

# ラボマニュアル

## マイクロアレイ編

東京大学医科学研究所  
ヒトゲノム解析センター  
中村祐輔研究室

## 目次

第1章 DNAマイクロアレー上に配置するcDNAの作製	3
第2章 スポットティング	15
第3章 プローブDNA の調製	18
a) トータルRNA, mRNA の蛍光標識	
b) 微量検体の蛍光標識 ( Laser capture microdissectionからRNA増幅 )	
第4章 ハイブリダイゼーション	27
a) 手動によるハイブリダイゼーション	
b) 自動機器によるハイブリダイゼーション	
第5章 シグナル検出から数量化まで	34
第6章 数理解析	40

---

第1章 奥津 潤一	(東京大学医科学研究所・ヒトゲノム解析センター)
第2章 北原 治	(東京大学医科学研究所・ヒトゲノム解析センター)
第3章 北原 治	(東京大学医科学研究所・ヒトゲノム解析センター)
第4章 鬼原 史・鈴木 英之	(東京大学医科学研究所・ヒトゲノム解析センター)
第5章 柳川 鍊平	(東京大学医科学研究所・ヒトゲノム解析センター)
第6章 角田 達彦	(理化学研究所・遺伝子多型研究センター)

## 第1章 DNAマイクロアレイ上に配置するcDNAの作製

### 原理と特徴

マイクロアレイ用にスライドガラスに配置するcDNAは、主にRT-PCR法によってmRNAより直接増幅することにより調製している。1つ1つの操作は、PCR・電気泳動・精製という単純なものであるが、遺伝子数が多く、それぞれの遺伝子も大量に増幅するので、様々な工夫が必要である。実際に、それぞれの研究室で、機械類・器具類などの最適化を行うことが望ましい。

### 手順

mRNAからのテンプレートcDNAの調製

プライマーの分注

1st PCR

1st PCR productの電気泳動と判定、2nd PCR 用シートの作成

2nd PCRのためのテンプレートの精製

テンプレート・プライマーの分注

2nd PCR

2nd PCR productの回収、電気泳動による確認

2nd PCR productの精製

電気泳動によるサイズチェック・濃度チェック

精製サンプルの希釈・濃縮

我々の研究室では、まず、発注したプライマーで1ウェル分PCRを行い(本稿では1st PCRと表記することにする)、増幅されるかどうかをチェックし、増幅が確認されたサンプルについてさらに8ウェル分もしくは16ウェル分のPCRを行い(2nd PCRと表記することにする)、大量のPCR productを得ている。また、2nd PCRの際にはテンプレートを節約するために1st PCR productを精製して、テンプレートとしている。

### 試薬

10x PCR buffer	
1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	83 ml
1 M Tris-HCl pH8.8.....	335 ml

1 M MgCl <sub>2</sub> .....	10 ml
0.2 M EDTA-Na pH8.0.....	167.5 μl
超純水.....	68.5 ml

調製後、全量をポアサイズ0.45 μmのフィルター(CORNING.430770)に通す。

● 10x TBE

Tris (ultrapure, GIBCO).....	540 g
EDTA-2Na(DOJINDO).....	46.5 g
ホウ酸(WAKO).....	275 g

超純水を加えて 5 Lとする。

電気泳動の際には、これを10倍希釈して1x TBEとして用いる。

● 10x loading buffer(1% SDS, 50% Glycerol, 0.05% BPB)

TaKaRaの制限酵素に添付されているものを用いている。

5倍希釈して2x loading bufferを大量に調製し、ストックしておく。

● 分子量マーカの調製

PCR productを電気泳動する時に、2種類の分子量マーカを使用している。サイズチェック用のマーカは1kb(GIBCO)から調製し、サイズ・濃度チェック用(手順の電気泳動で使用)のマーカはLow DNA mass ladder(GIBCO)から調製している。

サイズチェック用マーカ

1kb(GIBCO) .....	50 μl
10x loading buffer .....	100 μl
5M NaCl.....	4 μl
超純水.....	846 μl

サイズ・濃度チェック用分子量マーカ

Low DNA mass ladder (GIBCO) .....	100 μl
10x loading buffer .....	100 μl

超純水 .....	800 $\mu$ l
-----------	-------------

操作

mRNAからのテンプレートcDNAの調製

以下の12のヒト組織由来のmRNAをCLONTECH社より購入し、cDNAを合成し、これをRT-PCRのテンプレート(12mixと呼んでいる)として利用している。

成人の肝臓・脾臓・甲状腺・胎盤・筋肉・小腸・脳・心臓
胎児の肺・肝臓・腎臓・脳

- (1) mRNAとプライマーを混合する。

1 $\mu$ g/ $\mu$ l mRNA (CLONTECH) .....	2 $\mu$ l
0.5 mg/ml oligo (dT) <sub>12-18</sub> primer (GBCO) .....	2 $\mu$ l
超純水 (RNase free) .....	$\mu$ l 12

- (2) 混合液を70℃で10分間インキュベートする。

- (3) 氷上で5分間静置する。

- (4) 以下の試薬を加える。

5x first strand buffer (GBCO) .....	5 $\mu$ l
dNTP (25 mM each, TOYOBOより購入し、混合) .....	1 $\mu$ l
100 mM DTT (GBCO) .....	2.5 $\mu$ l
RNase inhibitor (TOYOBO) .....	0.5 $\mu$ l

- (5) 上記反応液から3  $\mu$ lを取り、RT(-)溶液とする。残った22  $\mu$ lには、Superscript II RNaseH<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (GBCO) 1  $\mu$ lを加え、RT(+)溶液とする。

- (6) 42℃で90分間インキュベートする。

- (7) 70℃で10分間インキュベートして、酵素を失活させる。

- (8) PCR用の水を加えてテンプレートとする。

RT(+)溶液には27 $\mu$ l加え、50 $\mu$ lに
RT(-)溶液には4.5 $\mu$ l加え、10.5 $\mu$ lに

- (9) 合成された12種類のcDNAを以下のように混合し、12mixとする。

cDNA (成人組織) .....	2.5 $\mu$ l
cDNA (胎児組織) .....	2.5 $\mu$ l
超純水 .....	1960 $\mu$ l

註 RT(+)溶液とRT(-)溶液をテンプレートとしてPCR反応を行い、ゲノムDNAの混入が無いことを確認しておく。

### プライマーの分注

プライマーは、96ウェルフォーマットで発注している。濃度は100 pmol/  $\mu$ lに統一されている。これをBiomek2000(Beckman社製)を用い、以下のプログラムによって、PCRプレートに分注する(図1)。

- (1) 10 pmol/  $\mu$ lにプライマーを希釈する。

プライマー(100 pmol/ $\mu$ l)	40 $\mu$ l
超純水	360 $\mu$ l

- (2) タイタープレートに(1)で希釈した10 pmol/  $\mu$ lのForwardプライマーおよびReverseプライマーを等量混合する。このプライマー混合液は、後の2nd PCRでも用いる。

Forwardプライマー(10 pmol/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l
Reverseプライマー(10 pmol/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l

- (3) PCRプレートに分注する。1st PCRは、テンプレートを使用しないNegative Controlも行うので、1つのプライマー混合液を2箇所に分注する。従って、1プレートでは、48遺伝子セットのPCRを行うことになる。

プライマー混合液	5 $\mu$ l
超純水	5 $\mu$ l

註 (3)で、超純水を予め加えておくことにより、PCR mixtureの分注量が、45  $\mu$ lから40  $\mu$ lになり、連続分注が手早く行える。



図1 Bm2000による分注

1st PCR

(1) Mixtureを以下のように作成する(プレート1枚、48遺伝子セット分)。

	Sample( $\mu$ l)	Negative Control( $\mu$ l)
超純水	1,182.5	1,282.5
10x PCR buffer	248.25	248.25
DMSO (SGMA)	250	250
dNTP (2.5 mM each)	200	200
12mk	100	-
ME (nacabitesque)	1.75	1.75
Ex Taq (TaKaRa)	17.5	17.5

(2) Mixtureをよく混和し、予めプライマーの分注されたプレートに40  $\mu$ ずつ連続分注する。

(3) PCRプレートをBook Tape(3M. Scotch Book Tape 845)でシールしてvortex, スピンダウンし、Thermalcyclerにかける。

95	5 min
40 cycles of	
95	30 sec
60	30 sec
72	1 min
72	10 min
4	forever

1st PCR productの電気泳動と判定、2nd PCR 用シートの作成

(A) アガロースゲルの作成

- (1) 三角フラスコにアガロース(ultrapure, GBCO) 6gを測り取り、これに300 mlの1xTBEを加える。
- (2) 電子レンジでアガロースをとかす。
- (3) 60 くらいまで冷めたら、10 mg/mlのエチジウムブロマイド3  $\mu$ を加えてよく攪拌し、トレイに注ぐ。
- (4) コームをさし、固まるまで静置する。

註 ゲルは1列あたり26ウェルの4列で、96サンプルが同時に泳動できるようになっている。また、奇数番目のウェルと偶数番目のウェルがそれぞれ12連ピペットの幅に設計されており、泳動サンプルの調製からアプライまで12連ピペットで行える。

