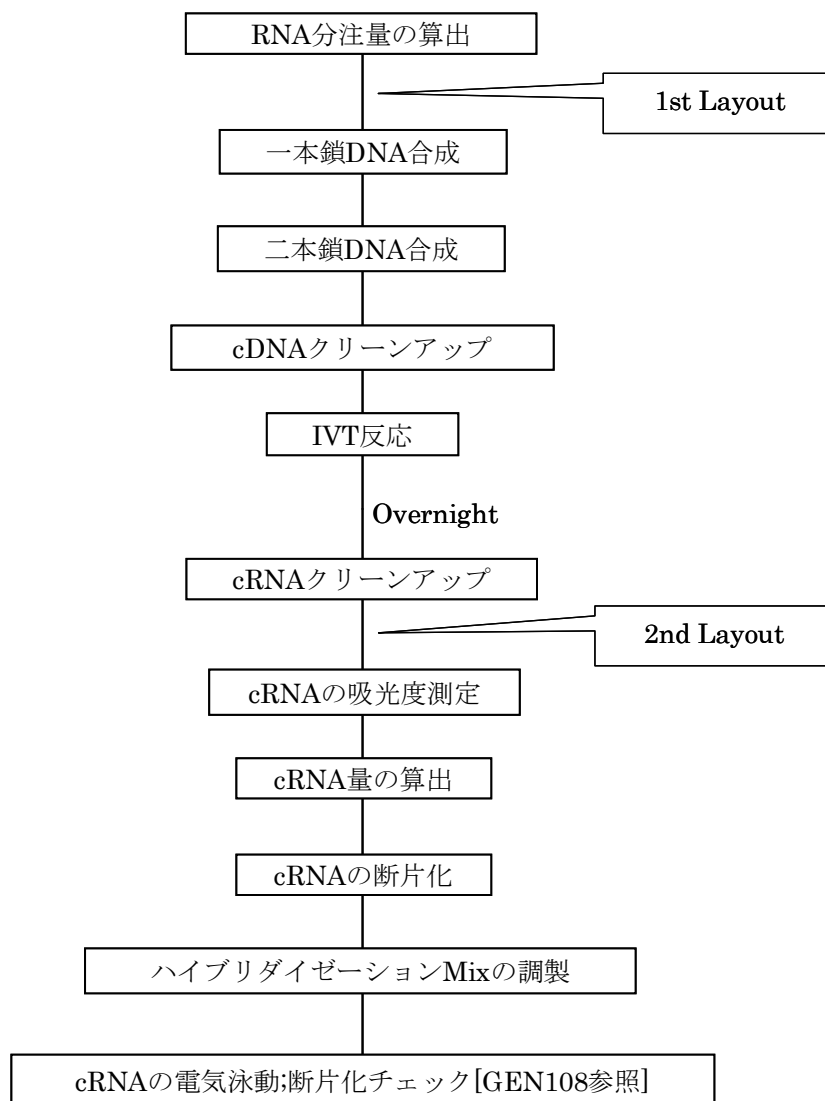


目 次

分 類	項 目	ページ
GEN115 Ver.4	作業手順の流れ図	1
	1.序	2
	2.試薬、器具及び機器	
	2-1.試薬	2-3
	2-2.器具	3-4
	2-3.機器	4
	3.試薬の調製	4-7
	4.操作手順	
	4-1.準備	8-11
	4-2.First Layout ランニング	11-14
	4-3.Second Layout ランニング	15-19
	4-4.終了	19
	5.Multiskan Spectrum による吸光度測定	20
6.電気泳動	20	
7.エラー発生時の対応	21	

作業手順



1. 序

本 SOP は、GeneChip Array Station (GCAS) を用いた cDNA 合成、IVT 反応、ハイブリダイゼーション Mix 調製の手順について記載したものである。

2. 試薬、機器、及び機器

2-1. 試薬

1) GeneChip HT One-Cycle cDNA Synthesis Kit(Affymetrix, cat.# 900687, -20℃保存)

【キットの構成成分】

- T7-Oligo(dT) Primer, 50 µM
- 5×1st Strand Reaction Mix
- DTT, 0.1 mM
- dNTP, 10 mM
- SuperScript II
- 5×2nd Strand Reaction Mix
- *E. coli* DNA Ligase
- *E. coli* DNA Polymerase I
- *E. coli* RNase H
- T4 DNA Polymerase
- 5×T4 DNA Polymerase Buffer

2) GeneChip HT IVT Labeling Kit(Affymetrix, cat.# 900688, -20℃保存)

【キットの構成成分】

- 10×IVT Labeling Buffer
- IVT Labeling Enzyme Mix
- IVT Labeling NTP Mix
- 3'-Labeling Control (0.5 µg/µL) TGP では使用しない。
- 5×Fragmentation Buffer

3) DEPC-Treated water (Ambion, cat.# 9920)

室温保存

使用期限：購入日から1年，開封後から3ヶ月

4) エタノール (和光純薬工業、cat.# 057-00456等、特級、規格:99.5%以上、室温保存)

使用期限：購入日から3年

5) RNA Clean (Agencourt、cat.#000494, 4℃保存)

- 6) GeneChip Eukaryotic Hybridization Control kit
(Affymetrix、cat.# 900547: 30反応分、400457: 150反応分、-20℃保存)
【キットの構成】
 - ・ 20× Eukaryotic Hybridization Control
 - ・ Control Oligonucleotide B2
- 7) MES-free acid monohydrate (Sigma、cat.# M5287、250g、室温保存)
使用期限：購入日から3年以内
- 8) MES Sodium Salt (Sigma、cat.# M5057、100g、室温保存)
使用期限：購入日から3年以内
- 9) 5 M NaCl (Ambion、cat.# 9760、100 mL、室温保存)
使用期限：購入日から1年以内、開封後6ヶ月
- 10) 0.5 M EDTA (Sigma、cat.# E7889、100 mL、室温保存)
使用期限：購入日から1年以内、開封後から6ヶ月
- 11) 10% Tween20 (Surfact-Amps 20: PIERCE cat.# 9005-64-5、10 mLアンプル6本/箱、室温保存)
アンプルを開封した後は、15 mL 容チューブ等に移し、アンプルに貼付されていたラベルを剥がしてチューブに貼る。なお、開封日も記入すること。
使用期限：購入日から1年、開封後6ヶ月
- 12) 10 mg/mL Herring Sperm DNA (promega, cat.# D181A)
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
- 13) 50 mg/mL Bovine Serum Albumin
(Invitrogen、cat.# 15561-020、3 mL (1 mL×3本))
使用期限：-20℃保存の場合・・・購入日から1年以内
4℃保存の場合・・・凍結融解日から1ヶ月

