相違が生じるのかを、マイクロアレイを用いて網羅的に解析する。用いた化学修飾の構造、及び siRNA の配列は、それぞれ図2、3に示した。

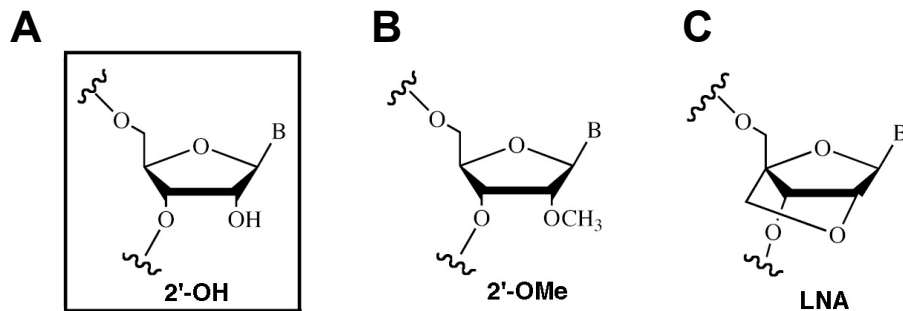
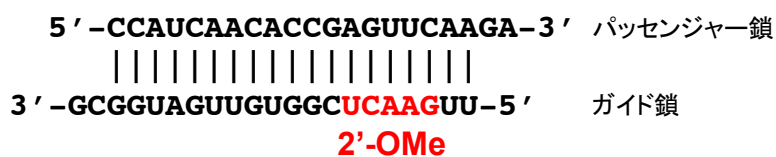
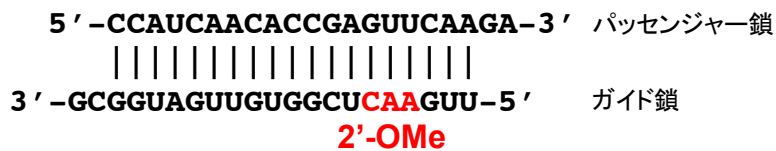
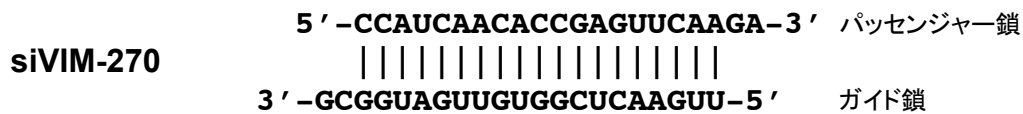


図2 本実習で細胞に導入した2本鎖RNAに用いた糖鎖修飾の構造
A, 未修飾RNA B, 2'-O-Methyl (2'-OMe) C, Locked Nucleic Acid (LNA)



化学修飾
siVIM-270

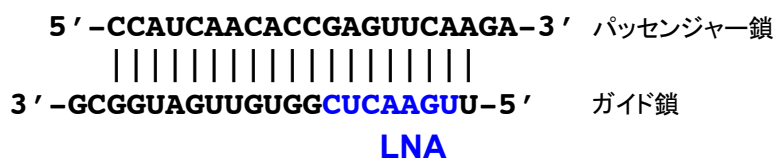
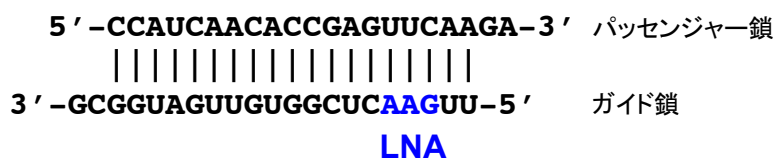
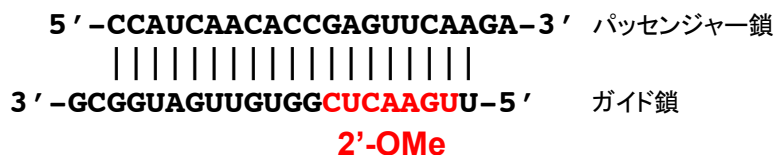


