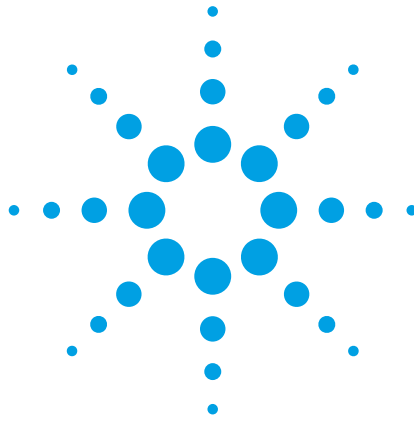


アジレント cDNA ラベル化キット プロトコル



ユーザーズガイド

製品番号 G2555A, G2557A 用
バージョン 2.0J

Agilent cDNA 及びアラビドプシス1
マイクロアレイキット用

2002年8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

G2555A-96003

改訂履歴

2002年1月英語版 version 1.1 をもとに日本語化

2002年7月英語版 May2002 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
覧になれます。

www.agilent.com/chem/dnasupport

注意

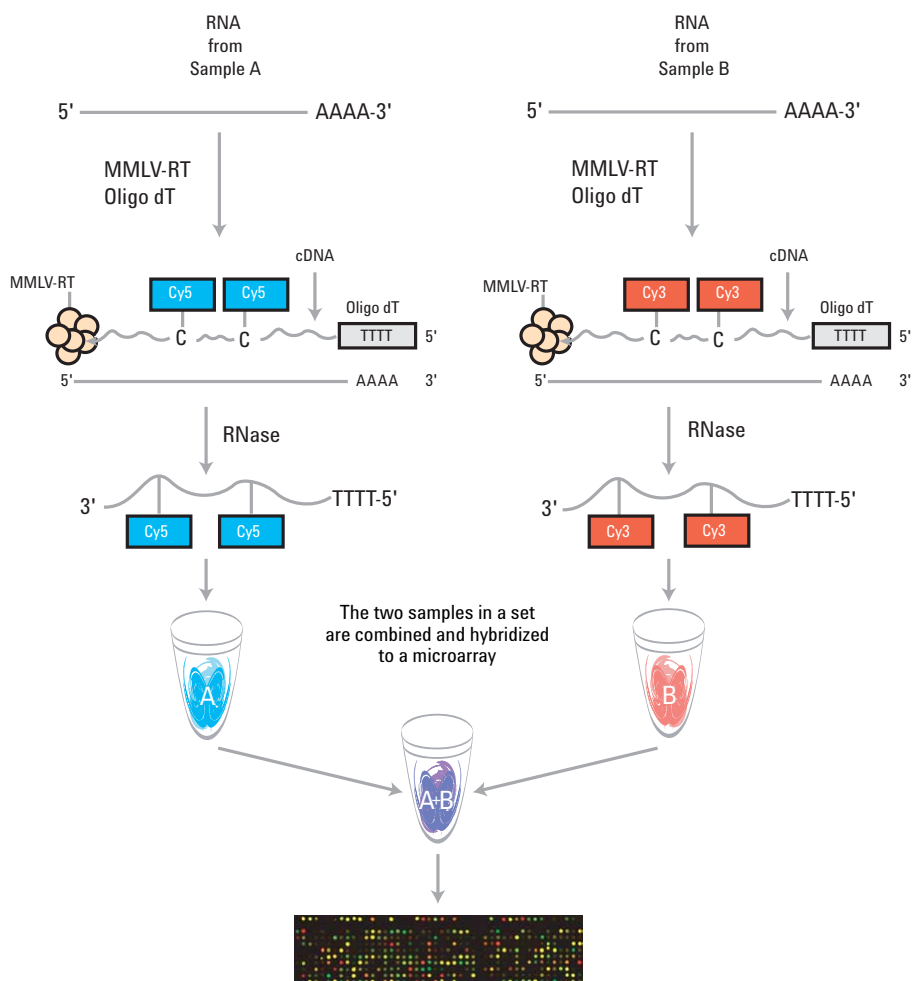
本マークは、無視して取り扱いを誤った場合、物的損害が発生する潜在的危険の存在を示しています。

