

# アジレント リニア増幅& ラベル化キット



## プロトコール

ユーザーズガイド  
製品番号G2554A, P/N G2556-66002 用  
Agilent *in situ* オリゴヌクレオチド  
マイクロアレイキット用

バージョン 3.0J  
2002年 12月

キットに添付されているキット構成リストと  
保管時の注意事項を必ずご確認ください。

**注意：このキットは研究用です。**



**Agilent Technologies**

## 部品番号

G2554-96010

## 改訂履歴

First edition, version 3.0, June, 2002  
Printed in USA

Agilent Technologies, Inc.  
BioResearch Solutions Unit  
1601 California Avenue  
Palo Alto, CA 94304 USA

2002年12月上記英語版をもとに日本語化

## テクニカルサポート

日本における販売及び技術サポートは  
フリーダイヤル 0120-477-111までご連絡ください。

またアジレント関連製品の詳しい情報は次の URL でご覧  
いただけます。

[www.agilent.com/chem/dnasupport](http://www.agilent.com/chem/dnasupport)

## ご購入された方へ

本製品は研究用のみにご使用ください。  
Agilent Technologies Inc. からの正式な許可なしに、  
Agilent製品を、再販、再販のための改造、もしくは製品の  
製造に使用することは出来ません。

プロトコルを日本語化するにあたり作業時間が発生する  
ため、日本語プロトコルの発行は英語の最新バージョン  
に比べてどうしても遅れが生じます。製品ご購入の際は、  
必ず製品添付の英語版プロトコルのVersionをお確かめの  
上、日本語版が古い場合は、最新の英語版を参照くださる  
ようお願い申し上げます。

## Warranty:

Each Product purchased will include a global warranty. A global warranty includes the warranty for the country of purchase. If the Product is moved to another country, Customer will receive the destination country's standard warranty, provided that: 1) the Product has a return to Agilent warranty, or 2) if the Product has an on-site warranty, Agilent has a Product specific support presence in that country.

Product warranty information is available with Products, on quotations, or upon request. The warranty period begins on Delivery, or the date of installation if installed by Agilent. If Customer schedules or delays installation by Agilent more than 30 days after Delivery, the warranty period begins on the 31st day after Delivery. Customer may receive a different warranty when the Product is purchased as part of a system.

Agilent warrants that Software will not fail to execute its programming instructions due to defects in materials and workmanship when properly installed and used on the hardware designated by Agilent. Agilent further warrants that Agilent owned standard Software will substantially conform to Specifications. Agilent does not warrant that Software will operate in hardware and software combinations selected by Customer, or meet requirements specified by Customer.

Agilent does not warrant that the operation of Products will be uninterrupted or error free.

If Agilent receives notice of defects or non-conformance as defined in Sections 7(c) and 7(d) during the warranty period, Agilent will, at its option, repair or replace the affected Product(s). Customer will pay expenses for return of such Product(s). Agilent will pay expenses for shipment of repaired or replacement Product(s). If Agilent is unable, within a reasonable time, to repair or replace the affected Product(s), Customer will be entitled to a refund of the purchase price upon prompt return of the Product(s) to Agilent.

Agilent warrants that Agilent Support will be provided in a professional and workmanlike manner. Agilent will replace, at no charge, parts which are defective and returned to Agilent within 90 days of delivery.

The above warranties do not apply to defects resulting from improper or inadequate maintenance, repair or calibration by Customer; Customer or third party supplied hardware or software, interfacing or supplies; unauthorized modification; improper use or operation outside of the Specifications for the Product; abuse, negligence, accident, loss or damage in transit; or improper site preparation.

THE ABOVE WARRANTIES ARE EXCLUSIVE AND NO OTHER WARRANTY, WHETHER WRITTEN OR ORAL, IS EXPRESSED OR IMPLIED. AGILENT SPECIFICALLY DISCLAIMS THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE.

**注意** 本マークは、無視して取り扱いを誤った場合、物的損害が発生する潜在的危険の存在を示しています。

## 目次

はじめに	4
キットの内容	7
必要な機器・器具及び試薬	7
安全上の注意	9
実験上の注意	9
試薬の準備	10
• Cyanine Dye ミックス	10
• 70% エタノール	10
• 0.3% Triton X-100	10
RNA試料のチェック	11
RNA増幅	11
• polyA+ RNAからのcDNA合成	11
• トータルRNAからのcDNA合成	12
• ラベル化cRNAの合成	13
• ラベル化cRNAの沈殿	14
ラベル化cRNAの濃度決定	14
付録	
付録1：RNAの質	16