2-2.器具

- 1) Stacker tips 200 μ L non-sterile (Caliper、78641)
- 2) Low-Profile 0.2 mL PCR -tube Strips (Bio-Rad、TLS-0801)
- 3) Elution Strip Tubes、0.85 mL (QIAGEN、19588)
- 4) 96 Well Reservoir、High Profile 300 mL (E&K Scientific、S30014)
- 5) 1.2 mL Square Well storage Plate、Low Profile (ABGene、AB-1127)
- 6) Greiner round bottom clear polypropylene plate (Greiner、650261)
- 7) Corning Polystyrene Round Bottom Plates (Fisher Scientific、CLS3795)
- 8) 96-Well Hard-Shell PCR Plate (Bio-Rad、HSP-9601)

- 9) DNase-RNase Free 1.5 mL 容マイクロチューブ (ビーエム機器、BM-15)
- 10) Tip Rack Spacer Plates
- 11) 96 ウェル UV 透過性プレート ([greiner bio-one](#), 655801)
- 12) ボトルトップフィルター(IWAKI, cat.# 8930 001/8024 045 等)
- 13) ストレージボトル(IWAKI, cat.# 8930 001 等)

2-3.機器

- 1) Zerostat ainti-Static Gun (MILTY、Zerostat)
- 2) Multiskan Spectrum(Themo Labystems)
- 3) テーブルトップ多本架冷却遠心機 (QIAGEN(Sigma)、4K15C)

3. 試薬の調製

各 Master Mix は、反応サンプル数により分量が異なる。GeneChip Expression Analysis Technical Manual の Appendix A を参照のこと。

1) T7 Primer Master Mix

下表に従い、1.5 mL 容チューブに調製後、Bio-Rad Low-Profile PCR Tube Strip に分注する。分注時、ウェルの底に気泡が入らないように注意する。気泡が入った場合はピペティングで除去する。各試薬は融解後、タッピング及びスピンドウンした後使用すること。

セッティングするまで氷冷下で保存する。

試薬	1 反応分	24 反応分	48 反応分
T7-Oligo(dT)Primer, 50 μM	1.0 μL	32.0 μL	57.0 μL
Nuclease-free Water	4.0 μL	127.9 μL	228.0 μL
合計	5.0 μL	159.9 μL	285.0 μL
Strip well あたりの分注量	—	18.5 μL	34.0 μL

2) 一本鎖 DNA 合成 Master Mix

下表に従い、1.5 mL 容チューブに調製後、Bio-Rad Low-Profile PCR Tube Strip に分注する。分注時、ウェルの底に気泡が入らないように注意する。気泡が入った場合はピペティングで除去する。各試薬は融解後、タッピング及びスピンドウンした後使用すること。

セッティングするまで氷冷下で保存する。

試薬	1 反応分	24 反応分	48 反応分
5×First Strand Reaction Mix	4.0 μL	114.0 μL	228.0 μL
DTT, 0.1 M	2.0 μL	57.0 μL	114.0 μL
dNTP Mix, 10 mM	1.0 μL	28.5 μL	57.0 μL
SuperScript™ II	1.0 μL	28.5 μL	57.0 μL
Nuclease-free Water	2.0 μL	57.0 μL	114.0 μL
合計	10.0 μL	285.0 μL	570.0 μL
Strip well あたりの分注量	—	33.5 μL	69.3 μL

3) 二本鎖 DNA 合成 Master Mix

下表に従い、5 mL 容チューブもしくは 1.5 mL 容チューブ（合計容量による）に調製後、0.85 mL QIAGEN Elution Strip Tube に分注する。分注時、ウェルの底に気泡が入らないように注意する。気泡が入った場合はピペティングで除去する。各試薬は融解後、タッピング及びスピンドウンした後使用すること。セッティングするまで氷冷下で保存する。

試薬	1 反応分	24 反応分	48 反応分
5×Second Strand Buffer	30.0 μL	810.0 μL	1620.0 μL
10mM dNTP Mix	3.0 μL	81.0 μL	162.0 μL
<i>E.coli.</i> DNA Ligase	1.0 μL	27.0 μL	54.0 μL
<i>E.coli.</i> DNA Polymerase I	4.0 μL	108.0 μL	216.0 μL
<i>E.coli.</i> DNA RNase H	1.0 μL	27.0 μL	54.0 μL
合計	39.0 μL	1053.0 μL	2106.0 μL
Strip well あたりの分注量	—	129.0 μL	260.0 μL

4) T4 DNA Polymerase Master Mix

GeneChip HT One-Cycle cDNA Synthesis Kit に含まれる T4 DNA Polymerase buffer は 5×であるため、RNase-free Water を用いて 1×の濃度に希釈する。（用時調製する）。

下表に従い、1.5 mL 容チューブに調製後、Bio-Rad Low-Profile PCR Tube Strip に分注する。分注時、ウェルの底に気泡が入らないように注意する。気泡が入った場合はピペティングで除去する。各試薬は融解後、タッピング及びスピンドウンした後使用すること。セッティングするまで氷冷下で保存する。

試薬	1 反応分	24 反応分	48 反応分
T4 DNA Polymerase	2.0 μL	69.3 μL	118.0 μL
1×T4 DNA Polymerase buffer	2.0 μL	69.3 μL	118.0 μL
合計	4.0 μL	138.6 μL	236.0 μL
Strip well あたりの分注量	—	16.0 μL	27.8 μL

