

SOP 番号 GEN112-2

Ver.3

標準操作手順書

GeneChip の洗浄・染色 (AGCC)

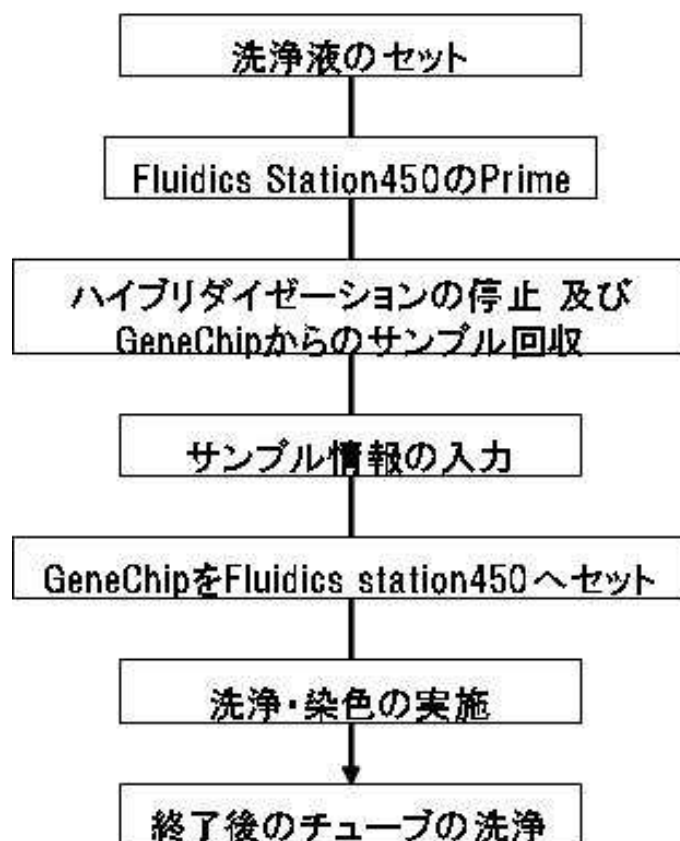
HWS Kit 使用

承認 _____ 年 月 日

目 次

分類	項目	ページ
GEN112 Ver.3	作業手順の流れ図	1
	1.序	2
	2.試薬・器具・機器	2
	3.洗浄・染色の準備	3-6
	4.サンプルの回収	6
	5.データ保存場所の設定	6-7
	6.Project を設定	7
	7.サンプル名の入力.	8-9
	8.洗浄・染色の実施	10-11
	9.Fluidics Station の Shutdown	12-13
	Appendix Fluidics Station (Fluidics Station 450) の作業工程の流れ	14-21

作業手順



1 序

本 SOP には、GeneChip の洗浄、染色について記載する。

2 試薬・器具・機器

2-1 試薬

- 1) GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit
Affymetrix, P/N 900720 (30 reactions)

1)-1 Stain Module, Box 1

- ・ Stain Cocktail 1 (18 mL 遮光)
- ・ Stain Cocktail 2 (18 mL)
- ・ Array Holding Buffer (30 mL)
- ・ Array Holding Buffer (30 mL)
- ・ Nuclease-free water (4 mL x2)

1)-2 Wash Buffers A and B, Box 2

- ・ Wash Buffer A (3本 800 mL/本 P/N 900721)
- ・ Wash Buffer B (1本 600 mL/本 P/N 900722)

2-2 器具

- 1) RNaseフリー、滅菌 1.5 mL容マイクロチューブ
(ビーエム機器, BM-15 BMリングロックチューブまたは同等品)
- 2) 1.5 mL容マイクロチューブ 遮光
(アシスト, 72.690.004 1.5 mLサンプリングチューブ 茶)
- 3) Tygon Tubing, 0.04" inner diameter (Cole-Parmer, P/N H-06418-04または同等品)
- 4) Media Bottle, SQ, 1,000 mL (Affymetrix, P/N 400119または同等品)
- 5) Media Bottle, SQ, 500 mL (set of 3 Affymetrix, P/N 400118または同等品)
- 6) Bottle Cap, Pre-Drilled (set of 4 Affymetrix, P/N 400137 または同等品)

2-3 機器

- 1) Fluidics Station 450 (Affymetrix, P/N 00-0079)
- 2) GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix, P/N 00-00212)

3 洗浄・染色の準備

3-1 洗浄液のセット

- 1) Wash Buffer A、Wash Buffer B ボトル内に異物が入っていないかを確認した後、Fluidics Station 本体側面のチューブに装着する。WATER のボトルにミリ Q 水が少ない場合はミリ Q 水を追加し、廃液が溜まっている場合は空にする。

注) チューブの先が洗浄液に十分浸っていることを確認する(特に Wash Buffer B)。

[1 台の Fluidics station で 4 枚の GeneChip の洗浄をする場合の使用量]


Wash Buffer A : 約 250 mL (デッドボリウム込みで 350 mL)

