

イネ cDNA マイクロアレイ実験プロトコール

藤井 文子¹⁾*, 真保 佳納子¹⁾, 矢崎潤史¹⁾*, 岸本直己²⁾, 菊池尚志²⁾

(年 月 日受理)

- 1) 農林水産先端技術研究所 (STAFF 研究所) 研究第一部, 305-0854
茨城県つくば市大字上横場字一杯塚 446-1
- 2) 農業生物資源研究所 分子遺伝研究グループ, 305-8602 茨城県つくば市観音台
2-1-2

Synopsis

The Microarray Project of MAFF was started in April, 1999. Here we describe the protocols for cDNA microarray experiments used in the research project. This manual will provide useful information to help researchers understand and perform microarray experiments.

Key words: Microarray, Gene expression, Transcription, Functional genomics, Protocol, cDNA, Rice, *Oryza sativa*

目 次

緒 言.....	2
I. マイクロアレイとは.....	3
1. マイクロアレイと DNA チップ.....	3
2. cDNA マイクロアレイ実験の概略.....	3
II. cDNA マイクロアレイプロトコール集.....	4
1. マイクロアレイ作製のための cDNA 調製.....	4
(1) 大腸菌 MTP (Micro Titer Plate) の準備.....	4
(2) ヒットピッキング.....	5
(3) プラスミド抽出.....	5
(4) 抽出したプラスミドの電気泳動によるチェック.....	6
(5) PCR.....	6
1) 抽出インサート全長の PCR による増幅.....	6
2) 3'UTR の PCR による増幅.....	6
(6) PCR 産物の精製	7
(7) 精製 PCR 産物の電気泳動による確認.....	7

* 現：農業生物資源研究所 分子遺伝部, 305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

(8) 精製 DNA の濃度調整.....	7
-----------------------	---

(9) 精製 DNA サンプルの 96MTP から 384MTP への移し替え.....	8
2 . スポッターの使用法.....	8
3 . マイクロアレイ実験に用いる RNA の調製について.....	10
4 . ターゲットの調製.....	10
(1) 一色蛍光法.....	10
(2) 二色蛍光法.....	12
5 . ハイブリダイゼーション.....	13
6 . スライドガラスの洗浄.....	13
7 . スキャニング.....	14
(1) Array Scanner GenerationIII でスキャンする場合.....	14
(2) FLA-8000 でスキャンする場合	15
8 . 画像データの数量化.....	16
(1) Array Gauge (Windows 版 , FUJIFILM の解析ソフトウェア)	16
(2) MicroArray Suite (Mac 版 , M&S 機器の解析ソフトウェア)	19
(3) ArrayVision (Windows 版 , Molecular Dynamics の解析ソフトウェア)	22
9 . その他.....	25
謝 辞.....	27
摘 要.....	27
参考文献.....	27
引用文献.....	27
Summary.....	28

緒 言

ゲノム研究は、近年、技術的な進歩と共に、急速な進展を見せている。現在までに、原核微生物から真核高等生物に至る諸生物で、ゲノム DNA の一次構造が決定されてきた。最も重要な農作物の一つであるイネについても、農林水産省農業生物資源研究所と農林水産先端技術研究所の共同研究プログラム「Rice Genome Research Program」が中心となって、ゲノム構造の解明を推進している。また、ゲノム構造解明の進展に伴い、新規遺伝子や機能未知遺伝子が数多く存在することが明らかになってきた。こうした背景のもと、最近になって、大量の遺伝子に関する転写レベルでの機能を短時間のうちに解析できる、“マイクロアレイ”と呼ばれる技術が開発された。農林水産省では、1999年4月より、21世紀グリーンフロンティア研究「遺伝子発現モニタリング手法を用いたイネ・ゲノム有用遺伝子の機能解明」(略称：マイクロアレイプロジェクト)を開始した。2000年度現在、マイクロアレイプロジェクト参画研究グループは、農林水産省の研究機関に加え、公立研究所・国立大学その他、私立大学・企業を含めて、計64グループに達している。筆者らは、マイクロアレイプロジェクトで使用される cDNA マイクロアレイの作製・利用に関するシステムを構築してきた。本稿は、本プロジェクトにおけるマイクロアレイ実験の基本的な作業手順を紹介したものであるが、本プロジェクト構築過程で

の経験から得られたノウハウも含まれている。この小編が、本プロジェクト参画者やマイクロアレイに興味を持つ研究者のための“マイクロアレイ実験の手引き”、或いは、マイクロアレイ実験に対する理解の一助、となれば幸いである。

本グループでは、マイクロアレイプロジェクトのウェブサイトを開設した (<http://microarray.rice.dna.affrc.go.jp/>)。マイクロアレイ実験のフローチャートや、機器類等の写真など、本稿には掲載されていない情報が参照出来る。本編を読み進めるに当たって、このウェブサイトを参照して頂ければ、本稿の内容がより容易になるはずである。

1. マイクロアレイとは

1. マイクロアレイと DNA チップ

一般に、DNA を直接スライドガラス等の上にスポットした（張り付けた）ものが、マイクロアレイと呼ばれている。本稿で紹介するのは、cDNA クローン（もしくは、そのインサート部分の PCR 産物）をスライドガラスにスポットした cDNA マイクロアレイである。

一方、DNA チップとは、ガラス等の支持体上で合成された約 25 塩基のオリゴヌクレオチドをプローブとして有するものである。

（マイクロアレイと DNA チップという名称は、ほぼ同義語、或いは、一方が他方を包含する関係にある名称、として使用されることがある。なお、本稿では、これ以降、DNA チップについては触れない。）

2. cDNA マイクロアレイ実験の概略

マイクロアレイ実験には、「2つの流れ」があり、これが後に「1つの流れ」となる（ウェブサイト参照）。「2つの流れ」とは、cDNA マイクロアレイを作製する過程と、解析用サンプル RNA を調製・加工する過程、即ち、研究対象の生物から RNA を抽出・精製・蛍光標識する過程である。前者の過程では、大量の DNA クローンを扱うために、ロボットシステムの使用など、殆どの作業が、通常スケールの実験とは異なってくる。一方、後者の過程における作業は、質的にも量的にも、通常の分子生物学・分子遺伝学的実験と大差ない。

そして、これら「2つの流れ」の産物が、共に一つの実験過程で供試される。すなわち、前者の過程で作製されたマイクロアレイと、後者の過程で調製されたターゲット*（蛍光標識された核酸**）とのハイブリダイゼーションが行われる。

この後、スキャナーでマイクロアレイ上の蛍光シグナルが測定され、蛍光強度を反映した画像データとして記録され、更に画像データが数量化データに変換される。最終的に、数量化データを用いて、サンプル間における転写レベル・転写パターンの変動が比較解析される。

*なお本稿では、サンプル RNA から調製した蛍光標識核酸を、「ターゲット」と称する。この場合、マイクロアレイ上の cDNA は、「プローブ」と呼ばれる。（研究者によっては、これらの呼称を正反対に用いる場合がある。）

** 本稿でも後段で紹介するが、一般に、マイクロアレイ実験における“サンプル RNA の標識（ラベリング）”とは、“サンプル RNA と蛍光色素を用い、逆転写酵素反応によって、**蛍光標識された cDNA を合成すること**”である。もちろん、サンプル RNA のなかには、解析対象生物で発現していた多数の遺伝子から由来した mRNAs が含まれており、従って、ここで蛍光標識された cDNA は、多数の遺伝子から由来した cDNAs の集団である。

つまり、

ターゲット

= 解析サンプル RNA から合成された蛍光標識 cDNAs

= 解析対象生物で発現していた多数の遺伝子からの cDNAs 集団（蛍光標識済み）

ということである。（II. 4. を参照）

II. cDNA マイクロアレイプロトコール集

緒言でも述べたように、このプロトコール集は、農林水産省マイクロアレイプロジェクトで使用されている、イネの独立 9000cDNA クローンを利用したマイクロアレイの作製・使用を念頭において作られたものである。本研究グループによる実際の作業手順を基に作られているため、異なるシステムに応用するためには、或る程度の変更や工夫が必要になると思われる。これらのことを念頭に置きつつ、以下、読み進めて頂ければ幸いである。

1. マイクロアレイ作製のための cDNA 調製

マイクロアレイ作製に必要な cDNA クローンを調製するためには、多くの行程、すなわち、大腸菌のレプリカ作製、レプリカ大腸菌から独立クローンのヒットピック、プラスミド抽出 PCR、PCR 産物の精製、電気泳動、濃度測定・調整、96MTP から 384MTP への移動等が存在するが、特別難しい行程は無い。しかしながら取り扱うクローン数が非常に多く、それぞれの DNA 量も多いため、作業の効率・精度を高めるには様々な工夫をすることが重要である。以下、手作業の場合と、自動システム（ルールロボットシステム「ジェネシス」テカン社製）の場合とを併記する。

（1）大腸菌 MTP (Micro Titer Plate) の準備

スタートサンプルは、イネ発現遺伝子群（EST：網羅的に単離・解析された cDNA クローン）が導入された 4 万以上の大腸菌クローンである。（イネ発現遺伝子群はプラスミド pBluescript にクローニングされており、大腸菌株 NM522 が形質転換に用いられた。保存形態は、グリセロールストックである。）