5) IVT Master Mix

下表に従い、5 mL 容チューブもしくは 1.5 mL 容チューブ（合計容量による）に調製後、0.85 mL QIAGEN Elution Strip Tube に分注する。分注時、ウェルの底に気泡が入らないように注意する。気泡が入った場合はピペッティングで除去する。各試薬は融解後、タッピング及びスピンドウンした後使用すること。セッティングするまで氷冷下で保存する。

試薬	1 反応分	24 反応分	48 反応分
10×IVT Buffer	6.0 μL	168.0 μL	336.0 μL
IVT Labeling NTP Mix	18.0 μL	504.0 μL	1008.0 μL
IVT Labeling Enzyme Mix	6.0 μL	168.0 μL	336.0 μL
T7 RNA Polymerase	1.0 μL	28.0 μL	56.0 μL
Nuclease-free Water	7.0 μL	196.0 μL	392.0 μL
合計	38.0 μL	1064.0 μL	2128.0 μL
Strip well あたりの分注量	—	131.0 μL	264.0 μL

6) Fragmentation Buffer

5×Fragmentation Buffer を融解後、タッピング及びスピンドウンし Bio-Rad Low-Profile PCR Tube Strip に分注する。分注時、ウェルの底に気泡が入らないように注意する。気泡が入った場合はピペッティングで除去する。セッティングするまで氷冷下で保存する。

試薬	1 反応分	24 反応分	48 反応分
5×Fragmentation Buffer (Strip well あたりの分注量)	7.5 μL	26.7 μL	53.4 μL

7) 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
ミリ Q	800 mL + α
	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、1 L 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）オートクレーブ厳禁。溶液が黄色がかったら、捨てること。

8) 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
5M NaCl	17.7 mL
0.5M EDTA	4.0 mL
10%Tween	200.1 mL
DEPC-Treated water	19.9 mL
	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。

9) Hybridization Master Mix

下表に従い、50 mL 容チューブに調製後、0.85 ml QIAGEN Elution Strip Tube に分注する。分注時、ウェルの底に気泡が入らないように注意する。気泡が入った場合はピペティングで除去する。各試薬は融解後、タッピング及びスピンドウンした後使用すること。

セッティングするまで氷冷下で保存する。

試薬	1 反応分	24 反応分	48 反応分
3 nM B2 Oligo	4.95 µL	133.7 µL	267.3 µL
20×BioB,C,D,Cre (controlos)	15.0 µL	405.0 µL	810.0 µL
HS DNA (10 mg/ml)	3.0 µL	81.0 µL	162.0 µL
Acetylated BSA (50 mg/mL)	3.0 µL	81.0 µL	162.0 µL
2×Hybridization Buffer	150.0 µL	4050.0 µL	8100.0 µL
DMSO (100%)	30.0 µL	810.0 µL	1620.0 µL
Nuclease-free Water	64.05 µL	1729.4 µL	3458.7 µL
合計	270.0 µL	7290.1 µL	14580.0 µL
ストリップ数	—	2	3
Strip well への分注量(1本目)	—	600 µL	600 µL
Strip well への分注量(2本目)	—	300 µL	600 µL
Strip well への分注量(3本目)	—	—	600 µL

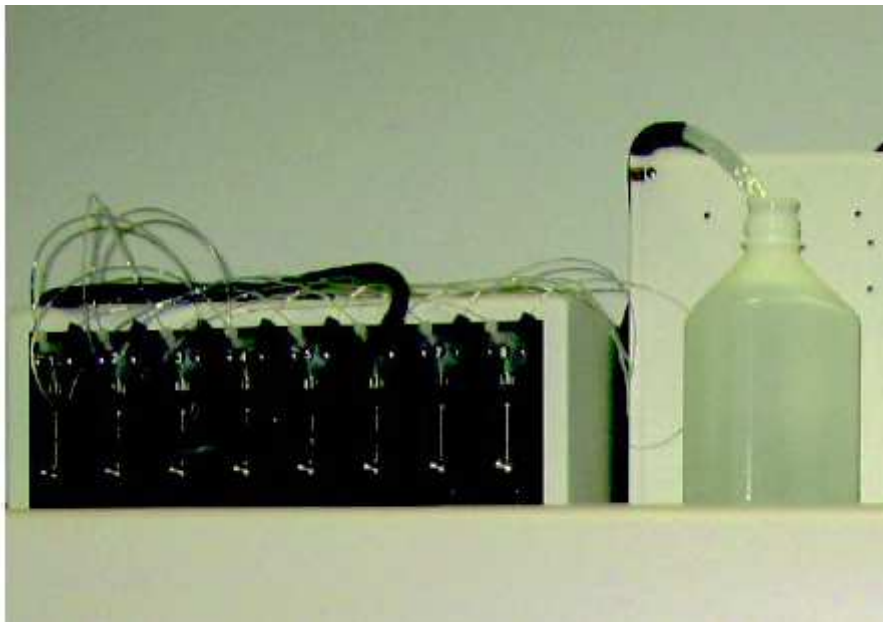
10) 脱気水

ストレージボトルにスターラーバーを入れる。MilliQ 水 1 L をパラフィルムを巻いて密閉したボトルトップフィルターを用いてろ過し、スターラーで攪拌しながら気泡がほぼ無くなるまで吸引・脱気する。

4. 操作手順

4.1 準備

- 1) あらかじめ脱気水を 500 mL 程度用意し、GCAS 上部のタンクへ満たしておく。



また、Waste タンクが空であることを確認し、床に設置する。



- 2) 試薬及びサンプルをアプライするチューブ、プレート類を氷上もしくは4℃冷蔵庫において冷やしておく。
- 3) GCAS 側部メインスイッチを ON にする。
- 4) エアーコンプレッサーの電源を入れる。
- 5) GCAS のスイッチを入れて 10 分以上経過してから、PC の電源を入れる（GCAS のスイッチを入れた直後では、接続が不安定になるため）
- 6) Watlow Temperature Controller の温度設定を確認する。
- 7) PC にログインする。

