

# テカン自動ハイブリ装置 HS4800

## ハイブリダイゼーション条件比較

### 目的]

マイクロアレイスライド自動ハイブリ装置HS4800にて、ハイブリダイゼーション、洗浄の最適条件を見つける。



### 使用機器 器具 試薬]

自動ハイブリ装置 HS4800 (Tecan社)

受託解析用TaKaRa Human 3K DNAチップ (タカラバイオ株式会社)

プレハイブリバッファー (6 × SSC, 0.2% SDS)

ハイブリバッファー (6 × SSC, 0.2% SDS, 5 × Denhardt's, 0.1mg/ml Denatured Salmon Sperm DNA)

洗浄バッファー (2 × SSC, 0.2% SDS) (0.05 × SSC)

Affimetrix® 428™ Array Scanner (タカラバイオ株式会社)

### 方法]

ヒト細胞から得られたRNAを各15 μgを、それぞれCy3, Cy5で逆転写反応時に取り込み蛍光標識し、この混合物をプローブとした。2 × プローブ溶液 (35 μl) に等量のハイブリバッファーを加え、最終量を70 μl に調製しHS4800にセットされたタカラHuman 3K DNAチップに加えた。65 °Cもしくは60 °Cで16時間ハイブリダイゼーションを行い、洗浄後Affimetrix社428Scannerにてスキャンを行った。

表1 ]ハイブリ、洗浄条件

	プレハイブリ温度	ハイブリ温度	洗浄1 温度/時間	洗浄2 温度/時間	乾燥 (HS4800でのN2吹き付け)
Probe#1	1 60	60	55 /2分Wash + 2分Soak	60 /2分Wash + 2分Soak	30 /1分
	2 60	60	55 /1分Wash + 1分Soak	60 /1分Wash + 1分Soak	30 /1分
	3 /	65	55 /5分Wash + 5分Wash	65 /5分Wash	/

\*スライドはマニュアルにて実施 (プローブ 24 μl)

### 結果]

スキャン画像を図1, S/N比、有効spotの割合を図2に示した。

自動ハイブリ装置HS4800では、マニュアルとほぼ同程度の結果が得られた。HS4800では今回ハイブリ温度を65 °C設定での検討も行ったところ (Data Not Shown), 60 °Cの方がシグナル強度が高くバックグラウンドが低い良い結果が得られた。このことからHSでは数条件での検討により、最適なハイブリ条件を設定することが可能となると言える。

\*スライド提供、データ解析協力 :タカラバイオ株式会社、DNA機能解析センター

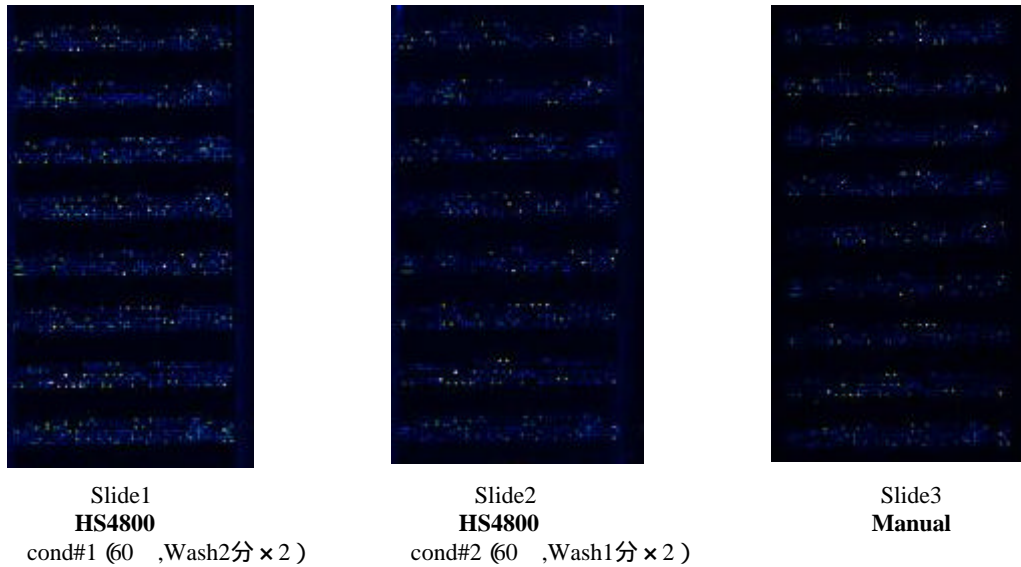


図1 ]スキャニング画像

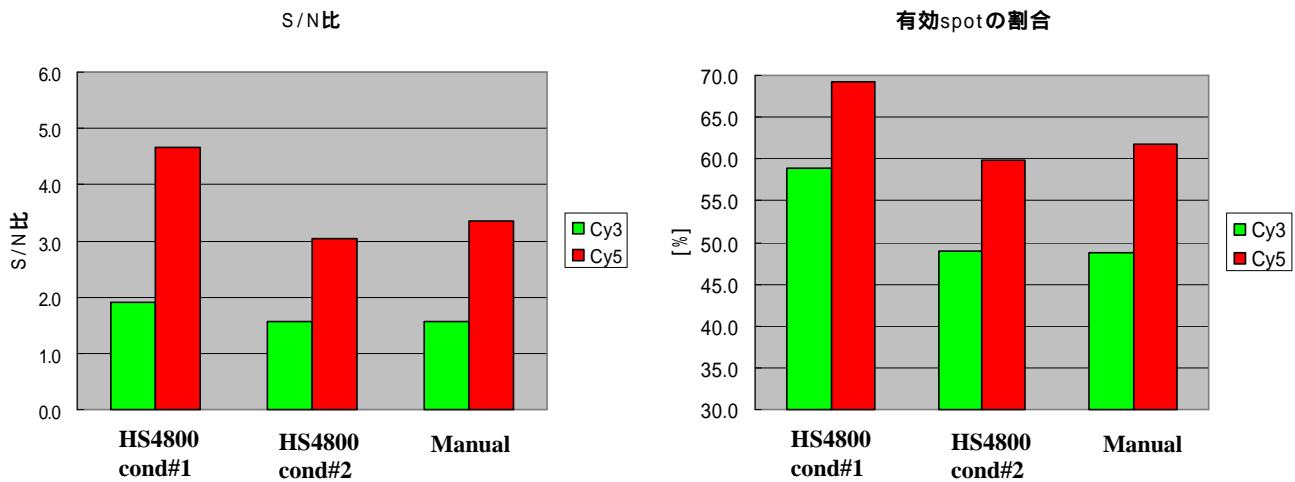


図2 ]S/N比,有効spotの割合

S/N比:[各スポットのSignal強度の平均値]/[各スポット周辺のBackground強度の平均値]

有効スポット数:有効シグナル強度を持つスポット数の割合

有効シグナル強度:[Signal\_Mean]>[Background\_Mean]+2x[Background\_StDev ]

Signal\_Mean:各スポットを格子状に分割し、それぞれのpixel値のSignal強度平均値を示す

<b>テカンジャパン株式会社</b>	本 社	〒183 - 0023	東京都府中市宮町 1 - 40 明治生命府中ビル10F
E-mail :			TEL : 042 - 334 - 8855 / FAX : 042 - 334 - 0401
InfoJapan@tecan.com	大阪オフィス	〒532 - 0011	大阪市淀川区西中島 5 - 5 - 15 住友生命新大阪ビル
http://www.tecan.co.jp			TEL : 06 - 6305 - 8511 / FAX : 06 - 6305 - 3167