

SOP 番号 GEN111

Ver.4

標準操作手順書

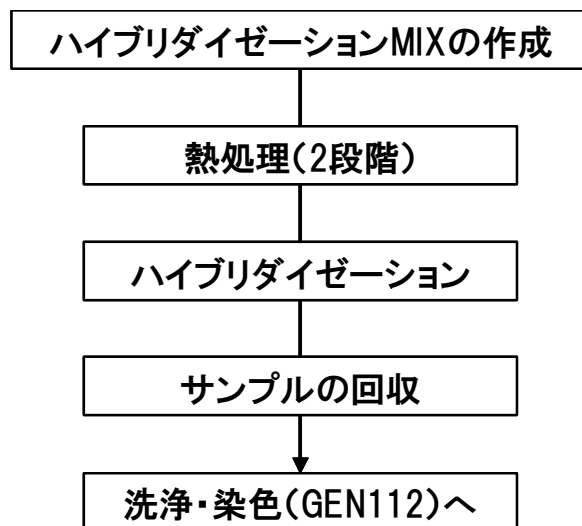
GeneChip のハイブリダイゼーション

承認 _____ 年 月 日

目 次

分類	項目	ページ
GEN111 Ver.4	作業手順の流れ図	1
	1.序	2
	2.試薬・器具	2-3
	3.使用機器	3
	4.試薬の調製方法	3-4
	5.ハイブリダイゼーション	4-6

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 Eukaryotic Hybridization Control kit

−20℃保存

(Affymetrix, cat.#900454 ; 30回分)

- ・ 20× Eukaryotic Hybridization Cont(100 μL×4本)
- ・ control Oligonucleotide B2(150 μL×1本)

又は

(Affymetrix, cat.#900457 ; 150回分)

- ・ 20× Eukaryotic Hybridization Cont (1,125 μL×3本)
- ・ control Oligonucleotide B2(750 μL×1本)

150 回用の Oligonucleotide B2 については、融解した際に 250 μL ずつ 3 本のチューブに分注して保存する。

- 2) MES-free acid monohydrate (Sigma, cat.# M5287, 250 g, 室温)
使用期限：購入日から 3 年以内
- 3) MES Sodium Salt (Sigma, cat.# M5057, 100 g, 室温)
使用期限：購入日から 3 年以内
- 4) 5 M NaCl (Ambion, cat.# 9760, 100 mL, 室温)
使用期限：購入日から 1 年以内、開封後 6 ヶ月
- 5) 0.5 M EDTA (Sigma, cat.# E7889, 100 mL, 室温)
使用期限：購入日から 1 年以内、開封後から 6 ヶ月
- 6) 10%Tween20 (Surfact-Amps 20 ; PIERCE cat.# 9005-64-5, 10 mL アンプル×6 本/箱, 室温)
使用期限：購入日から 1 年、開封後 6 ヶ月
アンプルを開封した後は、15 mL 容チューブ等に移し、Lot No.、購入日、開封日を記入する。
- 7) 10 mg/mL Herring Sperm DNA (promega, cat.# D1811)
使用期限：−20℃保存の場合・・・購入日から 1 年
4℃保存の場合・・・凍結融解日から 1 ヶ月

- 8) 50 mg/mL Bovine Serum Albumin (Invitrogen, cat.# 15561-020, 3 mL(1 mL ×3本), 4または-20℃)
使用期限：4℃保存の場合…凍結融解日から1ヶ月（凍結融解を繰り返さない）
-20℃保存の場合…購入日から1年以内
注）表示には“Bovine Serum Albumin”としか記載されていない（混入したヌクレアーゼ及びプロテアーゼを不活性化するためにアセチル化している）。規格は45-55 mg/mLである。
- 9) DEPC-Treated water (Ambion, cat.# 9920)
使用期限：購入日から1年以内、開封後6ヶ月
- 10) 20×SSPE Buffer (Invitrogen, cat.# 15591-043, 1 L, 室温)
使用期限：購入日から1年以内、開封後6ヶ月

2-2 器具

- 1) ボトルトップフィルター(IWAKI, cat.# 8930 001/8024 045 等)
- 2) ストレージボトル(IWAKI, cat.# 8930 001 等)
- 3) Tough-Spots (TOHO, 1/2inch diameter, white, T-SPOTS-50)

3 使用機器

- 1) Gene Chip Hybridization Oven 640 (AFFYMETRIX)
- 2) 定温(15℃)器 (Cool Incubator, 三菱電気エンジニアリング(株), CN-25A)

4 試薬の調製方法

- 1) 12×MES stock Buffer 冷蔵・遮光保存(3ヶ月以内に使用)
(2×Hybridization buffer に使用)

《調製法》

MES-free acid monohydrate	70.4 g
MES Sodium Salt	193.3 g
<u>ミリ Q</u>	<u>800 mL</u>
	1000 mL*

ビーカーに調製し、スターラーにてよく混ぜる。

*メスシリンダーを用いて1Lにメスアップした後、ボトルトップフィルターを用いてろ過する（滅菌ではなく、脱気及びゴミ除去の目的で行う）。pHは6.5～6.7になる。