### ご購入された方へ

本製品は研究用のみにご使用ください。本製品は診断や人間への使用を意図したものではありません。Agilent Technologies Inc. からの正式な許可なしに、Agilent製品を、再販、再販のための改造、もしくは製品の製造に使用することは出来ません。

## はじめに

リニア増幅&ラベル化試薬キットは、アジレント *in situ* オリゴヌクレオチドマイクロアレイ（製品番号 G2506A、G2507A、G2508A、G2509A、G4110A、G4120A、G4140A）にハイブリダイゼーションさせるラベル化cRNA（相補的RNA）ターゲットを調製するのに必要なプロトコールと試薬類で構成されています。

2つの異なる組織または細胞由来の poly A+ RNA または トータル RNA を増幅し、Cyanine 3 (532nmのレーザーで励起) または Cyanine 5 (633nmのレーザーで励起) でラベル化します。本プロトコールによる増幅とラベル化の流れは以下の通りです：まず、poly A+ RNA にプライマーをアニールさせます。プライマーには poly dT と T7 ポリメラーゼプロモータ領域が含まれています。次に、逆転写酵素 (MMLV-RT) を加えて、第一鎖cDNA (アンチセンス鎖) を合成します。反応中には第二鎖 (センス鎖) cDNA 合成反応の為にランダムヘキサマーが含まれています。この時点で、二本鎖cDNAが出来ます。次に、T7 RNAポリメラーゼを使ってアンチセンスcRNAを合成します。この時の反応液に、Cyanine3 または Cyanine5でラベル化されたCTPを入れることにより、cRNA合成時に蛍光標識が取り込まれラベル化が行われます。

ラベル化反応の後、2つの試料（処置群と対象群）を混合し、*in situ* オリゴヌクレオチドマイクロアレイにハイブリダイゼーションします。マイクロアレイを洗浄後、マイクロアレイスキャナ（アジレントマイクロアレイスキャナなど）でスポットの蛍光強度を読み取ります。スキャナで読み取った画像をスポット定量ソフトウェアで数値化、色素補正し、2つの試料間の遺伝子発現比を求めます。

ラベル化実験はpoly A + RNAの場合およそ7時間、トータルRNAの場合およそ9時間で終了しますが、実験手順への慣れや取り扱い試料の数によっても変わりますので、あくまで参考として目安にしてください。必要であれば、ステップ17の作業を一晩かけて行うこともできます。

poly A+ RNAの量は細胞の種類によって変わりますが、200ng poly A + RNAはおおよそ $10^6$ 細胞にあるpoly A + RNAの全量と計算できます。これには以下の推測が用いられます。

- 1細胞あたり約100,000 - 600,000 のmRNAが存在
- RNAの平均分子量は $5.77 \times 10^6$  Da で（平均長を1.75kb、1塩基あたり330 Daで計算）

