

マイクロアレイ実験プロトコル：直接標識法と間接標識法の比較

真保 佳納子¹⁾, 藤井 文子²⁾, 橋本 晶子¹⁾,
島谷 善平¹⁾, 長田 タ子¹⁾, 矢崎潤史²⁾, 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

Here we describe the protocols of indirect labeling methods for cDNA microarray experiments. Also we compared the indirect labeling method used in the Microarray Project of MAFF with other indirect labeling methods as well as a direct labeling method in terms of the reproducibility and the fluorescent signal intensity of microarray data.

Key words: Microarray, Gene expression, Transcription, Functional genomics, Labeling, cDNA, Protocol, Rice

目 次

I. 緒言.....	
II. 実験の流れ<間接標識法>	
実験の流れ<直接標識法>	
III. ターゲットの調製.....	
1. Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit による RNA 間接標識法	
2. RNA 直接標識法.....	
IV. 間接標識法及び直接標識法によって得られたマイクロアレイ実験結果の比較.....	

V. 直接標識法と間接標識法の特徴・相違点	
VI. 他のラベリングキットについて	
1 . Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit による <u>mRNA</u> 間接標識法.....	
2 . Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit による <u>totalRNA</u> 間接標識法.....	
3 . CyScribe cDNA Post Labelling Kit による <u>mRNA</u> 間接標識法	
謝辞	
摘要	
参考文献	
Summary.....	
付録：	
マイクロアレイ ハイブリダイゼーション プロトコル改訂第1版	
I. ターゲットの調製	
1 . Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit による RNA 間接標識法.....	
2 . Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit による <u>mRNA</u> 間接標識法.....	
3 . Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit による <u>totalRNA</u> 間接標識法.....	
4 . CyScribe cDNA Post Labelling Kit による <u>mRNA</u> 間接標識法	
5 . RNA 直接標識法	
II. ハイブリダイゼーション	
III. スライドガラスの洗浄	
IV. スキャニング	
V. 画像データの数量化	

I. 緒 言

1991年（平成2年）に開始された我が国のイネゲノムプロジェクトは、イネゲノム研究の基盤整備を目的とした第1期プロジェクト（1991？1997）に引き続き、現在、イネゲノム全塩基配列の決定とイネ遺伝子の機能解明を目的とした第2期プロジェクト（1998？）が進行中である。イネゲノムの塩基配列解明が進展するに従って、イネにおいても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。

こうした背景をもとに、第2期イネゲノムプロジェクトの一環として、1999年（平成11年）から「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）」が開始された。本プロジェクトの目的は、マイクロアレイ技術を応用して、大量かつ迅速に遺伝子の機能解明を行うことである。本プロジェクトには、マイクロアレイシステムの確立を担う研究課題と、マイクロアレイ技術を利用して遺伝子機能解明を担う研究課題が含まれている。前者の研究課題は、農林水産先端技術研究所（略称：STAFF研究所）遺伝子発現研究チームと、農業生物資源研究所 遺伝子発現研究チームの共同グループ（“マイクロアレイセンター”）が担当している。また後者の研究課題は、農林水産省の研究機関・公立研究所・大学・民間企業の各研究グループが担当している。我々“マイクロアレイセンター”は、本プロジェクトで用いられる cDNA マイクロアレイシステムを構築してきた。特に、より高精度で、かつ、より再現性が高いマイクロアレイデータを追求するために、マイクロアレイ実験における“ターゲット”の調製とハイブリダイゼーション条件について検討を行っている。（“ターゲット”とは、サンプル RNA から調製した蛍光標識核酸の呼称である。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ので注意を要する。）

マイクロアレイ実験における“ターゲット”調製法、即ち、“サンプル RNA の標識（ラベリング）”方法として、直接標識法と間接標識法がある。（“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。）

従来から行われている直接標識法では、CyDye-ヌクレオチドを逆転写反応によって、直接 cDNA に取り込ませる。この際に、逆転写酵素反応の基質として用いられる CyDye-ヌクレオチドは、dNTP よりも分子量が大きいため、下記の障害の原因となる。

- （１） 逆転写酵素の cDNA 合成効率が低下する。従って、この方法では逆転写酵素の cDNA 合成効率を最大限に利用することが困難である。
- （２） 標識効率が CyDye ヌクレオチドの取り込み効率に左右される。つまり、その結果、同じ遺伝子由来の mRNA から合成した cDNA 分子は、それぞれ標識パターンが異なる。

これら（１）（２）の結果として、蛍光量の少ない、即ち、発色レベルの低い“標識 cDNA”が

作製されることになる。

一方、間接標識法は、一般的に直接標識法よりも高効率・高再現性である、と言われている。間接標識法では、まず cDNA 合成時にアミノアリル -dUTP (分子量はほぼ dNTP と同じ) を取り込ませる。次に、合成 cDNA に取り込まれたアミノ官能基と N-hydroxysuccinimide (N-ヒドロキシサクシニミド) で活性化されている蛍光色素とを結合反応させることによって、cDNA を蛍光標識する。つまり、逆転写酵素反応の基質としてアミノアリル-dUTP を使うので、逆転写酵素の反応効率を低下させずに、蛍光量の多い、即ち、発色レベルの高い“標識 cDNA”を作製することが可能になる。また、標識効率が CyDye ヌクレオチドの取り込み効率に左右されないため、最終的に均一に標識された“標識 cDNA”を作製することができる。

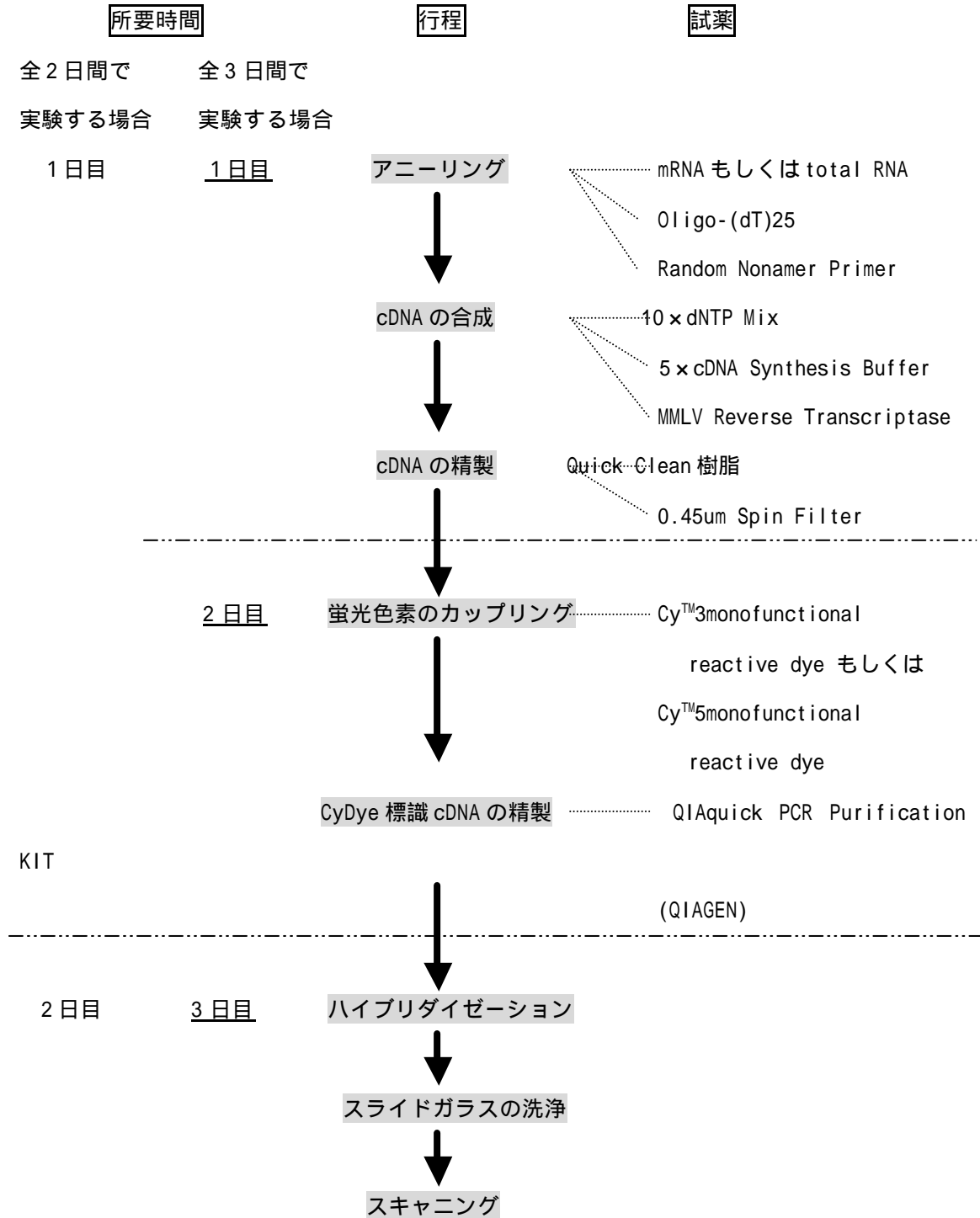
現在、間接標識法を用いる数種のラベリングキットが販売されている。我々は実際、いくつかのキットを比較検討し、その結果に基づいて、簡便かつ好結果の得られる Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit (CLONTECH 社) を、現在マイクロアレイプロジェクトに用いている。

本稿では、まず CLONTECH 社の Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit を用いた間接標識法のプロトコルを、従来用いてきた直接標識法のプロトコルと共に紹介し、次に、両標識法によって得られたマイクロアレイ実験データに基づき、両者の標識効率を比較した結果を報告する。更に、上記キットの代替製品である CLONTECH 社の Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit のプロトコル、並びに Amersham Biosciences 社の CyScribe cDNA Post Labelling Kit のプロトコルについても記述した。

