
TaKaRa

**TaKaRa DNA チップ
Protocol**

[IntelliGene[®] シリーズ]

目次

I. はじめに	3
II. 本チップ以外に必要な器具／試薬	4
III. 保存	4
IV. DNA チップの取扱い注意点	4
V. 蛍光標識反応を行う前の準備、注意点	
1. 器具類の滅菌法	5
2. 試薬類の調製法	5
3. RNA サンプルの調製法	5
VI. 使用方法	
1. 蛍光標識 cDNA ターゲットの作製	7
2. ハイブリダイゼーション	11
3. 洗浄	13
4. スキャニング	14
5. データ解析	14
VII. インターナルコントロールを用いた実験	15
VIII. データの補正方法	15
IX. トラブルシューティング	16
X. データの信頼性	17
XI. Appendix	18
XII. 参考文献	21
XIII. 関連製品	21
XIV. 注意	21

<用語について>

本説明書では、DNA チップ（DNA マイクロアレイ）のハイブリダイズ実験において、スライドガラス基板に固定化された DNA 断片をプローブ、ハイブリダイズ用にサンプル RNA から調製した蛍光標識 cDNA や cRNA をターゲットと表現しています。

注意：IntelliGene® HS Human Expression CHIP チップ（製品コード X121A）を使用する場合の推奨プロトコルは、本説明書のプロトコルとは異なります。 必ず HS チップ添付の説明書に従ってください。
--

I. はじめに

TaKaRa DNA チップ (IntelliGene® シリーズ、IntelliGene® II シリーズ) は、多数の遺伝子由来 DNA 断片をスライドガラス上に高密度に整列 (アレイ)・固定化した DNA チップ (DNA マイクロアレイ) で、各 DNA 断片に相補性を有する核酸をハイブリダイゼーションの原理を用いて検出することができます。

DNA チップは、主に、2 種類の検体中に含まれる各遺伝子由来の核酸量を比較する目的で使用します。例えば、2 種類の細胞由来 RNA を別々の蛍光色素 (Cy3 または Cy5) で標識後、同一 DNA チップ上で競合ハイブリダイゼーションさせ、各蛍光シグナルを DNA チップ解析装置 (スキャナー) で読み取ります。スキャニング画像から、マイクロアレイ解析ソフトを用いて各 DNA スポットの蛍光強度を比較することで、それぞれの細胞中に含まれる各遺伝子由来 mRNA 量の差を解析することができます。

各 DNA チップ上の DNA に関する情報は弊社ホームページからダウンロードできます*。
(URL: <http://www.takara-bio.co.jp/>)

*ダウンロードできるファイル

1. Array List (Text ファイル): DNA チップ上にアレイされた遺伝子のリスト。
2. Gene ID file (Text ファイル): 発現データ解析ソフト ImaGene™ (BioDiscovery 社) を用いてデータ解析する際に使用するファイル。

各 DNA チップは、図 1 に示したような専用スライドガラス (1×3 inch) 上の、製品ラベルと同じ面に DNA 断片が配置されています。製品によって、上枠 (22×22 mm) のみ (A)、あるいは上下枠を超えて (B) 配置されていますので、ご使用になる際は必ず各製品添付のデータシートで配置位置を確認してください。

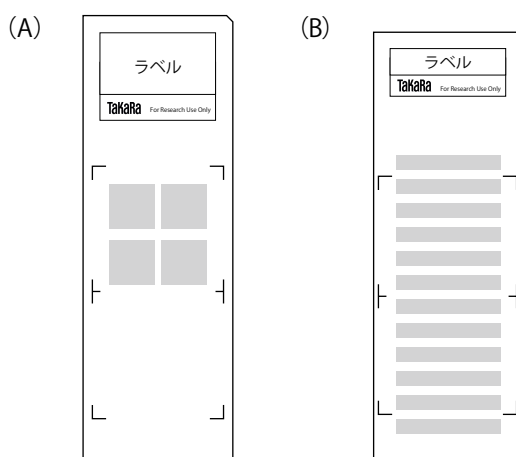


図 1: レイアウト図

(A) 製品コード X102/X104/X122/X301/X000

(B) 製品コード X001/X003/X2021 (2008 年 10 月現在)

* レイアウトは変更される場合があります。必ず各製品添付のデータシートを確認の上、ご使用ください。

II. 本チップ以外に必要な器具／試薬

<器具>

- TaKaRa Hybridization Chamber (製品コード TX710)
- TaKaRa Spaced Cover Glass S 22×24 mm (製品コード TX702)
XL 24 × 60 mm (製品コード TX705)
- 恒温水槽 (振とうできるタイプが望ましい、空気循環式恒温槽は不可)
- サーマルサイクラー (TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® (製品コード TP600) など)
- 0.2 ml または 1.5 ml チューブ
- 染色バット
- スライド染色かご
- スライドガラスを遠心可能な遠心機、あるいは圧縮 N₂ ガス

<試薬>

- RNA Fluorescence Labeling Core Kit (M-MLV Version) Ver.2.0 (製品コード TX810)
- 1 mM Cy3 -dUTP (GE ヘルスケアバイオサイエンス社 Code PA53022)
- 1 mM Cy5 -dUTP (GE ヘルスケアバイオサイエンス社 Code PA55022)
- 5 × Carrier

Human CHIP の場合は、

- 15 µg/µl Human Cot I DNA (Invitrogen, 15279011)
- 5 µg/µl Poly dA (Roche Diagnostics, 223581)
- 25 µg/µl Yeast tRNA (SIGMA, R8759)

となるように調製後、フェノール／クロロフォルム抽出し、エタノール沈殿後、等量の滅菌蒸留水に溶解したものを用意する。

Mouse CHIP の場合は、

- 15 µg/µl Mouse Cot I DNA (Invitrogen, 18440016)
- 5 µg/µl Poly dA (Roche Diagnostics, 223581)
- 25 µg/µl Yeast tRNA (SIGMA, R8759)

となるように調製後、フェノール／クロロフォルム抽出し、エタノール沈殿後、等量の滅菌蒸留水に溶解したものを用意する。

E.coli CHIP 等の原核細胞の場合：ハイブリダイゼーション溶液に含まれている salmon sperm DNA のみで十分ですので 5×Carrier を添加する必要はありません。