(B) 電気泳動

- (1) 以下のように泳動用サンプルを調製する。

PCR product.....	5 $\mu$ l
2x bading buffer.....	5 $\mu$ l

- (2) ピペッティングによりよく混合し、10  $\mu$ 全量をウェルにアプライする。
- (3) サイズチェック用マーカを5  $\mu$ アプライする。
- (4) 100Vの電圧で約30分間泳動する。
- (5) 泳動終了後、UV照射して、写真に撮る。

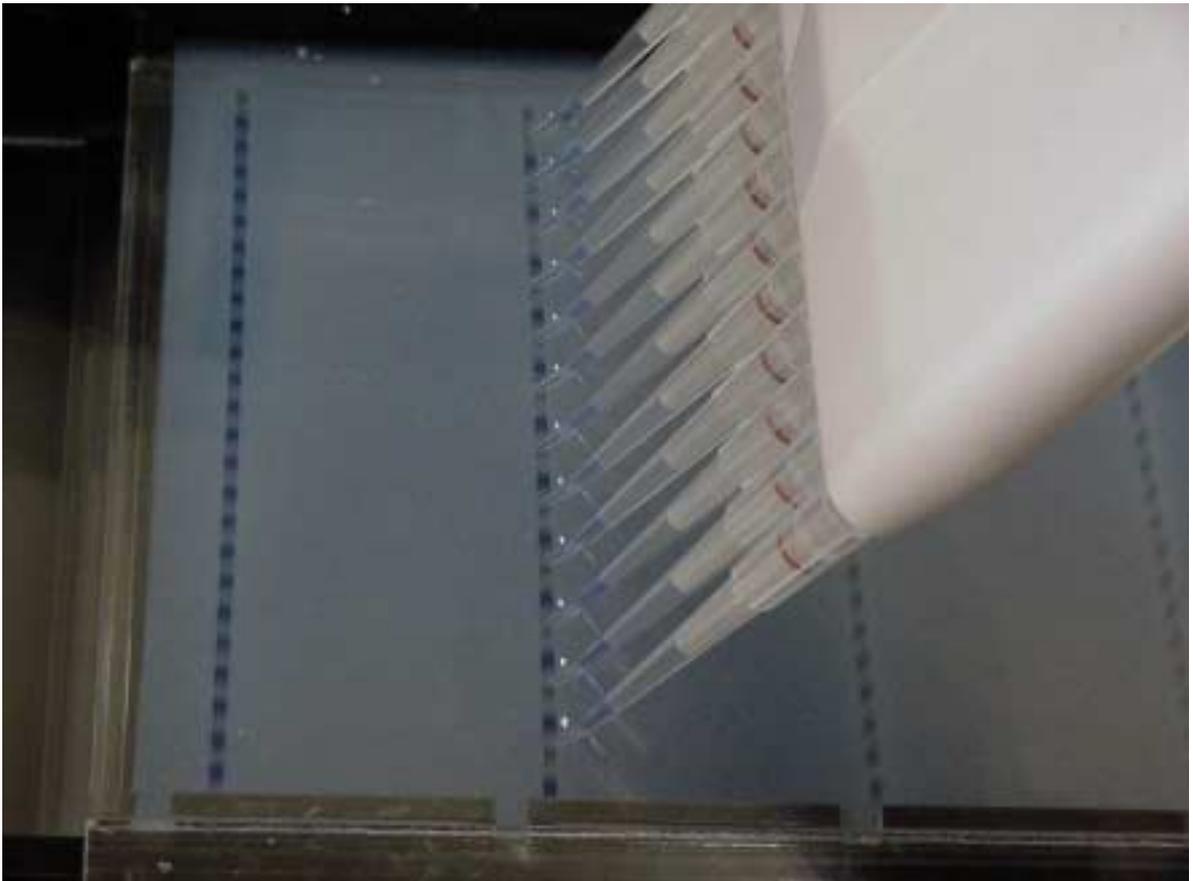


図2 電気泳動

(C) 判定

写真を見て、サイズをチェックしながら、以下の基準により判定を行う。

A:強いシングルバンドが見られる。

AD:弱いシングルバンドが見られる。

B:かすかにシングルバンドが見られる。

C:全くバンドが見られない。

DS: product sizeが予想されるものと異なる。

AM, ADM, BM: マルチバンドが見られる(A, AD, Bはメインバンドの強度による)。

AN, ADN, BN: Negative Controlでバンドが見られる。

(D) 2nd PCR用シートの作成

判定結果をexcelの表に入力し、並べ替えによりA, ADのみそれぞれ抜き出して、

新しい96ウェルフォーマットの表を作成する。Aと判定されたサンプルについては、8ウェル分の2nd PCRを行い、ADと判定されたサンプルについては16ウェル分の2nd PCRを行う。シートに従って、テンプレート・プライマーの分注を行うことになる。2nd PCRは、96サンプルが出揃うまで保留しておく。

#### テンプレートの精製

2nd PCRのテンプレートには、1st PCR productを精製して用いる。シートに従って、PCR productを1.2 ml ディープウェルプレートに1ウェルずつ分注していく。96ウェルが埋まったら、ArrayIt(BM機器)によりproductを精製する。

- (1) リザーバーに満たされたBinding bufferを12連ピペットで200  $\mu$ 採取してディープウェルプレートにアプライし、ピペッティングによりよく混和後、さらにそのまま同じチップを使って、カラムに全量アプライする。
- (2) 全ての行でアプライが終わったら、Vacuumを調節しながらゆっくり滴下し(1滴/秒くらいのスピードで)、カラムに吸着させる。Vacuum pumpには、ULVAC.typeDA-40Sを使っている。
- (3) 700  $\mu$ のWash bufferをアプライし、同様にゆっくり滴下しながらカラムを洗浄する。
- (4) もう一度700  $\mu$ のWash bufferをアプライし、同様にゆっくり滴下しながらカラムを洗浄する。
- (5) Vacuumを最高にして、5分間吸引する。
- (6) カラムを廃液受け用のプレートの上にセットして、4,500 rpmで5分間遠心し(TOMY LX-130,ローターTS40)、カラムに残ったWash bufferを完全に取り除く。
- (7) 新しいサンプル受け用のプレートの上にカラムを置き、各ウェルに50  $\mu$ ずつElution buffer(10 mM Tris-HCl pH8.5)を連続分注していく。
- (8) 5分間静置する。
- (9) 4,500 rpmで5分間遠心し、これをテンプレートとして回収する。

#### テンプレート・プライマーの分注

で調製したテンプレートとプライマーを混合し、96ウェルプレートに分注する。8ウェル分2nd PCRを行う場合(Aと判定された場合)には1枚のプレートで12遺伝子セットを、16ウェル分2nd PCRを行う場合(ADと判定された場合)に

は2枚のプレートで12遺伝子セットを増幅することになる。また、この時に分注するプライマーには、1st PCRのためのプライマー分注（手順 ）の時に作成したプライマー混合液を用いる。

- (1) シートを見ながら、PCRプレートにサンプル番号を記入する。
- (2) プレートのHの行(最下段)にプライマー混合液を80  $\mu$ lもしくは160  $\mu$ lずつ分注する。
- (3) で精製されたテンプレートを8  $\mu$ lもしくは16  $\mu$ lずつ12連ピペットでアプラインし、ピペットで攪拌した後、スピンドウンする。
- (4) プレートのHの行から11  $\mu$ lずつG,F,E,D,C,B,Aの行に移していく。16ウェル分増幅する場合には、さらに続いて、2枚目のプレートに移していく。
- (5) PCRプレートをBook Tapeでシールしてvortex, スピンドウンする。この状態で4 に保存する。Thermalcyclerが空き次第、順次Mixtureを作成し、2nd PCRを行う。1週間程度は4 に保存しておいても全く問題ない。

#### 2nd PCR

- (1) プレート1枚あたり以下のMixtureを作成する。

超純水 .....	7,130 $\mu$ l
10x Ex Taq buffer .....	1,000 $\mu$ l
dNTP mix(2.5 mM each) .....	800 $\mu$ l
Ex Taq (TaKaRa) .....	70 $\mu$ l

- (2) Mixtureをよく混和した後、予めテンプレート・プライマーの分注されたプレートに90  $\mu$ lずつ連続分注する。PCRプレートをBook Tapeでシールしてvortex, スピンドウンし、Thermalcyclerにかける。

95	5 min
30 cycles of	
95	30 sec
62	30 sec
72	1 min
72	10 min
4	forever

PCR productの回収、および電気泳動による確認

- (1) 96サンプルについて2nd PCRが終了したら、productを2.2 mlディープウェルプレートに回収する。
- (2) 以下のように電気泳動サンプルを調製する。

PCR product collected .....	5 $\mu$ l
2x bading buffer .....	5 $\mu$ l

- (3) このうち5  $\mu$ を2 %アガロースゲルにアプライし、100Vの電圧で約30分間電気泳動する。
- (4) 泳動後、写真を撮り、増幅されていることを確認したら、精製のステップに進む。