まずはじめに、これまでに RGP (Rice Genome research Program) で得られた全オリジナルクローンが保管されている独立型 DWP* (Deep Well Plate) 約 500 枚から、それぞれ 2 枚の MTP にコピー（約 500 枚 2 セット：それぞれを、マザーコピー、ワーキングコピーと称する）を作

製した MTP への培地の分注は、手作業の場合、電動デジタルピペット(EP-250 / RAININ) と M トレイ -1 (ステム/P01MSD) と BM-8-1200 用チップ (BM 機器/126-96RS) を使用し、各ウェル 140 μ l ずつ分注した。培地には 1/2TBE (6% グリセロール含有) を使用した。培地分注後、オートクレーブ滅菌済みのレプリカ作成用 96 連スタンプ (MS 機器) を使用し、植菌を行った (火災滅菌再使用はせず、1 回植菌毎にオートクレーブ滅菌を行う。即ち、レプリカ作成用 96 連スタンプ 1 回使用で 1 個の独立型 DWP のコピーを行う)。自動システムの場合 NewProtocol1 を使用してこれら一連の行程を行う。コピー後 MTP はシールなしでフタだけをした後、ラップで 2 重に包み 37 度で 1 晩静地培養した。包み方が悪いと、蒸発して培地が無くなってしまうので注意する。

次のヒットピッキング行程には、ワーキングコピーを使用する。マザーコピーは -80 $^{\circ}$ C 保存し、極力使用しない。

[* RGP のオリジナルクローンは、独立型 DWP (845-TPS, QSP 社) に保管されている。しかし、このタイプの DWP では、各 well がそれぞれ独立したチューブになっているため、1000 μ l tip を使用してコピー作製をする際、tip を上下させる行程で、独立したチューブが tip と共に上下してしまい、とすると、チューブが DWP から外れて倒れたり、その中のクローンがこぼれたりする危険が生ずる。従って、ブロック型 DWP (2ml アッセイブロック 96 ウェル, coster 社/cat. No. 431140) の使用を推奨する。また MTP には Microtiter plate (Falcon/3072) を使用している。]

(2) ヒットピッキング

一晩静地培養したワーキングコピー (500 牧) から、マイクロアレイに使用するユニーククローン (約 9000 クローン MTP 96 枚分) を選抜し、それらを、ユニーククローン用 MTP (Destination MTP) へ並び替える行程である。先ず、前項と同様の方法で、Destination MTP へ培地の分注を行い、手作業の場合は、滅菌した爪楊枝でユニーククロンのウェルに触れた後、順序に従って Destination MTP へ立てて行く。自動システムの場合は、Worklist を使用して本行程を行う。Destination MTP の培養は、前項と同様の方法で一晩静地培養する。

(3) プラスミド抽出

Destination MTP (ユニーククローン MTP) の各クローンからプラスミドを抽出する行程である。手作業の場合、まず培地を 1 ml ずつ、連続分注器 (ディストリマン GILSON) を使用して DWP (2ml アッセイブロック 96 ウェル (coster/431140)) に分注する。次に、レプリカ作成用 96 連スタンプを用いて、一晩静地培養した Destination MTP から DWP へコピーを取り、その DWP を Airpore Tape Sheet (QIAGEN) でシールした後、一晩 37 度で振とう培養する。一晩培養した DWP を 30min, 3000rpm (ベックマン Allegra6RK) で遠心し、上清除去後 DWP をひっくりかえしたまますばやくキムタオル上で残りの培地を吸い取る。プラスミド抽出にはキアゲンの QIAprep96Turbo Mini prep Kit を使用した (詳細は当キット取扱説明書参照)。抽出したプラスミドは DWP に回収した (キアゲンのキット付属の回収プレートよりも扱いやすい)。自動システムの場合 NewProtocol3 を使用して本行程を行う。

ここで抽出された各クローンのプラスミドは、後の行程で PCR テンプレート用に使われるが、

各大腸菌クローンからのダイレクトPCRを行っても良く、特に問題は無い。我々の場合は、クローン配布用に各クローンのプラスミドが必要であるため、プラスミド抽出を行っている。

(4) 抽出したプラスミドの電気泳動によるチェック

電気泳動には、日本エイドー社製のゲノム解析用泳動装置（処理能は MTP 8 枚 / 1 台）もしくはテカン社製のオート泳動システムを使用する。1 μ l のプラスミドを 1% アガロースゲル / TBE バッファーで泳動した。

(5) PCR

PCR テンプレート用に抽出したすべてのプラスミドを 10 倍に希釈し、以下の条件で PCR を行った。

1) インサート全長の PCR による増幅

我々はベクターに pBluescript を用いていることから、インサート全長を PCR により増幅させる際、1-2ng のプラスミドテンプレートに対し M13 RV primer と M4 primer (TAKARA) を使用している。

反応系は以下の通り。

10 $\times$ バッファー	5 μ l
25mM MgCl ₂	5 μ l
2mM dNTP mixture	5 μ l
20 μ M M4 primer	1 μ l
20 μ M RV primer	1 μ l
Plasmid template (1-2 ng / 抽出プラスミドを 10 倍希釈したもの)	
	x μ l (他の試薬の濃度・液量により適宜変える)
Taq polymerase	0.25 μ l
Water	y μ l (他の試薬の濃度・液量により適宜変える)
Total	50 μ l

注意) ロボットシステムにより PCR を行う際は、調製した反応液にミネラルオイルを 1-2 滴加える。

PCR cycle:

94 °C for 1 min

94 °C for 1 min, 60 °C for 2 min, 72 °C for 2 min (29cycles)

72 °C for 10 min

2) 3'UTR の PCR による増幅

RGP では EST マップ構築のために、ユニーククローンの 3'UTR を基に設計した、Upper primer

と Lower primer を作製している（遺伝子特異的プライマーセット：呉・前原ら，準備中）．これらを有効に利用すると共に、マイクロアレイに用いられた EST クローンのうち，未だ遺伝子特異的プライマーのないものについては同様のプライマーセットを設計・作製し，3'UTR の PCR による増幅を行っている．増幅サイズは平均約 250 bp である．（3'UTR とは，cDNA 3'端の非翻訳領域．）

反応系は以下の通り．

10 x バッファー	5µl
25mM MgCl ₂	5µl
2mM dNTP mixture	5µl
20µM Upper primer	1µl
20µM Lower primer	1µl
Plasmid template (1-2 ng)	x µl （他の試薬の濃度・液量により適宜変える）
Taq polymerase	0.25µl
Water	y µl （他の試薬の濃度・液量により適宜変える）
Total	50µl

PCR cycle :

94 °C for 1 min

94 °C for 1 min, 60 °C for 2 min, 72 °C for 2 min （29cycles）

72 °C for 10 min

（ 6 ） PCR 産物の精製

PCR 終了後，キアゲンの QIAquick 96 PCR Purification Kit 使用し，PCR 産物の精製をおこなった（詳細は添付説明書を参照）．プライマー等の除去，PCR バッファーの置換を行う（精製せずにマイクロアレイを作製すると，PCR 産物に含まれる PCR バッファーが，ハイブリダイゼーション反応を阻害する，と言われている）．

（ 7 ）精製 PCR 産物の電気泳動による確認

精製した PCR 産物すべてについて，2.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い，PCR の成否を確認した．これら精製 DNA サンプルの電気泳動には，前述の，日本エイドーのゲノム解析用泳動装置（処理能はMTP 8 枚 / 1 台）もしくはテカン社のオート泳動システムを使用する．

（ 8 ）精製 DNA の濃度調整

精製 PCR 産物を分光光度計（測定波長 OD₂₆₀）により濃度測定し，200 fmol / µl に濃縮または希釈する．希釈は精製の際の溶出バッファーを使用し，濃縮は 60 °C の加熱により行う．その後，精製 DNA を reagent D (DMSO reagent / Amersham Pharmacia 社)と以下の比率で混合（DNA+water : D reagent = 1 : 1 になるように）．

DNA 48 μ l
D reagent 162.5 μ l
Water 114.5 μ l

(9) 精製 DNA サンプルの 96MTP から 384MTP への移し替え
濃度調整後，reagent D との混合が終了した精製 DNA サンプルを，384MTP (GENETYX) に移し替える．その理由は，アレイスポッターが 384MTP (GENETYX) 仕様であるため．この移し替えには，ピペットマンもしくは 96 ピンタイプの分注器を用いている．

2 . スポッターの使用法

当研究グループでは，Array Spotter GenerationIII (Amersham Pharmacia) を用いている．

使用前の準備：

スポッターがクリーンブース内に設置されている場合，クリーンブース内のほこりを取り除くためファンを回しておく．また，湿度を一定にするため (55%程度)，加湿または除湿を行っておく．

スポッターの廃液ボトル内の液を捨てておく．また，MilliQ 水，100% EtOH，0.2M KOH のボトルにそれぞれの試薬を，スポッター内部の加湿用タンクに MilliQ 水を，補充しておく．