※ 自家調製した 5 × Carrier は、使用前にフェノール・クロロホルム処理を行うことをおすすめします。

- クロロホルム／イソアミルアルコール (24 : 1)
- 100%または 70% エタノール
- 3M CH₃COONa (pH5.2)
- プレハイブリダイゼーション溶液
(6 × SSC、0.2% SDS、5 × Denhardt's 溶液、1 mg/ml denatured salmon sperm DNA ; 0.22 µm フィルターろ過済み)
- ハイブリダイゼーション溶液
(6 × SSC、0.2% SDS、5 × Denhardt's 溶液、0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA ; 0.22 µm フィルターろ過済み)
- 2 × SSC
- 0.2 × SSC
- 0.05 × SSC
- 2 × SSC/0.2% SDS

III. 保存

容器ごとデシケーター中で冷暗所保存してください。

IV. DNA チップの取扱い注意点

DNA チップを取扱う際は、必ずプラスチック手袋を着用してください。DNA チップの取扱い時は、必ず製品ラベルの部分を持ってください。
油性インキのマーカーの多くは蛍光性を持っていますので、マーキングにはダイヤペン等を使用してください。

V. 蛍光標識反応を行う前の準備、注意点

1. 器具類の滅菌法

市販の滅菌ディスポーサブルプラスチック器具類は、通常 RNase フリーと見なしてよく、そのまま実験に用いてもさしつかえありませんが、マイクロ遠心チューブやマイクロピペット用チップなどはオートクレーブ処理したものをういてください。ガラス器具、スパーテルなどを用いる場合には、160℃で少なくとも2時間以上乾熱滅菌を行ってください。乾熱滅菌できないものは、0.1% DEPC 溶液で 37℃、12 時間処理した後、オートクレーブ処理を行ってから（DEPC による RNA のカルボキシメチル化を防ぐ）ういてください。RNA 実験用の器具類は他と明確に区別しておくことが必要です。また、RNase が混入する最も大きな要因は、素手からの持ち込みですので、RNA を用いた実験を行う際には必ずプラスチック手袋とマスクを着用してください。

2. 試薬類の調製法

試薬類は可能な限り 0.1% DEPC 処理水で調製し、オートクレーブ処理を行ってから使用してください。オートクレーブ処理ができない試薬が含まれている場合には、あらかじめ滅菌操作を行った器具類、水などを用いて溶液を調製し、ろ過滅菌後使用してください。

3. RNA サンプルの調製法

純度の高い RNA を調製する必要があります。多糖や蛋白質などの不純物により、標識反応が阻害されたり、ハイブリダイゼーション時に、バックグラウンドの上昇や非特異的なシグナルが生じる可能性があります。また DNA も逆転写酵素の鋳型となり得ますので、ゲノム DNA の混入も防ぐ必要があります。組織や細胞からの RNA 調製は、できるだけ短時間で行ってください。直ちに処理できない場合は、組織や細胞を -80℃ の冷凍庫もしくは液体窒素中で保存してください。

(1) total RNA の調製

塩化セシウム密度勾配遠心法やチオシアン酸グアニジンフェノールクロロホルム法（AGPC 法）、あるいは市販の RNA 分離精製用の試薬、キットを用いてください。RNAiso Plus（タカラバイオ）、FastPure® RNA Kit（タカラバイオ）、Sepasol-RNA（nacalai tesque）、Trizol Reagents（Invitrogen）、RNeasy kit（Qiagen）

(2) poly A⁺ RNA の精製（真核生物の場合）

poly A⁺ RNA は、Oligo (dT) Cellulose あるいは Poly (U) Sepharose を用いて、total RNA から単離する方法が一般的です。Oligotex™ -dT30 <Super>、Oligotex™ -dT30 <Super> mRNA Purification Kit を用いると、高純度な poly A⁺ RNA を容易に回収することができます。

(3) 精製 RNA の溶解

RNase-free H₂O または RNase-free TE Buffer に溶解してください。市販の RNA 分離精製用キットの中には、RNA を溶かしやすくするため界面活性剤の添加を推奨するプロトコルがありますが、界面活性剤が蛍光標識反応を阻害する場合がありますので、添加しないでください。

(4) RNA の純度検定

ハイブリダイゼーションの結果は、用いる RNA の純度に大きく左右されます。標識反応を行う前には、必ず RNA の純度検定を行ってください。

1) アガロースゲル電気泳動による検定 (total RNA)

total RNA 1 ~ 2 μ g を熱変性 (65℃、10 min.) し、アガロースゲルを用いて電気泳動します。分解の起こっていない total RNA では 2 本の ribosomal RNA (真核細胞: 28S と 18S、原核細胞: 23S と 16S) のはっきりとしたバンドがおおよそ 2 : 1 の割合でみられますが、ribosomal RNA のバンドが拡散している場合は、RNase が混入している可能性がありますので使用しないでください。また、28S または 23S のバンドよりも分子量の大きいバンドがある場合は、ゲノム DNA の混入が考えられますので RNase free DNase I による処理を行ってから標識反応に用いてください。この検定はアジレント 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies 社) および RNA6000 Nano Lab Chip キットを用いるとより正確に行えます。

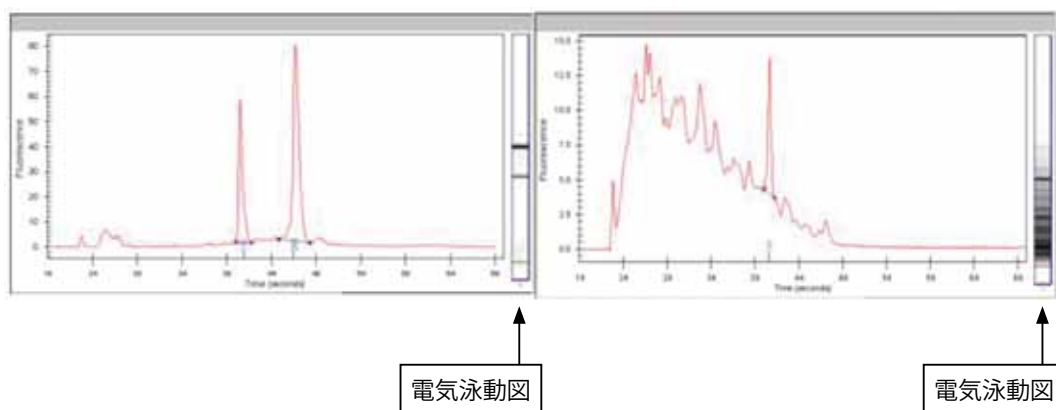
<アジレント 2100 バイオアナライザでの解析例>

1) 解析可能な total RNA

(18S、28S 二本の ribosomal RNA のピークがはっきり確認できる。)

