

SCIENCE IMAGING SYSTEMS

Application Note No.15

基礎編：CLONTECH社メンブレンによるマクロアレイ

BAS-5000 / BAS-2500 / BAS-1800 / BAS-1800II / FLA-3000G / FLA-2000

BAS

FLA

はじめに

マクロアレイ法は、スループロットに優れ、特に発現解析に大きな威力を発揮する方法であるといわれています。数年前までHigh-density cDNA filter、高密度ドットプロット等と呼ばれていました。マクロアレイメンブレンの作成にはcDNA、EST等の素材はもちろん、高価なドットロボットを保有することが必要でした。最近、数社からいわばレディーメイドのマクロアレイメンブレンが発売され、その敷居は低くなってきました。

市販のマクロアレイメンブレンは、メーカー毎に、メンブレンの大きさや、ドットの数、大きさ、間隔、並べ方等に特徴があります。また配列、機能共に既知のcDNAのみをドットしたものがある一方、cDNAとESTを取り混ぜてドットしたものもあります。ポジティブ / ネガティブ・コントロールも様々で、実験の目的に合わせて、使用するマクロアレイメンブレンを選択する必要があるようです。1枚のメンブレン上には少ないものでも約1,000、多いものでは10,000以上のドットがあります。ハイブリダイゼーション、画像化後の解析を考慮すると、画像をデジタルデータで生成するBAS / FLA等の装置が必要と言えます。

今回は、CLONTECH Laboratories社のAtlas™を実例に、その特徴および実験法について、RNA抽出からBASを使用した画像化、解析までをご紹介します。

Contents

1. Introduction
2. Atlas™ cDNA Expression Arraysの特徴
3. 実験法
4. 参考文献

Summary

- Atlas™ cDNA Expression Arraysのメンブレン上のドットをBAS-1800を用いて高精度に検出できました。
- 検出した画像はArray Gaugeにより定量的な解析が行えます。

1 Introduction

ヒトゲノムプロジェクトによる遺伝子解析の進展は著しく、当初の予定より早く2003年にはヒト全ゲノムの解析が終了すると言われている。今後は、このプロジェクトの成果を利用した、ヒト遺伝子機能の解析が重要な研究課題となり、特にヒト遺伝子の発現パターンの解析が脚光を浴びてきている。ヒト遺伝子の発現解析手法としてはNorthern Blotting法¹⁾が古くから行われており、また近年はRT-PCR法²⁾、DD法^{3) 4)}などの新しい手法が開発されてきている。しかし、これらの手法は、いずれも熟練を必要とし、かつ処理能力も高くはなかった。そのため、簡便で処理能力の大きい遺伝子機能解析システムの開発が望まれていた。

このような時代の要請に応じ、生まれてきた分析技術がDNAアレイ分析系である。DNAアレイ分析系では、複数のcDNA、EST、オリゴDNAなどによりDNAアレイを作製することにより、複数のmRNAの発現量を同時に解析(Massive Parallel Analysis)することを可能とした。

DNAアレイ系には、非常に高密度にDNAを固定化してアレイを作製するDNAマイクロアレイ系と、本稿に述べるようなDNAマクロアレイ系に大別することができる。

DNAマイクロアレイ系は、ガラス等の支持体上に、非常に多種類のDNAを高密度に固定化することにより、多種類のmRNA発現量の解析ができる技術として近年脚光を浴びている^{5) 6)}。代表的なDNAマイクロアレイ法として、ガラス支持体上にオリゴDNAを固定化する方法があるが、この方法はシステム価格が高く、かつデータの信頼性もまだ低い。また、もう一つの方法としてcDNA、ESTを固定化する方法も開発されているが、DNA固定化など、まだ技術的に改良すべき点が多い。