目次

1. はじめに	4
キットの内容	5
キット以外に必要な試薬	5
必要な機器	5
安全上の注意	6
実験上の注意	6
2. ラベル化プロトコル	7
RNA 試料のチェックとラベル化反応	7
Cyanine 3- /Cyanine 5- ラベル化 cDNA の合成	7
ラベル化 cDNA の精製	8
Cyanine 3- /Cyanine 5-ラベル化 cDNA の濃縮	8
付録	9
付録1：バイオアナライザを用いた RNA の品質チェック	9

1 はじめに

アジレント cDNA ラベル化キットは、アジレント cDNA マイクロアレイ (製品番号 G4100A、G4101A、G4104A、G4105A) と Arabidopsis 1 マイクロアレイ (製品番号 G4135A) にハイブリダイゼーションさせるラベル化 cDNA ターゲットを調製するのに必要なプロトコ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 RNA を、逆転写酵素と Cyanine 色素を使ってラベル化 cDNA を合成します。各試料は異なる蛍光色素 (Cyanine 3 または Cyanine 5) でラベル化します。ラベル化反応の後、2 つの試料 (処置群と対象群) を混合し、cDNA マイクロアレイにハイブリダイゼーションします。cDNA 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、最終的には 2 つの試料間の遺伝子発現比を求めます。



キットの内容

(製品番号 G2555A および G2557A)

・ MMLV-RT (200 U/ul)	40 ul
・ 5 × First Strand Reaction Buffer	400 ul
・ 0.1 M DTT	200 ul
・ DNA Primer (100 uM)	40 ul
・ dNTP Mix (-dCTP)	20 ul
・ 5 mM dCTP	10 ul
・ RNase 1 "A" (0.05 mg/ml)	40 ul
・ 2 × Deposition Hybridization Buffer (G2555A のみ)	125 ul

※試薬は-20℃で保管してください。

キット以外に必要な試薬

- ・ Cyanine 3-dCTP (1.0 mM) (Perkin-Elmer/NEN, cat. no. NEL576)
- ・ Cyanine 5-dCTP (1.0 mM) (Perkin-Elmer/NEN, cat. no. NEL577)
- ・ DNase/RNase フリー水 (ヌクレアーゼフリー水) (Invitrogen, cat. no. 10813-012)
- ・ 100%エタノール (Amresco, cat. no. E193)
- ・ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, cat. no. 28104)

必要な機器

- ・ マイクロピペッター (0.1 ul から 1 ml)
- ・ 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ピペットチップ
- ・ ヒーティングブロックまたはウォーターバス (設定温度 70℃)
- ・ UV 吸光光度計と石英セル (光路長 10 mm)
- ・ 小型遠心器
- ・ ウォーターバス (設定温度 42℃)
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 濃縮遠心器 (SpeedVac)

1 はじめに

安全上の注意

- ・ Cyanine 3-dCTP と Cyanine 5-dCTP 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。
- ・ Dithiothreitol (DTT) は、皮膚、目に炎症を起こす可能性があります。また気管吸入、誤飲により害を引き起こします。また中枢神経系への毒性の可能性があります。
- ・ これらの Material Safety Data Sheets (MSDS) は、アジレント社の WEB から入手することができます。 www.chem.agilent.com にアクセスし、Quick Search box で MSDS を、Product Number に G2555A を入力してください。

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。
- ・ 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。

2 ラベル化プロトコル

実験を始める前に、必ず本プロトコル全体に目を通してください。

RNA 試料のチェックとラベル化反応

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か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5065-4475）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、スミア状の場合や、rRNA 以外の複数のピークが観察される時は、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 が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、スミ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。

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

注意

ラベル化に必要な試料量はtotal RNA の場合は10 ug、polyA+ RNA では200 ng です。（RNA 試料は -80℃で保存できます。）ただし、Arabidopsisをサンプルとして用いる場合は、この倍の量（total RNA は20 ug、polyA+ RNA では400 ng）が必要です。

Cyanine3- /Cyanine 5-ラベル化cDNA の合成

マイクロアレイ実験にはCyanine 3 でラベル化したターゲット cDNA とCyanine 5 でラベル化したターゲット cDNA の合計2試料が必要です。

1. RNA（total RNA 10 ug または polyA+RNA 200 ng）を1.5 ml エッペンドルフチューブに入れます。試料は必ず2つ以上ご用意ください。（Arabidopsisの場合は、この倍の量をご用意ください。）
2. 1.0 ul のDNA プライマーを反応チューブに加え、さらにヌクレアーゼフリー水で全体量が25 ul になるように調整します。
3. 70℃で10分インキュベーションします（プライマーとRNA試料の熱変性）。
4. 反応チューブを氷で急冷し、そのまま5分間冷却します。
5. 1.25 ul のCyanine 3-dCTP またはCyanine 5-dCTP を加えます。

