

SOP 番号 GEN111-2

Ver.3

標準操作手順書

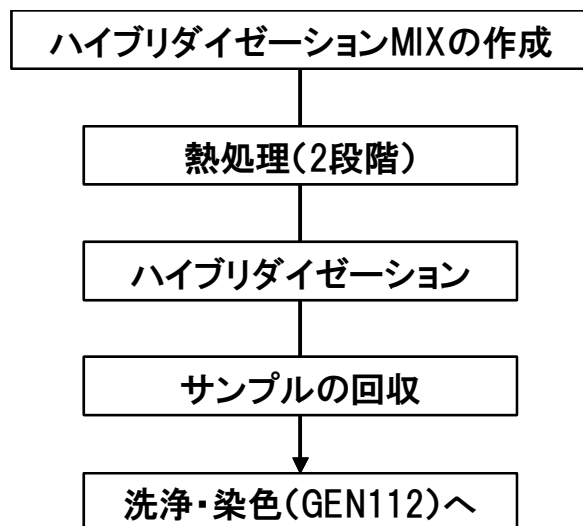
GeneChip のハイブリダイゼーション

承認 _____ 年 月 日

目 次

分類	項目	ページ
GEN111 Ver.3	作業手順の流れ図	1
	1.序	2
	2.試薬・器具	2
	3.使用機器	2
	4.試薬の調製方法	2
	5.ハイブリダイゼーション	3-4

作業手順



1 序

本 SOP は、GeneChip のハイブリダイゼーションについて記載する。

2 試薬・器具

2-1 試薬

- 1) GeneChip® 3' IVT Express Kit BOX 2 of 2 (Affymetrix, Part #901229)
 - ・ Control Oligonucleotide B2 -30℃保存
 - ・ 20X Hybridization Contorol -30℃保存
- 2) GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit (Affymetrix, Part #900720)
- 3) Hybridization Module from Box 1 4℃保存
 - ・ Pre-Hybridization Mix 4℃保存
 - ・ 2X Hybridization Mix 4℃保存
 - ・ DMSO 室温保存
 - ・ Nuclease-free water 4℃保存

2-2 器具

- 1) Tough-Spots (TOHO, 1/2inch diameter, white, T-SPOTS-50)

3 使用機器

- 1) ヒートブロック (エッペンドルフ ; Thermomixer Comfort
タイテック ; DryThermoUnit DTU-N または同等品)
- 2) Gene Chip Hybridization Oven 640 (Affymetrix, Part #800138)
- 3) 定温器 (15℃) (Cool Incubator, 三菱電気エンジニアリング(株), CN-25A)

4 試薬の調製

試薬を調整する前に Enzyme 類は数回タッピングをした後、冷凍試薬は室温で完全に融解した後、氷上にて保持し使用する。

- 1) Hybridization mix

試薬名	1 本分	25 本分	49 本分
Control Oligonucleotide B2	4.2 μL	105 μL	205.8 μL
20X Hybridization Contorol (65℃、5 分の加熱処理済み)	12.5 μL	312.5 μL	612.5 μL
2X Hybridization Mix	125 μL	3.125 mL	6.125 mL
DMSO	25 μL	0.625 mL	1.225 mL
Nuclease-free water	50 μL	1.25 mL	2.45 mL
Total	216.7 μL	5.4175 mL	10.6183 mL