2nd PCR productの精製

と同様にArrayItを用いて精製を行う。ただし、96サンプルに対して、カラム2個を用いる。

- (1) 2.2 ml ディープウェルプレートを2個、もしくは4個用意し、各ウェルに800  $\mu$ づつBinding bufferを入れておく。
- (2) 400  $\mu$ づつサンプルをアプライし、Book Tapeでしっかりシールする。2.2 ml ディープウェルプレートはウェル間の幅が非常に狭いので、コンタミネーションを防ぐために丁寧にシールする事が重要である。また、外側にも漏れないように周りもきっちりとシールする。
- (3) VortexによりサンプルとBinding bufferを混和する。混ざり方が不十分な場合には収率が悪くなることがある。
- (4) スピンドウンしてから、カラムにアプライする。1個の2.2 ml ディープウェルプレートから2つのカラムに600  $\mu$ づつアプライし、Vacuumを調節しながらゆっくり滴下させ、カラムに吸着させる。この操作を2回もしくは4回繰り返す。
- (5) 700  $\mu$ のWash bufferをアプライし、同様にゆっくり滴下しながらカラムを洗浄する。
- (6) もう一度700  $\mu$ のWash bufferをアプライし、同様にゆっくり滴下しながらカラムを洗浄する。
- (7) Vacuumを最高にして、5分間吸引する。
- (8) カラムを廃液受け用のプレートの上にセットして、4,500 rpmで5分間遠心する。

- (9) 新しいサンプル受け用のプレートの上にカラムを置き、各ウェルに50  $\mu$ ずつ Elution bufferを連続分注していく。
- (10) 5分間静置する。
- (11) 4,500 rpmで5分間遠心し、回収する。
- (12) 1個目のカラムのElutionが終わったプレートの上に2個目のカラムを乗せて、続けてElutionする。計100  $\mu$ でElutionしているが、実際に回収できるのは、80  $\mu$ 程度である。
- (13) 96ウェルタイタープレートに50倍希釈の泳動用サンプルを作成する。
- |                     |            |
|---------------------|------------|
| Eluted sample ..... | 2 $\mu$ l  |
| 超純水 .....           | 98 $\mu$ l |
- (14) エッペンドルフチューブのふたにサンプルの番号を記入し、1本ずつ回収する。

#### 電気泳動によるサイズチェック・濃度測定

- (1) 泳動用サンプルを調製する。

50倍希釈した泳動用サンプル.....	5 $\mu$ l
2x loading buffer.....	5 $\mu$ l

- (2) 10  $\mu$  全量を2 %アガロースゲルにアプライする。また、左右両端のウェルにサイズ・濃度チェック用マーカーをそれぞれ5  $\mu$ l, 10  $\mu$ lアプライする。
- (3) 泳動槽の+極側に10 mg/mlのエチジウムブロマイド3  $\mu$ lを加え、ピペットの先で攪拌する。
- (4) 100Vの電圧で約30分間泳動する。
- (5) 泳動終了後、写真を撮る。サイズチェックのために、通常の写真を1枚、濃度測定のために暗めの写真を1枚撮る。通常の写真より、光量を1/4程度に絞って写真を撮り、サイズ・濃度チェック用マーカーのバンドの濃度の差が検出できる範囲に収める。
- (6) 明るい方の写真を見ながらサイズのチェックを行う。サイズを確認すると同時にマルチバンドになっているサンプルや、スメアをひいているサンプルなどをチェックする。これらのサンプルは最終的にスポットされない。
- (7) 暗めに撮った写真はPhotoshopのsharp black and white photoモードでスキャンする。白黒反転後、数値化し、続いてNH imageのgel plotting macroによりグラフ化する。得られたグラフのピークをマーカーのピークと比較し、濃度を求め、200 fmol/  $\mu$ lとなるように希釈率・濃縮率を計算する。

### 精製サンプルの希釈・濃縮

で求めた値により、サンプルを希釈・濃縮する。

- (1) 希釈の場合には適当量のElution bufferを加える。
- (2) 濃縮の場合には、Final volumeのところに線を引き、60 のインキュベーター中でエッペンチューブのふたをあけて濃縮する。ラインのところまで濃縮されたサンプルからふたをしていく。

## 第2章 スポットティング

### 原理

調製したターゲットDNAを、専用のスポッターを用いてスライドガラス上にスポットし、次にUV クロスリンクによってスライドガラス表面のコーティング剤との間で共有結合を形成させて固定する。

### 手順

- ターゲットDNAの準備
- スポッターの準備
- ターゲットDNAのスポットティング
- UVクロスリンク

### 特徴

様々なタイプのスポッターが市販されているが、本稿では我々が用いている Amersham Pharmacia Biotech 社のMicroarray system Generation III spotterを使う際の手順に従って述べる。このスポッターは、1枚のスライドガラス上に4608個のターゲットDNAを2ヶ所ずつ配置するようにプログラムされており（9216 spots/slide）、一度に36枚のスライドを作成することができる。また、スライドガラスにはAmersham Pharmacia Biotech 社のMicroarray Slides Type 7を用いている。このスライドガラスの表面は、シグナル増強のためのアルミ薄膜層と、更にその上のターゲットDNA固定用のアミノシラン層によってコーティングされている。

### 試薬類および機器

- スポッター（Microarray system Generation III spotter）
- 384穴プレート（Microarray system Generation III spotter 専用）
- マイクロアレイ用スライドガラス（Microarray Slides Type 7）
- UV クロスリンカー（SPECTRO LINKER; SPECTRONICS CORPORATION）
- Microarray cross linking reagent D（Amersham Pharmacia Biotech）

### 操作

- ターゲットDNAの準備

- (1) 濃度を200 fmol/  $\mu$ lに調製した各ターゲットDNA(10  $\mu$ l)を等量のMicroarray crosslinking reagent Dとよく混合する。
- (2) (1)のターゲットDNA溶液を384穴プレートに注入し、遠心分離器でスピンドアウンする。

#### スポットターの準備

- (1) 洗浄液(蒸留水, エタノール, 0.2M KOH)量並びに加湿器の水量、廃液ボトル中に廃液がないことを確認する。
- (2) 送配用のポンプの電源を入れて、圧力が22~30 psiであることを確認する。
- (3) 窒素(99.999%)ポンペを開栓し、圧力が8~9 psiであることを確認する。
- (4) 本体並びにコンピュータの電源を入れプログラムを立ち上げる<sup>註</sup>。
- (5) スポッターにペンセットを取り付ける。

註 スポッターがイニシャライズを行っている間は、スポッターならびにコンピュータには手をふれないようにする。

#### スポットティング

- (1) (2)の384穴プレートをスポッターにのせる。
- (2) スライドグラスを、埃を払ってからスポッターにのせる。
- (3) スポットティングモードを"Normal mode"にし、384穴プレートおよびスライドグラスの枚数を入力する。
- (4) スポッター内の湿度を55%に設定する。
- (5) 湿度が $55 \pm 5\%$ になったら"Start"ボタンを押してスポットティングを開始する。
- (6) スポットが終了したスライドグラスは、30分間スポッター内(湿度55%)で静置した後、デシケータ内で保存する。

#### UVクロスリンク

スポットが終了したスライドグラスをUVクロスリンカーに移し、50~100mJ/cm<sup>2</sup>のUV照射を行なって、ターゲットDNAを固定する。

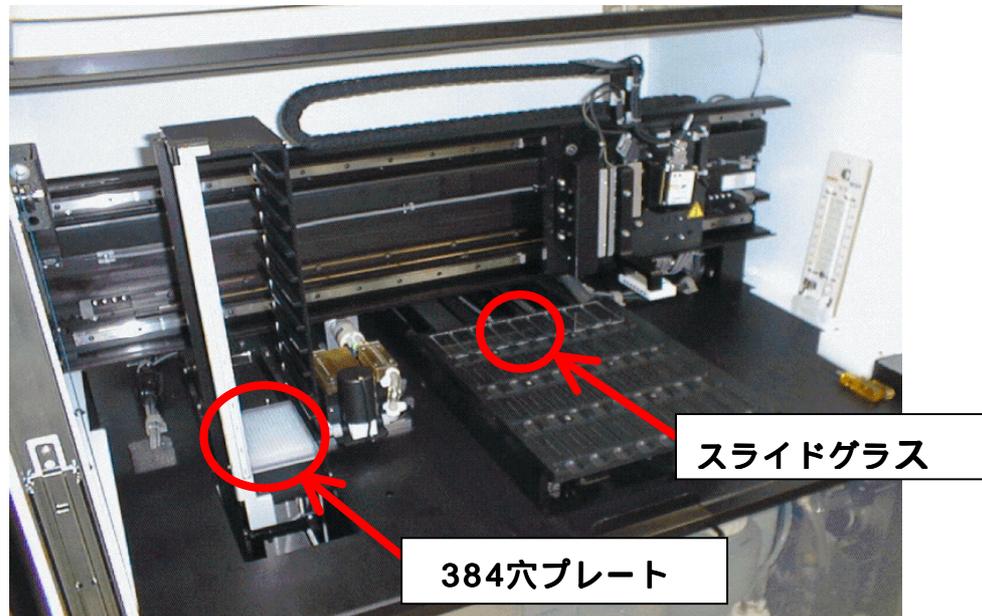
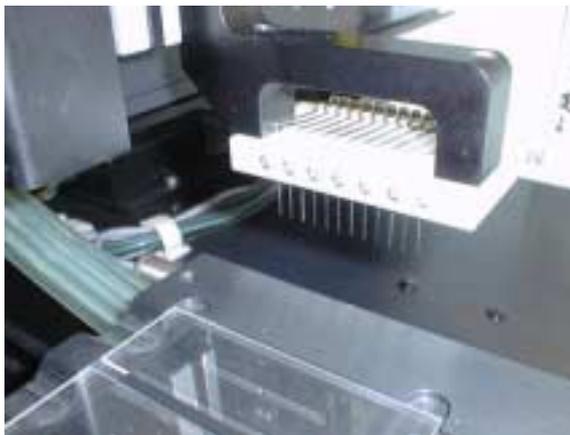