通常このキットを使うと、100倍の増幅率が得られます。ただし増幅率についてはお使いのサンプルRNAの精製度によっても異なります。

**実験を成功させるため、実験を始める前に必ず本プロトコール全体に目を通してください。**

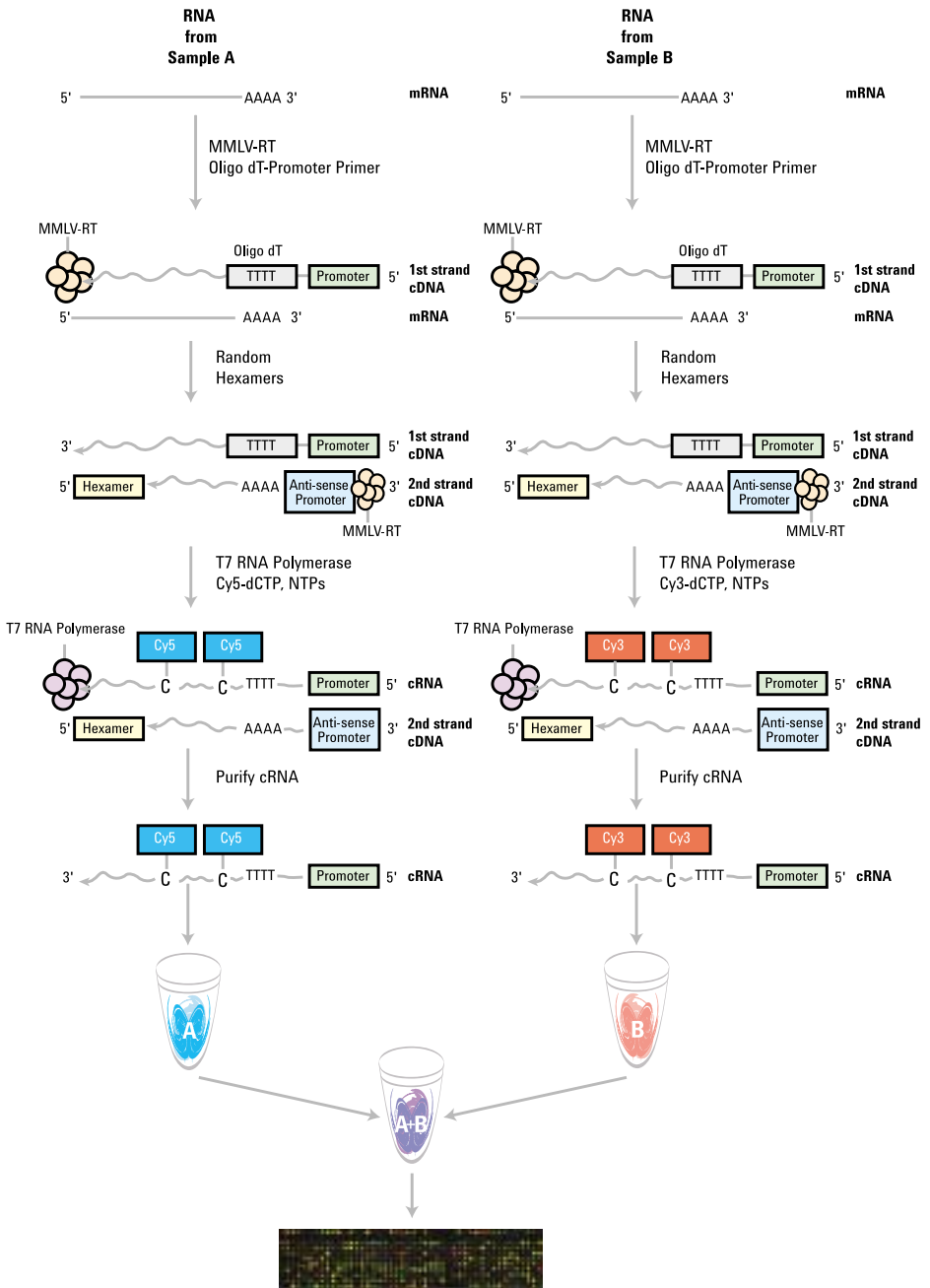


Figure 1. Procedural overview.

## 実験の流れ

ステップ	温度	時間
<b>cDNA合成</b>		
プライマーと テンプレートの熱変性	65°C	10分
急冷	氷上	5分
二本鎖cDNA 合成反応	40°C	120分 (polyA+) または240分 (トータルRNA)
逆転写酵素の 失活	65°C	15分
急冷	氷上	5分
<b>cRNA合成</b>		
cRNA合成	40°C	60分
<b>cRNA沈殿</b>		
cRNA沈殿	-20°C	60分から一晩
遠心	4°C	20分
cRNAペレットの 乾燥	室温	10分

## キットの内容 (製品番号G2554AおよびG2556A)

Component	Part number
T7 Promoter Primer (100 ul)	54172
5x First Strand Reaction Buffer (80 ul)	54173
0.1 M DTT (160 ul)	54174
10 mM dNTP mix (20 ul)	54175
Random Hexamers (200 ng/μL; 20 ul)	54176
MMLV-RT (200 U/μL; 20 ul)	54177
RNaseOUT (40 U/μL; 20 ul)	54178
4x Transcription Buffer (400 ul)	54180
NTP Mix (160 ul)	54181
Inorganic Pyrophosphatase (12 ul)	54182
T7 RNA Polymerase (2500 U/μL; 16 ul)	54183
4 M Lithium Chloride (1.6 ml)	54243

**Table 1. Kit contents and part numbers.**

※試薬は-20°Cで保存してください。

## キット以外に必要な機器・器具及び試薬

### 必要な機器・器具

- アイスおよびアイスバケツ
- パウダーフリー手袋
- UV分光光度計と石英セル
- タイマー
- 油性ペン
- マイクロピペッター
- 50 mL コニカルチューブ (滅菌済ヌクレアーゼフリー)
- 1.5 mL エッペンドルフチューブ (滅菌済ヌクレアーゼフリー)
- エアロゾル防止フィルター付きピペットチップ (滅菌済ヌクレアーゼフリー)
- ヒーティングブロック (設定温度65°C)
- 冷却遠心機 (設定温度4°C)
- ウォーターバス (設定温度40°C)
- ボルテックスミキサー