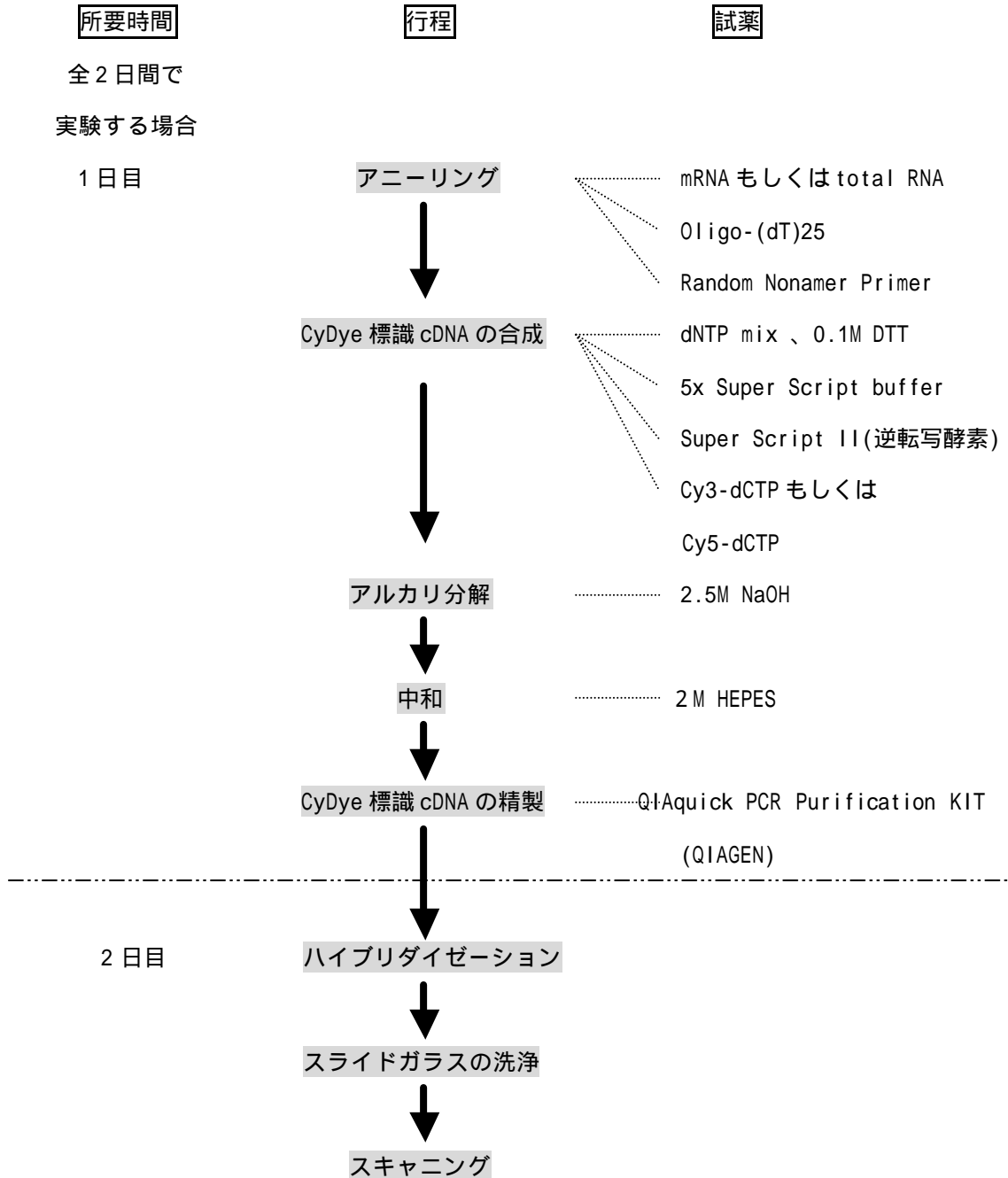
また末尾には、付録として、現在“マイクロアレイセンター”で用いているプロトコル(間接標識法からハイブリダイゼーション・スキャニング・蛍光データの定量化まで)を「マイクロアレイ ハイブリダイゼーションプロトコル(改訂第1版)」として、まとめて記した。併せて参照して頂きたい。

II. 実験の流れ

< 間接標識法 >



< 直接標識法 >



III . 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 沈殿の際には 4 、スピンドダウンの際には室温 (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 ₂ 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、その後スピンドダウンする。

(mRNA もしくは total RNA を使用する。)

mRNA (+dH ₂ O*)	5μl (2μg を含む)	—
total RNA (+dH ₂ O*)	—	10μl (40μg を含む)
Control RNA (x5000 希釈)	10μl	10μl
Oligo-(dT)25	5μl	5μl
Random Nonamer Primer	5μl	—
Total	25μl	25μl

(*RNA 溶液の濃度によっては、RNA 溶液を濃縮するか、或いは、dH₂O 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、冒頭の項 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) 0.45μm 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、すぐに次節(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 CyTM3 monofunctional reactive dye (PA23001) 及び CyTM5 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) 前節(1)-16) の cDNA サンプルに、Deionized H₂O 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。

3) 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。

4) 3M Sodium Acetate 2μl と 100% EtOH 50μl を加え、ボルテックスにて混合する。

5) 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。

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) ペレットを風乾、もしくは遠心濃縮機を用いて乾燥させ、Deionized H₂O 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 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。（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。

ハイブリダイゼーション以降の実験手順については、末尾「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）」（本稿 41 ページ以降）を参照のこと。

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。

・ 2.5M NaOH を予め調製しておく。

NaOH 1g を滅菌水 8ml に溶解後、10ml にメスアップして濾過滅菌する。

* 室温で 3 ヶ月間保存可能。

・ 2M HEPES を予め調製しておく。

HEPES free acid 4.77g を滅菌水 8ml に溶解後、10ml にメスアップして濾過滅菌する。

* 室温で 3 ヶ月間保存可能。

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 ₂ O*)	10μl (2μg を含む)	—
total RNA (+dH ₂ O*)	—	12μl (40μg を含む)
Control RNA (x5000 希釈)	10μl	10μl
Oligo-(dT)25	2μl	2μl
Random Nonamer Primer	2μl	—
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、dH₂O 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 分間ブリアニリングさせる。

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 First Strand buffer	8μl
0.1M DTT	4μl
dNTP mix	2μl
Cy3-dCTP もしくは Cy5-dCTP (*)	2μl
Super Script II (200units/μl) (* *)	2μl
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 加えて緩やかにピペティング後、スピンドウンする。

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。

(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 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。(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。

ハイブリダイゼーション以降の実験手順については、末尾「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）」(本稿 41 ページ以降) を参照のこと。

IV. 間接標識法及び直接標識法によって得られたマイクロアレイ実験結果の比較

1 . 供試 RNA サンプル

この実験に用いたサンプルは、イネの培養細胞カルスより抽出・精製した mRNA である。間接標識法、並びに、直接標識法にそれぞれ 2μg ずつ mRNA を用いた。

2 . 供試 cDNA マイクロアレイ

我々の用いたマイクロアレイでは、RGP (Rice Genome research Program) で得られた、イネの独立 EST*8987 クローンがスライドガラスにスポットされている。これらのクローンは、第 1 図に示す様に 2 枚のスライドガラス (1st slide glass と 2nd slide glass) にわたってスポットされている。1st slide glass には、4544 cDNA クローンが 2 ケ所 (spot1 : スライドガラス左側 ; spot2 : スライドガラス右側) にスポットされている 。また、2nd slide glass には、4443 cDNA クローンが 2 ケ所 (spot1 : スライドガラス左側 ; spot2 : スライドガラス右側) にスポットされている (第 1 図) 。

3 . 間接標識法と直接標識法によって得られた蛍光強度の比較

間接標識法と直接標識法の実験結果から得られた“ 再現性 ” を用いて、両標識法のシグナル強度を比較した。

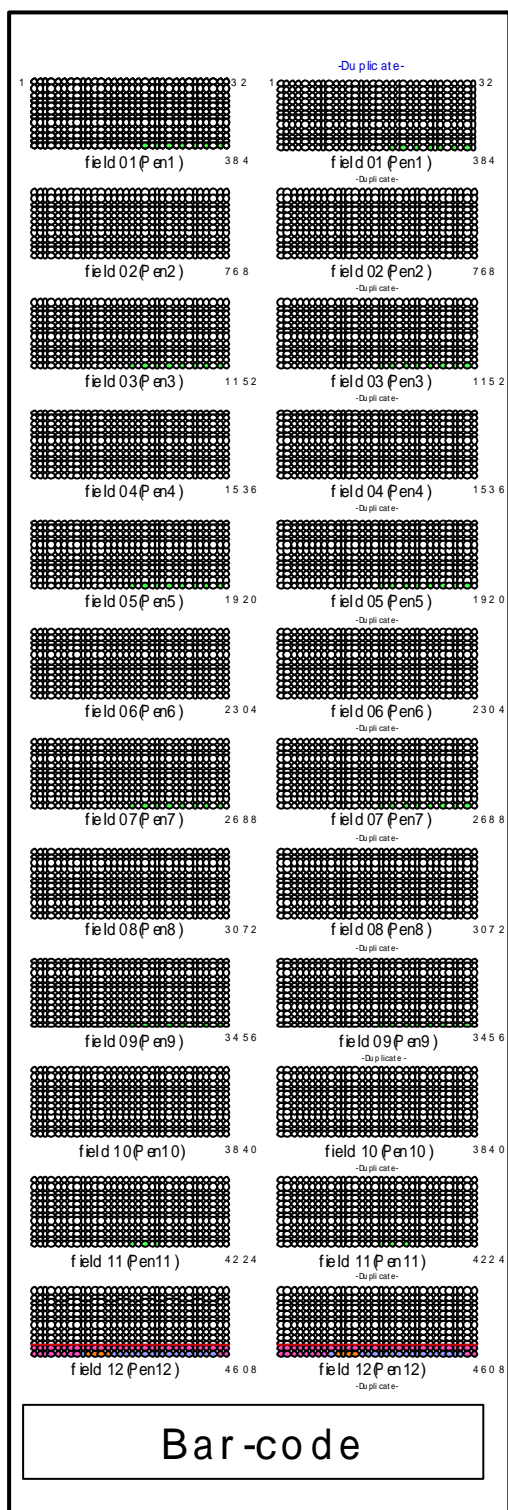
蛍光シグナルの数量化を終了した後、スライドガラス内における、左右スポットの蛍光強度を比較し、“ 再現性 ” を調べた。

ここでは、“再現性”を次のように定義する。まず、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カッタープロットする。数量化した蛍光強度が、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。