2) 使用不可能な total RNA

(18S rRNA のピークが確認できる。低分子の物が多く認められる。)



2) 吸光度検定 (total RNA および poly A⁺ RNA)

吸光度を測定し、A₂₆₀/A₂₈₀ の比率が 1.7 以下のサンプルは使用しない方が望ましく、比率が 1.8 ~ 2.0 のサンプルを使用することをお勧めします。

なお、吸光度測定の際は、10 mM Tris-HCl/0.1 mM EDTA (pH7.5) を使用してください。

VI. 使用方法

本 DNA チップでの実験は、

1. 逆転写反応による RNA からの蛍光標識 cDNA ターゲットの作製
2. ターゲットと DNA チップとのハイブリダイゼーション
3. ハイブリダイゼーション後の洗浄
4. ハイブリダイズした蛍光標識ターゲットのスキャンニング
5. データ解析

からなります。

以下に使用例を示します。ハイブリダイゼーションの原理を用いていますので、従来のメンブレンを用いた場合と同じように、必要があればハイブリダイゼーション溶液の組成、反応温度、洗浄条件等を変更して使用してください。なお、蛍光色素 Cy3、Cy5 は光により退色しやすいため、長時間の保温等の操作はなるべく遮光下で行ってください。

1. 蛍光標識 cDNA ターゲットの作製

比較したい 2 種類の検体由来の RNA を鋳型として、それぞれから逆転写反応により Cy3-dUTP もしくは Cy5-dUTP を取り込ませた蛍光標識 cDNA ターゲットを作製します。

蛍光標識反応には、TaKaRa DNA チップ用に至適化した RNA Fluorescence Labeling Core Kit (M-MLV Version) Ver. 2.0 をご使用ください。下記には本キットを用いた蛍光標識方法の概略を示します。

【補足】ターゲットの作製法としては、他に下記の方法があります。

1. 少量の真核生物由来 RNA、もしくは poly A⁺ RNA の発現が低い RNA から効率良く蛍光標識 antisense RNA ターゲットを調製したい場合、RNA Transcript SureLABEL Core Kit をご使用ください。詳細は本説明書 17 ページを参照してください。
2. mRNA を直接、蛍光標識してターゲットとしたい場合、*Label/IT*[®] Cy[™] 3 Labeling Kit と *Label/IT*[®] Cy[™] 5 Labeling Kit をご使用ください。実験方法の詳細は弊社情報誌 BIO VIEW 33 号 8～11 ページまたは弊社ホームページを参照してください。

(1) 試薬・器具

- ・ 解析する細胞由来 RNA（真核生物の場合は poly A⁺ RNA が望ましい）* 1
 - * 1：RNA は、2 種類必要です。一方の RNA に対して、もう一方の RNA の発現差を DNA チップにより調べます。解析に用いる RNA は純度の高いものを調製してください。（5 ページ、V. 蛍光標識反応を行う前の準備、注意点を参照）真核生物の場合には 0.5～2 μ g の poly A⁺ RNA もしくは 10～25 μ g の total RNA を、原核生物の場合は 5～25 μ g の total RNA を用意してください。
- ・ RNA Fluorescence Labeling Core Kit (M-MLV Version) Ver.2.0
- ・ 1 mM Cy3-dUTP および 1 mM Cy5-dUTP
- ・ 5 $\times$ Carrier * 2
 - * 2：Carrier は、DNA チップ表面の非特異的吸着を防ぐ他、複数の mRNA 上に存在する特異性の低い配列（poly A 配列や繰り返し配列）による非特異的なシグナルを低減させる目的があり、組成は使用する DNA チップの種類により変わります。
- ・ クロロホルム／イソアミルアルコール（24：1）
- ・ 100% および 70% エタノール
- ・ 3 M CH₃COONa (pH5.2)
- ・ ハイブリダイゼーション溶液（6 $\times$ SSC、0.2% SDS、5 $\times$ Denhardt's 溶液、0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA；0.22 μ m フィルターろ過済み）
- ・ サーマルサイクラー（TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient/Standard（製品コード TP600/TP650）など）
- ・ 0.2 ml および 1.5 ml チューブ

(2) 操作手順

Cy3、Cy5 は光により退色しやすいため、反応は遮光下で行ってください。

A. 蛍光標識反応

poly A⁺ RNA（または total RNA）を鋳型として逆転写反応を行ない、Cy3-dUTP もしくは Cy5-dUTP を取り込ませた蛍光標識 cDNA ターゲットを調製します。Cy3 標識時と Cy5 標識時では、使用する 10×dNTP Mixture が異なりますので、必ずそれぞれに対応する 10 × dNTP Mixture を使用してください。

1) 以下の反応液を遠心チューブに調製し、軽く攪拌する。

poly A ⁺ RNA *	0.5 ~ 2 μg
Oligo dT (18) primer (300 pmol/μl)	
または Random hexamer (300 pmol/μl) *	1 μl
DEPC-treated water	X μl
Total	10.0 μl

* 真核生物の total RNA の場合は、10 ~ 25 μg を使用し、Oligo dT (18) primer を用いることをお勧めします。原核生物の total RNA の場合は、5 ~ 25 μg を使用し、Random hexamer を用いてください。

2) 70℃で 5 分間加熱した後、氷上で冷却し、スピンドウンする。

3) 以下の試薬を加え、泡立えないようおだやかに攪拌する。

5 × reaction buffer	4.0 μl
10 × dNTP Mixture for Cy3 labeling	
または Cy5 labeling	2.0 μl
1 mM Cy3 または Cy5-dUTP	1.0 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	1.0 μl
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	2.0 μl

4) 42℃で 1 時間保温する。

5) 70℃で 10 分間保温し逆転写酵素を失活させる。

6) RNase H (60 U/μl) 1 μl を加え、37℃で 20 分間保温する。

B. 標識 cDNA の精製

1) あらかじめ精製カラム底に樹脂を集めた後、上蓋をはずし、800 μl の 100 mM NaCl を加えて再度上蓋をし、軽く vortex した後、室温にて 30 分以上樹脂の膨潤を行なっておく。