図3 siVIM-270 の配列と化学修飾を導入した位置
色をつけた部位に表記の修飾を導入した。上から順番に、未修飾 siVIM-270、2'OMe 修飾を導入した siVIM270-2'OMe-3、siVIM270-2'OMe-5、siVIM270-2'OMe-7、LNA 修飾を導入した siVIM270-LNA-3、siVIM270-LNA-7 を示した。

●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4)。なお、今回の実習に用いるアジレント社の SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K ver.2.0 には、1 区画あたり 60mer の合成オリゴ DNA が約 60000 プローブ載っている。

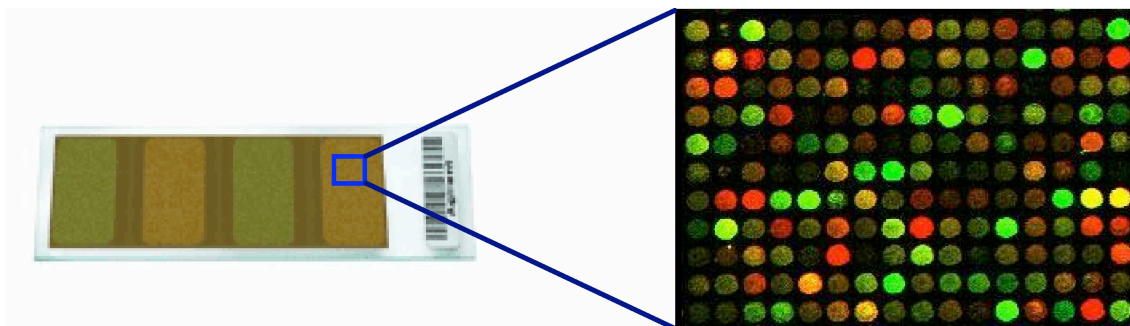


図4 マイクロアレイとスポットの拡大図

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5に示した。

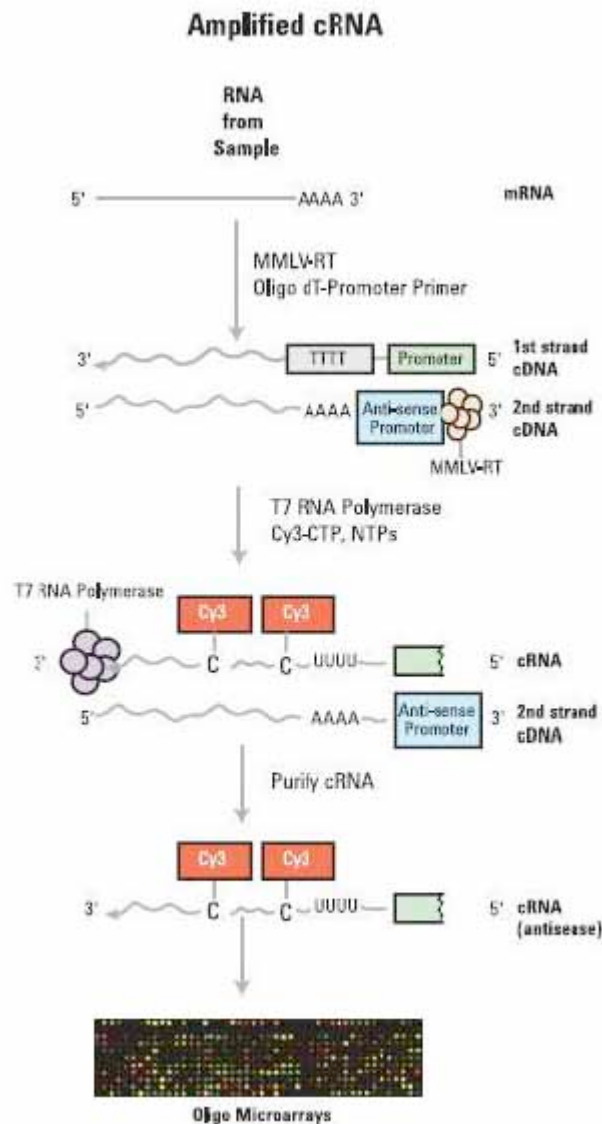


図5 ラベル化反応の概略図

【用意するもの、機器等】

SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K ver.2.0, 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
 8 x 15K フォーマット用消耗品 (ガasket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】

