

SOP 番号 GEN112

Ver.5

# 標準操作手順書

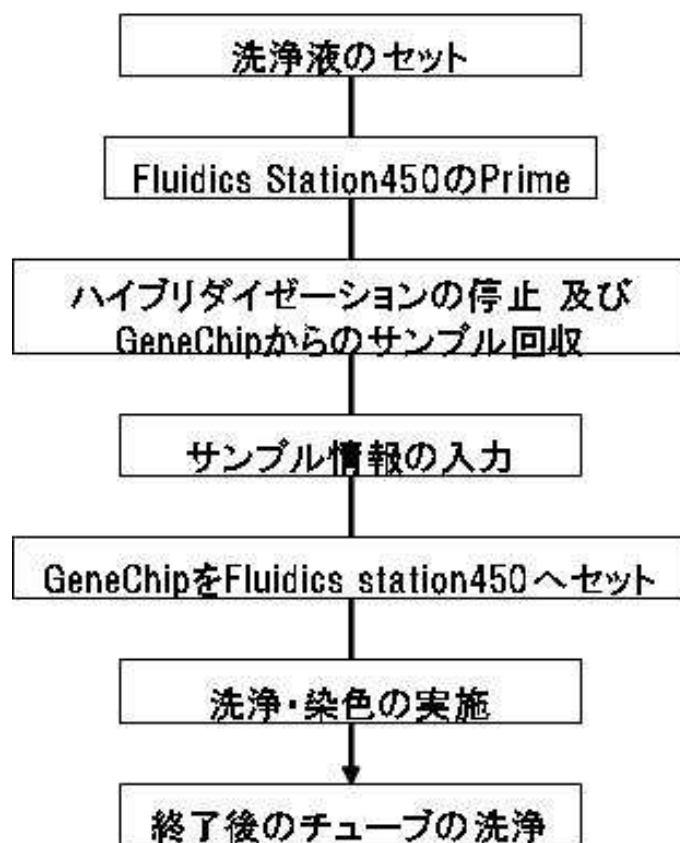
## GeneChip の洗浄・染色

承認 \_\_\_\_\_ 年 月 日

目 次

分類	項目	ページ
GEN112 Ver.5	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	7
	5.データ保存場所の設定	7
	6.Project を設定	8
	7.サンプル名の入力.	8-12
	8.洗浄・染色の実施	13
	9.Fluidics Station の Shutdown	14-16
	Appendix	17-22
	Fluidics Station (Fluidics Station 450) の作業工程の流れ	

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)

Stain Module, Box 1

- Stain Cocktail 1 (18mL 遮光)
- Stain Cocktail 2 (18mL )
- Array Holding Buffer (30 mL )
- Nuclease-free water (4mLx2)

Wash Buffers A and B, Box 2

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

### 2.2 器具

1) Sterile, RNase-free, microcentrifuge vials, 1.5 mL (USA Scientific, P/N 1415-2600 もしくは同等品)

2)Sterile, RNase-free, microcentrifuge vials, 1.5 mL, amber (USA Scientific, P/N 1615-5507 もしくは同等品)

3)Micropipettors, (P-2, P-20, P-200, P-1000), **Rainin** Pipetman (もしくは同等品)

4)Sterile-barrier pipette tips and non-barrier pipette tips

5)Tygon Tubing, 0.04" inner diameter(Cole-Parmer, P/N H-06418-04)

6)Tough-Spots™, Label Dots(USA Scientific, P/N 9185-0000)

7)Media Bottle, SQ, 1,000 mL(Affymetrix, P/N 400119)

8) Media Bottle, SQ, 500 mL (set of 3 Affymetrix, P/N 400118)

9)Bottle Cap, Pre-Drilled (set of 4 Affymetrix, P/N 400137)

### 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 A、Wash B ボトル内に異物が入っていないかを確認した後、を 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 B 液)。

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

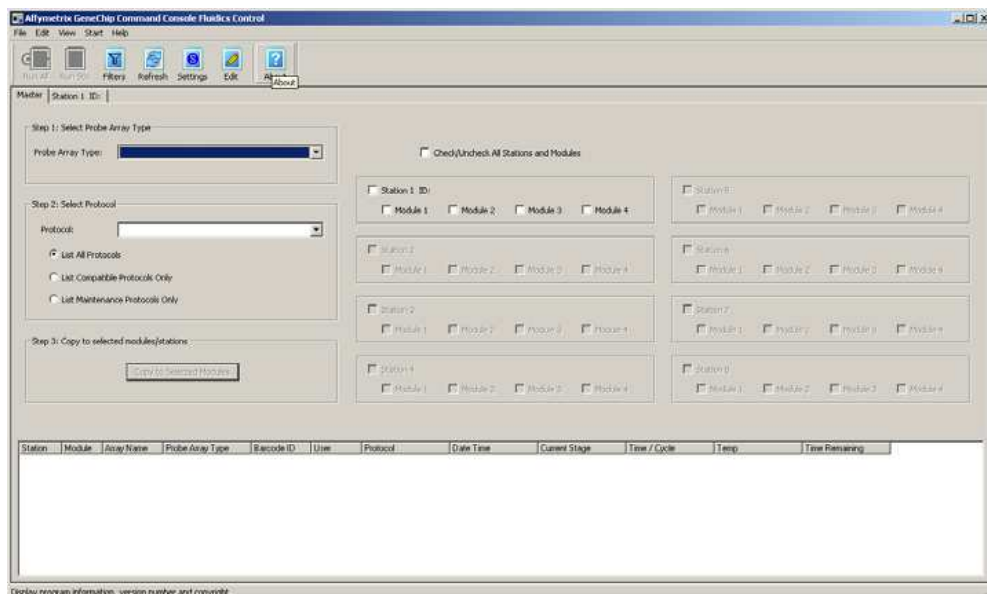
Wash A 液 : 約 250 mL (デッドボリューム込みで 350 mL)