## 必要な試薬

- **TE バッファ** (10 mM Tris; 1mM EDTA; pH 8.0, **ヌクレアーゼフリー**) (Amresco cat. no. E112)
- **70% エタノール** (Amresco cat. no. E193を希釈)
- **10% Triton X-100** (Proteomicsグレード) (Amresco, cat. no. M143を希釈\*)
- **1mM EDTA** (RNaseフリー溶液、Amresco, cat. No. E522-100MLを希釈\*)
- **Cyanine 3-CTP** (10.0 mM) (PerkinElmer/NEN Life Sciences, cat. no. NEL580 \*\*)
- **Cyanine 5-CTP** (10.0 mM) (PerkinElmer/NEN Life Sciences, cat. no. NEL581 \*\*\*)
- **Poly A+ RNA** 各200ng (濃度を36.4 µg/mLから200 µg/mLの間に調製)
- **トータルRNA** 各5µg (濃度を1.11mg/mLから5mg/mLの間に調製)
- **DNase/RNase フリー水** (Invitrogen, cat. no. 10977015)

\* トータルRNAをスタートサンプルとして使用する場合にのみ必要です。

\*\* PerkinElmer/NEN Cyanine 3-CTP 1チューブにつき、**4反応**が可能です。

\*\*\* PerkinElmer/NEN Cyanine 5-CTP 1チューブにつき、**6反応**が可能です。

## 安全上の注意

- 実験にあたっては、必ず適切な服装（白衣、手袋、防護メガネ、マスクなど）を着用してください。
- Cyanine 3-CTP とCyanine 5-CTP は発癌性物質を含んでいます。吸引、誤飲、皮膚への直接の接触は避けてください。
- キットには塩化リチウム（LiCl）が含まれています。塩化リチウム（LiCl）には中枢神経系への毒性があります。催奇性があり、乳児に悪影響を与える可能性があります。また不妊を誘発する可能性があります。吸入、皮膚接触、誤飲により、害を引き起こします。これらのMaterial Safety Data Sheets (MSDS) は、アジレント社のWEB（[www.chem.agilent.com](http://www.chem.agilent.com)）から入手することができます。

## 実験上の注意

- ご所属のラボの安全ガイドに従って、実験を行ってください。
- 実験台を清潔な状態に保って、実験を行ってください。
- Agilentでは一度に扱うサンプルの数は**6以上**を勧めています。
  - これは酵素など少量試薬を扱う際の、ピペットによるエラーを最小限にするためです。
  - 本プロトコルでは1反応に必要な試薬量と、6.5反応に必要な試薬量を明記してあります。
  - 実験を行うときは、**0.5反応分余分**に試薬を準備し、反応液が十分足りるようにします。例えばn反応行うときは、**n +0.5反応分**の試薬を使います。
- RNaseのコンタミネーションを防ぐために、実験中はパウダーフリーの手袋を着用し、ヌクレアーゼフリーの溶液およびピペットチップを使用してください。
- Cyanine 3とCyanine 5は光で分解します。**出来る限り光にあたらないように**注意して使用してください。保管時、反応時は必ず遮光してください。
- 1.5mLエッペンチューブで冷凍保存したストック溶液は、使用前に以下の様に取り扱ってください。
  - a. 解凍するときは室温以上の温度で暖めることなく出来るだけ速やかに解凍します。
  - b. 解凍後は軽くボルテックスし、5-10秒ほどスピンドウンして蓋や壁についた液を集めます。
  - c. 使用するまで氷上で保管します。

**開始する前にプロトコル全体をお読みください。**

## I. 試薬の準備

<注意>

- 以下の試薬はステップ8 (cDNA合成) のインキュベーションの間でも準備できます。
- Cyanine3-CTPとCyanine5-CTPは事前に準備して-80°Cに保存が可能です。
- 反応には希釈したCyanine3-CTPとCyanine5-CTPを各4.0 µLずつ使用します。事前に反応数の確認をし、十分なCyanine Dyeが手元にあるようにします。

### Cyanine Dye ミックス (必要時間 5-10分)

*Cyanine 3-CTP, 6.0 mM*

(1チューブあたり4反応使えます)

1. 10 mM Cyanine 3-CTPストックを解凍し、氷上に置きます。
2. 手短かにボルテックスします。
3. 1~2秒ほどスピンドウンし、蓋や壁についた液をチューブの底に集めます。
4. 10 µLのCyanine 3-CTPを取り出し、希釈用のエッペンドルフチューブに移します。
5. 6.7 µLのヌクレアーゼフリー水を希釈チューブに加え、穏やかに混合します。
6. 暗所-80°Cで保存します。長期の保存については、ご購入先までお問い合わせください。