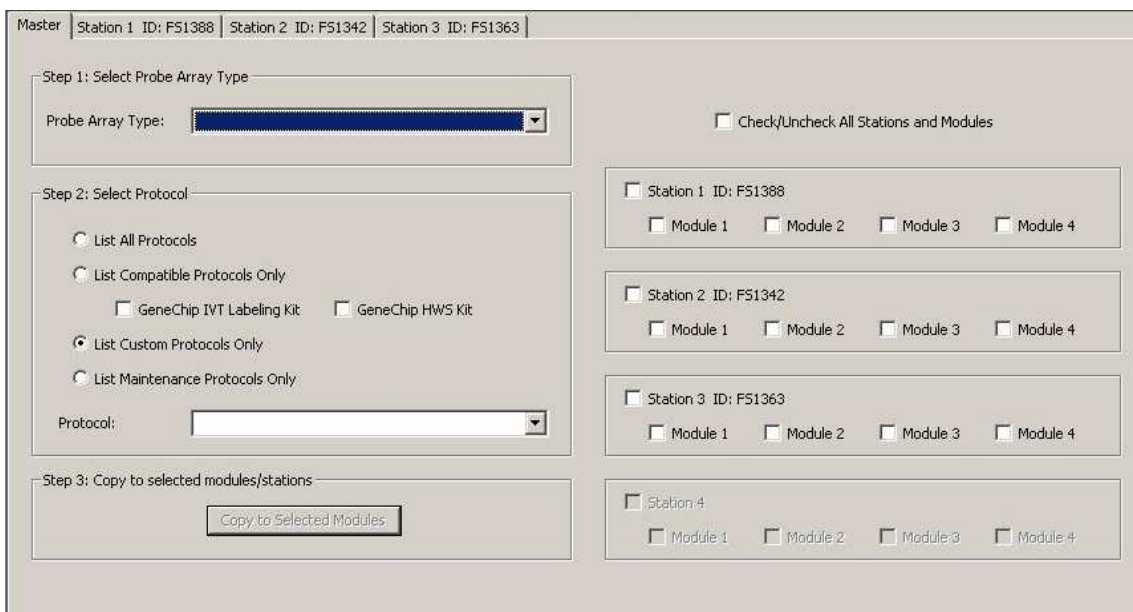
Wash Buffer B : 約 50 mL (デッドボリウム込みで 100 mL)

*Fluidics Station を 2 度使用する場合は、Wash Buffer A : 満タン、Wash Buffer B : 150~200 mL を入れておく。

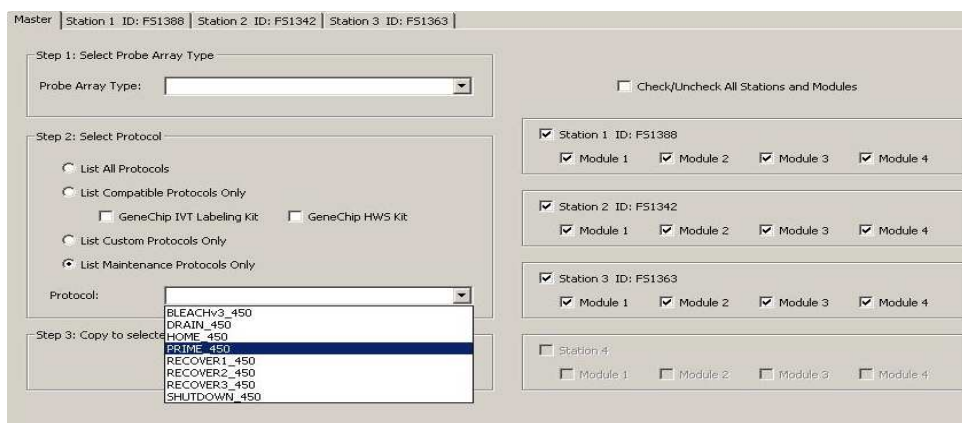
染色回数	Wash Buffer A	Wash Buffer B
1 回	350 mL	100 mL
2 回	満タン	200 mL

3-2 Fluidics Station の Prime

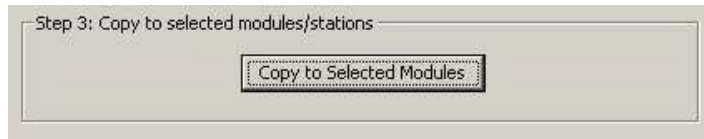
- 1) パソコン、スキャナー（本体前面左下）、Fluidics Station の電源（本体側面左下）、の順番で電源を入れる。
- 2) パソコンにログインする。
- 3)  Launcher を起動する。
- 4) AGCC Fluidics control software を起動する。
- 5) Master Control 画面：制御 PC に接続される全 Fluidics、全 Module の選択ができる。使用する Module ですべて同じ Type のアレイで同じ Protocol を実行する場合はこの画面で設定できる。



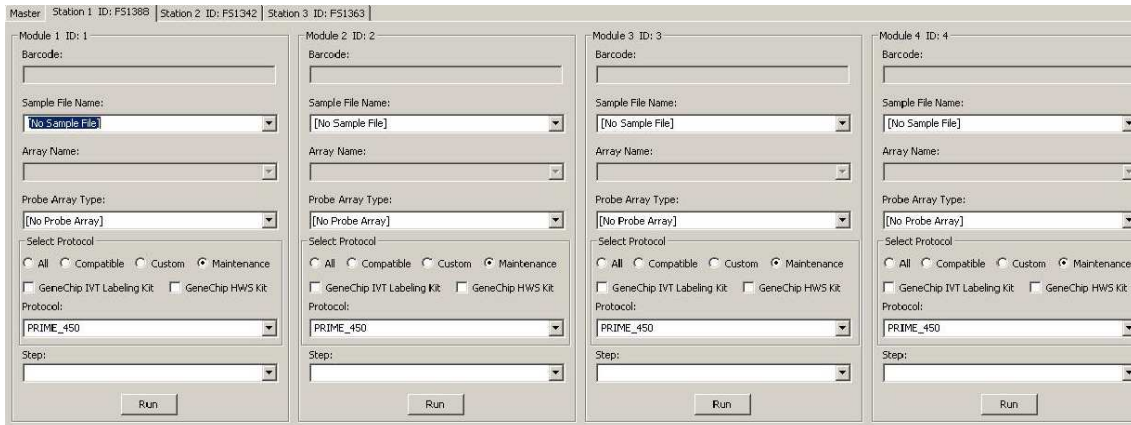
- 6) Wash Buffer A、Wash Buffer B を所定のチューブにセットしておく。
- 7) 使用する Station または Module をチェックする。
- 8) List maintenance protocol only をチェックする。
- 9) Protocol 設定欄に Prime_450 を設定する。



- 10) Copy to selected modules ボタンをクリックすると、各モジュールに Protocol の情報が送付される。



- 11) AGCC Fluidics Control から Fluidics ごとのタブを選択。
 12) 各 Module の Protocol の確認を行う。
 13) Module ごとに Run を行う。
 14) Fluidics station での作業は、各モジュールの液晶パネル部分の表示に従う。
 注意) 個々の Module を別々に設定する場合や、Copy to selected modules で、正しく情報が設定されているかは、各 Fluidics Station 毎の画面 (タブ表示) で確認すること。