注意：

*** スポッター用のペンセット (pen set) の先端を乾燥させない．** 1 つのペンセットには，1 2 本の微細キャピラリーペンが直線上に並んで付いている．ペンの先端を乾燥させると，目詰まりを起こしやすくなる．

*** バーコードシールが曲がっているスライドガラスや傷のあるスライドガラスは，スポッティングに使用しない．**

- (1) スポッターに接続している窒素ポンベの栓をあける．その後スポッター本体横にある白い弁を開けてスポッターに窒素を供給する．(スポッター本体横にある NITROGEN のメーターが 9 psi の値を指すまでポンベの栓をゆるめる．)(この加圧窒素は，スポッティングピンの洗浄の際，ピンの乾燥のために使われる．)
- (2) バキュームポンプのスイッチを入れ，スポッター本体横にある VACUUM のメーターが 25Hg の値を指すまで待つ．(この陰圧により，Slide Tray [後述] に置かれたスライドガラスを，スポッティングの際に固定・保持する)
- (3) スポッターに接続しているコンピュータにインストールされているソフトウェア "GenerationIII Array Spotter Control" を起動して，スポッターをイニシャライズする．(イニシャライズ中にマウス，キーボードなどに触れると，スポッターのアーム等が暴走し部品が損傷する可能性があるため，触れないようにする．)
- (4) メニュー画面になったらまず，Humidity Control ボタンを ON にして，スポッター内部

が適湿（55%程度）になるよう調節する。

- (5)画面左側にある Road Slides / Platesをクリックし、小さなウィンドウを表示させる。
この状態であればスポッターのドアが開閉できる（通常、スポッターがアクティブ状態の場合にはドアは開かないようになっている）。
- (6) スポッターのアームにペンセットを取り付け、付属のねじでしっかりと固定する。また、週1回程度、Park Station (Slide Tray の左側にある) 内の MilliQ 水を交換する（スポッター起動後の停止状態時に、アームに取り付けたペンセットの先端は、Park Station 内の水中に保持される）。
- (7)スライドガラスを Slide Tray の左奥から右方向へ順に置いていく（Slide Tray には36枚分のスライドガラス用ユニット（4行×9列）がある）。スライドガラスのほこりをエアダスター等の圧縮空気で除去し、バーコード面を自分側（手前）に向けて、各ユニットの左奥角にスライドの角を合わせてセットする。（スポッティング用スライドガラスの枚数が9の倍数以外の場合は、ダミーのスライドガラスを加えて9の倍数になるようにセットする。ユニット1行分（スライド9枚分）を単位にバキューム装置が働いているので、9の倍数になっていないと、スポッティング中にスライドを固定できず、各スポット液量の不均一やスポット間隔のずれ等が生ずる。）
- (8)あらかじめスピンドウンしておいた 384 穴プレート（プローブ用 DNA 入り）を、スポッター内の左側にある Microplate Elevator へ、下から順に、プレートの A1 が右奥にくるように（プレートのバーコードを奥側に向けて）Microplate Elevator へ入れていく。プレートを全て入れ終わったら Microplate Elevator の扉を閉め、次いでスポッターのドアをしっかりと閉める。
- (9) (4)や(5)と同じ画面上にある、小さなウィンドウ内の Ready ボタンをクリックする。
- (10) 同じ画面右側にある Manual Wash をクリックしてペンセットの洗浄を行う。これを3回繰り返す。
- (11) 同じ画面のメニューOption から Spotting Parameters を選択して、Spot Diameter を 250 μ m、Spot Buffer を 30 μ m に設定する。その後 Option から Spotter Set Up を選択し、plate 数を 12、Slide 数を 36、Well Sets を 32、Spot/Dip を 72 に設定する。
- (12) 画面左側の Start ボタンをクリックし、スポッターをスタートさせる。この際、Microplate Elevator のドアが開いているなどのエラーがあった場合には、小さなウィンドウ（エラーメッセージ）が画面に現れる。エラーを解決した後、小さなウィンドウ内の Start をクリックすれば、スポッターは再始動する。384 穴プレート 12 枚分をスライドガラス 36 枚にスポッティングする場合（1 run での最大処理能力）、ほぼ4時間で終了する。[注]
- (13) Spot が終了したら、画面右側にある Manual Wash をクリックしてペンセットの洗浄を行う。これを3回繰り返す。このあと画面左側にある Road Slides / Plates をクリックし、小さなウィンドウを表示させてからドアを開ける。ペンセットと 384 穴プレートをしまい、ドアを閉めてこの状態で約1時間放置してスライドガラス上のスポットを乾燥させる。
- (14) スポットが乾いたら遮光できるスライドガラスケースに入れ、乾燥器の中に保存する。

- (15) “Generation III Array Spotter Control”を終了してスポッター本体横にある，白色の弁と窒素ポンベの栓を閉め，真空ポンプのスイッチを切る．

[注] スライドガラス上のスポットの分布：

本スポッター（12 本ペン）の最大スポッティング数は，スライド 1 枚当たり 4608 スポット X 2 反復 = 合計 9216 スポットである．この場合，1 枚のスライド上では，

（12 本のペン）X（1 本のペンで同一クロンが 2 反復）

というスポッティングパターンが，384 回繰り返されることになる．

その結果，1 枚のスライドガラス上におけるスポットの分布は，次のようになる：

24 個の Field が 12 行 X 2 列に並び；1 個の Field には，384 スポットが 12 行 X 32 列に配列している．（24 X 384 = 9216 クローン）

著者らが作製しているイネ 9000 cDNA アレイでは，スライドガラス 2 枚のほぼ全面にわたって cDNA がスポッティングされている．

3．マイクロアレイ実験に用いる RNA の調製について

マイクロアレイ実験に適した，特別な RNA の調製法というものは無い．厳密な比較検討は行っていないが，CTAB 法，グアニジン法，SDS/フェノール法など，異なる抽出方法に起因する，実験結果の差異は無いと思われる．重要なことは，（或る程度）精製度の高い RNA であること，つまり，抽出した RNA にタンパク質・多糖類・実験試薬等の不純物・不要物が残留していないこと，逆転写酵素で cDNA が作られる程度に精製されていること，である．抽出したサンプルについて，分光光度計による測定結果（ $O.D._{260} / O.D._{280}$ や $O.D._{260} / O.D._{230}$ の値）が満足のゆくものであっても，電気泳動をして（或いは，Agilent Technologies/Caliper Technologies の LabChip システムを用いて）RNA の存在と品質を確認しておくことを薦める．また，抽出・精製には，市販されている RNA 抽出用キット類（QIAGEN の RNeasy Kit 等）の利用を推奨する．

なお、マイクロアレイ実験に供するのは，total RNA でも mRNA でもよい．（次項 4．参照）一般的に、mRNA を用いた場合の方が，アレイ実験で得られる画像の蛍光強度が高い．

4．ターゲットの調製

(1) 一色蛍光法

ここでは，イネ 9000 cDNA アレイ 1 セット分（2 枚 1 組）のプロトコールを紹介する．

実験開始前の準備：

ヒートブロックの温度をそれぞれセットしておく。(37 , 42 , 70 , 95)
 ハイブリオープンを 60 にセットし、また、加湿状態にしておく。

注意事項：凍結保存している試薬類は氷上で溶かす。

- 1) 1.5ml Tube に、mRNA (もしくは total RNA) と、下記の試薬を混合して反応液を作り、スピンドウンする。

mRNA (+ dH ₂ O [*])	10μl (2μg を含む)	—
Total RNA (+ dH ₂ O [*])	—	12μl (40μg を含む)
Control RNA	10μl	10μl
Oligo-(dT) ₂₅	2μl	2μl
Random Nonamer Primer	2μl	—
Total	24μl	24μl

(* RNA が上記カッコ内の質量になる様に、RNA 濃度によっては dH₂O を加え、上記の規定容量に調整する。)

- 2) 70 で 5 分間ブレアニーリングさせる。
 3) 25 (室温) で 10 分間インキュベートした後スピンドウンする。
 4) (3) の Tube に、以下の試薬類を加えて緩やかにピペティング後、スピンドウンする。

5x Super Script buffer	8μl
0.1M DTT	4μl
dNTP mix	2μl
Cy5-dCTP	2μl
(or Cy3-dCTP)	
Super Script II	2μl
Total	18μl

* 重要：Cy-dye を加えた後は遮光すること
 * 重要：Super Script II は一番最後に加えること

- 5) 42 ・暗所で 2.5 時間反応させる。
 6) 94 ・暗所で 3 分間加熱した後スピンドウンする。
 7) 2.5M NaOH を 4 μl 加えて混ぜる。
 8) 37 ・暗所で 15 分間反応させる。
 9) 2 M HEPES を 20μl 加えて緩やかにピペティング後、スピンドウンする。
 10) QIAGEN 社の QIAquick PCR Purification Kit , 或いは、アマシャム社の GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit 等を用いて精製する。その後バキュームコンセンレーターで Dry up させる。(この際バキュームコンセンレーターを遮光し、内部を暗所にしておく)
 11) (10) に 12μl の dH₂O を加えてしっかりと溶かす。その後スピンドウンする。

- 12) 95 ・暗所で 4 分間加熱する .
- 13) 氷上・暗所で 30 秒間急冷し , スピンドアウンする .
- 14) Oligo A₈₀ (1mg/ml) を 3 µl 加えピペッティングした後スピンドアウンする .
- 15) 70 ・暗所で 45 分間反応させ , スピンドアウンする .
- 16) 軽く温めておいた Clontech の ExpressHyb 45µl を加え , 気泡をたてない様に緩やかにピペッティングし , 混合した後スピンドアウンする .