脚注*

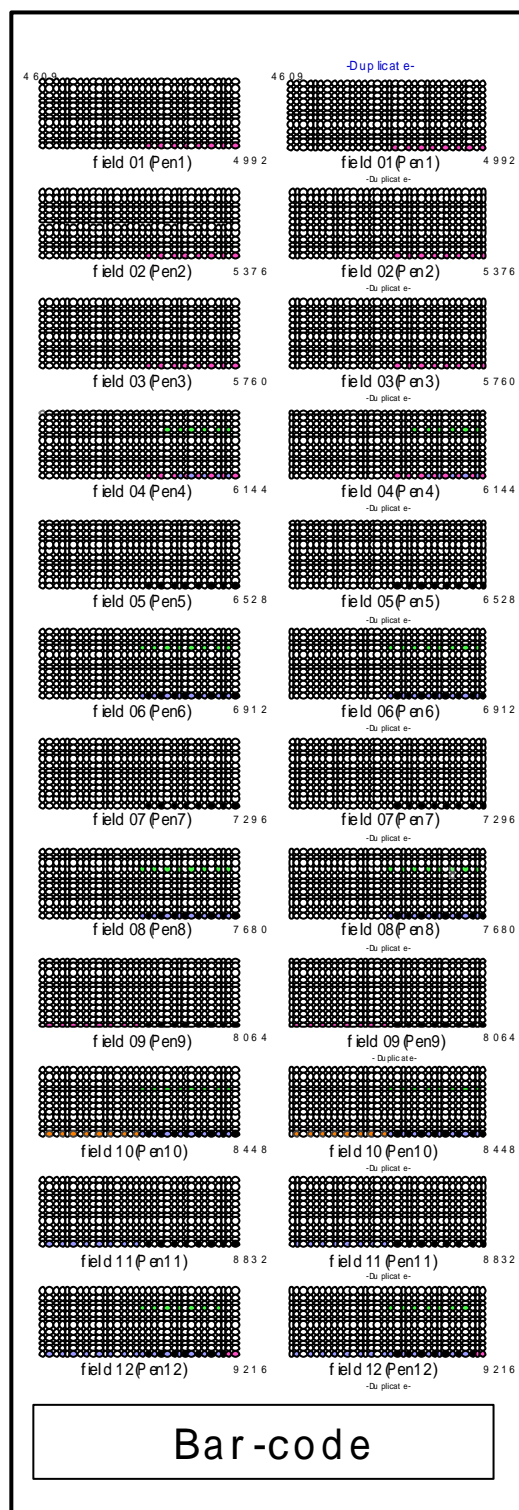
EST：網羅的に単離・解析されたcDNAクローン

G lass slide 1-st harf



- Positive control
- Negative control
- Forbidden clone
- Water
- no clone

G lass slide 2-nd harf



第 1 図 本研究で用いたマイクロアレイのイメージ

4. 比較結果

間接標識法と直接標識法のそれぞれの“再現性”を第2図と第3図に示す。第2図は1st slide glassの、第3図は2nd slide glassの“再現性”を示す。第2図と第3図において、A? CはCy5の“再現性”、D? FはCy3の“再現性”を示す。グラフCは“グラフAとBを重ねたもの”であり、グラフFは“グラフDとEを重ねたもの”である。これらのグラフにおいて、青点は間接標識法、赤点は直接標識法を示す。また、X軸はspot1の、Y軸はspot2の蛍光強度を示す。Y=Xの直線上にある点は、spot1とspot2の蛍光強度が等しい場合を示す。Y=Xの線の1つ外側にある点線、及び、さらにもう1つ外側にある実線は、それぞれspot1とspot2の蛍光強度比が2倍から0.5倍の範囲、及び、3倍から1/3倍の範囲を示す。

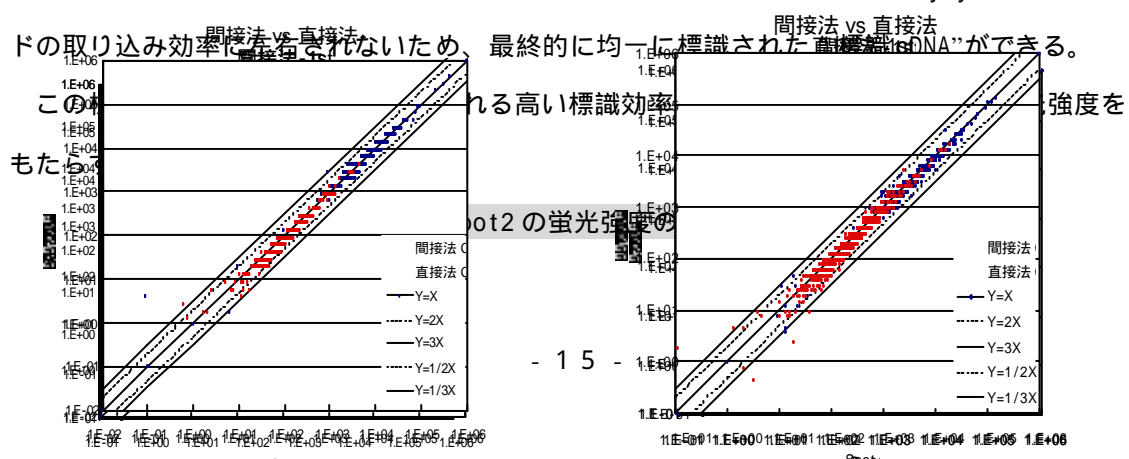
これらの結果から、間接標識法を用いた場合、直接標識法と同程度に良好な“再現性”が得られることが判った。また、直接標識法と比べて間接標識法を用いた場合の方が、蛍光色素Cy3とCy5共に、シグナル強度がより高くなることが判った。

5. 考察

我々の得た結果から、間接標識法を利用することにより、直接標識法よりも高い標識効率を得られることが明らかになった。

直接標識法では、cDNA合成時にCyDye-ヌクレオチドを直接取り込ませる。この際、逆転写酵素反応の基質となるCyDye-ヌクレオチドは、dNTPよりも分子量が大きいので、逆転写酵素の効率が低下するため、結果として蛍光量の少ない、即ち、発色レベルの低い“標識cDNA”が作製されることになる。

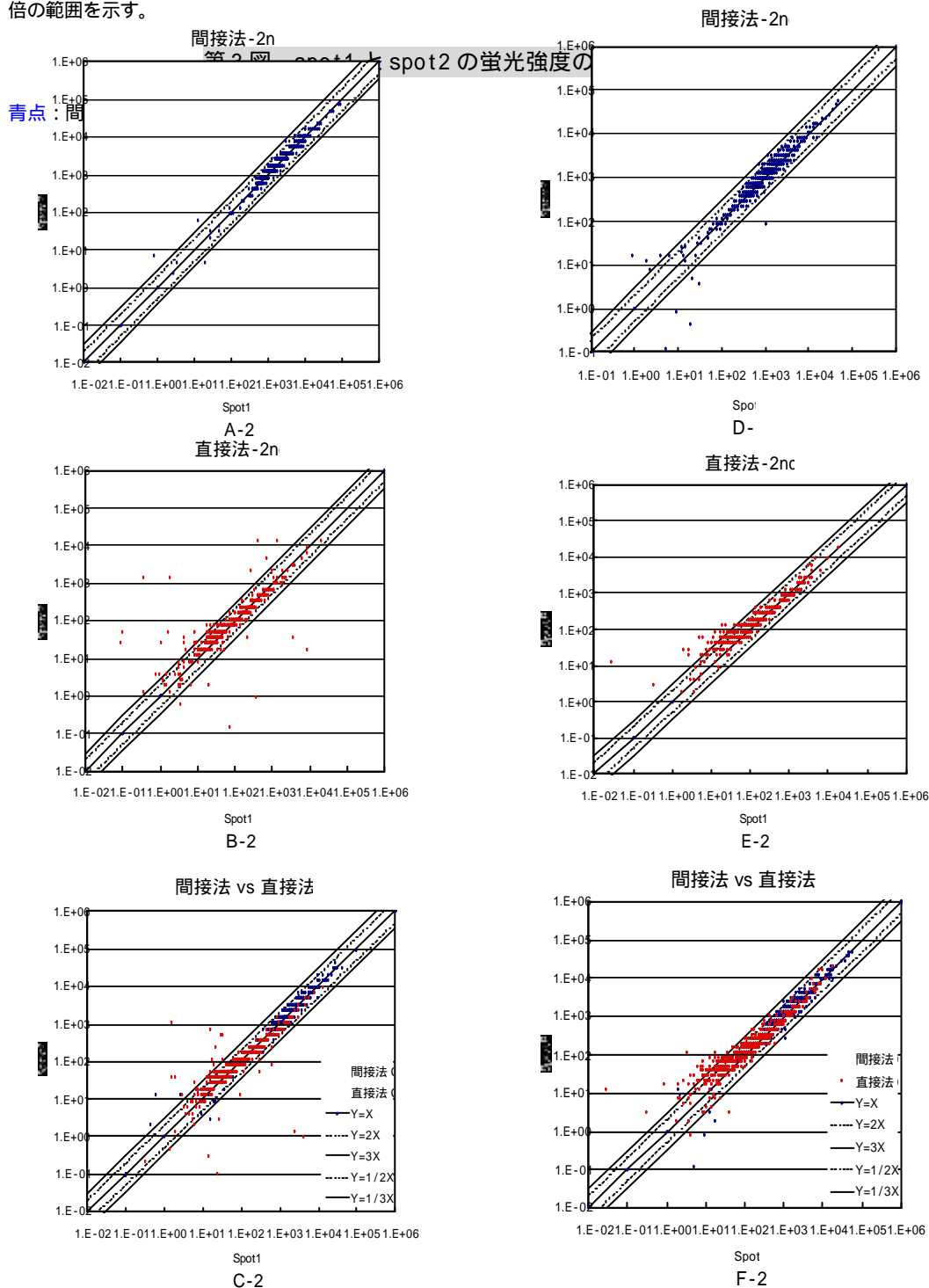
間接標識法では、まずcDNA合成時にアミノアリル-dUTP（分子量はほぼdNTPと同じ）を取り込ませる（アミノアリルは第一脂肪族アミノ基）。次に、合成したcDNAとN-hydroxysuccinimide（N-ヒドロキシサクシニミド）で活性化されている蛍光色素とを、アミノ官能基との反応により結合させる。つまり、逆転写酵素反応の基質としてアミノアリル-dUTPを使うので、逆転写酵素反応の効率が低下せず、従って、直接標識法に比べ蛍光量の多い、即ち、発色レベルの高い“標識cDNA”が作製される。また、標識効率がCyDye-ヌクレオチ