2) 膨潤したカラム中の気泡をぬく。* 1

3) カラムの上蓋をはずし、次に下蓋をはずす。

4) カラムを 2 ml チューブにセットして放置し、カラム内の余剰の水分をチューブに落とす。

5) チューブ中の溶液を捨て、同じチューブにカラムをセットする。

-
- 6) $750 \times g$ にて 2 分間遠心する。^{* 2}
(これ以降の操作は、樹脂の乾燥を防ぐため早く行なう。)
 - 7) カラムを 1.5 ml チューブにセットする。
 - 8) 標識反応済のサンプル (final 21 μ l) をカラム内樹脂の中央部に 1 滴ずつ全量滴下する。^{* 3}
 - 9) $750 \times g$ にて 2 分間遠心し^{* 2}、精製 cDNA を回収する。

* 1: カラムを上下逆にしたり、指などではじいて気泡を抜いてください。

* 2: 樹脂を崩さないために、遠心する際のカラムは常に同じ方向にセットしてください。たとえば、カラムに付いているタブを常にローターの外側に向けておくようにしてください。

* 3: サンプルが壁を伝わないように注意してください。

【補足】標識反応済みのサンプルは、濃い赤色 (Cy3) または青色 (Cy5) を呈しています。遠心後カラム上部のみが着色した場合は、Free の Dye-dUTP が十分に除去された目印になります。一方、カラムの下部まで着色が広がった場合は、精製がうまく行われていない可能性があります。精製溶出液は Free の Dye-dUTP が除かれるので、薄く着色するのみになります。

C. サンプルのエタノール沈殿とハイブリダイゼーション溶液への溶解

- 1) Cy3 標識、Cy5 標識両精製溶出液を混合する。
- 2) 滅菌蒸留水で 100 μ l 程度にメスアップし、等量のクロロホルム／イソアミルアルコール（24：1）を加え、10 秒間 vortex 後、15,000 rpm、4℃で 1 分間遠心する。
- 3) 水層を新しいチューブに移し、適当量*¹の 5×Carrier、1/10 量の 3M CH₃COONa（pH 5.2）と 2.5 倍量の 100% エタノールを加え混合後、室温で 10 分間静置する。
- 4) 15,000 rpm、4℃で 10 分間遠心する。
- 5) 沈殿を確認し、注意深く上清を除き、沈殿に 70% エタノールを加える。
- 6) 15,000 rpm、4℃で 2 分間遠心する。
- 7) 沈殿を確認し、注意深く上清を除く。
- 8) 再遠心をして上清をできるだけ除く。*²
- 9) 沈殿を適当量のハイブリダイゼーション溶液に溶解し、ターゲット溶液とする。*³
- 10) ハイブリ直前に、ターゲット溶液を 95℃で 2 分間加熱し変性させる（チューブの蓋が開かないよう注意すること）。
- 11) 室温に放置して冷却後、15,000 rpm、25℃で 10 分間遠心し、不溶物を除く（冷却しすぎて SDS が析出した場合は、軽く温めて溶解させてください）。

*¹：9) で用いるハイブリダイゼーション溶液の 1/5 量の 5×Carrier を加えてください。たとえば、ハイブリダイゼーション溶液が 10 μ l になる場合は、2 μ l の 5×Carrier を添加してください。（5×Carrier については 7 ページを参照してください。）原核生物の場合は必要ありません。

*²：この際、沈殿が乾くと不溶化する場合があるので、再遠心をして上清をできるだけ除いた後、すぐに次の溶解操作に進んでください。

*³：万一、沈殿が不溶化した場合、70℃程度の湯浴で数分間保温すると可溶化する場合があります。また、泡立った場合は軽くスピンドアウンすれば泡を除けます。

ハイブリダイゼーション溶液量は、ハイブリダイゼーション時に使用するカバーガラスの大きさと異なります。TaKaRa Spaced Cover Glass S（4 ページ、図 1（A）タイプ）の場合で 10 μ l、TaKaRa Spaced Cover Glass XL（図 1（B）タイプ）の場合で 25 ～ 27 μ l になります。

【補足】標識サンプルの確認

サンプルが適切に標識されていることを確認するためには、2 倍のスケールで標識反応を行い*、その 1/2 量を TestARRAY 上でハイブリダイゼーションして適度なシグナルが出るかどうかを見てください。特に、はじめて DNA チップの実験を行う方には、まず TestARRAY での確認を行い、一連の作業を習得された上で本実験を行われることをお勧めします。

*この時、精製カラムは 2 本用いてください。

2. ハイブリダイゼーション

スポット面積が広いタイプ（4 ページ、図 1（B）タイプ）の DNA チップの場合には、プレハイブリダイゼーション操作を行うことでハイブリダイゼーションのムラを低減できる場合があります。下記には、TaKaRa Hybridization Chamber を用いる方法を示しますが、湿箱を用いることも可能です。（19 ページ、【参考 2】）なお、試薬類は蛍光性の無いものを用いてください。器具類に蛍光性物質（洗剤等）が付着しているとバックグラウンド上昇の原因となります。また、ハイブリダイゼーション操作中にスライド表面が乾燥してしまうとバックグラウンドが上がる原因となりますのでご注意ください。

（1）プレハイブリダイゼーション

A. 試薬・器具類

- プレハイブリダイゼーション溶液（6 × SSC、0.2% SDS、5 × Denhardt's 溶液、1 mg/ml denatured salmon sperm DNA ; 0.22 μm フィルターろ過済み）
- 2 × SSC
- 0.2 × SSC
- 染色バット
- スライド染色カゴ
- カバーガラス TaKaRa Spaced Cover Glass S 22×24 mm
TaKaRa Spaced Cover Glass XL 24×60 mm
- TaKaRa Hybridization Chamber
- スライドガラスを遠心可能な遠心機、あるいは圧縮 N₂ ガス