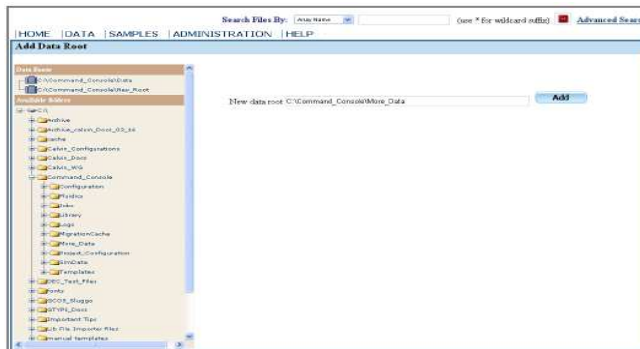
4 サンプルの回収

- 1) 4℃の冷蔵庫からサンプルの上清の残りを取り出す。ハイブリオープンから GeneChip を取り出し、GeneChip の裏側にある右上の Septa にチップ (RAININ ; グリーン) を刺す(空気穴用)。左下の Septa からチップ(RAININ)でサンプルを抜き取る。対応するサンプル ID ラベルが貼ってあるマイクロチューブに回収する (サンプルは-80℃で保存する)。
- 2) 右上の Septa にチップ (RAININ ; グリーン) を刺したまま、左下の Septa からチップ(RAININ)で Wash Buffer A を満タン (約 260 μL) に充填する。

5 データ保存場所の設定（研究員）

5-1 データを保存するフォルダを決める。

- 1) Windows のファイルエクスプローラーで¥¥Agccfs¥AGCC 以下にフォルダを作製する。
- 2) ¥¥Tgfs¥TGP2¥01-Research¥21-Experiment¥25-AGCC_Template にサンプル登録用のエクセルファイルを作成する。名前は Wxxxxx_Template.xls とする。
- 3) Data Root に設定する。
- 4) AGCC Portal の機能 DATA → Data Roots → Add 画面で登録する。
(初回のみ。Default では、¥¥Agccfs¥AGCC。状況に応じて変更の可能性あり。)
- 5) 左側で選択したフォルダが右側の欄に設定されるので、Add ボタンをクリックする。

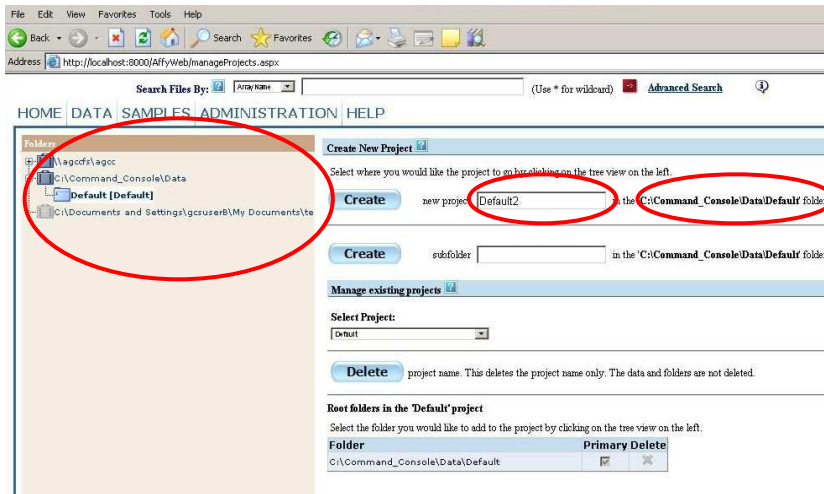


5-2 さらにこのフォル

ダを Default フォルダにする場合は、DATA → Default Folder 画面で設定する。

6 Project を設定する。(研究員)

- 1) AGCC Portal の機能 ADMINISTRATION → Projects → Manage 画面で登録する。



右一番上が新規 Project の作成。

左の Folders から 5-1)(1)で作成したフォルダを選択し、new project のフォルダ名と new project 名を確認し Create ボタンをクリックする。

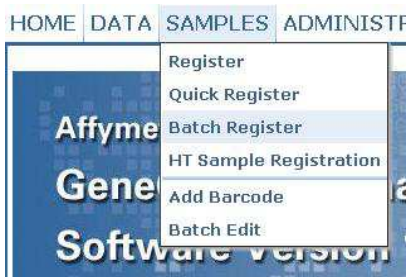
(既存の AGCC フォルダのサブフォルダを作成する場合は、自動的に親フォルダの Project に設定される。サブフォルダの作製は、同じく ADMINISTRATION → Manage 画面の上から 2 番目の Create subfolder 機能、または DATA → Folder View 画面の AddSubfolder 機能で行う。)

7 サンプル名の入力 (テクニシャン)

- 5-1,2)で作成したエクセルファイルにデータを入力する。(セルが水色の部分のみ。黄色、赤色の箇所は入力しない。紫色の箇所に関しては研究員の指示があった場合のみ入力する。)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	TGP_SAMPLE_ID	Sample File Name	Barcode	TGP_SAMPLE_TYPE	TGP_OPERATOR	TGP_USER	TGP_SAMPLE_DESC	TGP_SAMPLE_COMMENTS	Path	Project	Probe Array	Type Array Name
2	0090053KRAI-	0030178-46021	@51105600893406031009405127593181	K	Ueda	gcsuserB			V:\acctf\tapec1\TEST03			0030178-46021
3	0090055KRAI-	0030178-46022	@51105600893406031009405127593148	K	Ueda	gcsuserB			V:\acctf\tapec1\TEST03			0030178-46022
4	0090081KRAI-	0030178-46023	@51105600893406031009405127593124	K	Ueda	gcsuserB			V:\acctf\tapec1\TEST03			0030178-46023
5	0090082KRAI-	0030178-46024	@51105600893406031009405127593155	K	Ueda	gcsuserB			V:\acctf\tapec1\TEST03			0030178-46024
6												