(2) 二色蛍光法

ここでは , イネ 9000 cDNA アレイ 1 セット分 (2 枚 1 組) のプロトコールを紹介する .

実験開始前の準備 :

ヒートブロックの温度をそれぞれセットしておく . (37 , 42 , 70 , 95)

ハイブリオープン を 60 にセットし , また , 加湿状態にしておく .

注意事項 : 凍結保存している試薬類は氷上で溶かす . 以下の操作は Cy3 用と Cy5 用それぞれのチューブを用意し行う .

- 1) 1.5ml チューブに以下の試薬を混合して反応液を作り , スピンドアウンする .

(mRNA もしくは total RNA を使用する。)

mRNA	10µl (contains 2µg)	
total RNA	—	10µl (contains 40µg)
Control RNA	10µl	10µl
Oligo-(dT) ₂₅	2µl	2µl
Random Nonamer Primer	2µl	—
H ₂ O	—	2µl
Total	24µl	24µl

- 2) 70 で 5 分間プレアニーリングさせる
- 3) 25 (室温) で 10 分間インキュベートした後スピンドアウンする .
- 4) 前項 3) に , 以下の試薬類を加えて緩やかにピペッティング後 , スピンドアウンする .

5x Super Script buffer	8µl
0.1M DTT	4µl
dNTP mix	2µl
Cy3-dCTP (*)	2µl
もしくは Cy5-dCTP	
Super Script II * *	2µl
Total	18µl

(*) Cy-dye を加えた後は遮光すること

(* *) Super Script II は 一番最後に加えること

- 5) 42 、暗所で 2.5 時間反応させる .

- 6) 94 、暗所で 3 分間加熱した後スピンドウンする。
- 7) 2.5M NaOH を 4 μ l 加えて混ぜる。
- 8) 37 、暗所で 15 分間反応させる。
- 9) 2 M HEPES を 20 μ l 加えて緩やかにピペティング後、スピンドウンする。
- 10) QIAquick PCR Purification KIT(QIAGEN)を用いて精製する。
- 11) 前項 10)で精製、溶出した Cy3 と Cy5 のサンプルを 1 本のチューブにまとめる。その後バキュームコンセンレーターでドライアップする。(この際バキュームコンセンレーターを遮光し、暗所にしておく)
- 12) 前々項 10)に 9 μ l の dH₂O を加えてしっかりと溶かす。その後スピンドウンする。
- 13) 95 、暗所で 4 分間加熱する。
- 14) 氷上、暗所で 30 秒間急冷し、スピンドウンする。
- 15) Oligo A80 (1mg/ml)を 6 μ l 加えピペティングした後スピンドウンする。
- 16) 70 、暗所で 45 分間反応させ、スピンドウンする。
- 17) 軽く温めておいた ExpressHyb (Clontech) を 45 μ l 加え、気泡をたてないように緩やかにピペティングで混合した後スピンドウンする。

5 . ハイブリダイゼーション

実験開始前の準備：

ハイブリダイゼーションの前に、マイクロアレイを UV クロスリンクしておく (50000 μ J/cm²)。 (UV クロスリンクをしなくても実験結果には殆ど影響がない、と言われている。) クロスリンクしたマイクロアレイは、極力早く使用し、長期保存しない。

- (1)スライドガラスとカバーガラスの表面のほこりなどを圧縮空気 (エアードスター) で除去する。前項 (16) の半量 (30 μ l) を 1 枚目のスライドガラスの端に滴下し、滴下した側の端から徐々にカバーガラスをかぶせる。(注意事項：この際、気泡が入らないように十分注意する。また、一度のせたカバーガラスを動かさないようにする。)
- (2)残りの半量 (30 μ l) を 2 枚目のスライドガラスに滴下し、同様にカバーガラスをかぶせる。
- (3)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き、60 程度のお湯をしみ込ませる。その上に台座を置き、カバーガラスをかぶせたスライドガラスを乗せる。容器の蓋をしっかりと閉めて密閉状態にする。
- (4)60 ・暗所・加湿状態 (ハイブリオープン使用) で 4 時間ハイブリダイズさせる。

6 . スライドガラスの洗浄

洗浄前の準備：

2 種類の洗浄液 (1 x SSC, 0.2% SDS と 0.1 x SSC, 0.2% SDS) を 55 に温めておく。

ハイブリオープンを 55℃ にセットしておく。

- (1) 黒色のウォッシュボックス (= スライドグラス用ラック入り, ふた付きの, 遮光可能な洗浄用の箱) へ, 55℃ に温めた 1 x SSC, 0.2% SDS を十分量入れる。
- (2) タッパーなどの口の広い容器に, 55℃ に温めた 1 x SSC, 0.2% SDS を入れる。その液中にスライドグ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ラックに手早く入れる。この際, ガラスが, ラック内となるべく等間隔になる様に入れていく。蓋をして, 55℃ ・暗黒下で 10 分間穏やかに振とうする。
- (3) 別のウォッシュボックスに, 55℃ に温めた 0.1 x SSC, 0.2% SDS を入れ, その中に (2) のラックを手早く移し。蓋をして, 55℃ ・暗黒下で 10 分間穏やかに振とうする。
- (4) 別のウォッシュボックスに, 55℃ に温めた 0.1 x SSC, 0.2% SDS を入れ, その中に (3) のラックを手早く移し, 蓋をして, 55℃ ・暗黒下で 10 分間穏やかに振とうする。
- (5) 別のウォッシュボックスに室温の 0.1 x SSC を入れ, (4) のラックを手早く移して, 液中でラックを 10 回程度上下させて洗う。
- (6) 別のウォッシュボックスに室温の 0.1 x SSC を入れ, (5) のラックを手早く移して, 液中でラックを 10 回程度上下させて洗う。
- (7) 別のウォッシュボックスに室温の MilliQ 水を入れ, その中に (6) のラックを手早く移して, 水中でラックを 5 回程度上下させてリンスする。
- (8) 室温に設定したプレート用遠心機で 900 ~ 1000rpm, 4 分間遠心して, スライドグラス上の水気を除去する。この後に, スキャンニングする。

7. スキャンニング

(1) Array Scanner GenerationIII でスキャンする場合

このスキャナー (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia) には, スライドグラス用カートリッジと, カートリッジをセットするためのマガジンが付属しており (ウェブサイトの写真参照), これらを用いてスライドグラスをスキャンニングする。

- 1) スキャナー, コンピューターの順に電源を入れて, 立ち上げる。
- 2) ソフトウェア "Array Scanner Control" を起動して, スキャナーをイニシャライズする
- 3) イニシャライズ終了後, スキャナーから, マガジンを取り出す。
- 4) スライドグラス上のほこりを, エアダスターなどで取り除く。
- 5) スライドカートリッジを, Ω 字型の切り込みが手前, スライドストッパーが左側になるように, 一方の手で保持し, ストッパーのすぐ手前のバネを押しながら, スライドグラスを所定の位置にセットする。この際, スポット面を上, バーコードを Ω 型切り込みと反対側にする。
- 6) カートリッジを, スポット面を上にしてマガジンに入れる。カートリッジは, マガジンの最下段からサンプル番号順に入れていくのが望ましい (スキャンニングは, マガジン最下段から始まるため)。
- 7) i) マニュアルモードでスキャンする場合

"Array Scanner Control"の初期画面で、Scanner Mode を Manual にする。

"File"メニューから、"Scan Set up"を選ぶ。この画面で、Slide Area から Full Slide を選択し、次いで Scan Parameters (使用波長、スキャンする範囲、どのスライドガラスをスキャンするか等)を設定する。Done ボタンをクリックすると初期画面に戻る。スタートをクリックする。セーブウィンドウが表示されるので、画像データをセーブするファイル名を入力し、OK ボタンをクリックするとスキャニングが始まる。

ii) オートモードでスキャンする場合

"Array Scanner Control"の初期画面で、Scanner Mode を Auto にする。そのままスタートボタンをクリックすると、スキャニングが始まる。この場合、自動的にガラス全体のスポットが2波長 (Cy5, Cy3 の2色分) でスキャンされる。画像データの保存も自動的に行われ、保存ファイルの名前はバーコードナンバーとなる。もしバーコードを読み取れない場合は、「Slide○○」(= 「○○枚目にスキャンしたスライド」) という名前になる。

- 8) 一色蛍光法の画像データは、2つのフォルダ(それぞれに2ファイルずつを含む)と、フォルダなしの2つのファイルに、保存される。

まず、2つのフォルダ、○○○.dir と○○○b.dir、についてだが、フォルダ○○○.dir には、○○○.ds と○○○_L_1.GEL という2ファイルが、一方、フォルダ○○○b.dir には、○○○b.ds と○○○_R_1.GEL という2ファイルが、それぞれ入っている。これは1枚のスライドガラスを左側と右側にわけてスキャンしているためである。○○○_L_1.GEL が左側の、○○○_R_1.GEL が右側の画像になる。

フォルダなしの2つのファイルは、○○○.ds と○○○b.ds で、これはフォルダ内の同名のファイルと全く同じものである。

(参考：2色蛍光法の画像データをスキャンする場合、オートモードでは、Cy3 → Cy5 の順でスキャンされ、○○○_L_1.GEL に Cy3 の画像、○○○_L_2.GEL に Cy5 の画像が保存される。マニュアルモードでは Cy5 → Cy3 の順でスキャンされ、○○○_L_1.GEL に Cy5 の画像、○○○_L_2.GEL に Cy3 の画像が、保存される。また、"Image Quant"というソフトを用いれば、○○○.ds で左側の、○○○b.ds で右側の2色重なった画像を見ることが出来る。)