B. 操作手順

TaKaRa Spaced Cover Glass を使用する際には、ペーパーボンド等でのカバーガラス周辺の密閉は行わないでください。

- 1) Hybridization Chamber のスライドセッティングエリアのくぼみに、必要量の 2 × SSC を入れる。
- 2) Chamber に DNA チップを上向きにセットする。
- 3) TaKaRa Spaced Cover Glass を正しい方向で、アレイされている部分にかぶせる。（図 2）

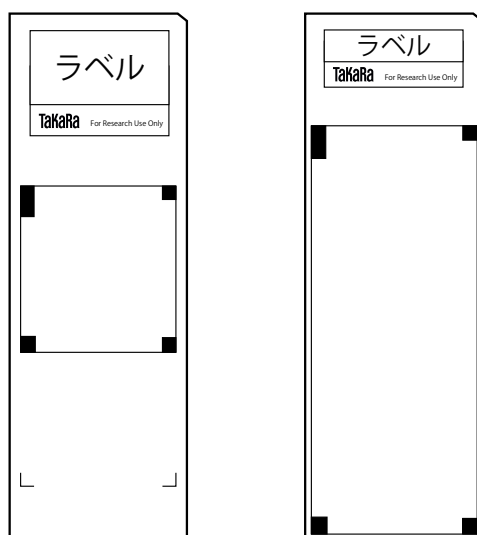


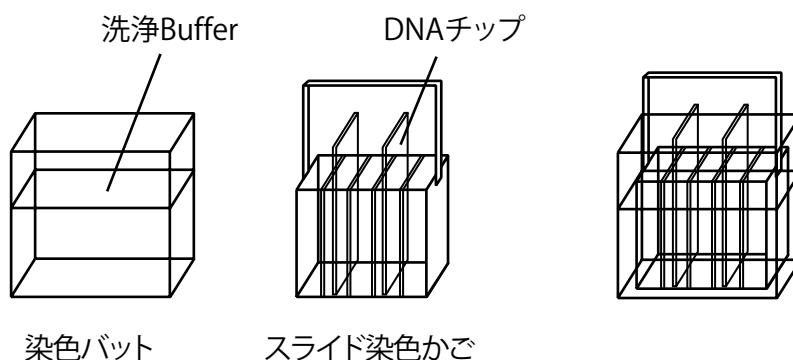
図 2：DNA チップに設置した TaKaRa Spaced Cover Glass

-
- 4) 10 μ l (Spaced Cover Glass S)、あるいは 25 ~ 27 μ l (Spaced Cover Glass XL) のプレハイブリダイゼーション溶液を、TaKaRa Spaced Cover Glass と DNA チップとの隙間に展開する。*¹
 - 5) Chamber カセットを密閉し、室温で 30 分~ 2 時間静置する。
 - 6) 室温の 2 × SSC の中で TaKaRa Spaced Cover Glass をはずす。*²
 - 7) スライド染色カゴに立て、室温の 2 × SSC、次いで 0.2×SSC 中でリンスする。
 - 8) 1,000 rpm、2 分間程度の低速遠心、もしくは圧縮 N₂ ガスを勢い良く吹き付けることにより、水分を飛ばして乾燥させる。*³

* 1: 多量のプレハイブリダイゼーション溶液を用いてスライド全体を処理することも可能です。

* 2: 操作のため溶液から出しても構いません。TaKaRa Spaced Cover Glass のスペーサー部分でアレイ面を傷つけないように注意深く行ってください。

* 3: 操作中アレイ面が他の DNA チップや容器等に触れると DNA スポットにキズが入りますので、DNA チップはスライド染色カゴ等に立てて洗浄してください。



- * DNA チップ表面に残った水滴をそのまま乾燥させますと、バックグラウンドとなる場合があります。
- * スライド染色カゴやスライド立てが入るようにプラスチック容器を加工して簡単な遠心容器を自作し 96 ウェルプレート用スイングローターにセットしてスライドガラスを遠心することができます。(20 ページ、【参考 3】)。また、50 ml の遠心チューブにスライドガラスを入れて遠心することもできます。(この際スイングローターを使用してください。)

(2) ハイブリダイゼーション

A. 試薬・器具類

- ・カバーガラス TaKaRa Spaced Cover Glass
- ・TaKaRa Hybridization Chamber
- ・恒温水槽（湯温 60℃：振とうできるタイプが望ましい、空気循環式恒温槽は不可）

B. 操作手順

ブレハイブリダイゼーションでの操作（11 ページ～）を参照してください。
TaKaRa Hybridization Chamber を使用する場合は恒温水槽を使用し、空気循環式恒温槽は使用しないでください。なお、TaKaRa Spaced Cover Glass を使用する際には、ペーパーボンド等でのカバーガラス周辺の密閉は行わないでください。

- 1) Hybridization Chamber カセットの蓋のネジをゆるめて蓋を開け、使用するスライドセッティングエリアのくぼみに、必要量の 2×SSC を入れる。
- 2) DNA チップの DNA がスポットされている面を上にして、スライドセッティングエリアに置く。
- 3) TaKaRa Spaced Cover Glass を正しい方向で、アレイされている部分にかぶせる。
- 4) 10 μ l (Spaced Cover Glass S)、あるいは 25 ～ 27 μ l (Spaced Cover Glass XL) のターゲット溶液を、Spaced Cover Glass と DNA チップの間に展開する。
- 5) カセットの蓋を閉じ、しっかりネジを締める。
- 6) 60℃の恒温水槽に沈めて 12 ～ 16 時間保温する。*

* ターゲット液の拡散を早めるため、TaKaRa Spaced Cover Glass がずれない程度に軽く振とうすることをお勧めします。（～ 80 rpm 程度）

3. 洗浄

洗浄条件はニトロセルロース膜等を用いた従来のハイブリダイゼーション実験の条件を用いることが可能です。必要であれば、洗浄温度、イオン強度、洗浄時間等を変更してください。

A. 試薬・器具類

- ・洗浄 buffer : 2 × SSC/0.2% SDS
2 × SSC
0.05 × SSC
- ・恒温水槽（湯温 55℃）
- ・スライド染色カゴ
- ・染色バット
- ・スライドガラスを遠心可能な遠心機*、あるいは圧縮 N₂ ガス

* スライド染色カゴやスライド立てが入るようにプラスチック容器を加工して簡単な遠心容器を自作し 96 ウェルプレート用スイングローターにセットしてスライドガラスを遠心することができます（20 ページ、【参考 3】）。また、50 ml の遠心チューブにスライドガラスを入れて遠心することもできます。（この際スイングローターを使用してください。）