注意

Cyanine 3 はピンク色、Cyanine 5 は青色ですが、反応チューブに試料名と色素名を書いておくことお勧めします。また、色素が光にさらされる時間を出来る限り短くしてください。

6. 下記の1反応に必要な試薬量をもとに、ラベル化反応に必要な分量のcDNAマスターミックスを作ります。

必要量	試薬
6 ul	ヌクレアーゼフリー水
10 ul	5 × First Strand Buffer
5 ul	0.1 M DTT
0.5 ul	dNTP Mix (no dCTP)
0.25 ul	5 mM dCTP
2 ul	MMLV-RT

2 ラベル化手順

cDNA マスターミックスは、ラベル化に必要な量をまとめて1本のチューブに作成します。必要量はピペットエラーによる不足分も考えて、0.5 反応分多くします。反応数を n とすると、必要量は $1 \text{ 反応分} \times (n + 0.5)$ となります。

7. RNA と Cyanine の入った反応チューブに 23.75 ul の cDNA マスターミックスを入れます。
8. 42℃ のウォーターバスで 1 時間反応させます。
9. 反応チューブをウォーターバスから取り出し、70℃ で 10 分インキュベーションし、反応を停止します。
10. チューブを氷で急冷し、5 分間冷却します。
11. 1.0 ul の RNase I "A" を反応チューブに入れます。ピペットでゆっくり攪拌し、室温で 30 分放置して RNA を分解します。

注意

RNase の取り扱いには十分注意してください。RNase 汚染の可能性がありますので、RNA 実験を行う区域ではステップ 11 以降の作業をしないようにしてください。

ラベル化 cDNA の精製

アジレントでは Qiagen の QIAquick スピнкаラムを使った精製法を推奨しています。cDNA に取り込まれなかった Cyanine 3-dCTP と Cyanine 5-dCTP がハイブリダイゼーション試料中に残存するとアレイのバックグラウンドが高くなります。QIAquick PCR Purification Kit プロトコルステップに従ってください。使用前に PE バッファに、エタノール (96-100%) を必要量加えてください。

1. Cyanine 3 ラベル化 cDNA と Cyanine 5 ラベル化 cDNA をどちらか片方のエッペンドルフチューブと一緒にし、混合します (100 ul)。
2. サンプルの 5 倍量の PB バッファ (サンプルが 100 ul の場合は、500 ul) を反応チューブに加えます。
3. QIAquick のカラムを 2 ml のコレクションチューブ中に差し込みます。
4. 反応チューブ中の溶液の全量を、注意深く QIAquick カラムに移します。
5. DNA をカラムに結合させるために、30-60 秒間、13,000 rpm で遠心します。
6. カラムを素通りした液は捨て、カラムをもとのコレクションチューブに戻します。
7. 0.4 ml の QIAquick PE バッファをカラムに入れ、13,000 rpm で 60 秒遠心します。
8. カラムを素通りした液は捨て、カラムを元のコレクションチューブに戻します。7 の作業を繰り返します。カラムに残っているエタノールを完全に除去するために、さらに 13,000 rpm で 60 秒遠心します。
9. QIAquick のカラムを新しい 1.5 ml エッペンドルフチューブに入れます。
10. 試料を溶出するために、30 ul の QIAquick EB バッファをカラムの中心に加えます。そのまま 1 分間待った後、13,000 rpm で 60 秒遠心します。
11. ステップ 10 をもう一度繰り返します。試料の最終濃度は約 60 ul になります。

Cyanine 3-/Cyanine 5-ラベル化 cDNA の濃縮

QIAquick カラムでの精製に続いて、ラベル化した cDNA を濃縮します。

※ アラビドプシス 1 アレイを使用し、この試料をすぐにハイブリダイゼーションに用いる場合、ハイブリダイゼーション液量が多いため濃縮する必要がありません。ハイブリダイゼーションのプロトコルに従い、液量を調製してください。すぐにハイブリダイゼーションに用いない場合は、必ず以下の濃縮操作を行ってから、ペレットを -80℃ で保存してください。