図1 スポッターの外観図

a



b

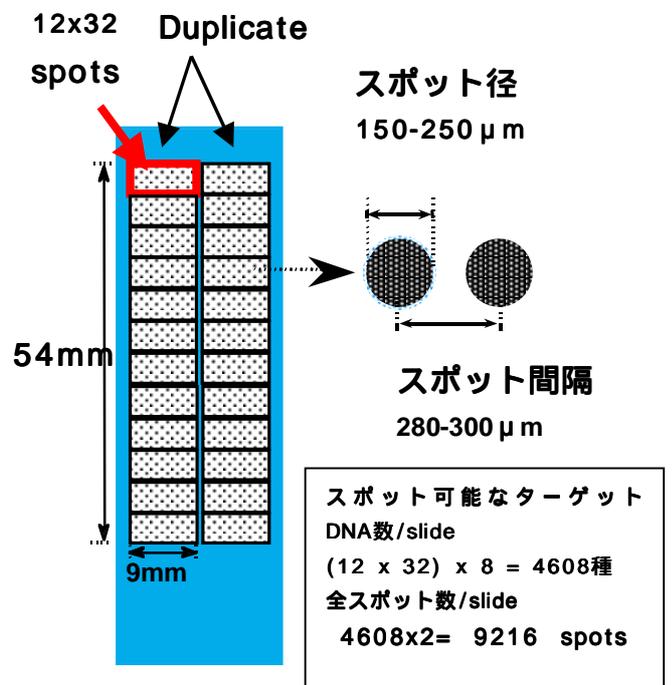


図2 スポットペンの拡大図(a) ならびに  
スライド上へのターゲットDNAのスポットの様子(b)

### 第3章 プローブDNA の調製

#### a) トータルRNA, mRNA の蛍光標識

##### 原理および特徴

プローブは、RNAを鋳型にしてcDNAを合成する際に、Cy3, Cy5ラベルされた基質(Cy3-dCTP, Cy5-dCTP)を取り込ませることによって作成する。プローブ作成に必要な鋳型RNAの量として、poly (A)<sup>+</sup> mRNAやT7-based RNA法(後述)により増幅したmRNA (aRNA)を利用する場合には1~5 μg、total RNAを利用する場合には10~100 μgを用いている。

##### 手順

プローブの合成

プローブの精製

##### 試薬

- 0.5mg/ml Oligo (dT)<sub>12-18</sub> primer (LIFE TECHNOLOGIES)<sup>註</sup>
- 5 × First Strand Buffer (LIFE TECHNOLOGIES)
- 0.1M DTT (LIFE TECHNOLOGIES)
- 100mM dNTP sets (TOYOBO)
- 1mM Cy3(Cy5)-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech)
- 40U/ μl RNase inhibitor (TOYOBO)
- 200U/ μl Super script II (LIFE TECHNOLOGIES)
- RNase free water (NIPPON GENE)
- NaOH (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 2.5N溶液
- HCl (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 2.5N溶液
- Tris(LIFE TECHNOLOGIES)-HCl (pH7.4) 1M溶液
- QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)

註 aRNAの場合は1mg/ml random primer (BOEHRINGER MANNHEIM)を用いている。

##### 操作

プローブ合成

- (1) poly (A)<sup>+</sup> RNAとoligo (dT)<sub>12-18</sub> primer ( mRNAの場合random primer) 3 μl 、RNase free waterを混合し、全容量を24 μlとする。
- (2) 70 °Cで10分間インキュベートする。
- (3) 1分間水中で冷却後、スピンドウンし室温に戻す。
- (4) 以下の試薬を混合して(3)に加える。

5 × First Strand Buffer.....	10 μl
0.1M DTT.....	5 μl
25mM d(A,G,T)TP 溶液.....	each 1 μl
1mM dCTP 溶液.....	2 μl
1mM Cy3(Cy5)-dCTP .....	2 μl
40U/ μl RNase inhibitor.....	1.5 μl

- (5) 軽く混ぜてからスピンドウンし、室温で10分間静置する。
- (6) 200U/ μl Superscript IIを2.5 μl 加え、37 °Cで2時間インキュベートする(全容量50 μl)。
- (7) 2.5N NaOHを6 μl 加えて65 °Cで30分間インキュベートし、反応を止める。
- (8) 1M TrisHCl(pH7.4), 2.5N HClをそれぞれ20 μl, 7 μl 加えて中和する。

#### プローブの精製

- (1) (8)のプローブ溶液をQIAquick PCR Purification Kitをもちいて精製する。
- (2) 真空乾燥器で濃縮し、全容量を10 μlとする<sup>註</sup>。

註 -20 °C 保存で2週間程度保存可能である。

## b) 微量検体の蛍光標識

( Laser capture microdissectionからRNA増幅 )

### 原理および特徴

目的とする組織の細胞を、他の組織が混在した系から選択的に取得する方法としてレーザーマイクロダイセクション (LCM) 法<sup>1-3</sup>がある。この方法は、組織切片上に熱反応性のフィルムをかぶせ、フィルムの上からレーザーを照射して目的とする細胞集団のみを取得する方法である。この方法によって得られた細胞から抽出したRNAは微量であるため、T7-based RNA 増幅法<sup>註</sup>により増幅してからマイクロアレイ実験に用いている。LCMで取得した2000～10000個の細胞から、3サイクルの増幅を行なうことによって、10～50 μgの増幅RNA (aRNA)を得ることができる。

註 T7 RNA polymeraseおよびT7プロモータ配列を付加したoligo d(T)<sub>21</sub>プライマーを利用したRNAの増幅法<sup>3,4</sup>。

### 手順

サンプル切片のH&E染色とLCM

T7-based RNA増幅

サンプル切片のH&E染色とLCM

### 試薬類および器機

- クライオスタット(サクラ精機)
- レーザーキャプチャー装置 LM100 (Arcturus Engineering)
- レーザーキャプチャー用キャップ (Arcturus Engineering)
- OCT medium (Miles Inc.)
- Mayer's Hematoxyline (MUTO PURE CHEMICALS LTD.)
- 1% Eosin alcohol (MUTO PURE CHEMICALS LTD.)
- エタノール(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 70, 80, 90, 95, 100%  
溶液
- キシレン(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)
- エタノール /キシレン混合液 (30:70, 50:50, 70:30)

- RNase free water (NIPPON GENE)
- RNeasy Mini kit (QIAGEN)
- -メルカプトエタノール (nacalai tesque)
- 5× First Strand Buffer (LIFE TECHNOLOGIES)
- DNase I (BOEHRINGER MANNHEIM)
- フェノール/クロロフォルム溶液 (LIFE TECHNOLOGIES)

## 操作

### (A) サンプル切片の切り出しとH&E染色

- (1) OCTに包埋した凍結切片(-80 で保存されていたもの)を、クライオスタットで10 μmの厚さにスライスし、表面処理していないスライドグラス上へのせる。
- (2) 下記の要領でスライド上の組織切片のH&E染色を行なう。
  - 1) 70% エタノールに3分間浸漬。
  - 2) DEPC水に30秒間浸漬。
  - 3) hematoxyline溶液に1分間浸漬。
  - 4) DEPC水で洗浄。
  - 5) 70, 80, 90, 95% エタノールにそれぞれ1, 0.5, 0.5, 0.5分間浸漬。
  - 6) eosin溶液に20秒間浸漬。
  - 7) 95% エタノールを3回交換して洗浄。
  - 8) 100% エタノールに5分間浸漬。
  - 9) 70% エタノール/30% キシレンに2分間浸漬。
  - 10) 50% エタノール/50% キシレンに2分間浸漬。
  - 11) 70% エタノール/30% キシレンに2分間浸漬。
  - 12) 100% キシレンに5分間浸漬。
  - 13) 100% キシレンに1分間浸漬。
  - 14) 暗所で乾燥。

### (B) LCM

- (1) (A)の(2)でH&E染色した組織切片をPixCell LM100へのせる。
- (2) キャップを組織切片の上へのせ、目的とする細胞をこのキャップの上から30 μm径のレーザービームをあてて取得する<sup>註</sup>。
- (3) 取得した細胞を -メルカプトエタノール入りのRLT緩衝液(QIAGEN RNeasy

kit)に溶解する。

- (4) QIAGEN RNeasy kitでRNAの精製を行なう。EB緩衝液80  $\mu$ lを用いて、カラムから精製RNAを溶出する。
- (5) (4)の精製RNA溶液に以下の混合溶液を添加後、37 で1時間インキュベートしてDNase処理を行なう。

5 $\times$ First Strand Buffer.....	2 $\mu$ l
40U/ $\mu$ l RNase inhibitor .....	1 $\mu$ l
DNase I.....	1 $\mu$ l