Wash B 液 : 約 50 mL (デッドボリューム込みで 100 mL)

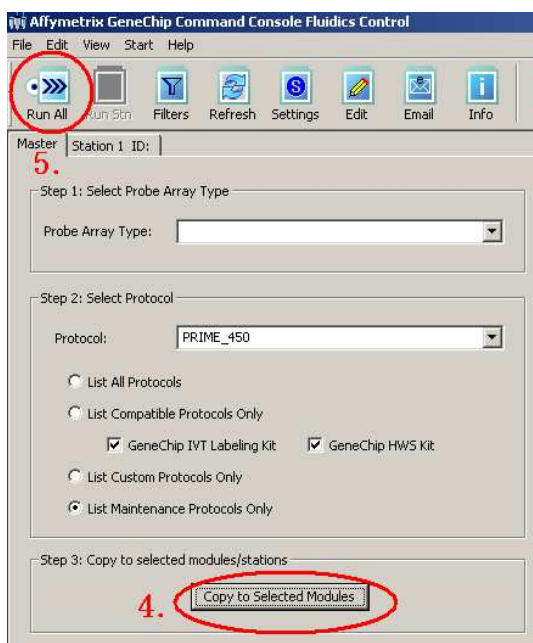
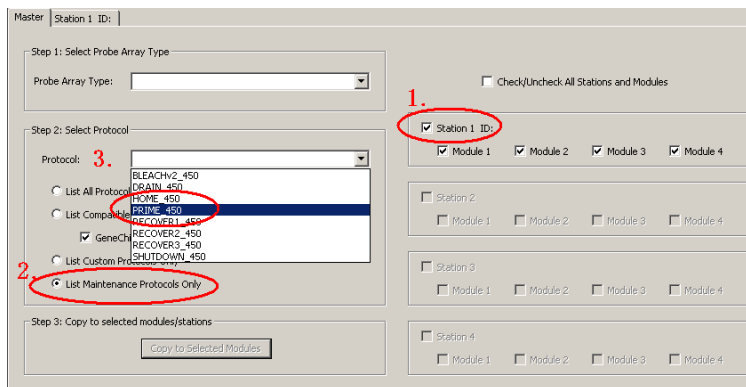
\*Fluidics Station を 2 回目に使用する場合は、Wash A 液 : 満タン、Wash B 液 : 150~200 mL を入れておく。

### 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) Ctrl+Alt+Del で画面を立ち上げる。
- 3) Password を入力して OK をクリックする（User ID は **gcsuser**）。
- 4) 電源を入れてから 10 分程経過後、スキャナーの左の黄緑色ランプのみ点灯してから、Launcher を起動する。  
（緑色と黄色が点灯している場合は準備中である）  
（または start → Affymetrix → Command Console → 各モジュールを起動させる。）
- 5) AGCC Fluidics control software を起動する。
- 6) 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。



- 7) WashA、WashB を所定のチューブにセットしておく。
- 8) 使用する Station または Module をチェックする。
- 9) List maintenance protocol only をチェックする。
- 10) Protocol 設定欄に Prime\_450 を設定する。