- 9) スキャニングが終了したら "Array Scanner Control"を終了し、スキャナーの電源を切る。

(2) FLA-8000 でスキャンする場合

FLA-8000 (FUJIFILM スキャナー) では、Array Scanner よりもスライドガラスのセッティング操作が簡便である。スライドキャリア (最大スライド5枚セット可能) にスライドガラスを挿入し、スライドキャリアごと本体にセットすればよい。

- 1) スキャナー、コンピューターの順に電源を入れて、立ち上げる。
- 2) ソフトウェア " Image Reader FLA-8000 v1.12 " を立ち上げ、スキャナーのウォーミングアップを行う。
- 3) スキャナーから、スライドガラス用キャリアーを取り出し、取っ手側を下にして置く
- 4) エアダスターなどでスライドガラス上のほこりを取り除く。スライドをキャリアーにセッ

- トする際には、スポット面を上にして、バーコード側の端を持って、キャリアーに挿入する。その後、キャリアーをスキャナー内にしっかりとセットし、スキャナーの蓋を閉める。
- 5) “スキャンコンディション”(即ち、“レゾリュ-ション”を‘10 mm’に、“スキャンモード”を“ハイセンス.”にセット)、“エリア”(“マックス”ボタンを押して、最大範囲にセット)を設定する。“レーザー”の波長とスキャンするスライドガラスの枚数を設定する。(前もって画像データの質を確認するために、“プレスキャン”をしても良い。) Scan ボタンをクリックするとスキャンがスタートする。スキャン終了後、Save ボタンをクリックし、画像データをセーブする。
 - 6) セーブされた画像は1画像につき、1つのファイルと1つのフォルダが1セットで作られる。このファイルには、Back up 情報(或いは Set up 情報)が含まれており、ファイル名は“ここで1セットになっているフォルダ名.set”である。一方、フォルダの方には、○○○? ○.img, ○○○? ○.inf, Info.set という3つのファイルが含まれている。なお、○○○? ○.img などの “? ○”の部分には、スキャンに使用したレーザーの波長が表示される。例えば、Cy 5 の波長でスキャンした場合は○○○? 640.img というようになる。(参考:“Image Reader”の古いversionである“Image Reader MAS-0”のFile プルダウンメニュー中にある“Convert to TIFF”を用いれば、img ファイルを tif ファイルに変換することが可能である。)
 - 7) スキャンが終了したら“Image Reader FLA-8000 v1.12”を終了し、スキャナーの電源を切る。

8. 画像データの数量化

本グループで使用経験のある3種類の数量化ソフトウェアについて、以下、それぞれの使用法を記述する。なお、(1)のソフトウェアには、日本語による詳しい操作ガイドと取扱説明書[詳細な操作方法を含む]が付属している。(2)と(3)のソフトウェアについては、今のところ英語版の取扱説明書だけであり、日本語の説明書は用意されていない(2000年末現在)。

[本節で使用する言葉の定義:]

Template: 蛍光シグナル強度を測定・数量化するための領域を定める枠組。遺伝子情報ファイル: マイクロアレイ上のクローンのナンバリング, クローン ID, accession No., 等の情報を含んだファイル。]

(1) Array Gauge (Windows 版, FUJIFILM の解析ソフトウェア)

STAFF 研究所作製のイネ 9000 cDNA アレイによって得たデータを数量化する場合は、あらかじめ、イネ 9000 cDNA アレイ用 Template, 及び、当該スポットに関する遺伝子情報ファイルをインストールしておく。インストールの詳細については FUJIFILM の Array Gauge 担当者に問い合わせられたい。

なお、個別のケースで新たに Template を作製する場合は、その詳細な操作手順が、本ソフトウェアの操作ガイドと取扱説明書（いずれも日本語版）に記されているので、御参照頂きたい。

- 1) ArrayGauge を起動する。画面上部に解析手順の項目が、フローチャートとして表示される。この順序に従って、解析を進めてゆく。画面左側パネルにも、現在の解析項目と次の項目（左側パネル最下段ボタン）が示される。
(a).img ファイルの場合：画面上部の Image アイコンボタンをクリックし、画面左側パネルの Trimming ボタンをクリックする。小さなウィンドウ (Trimming) が表示される。この小ウィンドウ下方の、階調調節用グラフ (Range Scope) 右端にある緑色の推薦をドラッグしながら、画像の濃淡・色調を調節する（注：ここで画像の階調・濃淡を変更してもオリジナルな蛍光強度は変化しない。従って、最終的な測定結果には影響を与えない。）。→ Display アイコンボタンへ。
(b).tif ファイルの場合：画面上部の Image アイコンをクリックし、画面左側パネルの Trimming ボタンから.tif ファイルを選択して開く。小さなウィンドウが開くので、ここで Range Scope を調節し、別のファイル名をつけてセーブする。→ Display アイコンボタンへ。
- 2) 画面左側パネル最下段にある Display アイコン、または、画面上部にある Display アイコンをクリックする。左側パネル内で、Scale が exponential になっていることを確認する。アレイ画像の微調節を行うためには、画面左側パネル下方にある階調調節用グラフの、緑色の垂線をドラッグしながら、画像の濃淡・色調を調節する。（注：ここで画像の階調・濃淡を変更してもオリジナルな蛍光強度は変化しない。従って、最終的な測定結果には影響を与えない。）フォルダアイコンから未解析画像ファイルを選択した場合は、左側のパネルの RangeScope ボタンをクリックして Trimming ウィンドウを表示させ、1)で述べた方法で階調調節をする。ついで 2)の方法でさらに微調節する。→Measure アイコンボタンへ
- 3) 画面左側パネル下方にある Measure アイコン（または、画面上部にある Measure アイコン）をクリックする。左側パネル内の Select からイネ 9000 cDNA アレイ用の Template を 1つ選択して OK ボタンをクリックすると、選んだ Template がアレイ画像上に表示される。画像データとテンプレートの対応を間違えないように注意する（例えば 1st スライドガラスの画像データに 2nd スライドガラス用のテンプレートを使用すると後で数量化が終了したテキストデータに 1st スライドガラス用の cDNA 情報を添付できなくなる。この際はもう一度テンプレートをつけ直して 3) からやり直すことになるので要注意）。
- 4) 左側パネル内の、3 つ横に並んだ正方形の Fitting ボタンのうち左 2 つと、上方にある手型ボタンとを駆使して Template を移動させ、スポットの位置に大まかに合わせてから Auto Option をクリックする。すると小さいウィンドウ (AutoFitting Parameters Option) が表示される。この中の Block Alignment Type を independent に、Spot Alignment Sensitivity を 5 に設定し、Spot Appearance をそのスポットティング状態（スポットがドーナツ状か否か）に合わせて選択し、Centering Parameter

を2に設定して、Auto をクリックする。この操作によって、Template がスポットに自動的に当てはまるよう調整される。Template がスポットとずれた箇所は手で修正し（場合によっては、もう一度 Auto Option を繰り返す）、最終的に Template を全てのスポットに上手く当てはめる。

（オプション 1：Positive Control スポットの設定は、この段階で行う。左側パネル内の Choice ボタンを使って Positive Control のスポットを選択し、次に Attribute ボタンをクリックしてスポット属性を Control に変更する。Positive Control スポットの Template が緑色に変わる。）（オプション 2：Global Background のための領域設定は、この段階で左側パネル内の Background ボタンを使って行う。10）参照。）
→ Analysis アイコンボタンへ

- 5) 画面左側パネル下方にある Analysis アイコン、または、画面上部にある Analysis アイコンをクリックする。1つの画像ファイルを解析した場合は、3枚のウィンドウ（即ち、既に5.で開いていたアレイ画像の他に、スポット蛍光強度の測定結果表、各スポットの濃度分布を示したパターン画像）が、画面に現れる。2つの画像ファイルを解析した場合は、7枚のウィンドウ（即ち、アレイ画像2枚と、それぞれのパターン画像[2枚]、スポット蛍光強度の測定結果の表1枚、パターン画像を比較した Compare Window 1枚、そして2つの測定結果を比較したスキャッタープロット1枚）が、画面に現れる。それぞれのウィンドウ上のスポットとデータは相互にリンクしている（しかし、スキャッタープロット上の各点から、他のウィンドウへの方向には、リンクがない）。
- 6) アレイ上の cDNA に関する情報を、測定結果表に加えるためには、まず、測定結果表ウィンドウをアクティブにして左側パネル内の cDNA info. ボタンをクリックする。小さなウィンドウ（cDNA Info）が表示されるので、その中の select ボタンをクリックして、あらかじめインストールしておいた遺伝子情報ファイルから、当該測定結果表に対応するファイル（例えば、イネ 9000 cDNA アレイ前半スライドの結果ならば、ファイル Rice9000FullArray1-stInfo）を選択して OK ボタンをクリックする。小さなウィンドウの左側に、その情報ファイルに含まれる諸項目が表示されるので、まず、その中の Element No. のみを選択し Add ボタンをクリックして Index Matching Information へ移動させる、次いで、Add all ボタンをクリックして、残りの遺伝子諸情報すべてを Gene Information to Display へ移動させる。最後に OK をクリックすると、結果表内へ各スポットに対応した遺伝子情報が表示される。
- 7) 左側パネル内の Measure Option ボタンをクリックすると小さなウィンドウ（名称：Measure Option）が表示される。ここから、Background や Normalization の設定が出来る（Background の設定は Range Option からでも可能。10）参照。）（Normalization は、一般に、Global Normalization が行われている。Positive control を使うと上手く Normalization 出来ない場合が多い。）
- 8) 測定結果表をアクティブにして、左側パネル内の Table Option ボタンをクリックすると小さなウィンドウ（名称：Table Option）が表示される。ここでは測定結果やクローンの情報を、No. や Index の順（いずれも昇順のみ）、Density の順序（測定値の