User name: administrator

Password: caliperls

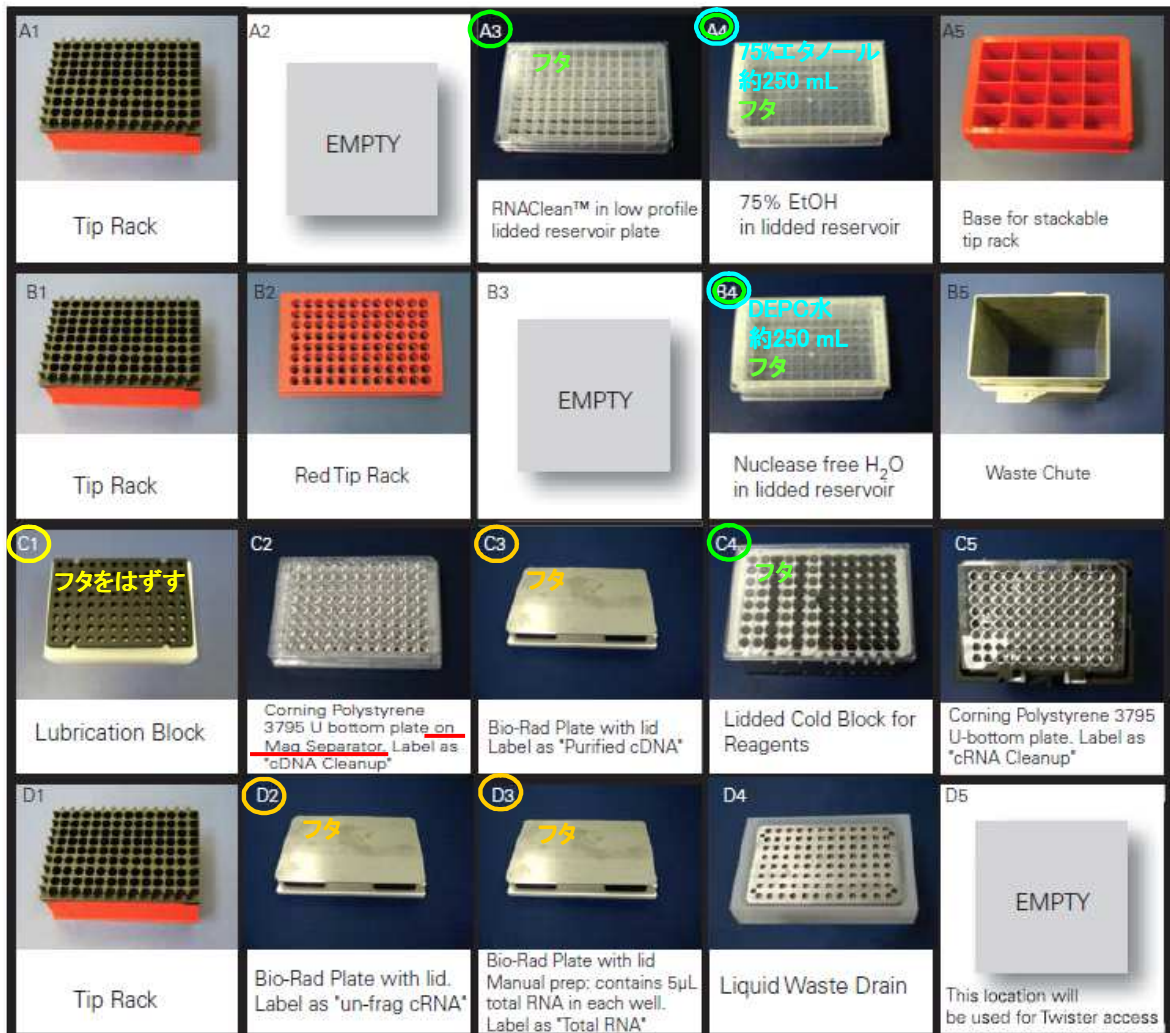
- 8) 必要なチップボックスの数を算出し、Rack1 へセットする。

反応サンプル数	8	16	24	48	72	96
必要なチップボックス数	2	4	6	11	16	21

この時金属製スペーサーあるいは静電気除去銃を使用し静電気の発生を防ぎながら積み重ねる。通常は静電気除去銃を使用する。また Rack2 が空になっている事を確認する。



9) Reference Card を参照しながらプレートデッキにセットする (First Layout)。プレートは手前左に寄せてセットする。



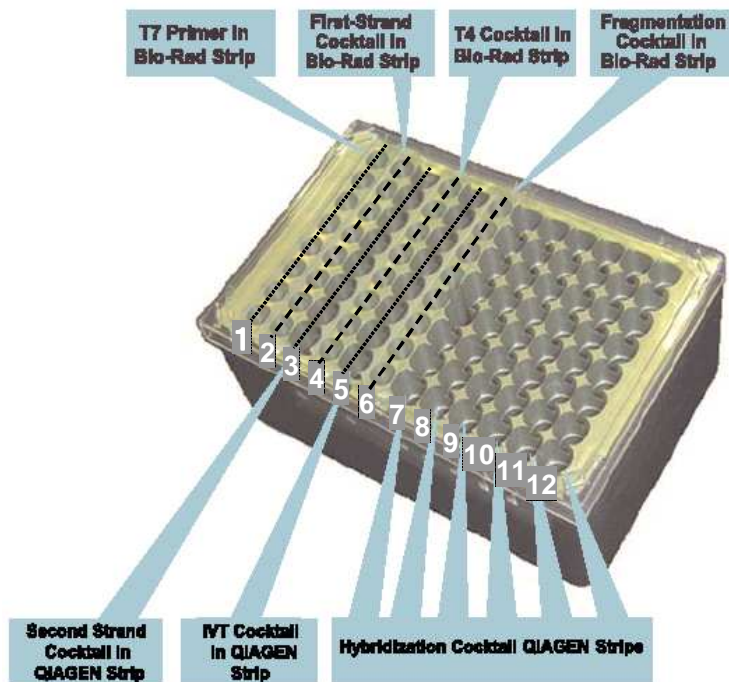
位置 A4 セットリザーバーへ 75%エタノールを約 250 mL、位置 B4 セットリザーバーへ DEPC-Treated water を約 250 mL 注ぎ入れる。

