

# マイクロアレイハイブリダイゼーション

## プロトコール改訂第1版

### ・ターゲットの調製

ここでは、2色蛍光法を用い、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。

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

#### 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。(48、70、95)
- ・微量遠心機の温度設定は、EtOH沈殿の際は4、スピンドアウンの際は室温(20?25)とする。

#### 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て行う。

#### (1)cDNAの合成と精製

- 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	10μl
10×dNTP Mix	5μl
Deionized H <sub>2</sub> O	7.5μl
MMLV Reverse Transcriptase(200units/ul) (＊)	2.5μl
<hr/>	
Total	25μl

- (＊)MMLV Reverse Transcriptaseは加える直前に-30 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、その後スピンドウンする。  
( mRNA もしくは total RNA を使用する。)

mRNA (+dH <sub>2</sub> O*)	5μl (2μg を含む)	—
total RNA (+dH <sub>2</sub> O*)	—	10μl (40μg を含む)
Control RNA	10μl	10μl
Oligo-(dT)25	5μl	5μl
Random Nonamer Primer	5μl	—
<b>Total</b>	<b>25μl</b>	<b>25μl</b>

(\*RNA 溶液の濃度によっては、RNA 溶液を濃縮するか、或いは、dH<sub>2</sub>O を加えて、標識する RNA 量が上記カッコ内の質量になる様に、最終容量を 25μl に調製する。)

- 3) 70 で 5 分間加熱する。
- 4) 前項 3) を 48 まで冷却し、前々項 1) の Master Mix 25μl を加えて混合し、スピンドウンする。(合計 50μl)
- 5) 48 で 30 分間インキュベートする。
- 6) 70 で 5 分間インキュベートした後、スピンドウンする。
- 7) Quick Clean 樹脂 5μl を加え、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。
- 8) 45μm の Spin Filter を付属の採集用チューブにセットして、前項 7) の全量を Spin Filter に移す。
- 9) 微量遠心機にて、最大速度(15,000rpm)で 1 分間遠心する。
- 10) Spin Filter を取り除き、前項 9) の採集用チューブに 3M Sodium Acetate 5.5μl を加え、ボルテックスにて攪拌する。
- 11) 氷冷した 100% EtOH 137.5μl を前項 10) に加え、ボルテックスにて攪拌する。
- 12) 前項 11) を -20 のフリーザー内に 1 時間おき、cDNA を沈殿させる。  
\*このプローブは -20 ・EtOH 沈状態で、1? 2 日間保存できる。
- 13) 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。
- 14) 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。
- 15) ペレットを風乾、もしくは遠心濃縮機を用いて乾燥させる。
- 16) 2×Fluorescent Labeling Buffer 10μl 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。  
\*もし、2×Fluorescent Labeling Buffer を加えたらすぐにセクション(2)に進むこと。

## (2) 蛍光色素のカップリング

**実験前の準備：**微量遠心機の温度設定は4℃とする。

**注意事項：**

- ・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。
- ・色素に添付されているプロトコールは使用しない。
- ・キットに同梱されているDMSOのみを使用する。(他メーカーのDMSOは絶対に使用しない。)
- ・色素を加えた後は遮光する。

- 1) (1), (16)のcDNAサンプルに、Deionized H<sub>2</sub>O 0.5μlを加える。(合計10.5μl)
- 2) 色素(Amersham Pharmacia Cy3またはCy5)が入っている容器に、キット内のDMSO 45μlを直接加え、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、-20℃で1?2ヶ月間保存できる。この際、密封・遮光する。
- 2) 前々項1)のcDNAサンプルに、前項2)のDMSO/色素混合液10μl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。
- 3) 3M Sodium Acetate 2μlと100% EtOH 50μlを加え、ボルテックスにて混合する。
- 4) 前項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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) ペレットを風乾、もしくは遠心濃縮機を用いて乾燥させ、Deionized H<sub>2</sub>O 100μlを加えてしっかりと溶解する。(ペレットを乾燥させる際は、風乾する場所や遠心濃縮機を遮光し暗所にしておく。)

## (3) CyDye 標識 cDNA の精製

**実験前の準備：**微量遠心機の温度設定は室温(20?25℃)とする。

- 1) QIAquick PCR Purification KIT(QIAGEN)を用いて精製する。
- 2) 前項1)で精製・溶出したCy3とCy5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。(この際、遠心濃縮機を遮光し暗所にしておく。)  
\*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。