(全容量 100  $\mu$ l)

- (6) フェノール/クロロフォルム溶液を100  $\mu$ l加えて精製する。
- (7) エタノール沈殿をしてRNAを回収する。

註 通常200~1000ショットのレーザービーム照射により細胞を取得している。

a



b

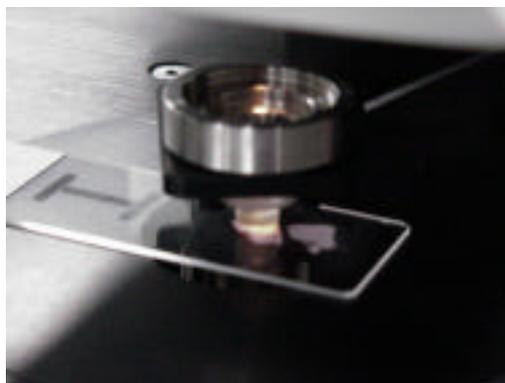


図1. LCM の外観図(a)およびサンプル採取の様子(b)

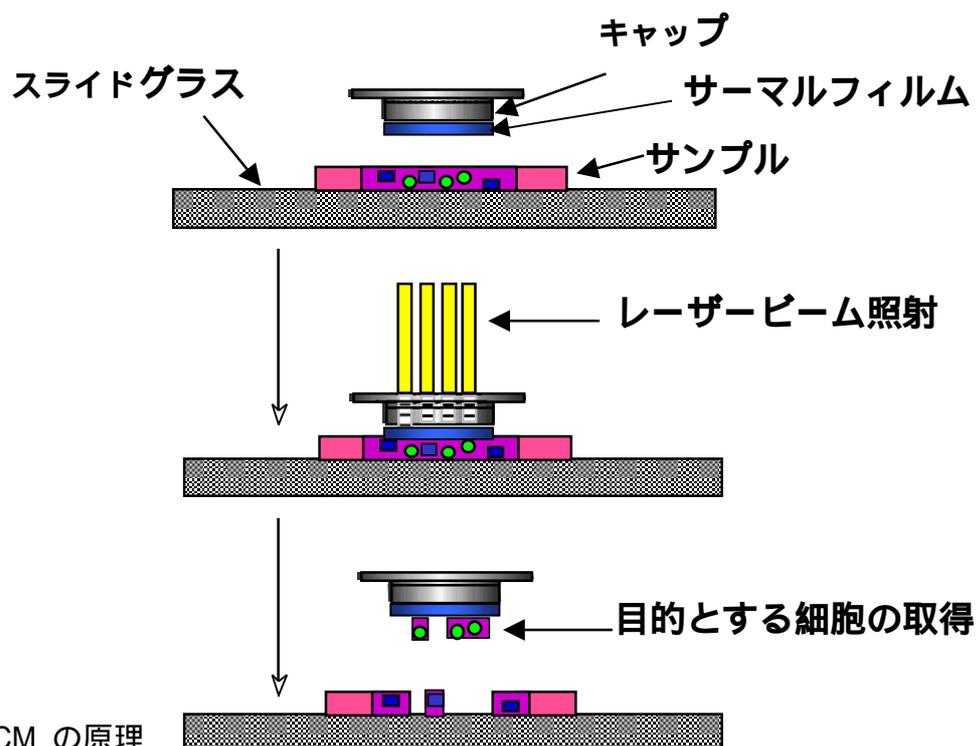


図 2. LCM の原理

#### T7-based RNA増幅

#### 試薬

- T7プロモーター配列を付加したoligo d(T)<sub>21</sub>プライマー(T7-oligo d(T)<sub>21</sub>プライマー)  
5'TCTAGTCGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCG(T)<sub>21</sub>-3'
- 5 × First Strand Buffer (LIFE TECHNOLOGIES)
- 0.1M DTT (LIFE TECHNOLOGIES)
- 100mM dNTP sets (TOYOBO)
- 40U/ μl RNase inhibitor (TOYOBO)
- 200U/ μl Super script II (LIFE TECHNOLOGIES)
- RNase free water (NIPPON GENE)
- 10 × 2nd strand buffer<sup>註</sup>
- KCl (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 906mM溶液
- 4U/ μl DNA polymerase I (TaKaRa)
- 60U/ μl RNaseH (TOYOBO)

- 60U/  $\mu$ l E.coli ligase (TaKaRa)
- 10U/  $\mu$ l T4 DNA polymerase (TOYOBO)
- QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)
- Ampliscribe T7 Transcription Kit (EPICENTRE TECHNOLOGIES)
- 1mg/ml random primers (LIFE TECHNOLOGIES)
- RNeasy Mini Kit ( QIAGEN )
- DNase I (BOEHRINGER MANNHEIM)

註 10 × 2nd strand bufferの組成は以下の通りである。

1M Tris-HCl (pH 8.3) .....	188 $\mu$ l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (nacarai tesque) 1M溶液 .....	100 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 1M溶液 .....	46 $\mu$ l
-NAD (SIGMA) 50mM溶液 .....	30 $\mu$ l
0.1M DTT .....	375 $\mu$ l
RNase free water .....	261 $\mu$ l

#### 操作

- (1) LCMで取得し、抽出・精製ならびにDNase処理したサンプルを、0.5mg/mlの T7-oligod(T)<sub>21</sub> プライマー 1  $\mu$ lおよびRNase free waterと混合し、全容量を 11.5  $\mu$ lにする。
- (2) 70 °Cで10分間インキュベートする。
- (3) 2分間水中においた後、42 °Cで5分間インキュベートする。
- (4) 以下の溶液を混合して(3)に加える。

5 × First Strand Buffer .....	4 $\mu$ l
0.1M DTT .....	2 $\mu$ l
10mM dNTPs solution .....	1 $\mu$ l
40U/ $\mu$ l RNase inhibitor .....	0.5 $\mu$ l
200U/ $\mu$ l Super script II .....	1 $\mu$ l

(全容量 20  $\mu$ l)

- (5) 42 °Cで1時間インキュベートする。
- (6) 以下の溶液を混合して(5)に加える。

10 × 2nd strand buffer .....	15 $\mu$ l
906mM KCl.....	15 $\mu$ l

10mM dNTPs solution.....	3 $\mu$ l
4U/ $\mu$ l DNA polymerase I.....	4 $\mu$ l
60U/ $\mu$ l RNaseH.....	0.25 $\mu$ l
60U/ $\mu$ l E. coli gase .....	0.25 $\mu$ l
RNase free water.....	92.5 $\mu$ l

(全容量 150  $\mu$ l)

- (7) 16 で2時間インキュベートする。
- (8) 10U/  $\mu$ lのT4 DNA polymerase 2  $\mu$ lを加えて再び16 で10分間インキュベートする。
- (9) 合成した2本鎖cDNAをQIAquick PCR Purification Kitで精製し、真空乾燥器で乾燥する。
- (10) 乾燥した2本鎖cDNAを8  $\mu$ lのRNase free waterに溶解後、以下の溶液を加える。

10 $\times$ T7 RNA polymerase buffer.....	2 $\mu$ l
100mM d(A,C,G,U)TP.....	each 1.5 $\mu$ l
0.1M DTT.....	2 $\mu$ l
T7 RNA polymerase.....	2 $\mu$ l

(全容量 20  $\mu$ l)

- (11) 42 で3時間インキュベートする。
- (12) DNase Iを1  $\mu$ l加えて37 で15分間処理する。
- (13) RNeasy MiniKitで精製し50  $\mu$ lのRNase free water でカラムから溶出する。  
以上で1サイクル分の増幅が終了するが、更にRNAを増幅する場合には以下の(14)以降のステップにしたがって反応を行なう。
- (14) 真空乾燥器で乾燥後、RNase free waterに溶解して全容量を10.5  $\mu$ lとする。
- (15) 1mg/mlのrandom primerを1  $\mu$ l加えて70 で10分間インキュベートする。
- (16) 氷中に1分間、次に室温で10分間静置する。
- (17) 4と同じ試薬を加えた後、37 で1時間インキュベートする。
- (18) 60U/  $\mu$ lのRNase Hを0.5  $\mu$ l添加後、37 で20分間インキュベートする。
- (19) 95 の水浴中で2分間熱処理後、氷中で静置する。
- (20) 0.5mg/mlのT7-oligo dT<sub>21</sub>プライマー 1  $\mu$ lを加え、70 で5分間、42 で10分間インキュベート後、氷中に静置する。
- (21) 以下の溶液を加えて16 で2時間インキュベートする。

10 × 2nd strand buffer.....	15 μl
906mM KCl.....	15 μl
10mM dNTPs solution.....	3 μl
4U/ μl DNA polymerase I.....	4 μl
60U/ μl RNase H.....	0.25 μl
RNase free water.....	91.25 μl

(全容量 150 μl)

(22) 以下(8)～(13)と同じ手順で反応を行なう。

(23) 更にRNA増幅を繰り返すには、(14)から(22)までの操作を行なう。

#### 参考文献

1. Emmert-Buck, M.R. et al Laser capture microdissection. Science, 274: 998-1001, 1996.
2. Bonner, R.R. et al Laser capture dissection: molecular analysis of tissue. Science, 278: 1481-1482, 1997.
3. Luo, L. et al Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. Nature. Med., 5: 117-122, 1999.
4. Van Gelder R. N. et al Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. Proc. Natl Acad. Sci USA, 87: 1663-1667, 1990.