使用するスチール製のフタとプラスチック製のフタを RNase AWAY および消毒用 EtOH で拭き、位置 A3, A4, B4, C4 のプレートへプラスチック製のフタを、位置 C3, D2, D3 のプレートへスチール製のフタをする。

位置 C1 の Lubrication Block のフタをはずす。

位置 C2 のプレートの下に Magnetic Separator を置く。

11) コールドブロックが冷却されていることを確認し、必要な試薬をセットする。



位置は左から順に

- | | |
|------------------------------|-----------------|
| 1. T7Primer | (Bio-Rad Strip) |
| 2. First-Strand Cocktail | (Bio-Rad Strip) |
| 3. Second Strand Cocktail | (QIAGEN Strip) |
| 4. T4 Cocktail | (Bio-Rad Strip) |
| 5. IVT Cocktail | (QIAGEN Strip) |
| 6. Fragmentation Cocktail | (Bio-Rad Strip) |
| 7~12. Hybridization Cocktail | (QIAGEN Strip) |

4.2 First Layout ランニング (cDNA 合成～cRNA クリーンアップ)

1) GeneChip Array Station アイコンをダブルクリックし、ソフトを立ち上げ、ソフトにログインする。

User name: Operator

Password: Password

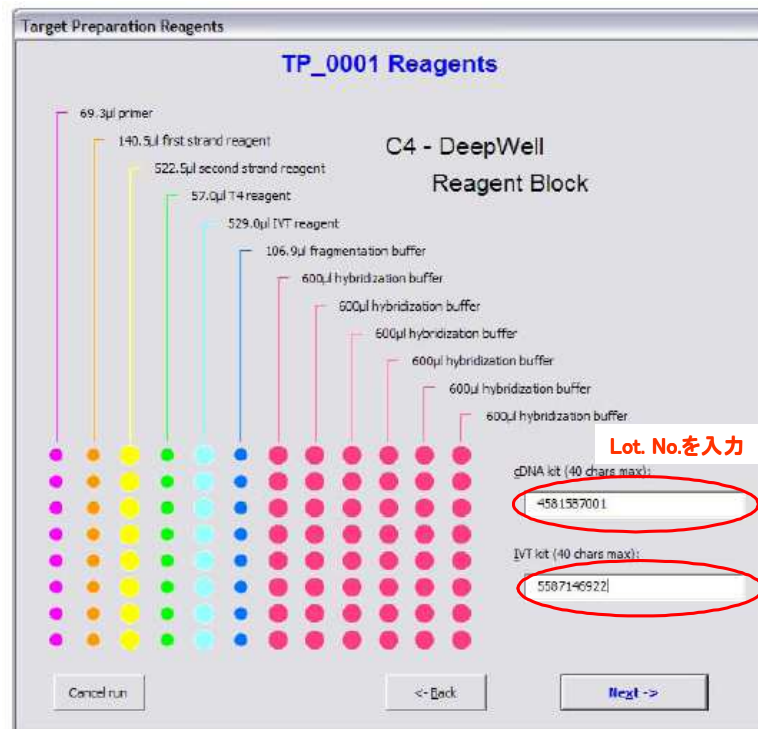
2) プログラム選択、「File-Open」から「TP_0001」を選択し「Open」をクリックする。

3) Go ボタン  をクリックする。

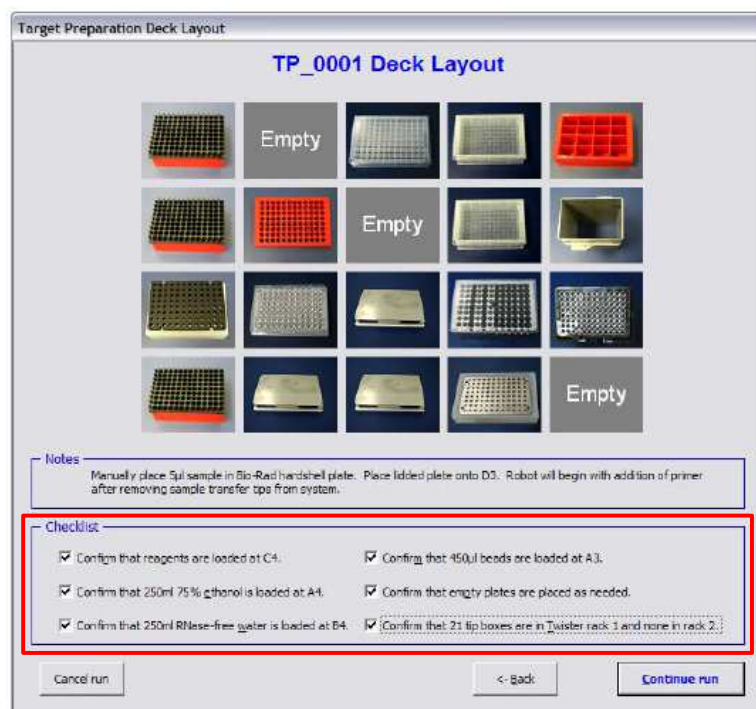
- 4) 新規ポップアップウインドウ「**Target Preparation Setup**」>「**TP_0001 Setup**」より設定を行う。

- A. 「**User Name**」からユーザー名「**Array Station User**」を選択。
- B. 「**Number of Samples**」から使用するサンプル数を選択。
- C. 「**IVT Incubation time**」から IVT インキュベーション時間「**16**」を選択。
- D. 「**Target for**」から最終的なハイブリ液量「**300 µL-One cartridge**」を選択。
- E. 「**Tracking identifier**」に Working No.を入力する。
例) Working ID ; 00789 の場合、「W00789」
- F. 対応するオプションにチェックする。通常は使用しない。
a) プレーットのバーコード読み取り。
b) 出発の Total RNA 5 µL の分注を行う。
c) IVT 後のサンプルを cRNA 精製までサーマルサイクラーで 4 °C 保存。
d) Rack.1 へチップを重ねる際に金属製セパレートプレートを使用。
- G. 「**Notification setting**」から E-mail で進行状況を通知できる。通知したい項目や E-mail アドレスを入力する。通常は使用しない。
- H. テストラン用。通常は使用しない。
- 「**Next - >**」をクリックする。