B. 操作手順

- 1) 室温の $2 \times \text{SSC}$ 中で TaKaRa Spaced Cover Glass をはずす。* 1
- 2) DNA チップをスライド染色カゴに立て、あらかじめ恒温槽で保温しておいた染色バット中の 55°C の $2 \times \text{SSC}/0.2\% \text{ SDS}$ で 5 分間 $\times 3$ 回洗浄する(スライド染色カゴをゆすってください)。
- 3) 室温の $0.05 \times \text{SSC}$ でリンスする。* 2
- 4) 1,000 rpm、2 分間程度の低速遠心、または圧縮 N_2 ガスを勢い良く吹き付けることにより、水分を飛ばして DNA チップを乾燥させる。* 3
- 5) スキャンニングする。* 4

* 1：操作のため溶液から出しても構いません。アレイ面を傷つけないように注意深く行ってください。カバーガラスをはずしたらただちに洗浄液につけてください。

* 2：SDS や塩が残っているとバックグラウンドが高くなるため、なるべく SDS フリーの低塩濃度溶液にて最終洗浄を行ってください。

* 3：DNA チップ表面に残った水滴をそのまま乾燥させると、バックグラウンドとなる場合があります。

* 4：乾燥を終えた DNA チップはすみやかにスキャンニングしてください。

4. スキャンニング

Affymetrix 428 Array Scanner などの DNA チップ解析装置を用いて、各スポットの蛍光シグナルを読み取ります。

操作手順 (Affymetrix 418/428 Array Scanner の場合)

- 1) 洗浄・乾燥後の TaKaRa DNA チップの製品ラベル側を手前、アレイ面を上にして、スキャナーのステージにセットする。
- 2) レーザーパワー (Affymetrix 418 Array Scanner の場合のみ)、および PMT ゲインを設定した後、読み取り範囲パラメーター*を入力し、スキャンニングを行う。
- 3) 取得した画像データを保存する。

* Affymetrix 418/428 Array Scanner での読み取り範囲のパラメーターは IntelliGene® のデータシートに記載されています。

Affymetrix 418/428 Array Scanner によりスキャンした画像は、製品ラベル側が上方向の画像 (3 ページ、図 1 と同じ方向) として保存されます。PerkinElmer 社の ScanArray シリーズでスキャンした画像は、上下が逆になりますので遺伝子リストと画像上のスポット位置の関連付けに注意してください (詳細は各スキャナーのメーカーにお問い合わせください)。

5. データ解析

スキャンニングにより得られた画像データから、ImaGene™ (BioDiscovery 社) などのマイクロアレイ解析用ソフトウェアを用いて、各スポットの蛍光シグナルを定量します。タカラバイオのホームページよりダウンロード可能な ImaGene™ 解析用の Gene ID file は、製品ラベルを上にして正面から見た画像にのみ対応しています。PerkinElmer 社の ScanArray シリーズで製品ラベルを手前にしてスキャンした場合、画像の上下が逆となるため、Gene ID file に対応していません。得られた画像を 180° 回転した後、解析してください。(詳細は、各スキャナーのメーカーにお問い合わせください。)

VII. インターナルコントロールを用いた実験

TaKaRa DNA チップには、インターナルコントロールとして λ DNA 由来 lambda A 断片 (TestARRAY、Human CHIP、Mouse CHIP の場合) や、Human TFR DNA 断片 (Cyano CHIP、*E.coli* CHIP の場合) がスポットされています。インターナルコントロールを用いた実験を行う場合には、lambda A 断片に相補的な λ poly A⁺ RNA-A や、Human TFR DNA 断片に相補的な Human TFR RNA (1 kb) を RNA サンプルに添加してから標識反応を行ってください。インターナルコントロールは、以下のようなコントロールとなります。

1. 標識反応およびハイブリダイゼーションのコントロール

インターナルコントロールスポットのハイブリダイゼーションシグナルが出ている場合、標識反応とハイブリダイゼーションは成功していると考えられます。それにもかかわらずその他 (housekeeping gene 等) のシグナルが検出されないまたは低すぎる場合は、RNA サンプルの純度が低かったり、分解している可能性が高いことが推測されます。

2. Cy 3 と Cy 5 チャンネルの補正のコントロール

補正方法の項 (15 ページ、VIII. データの補正方法) を参照してください。

VIII. データの補正方法

DNA チップを用いた実験では、2 種類の RNA サンプルをそれぞれ異なる 2 種類の蛍光色素 (ここでは Cy 3 と Cy 5) で標識を行うため、2 種のサンプル間での遺伝子発現の比率を求めるためには、Cy 3 と Cy 5 チャンネルの補正を行う必要があります。以下に種々の補正方法例を示します。

1. Housekeeping gene による補正

TaKaRa DNA チップには数種類の housekeeping gene が固定化されています。実験に合った housekeeping gene のシグナルで両チャンネル全体のシグナル補正を行います。

2. 全遺伝子のシグナルの中央値による補正

IntelliGene® II Mouse CHIP などの遺伝子数が多いチップの場合、大部分の遺伝子の発現量は変化しないと仮定して、全遺伝子のシグナルの Cy3/Cy5 比率の中央値が 1 になるように補正を行います。近年最も好ましい補正法として、局所重み付け線形回帰 (lowess) による normalization があります。詳細は以下を参考にしてください。

Workman, C. et. al : *Genome Biol.* 2002 Aug 30 ; 3 (9)

esearch0048.1- research0048.16

ただし、この方法は、遺伝子数が少ないチップの場合にはお勧めできません。

3. インターナルコントロールによる補正

2 種類の同量の RNA サンプルにそれぞれ一定量のインターナルコントロール RNA を添加してから標識反応を行います。インターナルコントロールの量は両チャンネルで等しいため、ハイブリシグナル強度が等しくなるように補正を行います。ただし、この補正方法は標識反応以後の補正は可能ですが、サンプル量や RNA 量に差がある場合は、お勧めできません。

IX. トラブルシューティング

DNA チップを用いた実験におけるトラブルは、RNA の調製、蛍光標識、ハイブリダイゼーション、洗浄など各操作の複合的な原因により生じます。以下に、トラブルシューティングを示します。