## 第4章 ハイブリダイゼーション

### a) 手動によるハイブリダイゼーション

#### 特徴

マイクロアレイのスキャナーは非常に高感度であるため、室内の埃、ウォッシングバッファー中の結晶、スライド上の微細なキズなどがノイズとしてスキャンの結果に影響を与える。このため、スライドを慎重に取扱う必要があり、特にカバーガラスをかける際にスポット面（スキャンされるエリア）には極力触れないことが肝要である。当研究室ではウォッシングに用いるバッファーなどはすべてフィルターを通すなど、ノイズを減らす工夫を行っている。

#### 手順

プローブDNAの準備  
スライドガラスのプレトリートメント  
ハイブリダイゼーション  
ウォッシング

#### 試薬

- A80 (1mg/ml) : (Amersham Pharmacia Biotech)
- Version II buffer (同社)
- ホルムアミド (Sigma, Cat. No. F- 9037)
- プレトリート溶液 (5xSSC- 0.2%SDS )

20 × SSC.....	12.5ml
10%SDS.....	1.0ml
超純水 ( Milli-Q水など ) .....	36.5ml

全容量50 mlとする。

- ウォッシング溶液1 ( 1xSSC- 0.2%SDS )

20 × SSC.....	25.0ml
10%SDS.....	10.0ml
超純水.....	465.0ml

全容量500 mlとする。

- ウォッシング溶液2 ( 0.1xSSC- 0.2%SDS )

20 × SSC.....	2.5ml
10%SDS.....	10.0ml

超純水.....	487.5ml
----------	---------

全容量500 mlとする。

● ウォッシング溶液3 (0.1xSSC)

20 x SSC.....	2.5ml
---------------	-------

超純水.....	497.5ml
----------	---------

全容量500 mlとする。

註 プレトリート溶液、ウォッシング溶液は調製後フィルター( CORNING, Cat. No. 430770 )を通す。

## 操作

### プローブDNAの準備

- (1) プローブDNA(10  $\mu$ l)を95 °Cで2分間インキュベートする。
- (2) 氷上に30秒間静置する。
- (3) A<sub>80</sub> (1mg/ml) 2  $\mu$ lを加える。
- (4) 遮光し、70 °Cで45分間インキュベートする
- (5) Version II buffer 10  $\mu$ lを加える。
- (6) ホルムアミド20  $\mu$ lを加え、泡が入らないよう注意を払いつつ、ピペッティングでよく混合する。全容量は42  $\mu$ lとなる。

註 Version II bufferは粘性が高いのでよく混合する。

### スライドガラスのプレトリートメント

(Type 7スライドの場合)

- (1) UVクロスリンクを終えたスライド(スポッティングの項参照)をスライドチャンバー(免疫染色用のボックスなど)に置き、60 °Cに暖めておいたプレトリート溶液(スライド表面全体に溶液がいきわたる量:スライド1枚当たり2ml)を滴下する。
- (2) スライドチャンバーの蓋をビニールテープでシールしてインキュベーター内に60 °Cで2時間静置する。
- (3) ビーカーに超純水を満たし、4、5回洗う。

- (4) 同じ操作を、別のビーカーでもう一度繰り返す。
- (5) 高圧フロンスプレー（ハイパージェットガス・コニカ）でスライド表面の水を除く。

註 1) 蓋をしない状態でプレトリートを行うと、プレトリート液が乾燥し、結晶化する。当研究室では、免疫染色用のボックスの底面に水で濡らしたキムワイプなどをおいて保湿している。

註 2) 2時間以上60℃に静置した場合や、スライドごとプレトリート液に浸すと表面のアルミが溶出するので、これらを行わないように注意する。

註 3) 静置する温度が60℃より高いとアルミが溶出し、温度が低いとプレトリートの質が下がり、シグナルが弱くなる。

他のシステムではBSAを用いたプレハイブリダイゼーションを行っていることが多いが、当研究室では行っていない。

### ハイブリダイゼーション

- (1) プレトリート後のスライド表面の埃を、高圧フロンスプレーで除く。
- (2) スポット面にプローブDNAを全量滴下する。
- (3) 気泡が入らないように、カバーグラスをかける。
- (4) カバーグラスの全周をペーパーボンドでシールする。
- (5) スライドチャンバー内にスライドを静置し、蓋のまわりをビニールテープでシールする。
- (6) 遮光し、42℃で14-16時間ハイブリダイゼーションを行う。

註 1) バッファの粘性が高いので、一度入った気泡はそのまま残り、不均一なハイブリダイゼーションの原因となる。

註 2) 歪んだカバーグラスを使うとプローブが均一に行き渡らず、不均一なハイブリダイゼーションの原因となる。

註 3) カバーグラスの汚れは気泡が入る原因となるので、あらかじめエタノールなどで洗浄しておく。

註 4) 一度スポット面にかぶせたら、カバーグラスを極力動かさない。スポットが流れる原因となる。

註 5) ペーパーボンドでシールしない場合、カバーガラス周囲のアルミが溶出することがある。

### ウォッシング

- (1) ウォッシング溶液1,2をあらかじめ55℃に暖めておく。
- (2) シールしていたボンドをはがす。
- (3) カバーガラスをつけたまま、ウォッシング溶液1を満たした容器にスライドを入れ、カバーガラスがはがれるまで軽く振る。
- (4) 別の容器にウォッシング溶液1を満たし、カバーガラスのはがれたスライドを入れ、55℃で10分間振とうする。
- (5) 容器にウォッシング溶液2を満たし、スライドを移して55℃で10分間振とうする。
- (6) 同じ操作を別の容器でもう一度繰り返す。
- (7) 容器にウォッシング溶液3を満たし、室温で1分間振とうする。
- (8) 同じ操作を別の容器でもう一度繰り返す。
- (9) ビーカーに超純水を満たし、4、5回洗う。
- (10) 同じ操作を、別のビーカーでもう一度繰り返す。
- (11) 高圧フロンスプレーでスライド表面に付着した水を除く。
- (12) スキャンするまで遮光して保存しておく。

註 1) ウォッシングを行う容器は、温度コントロールのため蓋のついたものが望ましい。

註 2) ウォッシングはすべて遮光下で行う。

### b) 自動機器によるハイブリダイゼーション

#### 原理と特徴

Amersham Pharmacia Biotech社のASP (Automated Slide Processor)には、2~1000  $\mu$ の溶液を、一定の時間間隔と速度で自動的に攪拌する機能が備わっている。マニュアルによるハイブリダイゼーションでは、プレトリートメント、ハイブリダイゼーション、及び洗浄の工程を、再現性良く、均一に行うことは難しいが、ASPを利用することにより、この問題を解決することが可能となる。

## 手順

装置の準備  
UVクロスリンキング  
プレトリートメント  
ハイブリダイゼーション  
スライドガラスの乾燥

## 試薬

- 超純水（抵抗17 Mohm 以上のMilli-Q水など）（400 ml）4本
- プレトリートメント溶液（5×SSC、0.2%SDS、400 ml）

20XSSC .....	100 ml
10%SDS .....	8 ml

超純水を加え、全容量400 mlとする。

- ウォッシング溶液1（1×SSC- 0.2%SDS：400 ml）

20XSSC .....	20 ml
10%SDS .....	8 ml

超純水を加え、全容量400 mlとする。

- ウォッシング溶液2（0.1×SSC- 0.2%SDS：400 ml）

20XSSC .....	2 ml
10%SDS .....	8 ml

超純水を加え、全容量400 mlとする。

- 100% イソプロパノール（400 ml）

註 プレトリート溶液、ウォッシング溶液は調製後フィルター（CORNING, Cat. No. 430770）を通す。

## 操作

装置の準備

- (1) 超純水、プレトリートメント溶液、ウォッシング溶液1、ウォッシング溶液2、イソプロパノールの各溶液が準備されていることを確認する
- (2) ~ の溶液が入ったそれぞれの容器に、該当する吸引用のオレンジ色のチ

ューブを挿入する。

- (3) 一部が結晶化したプレトリートメント溶液( )を溶かすため、恒温槽を 70 に設定し、容器を入れて1時間ほど前もって暖めておく。
- (4) Automated Slide Processor (ASP)装置の電源を入れる。
- (5) モジュール全面の緑のランプが点灯することを確認する。
- (6) コンピュータを立ち上げ、Shift+Alt+Del を同時に押すとコンピュータがスタートする。
- (7) ASPというソフトのアイコンをクリック。コンピュータ画面のメニューバーから File .....Open を選択し、 Type-7 Detergent Wash というプログラムをクリック。メニューバーからRun.....start を選んでクリックすると、プログラムがスタートする。
- (8) 数十秒後に使用するチャンバー(run-defined chambers)の番号が入力待ちになるので、チャンバー位置を入力する。
- (9) その後 Continue をクリックすると、ASP 装置はチューブ内部の空気を追い出し、代わりに溶液で満たす操作 (Flush) を始める。