- 5) 「TP_0001 Reagents」より試薬液量を確認し、「cDNA kit」および「IVT kit」にそれぞれの Lot. No.を入力する。「Next ->」をクリックする。



- 6) 「TP_0001 Deck Layout」よりセットした内容を確認し、Check list にチェックを全て入れる。「Continue run」をクリックする。



7) 以下のステップが始まる。

- ① T7 プライマーのアニーリング
- ② ss cDNA 合成
- ③ ds cDNA 合成
- ④ T4 polymerase 反応
- ⑤ cDNA クリーンアップ
- ⑥ IVT 反応 (overnight)
- ⑦ cRNA クリーンアップ

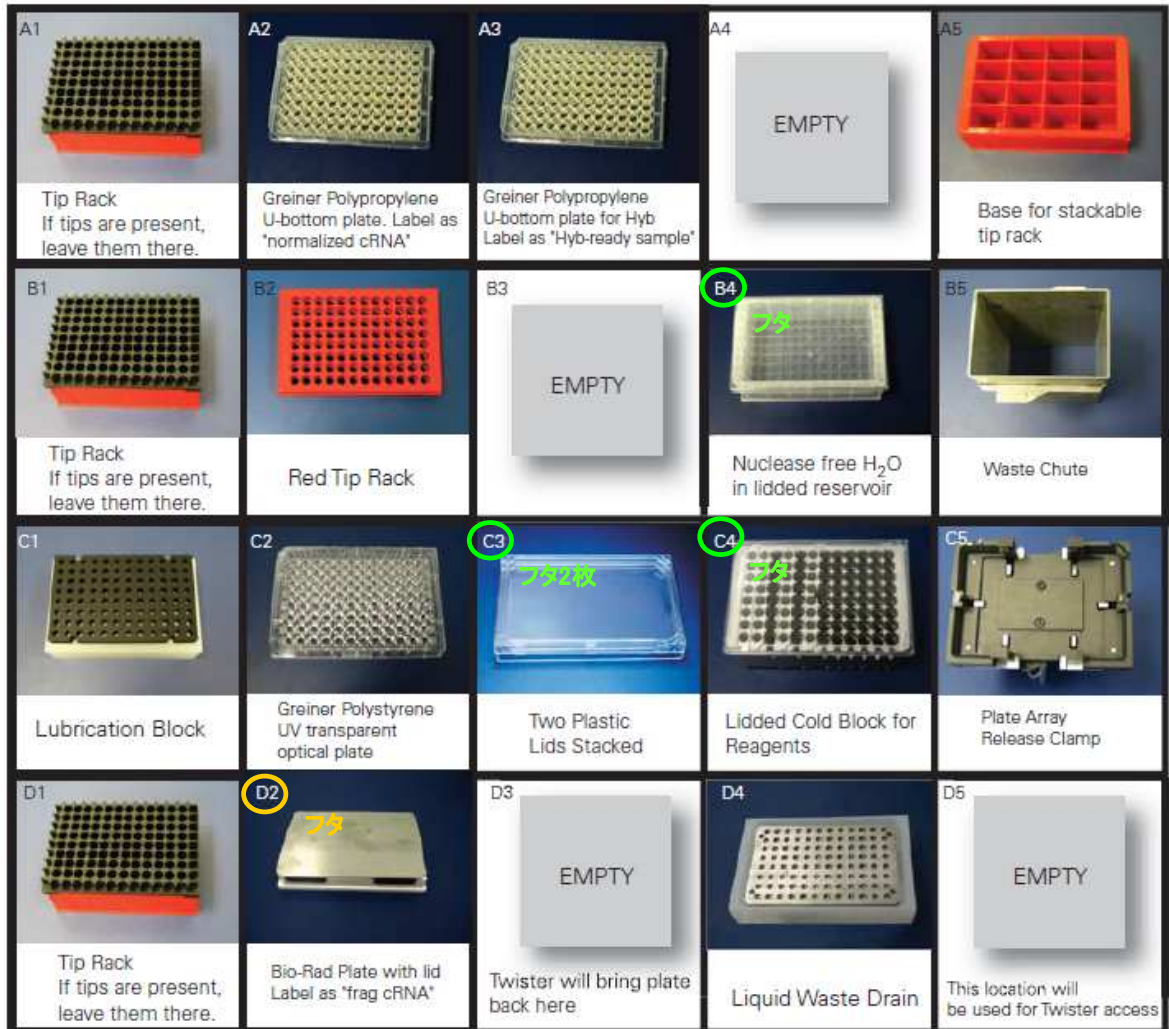
4)でcにチェックを入れてあると、⑥の終了後に以下のメッセージが出る。

「OK」をクリックし、⑦を進める。



4.3 Second Layout ランニング (cRNA 濃度測定～ハイブリミックス調製)

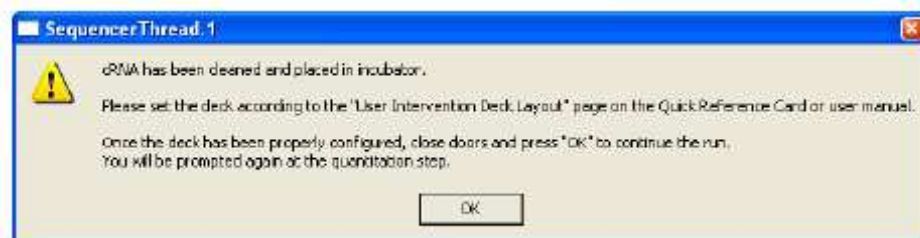
1) First Layout のステップをすべて終了後 (cRNA 精製終了後)、User Message に従い Reference Card を参照しながらプレートをデッキにセットする。



使用するスチール製のフタとプラスチック製のフタを RNase away および消毒用 EtOH で拭き、位置 C3 へプラスチック製のフタ 2 枚を置き、位置 D2 へスチール製のフタをする。