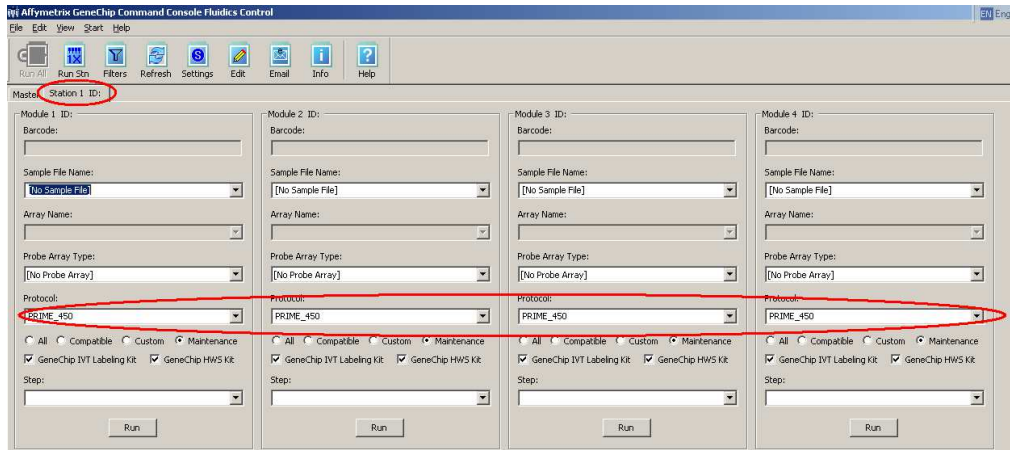


11) Copy to selected modules ボタンをクリックすると、各モジュールに Protocol の情報が送付される。

12) ツールバーの一番左の RunAll  をクリックすると Protocol が開始される。

13) 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。





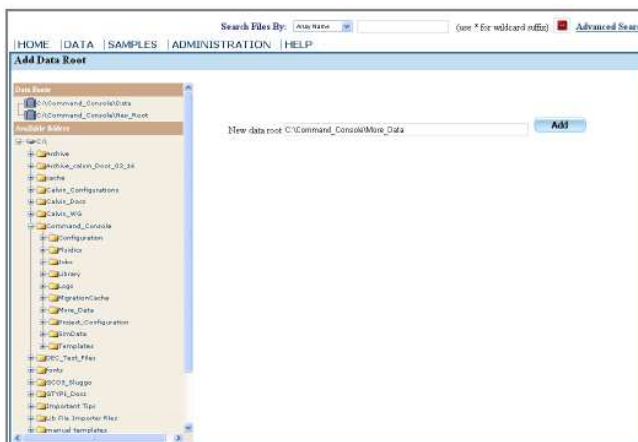
#### 4. サンプルの回収

- 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 Aを満タン (約260 μL) に充填する。

#### 5. データ保存場所の設定

- 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フォルダを作製する。
  2. Data Root に設定する。

AGCC Potal の機能 DATA → Data Roots → Add 画面で登録する。

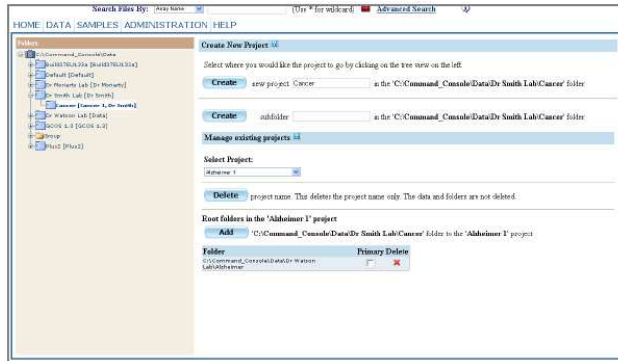


左側で選択したフォルダが  
右側の欄に設定されるので、  
Add ボタンをクリックする。

- 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。

1)AGCC Potal の機能 ADMINISTRATION → Manage 画面で登録する。



一番上が新規 Project の作成。  
左側で選択した Data Root に対して Project 名を設定して 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

1)SAMPLS→ Batch Reister

The Batch Sample Registration ページが開く。

2)使用したいテンプレートにチェックを入れる。

**Step 1: Create a blank batch registration file with the desired attributes**

Select the templates with the attributes you wish to use for the sample files. 

>  Default

>  MIAME Sample Information

>  Moriarty

Default
Gender
Age
Diagnosis Date
Diagnosis Code
Condition
Date of Death
Toxin Exposure

Select the file type:

- TSV (Tab-delimited text)
- Excel

For use with Excel or compatible application:

Create a spreadsheet for  samples

(optional)project set to

(optional)probe array type set to

and with template defaults. You can change the project and probe array type when editing the document.

**Download**

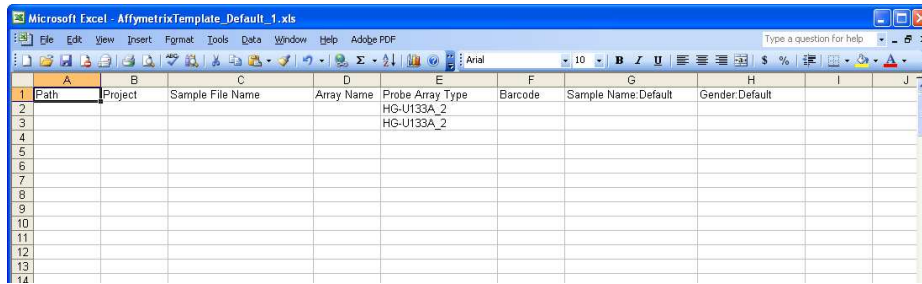
テンプレート名をクリックすることにより属性が表示される。

3)使用する **Template** と出力するファイル形式（タブ区切りか **Excel**）を選択する。  
データ入力用に項目名を設定しデータ部分が空のファイルを作成する。