#### UVクロスリンクング

UVクロスリンクングを終えたスライドグラスを使用する。UVクロスリンクングについてはスポッティングの項を参照。

#### プレトリートメント

- (1) コンピュータの画面に Insert Test Slides と表示されたら、UVクロスリンクングを終えたスライドをチャンバーに取り付ける作業に入る。
- (2) チャンバーの取っ手を外側へはずし、すでに中に入っているダミーライド(スライグラスと同サイズのテスト用ガラス)を取り出す。
- (3) ケイドライに蒸留水を湿らせてチャンバー内部の汚れを拭き取る。
- (4) ケイドライにイソプロパノールを湿らせてチャンバー内部を拭き取る。
- (5) プレトリートメントを施すスライドをチャンバーに取り付ける
- (6) 取り付けを終えた後Continue をクリックする。2 ~ 3 時間後にプレトリートメントが終了する。
- (7) チャンバーから一度スライドを取り出し、表面の色調の変化からプレトリートメントの質をチェックする。

### ハイブリダイゼーション

- (1) ASP 装置のコンピュータの表示が eject probe solution now となったらプローブ溶液 240  $\mu$ l を専用のシリンジで吸い取り ( 1 枚のスライドにつき 240  $\mu$ l ) プレトリートメントを終えたスライドガラスのチャンバー に注入する。
- (2) Continue をクリックし、この状態 ( 42 ) で 16 時間 40 分ハイブリする。
- (3) ハイブリ後、1 時間半程度ハイブリ溶液の洗浄が行われる。
- (4) Replace Test Slides with Dummy Slides という表示が出たら、スライドガラスをダミーライドと交換する。
- (5) その後 1 時間半ほどでチャンバーの洗浄と乾燥が終わる。

### スライドガラスの乾燥

- (1) 500 ml のビーカーを 3 つ用意し、それぞれのビーカーに 超純水を 400ml ずつ満たす。
- (2) ハイブリダイゼーションを終えたスライドガラスを 3 つのビーカーの超純水に順に浸し、その後、高圧フロン Sprey にてスライドガラスの表面を乾燥させる。
- (3) スキャンまで遮光して保存する。

### ( 参考 )

Type-7 Detergent Wash というプログラムで実行される重要なステップ操作の内容は以下ようになる。

#### ・ Prime

チャンバーにつながっているオレンジ色のチューブ内部を、チャンバーの直前まで溶液で満たす操作。シリンジポンプにより液量がコントロールされる。

#### ・ Flush

入力した量の溶液を、入力した速度で、入力した回数チャンバーへ送り込む操作。シリンジポンプにより液量がコントロールされる。

#### ・ Mix

シリンジポンプを前後に動かすことにより、チャンバー内部の溶液を攪拌する。前後に動かす液量と速度、及びサイクル数を入力することができる。

## 第5章 シグナル検出から数量化まで

スライドグラスをスキャナーに装填した後はコンピューター内に実験の場を移し、いわゆる“ドライ”な作業へと移行する。

各ソフトウェアの詳細はそれぞれのマニュアルを御参照いただくこととし、ここでは実際の作業にかかわる部分についてのみ経時的流れに沿って解説する。

### 手順

シグナル検出	(Detection)
画像化	(Visualization)
数量化	(Quantitation)

### 使用するソフトウェア

- “ Array Scanner Control ”
  - “ Image Quant ”
  - “ Merge Gel ”
  - “ Array Vision ”
- (いずれもMicroarray System Generation IIIに付属。)

### 使用するハードウェア (写真 1)

- Microarray System Generation III  
(Array Spotter, Array Scanner, Analysis Workstation)  
(Molecular Dynamics社製)



写真 1 Array Scanner 全景

#### シグナルの検出 (Detection)

- (1) スキャン開始30分前に(ハイブリダイゼーションが終わり、ウォッシングに入る前に)スキャナーの電源をONにし、レーザー・ビームのウォームアップを開始する。
- (2) スキャナーコントロール用アプリケーション“Array Scanner Control”を立ち上げ、door lockを解除し、スライド・マガジンを取り出し、スライド・ホルダーの数を確認する。
- (3) ハイブリダイゼーションおよびウォッシングを終えたスライドガラスを、超純水約400 $\mu$ lを入れた3つのビーカーで順にリンスした後、高圧ガスで水滴を吹き飛ばすようにして乾燥させる。
- (4) 乾燥したスライドガラスを、一つ一つの向きに注意しながら、スライド・ホルダーにはめ込む。(写真 2)



写真 2 スライド・ホルダー

- (5) スライドガラスの順序に気を付けながら、マガジンにホルダーごとスライドを装填する。
- (6) マガジンをスキャナーに装填し（写真 3）ドアを閉める。

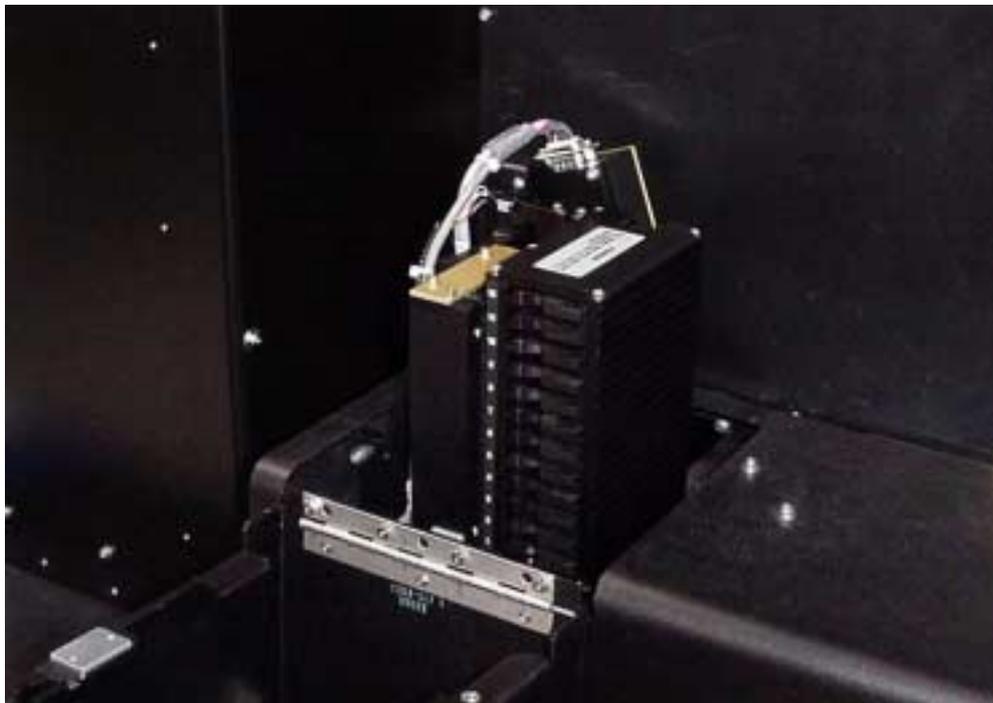


写真 3 スライド・マガジン（装填された状態）

- (7) レーザービームのウォームアップが終了（電源を入れてから30分以上経過）していたら、ダイアログ・ボックス内の“start”をクリックし、スキャン開始。
- (8) スキャンに要する時間はスライドガラス1枚あたり約10分である。

#### シグナルの画像化 (Visualization)

- (1) スキャンが終了したスライドガラスの画像データを画像加工用アプリケーション“Image Quant”で開いて拡大し、全ての行で横に32個のスポットが並び、かつ、適切にスキャンされていることを確認する。
- (2) スライド全域がスキャンされていなければ、再スキャンする。
- (3) 全域がスキャンされていれば、ツールバー上のヒストグラムのアイコンをクリックし、それぞれのチャンネル毎に信号強度のレンジをヒストグラム上で設定する。
- (4) 左右の画像を連結して1枚にまとめるには、画像合成用アプリケーション“Merge Gel”を立ち上げ、画像ファイルを選択してmergeをクリックする。
- (5) 合成(merge)された画像ファイルは元のファイルと同じディレクトリーに“... M”の名前で作成される。
- (6) 画像ファイルは全て、別のディレクトリーに移動して保存しておく（デフォルトのディレクトリーに放置しておくとう書き消去されてしまう！）。

#### シグナルの数量化 (Quantitation)

- (1) 信号強度数量化用アプリケーション“Array Vision”を立ち上げる。
- (2) メニュー・バーのImageからRetrieveを選び、ch1にL1、ch2にR1、ch3にL2、ch4にR2を、それぞれ取り込む。
- (3) Transformのアイコンをクリックし、現れたダイアログボックス上でh Placeをクリックし、FiltersはMedianを選択。Modifyは5×5に変更して、Applyをクリック。Source1～4について、それぞれ同様の処理を行う。
- (4) Visuabのウィンドウを開き、グリッド画面のコントラストをスポットの輪郭が確認できる程度に調節する。
- (5) Templateのアイコンをクリックして適当なTemplate fileを選択し、開く。
- (6) Alignmentのアイコンをクリックし、画面上に現れるグリッド（赤い丸）を、それぞれのシグナル部分にドラッグして合わせていく。
- (7) チャンネル1つ分（4608スポット）のグリッドを合わせ終わったら、メニュー

ー・バーのBackgroundをクリックし、LocationをSurrounding Individual Elementsに、ModeをIndividualに設定する。