- ・ TGP_SAMPLE_ID:TGP_Template : Sample Name
 - ・ Sample File Name : チップ ID
 - ・ Barcode : チップバーコード
 - ・ TGP_SAMPLE_TYPE:TGP_Template : SAMPLE TYPE
 - ・ TGP_OPERATOR:TGP_Template : 作業を行った人物の名前
 - ・ TGP_USER:TGP_Template : 系列
 - ・ TGP_SAMPLE_DESC : 研究員の指示があった場合のみ入力
 - ・ TGP_SAMPLE_COMMENTS : 研究員の指示があった場合のみ入力
- 上書き保存。
 - AGCC Portal→SAMPLS→ Batch Reister



- Browse をクリックして、Choose File ダイアログボックスを開く。

Step 3: Upload the batch registration file to create new sample (.ARR) files.

Enter the path, or click Browse to find the batch registration file (.XLS or .TSV format or Tab delimited .TXT).

Allow Custom Barcodes

Click Upload to upload the Sample information.

- 5) ファイルを選択してオープンをクリック。アップロード **Upload** を押し、入力済みのファイルをアップロードする。
- 6) 確認画面が表示されるので内容を確認し **save** を押す。
(**Cancel** をクリックすると内容を修正できる。)

Search Files By: (Use * for wildcard) **Advanced Search**

HOME DATA SAMPLES ADMINISTRATION HELP

Batch Sample Registration

Create and Upload Batch Registration File > Confirm > Finish

The following samples have been read from the file.

Path	File Name	Array Names	Status
\\Agcch\AAGCC\TEST01	003017846017	003017846017	Sample read from file with no errors.
\\Agcch\AAGCC\TEST01	003017846018	003017846018	Sample read from file with no errors.

If you have errors but wish to continue registering only the valid records click the Save button and only the valid records will upload. Or you may cancel the process by clicking Cancel.

- 7) 完了画面が表示される。

Search Files By: (Use * for wildcard) **Advanced Search**

HOME DATA SAMPLES ADMINISTRATION HELP

Batch Sample Registration

Create and Upload Batch Registration File > Confirm > **Finish**

Status of sample file creation.

Path	File Name	Array Names	Status
C:\Command_Console\Data\GCOS 1.3	Batch1	Batch1	Sample successfully read from file.
C:\Command_Console\Data\GCOS 1.3	Batch2	Batch2	Sample successfully read from file.
C:\Command_Console\Data\GCOS 1.3	Batch3	Batch3	Sample successfully read from file.

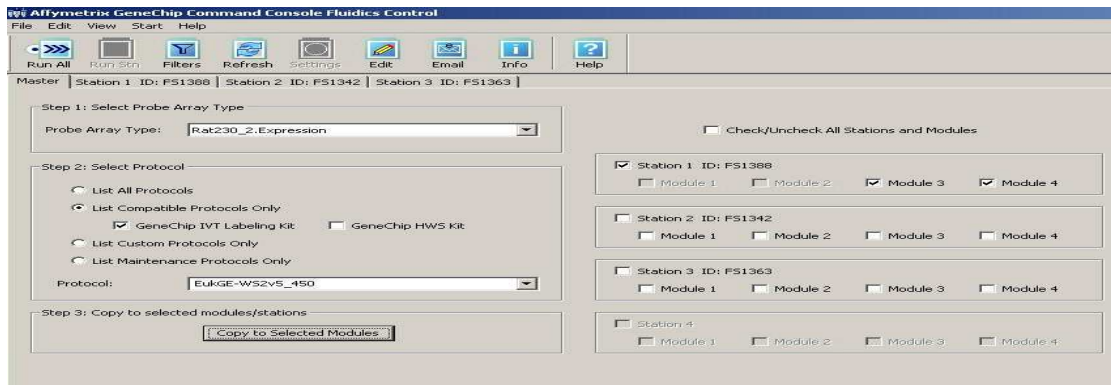
Batch Array Registration is complete.

Start Instrument Control Modules:

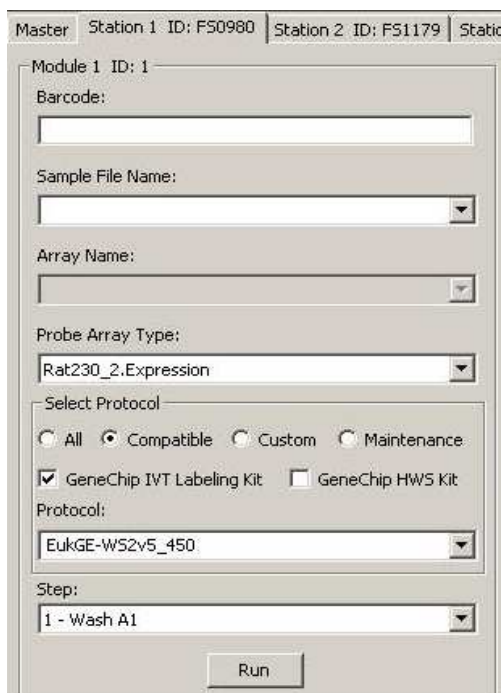
- Scan Control
- Fluidics Control

8 洗浄・染色の実施

- 1) AGCC Fluidics Control から Master のタブを選択。使用するステーションにチェックを入れる。



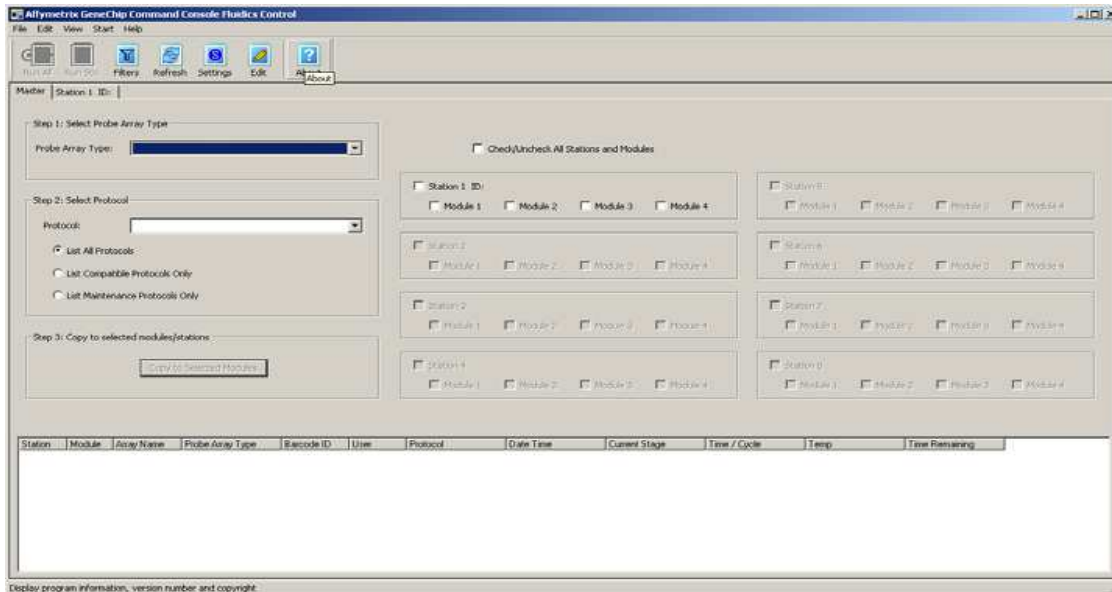
- 2) アレイのタイプを設定する。
- 3) List Compatible Protocols Only にチェックを入れ、GeneChip IVT Labeling Kit と GeneChip HWS Kit にチェックを入れる。
- 4) Protocol リストにはそのアレイタイプと Kit 使用の組み合わせに適した Protocol のみが表示されるので使用する Protocol を選択。
IVT Express Kit と HWS Kit を使用した場合は、FS450_0001 を選択。
- 5) Copy to Selected Modules をクリックして各モジュールに情報をコピーする。
- 6) Station ごとのタブを選択。



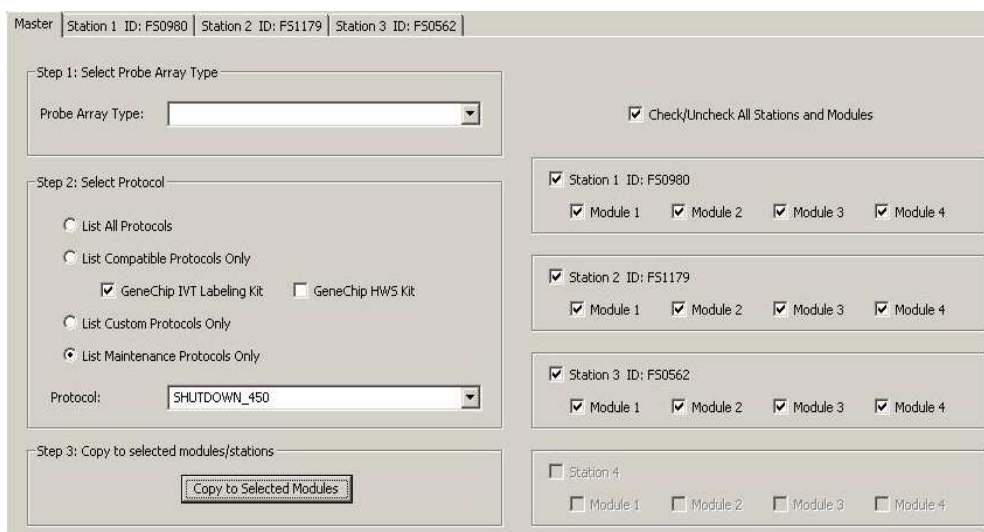
- 7) サンプルファイル名を設定し Protocol を確認して Module ごとに Run を行う。
(プルダウンリストにサンプルファイル名が表示されない場合は Refresh を行う。)
- 8) Prime が終わっていることを確認し (LCD 画面に “Priming done READY” と表示される)、GeneChip を対応する Module のホルダーにセットする (注意: ウォッシュブロックを強く押し過ぎない。)
- 9) サンプルホルダー1に 600 μ L の Stain Cocktail 1 を分注した 1.5 mL チューブ (茶色) をセットする。サンプルホルダー2に 600 μ L の Stain Cocktail 2 を分注した 1.5 mL チューブ (clear) をセットする。サンプルホルダー3に 800 μ L の Array Holding Buffer を分注した 1.5 mL チューブ (clear) をセットする。
それぞれの試薬は使用する前にボトルを穏やかにボトルをタッピングしよく混合する。
- 10) Fluidics Station の LCD 画面の Current Stage に染色段階が表示される。
以後の作業は、LCD 画面を確認しながら進める (Appendix 参照)。

9 Fluidics station の Shutdown

- 1) Wash Buffer A 及び Wash Buffer B のボトルをはずして、それぞれ、MiliQ 水の入った DI WATER のボトルを装着する。
- 2) Master Control 画面：制御 PC に接続される全 Fluidics、全 Module の選択ができる。使用する Module ですべて同じ Type のアレイで同じ Protocol を実行する場合はこの画面で設定できる。



- 3) 使用する Station または Module をチェックする。
- 4) List maintenance protocol only をチェック
- 5) Protocol 設定欄に Shutdown を設定する。
- 6) Copy to selected modules ボタンをクリックすると、各モジュールに Protocol の情報が送付される。