*Cyanine 5-CTP, 4.0 mM*

(1チューブあたり6反応使えます)

1. 10 mM Cyanine 5-CTPストックを解凍し、氷上に置きます。
2. 手短かにボルテックスします。
3. 1~2秒ほどスピンドウンし、蓋や壁についた液をチューブの底に集めます。
4. 10 µLのCyanine 5-CTPを取り出し、希釈用のエッペンチューブに移します。
5. 15 µLのヌクレアーゼフリー水を希釈チューブに加え、穏やかに混合します。
6. 暗所-80°Cで保存します。長期の保存については、ご購入先までお問い合わせください。

### 70% エタノール (必要時間 5分)

1. 50 mL コニカルチューブに35 mL の100% エタノールと15 mL ヌクレアーゼフリー水を入れて混合します。
2. 室温で保存します。

### 0.3% Triton X-100 (必要時間 5分)

この試薬はトータルRNAから増幅する場合にのみ準備します。

1. 1mM EDTA を 970µL 取り出し、ヌクレアーゼフリーのエッペンドルフチューブに入れます。
2. 30µL の 10% Triton X-100 を加え、混合します。

## RNA 試料のチェック

実験を成功させるには、質の高いRNAを使うことが大切です。実験に使用する前に、ラベル化に使用するtotal RNA またはpolyA+ RNA の品質を以下の方法でご確認ください。

### 1. サイズ分布 (付録を参照ください) :

変性アガロースゲルまたはアジレントバイオアナライザで試料の分解度を確認  
RNA 分析には、アジレント2100 バイオアナライザRNA6000 ナノキット (製品番号5065-4476) を使用することを推奨します。バイオアナライザは 1 ul の試料 (total RNA の場合5 ng/ul, polyA+RNA の場合25 ng) があれば短時間で RNA の質 (分解度) を調べることができます。従来のアガロースゲル電気泳動と比べて、試料量と実験時間を大幅に節約することが出来ます。

- ・ total RNA では通常約1.9 Kb と5 Kb に18s と28s rRNA のピークが見えます。この18s/28s のrRNA の比から試料の分解度を推定することが出来ます。rRNA のバンドはシャープでなければなりません。もし、rRNA のバンドがはっきり見えなくて、スメア状の場合や、rRNA以外の複数のピークが観察されるときは、試料RNA の分解が起きていることを示しています。さらに、高い分子量にバンドが見えるときは (>9000 Kb) ゲノムDNA のコンタミネーションしている可能性があります。
- ・ PolyA+ RNA の場合、0.5 Kb から2 Kb にかけて、スメアなバンドが見られます。

### 2. RNA 濃度の決定

UV吸光度計 (260 nm) でRNAのO.D.を測定します。以下の式を使って試料濃度を決定します。

$$\text{試料濃度} = (260 \text{ nm の吸光度}) \times 40 \text{ ng/ul}$$

## II. polyA+ RNAまたはトータルRNAからの増幅&ラベル化

### PolyA+ RNA からのcDNA 合成 (必要時間~3 時間)

トータルRNAから合成反応を行う時は、トータルRNAからのcDNA合成の項目をお読みください。

1. 1.5 mL エッペンチューブに200 ng poly A+ RNAを加えます。液量は**5.5  $\mu$ L**以下に抑えてください。RNAの濃度は少なくとも**36.4  $\mu$ g/mL**である必要があります。(詳しくは、「はじめに」の項をご参照ください)。
2. 5.0  $\mu$ L のT7 Promoter Primerを加えます。
3. ヌクレアーゼフリー水を加えて、最終量を10.5  $\mu$ Lに調製します。
4. 65°Cのヒートブロックに10分間インキュベートし、プライマーとRNAサンプルを熱変性・アニールさせます。
5. 反応チューブをオンアイスで5分間急冷します。
6. 別の1.5 mL エッペンチューブに以下の試薬を順に加え、cDNAミックスを作ります。cDNAミックスは使用するまでオンアイスにしておきます。

試薬	1反応 (μL)	6.5反応 (μL)
5x First Strand Buffer	4.0	26
0.1 M DTT	2.0	13
10 mM dNTP Mix	1.0	6.5
Random Hexamers	1.0	6.5
MMLV-RT	1.0	6.5
RNaseOUT	0.5	3.3
合計	9.5	61.8

表2. PolyA+ RNA用cDNAミックスの準備

- 各反応チューブに9.5 μLのcDNAミックスを加えます。
- 反応チューブを40°Cのウォーターバスで2時間インキュベーションします。
- 反応チューブを65°Cに移し、15分間インキュベーションします。