一方、DNAマクロアレイ系は、プロットング技術を改良する形で開発されてきているため、これまでの知見、ノウハウをいかしやすく安定している。前述のDNAマイクロアレイ系と比較して固定化されているDNA種も少なく、処理能力は劣るが、データの信頼性は高いとされている。また、DNAをRIで標識し、ハイブリダイゼーション後mRNAを非常に高感度にイメージングプレートで検出することが可能である。さらに、検出した画像はArray Gaugelによる解析も可能である。その概略図をFig.1-1に示す。

DNAマクロアレイメンブレンは本稿のCLONTECH社Atlas™ cDNA Expression Arraysの他にResearch Genetics社、Genome Systems社などから販売されている。特にGenome Systems社のアレイの場合は、22cm×22cmの大サイズであるため、イメージングプレートBAS-MS2325の使用が好ましい。このイメージングプレートは、BAS-1800IIまたは、FLA-3000GIによる検出が可能である。

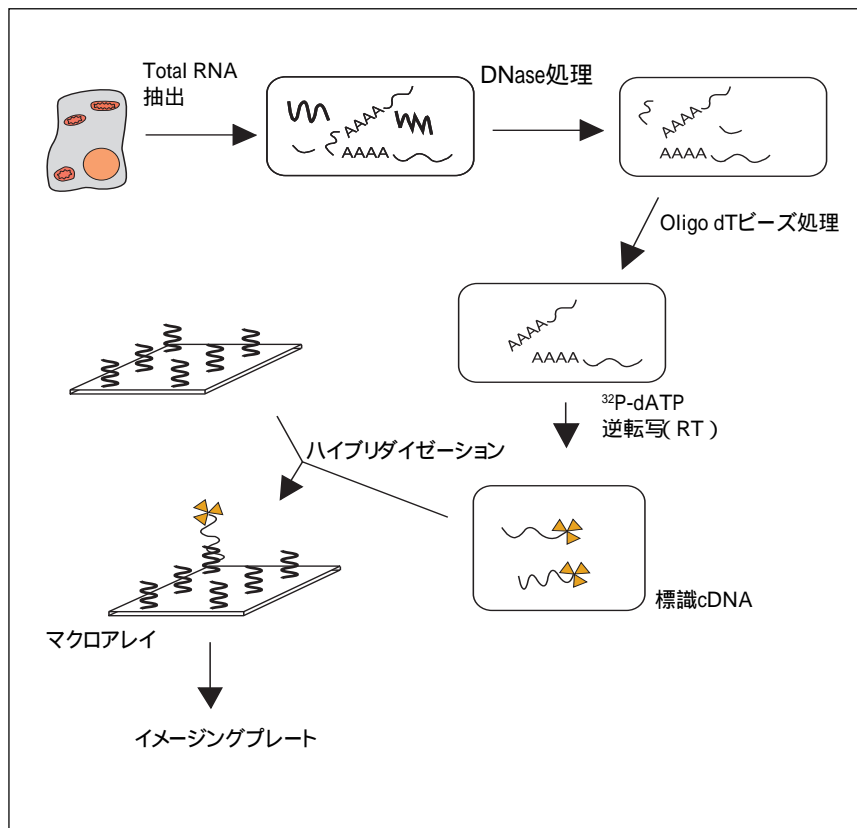


Fig.1-1

Fig.1-1 マクロアレイの概念図

2 Atlas™ cDNA Expression Arrays の特徴

Atlas™ cDNA Expression Arraysは、ナイロンメンブレン上にcDNA断片を固定化した、代表的な中密度マクロアレイであり、次の技術により、S/N比の向上を図っている。

S / N比
Signal / Noise比

- 1) 鋳型mRNAから、標識cDNAの作成時にGene Specific Primerを使用している。Gene Specific Primerは、固定化されているcDNA断片の塩基配列を基に作製しているため、理論的には対応するcDNAしか転写されない。このことにより、バックグラウンドが低下することになる。
- 2) 非特異反応を減少させるために、繰り返し配列や、ホモロジーの高い配列を除くように、固定化cDNA断片が設計されている。