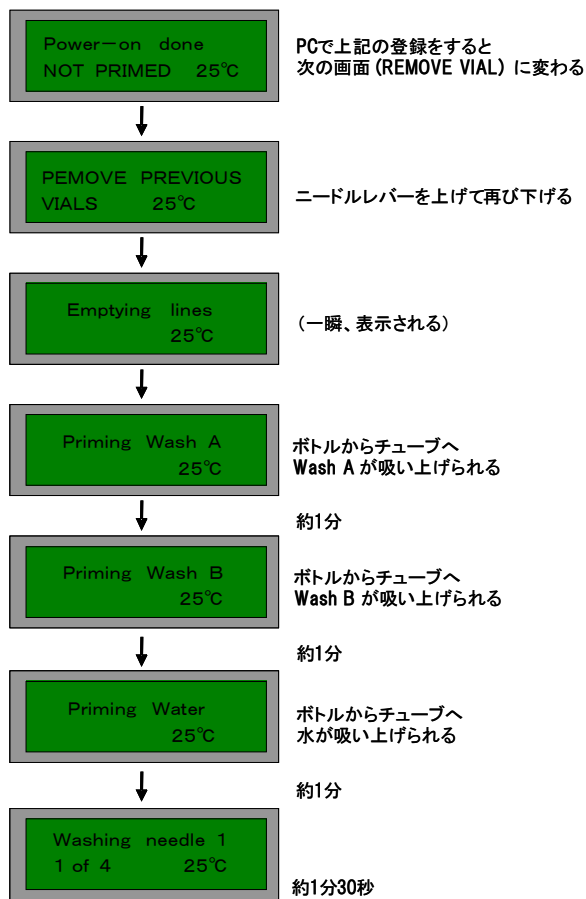
- 6) AGCC Fluidics Control から Fluidics ごとのタブを選択。Protocol の確認を行う。
- 7) Module ごとに Run を行う。
- 8) Fluidics station での作業は、各モジュールの液晶パネル部分の表示に従う。
個々の Module を別々に設定する場合や、Copy to selected modules で、正しく情報が設定されているかは、各 Fluidics Station 毎の画面（タブ表示）で確認する。
- 9) Fluidics Station の LCD 画面に “REMOVE PREVIOUS VIAL” と表示される。
ニードルレバーを上げ、レバーを下げる。
- 10) Fluidics Station の LCD 画面に”Shutdown done NOT PRIMED” と表示される。
Shutdown は終了である。
- 11) Fluidics Station の本体左下側面のスイッチを OFF にする。

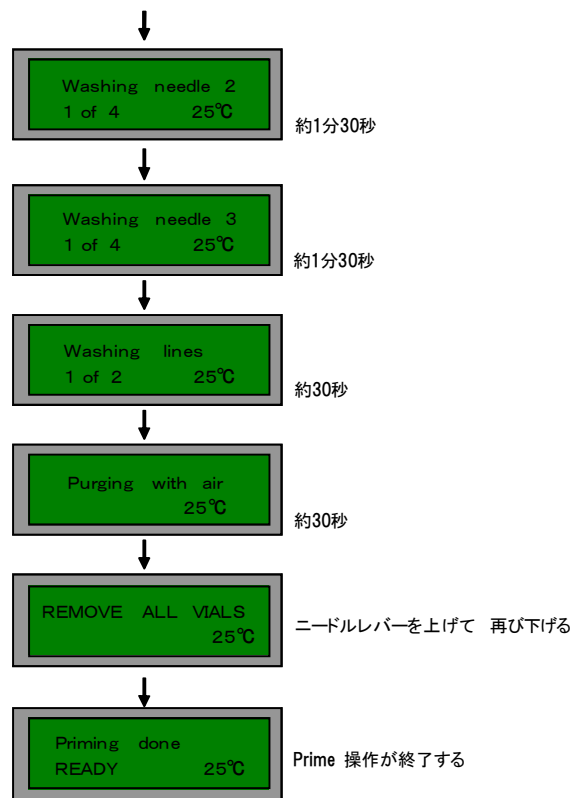
Appendix : Fluidic Station (Fluidic Station 450) の作業工程の流れ

Prime 操作(3.2 項参照)

- 1) Master Control 画面を立ち上げる。
- 2) 使用する Station または Module をチェックする。
- 3) List maintenance protocol only をチェックする。
- 4) Protocol 設定欄に Prime_450 を設定する。
- 5) Copy to selected modules ボタンをクリックすると、各モジュールに Protocol の情報が送付される。
- 6) AGCC Fluidics Control から Fluidics ごとのタブを選択。
- 7) 各 Module の Protocol の確認を行う。
- 8) Module ごとに Run を行う。