青点：間接標識法， 赤点：直接標識法

X 軸：spot1 の蛍光強度， Y 軸：spot2 の蛍光強度

Y=X の直線上にある点は、spot1 と spot2 の蛍光強度が等しい場合を示す。Y=X の線の 1 つ外側にある点線、及び、さらにもう 1 つ外側にある実線は、それぞれ spot1 と spot2 の蛍光強度比が 2 倍から 0.5 倍の範囲、及び、3 倍から 1/3 倍の範囲を示す。



X 軸：spot1 の蛍光強度， Y 軸：spot2 の蛍光度

Y=X の直線上にある点は、spot1 と spot2 の蛍光強度が等しい場合を示す。Y=X の線の 1 つ外側にある点線、及び、さらにもう 1 つ外側にある実線は、それぞれ spot1 と spot2 の蛍光強度比が 2 倍から 0.5 倍の範囲、及び、3 倍から 1/3 倍の範囲を示す。

V. 直接標識法と間接標識法の特徴・相違点

アニーリング時

	間接法	直接法
Random Nonamer Primer		
の使用量	5 μ l	2 μ l
<hr/>		
Anchored oligo-(dT)25		
の使用量	5 μ l	2 μ l
<hr/>		
備考	50 μ l の cDNA 合成反応液中の最終濃度が 5 μ M となるように十分量のプライマーを加える。	上記の 2 つのプライマー濃度が不明なため cDNA 合成反応液中の最終濃度がわからない。

逆転写酵素

	間接法	直接法
使用する逆転写酵素	MMLV	Super Script II RNase H ⁻
とその使用量	Reverse Transcriptase (200units/ μ l)	Reverse Transcriptase
(200units/ μ l)	2.5 μ l (500units)	2 μ l
(400units)		
備考	直接法と間接法ともに、MMLV 由来の逆転写酵素である。	

cDNA 合成と蛍光色素のカップリング

	間接法	直接法
cDNA 合成ステップ	アミノアリル -dUTP (第一脂肪族アミノ基) を取り込ませる。 (cDNA 合成の次のステップで蛍光色素をカップリングする)	CyDye 標識ヌクレオチドを直接取り込ませる。
使用する蛍光色素と その使用量	Cy TM 3monofunctional reactive dye + DMSO もしくは Cy TM 5monofunctional reactive dye + DMSO (225nmoles/45μl) 10μl (50nmoles) (2nmoles)	Cy-3 dCTP もしくは Cy-5 dCTP (25nmoles/25μl) 2μl
備考	本法の蛍光色素は、 N-hydroxysuccinimide で活性化されている蛍光色素 である。	本法の蛍光色素は、 蛍光標識ヌクレオチド である。

First-Strand cDNA 合成後の RNA の分解・除去

間接法	直接法
RNA の分解・除去を行わない。	RNA をアルカリ (2.5M NaOH) 分解し、

酸(2M HEPES)で中和して除去する。

備考 “正式な” 間接法のプロトコールでは、RNase H⁻と0.5M EDTAでRNAの除去を行っている。我々は、RNase H⁻の使用を避けるためRNAの分解・除去を行っていない。間接法では直接法と比べてCyDyeの取り込み効率が非常に高いため、アレイ実験結果への影響が見られないからである。

VI. 他のラベリングキットについて

1. Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit

(CLONTECH 社 : K1860-1) による mRNA 間接標識法

本キットは、III.1. で紹介した Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit (CLONTECH 社 : K1037-1) の代替製品として販売されているものである。

ここでは、mRNA を用いた、イネ 9000 cDNA アレイ 1 セット分 (2 枚 1 組) の 2 色蛍光法プロトコールを紹介する。

(本キットを用いて totalRNA をラベルする場合は、次項 VI.2. を参照のこと。)

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 沈殿の際には 4 、スピンドダウンの際には室温 (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。

作成後は氷上で維持する。

5 × First-Strand Buffer	4μl
10 × dNTP Mix	2μl
DTT	2μl
Deionized H ₂ O	1μl
PowerScript™ Reverse Transcriptase (*)	1μl
<hr/>	
Total	10μl

(*) PowerScript™ 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。

(このプロトコールでは mRNA を使用する。)

mRNA (+dH ₂ O*)	3μl (2μg を含む)
Control RNA (x1000 希釈)	2μl
Random Nonamer Primer	5μl
<hr/>	
Total	10μl

(*RNA 溶液の濃度によっては、RNA 溶液を濃縮するか、或いは、dH₂O 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 10μl 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、冒頭の項 1) の Master Mix 10μl を加えて混合し、スピンドウンする。(合計 20μl)
- 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 2μl 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) 0.22μm 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 2.2μl を加え、ボルテックスにて攪拌する。
- 11) 氷冷した 100% EtOH 55μl 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、すぐに次節(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 CyTM3 monofunctional reactive dye (PA23001) 及び CyTM5 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 を独自に使用しない。)
- ・色素を加えた後は遮光する。

1) 前節(1) - 16) の cDNA サンプルに、Deionized H₂O 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。

3) 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。充分に混ぜ、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 2μl と 100% EtOH 50μl を加え、ボルテックスにて混合する。

5) 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。

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) ペレットを風乾、もしくは遠心濃縮機を用いて乾燥させ、Deionized H₂O 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。

注意事項：

・ウォッシュステップは、700 μ l の PE Buffer で3 回行う。

・最後の溶出ステップは、50 μ l の dH₂O で2 回溶出を行う。

（この際、dH₂O 50 μ l をカラムに加えた後、1 分間放置する。）

2) 前項1) で精製・溶出した 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。（この際、遠心濃縮機を遮光し暗所にしておく。）

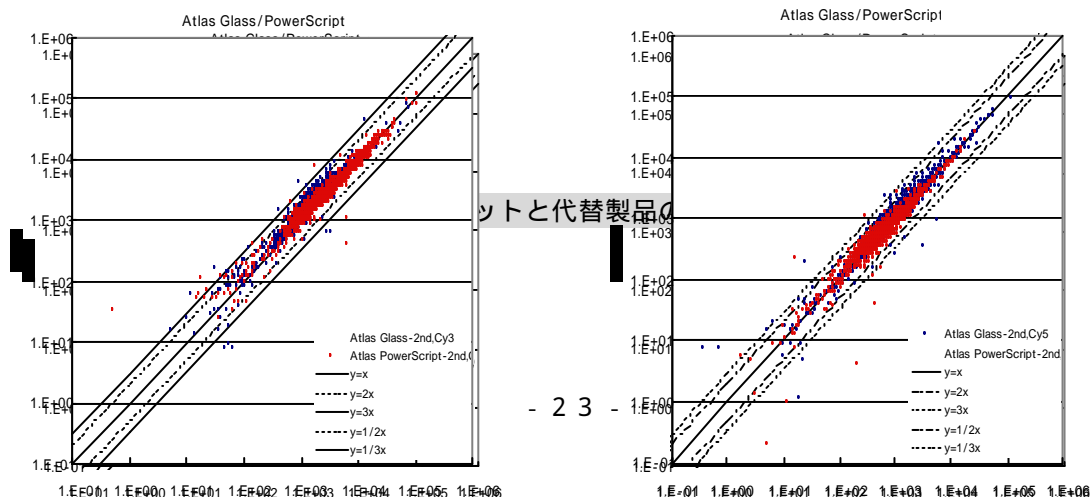
* この精製プローブは遮光して-20 で保存すれば数ヶ月間安定である。

(4) mRNA 間接標識法による従来のキットとその代替製品の蛍光強度の比較結果

従来のキット Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit (CLONTECH 社：K1037-1) と、その代替製品 Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit (CLONTECH 社：K1860-1) を用いて、mRNA 間接標識法による蛍光強度を比較した。その結果を第4 図に示す。

第4 図に示したグラフでは、青点は従来のキットの“再現性”を示し、赤点は代替製品の“再現性”を示している。また、これらのグラフの X 軸は spot1 の、Y 軸は spot2 の蛍光強度を示す。Y=X の直線上にある点は、spot1 と spot2 の蛍光強度が等しい場合を示す。Y=X の線の1 つ外側にある点線、及び、さらにもう1 つ外側にある実線は、それぞれ spot1 と spot2 の蛍光強度比が2 倍から0.5 倍の範囲、及び、3 倍から1/3 倍の範囲を示す。

第4 図に示した結果から、従来のキットとその代替製品では、同程度に良好な“再現性”が得られることが判った。



青点：従来のキット (Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit)

赤点：代替製品 (Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit)

X 軸：spot1 の蛍光強度，Y 軸：spot2 の蛍光強度

Y=X の直線上にある点は、spot1 と spot2 の蛍光強度が等しい場合を示す。Y=X の線の 1 つ外側にある点線、及び、さらにもう 1 つ外側にある実線は、それぞれ spot1 と spot2 の蛍光強度比が 2 倍から 0.5 倍の範囲、及び、3 倍から 1/3 倍の範囲を示す。

2. Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit

(CLONTECH 社：K1860-1)による totalRNA 間接標識法

本キットは、III.1. で紹介した Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit (CLONTECH 社：K1037-1) の代替製品として販売されているものである。

ここでは、totalRNA を用いた、イネ 9000 cDNA アレイ 1 セット分 (2 枚 1 組) の 2 色蛍光法プロトコールを紹介する。

重要：本キットを用いて totalRNA をラベルする場合は、逆転写酵素として SUPER SCRIPT™ II RNaseH⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO BRL 社)を別途購入して用いること。本キット付属の逆転写酵素 (PowerScript™ Reverse Transcriptase) を totalRNA のラベリングには用いないこと。(totalRNA を PowerScript™ Reverse Transcriptase でラベルしても、発色レベルの極めて低い標識産物しか得られないので、マイクロアレイ実験には適さない。既に筆者らは実際に実験を行って、この点を確認している。)

実験開始前の準備：

- ・本キット以外に SUPER SCRIPT™ II RNaseH⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO BRL 社)を用意する。
- ・ヒートブロックの温度をそれぞれセットしておく。(42、70、95)
- ・微量遠心機の温度設定は、EtOH 沈殿の際には 4、スピンドアウンの際には室温 (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。

作成後は氷上で維持する。

5×First Strand Buffer (*)	10μl
0.1M DTT (*)	5μl
10×dNTP Mix	5μl
Deionized H ₂ O	2.5μl
Super Script II (200units/ul) (* *)	2.5μl
<hr/>	
Total	25μl

(*) 5×First Strand Buffer と 0.1M DTT は、SUPER SCRIPT™ II RNaseH⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO BRL 社) に同梱されているものを使用する。