4日目～6日目（6月12、16、17日）は、情報基盤センター1階大演習室2で実習を行う。ECCS のシステムには共通 ID を用いてログインできるので、実習初日に各自ログインできることを確認しておくこと。パスワードが不明の場合や利用実績がなく手続きが必要な場合は、情報基盤センターの窓口で所定の手続きをすること（申請の翌日に通知書が発行される）。また、マイクロアレイの結果の解析に GeneSpring GX を使うが、容量が 1.5GB 必要なので、事前に容量に空きをつくっておくこと。

〈1日目〉 6月9日（火）

- ・ 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〉 6月10日（水）

- ・ 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
- ・ スライドガラスを扱う練習

〈3日目〉 6月11日（木）

- ・ Cy-3 ラベル化 cRNA の精製

- ・ Cy-3 ラベル化 cRNA の品質チェック
- ・ 断片化
- ・ ハイブリダイゼーション開始

※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〉 6月12日 (金)

- ・ スライドガラスの洗浄～スキャニング～数値化 (教員が12日午前に行う)
- ・ データ解析 (情報基盤センター1階大演習室2)

〈5日目〉 6月16日 (火)

- ・ データ解析 (情報基盤センター1階大演習室2)

〈6日目〉 6月17日 (水)

- ・ データ解析 (情報基盤センター1階大演習室2)

【手順】

〈実験の前準備〉

24 穴プレートで培養している HeLa 細胞に、Lipofectamine 2000 Reagent を用いて、以下をトランスフェクションした。

- mock (トランスフェクション操作のみを行ったもの)
- siVIM-270 (RNA) (50 pmol/well)
- siVIM-270-2'OMe-3 (2'OMe3) (50 pmol/well)
- siVIM-270-2'OMe-5 (2'OMe5) (50 pmol/well)
- siVIM-270-2'OMe-7 (2'OMe7) (50 pmol/well)
- siVIM-270-LNA-3 (LNA3) (50 pmol/well)
- siVIM-270-LNA-7 (LNA7) (50 pmol/well)

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、350 μ l の Buffer RLT に溶解した細胞溶解液を 1 つずつ配布する。

- mock → 「 mock-1 (1 班)」「 mock-2 (5 班)」
- RNA → 「 RNA (2 班)」
- 2'OMe3 → 「 2'OMe3 (3 班)」
- 2'OMe5 → 「 2'OMe5 (4 班)」
- 2'OMe7 → 「 2'OMe7 (6 班)」
- LNA3 → 「 LNA3 (7 班)」
- LNA7 → 「 LNA7 (8 班)」

2. 350 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、10~20 回のピペッティングが必要。目で見ても、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 スピンカラムにサンプルを全量アプライし、ふたをして、13,000 rpm で 1 分間遠心して、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. 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 1 分間遠心し、カラムを素通りした液を捨てる。

5. 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

6. 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 1 分間遠心する。カラムを素通りした液を捨てる。

7. 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 1 分間遠心し、カラムを素通りした液を捨てる。

8. 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、13,000rpm 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、2.5 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 2.0 μ l でとる。測定にも RNA 溶液を 2.0 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。

$$\bullet \text{ RNA conc. (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 40$$