4)登録データ数を設定し、オプションで **Project** と **Array Type** を設定する。

5)Download ボタンをクリックすると空のファイルが作成される。

6)データを入力する。



**Path** : Sampleファイルをプロジェクトフォルダーに置くのに使用。

**Project** : Sample(.ARR)ファイルが配属されるプロジェクト。(エクセルを使用している場合ドロップダウンリストから選択できる。)

**注意** : PathかProjectのどちらかをファイルに指定すること。

**File Name** : Sampleファイルのための固有の名前。

**Array Name** : アレイに割り当てられた名前。

**Probe Array Type** : プローブアレイのタイプ。

**Barcode** : アレイバーコード

**Attributes** : 結果を解釈するのに使用できるサンプルと実験に関する追加情報。

7)ボックスにファイルのパスと名前を入れる。または、Browseをクリックして、Choose Fileダイアログボックスを開く。

---

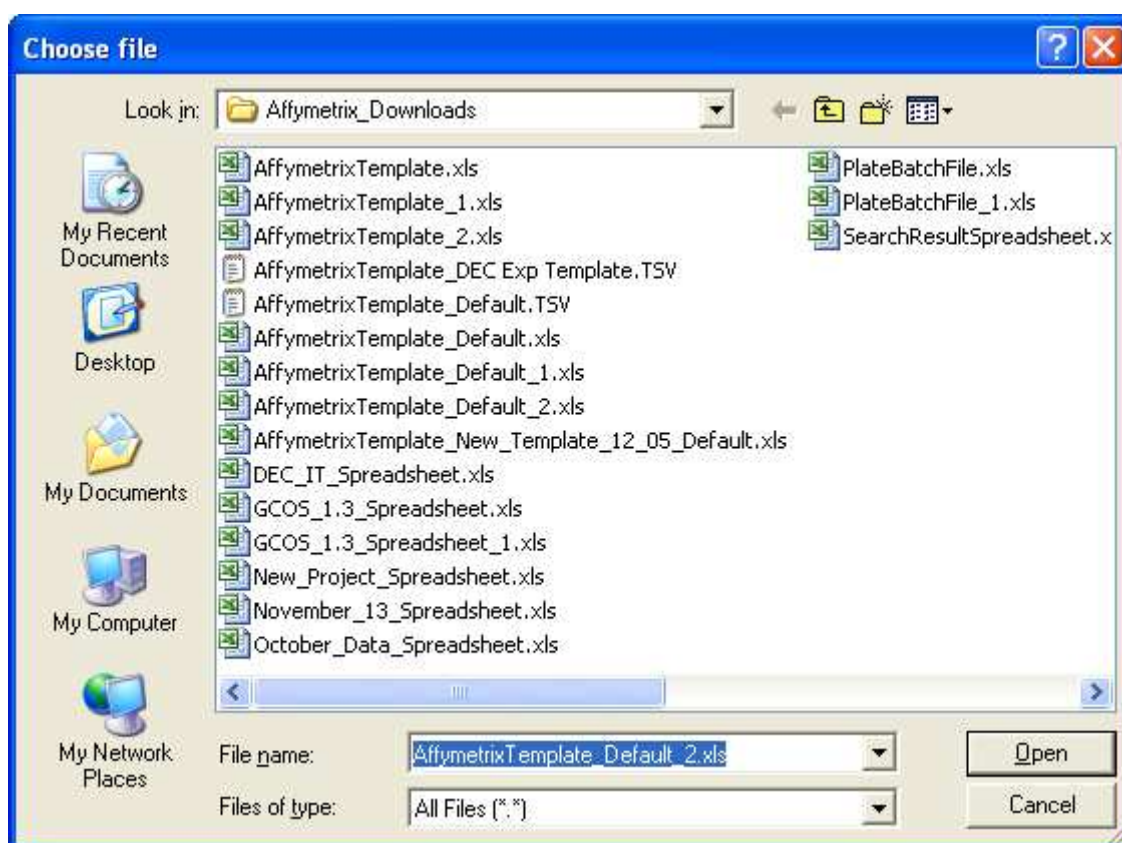
**Step 3: Upload the batch registration file to create new sample (.ARR) files.**

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.

ファイルを選択してオープンをクリック。



8) アップロードを押し、入力済みのファイルをアップロードする。

9) 確認画面が表示されるので内容を確認し next 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.

All sample data in this file contains errors.

Path	File Name	Array Names	Status
	Batch1	Batch1	There were no paths found for this project - New_Project3
	Batch2	Batch2	There were no paths found for this project - New_Project3
	Batch3	Batch3	There were no paths found for this project - New_Project3

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.

10)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.

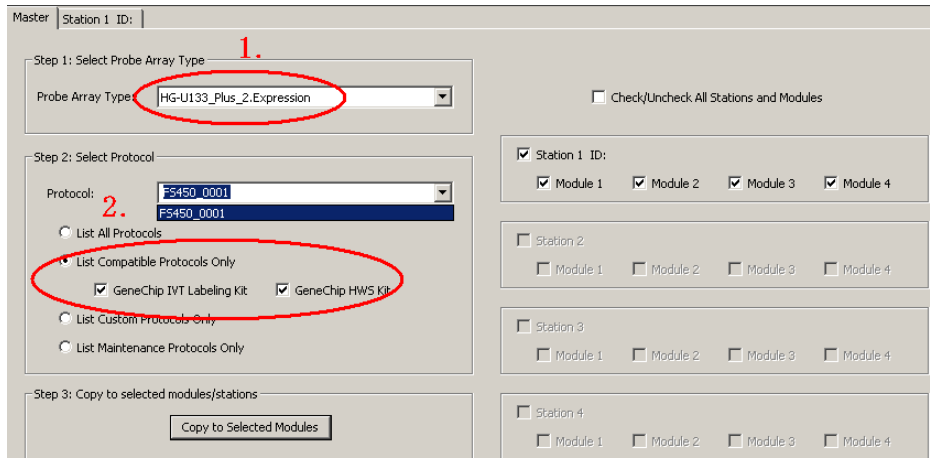
**Batch Array Registration is complete.**

Start Instrument Control Modules:

- Scan Control
- Fluidics Control

## 8. 洗浄・染色の実施

1. Master Control 画面を使用する場合。全部同じ種類のアレイで1つのプロトコルを使用する。

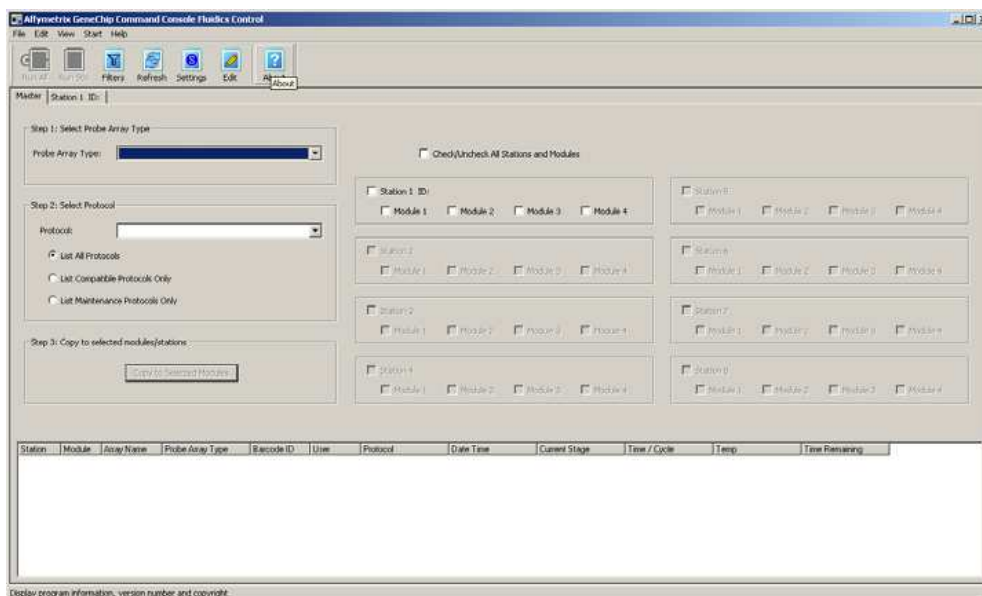


- 1) アレイのタイプを設定する
- 2) List Compatible Protocol Only を選択し、GeneChip の IVT Kit と HWS Kit の使用の有無を設定すると、リストにはそのアレイタイプと Kit 使用の組み合わせに適したプロトコルのみが表示される。
- 3) Protocol を設定したら、使用する Module を設定し、Copy to selected modules を実行する。
- 4) Station 毎の設定画面でも同様に Protocol のリスト表示にフィルタがかけられる。  
各モジュール毎に、アレイタイプかサンプルファイル名と Protocol を設定して Run を実行する。
- 5) 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)。
- 6) サンプルホルダー1 に 600  $\mu$ L の Stain Cocktail 1 を分注した 1.5mL チューブ (褐色) をセットする。サンプルホルダー2 に 600  $\mu$ L の Stain Cocktail 2 を分注した 1.5mL チューブをセットする。サンプルホルダー3 に 800  $\mu$ L の Array Holding Buffer を分注した 1.5mL チューブをセットする。
- 7) 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

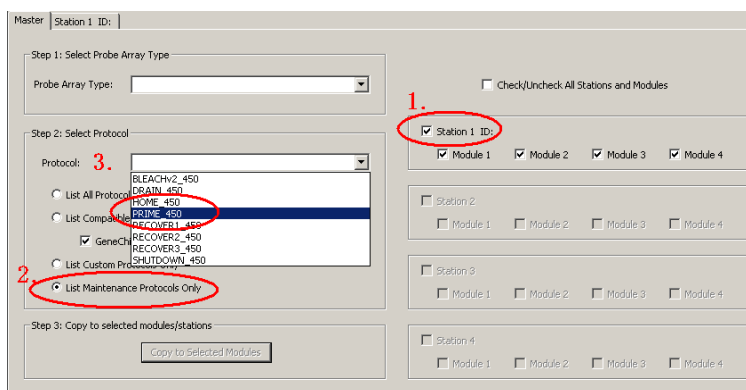
- 1) Wash A 及び Wash B のボトルをはずして、それぞれ、MilliQ 水の入った DI WATER のボトルを装着する。
- 2) Master Control 画面: 制御 PC に接続される全 Fluidics、全 Module の選択ができる。使用する Module ですべて同じ Type のアレイで同じ Protocol を実行する場合はこの画面で設定できる。