(* *) Super Script II は別途購入して用いる。本キット付属の逆転写酵素(PowerScript™ Reverse Transcriptase) は使用しないこと。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。

- 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。

(このプロトコールでは total RNA を使用する。)

total RNA (+dH ₂ O*)	10μl (40μg を含む)
Control RNA (x5000 希釈)	10μl
Oligo-(dT)25	5μl
<hr/>	
Total	25μl

(* RNA 溶液の濃度によっては、RNA 溶液を濃縮するか、或いは、dH₂O 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 25 μ l に調製する。)

- 3) 70 で 5 分間加熱する。
- 4) 前項 3) を 42 まで冷却し、冒頭の項 1) の Master Mix 25 μ l を加えて混合し、スピンドウンする。(合計 50 μ l)
- 5) 42 で 2.5 時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 5 μ l 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) 0.22 μ m 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 5.5 μ l を加え、ボルテックスにて攪拌する。
- 11) 氷冷した 100% EtOH 137.5 μ l 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 \times Fluorescent Labeling Buffer 10 μ l 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 \times Fluorescent Labeling Buffer を加えたら、すぐに次節(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 CyTM3 monofunctional reactive dye (PA23001) 及び CyTM5 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) 前節(1) - 16) の cDNA サンプルに、Deionized H₂O 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。
 - 3) 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。
 - 4) 3M Sodium Acetate 2μl と 100% EtOH 50μl を加え、ボルテックスにて混合する。
 - 5) 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。
 - 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) ペレットを風乾、もしくは遠心濃縮機を用いて乾燥させ、Deionized H₂O 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。

注意事項：

- ・ウォッシュステップは、700μl の PE Buffer で 3 回行う。
- ・最後の溶出ステップは、50μl の dH₂O で 2 回溶出を行う。
(この際、dH₂O 50μl をカラムに加えた後、1 分間放置する。)

- 2) 前項 1) で精製・溶出した 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。(この際、遠心濃縮機を遮光し暗所にしておく。)

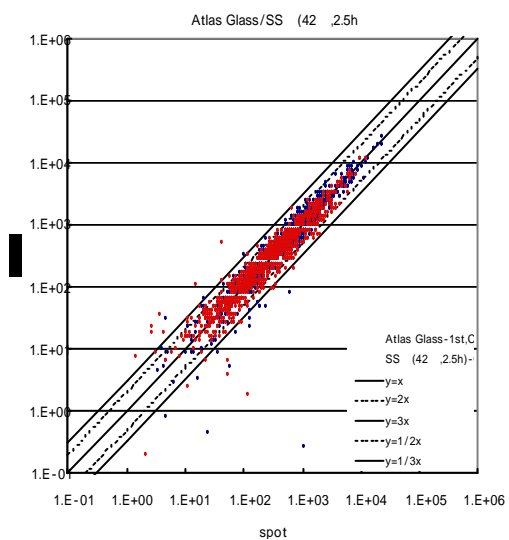
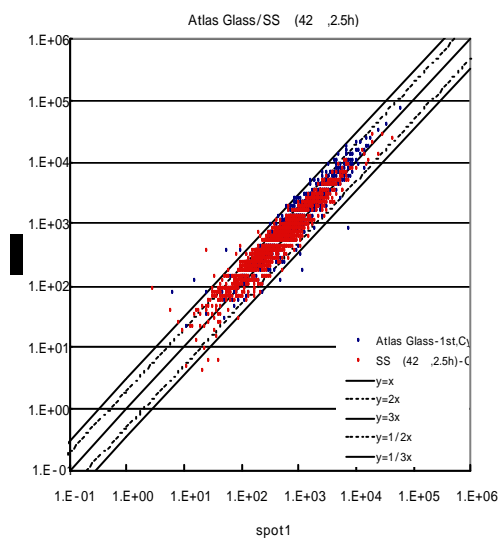
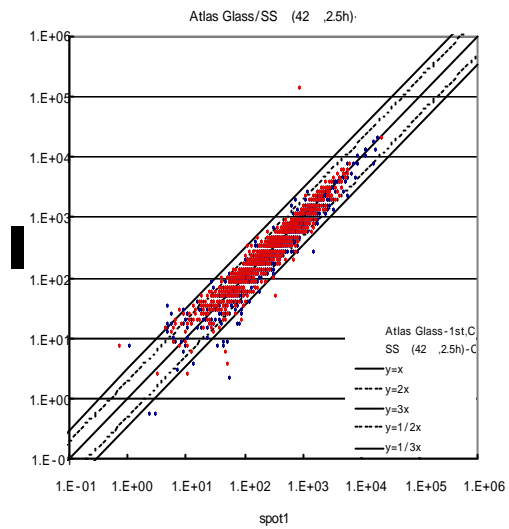
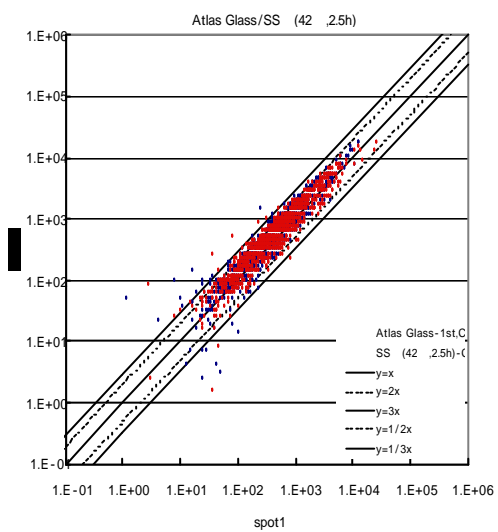
* この精製プローブは遮光して-20℃で保存すれば数ヶ月間安定である。

(4) totalRNA 間接標識法による従来のキットとその代替製品の蛍光強度の比較結果

従来のキット Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit (CLONTECH 社 : K1037-1) と、その代替製品 Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit (CLONTECH 社 : K1860-1) を用いて、totalRNA 間接標識法による蛍光強度を比較した。その結果を第 5 図に示す。

第 5 図に示したグラフでは、青点は従来のキットの“再現性”を示し、赤点は代替製品の“再現性”を示している。また、これらのグラフの X 軸は spot1 の、Y 軸は spot2 の蛍光強度を示す。Y=X の直線上にある点は、spot1 と spot2 の蛍光強度が等しい場合を示す。Y=X の線の 1 つ外側にある点線、及び、さらにもう 1 つ外側にある実線は、それぞれ spot1 と spot2 の蛍光強度比が 2 倍から 0.5 倍の範囲、及び、3 倍から 1/3 倍の範囲を示す。

第 5 図に示した結果から、従来のキットとその代替製品では、同程度に良好な“再現性”が得られることが判った。



第5図 従来のキットと代替製品の比較結果<totalRNA>

青点：従来のキット (Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit)

赤点：代替製品 (Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit)

X 軸：spot1 の蛍光強度，Y 軸：spot2 の蛍光強度

Y=X の直線上にある点は、spot1 と spot2 の蛍光強度が等しい場合を示す。Y=X の線の 1 つ外側にある点線、及び、さらにもう 1 つ外側にある実線は、それぞれ spot1 と spot2 の蛍光強度比が 2 倍から 0.5 倍の範囲、及び、3 倍から 1/3 倍の範囲を示す。

3 . CyScribe cDNA Post Labelling Kit (Amersham Biosciences 社：RPN5660)

による mRNA 間接標識法

ここでは、mRNA を用いた、イネ 9000 cDNA アレイ 1 セット分 (2 枚 1 組) の 2 色蛍光法プロトコールを紹介する。

重要：本キットは、totalRNA のラベリングには用いないこと。(totalRNA のラベリングに使用しても、発色レベルの極めて低い標識産物しか得られないため、マイクロアレイ実験には適さない。)

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)
- ・ 微量遠心機の温度設定は、室温 (20? 25) とする。
- ・ 予め、スピンドウンしておいた AA-dUTP チューブに nuclease free water 30ul を加えて溶かし、氷上に置いておく。(このチューブには作製した日付を記入しておくこと。)
 - * AA-dUTP 溶液は、-15? -30 にて 1 カ月間保存可能。
- ・ 2.5M NaOH を予め調製しておく。

NaOH 1g を滅菌水 8ml に溶解後、10ml にメスアップして濾過滅菌する。

 - * 室温で 3 ヶ月間保存可能。
- ・ 2M HEPES を予め調製しておく。

HEPES free acid 4.77g を滅菌水 8ml に溶解後、10ml にメスアップして濾過滅菌する。

 - * 室温で 3 ヶ月間保存可能。
- ・ 予め、0.1M Sodium Bicarbonate (NaHCO₃) pH9.0 及び 4M Hydroxylamine HCl を作製しておく。(後述の [追記 1：試薬の作製] を参照)

注意事項：

- ・ 試薬類の作製は氷上で行う。
- ・ 精製ステップは、プローブの標識効率に大きく影響があるので丁寧に行う。
- ・ Cy3 用のチューブと Cy5 用のチューブをそれぞれ用意して、別々に下記のラベリング操作を行う。[(2) - 5)まで]

(1) cDNA の合成と精製

1) 氷上で、1.5ml チューブに以下の試薬を加えて緩やかにピペッティングして混合する。

mRNA	8μl (2μg を含む)
Control RNA (x5000 希釈)	10μl
Random nonamers	2μl
Anchored oligo(dT)	2μl
<hr/>	
Total volume	22μl

2) 70 で5分間インキュベートする。

3) 室温で10分間冷却後、スピンドウンする。

4) 氷上で、前項3)のチューブに以下の試薬を加える。この際、酵素は一番最後に加えること。

5 × CyScript buffer	8μl
0.1M DTT	4μl
Nucleotide mix	2μl
AA-dUTP	2μl
CyScript reverse transcriptase(＊)	2μl
<hr/>	
Total volume	18μl

(＊) CyScript reverse transcriptase は加える直前に-30 から取り出し、使用後は直ちに冷凍庫に戻すこと。

5) 前項4)を、より緩やかにピペッティングを行うかピペットチップの先で攪拌する。

その後スピンドウンする。(合計 40 μ l)

* 激しく攪拌すると、酵素が失活するおそれがあるので注意する。

6) 42 で 1.5 時間インキュベートする。

7) 2.5M NaOH 4 μ l を加えてボルテックス後、スピンドウンする。

8) 37 で 15 分間インキュベートする。

9) 2M HEPES 20 μ l を加えてボルテックス後、スピンドウンする。

* この cDNA 溶液は -15? -30 で保存できる。

10) QIAGEN 社の QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製する。(1 回目の精製。後述の【追記 2: QIAquick PCR Purification Kit による精製】を参照。)