• 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。

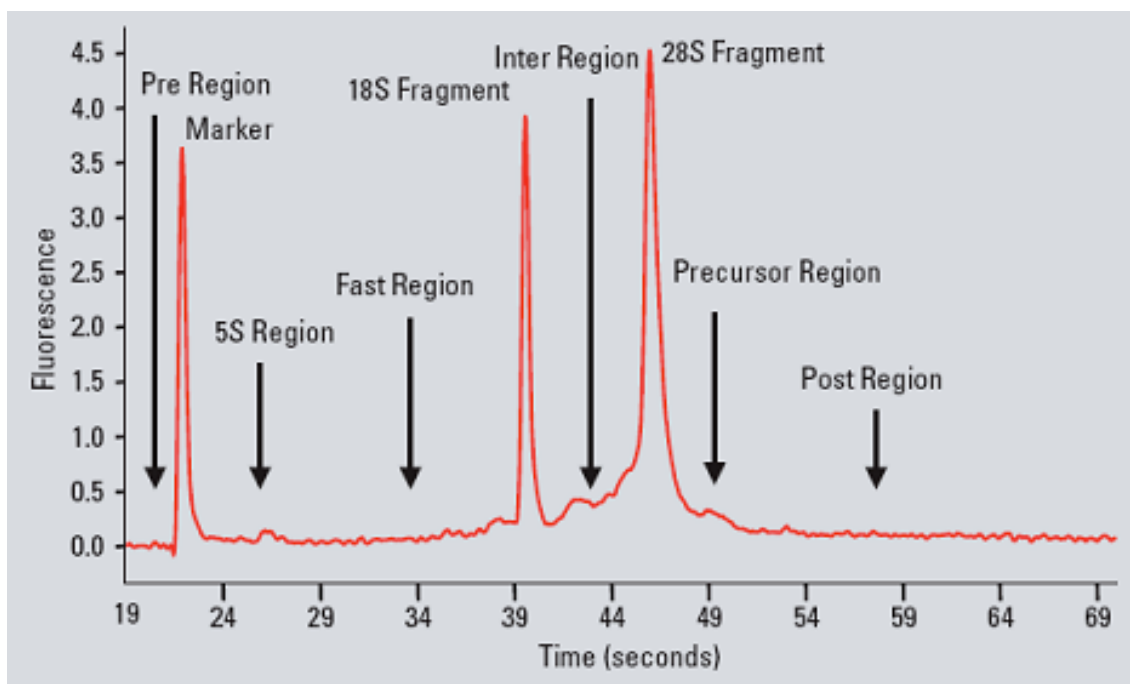
1. 溶出した RNA 溶液 3 μ l を別のエッペンに分取し、70°C で 2 分間熱変性する。

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のので、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. 3 μ l の 2nd 希釈液に 27 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) 9 班分まとめて作製する。

9 反応分

- 5x First Strand Buffer 18 μ l
- 0.1 M DTT 9 μ l
- 10mM dNTP mix 4.5 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) 9班分まとめて作製する。

9 反応分

- MMLV-RT 4.5 µl
- RNase Inhibitor 2.25 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) 8班分まとめて作製する。

9 反応分

- RNase フリー水 68.85 µl
- 4xTranscription Buffer 90 µl
- 0.1 M DTT 27 µl
- NTP 36 µl
- 50% PEG 28.8 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) 9 班分まとめて作製する。

9 反応分

- RNase Inhibitor 2.25 μ l
- Inorganic Pyrophosphatase 2.7 μ l
- T7 RNA Polymerase 3.6 μ l
- Cy3-CTP 10.8 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。

※ 2 日目はここまで。インキュベーション後のサンプルは教員が回収する。

〈3日目〉

i) 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1分間遠心する。

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 (エタノール添加剤)を加える。ふたを閉め、13,000rpm で1分間遠心し、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 (エタノール添加剤)を加え、ふたを閉め、13,000rpm で1分間遠心する。

7. ろ液を捨てた後、スピнкаラムふたを閉め、13,000rpm で1分間遠心する。

8. 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。

9. 溶出した cRNA 溶液は、氷上で保存する。

ii) NanoDrop を用いた cRNA の分析

1. 2.5 μl の cRNA 溶液を分注する。
2. NanoDrop のソフトウェアを起動し、“Microarray Measurement”のタブを選択する。
3. 2.0 μl の水でブランクを取る。
4. 2.0 μl の cRNA 溶液を測定する。
5. 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。

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

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

※ Cy-3 の取り込み効率は 9 pmol / μg 以上あれば OK。

iii) バイオアナライザを用いた cRNA の分析

1. 3 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ブンを 65°Cに設定する。

1. Cy-3 ラベル化 cRNA を 0.6 μg 分 (x μl)、5 μl の 10 x Blocking Agent、1 μl の 25 x Fragmentation Buffer、水を加えて最終量を 25 μl 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、25 µl 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 40 µl 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. クラップアッセンブリを、チャンバベースの丸くなっているコーナー側から差し込み、完全にストップする位置まで移動させる。手でスクリューをしっかり締める。
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スケット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にセットしたオーブンのローターに、両端をしっかり固定して差し込む。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ブンの扉を閉め、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 ガスケットの解体用

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スケットスライドをはがす。

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

※以降は情報基盤センター1階でおこなう。ログインできるか確認しておくこと。