注意）オートクレーブをかけてはいけない。溶液が黄色がかったら捨てること。

2) 2×Hybridization Buffer 冷蔵・遮光保存（1ヶ月以内に使用）

《調製法》

12×MES Stock Buffer	8.3 mL
5 M NaCl	17.7 mL
0.5 M EDTA	4.0 mL
10%Tween20	0.1 mL
<u>DEPC-Treated water</u>	<u>19.9 mL</u>
	50 mL

50 mL 容チューブ等で調製後、蓋をしっかりと閉め転倒混和する。

3) 1×Hybridization Buffer 冷蔵・遮光保存（調整後1ヶ月以内に使用）
2×Hybridization Buffer と DEPC-Treated water を等量混合して調製する。

4) Wash A 液 (Non-Stringent Wash Buffer) 室温保存（1ヶ月以内に使用）
(Final : 6×SSPE、0.01% Tween20)

- ・ 20×SSPE Buffer (Invitrogen)
- ・ 10%Tween20 (Surfact-Amps 20, PIERCE)

《調製法》

20×SSPE	300 mL	…(1 L のメスシリンダーで秤量してビーカーへ)
10% Tween-20	1 mL	…(1 mL 用ピペットで採取してビーカーへ)
<u>ミリ Q 水</u>	<u>699 mL</u>	…(1 L のメスシリンダーで秤量してビーカーへ)
	1000 mL*	

*スターラーを用いて混合した後、ボトルトップフィルターを用いてろ過する（滅菌の目的ではなくゴミ除去の目的で行う）。

調製後は、専用のボトルが清浄であることを確認して Wash A 液を移す。

5 ハイブリダイゼーション

1) 下表に従って、1.5 mL 容マイクロチューブに Hybridization control mix を作製する。

Hybridization control mix	1 本分	26 本分	51 本分
Control Oligonucleotide B2	5 μL	130 μL	255 μL
20×Eukaryotic Hybridization Control	15 μL	390 μL	765 μL

上記の 20×Eukaryotic Hybridization Control をヒートブロック（タイテック）で 65°C、5 分間加熱する。

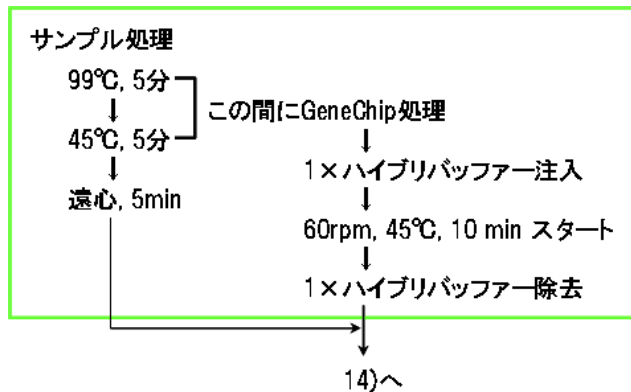
注意 Oligonucleotide B2 と Eukaryotic Hybridization Control は凍結融解を 3 回までとする。融解回数をチューブのフタに正の字で記録する。

- 3) 断片化した cRNA を 1.5 mL のマイクロチューブに 30 μ L ずつ分注する。
- 4) 下表に従ってハイブリダイゼーション mix を作製する。

試薬名	1 本分	25 本分	49 本分
Control Oligonucleotide B2	5 μ L	125 μ L	245 μ L
20×Eukaryotic Hybridization Control (65°C、5 分の加熱処理済み)	15 μ L	375 μ L	735 μ L
10 mg/mL Herring Sperm DNA	3 μ L	75 μ L	147 μ L
50 mg/mL Bovine Serum Albumin	3 μ L	75 μ L	147 μ L
2×Hybridization Buffer	150 μ L	3.75 mL	7.35 mL
DMSO	30 μ L	0.75 mL	1.47 mL
DEPC-Treated water	64 μ L	1.6 mL	3.136 mL
Total	270 μ L	6.75 mL	13.23 mL

- 5) よく混合したハイブリダイゼーション mix を、断片化 cRNA (30 μ L) の入ったチューブに 270 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 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。
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。
- 7) 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 1×Hybridization Buffer 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)。
- 8) ハイブリオーブンで GeneChip のインキュベーションを行う (60 rpm, 10 分間, 45°C)。
- 9) ヒートブロック (タイテック) で、99°C、5 分間、インキュベートする。
- 10) ヒートブロック (タイテック) で、45°C、5 分間、インキュベートする。
- 11) ハイブリ液を遠心 (15,000 rpm, 5 分間, 室温)する。

- 12) 11) の間にハイブリオープンからチップラックを取り出し、GeneChip から液漏れがないことを確認する。
- 13) プレインキュベートした GeneChip から RAININ 製のチップを用いて 1× Hybridization Buffer を除く。
7)~13)をフローにすると右の様に示すことが出来る。



- 14) 遠心したハイブリ液の上清をRAININ製のチップで200 μL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)、7)と同様にしてGeneChipに注入する。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。
 - 15) 液漏れを防ぐためにシール (1/2 inch Tough Spots) でSeptaをふさぐ。
 - 16) 上清を採取後のチューブ(残りのサンプル量は約100 μL)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。
チップのガラス面は絶対に触らないこと。
 - 17) 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, 18 時間)
 - 18) 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(16)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。
 - 19) 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 μL)。
 - 20) 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