降順)や Ratio の順序に従って並べ替えることができる。Ratio の場合は、2 サンプル間のデータ比率を、降順(Ratio(down) ボタンをクリック)、もしくは昇順(Ratio(up) ボタンをクリック)で表示できる。また、List Amount で All ボタンを選択すると、全てのクロンのデータと情報を、一方、Top ボタンを選択してから表示したいデータ数を入力すると、その数だけのデータと情報を最高値データから降順で表示することができる。List Choice で Selections を選択すると、結果表内にある Status に O.K. と入力されたクローンだけをリストアップする。(入力には、Status 欄をクリックするだけで良い)

- 9) アレイ画像をアクティブにして左側パネル内の Range Option ボタンをクリックする。十字型に変化したカーソルで、その画像上の任意のスポットをクリックすると、小さなウィンドウ(名称: Range Option)が表示される。ここではバックグラウンド領域、測定濃度域を調整できる。我々は以下の(a)の設定を用いて解析を行っている。
(a) Display mode を OutLine にし、Limit Density Range の空欄はそのままにしておく(チェックをいれない)。Peak Noise Reduction の空欄をクリックしてチェックマークを入れる(Limit Density Range の設定値は0%のまま)。Back Ground で Local ボタンを選択し、BG Thickness を3に、BG Space を0に設定する。(注:ここで Global Back Ground を選択するためには、5)で Background 領域を設定しておく必要がある。)→ Annotation アイコンへ。または Save アイコンへ(この場合は10)をとばして11)に進む。)
(b) Display mode を OutLine にし、Limit Density Range と Peak Noise Reduction の空欄をクリックしてチェックマークを入れる(Limit Density Range の設定値は0%のまま)。Back Ground で Local ボタンを選択し、BG Thickness を3に、BG Space を0に設定する。(注:ここで Global Back Ground を選択するためには、5)で Background 領域を設定しておく必要がある。)
- 10) 画面左側パネル下方にある Annotation アイコンまたは画面上部にある Annotation アイコンをクリックする。左側パネル内の A アイコンを選択すればアレイ画像上に文字が、矢印アイコンを選択すれば矢印を入力することができる。→ Save アイコンへ
- 11) 左側パネル下方にある Save アイコン、または、画面上部にある Save アイコンをクリックする。ここで測定結果表をアクティブにし、Export をクリックして TEXT 形式で保存する。またアレイ画像の場合は、Save を選択すると img ファイルで、Export を選択すると tif ファイルまたは bmp ファイルで保存できる。

(2) MicroArray Suite (Mac 版, M&S 機器の解析ソフトウェア)

このソフトウェアで解析できるのは、tif ファイル形式のデータである。

使用前の準備: 各スポットに関する遺伝子情報ファイルを作製しておく(下記4)(b)参照)。

- 1) 数量化操作前の作業: マイクロアレイの蛍光画像は、バックグラウンドの高い領域(ス

ライドガラス外縁付近に多く生ずる)やバーコード部分など、解析に不必要な、蛍光強度の極めて高い領域を含んでいる場合がある。MicroArray Suite では、アレイ画像上のスポットシグナル領域を切り取って、新しいファイルを作る(この作業をしないと、数値化が困難になる。)

- a) MASbata21 を立ち上げて file から、解析したい画像の tif ファイルをイメージを選択して開く。プルダウンメニュー Enhance から Normalization を選択し、コントラストを調節する。ROI ウィンドウの虫眼鏡アイコン(画像をクリックすれば画像は拡大され、Option キーを押しながら画像をクリックすると縮小される)を選択し、スライドガラス全体が見えるように大きさを調整する。次に、cut アイコンをクリックし、切り取りたい画像箇所を囲む。Edit から Crop image を選択すると、切り取りたい画像部分のみのイメージになる。
 - b) ガラス上のゴミや汚れの数値を下げるために Enhance から Median Filter を選択し、3x3 ピクセルで2回ほどかける。何度もフィルターをかけるとスポット蛍光強度の測定数値に影響を及ぼすので注意する。
 - c) File から Save As...を選択し、この“切り取り画像”に、別のファイル名をつけて保存する。この画像を、以降の数値化解析に用いる。この画像のファイルも tif 形式であるが、アイコンの形が、オリジナル画像の tif ファイルとは異なっている。(注意:この画像をオリジナル画像と同じ名前で保存すると、オリジナル画像は失われるので要注意。)(参考:この画像を保存する際、名前の後ろに .tif という拡張子をつけておけば、Windows でも開くことができる。)
 - d) MASbata21 を終了させる(この後再度立ち上げて、数値化を行う)。
- 2) [ここからが、数値化操作である。] MASbata21 を立ち上げて1)で保存した tif イメージファイルを選択し、開く。Enhance から Normalization を選択し、コントラストを調節する。Enhance から invert を選択し、invert CLUT にチェックを入れ OK をクリックする。これを行うとシグナルを黒く、バックを白く表示させることができる。(同じ動作を再度行くと反転した画像になる。)
 - 3) Ext.から Place Grids を選択すると、前回最後に使用した Grid と Grid Set up という小さなウィンドウが表示される。
 - 4) 新しく Grid を作成する場合は以下の手順に従う。
 - (a) その小さなウィンドウ中の New を選択すると、Confirm Save という更に小さなウィンドウが表示される。その中で No を選択し、アレイ画像のウィンドウ下方にある ClearGrids をクリックすると、それまで表示されていた Grid が画面上から消える。
 - (b) Grid Set up ウィンドウ中の Load Gene Library から、使用する遺伝子ファイル(本項(2)の冒頭「使用前の準備」参照)を選択し、設定する。次に、スポッティングのパターンに合わせて、4つの項目(Super Grid Rows, Super Grid Columns, Sub Grid Rows, Sub Grid Columns)をそれぞれ設定する。[例:スライド1枚の全面にスポットされている場合は、Super Grid Rows に12(Fieldの行数), Super Grid Columns に2(Fieldの列数), Sub Grid Rows に12(1Field内スポットの行数), Sub Grid Columns に32(1Field内スポットの行数)を、それぞれ設定する。(スポッティングパターンや Field については、「II. 2.

スポッターの使用法」の末尾にある[注]を参照のこと。)] カーソルを、アレイ画像のスポットの一番左上から、1 Field 分のスポットを囲む様にドラッグすると、残りの Field に対応する Grid も表示される。

- 5) Grid をスポットに合わせていく。個々の Grid は全て相互にリンクしているため、左側の Grid を動かすと右側の Grid も連動して動き、上側の Grid を動かすと下方の Grid も連動して動く。従って、左側の Grid から右の Grid、上側の Grid から下方の Grid、という順序で、Grid をスポットに合わせていく。Grid 間のリンクをはずすには、まず、リンクをはずしたい Field にカーソルを持っていき、そこでアップルマークを押しながら Field をクリックすると、その Grid だけが青色に変化し、リンクをはずすことができる(この時、カーソルはチェーンのような形になる)。リンクを元に戻すには同じ操作を行えばよい。また、画像ウィンドウ下方に Grid Cell Mode ボタンがあり、このモードでは、全 Field の同じ場所のスポットを囲んでいるセルが全てリンクしていて、ひとつ動かせばそれ以下のものが全て同じように動く。リンクをはずすには上記の場合と同様にする。Grid のリンクをはずしたら、必ずリンクを元に戻しておく。また、Field の大きさを変えたいときは Field の外枠にカーソルを合わせるとカーソルが矢印様になるので、ドラッグして大きさを調節する。作成した Grid は必ず名前を付けて保存しておく。以上のような方法で Grid をスポットに当てはめたら、画像ウィンドウ下方右側にある OK をクリックする。
- 6) Ext. から Process Arrays を選択し、Place Grid Setting 内の項目内容のチェックを行い、Processing Specifics 内の Target size を 10pixels に、Type を Thresholding に、weight を 3 に、Background Subtraction を Local に、Intensity Average Within を Target に設定する。また Target Analysis が Target Detection Only になっていることを確認して OK を押す。(この際、必ず日本語変換ソフトになっていないことを確認する。ことえりや ATOK のままだと強制終了される可能性があるので注意すること。)すると、3つのウィンドウ(元から表示されている画像、Processing Result という名前のイメージファイルと Grid が重なっているウィンドウ、Sample Intensities という名前の測定結果表)が現れる。
- 7) Ext. から Display Array Data モードを選択すると、2つのウィンドウ(Color image と Sample Intensities)が開く。Color image では、キーコードがキーボードと対応しており、例えばHを押すとキーコードのヘルプが表示される。Clone info には、クリックしたスポットのデータが最大 100 個まで表示されるので、興味のあるスポットのデータだけを選び出すことができる。Qを押すかダブルクリックで Display Array Data モードから出ることができる。Display Array Data モードから出ないと他の作業(例えばセーブ)は行えない。また、一度 Display Array Data モードから出ると、再度入ることができないので注意する。
- 8) 必要なデータを Save As...で保存する際、保存するファイルの名前には、全て別名を付ける。保存されたファイルは、全て Micro Array Suite 専用の保存形式になる。(1)で作製した“切り取り画像”= tif イメージファイルは、tif のまま。(1)d)を参照)。Sample Intensities は、tab 区切りで text 形式保存できるので、別名保存する際に.txt という