【トラブル】 十分なシグナル強度が得られない。

【原因および解決策】 以下の原因により、標識産物の量が少なく、ターゲットの蛍光強度が足りないことが考えられます。事前に、TestARRAY を用いてシグナルが出ることを確認することをお勧めします。

RNA 量が少ない

発現量の低い遺伝子が多い場合には、できる限り標識に用いる RNA 量を増やしてください。

RNA の純度が低い

多糖や蛋白質などの不純物により、標識反応が阻害された可能性があります。標識に用いる RNA はできる限り純度の高いものを使用してください。

RNase が混入した

RNase の混入を防ぐため、実験操作は手袋とマスクを着用し、RNase free の器具や試薬を用いてください。また、RNA は -80℃ にて保存してください。

【トラブル】 ハイブリダイゼーション後のバックグラウンドが高い。

【原因および解決策】 以下の原因により、バックグラウンドが上がったことが考えられます。手順や操作法をチェックするためにも、事前に TestARRAY を用いて確認することをお勧めします。

RNA の純度が低い

多糖や蛋白質等の不純物により、バックグラウンドが上昇する可能性があります。標識に用いる RNA はできる限り純度の高いものを使用してください。

原核生物の total RNA をラベリングした場合

リボソーム RNA も標識されるためバックグラウンドが高くなる場合があります。RNA 量を 1/2 ~ 1/5 に減らしてください。

ハイブリダイゼーション中にターゲットが乾燥した

ハイブリダイゼーション中にターゲットが乾燥すると、高いバックグラウンドが生じます。TakaRa Hybridization Chamber は、空気循環式恒温槽内で使用するとターゲット液が乾燥する恐れがあります。必ず水浴で御利用ください。ハイブリダイゼーション中の乾燥には十分注意し、ハイブリダイゼーション後の洗浄操作時の乾燥も避けてください。

洗浄が不十分であった

洗浄が不十分な場合、バックグラウンドが高くなります。洗浄時間の延長、洗浄温度を上げる、洗浄溶液の変更等を行い、より強い洗浄条件にしてください。

Free の Cy3、Cy5-dUTP の除去が不完全であった。

Free の Cy3-dUTP、Cy5-dUTP はバックグラウンドの原因になります。精製カラムの膨潤等、精製工程が確実に行われているか確認してください。

【トラブル】 ハイブリダイゼーション後のバックグラウンドが不均一になった。

【原因および解決策】 バックグラウンドの不均一性は、以下の原因が考えられます。

標識ターゲット中に不溶物やゴミが混入している

標識ターゲット中に、不溶物やゴミが混入している場合、バックグラウンドが不均一になります。ハイブリダイゼーション操作を行う前に、標識ターゲット溶液を高速（15,000 rpm、10 分）にて遠心し、不溶物やゴミを沈殿させた後、上清をハイブリダイゼーションに使用してください。上清を取る際、沈殿物を一緒に吸い取らないように十分注意してください。

ハイブリダイゼーション操作時に気泡が混入した

ハイブリダイゼーション時の気泡が原因でアレイ面に標識ターゲットが行き渡らず、ハイブリダイゼーションシグナルが出なかったり、バックグラウンドが不均一になることがあります。ハイブリダイゼーション時に泡が入らないように注意してください。

ハイブリダイゼーション中に乾燥した

ハイブリダイゼーション中にターゲットが乾燥することにより、バックグラウンドの不均一性を引き起こします。ハイブリダイゼーション中の乾燥には十分注意してください。

洗浄後の乾燥が不十分

洗浄後の乾燥を自然乾燥で行なうと、洗浄溶液中の塩などがアレイ面に析出し、バックグラウンドが不均一になります。洗浄後の乾燥は遠心機や N₂ ガススプレーにて強制的に完全に行なってください。（20 ページ、【参考 3】）

X. データの信頼性

スキャニング画像の鮮明さやハイブリダイゼーションの具合に左右され、また、種々の判断基準がありますが、バックグラウンドが十分低く、かつ十分なシグナル強度において、Cy3/Cy5 のうち低い方のシグナル強度の Mean 値（ピクセルの平均値）がバックグラウンドの Mean 値 + 2SD 値よりも高い遺伝子において、2 種類の検体間で 2 倍以上のシグナル強度差が見られる場合、99%の確率で有意な差があるという見方があります。

XI. Appendix

【参考 1】 RNA Transcript SureLABEL Core Kit で作製した蛍光標識ターゲットと TaKaRa Hybridization Chamber を用いたハイブリダイゼーション法

少量の真核生物由来の total RNA から、RNA Transcript SureLABEL Core Kit を用いて蛍光標識 antisense RNA ターゲットを調製し、解析に用いることもできます。キット添付の説明書に従って標識、エタノール沈殿、ホルムアミドへの溶解を行った後、以下に示した方法でハイブリダイゼーションを行ってください。

(1) 試薬・器具類

- ・カバーガラス TaKaRa Spaced Cover Glass
- ・TaKaRa Hybridization Chamber
- ・恒温水槽（湯温 60℃：振とうできるタイプが望ましい、空気循環式恒温槽は不可）

(2) 操作手順

必ず TaKaRa Hybridization Chamber 添付の資料を確認の上、使用してください。
なお、TaKaRa Spaced Cover Glass を使用する際には、ペーパーボンド等でのカバーガラス周辺の密閉は行わないでください。

- 1) ターゲット溶液を 70℃で 10 分間加熱し変性させる。
- 2) 室温に放置して冷却後* 1、15,000 rpm、25℃で 10 分間遠心し、不溶物を除く。
- 3) Hybridization Chamber の蓋のネジをゆるめて蓋を開け、使用するスライドセッティングエリアのくぼみに、必要量の 2 × SSC を入れる。
- 4) DNA チップの DNA がスポットされている面を上にして、スライドセッティングエリアに置く。
- 5) TaKaRa Spaced Cover Glass を正しい方向で、アレイされている部分にかぶせる。
- 6) 10 μ l (Spaced Cover Glass S)、あるいは 25 ~ 27 μ l (Spaced Cover Glass XL) のターゲット溶液を、Spaced Cover Glass と DNA チップの間に展開する。
- 7) カセットの蓋を閉じ、しっかりネジを締める。
- 8) 60℃の恒温水槽にて 12 ~ 16 時間保温する。* 2