## 2. RNA 直接標識法

#### 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 )
- ・微量遠心機の温度設定は室温 (20? 25 ) とする。

#### 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て行う。

#### (1) CyDye 標識 cDNA の合成

1 ) 1.5ml チューブに以下の試薬を混合して反応液を作り、スピンドウンする。

( mRNA もしくは total RNA を使用する。)

mRNA ( +dH <sub>2</sub> O* )	10μl (2μg を含む)	—
total RNA ( +dH <sub>2</sub> O* )	—	12μl (40μg を含む)
Control RNA	10μl	10μl
Oligo-(dT)25	2μl	2μl
Random Nonamer Primer	2μl	—
<hr/>		
Total	24μl	24μl

( \* RNA 溶液の濃度によっては、RNA 溶液を濃縮するか、或いは、dH<sub>2</sub>O を加えて、標識する RNA 量が上記カッコ内の質量になる様に、最終容量を 24μl に調製する。)

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
Cy3-dCTP もしくは Cy5-dCTP ( * )	2μl
Super Script II ( * * )	2μl
<hr/>	
Total	18μl

( \* ) Cy-dye を加えた後は遮光すること。

( \* \* ) Super Script II は加える直前に -30 から取り出し、使用後は直ちに戻すこと。

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4μl加えて混ぜる。
- 8) 37 ・暗所で15分間反応させる。
- 9) 2M 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。

## (2) CyDye 標識 cDNA の精製

**実験前の準備：**微量遠心機の温度設定は室温（20? 25 ）とする。

- 1) QIAquick PCR Purification KIT(QIAGEN)を用いて精製する。
- 2) 前項1)で精製・溶出したCy3とCy5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。(この際、遠心濃縮機を遮光し暗所にしておく。)

## ・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(50000μJ/cm<sup>2</sup>)  
(ただし、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。
- ・ヒートブロックの温度をそれぞれセットしておく。(95 、70 )
- ・微量遠心機の温度設定は室温(20? 25 )とする。
- ・ハイブリオープンの温度を60 に設定しておく。

- 1) ・**ターゲットの調製**で、精製されたCyDye 標識 cDNA に dH<sub>2</sub>O 9μl を加え、ピペティングでしっかりと溶解する。その後、スピンドウンする。
- 2) 95 ・暗所で4分間加熱する。
- 3) 氷上・暗所で30秒間急冷し、スピンドウンする。
- 4) Oligo A80 (1mg/ml)6μl を加え、ピペ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 ・暗所で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 (CLONTECH) 45μl を加え、ピペティングにて気泡をたてないように緩やかに、かつ、しっかりと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、軽く温めた後にスピンドウンする。

- 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、前項6)の半量(30μl)を1枚目のスライドガラスの端に滴下し、カバーガラスを静かに

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。)

- 8) 残りの半量(30 $\mu$ l)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。
- 8) 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 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、前々項7)、前項8)のスライドガラスを置いた後、容器の蓋をしっかりと閉めて密閉状態にする。
- 9) 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。

## ・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、及び、0.1 x SSC, 0.2% SDS)を55 に温めておく。
- ・ハイブリオープンの温度を55 に設定しておく。
- ・プレート遠心機の温度設定を室温(20? 25 )とする。

- 1) 黒色のウォッシュボックス(=スライドガラス用ラック入り、ふた付きの遮光可能な洗浄用の箱)に、55 に温めた1 x SSC, 0.2% SDSを十分量入れる。
- 2) 口の広い容器(タッパーなど)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ガラスを浸してカバーガラスを剥がし、前項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、ガラスがラック内でなるべく等間隔になる様に入れていく。)蓋を閉め、55 ・暗黒下で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のと剥がれやすい。
- 3) 清浄な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、その中に前項2)のラックを手早く移す。蓋を閉め、55 ・暗黒下で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、55 に温めた0.1 x SSC, 0.2% SDSを入れ、その中に前項3)のラックを手早く移し、蓋を閉め、55 ・暗黒下で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室温の0.1 x SSCを入れ、前項4)のラックを手早く移し、液中でラックを10回程度上下させてスライドガラスを洗浄する。
- 6) 別の清浄なウォッシュボックスに室温の0.1 x SSCを入れ、前項5)のラックを手早く移し、液中でラックを10回程度上下させてスライドガラスを洗浄する。
- 7) 別の清浄なウォッシュボックスに室温のMilliQ水を入れ、その中に前項6)のラックを手早く移し、水中でラックを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予め敷いておく。その