Fluidics Station の LCD画面

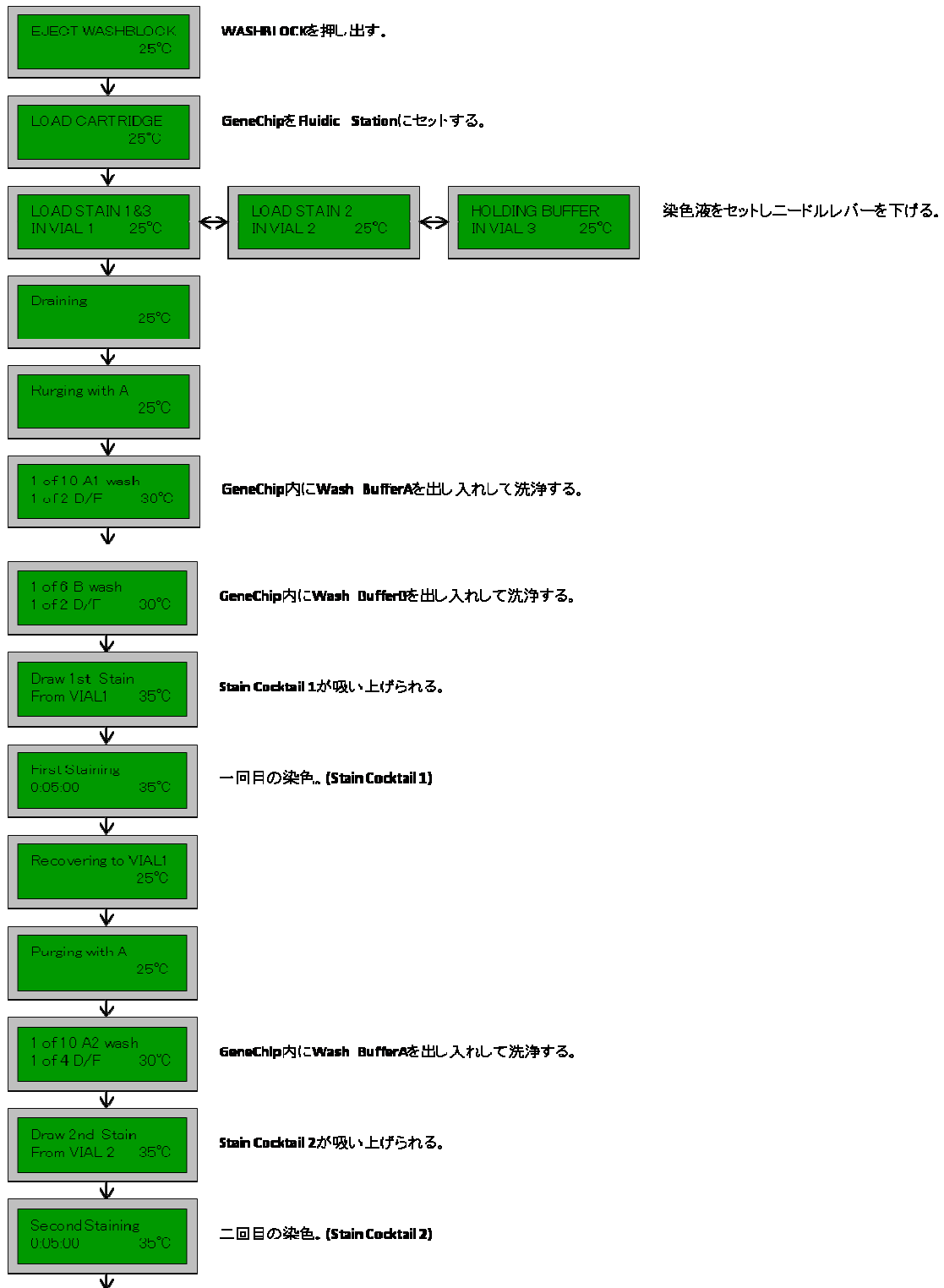


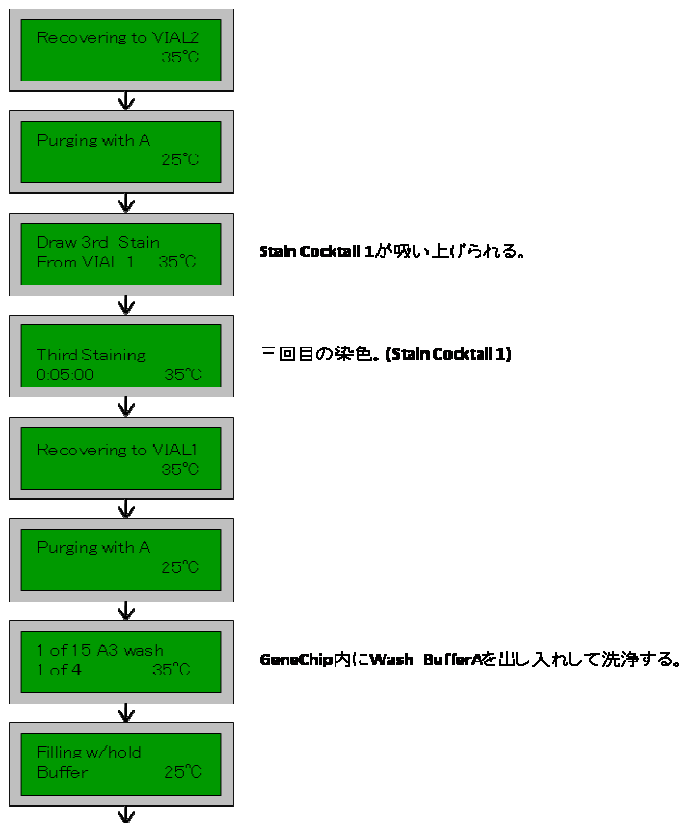


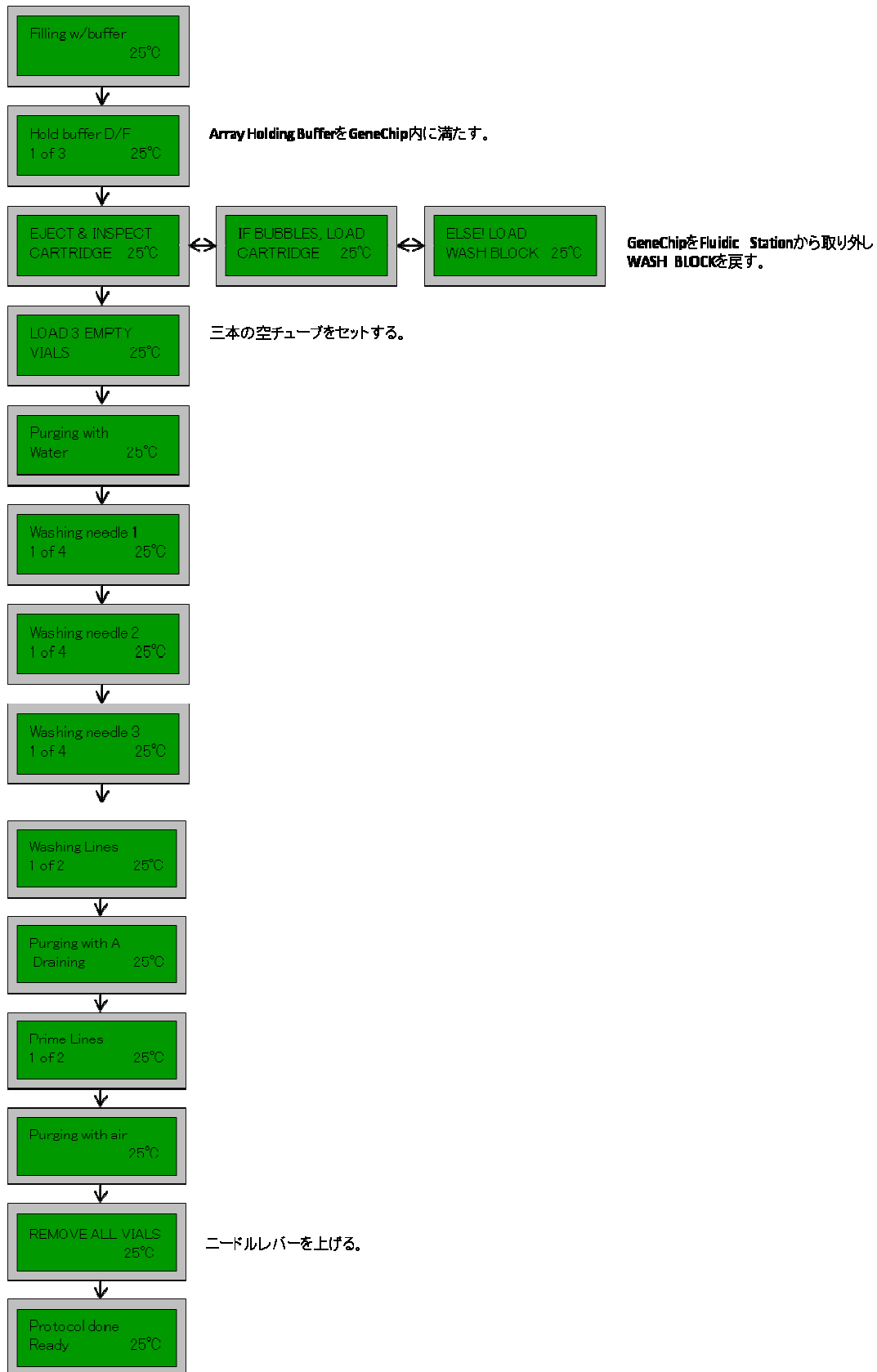
洗浄・染色操作（7項参照）

- 1) 実験条件の入力を行う。
- 2) AGCC Fluidics Control から Master のタブを選択。使用するステーションにチェックを入れる。
- 3) アレイのタイプを設定する。
- 4) List Compatible Protocols Only にチェックを入れ GeneChip の IVT Kit と HWS Kit の使用の有無を設定する。
Protocol リストにはそのアレイタイプと Kit 使用の組み合わせに適した Protocol のみが表示されるので使用する Protocol を選択。
- 5) Copy to Selected Modules をクリックして各モジュールに情報をコピーする。
- 6) Station ごとのタブを選択。
- 7) サンプルファイル名を設定し Protocol を確認して Module ごとに Run を行う。