* このステップはプローブの標識効率に大きく影響を及ぼすので丁寧に行う。

11) 精製後、遠心濃縮機などを用いてドライアップする。

* この際、乾燥させすぎないように注意する。

12) 前項 11) に nuclease free water 30 μ l を加え、ピペティングによって完全に溶解させる。

(2) 蛍光色素のカップリングと精製

1) まず、蛍光色素溶液を作製する。(重要: 作製は、標識反応直前に行う。) 本キット内には、予め CyDye 入りチューブが含まれている。本プロトコールの場合、1 サンプルあたり mRNA 2 μ g を使用しているので、1 サンプルあたり CyDye 入りチューブが 2 本必要である。

Cy3 溶液 (mRNA 2 μ g 用の分量):

Cy3 reactive dye (本キットに含まれている) を 2 本使用する。

1 本あたり 0.1M Sodium Bicarbonate (NaHCO₃) pH 9.0 を 15 μ l 加え、しっかりとピペティングして溶かす。

Cy5 溶液 (mRNA 2 μ g 用の分量):

Cy5 reactive dye (本キットに含まれている) を 2 本使用する。

1 本あたり 0.1M Sodium Bicarbonate (NaHCO₃) pH 9.0 を 15 μ l 加え、しっかりとピペティングして溶かす。

* サンプル量単位当たりの CyDye 使用本数: mRNA サンプル 1 μ g に対して、本キット付属の CyDye を 1 本使用する。

* 結露を防ぐため CyDye は未開封のまましばらく室温に放置しておき、使用直前に懸濁する。懸濁後は直ちに使用する。

* CyDye の懸濁が不十分だと、標識反応の効率が下がるので注意する。

- 2) 前節(1)-12)の Cy3 用チューブと Cy5 用チューブそれぞれに、前項 1)の Cy3 溶液(2 本分 : 30 μ l)、或いは Cy5 溶液(2 本分 : 30 μ l)を加えて、混合する。(合計 60 μ l)

注意事項 : 色素を加えた後は遮光する。

- 3) 室温・暗所で 1 時間インキュベートする。
- 4) 4M HydroxylamineHCl を 30 μ l 加えて混ぜ、室温・暗所で 15 分間インキュベートする。
- 5) QIAGEN 社の QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製する。(2 回目の精製。後述の【追記 2 : QIAquick PCR Purification Kit による精製】を参照。)
- 6) 前項 5)で精製・溶出した 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。(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。

[追記 1 : 試薬の作製]

- 0.1M Sodium Bicarbonate (重炭酸塩 : NaHCO_3) pH 9.0 100ml

Sodium Bicarbonate	0.84g
滅菌水	+
<hr/>	
100ml	

Sodium Bicarbonate を滅菌水 90ml に溶解し、1M NaOH を用いて pH9.0 に調整する。

その後、100ml にメスアップしてよく混合し、0.45 ミクロンのフィルターにかけて濾過滅菌する。

* 分注して -15 ? -30 で保存する。(3 カ月間保存可能)

* 保存が悪く、また調製後長時間経過している溶液の使用は、CyDye カップリング反応の効率を低下させるので使用しない。

* 溶液の pH は、CyDye カップリング反応の効率に影響するので、使用前に pH を確認すること。

- 4M Hydroxylamine HCl 100ml

Hydroxylamine HCl	27.8g
滅菌水	+
<hr/>	
100ml	

Hydroxylamine HCl を滅菌水に溶解後、100ml にメスアップしてよく混合する。

その後 0.45 ミクロンのフィルターにかけて濾過滅菌する。

* 室温で 3 カ月間保存可能。

【追記2：QIAquick PCR Purification Kit による精製】

注意事項：1 回目の精製と2 回目の精製では、精製の最初の行程1) で手順が異なるので注意すること。

1) 【1 回目の精製：(1) -10)】

AA 修飾 cDNA 溶液に PB buffer 320 μ l を加えてピペッティングでよく混ぜる。

【2 回目の精製：(2) -5)】

CyDye 標識 cDNA 溶液に PB buffer 450 μ l を加えてピペッティングでよく混ぜる。

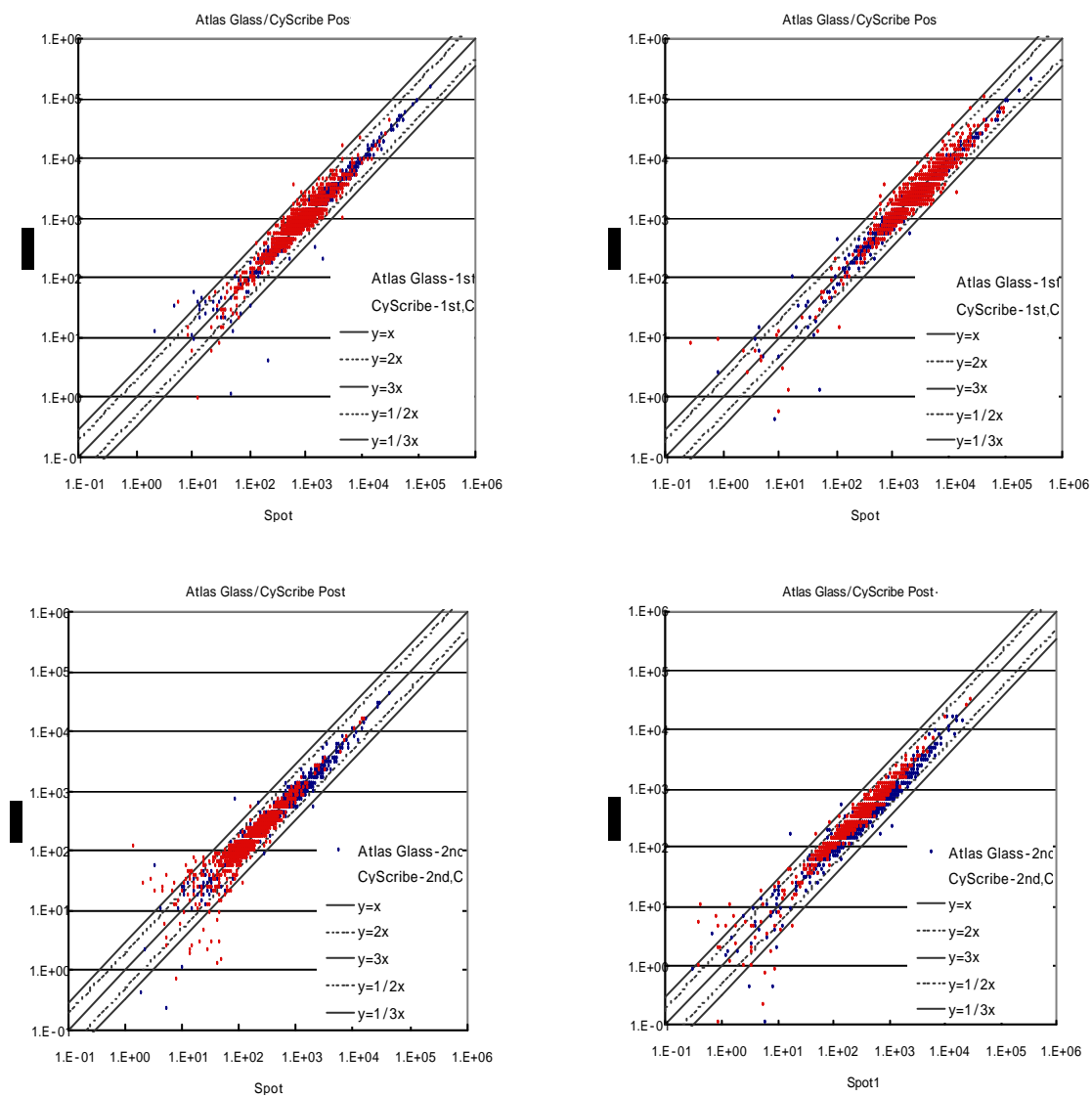
- 2) 2ml のコレクションチューブにスピncラムをセットして、前項1) をスピncラムに移す。
- 3) 13,000rpm (10,000 \times g) で60 秒間遠心する。
- 4) コレクションチューブ内のフロースルー液を捨て、スピncラムを再度セットする。
- 5) PE buffer 750 μ l をスピncラムに加えて、13,000rpm (10,000 \times g) で60 秒間遠心する。
- 6) コレクションチューブ内のフロースルー液を捨て、スピncラムを再度セットする。
- 7) PE buffer 400 μ l をスピncラムに加えて、13,000rpm (10,000 \times g) で60 秒間遠心する。
- 8) コレクションチューブ内のフロースルー液を捨て、スピncラムを再度セットする。
- 9) 13,000rpm (10,000 \times g) で60 秒間遠心して、残留 buffer を完全に除去する。
- 10) スピncラムを1.5ml チューブにセットし、滅菌水 50 μ l を加えて1 分間インキュベートする。
- 11) 13,000rpm (10,000 \times g) で60 秒間遠心して、cDNA を溶出する。

(3) mRNA間接標識法による Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit (CLONTECH 社 : K1037-1) と CyScribe cDNA Post Labelling Kit (Amersham Biosciences 社 : RPN5660)の蛍光強度の比較結果

Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit (CLONTECH 社 : K1037-1)と、CyScribe cDNA Post Labelling Kit (Amersham Biosciences 社 : RPN5660)を用いて、mRNA間接標識法による蛍光強度を比較した。その結果を第6図に示す。

第6図に示したグラフでは、青点はCLONTECH社のキットの“再現性”を示し、赤点はAmersham Biosciences社のキットの“再現性”を示している。また、これらのグラフのX軸はspot1の、Y軸はspot2の蛍光強度を示す。 $Y=X$ の直線上にある点は、spot1とspot2の蛍光強度が等しい場合を示す。 $Y=X$ の線の1つ外側にある点線、及び、さらにもう1つ外側にある実線は、それぞれspot1とspot2の蛍光強度比が2倍から0.5倍の範囲、及び、3倍から1/3倍の範囲を示す。

第6図に示した結果から、CLONTECH社の従来のキットとAmersham Biosciences社のCyScribe cDNA Post Labelling Kitでは、同程度に良好な“再現性”が得られることが判った。



第6図 従来のキット (Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit)