上に前項 7 ) のラックを乗せ、900 ~ 1000rpm で 4 分間遠心して、スライドガラス上の水滴を除去する。この後に、スキャニングする。

## ・スキャニング

ここでは、FLA-8000 (FUJIFILM スキャナー) を用いてスキャンする場合を紹介する。

FLA-8000 (FUJIFILM スキャナー) では、スライドキャリアにスライドガラスが最大 5 枚セット可能である。

- 1) まず、スキャナーの電源を入れる。自動的にスキャナーのウォーミングアップ (スキャナー本体の “SCAN ランプ (赤色)” が点滅) が開始される。
- 2) 次に、コンピューターの電源を入れて、スキャナーのウォーミングアップ終了 (スキャナー本体の “POWER ランプ (緑色)” が点灯) まで待つ。
- 3) ソフトウェア “Image Reader FLA-8000 v1.2 ” を立ち上げると、“Carrier Set ” 画面が現れる。この画面に従って、スライドガラス用キャリアの着脱を行う。
- 4) スキャナーから、スライドガラス用キャリアを取り出し、取っ手側を下にして置く。
- 5) 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、キャリアに挿入する。その後、キャリア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。
- 6) 画面上部に操作手順の項目が、フローチャートとして表示される。この順序に従って操作を進めていく。画面左下側にも次の項目 (“Setting ”) が青ボタンで表示される。“Setting ” ボタンへ。
- 7) “Setting ” 画面が現れる。画面左上の “Condisions ” の設定については、“Resolution (μm) ” を ‘10 μm ’ に、“Scan Mode ” を “High Sens. (Slow) ” にセットする。また “Area ” については、“Max ” ボタンを押して最大のスキャン範囲に設定する。画面右側の “Laser ” の波長とスキャンするスライドガラスの枚数・キャリア上の位置を設定する。(前もって画像データの質を確認するために、“Pre View (中央の青ボタン)” を実行しても良い。) “Scan ” ボタンをクリックするとスキャンがスタートする。(スライドガラス 1 枚のスキャニングには約 20 分を要する。)
- 8) 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。
- 9) “Save ” 画面には、設定したスライドガラス枚数分の入力項目が現れる。“Name ” にはスライドガラスのバーコード No. を入力する。ここで入力したバーコード No. が、画像データのファイル名とフォルダ名になる。
- 10) 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、このファイルの名前は “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

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“ ? 635 .img ”というようになる。

- 1 1 ) スキャンが終了したら“ Image Reader FLA-8000 v1.2 ”を終了し、スキャナーの電源を切る。

## ・画像データの数量化

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。

ここでは、Array Gauge (Windows 版、FUJIFILM の解析ソフトウェア) を用いた数量化手法を紹介する。このソフトウェアは、FUJIFILM スキャナーから入力された画像データもしくはTIFF、BMP 形式のアレイ解析を行うことができる。本プロトコールでは、.img ファイル (FUJIFILM スキャナーから入力された画像データの標準フォーマット) と TIFF 形式のファイルを解析する場合を紹介する。

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 担当者にお問い合わせ頂きたい。

なお、異なるアレイを用いた実験で新たに 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。) “ 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“Triming”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。9)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3)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“Rice9000FullAllay1-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、右側上方の“Index Matching Information”の欄へ移動させる。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右側下方の“Gene Information to Display”の欄へ移動させる。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” ボタンからでも可能。9) 参照)。(一般に、Positive control を使うと上手く Normalization 出来ない場合が多い。)
- 8) オプション: 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  
ておき ( 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、4 ) 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) オプション : “ 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、4 ) で Background  
領域を設定しておく必要がある。)

1 0 ) 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

1 1 ) 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。測定結果表を保存 Save するためには、測定結果表のウィンドウをアクテ  
ィブにし、“ Export ” ボタンをクリックして TEXT 形式で保存する。また、アレイ画像を保  
存する場合は、アレイ画像のウィンドウをアクティブにし、“ Save ” ボタンを選択すると  
img ファイルでの保存が、“ Export ” ボタンを選択すると tif ファイルまたは bmp ファイル  
での保存が可能となる。

この後、TEXT 形式等で保存した測定結果表の数値データを用いて、“再現性”の確認・  
Normarization・サンプル間の比較解析 ( マイクロアレイセンターのウェブサイト  
<http://microarray.rice.dna.affrc.go.jp/> のマイクロアレイセンター使用プロトコル  
を参照 ) を行う。

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システム全体のフローチ  
ャートや、マイクロアレイ作製法、スポットティング法、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。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。