3 実験法

Atlas™ cDNA Expression Arrays 実験の流れ

1. Total RNAの抽出・精製

CLONTECH プロトコール PT3231-1

DNase処理

・・・Atlas™ Pure RNA Isolation Kit

2. PolyA+RNAの抽出・精製

Oligo dT ビーズ法

電気泳動による確認

3. 標識cDNAプローブの作製

CLONTECH プロトコール PT3140-1

CHROMA SPIN™ Columnによる精製

・・・Atlas™ cDNA Expression Arrays

4. 標識cDNAプローブの性能確認

コントロールのナイロンメンブレンとのハイブリダイゼーション

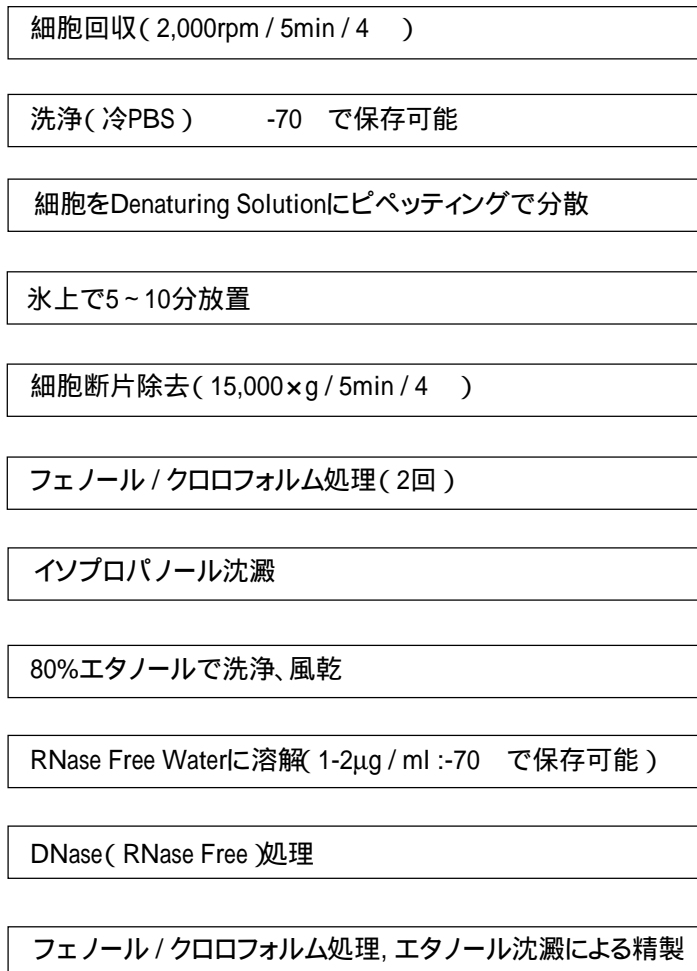
5. Atlas™ cDNA Expression Arraysとハイブリダイゼーション

6. BASによる測定

7. Array Gaugeによる解析

1. Total RNAの抽出・精製

Total RNAの抽出・精製方法をFig.3-1に示す。

**PBS**

Phosphate Buffered Saline(pH7.4)

Fig.3-1

Fig.3-1 Total RNAの抽出・精製

2. PolyA+RNAの抽出・精製

精製したTotal RNAからOligo dTビーズ法によりmRNAを抽出・精製する。

精製mRNAは、変性アガロースゲル中で0.5-12Kbのスミアなバンドを示す。

Atlas™ cDNA Expression Arraysに添付のコントロールPolyA+RNA(2µg)と比較して純度を検定する。

ワンポイントアドバイス

標識cDNAプローブ作製のための鋳型は、Total RNAも、mRNAも使用することができる。いずれの場合でもRNAの純度が実験の成否を握る鍵となる。本法は、Total RNAを抽出した後、oligo dTビーズ(ラテックス)によりmRNAを抽出・精製し、このmRNAを鋳型として標識cDNAプローブを作製する。操作は煩雑ではあるが良好な結果を得ることができる(Atlas™では、Atlas™ Pure RNA Isolation Kitを推奨している)。