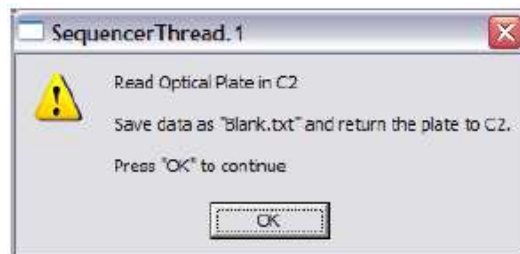
位置 C2 へは Magnetic Separator を除いて、96 ウェル UV 透過性プレート (greiner bio-one) を置く。

2) 下記の新規ポップアップウィンドウで「OK」をクリックし、Second Layout ステップを開始する。



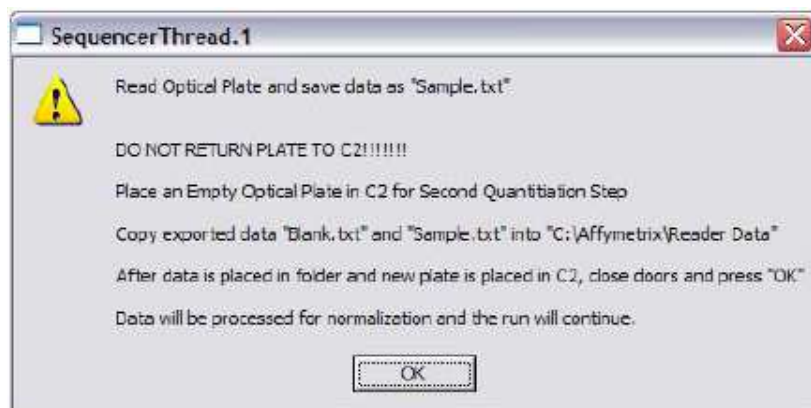
3) 1回目空白データ測定

C2のプレートに Blank (DEPC-Treated water) が分注され、測定をするようにとのメッセージが表示される。プレートを外して測定を行う。測定法については次項「5. Multiskan Spectrum による吸光度測定」に従う。空白測定後、プレートを C2 へ戻し、OK ボタンを押す。



4) 1回目サンプルデータ測定

プレートにサンプルが分注され、再び測定を指示するメッセージが新規ポップアップウィンドウで表示される。プレートを外し、次項 5 を参照して測定を行う。測定後、プレートは C2 へ戻してはならない。



5) 1回目空白データおよび1回目サンプルデータのインポート

ファイルサーバーに接続可能な PC 上で、保存した Blank データテキストファイル及び「conversion-template.xls」を開く。測定値を conversion-template.xls 上の該当する箇所へコピー&ペーストを行う。貼り付けを行った conversion-template.xls を「Blank.txt」と名前を付けて、tab delimited text file として、デスクトップなどに一時保存する。Sample データテキストファイルも同様に conversion-template.xls へ貼り付け、「Sample.txt」と名前を付けて一時保存する。USB メモリなどのメディアを使用して、「Blank.txt」と「Sample.txt」を、GCAS 操作用 PC の「C:\Affymetrix\Reader Data」へ保存する。

6) ダイアログの指示に従い、C2 の位置に新しい 96-Well Plate をセットし “OK” をクリックする。

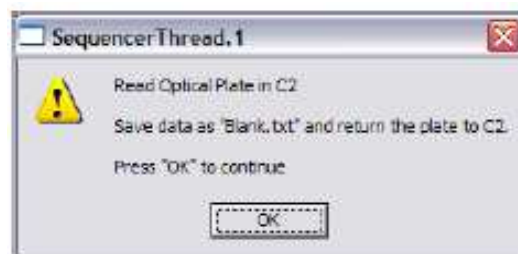
- 7) 測定した濃度に基づき Sample のノーマライゼーションが行われ、収量が表示される。 “Resume Run” をクリックする。

A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12	32.0
32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0
B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12	32.0
32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0
C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12	32.0
32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0
D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12	32.0
32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0
E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12	32.0
32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0
F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12	32.0
32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0
G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12	32.0
32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0
H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12	32.0
32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0

Lower Limit 25.000000 Upper Limit 250.000000 Resume Run

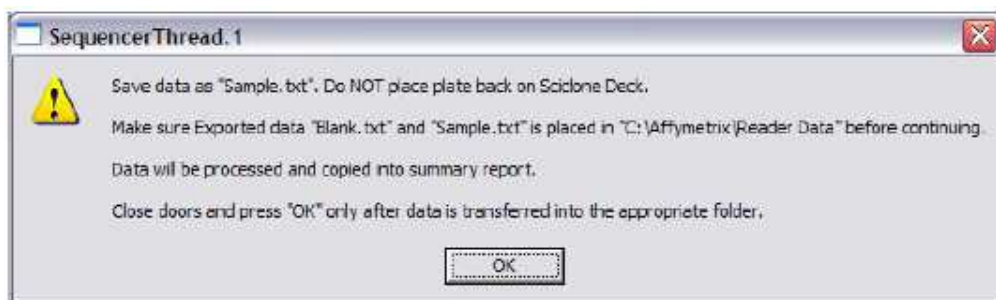
8) 2 回目ブランクデータ測定

再び C2 のプレートに Blank (DEPC-Treated water) が分注され、測定をするよ
うにとのメッセージが表示される。プレートを外し、次項 5 を参照して測定を行
う。ブランク測定後、プレートを C2 へ戻し、OK ボタンを押す。



9) 2 回目サンプルデータ測定

プレートにノーマライゼーションを行ったサンプルが分注され、再び測定を指示
するメッセージが新規ポップアップウィンドウで表示される。プレートを外し、
次項 5 を参照して測定を行う。測定後、プレートは C2 へ戻してはならない。



10) 2回目ブランクデータおよび2回目サンプルデータのインポート

GCAS 操作 PC 上で、保存したデータファイル及び「conversion-template.xls」を開き、5)と同様に、測定値を該当する個所へコピー&ペーストを行う。貼り付けを行ったファイルを Blank.txt および Sample.txt という名前を付けて、tab drive text file として“C:/Affymetrix/Reader Data”へ保存する。