拡張子をつけておけば Windows でも開く事ができる．この text ファイルを Microsoft Excel などの表計算ソフトに落として，解析する．

- 9) 以上，ここで紹介したソフトウェア "Micro Array Suite" では，1 枚の画像ファイルから幾つものウィンドウが作成されてくる．従って，作業中は，各ウィンドウを，それぞれファイルとして保存しながら，解析してゆく方が安全である．(例えば，終了する際，プルダウンメニューの Window から Dispose all windows を選択すると，そこに開いていた全てのウィンドウが閉じる，つまり，保存していないデータ等のウィンドウも閉じてしまう．)

(3) ArrayVision (Windows 版, Molecular Dynamics の解析ソフトウェア)

1) "ArrayVision"を起動する．画面上部に示されるアイコンのうち，右端のアイコン (ArrayMacro ボタン) をクリックすると，2 つの小さなウィンドウが現れる．画面右側の，横長の小さなウィンドウ (Run[ArrayMacro]ウィンドウ) には，数量化する手順の各段階が示される (ここでは[Display Format]: Change display format と表示)．同時に，画面中央には，Run[Display Format]ウィンドウ) が表示されるので，Image type を 16 bits (default), total # of channels を 4, total # of views を 1 に合わせ，OK をクリックする．

2) Run[ArrayMacro]ウィンドウには，[ARV Analysis setting]: ArrayVision channels and measure selection と表示される．画面中央には，Run Macro ウィンドウが示されるので，Analysis type を Expression, Arrays/Templates を single array, Template mode を single, Element value を Dens x Area, Background を average に合わせ，チェックボックスには全てチェックを入れて OK をクリックする．

3) Run[ArrayMacro]ウィンドウには，" [Loading Image Set]: Load multiple images from files. " と表示される．画面中央には，Retrieve image set ウィンドウが示される．このウィンドウ左側の欄に示されるファイルの中から，解析したい GEL ファイルを選択して Add ボタンを押し，同ウィンドウ右下側の欄 (Images to load) に表示させる．OK ボタンをクリックする．

4) Loading Image という小さいウィンドウ (ファイルが " Loading 中である " ことを表示) が消えると，Image view ウィンドウが現れる．この中に先ほど選んだ GEL ファイル (=アレイ画像) が表示される．また，Run[ArrayMacro]ウィンドウには，" [Pause]: Cause macro execution ... (以下略) " という文と Stop アイコンが表示される．これらの背後には，Visuals ウィンドウが表示されている．

- 5) Visuals ウィンドウ右上 3 番目の Histogram アイコン (Run[ArrayMacro]ウィンドウの後ろに隠れている) をクリックすると，Visuals ウィンドウ右半分 (= LUT map) に蛍光シグナルのピクセル分布を示すヒストグラムが表示される．LUT map の左下から右上に走る斜線 (茶色) の両端をドラッグしながら X 軸方向に沿って動かし，Image view ウィンドウの画像を見ながら，最適なコントラストに調整する．(Image view ウィンドウ内の画像の倍率は，このウィンドウの左上端アイコン (緑 & 赤) のプルダウンメニューから magnification を選び，適宜，調節する．)

- 6) Run[ArrayMacro]ウィンドウの Stop アイコンの下にある”Resume”ボタン（緑色で、点滅している）をクリックする。新たに Template Definition [Untitled] ウィンドウが現れる。このウィンドウで template を作る（Template とは、アレイ画像上のスポットに当てはめてシグナル強度を測定・数量化するための枠組）。
- 7) i) 既に適当な template が保存されている場合：Template Definition ウィンドウの左上にある file のプルダウンメニューから Open を選ぶと、保存されている Template files が現れる。必要な template を選び、OK ボタンを押すと、Image view ウィンドウのアレイ画像に template（多数の赤丸）が現れる。（template と画像上のスポットがずれている場合は、Template Definition ウィンドウから Alignment メニューに入り、下の h) 以降に記した要領で、template をスポットに当てはめてゆく。）
- ii) 新規に template を作製する場合：
- a) Template definition ウィンドウ内のメニューから Layout メニューを選ぶ。このメニューの Change ボタンをクリックする。
- b) 3つの項目が現れる。Field selection を multiple に、Layer selection を one に合わせ、row には field の数(= 使用した pen の本数)、column には 1 field 当たりのスポットの列数を入力して OK ボタンをクリックする。
- c) a) の Layout メニューに戻る。Rows にはスポットの全行数、Column にはスポットの全列数を入力する。
- d) アレイ画像上のスポットの直径を測る。別の小さなウィンドウ Layout tool box にある”A--B “ボタン（= 距離測定用ボタン）を押すと、カーソルで直線を引くことによって、2点間の距離測定が出来るようになる（起点からドラッグして終点で放すと、それら2点間の距離が測定される）。先ず、スポットの直径を測る。直径が Rows 或いは Column の欄に表示されるので、その数値を Diameter の欄にキーボードから入力する。
- e) 次に、行・列方向のスポット間距離(interval)を測定する。（行の interval とは、隣接した上下スポットの上端から上端まで[或いは下端から下端まで]の距離、列の interval とは、隣接した左右スポットの左端から左端まで[或いは右端から右端まで]の距離）Interval は、d)と同じ要領で測定すれば、自動的に interval の欄に入力される。
- f) 更に、Element 欄の circle を選んで、Create ボタンをクリックする。
- g) Element Starting Position ウィンドウが現れる。Template の起点を決めるために、画像の左上端スポットをクリックする。画像に Template（多数の赤丸）が現れる。
- h) [ここから、Template をスポットに当てはめる作業] .
Template definition ウィンドウ内のメニューから Alignment メニューを選ぶ（template をスポットに当てはめるためのメニュー）。Template の外側に、緑色の方形をした枠（以下、緑枠と称す）が現れる。（Layout tool box も Alignment tool box に変わる。）
- i) 先ず、緑枠の左右の辺と上辺をドラッグして（カーソルは、矢印から両矢印に変化）template の列がスポットの列に合うように調節する。

- j) 次に、緑枠の下辺を、キーボードのコントロールキーを押しながらドラッグし、最下行の template が、最下行のスポットに合うように調節する（“ コントロールキーを押しながら ” ドラッグすることにより、field 数に対応した template が配置される。単に下辺をドラッグすると、template は均等に広がる）。
- k) 緑枠が囲む template の範囲は、容易に変更出来る。カーソルを 1 個の template に合わせてクリックすると、緑枠は 1 個の template のみを囲む。更に、シフトキーを押しながら、他の template をクリックすると、クリックした 2 つの template を囲む緑枠が出来る。同様の要領により、緑枠を任意の方形に変えて、template を囲むことが出来る。
- なお、緑枠内の全 template をそのまま移動させる場合は、カーソルを緑枠の左上端に合わせて（カーソルは矢印から十字に変化）ドラッグする。
- また、カーソルを緑枠の右上端に合わせて（カーソルは弓形の両矢印に変化）ドラッグすると 緑枠内の全 template は 枠の左上隅を軸に rotate する。
- 更に、カーソルを緑枠内の四隅にある template の 1 つに合わせ（カーソルは V 字型に変化）ドラッグすることにより、緑枠内の template をスポットの位置に調整する方法もある。
- l) 緑枠内にあるスポットのシグナルが全体的に強い場合は、上記の要領で大まかに template をスポットに合わせた後、Alignment メニューの Autoalignment ボタンをクリックすることによって、緑枠内の template とスポットを自動的に当てはめることが出来る。（しかし、シグナルが弱い場合には、Autoalignment によって、かえってずれてしまうことがある。Autoalignment のあとで Undo ボタンを押せば、Autoalignment をキャンセル出来る。）
- m) それでもなお template とスポットがずれている場合は、同じ画面上に現れている極小ウィンドウ（Alignment ウィンドウ）の individual template 移動アイコン（丸に矢印アイコン）をクリックした後、個々の template をドラッグさせてスポットに合わせる。
- n) Template definition ウィンドウから、Label メニューを選ぶ。ここで、各スポットに番号を割り当てることができる（つまり、各スポットの並びと数量化データの配列を対応させるための設定）。左側のアイコンで“ 行方向と列方向にそれぞれ番号をつける ”、中央のアイコンで“ 最上の行から順に、左から右方向に、最下行まで通し番号をつける ”、右側のアイコンで“ 縦方向に通し番号をつける ” ことが出来る。
- o) Template definition ウィンドウから、Background メニューを選ぶ。Background の設定位置を選ぶ項目が現れる（各テンプレートの外側に設定する；各スポットの外側に設定する；Negative control 用スポット等を選ぶ；スポットのない領域の或る範囲を選ぶ）ので、どれか 1 項目を選択する。Define ボタンを押して、設定条件を入力する（入力する条件は、項目によって異なる）。使用アレイの設計などを考慮して background を設定する。
- p) Template definition ウィンドウから、Anchor/Blank メニューを選ぶ。何もスポットをしていない箇所に対応する Template 等を blank として設定しておく。（その

template については数量化データが計算されない.) (o) や p) の作業中に template が見えなくなるが, Refresh ボタンを押し, template を表示して, どの場所に background や blank が設定されたかを確認する. もし間違いがあれば Clear ボタンでクリアし, 再設定する.)