と CyScribe cDNA Post Labelling Kit の比較結果<mRNA>

青点 : CLONTECH 社のキット (Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit)

赤点 : Amersham Biosciences 社のキット (CyScribe cDNA Post Labelling Kit)

X 軸：spot1 の蛍光強度，Y 軸：spot2 の蛍光強度

Y=X の直線上にある点は、spot1 と spot2 の蛍光強度が等しい場合を示す。Y=X の線の 1 つ外側にある点線、及び、さらにもう 1 つ外側にある実線は、それぞれ spot1 と spot2 の蛍光強度比が 2 倍から 0.5 倍の範囲、及び、3 倍から 1/3 倍の範囲を示す。

謝 辞

本プロトコルは、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ーシステムの開発」； 課題番号 1000) のサポートによって作製された。

摘 要

本稿は、Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit を用いた間接標識法のプロトコルを、従来用いていた直接標識法のプロトコルと共に紹介し、次に、両標識法によって得られたマイクロアレイ実験データに基づき、両者の標識効率を比較した結果をまとめたものである。

また末尾には、付録として、現在“マイクロアレイセンター”で用いているプロトコル(間接標識法からハイブリダイゼーション・スキャニング・蛍光データの定量化まで)をまとめて記した。【マイクロアレイ ハイブリダイゼーションプロトコル(改訂第一版)】

参考文献

藤井文子，真保佳納子，矢崎潤史，岸本直己，菊池尚志 2002 イネ cDNA マイクロアレイ実験プロトコル．農業生物資源研究所研究資料 第 1 号： - （英語版 同研究資料第 1 号： - ）

Summary

Kanako Shimbo¹⁾, Fumiko Fujii²⁾, Akiko Hashimoto¹⁾,
Zenpei Shimatani¹⁾, Yuko Nagata¹⁾, Junshi Yazaki²⁾, 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 of indirect labeling methods for cDNA microarray experiments in the project. In this article, on Rice 9000 cDNA Microarray, we also compared the indirect labeling method used in the Microarray Project of MAFF with other indirect labeling methods as well as a direct labeling method in terms of the reproducibility and the fluorescent signal intensity of microarray data. The protocols will help the researchers carry out their microarray experiments and to understand the details on procedure of labeling in microarray experiments.

付録

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）

I. 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 沈殿の際には4、スピンドウンの際には室温（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 ₂ 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 ₂ O*)	5μl (2μg を含む)	—
total RNA (+dH ₂ O*)	—	10μl (40μg を含む)
Control RNA (x5000 希釈)	10μl	10μl
Oligo-(dT)25	5μl	5μl
Random Nonamer Primer	5μl	—
Total	25μl	25μl

(*RNA 溶液の濃度によっては、RNA 溶液を濃縮するか、或いは、dH₂O 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、冒頭の項 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) 0.45μm 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、すぐに次節(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CyTM3 monofunctional reactive dye (PA23001) 及びCyTM5 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) 前節(1)-16)のcDNAサンプルに、Deionized H₂O 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。

3) 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。

4) 3M Sodium Acetate 2μl と100% EtOH 50μl を加え、ボルテックスにて混合する。

5) 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。

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) ペレットを風乾、もしくは遠心濃縮機を用いて乾燥させ、Deionized H₂O 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 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。（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. Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit

(CLONTECH 社 : K1860-1) による mRNA 間接標識法

本キットは、I. 1. で紹介した Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit (CLONTECH 社 : K1037-1) の代替製品として販売されているものである。

本キットを用いて totalRNA をラベルする場合は、次項 I. 3. を参照のこと。

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 沈殿の際には4 、スピンドダウンの際には室温(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。

作成後は氷上で維持する。

5×First-Strand Buffer	4μl
10×dNTP Mix	2μl
DTT	2μl
Deionized H ₂ O	1μl
PowerScript™ Reverse Transcriptase (*)	1μl
<hr/>	
Total	10μl

(*) PowerScript™ 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、その後スピンドダウンする。

(このプロトコールでは mRNA を使用する。)

mRNA (+dH ₂ O*)	3μl (2μg を含む)
Control RNA (x1000 希釈)	2μl
Random Nonamer Primer	5μl
<hr/>	
Total	10μl

(*RNA 溶液の濃度によっては、RNA 溶液を濃縮するか、或いは、dH₂O 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 10μl 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、冒頭の項 1) の Master Mix 10μl を加えて混合し、スピンドウンする。(合計 20μl)
- 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 2μl 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) 0.22μm 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 2.2μl を加え、ボルテックスにて攪拌する。
- 11) 氷冷した 100% EtOH 55μl 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、すぐに次節 (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 CyTM3 monofunctional reactive dye (PA23001) 及び CyTM5 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 を独自に使用しない。)
- ・色素を加えた後は遮光する。

- 1) 前節(1) - 16) の cDNA サンプルに、Deionized H₂O 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。

- 3) 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? 60 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 2μl と 100% EtOH 50μl を加え、ボルテックスにて混合する。
- 5) 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。
- 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) ペレットを風乾、もしくは遠心濃縮機を用いて乾燥させ、Deionized H₂O 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。

注意事項：

- ・ウォッシュステップは、700μl の PE Buffer で 3 回行う。

- ・最後の溶出ステップは、50μl の dH₂O で 2 回溶出を行う。

(この際、dH₂O 50μl をカラムに加えた後、1 分間放置する。)

2) 前項 1) で精製・溶出した 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。(この際、遠心濃縮機を遮光し暗所にておく。)

* 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。

3. Atlas™ PowerScript™ Fluorescent Labeling Kit

(CLONTECH 社：K1860-1)による totalRNA 間接標識法

本キットは、1. 1. で紹介した Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit (CLONTECH 社 : K1037-1) の代替製品として販売されているものである。

重要：本キットを用いて totalRNA をラベルする場合は、逆転写酵素として SUPER SCRIPT™ II RNaseH⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO BRL 社)を別途購入して用いること。本キット付属の酵素 (PowerScript™ Reverse Transcriptase) を totalRNA のラベリングには用いないこと。
(totalRNA を PowerScript™ Reverse Transcriptase を用いてラベルしても、発色レベルの極めて低い標識産物しか得られないので、マイクロアレイ実験には適さない。既に筆者らは実際に実験を行って、この点を確認している。)

実験開始前の準備：

- ・本キット以外に SUPER SCRIPT™ II RNaseH⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO BRL 社)を用意する。
- ・ヒートブロックの温度をそれぞれセットしておく。(42 、70 、95)
- ・微量遠心機の温度設定は、EtOH 沈殿の際には 4 、スピンドダウンの際には室温 (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。

作成後は氷上で維持する。

5×First Strand Buffer (*)	10μl
0.1M DTT (*)	5μl
10×dNTP Mix	5μl
Deionized H ₂ O	2.5μl
Super Script II (200units/ul) (* *)	2.5μl
<hr/>	
Total	25μl

(*) 5×First Strand Buffer と 0.1M DTT は、SUPER SCRIPT™ II RNaseH⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO BRL 社)に同梱されているものを使用する。

(* *) Super Script II は別途購入して用いること。本キット付属の逆転写酵素 (PowerScript™ Reverse Transcriptase) は使用しないこと。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。

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。

(このプロトコールでは total RNA を使用する。)

total RNA (+dH ₂ O*)	10μl (40μg を含む)
Control RNA (x5000 希釈)	10μl
Oligo-(dT)25	5μl
<hr/>	
Total	25μl

(* RNA 溶液の濃度によっては、RNA 溶液を濃縮するか、或いは、dH₂O 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 42 まで冷却し、冒頭の項 1) の Master Mix 25μl を加えて混合し、スピンドウンする。(合計 50μl)

5) 42 で 2.5 時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) 0.22 μ m 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 5.5 μ l を加え、ボルテックスにて攪拌する。
- 11) 氷冷した 100% EtOH 137.5 μ l 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 \times Fluorescent Labeling Buffer 10 μ l 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 \times Fluorescent Labeling Buffer を加えたら、すぐに次節(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 CyTM3 monofunctional reactive dye (PA23001) 及び CyTM5 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) 前節(1) - 16) の cDNA サンプルに、Deionized H₂O 0.5 μ l を加える。(合計 10.5 μ l)

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 45 μ l 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。

- 3) 前々項 1) の cDNA サンプルに、前項 2) の DMSO/色素混合液 10 μ l を加える。充分に混ぜ、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 2 μ l と 100% EtOH 50 μ l を加え、ボルテックスにて混合する。
- 5) 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。
- 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) ペレットを風乾、もしくは遠心濃縮機を用いて乾燥させ、Deionized H₂O 100 μ l 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。

注意事項：

- ・ウォッシュステップは、700 μ l の PE Buffer で 3 回行う。
- ・最後の溶出ステップは、50 μ l の dH₂O で 2 回溶出を行う。
(この際、dH₂O 50 μ l をカラムに加えた後、1 分間放置する。)

- 2) 前項 1) で精製・溶出した 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。(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。

4 . CyScribe cDNA Post Labelling Kit (Amersham Biosciences 社 : RPN5660)

による mRNA 間接標識法

重要：本キットは、toaIRNA のラベリングには用いないこと。（toaIRNA のラベリングに使用しても、発色レベルの極めて低い標識産物しか得られないため、マイクロアレイ実験には適さない。）

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 ）
- ・微量遠心機の温度設定は、室温（20? 25 ）とする。
- ・予めスピンドウンしておいた AA-dUTP チューブに nuclease free water 30ul を加えて溶かし、氷上に置いておく。（このチューブには作製した日付を記入しておく。）
 - * AA-dUTP 溶液は、-15? -30 にて 1 カ月間保存可能。
- ・ 2.5M NaOH を予め調製しておく。
NaOH 1g を滅菌水 8ml に溶解後、10ml にメスアップして濾過滅菌する。
 - * 室温で 3 ヶ月間保存可能。
- ・ 2M HEPES を予め調製しておく。
HEPES free acid 4.77g を滅菌水 8ml に溶解後、10ml にメスアップして濾過滅菌する。
 - * 室温で 3 ヶ月間保存可能。
- ・ 予め 0.1M Sodium Bicarbonate(NaHCO_3) pH9.0 及び 4M Hydroxylamine HCl を作製しておく。（後述の【追記1：試薬の作製】を参照）