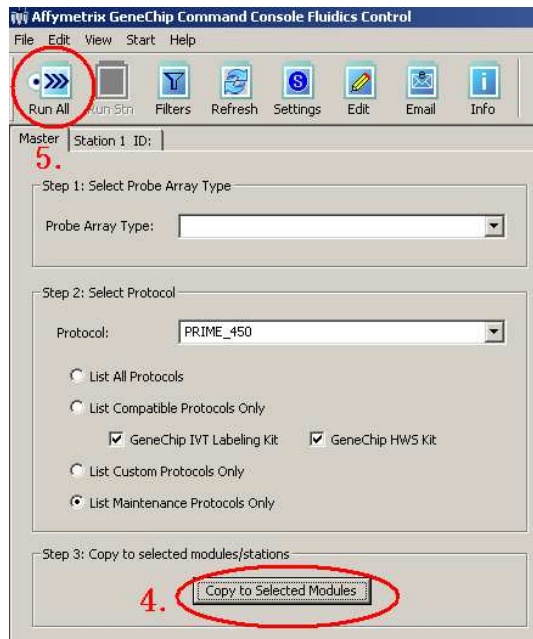
3)使用する Station または Module をチェックする。

4)List maintenance protocol only をチェック

5)Protocol 設定欄に **Shutdown** を設定する。



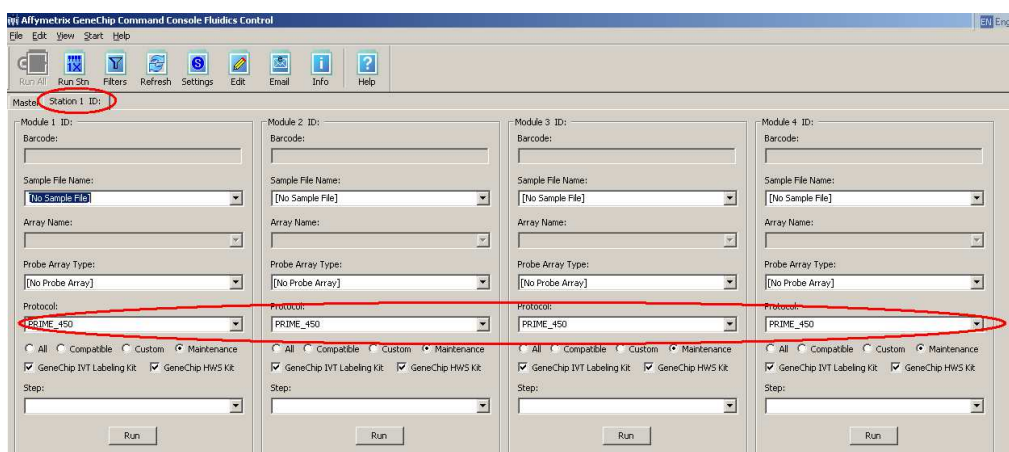




6) Copy to selected modules ボタンをクリックすると、各モジュールに Protocol の情報が送付される。

7) ツールバーの一番左の RunAll  をクリックすると Protocol が開始される。

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。



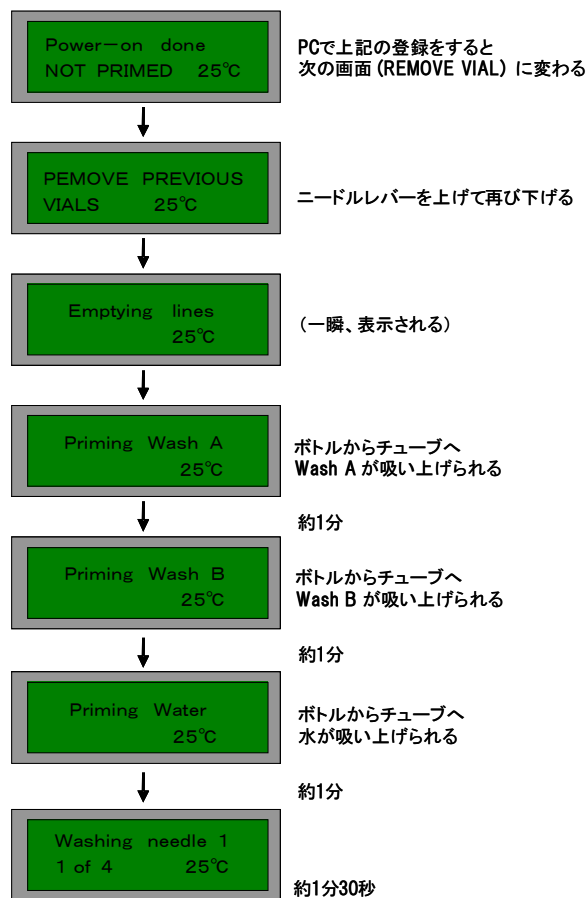
- 9) Fluidics Station の LCD 画面に “**REMOVE PREVIOUS VIAL**” と表示される。ニードルレバーを上げ、レバーを下げる。
- 10) Fluidics Station の LCD 画面に “**Shutdown done NOT PRIMED**” と表示される。  
Shutdown は終了である。
- 11) Fluidics Station の本体左下側面のスイッチを OFF にする。

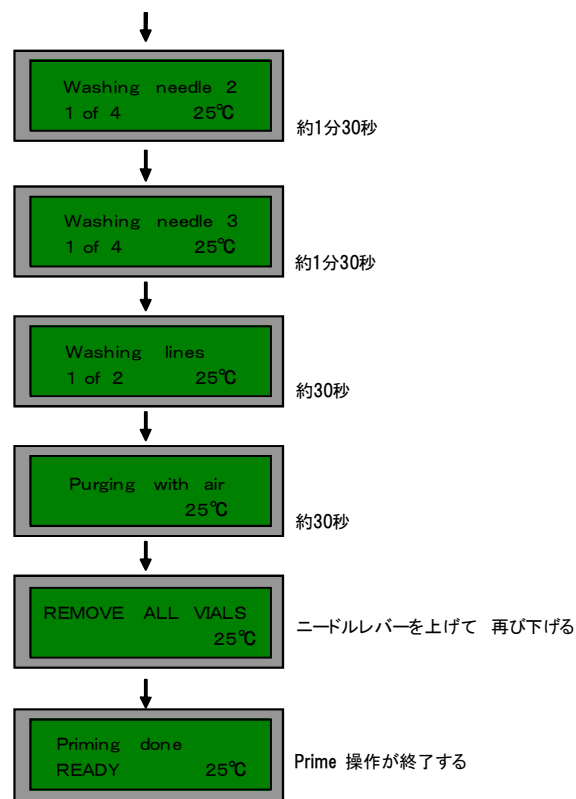
**Appendix** : Fluidic Station (Fluidic Station 450) の作業工程の流れ