**注意** 65°CのインキュベーションでMMLV-RTを失活させます。

- チューブをアイスに移し、5分間急冷させます。
- 遠心機でスピンドウンして、蓋や壁についた液をチューブの底に集めます。

#### トータルRNA からのcDNA 合成 (必要時間 ~ 5 時間)

注意： polyA+ RNAから合成反応を行う時は、polyA+ RNAからのcDNA合成の項目をお読みください。

- 1.5 mL エッペンチューブに5μgのトータルRNAを加えます。液量は4.5 μL以下に抑えてください。RNAの濃度は少なくとも1.11 mg/mLである必要があります。(詳しくは、「はじめに」の項をご参照ください)。
- 5.0 μL のT7 Promoter Primerを加えます。
- ヌクレアーゼフリー水を加えて、最終量を9.5 μLに調製します。
- 65°Cのヒートブロックに10分間インキュベートし、プライマーとRNAサンプルを熱変性・アニールさせます。
- 反応チューブをオンアイスで5分間急冷します。
- 別の1.5 mL エッペンチューブに以下の試薬を順に加え、cDNAミックスを作ります。cDNAミックスは使用するまでオンアイスにしておきます。

試薬	1反応 (μL)	6.5反応 (μL)
5x First Strand Buffer	4.0	26
0.1 M DTT	2.0	13
10 mM dNTP Mix	1.0	6.5
Random Hexamers	1.0	6.5
MMLV-RT	1.0	6.5
RNaseOUT	0.5	3.3
0.3% Triton X-100	1.0	6.5
合計	10.5	68.3

表3. トータルRNA用cDNAミックスの準備

7. 各反応チューブに10.5  $\mu$ LのcDNAミックスを加えます。
8. 反応チューブを40°Cのウォーターバスで4時間インキュベーションします。
9. 反応チューブを65°Cに移し、15分間インキュベーションします。

**注意** 65°CのインキュベーションでMMLV-RTを失活させます。

10. チューブをアイスに移し、5分間急冷させます。
11. 遠心機でスピンドウンして、蓋や壁についた液をチューブの底に集めます。

**ラベル化cRNAの合成: in vitro転写およびCyanine 3-CTP, Cyanine 5-CTPの取り込み (必要時間 1.5時間)**

12. 各反応チューブに4.0  $\mu$ L Cyanine 3-CTP (6.0 mM) または 4.0  $\mu$ L Cyanine 5-CTP (4.0 mM) のどちらか一方を加えます。
13. 使用する直前に、以下の試薬を順に加え、Transcription ミックスを作ります。液の混合はピペットを使って行います。室温で準備します。

**注意** 酵素は反応を開始する直前まで混合しないで下さい。

試薬	1反応 ( $\mu$ L)	6.5反応 ( $\mu$ L)
Nuclease-free water	20.1	130.7
4x Transcription Buffer	20	130
0.1 M DTT	6.0	39
NTP Mix	8.0	52
RNaseOUT	0.5	3.3
Inorganic Pyrophosphatase	0.6	3.9
T7 RNA polymerase	0.8	5.2
<b>合計</b>	<b>56.0</b>	<b>364.1</b>

表4. Transcription ミックスの準備

14. 各反応チューブに、56  $\mu$ LのTranscriptionミックスを加えます。ピペットでゆっくりと混合します。
15. ウォーターバスで40°C、1時間転写反応を行います。

**注意** 反応時は必ず遮光してください。

### ラベル化cRNA (アンチセンス鎖) の沈殿 (必要時間 2.5時間～一晚)

16. 80  $\mu$ L の 4.0 M LiCl (キットに入っています) を各反応チューブに加え、ピペットで混合します。

**注意** LiCl (塩化リチウム) は毒性があります。安全上の注意をよくお読みください。

17.  $-20^{\circ}\text{C}$  で一晚 (あるいは少なくとも1時間) ラベル化cRNAを沈殿させます。

**注意** 必ず $-20^{\circ}\text{C}$ で沈殿させます。 $-80^{\circ}\text{C}$ またはドライアイスでは行わないで下さい。LiClが結晶化してしまう可能性があります。

18. 沈殿物を $4^{\circ}\text{C}$ で20分間遠心させます (フルスピード)。

19. 上澄み液をピペットで取り除きます。

**注意** ご所属のラボの安全ガイドに従い、LiCl (塩化リチウム) 溶液を廃棄してください。

20. ペレットを1.0 mLの70%エタノール (室温) で洗浄します。遠心をかけ再ペレット化し、エタノールを取り除きます。

- 必要であれば、さらに30秒遠心させて蓋や壁についたエタノールを集め、完全にエタノールを取り除きます。
- 通常、ペレットは目で確認できます。Cyanine3 CTPを含んだペレットはピンク色、Cyanine5 CTPを含んだペレットは青色です。