5 ハイブリダイゼーション

- 1) GeneChip を袋から取り出し、チップの表面に Working とサンプル No を記入しチップ ID バーコードシールを貼る。

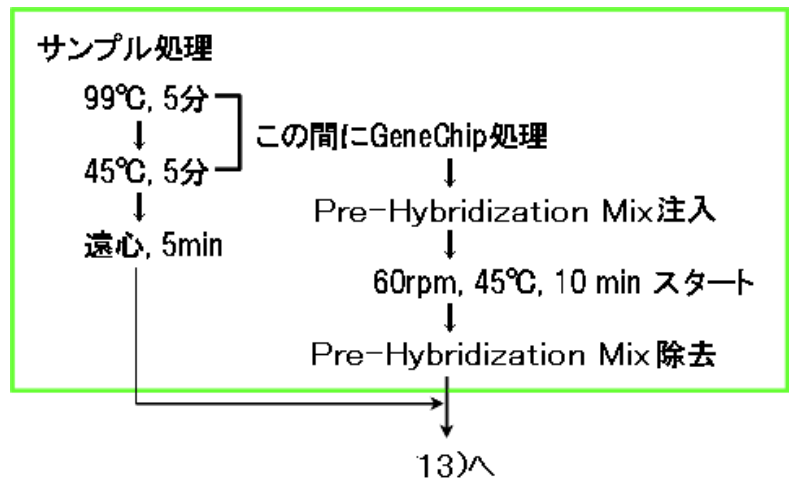
(袋表面に貼ってある Lot シールを切り取って、専用の台紙に貼る。)

注1) GeneChip ガラス面の結露を防ぐため、少なくとも 30 分前には室温に戻しておく。この時、ガラス面の傷等を確認する。

注2) septa を塞ぐ赤いゴムの破損を防ぐため、左下の septa を空気孔として使い、右上の septa からサンプルを注入してもよい。

- 2) 20X Hybridization Control をヒートブロックで 65°C、5 分間加熱する。
- 3) Hybridization mix を作成する。
- 4) 断片化した aRNA を 1.5 mL のマイクロチューブに 33.3 μ L ずつ分注する。
- 5) よく混合した Hybridization mix (5.3) で作成) を、断片化 aRNA (33.3 μ L) の入ったチューブに 216.7 μ L 分注し、タッピング後、スピンドウンする (溶液の分注は、1 本のチップで連続的に行って良いが、チューブや液面にチップ先が付いた場合は交換する)。
以後の操作を行うまで、サンプルと Hybridization mix は混ぜた状態で冷蔵庫に保管。(このまま-80°Cで保存可能)
- 6) GeneChip の裏側にある右上 Septa に RAININ のチップ (グリーン) を空気孔として刺し、左下 Septa から RAININ 製のチップで Pre-Hybridization Mix を 200 μ L 注入する (Septa に差す RAININ チップも GeneChip ごとに交換する)。
- 7) ハイブリオープンで GeneChip のプレインキュベーションを行う (60 rpm, 10 分間, 45°C)。
- 8) GeneChip から液漏れがないことを確認する。
- 9) 5)のハイブリ液を 99°Cで 5 分間、インキュベートする (タイテック製ヒートブロック使用)。
- 10) 9)が終了したハイブリ液を 45°Cで 5 分間、インキュベートする (タイテック製ヒートブロック使用)。
- 11) ハイブリ液を遠心 (15,000 rpm, 5 分間, 室温)する。
- 12) ハイブリ液を遠心している間にプレインキュベートした GeneChip から RAININ 製のチップを用いて Pre-Hybridization Mix を除く。

- 5)~12)をフローにすると右の様に示すことが出来る。



- 13) 遠心したハイブリ液の上清をRAININ製のチップで200 μ Lずつとり (異物の混入を防ぐためチップはサンプルごと交換)、10)と同様にしてGeneChipに注入する。液漏れを防ぐためにシール (1/2 inch Tough Spots) でSeptaをふさぐ。上清を採取後のチューブ (残りのサンプル量は約50 μ L) には、サンプルIDバーコードシールを貼り、 -80°C に保管する。
注1) チップのガラス面は絶対に触らないこと。
- 14) GeneChip を Chip トレイに入れ、ハイブリオープンにセットする。Tray Retainer で Chip トレイを固定してインキュベーションを開始する。(45°C, 60 rpm, 16 時間)
- 15) インキュベーション終了後、チップからハイブリ液を抜く。上清をとった残りのチューブ (13)参照) に抜き取ったハイブリ液を戻す。ハイブリダイゼーション後のハイブリ液は -80°C で保存する。
- 16) WashA 液をチップチャンバーに満タンになるまで充填する (約 260 μ L)。
- 17) GeneChip は、Fluidics にセットするまで低温恒温器 (15°C) で保存する。

以下余白