- q) 作製した新規 template を保存するためには, Template definition ウィンドウ上側の File プルダウンメニューから Save as... を選び, ファイル名をつけてから保存する.
- 8) Template definition ウィンドウの OK ボタンをクリックする.(注意: 新規に template を作製した場合, 保存する前に, この操作を行うと, 新規 template は失われてしまうので要注意.) (なお, 或る段階に戻って, もう一度作業をやり直したい場合は, Run[ArrayMacro] ウィンドウの左下にあるアローヘッドボタンを操作することによって, 各段階に戻ることが出来る.)
- 9) カーソルを, Image view ウィンドウの画像上に移動させ(カーソルは, 4本の矢印からなる四角いカーソルに変わる), クリックすると, 蛍光強度の数値化計算が始まる. データの一覧表は, Image view ウィンドウの背後に現れている Data ウィンドウに表示される.
- 10) アレイ画像を見ると, ゴミやバックグラウンドがあるために, “データにならないスポット”が見つかる. こうした場合, 計算終了後, Image view ウィンドウから “データにならないスポット” に目印 (= “旗”) を付けて区別しておくことが出来る. まず, 画面上の極小ウィンドウ (Sample ウィンドウ) の Flag アイコン (右から2番目にある, V アイコン) をクリックすると, カーソルが V 字型に変わる. そして, 各スポットに対応する template をクリックすると, template は自動的に赤色に塗りつぶされる (スポットに “旗” が付いた状態). Data ウィンドウのデータ一覧表にも, そのスポットに対応する欄に “旗” が付く.
- 11) 画面最上段のメニューバーから File メニューを選び, その中の Save as... を選んで, ファイル名を付け, 保存する. 最終的な画像とデータ一覧表の両方が, ArrayVision のファイル形式で保存される. また, 同様に File メニューから Export を選び, 同じ名前を付けて, Text 形式で保存する. この場合, データ一覧表は, 先の ArrayVision ファイル形式で保存されたデータ一覧表とは独立した別のファイルとして, Text ファイル形式で保存される.

9. その他

“再現性”の確認:

蛍光強度の数値化が終了したら, スライドガラス内における, データの “再現性” を調べる. 先ず, スポット蛍光強度の測定結果表をテキストファイルとして export する. そのファイルを Excel などの表計算ソフトに落とし, 一枚のスライドガラスについて, 左右スポットセットのデータをスキッタープロットする. 数値化した蛍光強度が, 2 倍から 0.5 倍までの

範囲（或いは、3 倍から 1/3 倍までの範囲）に入っていれば、「“ 再現性 ” あり」と判断する。それ以上、或いはそれ以下の値を示したデータについては、以下のいずれかを行う：(1) アレイ実験結果を用いて RNA サンプル間比較解析を行った後、それらの比較結果を必ず別の方法（RT-PCR や Northern 法など）によって確認する；(2) 或るアレイ実験に関して「“ 再現性 ” が非常に低い」と判断された場合、同一 RNA サンプルを用いて再度アレイ実験を行う。(2) の場合でも、得られたアレイ実験結果を別の方法によって確認する。

Normalization :

一般に、中央値を利用する方法や、Global Normalization 法が行われている。Positive control を reference として使うと、上手く normalization 出来ない場合が多い。理想的方法として、internal positive control として、絶対に発現量の変化しない複数の house-keeping 遺伝子（或いは、それらの cDNAs）をアレイ上から探し出し、それらのシグナルを normalization に用いる方法があるが、この方法では、実験毎に“ internal positive control として使用する複数の house-keeping 遺伝子 ” を見つけねばならない。

なお、我々は、positive control 用クローンのシグナルを、“ ハイブリ実験が成功したことの確認 ” のためにのみ使っており、データの Normalization には用いていない。我々のイネ cDNA アレイには、positive control 用クローンとして、イネ cDNA とクロスハイブリダイズしないブタ EST クローンのインサート DNA がスポットされている（external positive control）。そして、ハイブリダイゼーション用ターゲットの調製時には、これらブタ由来クローンの cRNA (in vitro transcript) を各サンプル RNA と混合して同時に逆転写酵素反応を行っている。従って、画像データとして、イネ cDNA クローンの蛍光シグナルと共に、positive control のシグナルも得られる。

サンプル間のデータ比較解析：

発現変化の最も単純な判定法は、「比較するデータ間で、蛍光強度の比が“ 2 以上 ” ならば“ 転写量の増加 ” を示し、また、“ 0.5 以下 ” ならば“ 転写量の減少 ” を示す」と判定する方法である（或いは、“ 3 以上 ”・“ 1/3 以下 ” を基準に、判定する場合もある）。ただし、これらの基準には、統計学的な根拠が全く無いので、アレイ実験の結果を RT-PCR や Northern 法によって確認する必要がある。

比較解析で、最もシンプルな計算法は、前項で述べたように、export したデータを Excel 等の表計算ソフトを用いて、蛍光強度の数値化データ間で比較する方法である。先述したソフトウェアの中では、Array Gauge や MicroArray Suite に、ある程度の比較解析機能が含まれている。ここでは紹介しなかったが、既に Spotfire（スキャタープロット上の各点と、アレイ上の遺伝子情報が相互にリンク）や GeneSpring（主成分分析等、統計学的手法を用いた比較解析も可能）など、幾つかの比較解析ソフトウェアが販売されている。

謝 辞

本プロトコールは、農林水産省 21 世紀グリーンフロンティア研究「遺伝子発現モニタリング手法を用いたイネ・ゲノム有用遺伝子の機能解明」(担当研究課題「イネの遺伝子群発現モニタシステムの開発」； 課題番号 1000) のサポートによって作製された。

摘 要

本稿は、マイクロアレイプロジェクトで主に用いられている、イネ cDNA マイクロアレイの作製・利用に関するプロトコール集である。大量のマイクロアレイ用 cDNA の調製、スポンターの使用法、ターゲットの調整 (= RNA の蛍光標識法)、ハイブリダイゼーション、スライドガラスの洗浄、蛍光シグナルのスキヤニング、画像データの数量化に関するプロトコールが含まれている。本プロトコール集は、本プロジェクト参画者やマイクロアレイに興味を持つ研究者のための“マイクロアレイ実験の手引き”、或いは、マイクロアレイを理解するための一助になるであろう。

参考文献

マイクロアレイに関連したマニュアル・プロトコール集：

筆者らが気付いた範囲内で記した。参考にされることをお勧めする。

- 1) 松村正明・那波宏之(監修) 2000. DNA マイクロアレイと最新 PCR 法. 細胞工学別冊 ゲノムサイエンスシリーズ pp. 133. 秀潤社, 東京.
- 2) 辻本豪三・田中利男(編集) 2000. ゲノム機能研究プロトコール. 実験医学別冊 ポストゲノム時代の実験講座 pp. 269. 羊土社, 東京.
- 3) 林崎良英(監修)・岡崎康司(編集) 2000. 必ずデータが出る DNA マイクロアレイ 実戦マニュアル. pp. 174. 羊土社, 東京.
- 4) 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター(中村祐輔研究室)編集 2000. ラボマニュアル マイクロアレイ編. pp. 43. (非売品)

引用文献

1) Wu J, T. Maehara, T. Shimokawa, S. Yamamoto, C. Harada, Y. Takazaki, N. Ono, Y. Mukai, K. Koike, J. Yazaki, F. Fujii, A. Shomura, T. Ando, I. Kono, K. Waki, K. Yamamoto, M. Yano, T. Matsumoto and T. Sasaki 2002. A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. Plant Cell 14:525-535.

Summary

Protocols for experiments on rice cDNA microarray

Fumiko Fujii¹⁾ *, Kanako Shimbo¹⁾,
Junshi Yazaki¹⁾ *, Naoki Kishimoto²⁾ and Shoshi Kikuchi²⁾

1) Rice Genome Research Program, STAFF-Institute. Ippaizuka, Kamiyokoba, Tsukuba 305-0854, Japan.

2) Department of Molecular Genetics, National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS). Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan.

The Microarray Project of MAFF (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan) was started in April 1999. Here we describe the protocols for microarray experiments used in this research project. This article, mainly on Rice 9000 cDNA Array, includes protocols for preparation of insert DNAs from cDNA clones as probes, usage of array spotter, preparation of targets from RNA samples, microarray hybridization, washing of microarray, scanning of fluorescent signals, and quantification of image data. The protocols will allow the participating researchers in the project as well as other researchers to perform their own microarray experiments and to understand the details on procedure in microarray experiment.

*Present address: Department of Molecular Genetics, NIAS, MAFF. Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602