※ アラビドプシス 1 以外のアレイは、ハイブリダイゼーション液量が少ないため、以下の濃縮操作が必要です。

1. 濃縮遠心機 (SpeedVac) で溶媒を乾燥させます (約 1 時間)。

注意

Cyanine 色素の分解を防ぐために加熱しないでください。

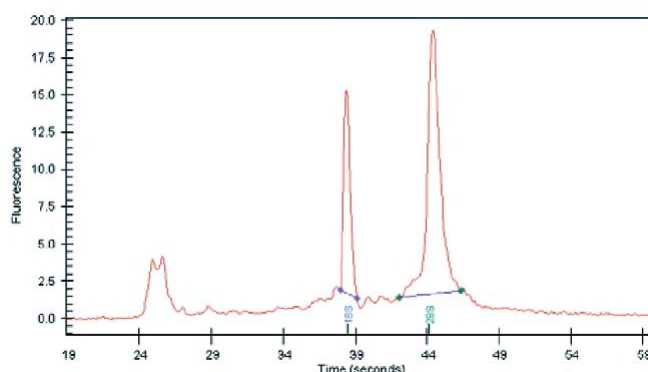
2. 引き続きハイブリダイゼーションを行うか、ドライアイスで冷凍後、-80℃ で保存してください。

ラベル化の材料となる RNA 量が少なかった場合、ここでペレットが見られない場合があります。ペレットが見られなくてもラベル化された cDNA サンプルができていますので、引き続きハイブリダイゼーションを行うことができます。

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 Total RNA

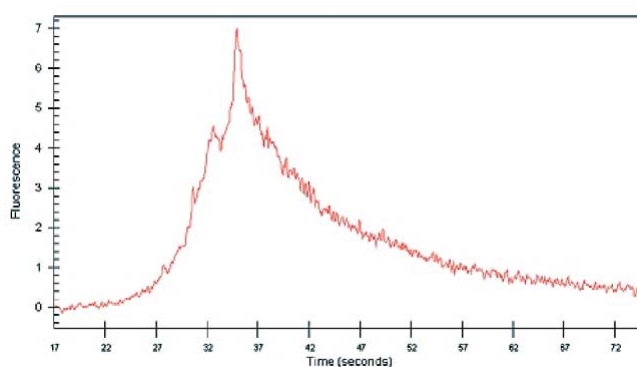


高品質 total RNAのエレクトロフェログラム (Agilent2100バイオアナライザ)

RNAサンプルは非常に多様性があるので、rRNA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totalRNA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 mRNA



高品質 mRNA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mRNAは、おおよそ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mRNA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mRNA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rRNAのピークを同定します。

Copyright Agilent Technologies 2001

すべての権利は留保されています。著作権法で認められている場合を除き、本書を許可なく複製、改作、翻訳することは禁止されています。本書は「Agilent cDNA Microarray Kit Protocol, G2555-98003」を和訳・編集したものです。

本和文プロトコルの著作権は全て横河アナリティカルシステムズ（株）が所有しています。

ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

本書は、内容について細心の注意をもって作成いたしましたが、万一ご不審な点や誤り、記載もれ等、お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害本キットの本来の用途以外の使用に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害本プロトコルに以外の方法または試薬を用いたことによる性能上のトラブル、損害。分析結果に基づく損失本書の内容の一部または全部を無断で複製、転載したり、他の言語に翻訳することは法律で禁止されています。複製、転載などの必要が生じた場合は、当社にお問い合わせください。

本製品パッケージとして提供した本マニュアル、CD-ROM等の媒体は本製品用にだけお使いください。

保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

Agilent Technologies は、本品に関していかなる保証も行いません。これには暗黙の保証、または商品性および特定目的への適合性が含まれますが、それらに限定されません。

Agilent Technologies は、本書に含まれている誤植、あるいは本品の性能、または使用に関する偶発的ないし間接的な損害に関して責任を負いません。

Agilent's Printed Microarray Solutions

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

Agilent Technologies
BioResearch Solutions Unit
1601 California Avenue
Palo Alto, CA 94034
E-mail: dna_microarrays@agilent.com

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

Part Number: G2555A & G2557A

Information, descriptions and specifications are subject to change without notice. Please register online with Agilent to receive new product updates at:

www.agilent.com/chem/printit
(enter access code: BR3003).

Rosetta Resolver is a US registered trademark of Rosetta Inpharmatics.