1) Prime 操作

- (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。
- (2)List maintenance protocol only をチェック
- (3)Protocol 設定欄に Prime\_450 を設定する。
- (4)「**RUN ALL**」をクリックする。

**Fluidics Station の LCD画面**



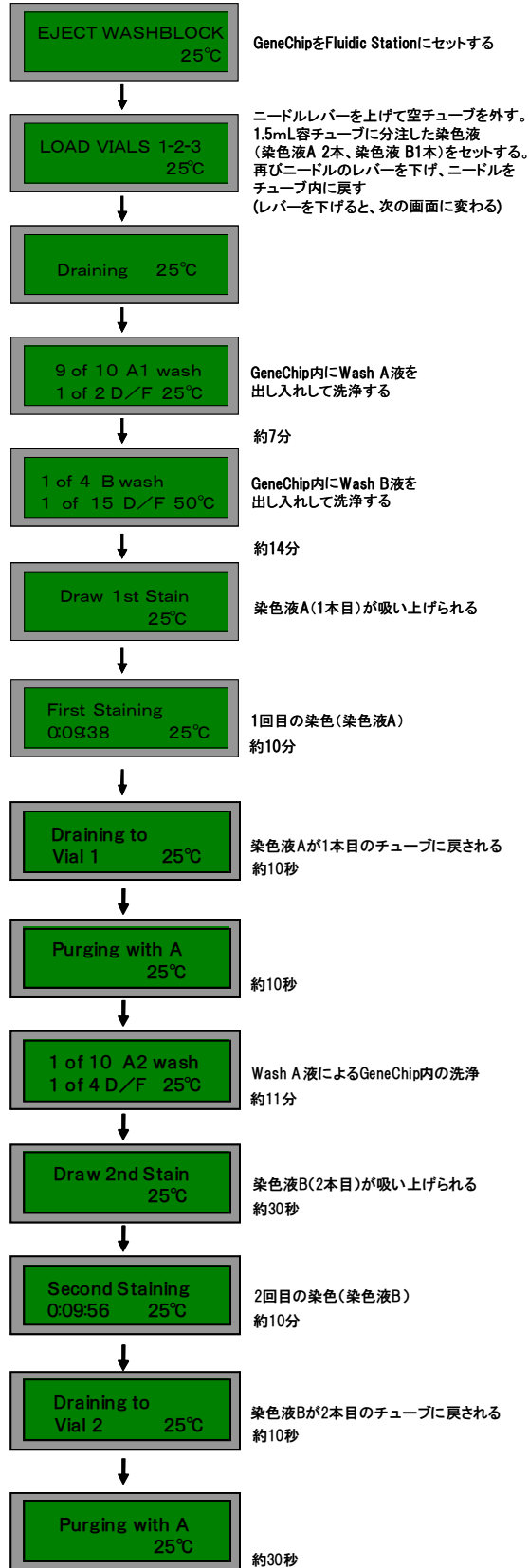


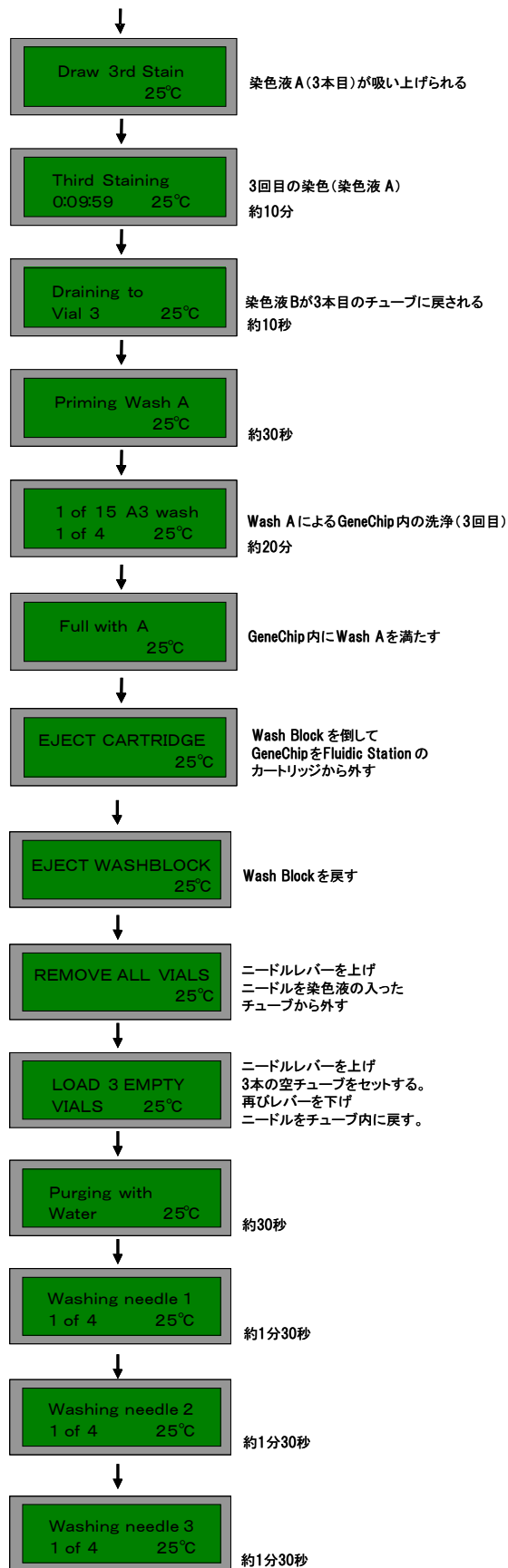
## 2) 洗浄・染色操作

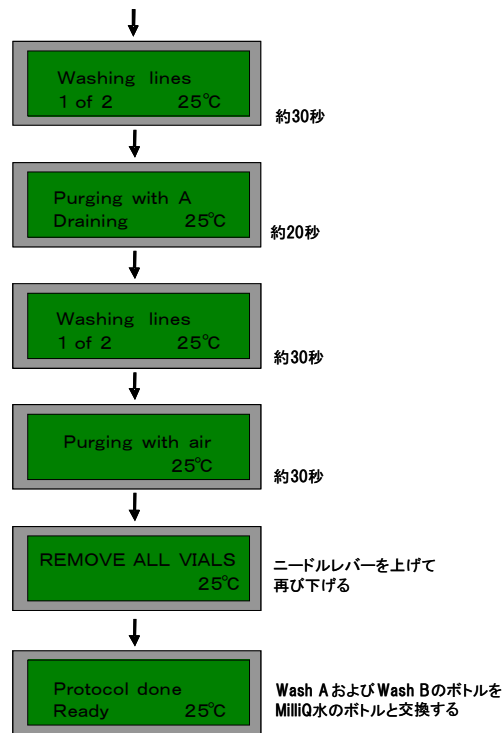
実験条件の入力を行う。

- (1) アレイのタイプを設定する
- (2) List Compatible Protocol Only を選択し、GeneChip の IVT Kit と HWS Kit の使用の有無を設定すると、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プロトコルのみが表示される。