* 1：冷却しすぎて SDS が析出した場合、軽く温めて溶解させてください。

* 2：ターゲット液の拡散を早めるため、TaKaRa Spaced Cover Glass がずれない程度に軽く振とうすることをお勧めします。（～ 80 rpm 程度）

【参考 2】 湿箱を用いたハイブリダイゼーション法

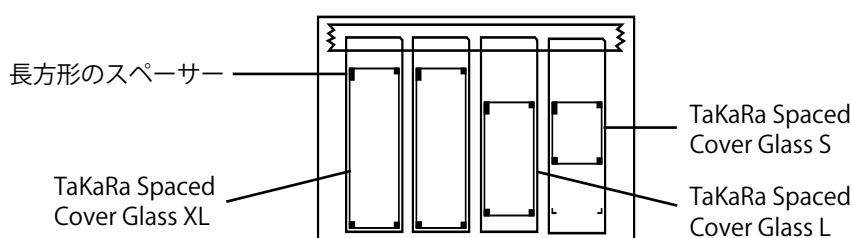
(1) 試薬・器具類

- ・カバーガラス TaKaRa Spaced Cover Glass
- ・角型シャーレ
- ・湿箱
- ・恒温水槽（湯温 65℃）

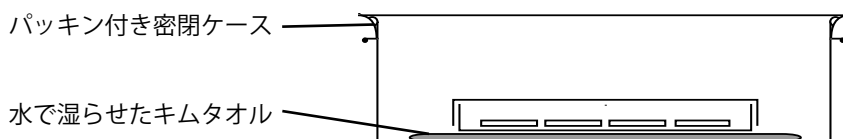
(2) 操作手順

以下の操作に先立ち、水で湿らせたキムタオルを湿箱の底に平らに敷いておいてください。なお、TaKaRa Spaced Cover Glass を使用する際には、ペーパーボンド等でのカバーガラス周辺の密閉は行わないでください。

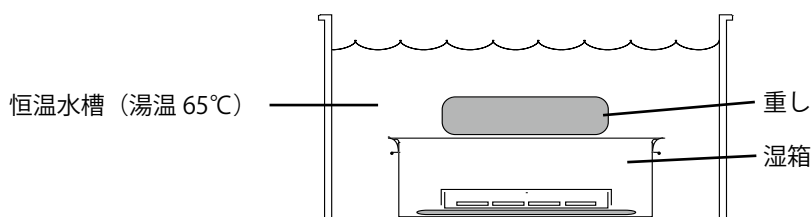
- 1) DNA チップのスポット面を上にして、角型シャーレに入れ、テープで固定する。
- 2) TaKaRa Spaced Cover Glass を正しい方向でアレイ部分にかぶせる。



- 3) 10 μ l (Spaced Cover Glass S)、20 ~ 22 μ l (Spaced Cover Glass L) あるいは 25 ~ 27 μ l (Spaced Cover Glass XL) のターゲット溶液を、Spaced Cover Glass と DNA チップの間に展開する。
- 4) 図のような湿箱を用意し、蓋を閉めた角型シャーレを湿箱の中に設置する。



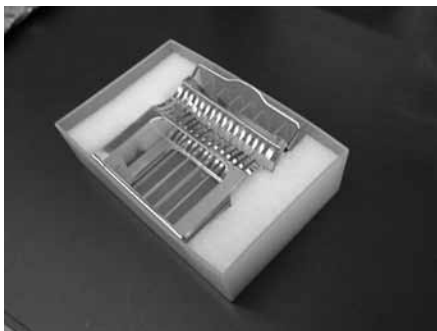
- 5) 湿箱を 65℃の恒温水槽に浸け、12 ~ 16 時間保温する。



【参考 3】遠心容器の自作例

ウレタンをスライド染色カゴを固定できるように適当な大きさに切断してピペットチップケースの蓋にはめ込み、ウレタンの下にキムワイプを敷きます。スライド染色カゴを固定し、さらに 96 ウェルプレート用スイングローターにセットして遠心します。

注) スイングローターは、必ずディープウェルプレートに対応したものを使用してください。



XII. 参考文献

- 1) Phimister, B. ed.: *Nature Genet. Suppl.*, **21**, 1-60 (1999)
- 2) 細胞工学別冊 ゲノムサイエンスシリーズ 1: DNA マイクロアレイと最新 PCR 法 (2000)

XIII. 関連製品

< IntelliGene® シリーズおよび IntelliGene® II シリーズ >

Human Cancer CHIP (製品コード X102)
Human Cytokine CHIP (製品コード X104)
PD Human PREB CHIP (製品コード X122)
Mouse CHIP (製品コード X2021)
Cyano CHIP (製品コード X001)
E. coli CHIP (製品コード X003)
TestARRAY (製品コード X000)

< IntelliGene® HS シリーズ >

HS Human Expression CHIP (製品コード X121A)

< 装置類 >

TaKaRa Hybridization Chamber (製品コード TX710)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® (製品コード TP600/TP650)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® mini (製品コード TP100)

< 試薬類 >

λ poly A⁺ RNA-A (製品コード TX802)
λ Control Template&Primer Set-A (製品コード TX803)
Human TFR RNA (1 kb) (製品コード TX805)
Human TFR Template&Primer Set (製品コード TX806)
RNA Fluorescence Labeling Core Kit (M-MLV Version) Ver. 2.0 (製品コード TX810)
RNA Transcript SureLABEL Core Kit (製品コード TX815)
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)
FastPure®RNA Kit (製品コード 9190)
Oligotex[™]-dT30 <Super> (製品コード W9021A/W9021B)
Oligotex[™]-dT30 <Super> mRNA Purification Kit (From Total RNA) (製品コード 9086)
TaKaRa Spaced Cover Glass S [22×24 mm] (製品コード TX702)
TaKaRa Spaced Cover Glass L [22×45 mm] (製品コード TX703)
TaKaRa Spaced Cover Glass XL [24×60 mm] (製品コード TX705)
Label IT[®] Cy[™] 3 Labeling Kit (製品コード MIR3625)
Label IT[®] Cy[™] 5 Labeling Kit (製品コード MIR3725)
Label IT[®] シリーズは Mirus Bio 社の製品です。

XIV. 注意

- ・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

製品についての技術的なお問い合わせ先

TaKaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社