- (8) グリッド・テンプレート・ファイルに適切な名前を付けて保存する。
- (9) 引き続きチャンネル2～4についてグリッドを合わせ、グリッド・テンプレート・ファイルを保存する。
- (10) スライドグラス1枚分のグリッド合わせ、およびテンプレート・ファイルの保存が終わったら、グリッド画面の部分をクリックして演算開始。
- (11) 出来上がったテーブルをタブ区切りテキストファイル形式(.txt)等で表計算ソフトウェアにExportする。
- (12) 引き続き他のスライドグラスを処理するには、Image Retrieveから繰り返す。
- (13) 全てのスライドグラスを処理したら、“Array Vision”を閉じて、実験を終了する。

当センターでは“Array Vision”で作成したデータシートのうち、sD×Aのみをテキストファイル形式にまとめ、数理解析( Dr. 角田の講義を参照)に供している。

## 第6章 数理解析

### a) スポットデータの加工

#### 原理および特徴

マイクロアレイの実験は一般に、2つの試料の遺伝子ごとのmRNA発現量を同一の条件下で比較することを目的とする。しかし、蛍光物質の違い、スライドガラスのロット差や、試料の調製の違いなどによって両者の蛍光強度の比が本来のものとはずれてしまうこともある。そもそも試料の内容を「等量」混ぜるとは何かという大問題もある。そこで、一つのやり方として、ハイブリダイズを終えた後、発現量があまり変化しないコントロール遺伝子などによって蛍光強度の正規化を行う。また、実験室内の塵などによって誤った蛍光量が観測されることもあるので、それを抑えるための画像処理や多数決処理などの解析が必要である。さらに、網羅的な cDNA ライブラリを用いたとき、遺伝子によっては2試料のいずれにおいても発現量が低く、観測結果がマイクロアレイ観測系のノイズやゆらぎに埋もれてしまうことがある。しかし見かけ上は蛍光強度が計測できてしまう。そのような偽データを抑えるために、信頼性限界ラインを定め、それ以下の領域のデータは扱わないという工夫をする必要がある。

以下の手順の操作を行うと、蛍光のバックグラウンドや塵などの影響が除かれた後のスポットデータの、正規化され信頼性のある蛍光強度比が求まる。

#### 手順

- 画像処理によるフィルタリング
- スポットテンプレートの調整
- バックグラウンドレベルの計算
- 複数スポット間の多数決処理
- コントロール遺伝子を用いた正規化
- 信頼性限界ライン特定

#### 操作

- 画像処理によるフィルタリング

スキャナから取り込んだアレイ画像にメディアンフィルタをかける。

注) マイクロアレイシステム付属のスポットデータ加工ソフトウェアにオプションがあることが多い。

#### スポットテンプレートの調整

1. アレイスポットのテンプレートを自動アライメント機能で配置する。
2. テンプレート内のスポット枠がスポットの実際の位置から外れたものを調整し直す。

注) マイクロアレイシステム付属のスポットデータ加工ソフトウェアにオプションがあることが多い。テンプレート内のスポット枠の位置も微調整される。ただし蛍光量の少ないスポットでは自動配置がうまく働かない場合があるために微調整が必要であるし、ときには大きくずれて異なる行や列に合わせてテンプレートを置いてしまうことがあるので注意が必要である。

#### バックグラウンドレベルの計算

スポット周囲あるいはスライドグラス全体のバックグラウンドレベルを求め、それからスポット内の面積に対するバックグラウンドの蛍光量を計算し、スポットの観測蛍光量から引く。

注) システム付属のソフトウェアで計算する。各スポットの周囲だけでバックグラウンドレベルを計算する場合と、スライド全体で平均する場合があるが、どちらが良いかはハイブリダイゼーションなどによるむらの多さなどで決まる。むらが多いときは各スポットの周囲だけで計算した方が多い場合が多い。

#### 複数スポット間の多数決処理

1. 同一の遺伝子に対しハイブリダイズした複数（4個等）のスポットデータを並べる。
2. バックグラウンドレベルを引いた後の蛍光強度が0のスポットは処理対象からはずす。すべてのスポットで0ならば0とする。
3. 1スポットのみ除いたセットで蛍光強度比の分散を計算し、除いておいたスポットが分散の2倍程度におさまっていれば、除いたスポットも信頼性があるとみなして考慮の対象とする。

4. 3をすべての組合せで行う。

5. 同一の遺伝子に対する複数のスポットのうち対象となったスポットの間で蛍光強度比の重みつき平均を求めたものを、その遺伝子に対する蛍光強度比であるとみなす。

注) 重みつき平均は、蛍光量が多いものほど信頼性がある場合が多いことから、蛍光量に比例して重みづけを行い、平均化する。

#### コントロール遺伝子を用いた正規化

1. 二種類の比較対象の間で発現量が変化しないとみなせる遺伝子群を抽出しておく。

2. 1で求めた遺伝子群の蛍光強度比の平均が 1 になるようにアレイ全体の蛍光強度比を修正（正規化）する。

注) 発現が変化しないとされる遺伝子は複数、できれば数十個決定しておくことが望ましい。実験ごとに、発現量の小さい遺伝子を除外するようにしておく。

#### 信頼性限界ライン特定

1. アレイ上の遺伝子群全体の中で、蛍光強度の強い遺伝子群全体の蛍光強度の分散を求める。

2. 蛍光強度の高い遺伝子群にだんだん低い遺伝子を混ぜていき、そのたびに分散を求める。

3. 1 と2で求めた蛍光強度比の分散の差が許容値（1程度）を超えたら、ゆらぎの成分が大きいと判断し信頼性限界を超えたとみなす。

註) 二種類の対象の遺伝子のうち多くがほぼ同じ発現量であるという仮定がある。著しく異なる組織などでは、この考え方が当てはまるかどうかを検討する必要がある。

#### b) 重要な遺伝子の抽出と診断システム

##### 原理および特徴

2つの試料間（例えば癌細胞と正常細胞）で比較した個々の遺伝子の発現量比をアレイ上の各スポットの蛍光強度比によって求めた後は、試料の種類（例えば癌

細胞の薬剤感受性の違いなどによるグループ)の違いによって発現比が大きく異なる遺伝子を求めることが次のタスクになる。とくにそれぞれのグループ内で複数のサンプルが得られた場合には、グループ内で共通し、グループ間で異なる発現の仕方をするものが有意なものである可能性が高い。次に、そのような顕著に異なる遺伝子群を抽出し、工夫をして組み合わせれば、異なったグループを識別することができるようになる。その1例は、我々が行った食道癌の薬剤感受性の予測である。

## 手順

個々のスポットの発現量比の違いのカテゴリ化  
グループ内で共通しグループ間で発現量比が異なる遺伝子の抽出  
遺伝子に対する重み付けによる予測システム

## 操作

個々のスポットの発現の違いのカテゴリ化

1. 比較する二種類の発現量が両方とも信頼性限界ライン未満のスポットは「検出できず」と判定する。
2. 蛍光強度比が2.0以上のとき、発現が「上昇した」と判定する。
3. 蛍光強度比が0.5以下のとき、発現が「下降した」と判定する。
4. 蛍光強度比が0.5から2.0までの場合は「変化なし」と判定する。

注) 連続量のまま扱う方法もあるが、臨床データではサンプルごとに大きなばらつきがあることが多いので、ある程度大きな分類でとらえ、遺伝子の数やサンプル数を増やすことによって情報量を多くする方針をとっている。

グループ内で共通しグループ間で発現量比が異なる遺伝子の抽出

1. 遺伝子ごとに、各グループ内で、判定した発現相違カテゴリに入る事例の数を数える。例えば薬剤感受性のあるグループの8事例内で、ある遺伝子に着目すると上昇5事例、下降1事例、変化なし2事例、検出できず0事例というように数える。

2. 遺伝子ごとに、1の数をもとにし、グループ間での順序関係検査値を計算する。  
この値が大きいほど、2つのグループの遺伝子発現上昇、下降の振舞いの違いが大きいことになる。
3. 任意の2つの遺伝子間での、事例ごとの振舞いの一致性（発現パタンの類似度）を計算する。
4. 3の計算から、似ている遺伝子どうしをクラスタリングする。
5. 2と4の結果から、グループ間で有意に異なる遺伝子群をクラスタとして抽出する。複数の異なるクラスタが選ばれ、一つのクラスタ内には複数の遺伝子が含まれていることが多い。

#### 遺伝子に対する重み付けによる予測システム

1. 各遺伝子の発現変化量（比のbg値）にかける重み変数を割り当てておく。この重みは後のプロセスで最適なものを求める。
2. サンプルが与えられたとき、遺伝子発現プロファイルに各遺伝子に対する重みをかける。これらの重みを全遺伝子で足しあげたものを、そのサンプルの予測スコアであるとみなす。
3. サンプルのスコアの分布が、グループ間で大きく異なるような重みづけが最適なものであるとみなし、各遺伝子の各カテゴリに対する重みを計算する。
4. 未知のサンプルに対しては、2の計算方法によって予測スコアを求め、どのグループに属するものであるかを判定する。

註) 3の計算は群内分散に比べ群間分散がなるべく大きくなるような重み変数の値を求めるという最適化問題である。我々の食道癌の薬剤感受性の研究では多変量解析を用い、算出した。