- (3) Protocol を設定したら、使用する Module を設定し、Copy to selected modules を実行する。
- (4) 各モジュール毎に、アレイタイプかサンプルファイル名と Protocol を設定して Run を実行する。

Fluidics Station の LCD 画面





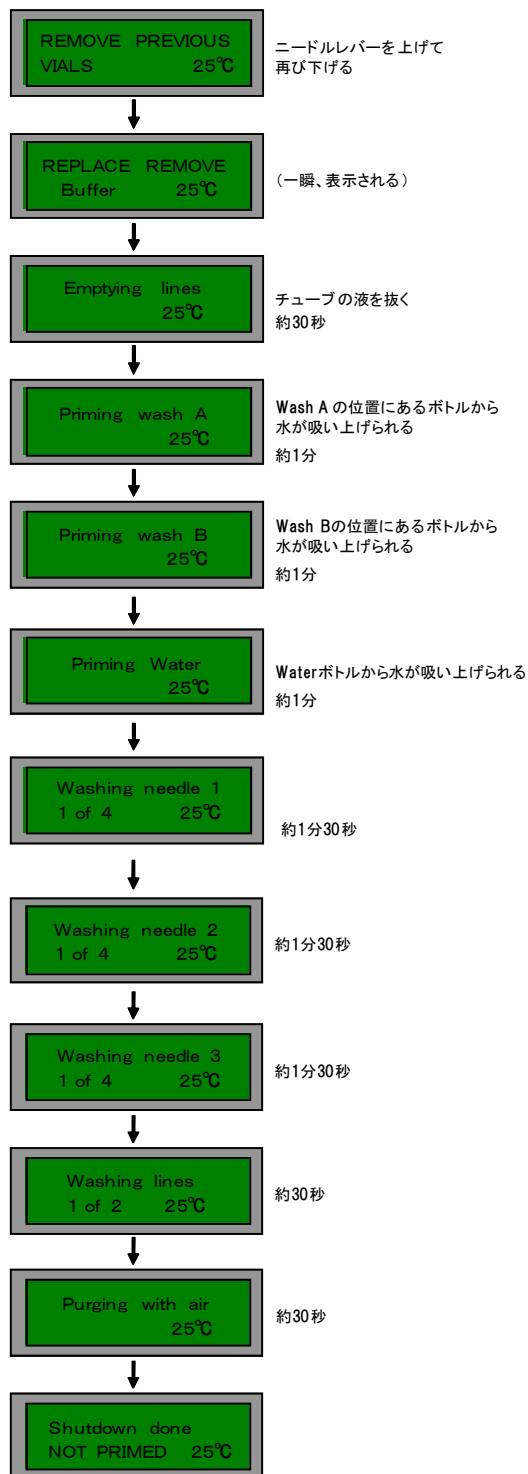


洗浄・染色操作が終了する。

### 3) ShutDown 操作

- (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
- (4) Protocol 設定欄に Shutdown を設定する。
- (5) 「**RUN ALL**」をクリックする。

### 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