Fluidics Station の LCD 画面



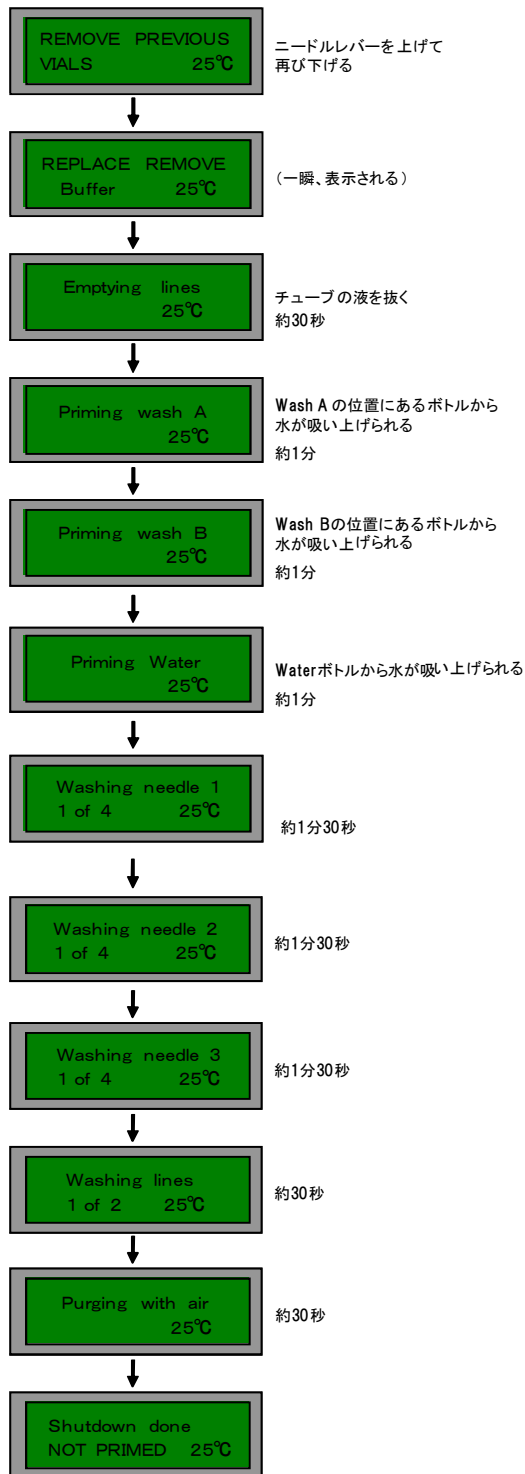




ShutDown 操作 (9 項参照)

- 1) Master Control 画面を立ち上げる。
- 2) 使用する Station または Module をチェックする。
- 3) List maintenance protocol only をチェックする。
- 4) Protocol 設定欄に SHUTDOWN_450 を設定する。
- 5) Copy to selected modules ボタンをクリックすると、各モジュールに Protocol の情報が送付される。
- 6) AGCC Fluidics Control から Fluidics ごとのタブを選択。
- 7) 各 Module の Protocol の確認を行う。
- 8) Module ごとに Run を行う。

Fluidics Station の LCD 画面



Shutdown 操作が終了する。

Fluidics station 本体及び PC のスイッチを OFF にする。

以下余白