また、ゲノムDNAの混入はS/N比を大きく低下させるので、できるだけ避けなければならない。抽出したTotal RNAは、oligo dTビーズ(ラテックス)精製前にDNase(RNase Free)で処理をすることにより、混在しているゲノムDNAを除去することができる。

3. 標識cDNAプローブの作製

標識cDNAプローブの作製方法はFig.3-2 にまとめる。

未反応の³²P NucleotideはCHROMA SPIN™ Columnにより除去する。

ワンポイントアドバイス

Atlas™ cDNA Expression Arraysでは、キットに含まれているGene Specific Primerを使用することにより S/N比を向上させている。通常のOligo dT Primer や、Random Primerの使用は望ましくない。

PCR用チューブでPolyA+RNAとPrimerを混合する
(Vortexで撹拌後、遠心して集める)

PolyA+RNAサンプル 1mg (2ml)
10×CDS Primer Mix 1ml

Thermal Cyclerで70 / 2分 加熱

Thermal Cyclerを70 に予め
加熱しておく。

50 / 2分 加熱

Master Mix 8ml添加、ピペットで混合
(Thermal Cycler内で行う)

Master Mix の調整

5×Reaction Buffer	2 ml
10×dNTP Mix(dNTP標識用)	1 ml
[- ³² P]dATP(3,000Ci / mmol)	3.5ml
DTT(100mM)	0.5ml
MMLV Reverse Transcriptase	1 ml
Total	8 ml

50 / 25分 反応

10×Termination Mix 1ml添加(反応停止)

CHROMA SPIN™ Columnによる精製

Fig.3-2

Fig.3-2 標識cDNAプローブ
の作製

4. 標識cDNAプローブの性能確認

実際の実験を行う前に、コントロールのナイロンメンブレンを用いて、予備実験を行う。コントロールのナイロンメンブレンを使用するという以外は、実際の実験と全く同じ操作手順で行うことにより、標識cDNAプローブの非特異的吸着のレベルを確認する。バックグラウンドが非常に高い場合は、標識cDNAプローブを再作製する必要がある。

ハイブリダイゼーションは通常のマクロアレイと同様の方法で行う。

5. Atlas™ cDNA Expression Arraysとハイブリダイゼーション

実験は上記キットに添付のプロトコールによる。

ワンポイントアドバイス

ハイブリダイゼーション前にメンブレンは蒸留水でぬらす。ハイブリダイゼーション終了まで乾かさないう(乾かすとバックグラウンドのムラができてしまう)。

6. BASによる測定

メンブレンを露出したイメージングプレートを、BAS-1800で検出する。

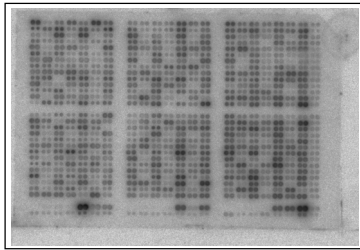


Fig.3-3

Fig.3-3 Atlas™ Mouse cDNA Expression Array (Control)

露出時間:18時間
読み取り条件: Resolution : 50μm
Gradation : 16bit
Sensitivity : 4000
Latitude : 5

7. Array Gaugeによる解析

Atlas™ cDNA Expression Arrays^{注1)}では、複数のHousekeeping Geneと、複数のNegative Controlがスポットされている。Array Gaugeでは、定量結果をFig.3-4のように例えばHousekeeping Geneであるbeta-actinを基準としてパターン表示することができ、発現の差異を視覚化することができる。