21. 約10分、室温でペレットを乾かします。

22. ペレットを100  $\mu$ Lのヌクレアーゼフリー水で溶解します。

**注意** ヌクレアーゼフリー水を加えた後、5分置いてから、ゆっくりとピペットで混合させます。

### III. ラベル化cRNAの濃度決定

23. 増幅効率を計算します。

- 1.5 mLエッペンチューブに 5.0  $\mu$ Lのラベル化cRNAと、295  $\mu$ LのTE (pH 8.0) を加えて混合し、1 : 60の希釈液を作ります。
- ブランク測定にTEバッファを用いて、260nmのODを測定します。cRNA濃度の決定には以下の式を使います:

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g/mL RNA}$$

- cRNA濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) にサンプル量 (0.1 mL) を乗じ、スタートのpoly A+ RNA量 (0.2  $\mu\text{g}$ ) で割って、増幅効率を計算します。

$$\text{cRNA conc (} \mu\text{g/mL)} \times 0.1 \text{ mL} / 0.2 \mu\text{g}$$

24. Cyanine3 とCyanine5の取り込み効率を計算します。

- 5.0  $\mu\text{L}$ のラベル化cRNAに、95  $\mu\text{L}$ のTE (pH 8.0) を加えて混合し、1 : 20の希釈液を作ります。
- 紫外可視分光光度計により、350 - 700 nmの範囲で測定します。
- 取り込み率には以下の式を使います。

$$\text{Cy3-CTP濃度 (mM)} = \frac{A_{552\text{nm}}}{(150\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) (1\text{cm 光路長})} \times 20 \text{ (希釈率)}$$

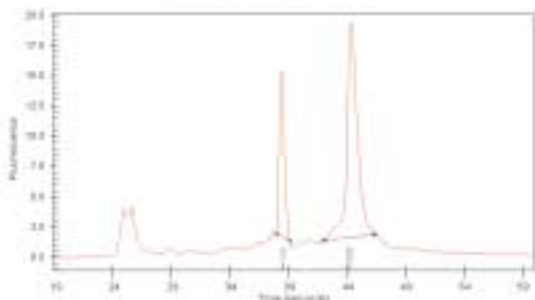
$$\text{Cy5-CTP濃度 (mM)} = \frac{A_{650\text{nm}}}{(250\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) (1\text{cm 光路長})} \times 20 \text{ (希釈率)}$$

25. 各マイクロアレイへのハイブリダイゼーションに必要なcRNA量を計算します。cRNAを直ぐに使用しない場合には、少量に分注し、ドライアイスで冷凍後、暗所  $-80^{\circ}\text{C}$ で保存できます。長期保存の場合は、チューブに分注して保存して下さい。

**注意** 解凍、冷凍のサイクルを繰り返すとcRNAが分解しやすくなります。cRNA産物の質をAgilent 2100バイオアナライザで再確認することをお勧めします。

## 付録 1 : バイオアナライザを用いたRNAの品質チェック

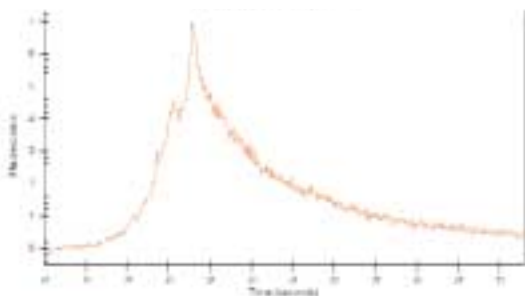
### Mouse Spleen トータル RNA



#### 高品質トータル RNAのエレクトロフェログラム (Agilent2100バイオアナライザ)

RNAサンプルは非常に多様性があるので、リボソームRNAのピークの高さと比の値もサンプルによって様々に変化しますが、多くの高品質なRNAサンプルは、共通の特徴を持っています。まず、18sと28s (原核生物の場合、16sと23s) の2本のリボソームRNAのピークが非常にはっきりと現れます。エレクトロフェログラムの29秒の付近から18sのリボソームRNAのピークまでの間のベースラインは、ほぼフラットとなり、小さなRNA分子に相当するやや丸い形状をした小ピークがところどころに見られます。また18sと28sの2本のピークの間にも、小さなピークが観察されます。この小さなピークは、高品質なトータルRNAではそれほど目立つものではありません。また、24~27秒付近に、5S、5.8SまたはtRNA由来の小さなピークが検出されることがあります。これはRNAの抽出法により、ピーク形状が変わります。

