

## Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit (Clontech 社 K1037-1) による RNA 間接標識法

### A. cDNA の合成と精製

※あらかじめヒートブロックを下記の温度にそれぞれセットしておくこと。

(70°C、48°C、37°C)

※微量遠心機の温度設定は EtOH 沈殿の際は 4°C、スピンドアウンの際は室温とする。

※試薬類は全て氷上で溶かすこと。

※これはアレイ 1 セット分 (2 枚 1 セット) のプロトコールである。

※以下の操作は Cy 3、Cy 5 それぞれのチューブを用意し、行うこと。

1. 以下の試薬を混合し、サンプル数プラス 1 サンプル分の Master Mix を作成する。作成後は室温下においておく。

|                                         |       |
|-----------------------------------------|-------|
| 5×cDNA Synthesis Buffer                 | 10ul  |
| 10×dNTP Mix                             | 5ul   |
| Deionized H <sub>2</sub> O              | 7.5ul |
| MMLV Reverse Transcriptase(200units/ul) | 2.5ul |
| <hr/>                                   |       |
| total 量                                 | 25ul  |

**※MMLV Reverse Transcriptase は加える直前に-30°Cから取り出し、使用後は直ちに戻すこと。**

2. 1.5ml チューブに以下の試薬を混合して反応液を作成し、その後スピンドアウンする。

|                            |      |
|----------------------------|------|
| mRNA                       | 2ug  |
| Deionized H <sub>2</sub> O | 4ul  |
| Control RNA                | 10ul |
| Random Nonamer Primer      | 5ul  |
| Oligo-(dT)25               | 5ul  |
| cDNA Synthesis Control     | 1ul  |
| <hr/>                      |      |
| total 量                    | 25ul |

3. 70°Cで 5 分間加熱する。
4. 3.を 48°Cまで冷却して 1.の Master Mix 25ul を加えて混合し、スピンドアウンする。
5. 48°Cで 30 分間インキュベートする。
6. 70°Cで 5 分間インキュベートした後スピンドアウンする。

7. 6.を 37℃まで冷却して RNase H(10units/ul)を 0.5ul 加え、ピペティングにて十分に混和する。
8. 37℃で 15 分間インキュベートした後スピンドウンする。
9. 0.5M EDTA(pH 8.0) 0.5ul と Quick Clean 樹脂 5ul を加えてボルテックスにて 1 分間しっかりと混合する。その後スピンドウンする。
10. 0.45um の Spin Filter を付属の採集用チューブにセットして、9.を Spin Filter に全て移す。微量遠心機にて最大速度(15,000rpm)で 1 分間遠心する。
11. Spin Filter を取り除き、10.の採集用チューブに 3M Sodium Acetate 5.5ul を加え、ボルテックスにて攪拌する。
12. 氷冷した 100% EtOH 137.5ul を 11.に加え、ボルテックスにて攪拌する。
13. 14.を-20℃のフリーザー内に 1 時間おき、cDNA を沈殿させる。
14. 4℃に設定した微量遠心機にて最大速度(15,000rpm)で 20 分間遠心する。
15. 上清を取り除き、70% EtOH を加えて最大速度(15,000rpm)で 5 分間遠心し、ペレットを洗浄する。
16. ペレットを風乾もしくは遠心濃縮機を用いて乾燥させ、2×Fluorescent Labeling Buffer 10ul を加えてしっかりと溶解させる。

**※このとき他のバッファーを使用しないこと。**

**※2×Fluorescent Labeling Buffer を加えたらすぐにセクション B に進むこと。**

## B. 蛍光色素のカップリング

※微量遠心機の温度設定は 4℃とする。

※色素は Amersham Pharmacia 社の Cy<sup>TM</sup>3 monofunctional reactive dye (PA23001) 及び Cy<sup>TM</sup>5 monofunctional reactive dye (PA25001) を使用すること。

**※色素に添付されているプロトコールは使用しないこと。**

**※キットに同梱されている DMSO のみを使用し、他メーカーの DMSO を独自に使用しないこと。**

1. A.16.の cDNA サンプルに、Coupling Reaction Control Oligo 0.5ul を加える。
2. 色素容器(Amersham Pharmacia Cy3 または Cy5)にキット内の DMSO 45ul を直接加えてしっかりとボルテックスで攪拌し、5mM の蛍光色素のストック溶液を調整する。  
この DMSO/色素混合液は密封・遮光して-20℃に置いておけば 1～2 ヶ月間保存できる。
3. 1. の cDNA サンプル 10.5ul に 2.の DMSO/色素混合液 10ul を加える。十分に混ぜ、

暗所・室温下に 30 分置いてインキュベートする。その後スピンドウンする。

4. 3M Sodium Acetate 2ul と 100% EtOH 50ul を加えてボルテックスにて混合する。
5. 4.を遮光して-20℃のフリーザー内に 2 時間置き、標識プローブを沈殿させる。
6. 4℃に設定した微量遠心機にて最大速度(15,000rpm)で 20 分間遠心する。
7. 上清を取り除き、70% EtOH を加えて最大速度(15,000rpm)で 5 分間遠心し、ペレットを洗浄する。
8. ペレットに Deionized H<sub>2</sub>O 100ul を加え、しっかりと溶解する。