11) OK をクリックする。

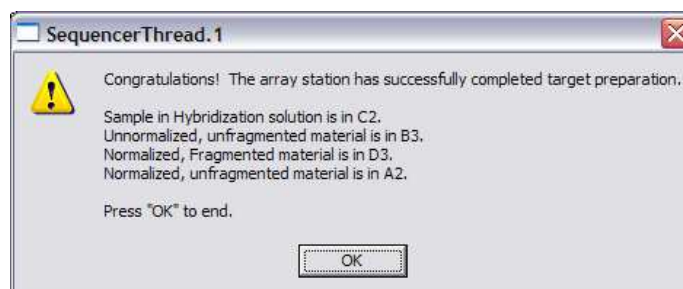
12) ノーマライゼーション後の収量が表示される。“Resume Run” をクリックする。



13) 断片化及び hybridization cocktail の分注

ノーマライゼーションを行った Sample は断片化及び、ハイブリカクテルの分注が行われ、ハイブリダイゼーションへ供する事ができる段階までの処理が行われる。

14) 全ての工程を終了後、その旨を告げるメッセージが表示される。OK をクリックする。



最終的なサンプル配置は以下の通り。

- C2 : hybridization cocktail を加えた Sample (マイナス 80°C保存可)
- B3 : ノーマライゼーション前 cRNA Sample (試験終了までマイナス 80°C保存)
- D3 : 断片化済み Sample (電気泳動用サンプル)
- A2 : 断片化前 Sample (電気泳動用サンプル)

14) 必要な Sample の保存

前述のプレートから C2 の hybridization cocktail を加えた Sample を 1.5mL チューブへ移し換え hybridization に供する。B3 のノーマライゼーション前 cRNA Sample はプレートにシールで封を施し実験終了まで-80℃保存を行う。

15) 泳動用サンプルの分取

また Sample を保存する際、電気泳動に用いるサンプルも確保する(断片化前；A2 または B3、断片化後；D3 に分注されたサンプル)。断片化後サンプルを分取する際はテーブルトップ多本架冷却遠心機で遠心後タッピングしてから分取する。

4.4 終了

1) ログの保存

“C:/Affymetrix/Log/Execultion”の該当するファイルをコピーする。ファイル名の先頭にワーキング No. を付加し、¥¥Tgfs¥TGP2¥21-Experiment¥GCAS DATA¥Log Files へ保存。

2) Summary Report の保存および印刷

“C:/Affymetrix/Reports/Data”の該当する txt ファイルをコピーする。ファイル名の先頭にワーキング No.を付加し、¥¥Tgfs¥TGP2¥01-Research ¥21-Experiment ¥19-GCAS DATA¥Summary Report へ保存。

“C:/Affymetrix/Reports/ Summary”の該当する rtf ファイルをコピーする。ファイル名の先頭に Working ID を付加し、¥¥Tgfs¥TGP2¥01-Research¥21-Experiment ¥19-GCAS DATA¥Summary Report へ保存。rtf ファイルを印刷する

3) 吸光度測定結果の保存および印刷

“C:/Affymetrix/Reports/Data”の該当する txt ファイルをコピーする。ファイル名の先頭にワーキング No.を付加し、¥¥Tgfs¥TGP2¥01-Research¥21-Experiment ¥19-GCAS DATA¥Multiscan data for GCAS へ保存。txt ファイルを印刷する。

4) PC のシャットダウンを行う。

5)主電源を切る

6)エアーコンプレッサーの電源を切る。

7) 使用したスチール製のフタとプラスチック製のフタを水洗する。

5. Multiskan Spectrum による吸光度測定

- 1) Multiskan Spectrum 本体のスイッチを **ON** にする（光源を安定させるために測定開始の少なくとも 20 分前にスイッチを入れる）。
- 2) Multiskan Spectrum に接続している PC を起動する。
- 3) デスクトップの「**Multiskan Spectrum**」アイコンをクリックする。
- 4) 「**Self Test Results**」ダイアログボックスは、「**Close**」を選択してダイアログボックスを閉じる。
- 5) 選択ツリーの「Reader Protocols」から「Predefined Protocol」の「GCAS」を選択する。
- 6) 「**Plate out**」ボタンをクリックし、マイクロプレートを実験室にセットする。
- 7) 「**Start GCAS**」をクリックし測定を開始する。
- 8) 測定終了後、260 nm, 280 nm, 320 nm 及び濃度の結果レポートが表示される。
- 9) 「**Export**」ボタンをクリックし、¥¥ Tgfs ¥TGP2¥01-Research¥21-Experiment ¥19-GCAS DATA¥Multiskan data for GCAS¥cRNA へレポートを保存する。
ファイル名は、W + **Working ID**+アルファベット+記号(1 回目の blank の場合は **B-1**、2 回目は **B-2**、**sample** の場合はそれぞれ **S-1**, **S-2**)とする。
例) Working ID ; 00789 の場合
Blank (1 回目) ; W00789B-1 Blank (2 回目) ; W00789B-2
Sample (1 回目) ; W00789S-1 Sample (2 回目) ; W00789S-2
- 10) 保存後、「**Remove**」ボタンをクリックし、レポートを消去する。
- 11) 「**Plate In**」をクリックし、Multiskan Spectrum のプレートトレイを収納する。
- 12) Multiskan Spectrum 本体のスイッチを **OFF** にする。
- 13) アプリケーションを終了し、PC の電源を切る。

6. 電気泳動

分取した断片化前サンプル（ノーマライゼーションを行ったものが好ましいが、収量の関係で採取できない場合はノーマライズ前の cRNA 0.5 µL を 9.5 µL のローディングバッファーに添加）及び断片化サンプルを【SOP GEN 108】を参照し、電気泳動を行う

7. エラー発生時の対応

作動中に何らかのトラブルが発生した場合、ロボット上部のライトがオレンジ色に点灯し、エラーを知らせるアラーム及びエラー発生のウインドウが開く。工程責任者の指示のもと、以下の復帰作業を行う。

《エラーからの復帰》

- ・ 「Stop Alarm」 を押し、アラームを停止する。
- ・ 「Device control」 でエラーの詳細を表示し、症状に合わせた対応を行う。
- ・ 「Execute Selected Option」 のうちより動作を選択し **Execute**。

なお、対応不可能なエラーが発生した場合は以下に連絡する。

- ・ アフィメトリックス・ジャパン株式会社

以下余白