### Bovine Brain poly A+ RNA



#### 高品質Poly A+ RNAのエレクトロフェログラム (Agilent2100バイオアナライザ)

Agilent2100バイオアナライザで測定した高品質なpoly A+ RNAは、おおそ500-9000baseの範囲で存在している転写産物により、ブロードな1つのピークに見える形状を示します。その大部分は1000-4000baseの範囲に分布します。高品質なpoly A+ RNAのエレクトロフェログラムのピーク形状はなだらかで、複数の大きなピークが観察されることはありません。高品質のpoly A+ RNAであっても、ごく微量のリボソームRNAが混入していることがよくあります。混入しているリボソームRNAは、1もしくは2本のピークとして観察されます。バイオアナライザのソフトウェアでは、リボソームRNAの混入比率を自動計算し、比率が5%を超えたときにリボソームRNAのピークを同定します。





## Agilent's Printed Microarray Solutions

<b>Design it!</b>	<b>Microarray Design Services</b>
<b>G2560A</b>	Microarray Design and Basic QC
<b>G2561A</b>	Probe Selection
<b>G2562A</b>	Probe Curation
<b>G2563A</b>	Professional Consulting Service
<b>Print it!</b>	<b>cDNA and Custom Microarrays</b>
<b>G2506A</b>	25-mer Custom Oligonucleotide Microarray (8.4K)
<b>G2507A</b>	25-mer Custom Oligonucleotide Microarray (22K)
<b>G2508A</b>	60-mer Custom Oligonucleotide Microarray (8.4K)
<b>G2509A</b>	60-mer Custom Oligonucleotide Microarray (22K)
<b>G4100A</b>	Human 1 cDNA Microarray Kit
<b>G4101A</b>	Human 2 cDNA Microarray Kit
<b>G4104A</b>	Mouse cDNA Microarray Kit
<b>G4105A</b>	Rat cDNA Microarray Kit
<b>G4135A</b>	Arabidopsis 1 Microarray Kit
<b>Run it!</b>	<b>Microarray Processing Tools</b>
<b>G2554A</b>	Fluorescent Linear Amplification Kit
<b>G2556A</b>	Fluorescent Linear Amplification Kit with Hyb'n Reagent
<b>G2559A</b>	<i>in situ</i> Hybridization Reagent Kit
<b>G2557A</b>	Fluorescent Direct Label Kit
<b>G2555A</b>	Fluorescent Direct Label Kit with Hybridization Reagent
<b>G2558A</b>	Deposition Hybridization Reagent Kit
<b>G4145A</b>	Large Volume Deposition Hybridization Kit
<b>G2530A</b>	Microarray Hybridization Chamber (8.4K format)
<b>G2530-60002</b>	Hybridization (8.4K format) Septa, Backings & Gasket
<b>G2533A</b>	Microarray Hybridization Chamber (16.2K format)
<b>G2533-65002</b>	Hybridization (16.2K format) Septa, Backings & Gasket
<b>G2531A</b>	Microarray Hybridization Chamber (22K format)
<b>G2531-60002</b>	Hybridization (22K format) Septa, Backings & Gasket
<b>G2940BA</b>	2100 Bioanalyzer Instrument System Bundle
<b>5065-4476</b>	RNA 6000 Nano LabChip Kit (messenger & total RNA)
<b>5064-8230</b>	DNA 7500 LabChip Kit (100 - 7500 bp)
<b>5064-8231</b>	DNA 12000 LabChip Kit (100 - 12000 bp)
<b>5064-8284</b>	DNA 500 LabChip Kit (25 - 500 bp)
<b>5065-4449</b>	DNA 1000 LabChip Kit (25 - 1000 bp)
<b>G2565AA</b>	48-slide, Dual Laser DNA Microarray Scanner
<b>(# varies)</b>	Microarray Technology Transfer, Services and Support Packages
<b>Discover it!</b>	<b>Microarray Analysis</b>
<b>G2567AA</b>	Feature Extraction Software License
<b>(# varies)</b>	Rosetta Resolver® Gene Expression Data Analysis System

Agilent Technologies  
BioResearch Solutions Unit  
3500 Deer Creek Road, MS 25U7  
Palo Alto, CA 94304  
Email: [dna\\_microarrays@agilent.com](mailto:dna_microarrays@agilent.com)

<http://www.agilent.com/chem/dna>

Part Number: G2554-96010



**Agilent Technologies**