注意事項：

- ・試薬類の操作は氷上で行う。
- ・精製ステップはプローブの標識効率に大きく影響があるので丁寧に行う。
- ・Cy3 用のチューブと Cy5 用のチューブをそれぞれ用意して、別々に下記のラベリング操作を行う。[（2）- 5）まで]

(1) cDNA の合成と精製

1) 氷上で、1.5ml チューブに以下の試薬を加えて緩やかにピペッティングして混合する。

mRNA

8μl (2μg を含む)

Control RNA (x5000 希釈)	10μl
Random nonamers	2μl
Anchored oligo(dT)	2μl
<hr/>	
Total volume	22μl

2) 70℃ で 5 分間インキュベートする。

3) 室温で 10 分間冷却後、スピンドウンする。

4) 氷上で、前項 3) のチューブに以下の試薬を加える。この際、酵素は一番最後に加えること。

5 × CyScript buffer	8μl
0.1M DTT	4μl
Nucleotide mix	2μl
AA-dUTP	2μl
CyScript reverse transcriptase (*)	2μl
<hr/>	
Total volume	18μl

(*) CyScript reverse transcriptase は加える直前に -30℃ から取り出し、使用後は直ちに冷凍庫に戻すこと。

5) 前項 4) を、より緩やかにピペティングを行うかピペットチップの先で攪拌する。

その後スピンドウンする。(合計 40μl)

* 激しく攪拌すると、酵素が失活するおそれがあるので注意する。

6) 42℃ で 1.5 時間インキュベートする。

7) 2.5M NaOH 4μl を加えてボルテックス後、スピンドウンする。

8) 37℃ で 15 分間インキュベートする。

9) 2M HEPES 20μl を加えてボルテックス後、スピンドウンする。

* この cDNA 溶液は -15℃ -30℃ で保存できる。

10) QIAGEN 社の QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製する。(1 回目の精製。後述の【追記 2 : QIAquick PCR Purification Kit による精製】を参照。)

* このステップはプローブの標識効率に大きく影響を及ぼすので丁寧に行う。

1 1) 精製後、遠心濃縮機などを用いてドライアップする。

* この際、乾燥させすぎないように注意する。

1 2) 前項 11) に nuclease free water 30 μ l を加え、ピペッティングによって完全に溶解させる。

(2) 蛍光色素のカップリングと精製

1) まず、蛍光色素溶液を作製する。(重要：作製は、標識反応直前に行う。)本キット内には、予め CyDye 入りチューブが含まれている。本プロトコールの場合、1 サンプルあたり mRNA 2 μ g を使用しているので、1 サンプルあたり CyDye 入りチューブが 2 本必要である。

Cy3 溶液 (mRNA 2 μ g 用の分量):

Cy3 reactive dye (本キットに含まれている) を 2 本使用する。

1 本あたり 0.1M Sodium Bicarbonate (NaHCO₃) pH 9.0 を 15 μ l 加え、しっかりとピペッティングして溶かす。

Cy5 溶液 (mRNA 2 μ g 用の分量):

Cy5 reactive dye (本キットに含まれている) を 2 本使用する。

1 本あたり 0.1M Sodium Bicarbonate (NaHCO₃) pH 9.0 を 15 μ l 加え、しっかりとピペッティングして溶かす。

* サンプル量単位当たりの CyDye 使用本数：mRNA サンプル 1 μ g に対して、本キット付属の CyDye を 1 本使用する。

* 結露を防ぐため CyDye は未開封のまましばらく室温に放置しておき、使用直前に懸濁する。懸濁後は直ちに使用する。

* CyDye の懸濁が不十分だと、標識反応の効率が下がるので注意する。

2) 前節 (1) -12) の Cy3 用チューブと Cy5 用チューブそれぞれに、前項 1) の Cy3 溶液 (2 本分：30 μ l)、或いは Cy5 溶液 (2 本分：30 μ l) を加えて、混合する。(合計 60 μ l)

注意事項：色素を加えた後は遮光する。

3) 室温・暗所で 1 時間インキュベートする。

4) 4M Hydroxylamine HCl を 30 μ l 加えて混ぜ、室温・暗所で 15 分間インキュベートする。

5) QIAGEN 社の QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製する。(2 回目の精製。後述の

[追記 2 : QIAquick PCR Purification Kit による精製] を参照。)

6) 前項 5) で精製・溶出した 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。(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。

[追記 1 : 試薬の作製]

・ 0.1M Sodium Bicarbonate (重炭酸塩 : NaHCO_3) pH 9.0 100ml

Sodium Bicarbonate	0.84g
滅菌水	+
<hr/>	
	100ml

Sodium Bicarbonate を滅菌水 90ml に溶解し、1M NaOH を用いて pH9.0 に調整する。
その後、100ml にメスアップしてよく混合し、0.45 ミクロンのフィルターにかけて濾過滅菌する。

* 分注して -15 ? -30 で保存する。(3 カ月間保存可能)

* 保存が悪く、また調製後長時間経過している溶液の使用は、CyDye カップリング反応の効率を低下させるので使用しない。

* 溶液の pH は、CyDye カップリング反応の効率に影響するので、使用前に pH を確認すること。

• 4M Hydroxylamine HCl 100ml

Hydroxylamine HCl	27.8g
滅菌水	+
<hr/>	
	100ml

Hydroxylamine HCl を滅菌水に溶解後、100ml にメスアップしてよく混合する。
その後 0.45 ミクロンのフィルターにかけて濾過滅菌する。

* 室温で 3 カ月間保存可能。

[追記 2 : QIAquick PCR Purification Kit による精製]

注意事項： 1 回目の精製と 2 回目の精製では、精製の最初の行程 1) で手順が異なるので注意

すること。

1) 【1回目の精製:(1)-10)】

AA 修飾 cDNA 溶液に PB buffer 320 μ l を加えてピペッティングでよく混ぜる。

【2回目の精製:(2)-5)】

CyDye 標識 cDNA 溶液に PB buffer 450 μ l を加えてピペッティングでよく混ぜる。

- 2) 2ml のコレクションチューブにスピncラムをセットして、前項1)をスピncラムに移す。
- 3) 13,000rpm(10,000 \times g)で60秒間遠心する。
- 4) コレクションチューブ内のフロースルー液を捨て、スピncラムを再度セットする。
- 5) PE buffer 750 μ l をスピncラムに加えて、13,000rpm(10,000 \times g)で60秒間遠心する。
- 6) コレクションチューブ内のフロースルー液を捨て、スピncラムを再度セットする。
- 7) PE buffer 400 μ l をスピncラムに加えて、13,000rpm(10,000 \times g)で60秒間遠心する。
- 8) コレクションチューブ内のフロースルー液を捨て、スピncラムを再度セットする。
- 9) 13,000rpm(10,000 \times g)で60秒間遠心して、残留bufferを完全に除去する。
- 10) スピncラムを 1.5ml チューブにセットし、滅菌水 50 μ l を加えて1分間インキュベートする。
- 11) 13,000rpm(10,000 \times g)で60秒間遠心して、cDNA を溶出する。

5 . 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。
- ・2.5M NaOH を予め調製しておく。

NaOH 1g を滅菌水 8ml に溶解後、10ml にメスアップして濾過滅菌する。

* 室温で3ヶ月間保存可能。

- ・2M HEPES を予め調製しておく。

HEPES free acid 4.77g を滅菌水 8ml に溶解後、10ml にメスアップして濾過滅菌する。

* 室温で3ヶ月間保存可能。

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 ₂ O*)	10μl (2μg を含む)	—
total RNA (+dH ₂ O*)	—	12μl (40μg を含む)
Control RNA (x5000 希釈)	10μl	10μl
Oligo-(dT)25	2μl	2μl
Random Nonamer Primer	2μl	—
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、dH₂O 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 First Strand Buffer	8μl
0.1M DTT	4μl

dNTP mix	2μl
Cy3-dCTP もしくは Cy5-dCTP (*)	2μl
Super Script II (* *)	2μl
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 加えて緩やかにピペティング後、スピンドウンする。

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。

(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 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。(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。

II . 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)。
(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) 1. **ターゲットの調製**で、精製されたCyDye 標識 cDNA に dH₂O 9 μ l 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) 6 μ l を加え、ピペティングで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) 45 μ l を加え、ピペティングで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(30 μ l)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 μ 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。
- 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 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。
- 10) 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。

III . スライドガラスの洗浄

洗浄前の準備：

- ・ 2 種類の洗浄液（1×SSC，0.2% SDS、及び、0.1×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×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×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×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×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×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×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、スキヤニングする。

IV . スキャニング

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

FLA-8000 (FUJIFILM 社製スキャナー) 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、スキャナーに付属した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) コンピュータ画面上のアイコン ソフトウェア “Image Reader FLA-8000 v1.2 ” をダブルクリックし、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し、その下にある “Optics ” では “Confocal ” にチェックを入れる。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」の方には、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、Cy5の波長でスキャンした場合は“-635.img”というようになる。

11) 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。

V. 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 Ver. 1.31 (Windows 版、FUJIFILM 社製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 社製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。本プロトコルでは、img ファイル (FUJIFILM 社製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 社の 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 Ver. 1.31 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 “Triming” ボタンをクリックする。小さなウィンドウ “ファイルを開く” が表示される。この小ウィンドウから解析する img ファイルを選択する。そして “開く” というボタンを押すと、このウィンドウは “Triming” という小ウィンドウに切り替わる。この “Triming” 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。“OK” ボタンをクリックすると、小さなウィンドウ “名前を付けて保存” が表示されるので、ここで Triming を行った画像を保存する。また、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、ここで述べた方法で階調調節をする。（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 “Triming” ボタンをクリックする。小さなウィンドウ “ファイルを開く” が表示される。この小ウィンドウの下方にある “ファイルの種類” から “TIFF Files(.tif)” を選択し、解析する tif ファイルを選択する。そして “開く” というボタンを押すと、このウィンドウは “Triming” という小ウィンドウに切り替わる。この “Triming” 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。“OK” ボタンをクリックすると、小さなウィンドウ “名前を付けて保存” が表示されるので、ここで Triming を行った画像を保存する。また、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、ここで述べた方法で階調調節をする。（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

- 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。) “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“4”(ないしは“3”)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“3”(ないしは“4”)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
- 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
- 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(名称: 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、
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

は測定結果やクローンの情報、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、全てのクローンの詳細と情報を、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。“OK” ボタンをクリックする。（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。“OK” ボタンをクリックする。（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。）
- 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。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可能となり、また“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を行う（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）。

“マイクロアレイセンター”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。