### C. NucleoSpin<sup>R</sup> カラムによるプローブ精製

※微量遠心機の温度設定は室温（20～25℃）とする。

※使用前に Buffer NT3 に 95% EtOH を 4：1 の割合で加えておくこと。

1. B.8.に Buffer NT2 400ul を加え、充分に混合する。
2. NucleoSpin Extraction Spin Column を 2 ml のコレクションチューブにセットし、1. をスピнкаラムにロードする。最大速度(15,000rpm)で 1 分間遠心し、フロースルー液を廃棄する。
3. スピнкаラムを再び 2.のチューブにセットし、Buffer NT3 700ul を加える。最大速度(15,000rpm)で 1 分間遠心し、フロースルー液を廃棄する。
4. 3.をもう一度繰り返す。
5. スピнкаラムを再びセットし、最大速度(15,000rpm)で 1 分間遠心して Buffer NT3 のキャリーオーバーを完全に除去する。
6. スピнкаラムを新しい 1.5ml チューブにセットし、Deionized H<sub>2</sub>O 50ul を加えて 1 分間放置する。その後、最大速度(15,000rpm)で 1 分間遠心する。これをもう一度繰り返す。

※ この精製プローブは遮光して-20℃で保存すれば数ヶ月間安定である。

7. Cy 3 と Cy 5 の精製プローブを 1 本のチューブにまとめ、遠心濃縮機を用いてドライアップする。

### D. ハイブリダイゼーション

※あらかじめヒートブロックを下記の温度にそれぞれセットしておくこと。

(95℃、70℃)

※微量遠心機の温度設定は室温（20～25℃）とする。

1. C.7.に Deionized H<sub>2</sub>O 9ul を加え、しっかりと溶解する。
2. 95°C・暗所にて 4 分間加熱する。
3. 氷上・暗所にて 30 秒間急冷し、スピンドウンする。
4. OligoA80(1mg/ml) 6ul を加え、ピペッティングにてしっかりと混合してスピンドウンする。
5. 70°C・暗所にて 45 分間インキュベートし、スピンドウンする。
6. 軽く温めておいた ExpressHyb 45ul を加え、ピペッティングにて気泡をたてないように緩やかに混合してスピンドウンする。  
\*この際、気泡ができてしまったときは軽く温めたあとスピンドウンする。
7. カバーガラスとスライドガラスの表面に付着したほこりをエアードスターなどで取り除き、6.の半量(30ul)を 1 枚目のスライドガラスの端に滴下してカバーガラスを静かにかぶせる。この際、気泡ができないように注意する。また、一度かぶせたカバーガラスは動かしたりしないこと。
8. 6.の残り半量(30ul)を 2 枚目のスライドガラス上に滴下し、同様にしてカバーガラスをかぶせる。
9. タッパーなどの密閉できる容器にキムタオルやスポンジを置いて 60°C くらいのお湯をたっぷりとしみ込ませる。その上に台座を乗せ、7. 8.のスライドガラスをおいた後容器のふたをしっかりと閉めて密閉状態にする。
10. 60°C・暗所・加湿状態（ハイブリオーブンを使用）にて 4 時間ハイブリダイズさせる。

#### E. スライドガラスの洗浄

※あらかじめ 2 種類の洗浄液（1×SSC,0.2%SDS 及び 0.1×SSC,0.2%SDS）を 55°C に温めておくこと。

※ハイブリオーブンの温度を 55°C に設定しておくこと。

※プレート遠心機の温度設定を室温（20～25°C）にしておくこと。

1. 黒色のウォッシュボックスと口の広い容器（タッパーなど）に温めておいた 1×SSC,0.2%SDS を多めに入れておく。
2. 1. のタッパーに D.10. のスライドガラスを浸してカバーガラスを剥がし、1. のウォッシュボックス内のスライドガラス用ラックに均等に入れていく。ふたをしっかりと閉めて遮光状態にし、55°C で 10 分間穏やかに振とうする。  
※カバーガラスが剥がれにくい場合はウォッシュ液の中にしばらく浸しておく

と剥がれやすくなる。

3. 清浄なウォッシュボックスに温めておいた  $0.1\times\text{SSC}$ ,  $0.2\%\text{SDS}$  を入れ、その中に 2. のラックを移しふたを閉めて遮光状態にし、 $55^{\circ}\text{C}$ で 10 分間穏やかに振とうする。
4. 清浄なウォッシュボックスに温めておいた  $0.1\times\text{SSC}$ ,  $0.2\%\text{SDS}$  を入れ、その中に 3. のラックを移しふたを閉めて遮光状態にし、 $55^{\circ}\text{C}$ で 10 分間穏やかに振とうする。
5. 清浄なウォッシュボックスに  $0.1\times\text{SSC}$  を入れてその中に 4.のラックを移し、ラックを 10 回程度上下させてスライドガラスを洗浄する。
6. 5.の洗浄液を取り替えて、もう一度スライドガラスを洗浄する。
7. 清浄なウォッシュボックスにミリQ水を入れてその中に 6.のラックを移し、ラックを 5 回程度上下させてスライドガラスをリンスする。
8. プレート遠心機内のバケットに適当な大きさのキムタオルなどを敷いてその上に 7. のラックを乗せ、900rpm で 4 分間程度遠心してスライドガラス上の水気をとばす。
9. スキャナーにセットし、Cy 3, Cy 5 の二つの波長を選択してそれぞれのシグナルを検出する。