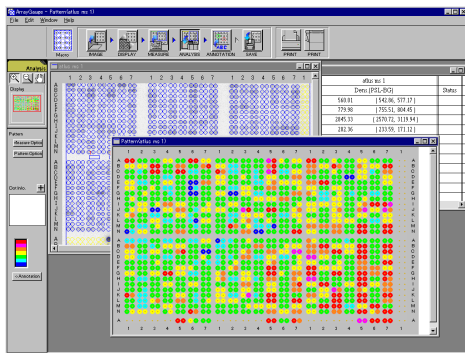


Fig.3-4

注1) 今回使用したAtlas™ Mouse cDNA Expression Arrayでは9種類のHousekeeping Geneと3種類のNegative Control(M13 mp18(+) strand DNA, lambda DNA, pUC18 DNA)がスポットされている。

Fig.3-4 Array Gaugeによるパターン表示

beta-actinを基準にして定量値からパターン分類したもの

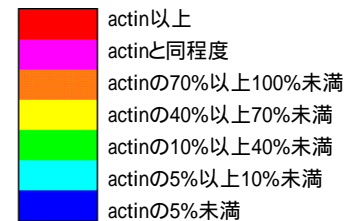


Fig.3-3の測定結果を、Array Gaugeで定量後Excelを用いて規格化するとTable.3-1のような結果になる。このような方法により、実験間、細胞間の誤差を補正することができる。基準とするHousekeeping Geneは、実験に応じて適当なものを選択する。今回はHousekeeping Geneにbeta-actinを選択した。

Table.3-1

No.	Index	Dens.(定量値-バックグラウンド)	beta-actinを基準とした割合(%)
1	A-1-a	886.66	159
2	A-1-b	311.93	56
3	A-1-c	96.95	17
4	A-1-d	171.9	31
5	A-1-e	257.43	46
6	A-1-f	356.98	63
7	A-1-g	175.12	31
8	A-1-h	192.11	34
9	A-1-i	167.5	30
10	A-1-j	218.65	39
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
600	G-13	69.53	12
601	G-21	3088.95	551
602	G-19	560.25	100

バックグラウンドはBLANKスポットの平均値とM13 mp18(+) strand DNAの平均値にしました。

Table.3-1 規格化した測定結果例

G-13 : Housekeeping Gene (myosin I)
G-21 : Housekeeping Gene (ribosomal protein S29)
G-19 : Housekeeping Gene (beta-actin)

4 参考文献

- 1) Molecular Cloning 2nd Edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)
- 2) Paul D.Siebert, Betty C.B.Huang, Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines; Pro.Nat.Acad.Sci. USA, 94, 2198-2203 (1997)
- 3) 栗原靖之, 丸本佳代子, 高感度蛍光色素を使ったポストステイニングによる蛍光ディフレンシャルディスプレイ(SSDD)法, non-RI実験の最新プロトコール 蛍光の原理と実際: 遺伝子解析からバイオイメージングまで; 羊土社, 45-50 (1999)
- 4) 栗原靖之, 丸本佳代子, Application Note No.11 応用編: 蛍光色素SYBR® Green Iを使った簡便なDifferential Display(SSDD)法; 富士写真フイルム株式会社 (1998)
- 5) 安住薫, 野村剛, Application Note No.14 応用編: 初心者でも成功する簡便なFluorescent Differential Display(FDD)法; 富士写真フイルム株式会社 (1999)
- 6) Stephen P.A. Fodor, Massively Parallel Genomics; Science 277, 393-401 (1997)
- 7) Robert J.Lipshutz, Stephen P.A. Fodor, Thomas R.Gingeras & David J.Lockhart, High density synthetic oligonucleotide arrays; Nature Genetics Supplement 21, 20-24 (1999)
- 8) Edited by Mark Schena, DNA Microarrays A Practical Approach; Oxford University Press (1999)

著者
須藤 幸夫
織笠 敦
編集
三浦 研二
長島 眞喜子
大岡 留里子
(富士写真フイルム)

1999年 12月発行



富士写真フイルム株式会社

●本書についてのお問い合わせは
東京本社 ■ 機器事業部 サイエンス・システム
〒106-8620 東京都港区西麻布2-26-30 TEL (03)3406-2201
FAX (03)3406-2158
E-mail : sginfo@tokyo.fujifilm.co.jp