Soğuk ve sıcaklık stresinin *Rhodobacter capsulatus* bakterisinde hidrojen üretim metabolizması üzerine etkileri

Proje No: 108T455

Prof.Dr. Ayşe Meral YÜCEL

ARALIK 2011

ANKARA

ÖNSÖZ

Rhodobacter capsulatus oksijensiz fotoheterotrofik koşullarda ve nitrojen kıtlığında hidrojen üretebilen mor kükürtsüz bir bakteridir. Nitrojenaz enzimi ile basit organik moleküllerden yüksek verimde hidrojen üretebilir. Yapılan çalışmalarda *R. capsulatus* bakterisinin kontrollü koşullar (sabit sıcaklık ve ışık) altında asetik asit kullanarak fotobiyoreaktörlerde yüksek verimde hidrojen üretebildiği gözlenmiştir. Ancak, güneş enerjisinden optimum yararlanmak üzere tasarlanmış fotobiyorektörler doğal koşullar altında çalıştırıldığında gece-gündüz sıcaklık değişimi hidrojen üretim verimini ciddi ölçüde etkilemektedir. Bu çalışma kapsamında hidrojen üretim koşulları altında farklı sıcaklık streslerine maruz bırakılan bakterilerin metabolik değişimleri mikrodizin ve proteomik yöntemleriyle araştırılmış, değişen sıcaklık stresi etkisinin hidrojen üretim metabolizmasına olan etkileri incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında literatürdeki verilerden faydalanarak *R. capsulatus* için ekspresyon çipi tasarımı gerçekleştirilmiştir. Soğuk ve sıcaklık stresine maruz bırakılmış bakterilerden belli zaman aralıklarında örnekler alınmış ve RNA ve protein izolasyonlarının ardından mikrodizin ve proteomik analizleri gerçekleştirilmiştir. Mikrodizin çalışmaları ODTÜ Merkez Laboratuvarında bulunan mikrodizin sistemi kullanılarak, proteomik çalışmaları ise TÜBİTAK-MAM-GMBE bünyesinde bulunan LC-MS-MS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Proje ODTÜ Hidrojen Araştırma Laboratuvarı, Kimya Mühendisliği, Biyoloji Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Araştırma Laboratuvarı, ODTÜ Merkez Laboratuvarı Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi ve TÜBİTAK-MAM-GMBE ekip ve ekipmanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu proje TÜBİTAK tarafından 108T455 kodlu TBAG projesi üzerinden desteklenmiştir. Proje süresince 2 yüksek lisans, 1 doktora öğrencisi bursiyer olarak desteklenmiştir.
Projede emeği geçen tüm araştırmacılar adına TÜBİTAK'a sağlamış olduğu destekten dolayı teşekkür ederim,

Saygılarımla,

Prof. Dr. Ayşe Meral Yücel
ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ 2

TABLO VE ŞEKİLLER 6

ÖZET 9

ABSTRACT 11

2. GENEL BİLGİLER 14

2.1 *Rhodobacter capsulatus*'un Hidrojen Üretim Metabolizması 15

2.2 Çeşitli Stres Koşullarının Hidrojen Üretimine Etkisi 16

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 18

3.1 Mikroorganizma 18

3.2 Bakteri Aktivasyonu Besi Yeri 18

3.3 Bakteri Büyüme ve Hidrojen Üretim Besi Yeri 19

3.4 Analitik Ölçümler 20

3.5. Stres Uygulaması, Mikrodizin ve Proteomik Örneklerinin Toplanması 20

3.6 RNA Saflaştırması ve Karakterizasyonu 21

3.7. Rhodobacter capsulatus için Mikrodizin Ekspresyon Çipinin Tasarlanması 22

3.8 Mikrodizin Analizi 24

3.8.1 Veri Analizi 24

3.9 Proteom Analizi 25

3.9.1 Örneklerin Hazırlanması 25

3.9.2 Veri Analizleri 26

3.9.2.1 Protein İfade farklılıkları analizi 26

3.9.2.2 MS ve MS/MS Deney kurulumu 26

3.9.2.3 Karşılaştırmalı grup analizi 26

3.9.2.4 PLGS Expression^{E} protein ekspresyon analizi 27

4. BULGULAR 27
4.1 Fizyolojik Bulgular 27
4.2 Mikrodizin Analizi 30
4.2.1 RNA Saflaştırması Karakterizasyonu 30
4.2.2 Mikrodizin Verisi Kalite Kontrolü 32
4.2.3 Soğuk Stresi Altında Kontrole Göre Gen İfadesi Değişimi 33
4.2.3 Sıcak Stresi Altında Kontrole Göre Gen İfadesi Değişimi 34
4.2.4 Soğuk ve Sıcaklık Stresinde Değişim Gösteren Genlerin İncelenmesi 36
4.2.5 Isısal Stresin Azot Metabolizmasına Etkisi 38
4.2.6. Isısal Stresin Elektron Taşıma Zincirine Etkisi 38
4.2.7. Isısal Stresin Fotosentez Metabolizmasına Etkisi 39
4.2.8. Isısal Stresin Protein Sentezine Etkisi 40
4.2.9. Isısal Stresin Hücre Zarı ve Duvarı Biyosentezine Etkisi 40
4.2.10. Isısal Stresin Lipit Metabolizmasına Etkisi 41
4.2.11. Isısal Stresin Nükleik Asit Metabolizmasına Etkisi 42
4.2.12. Isısal Stresin Taşıyıcı ve Bağlayıcı Protein Biyosentezine Etkisi 43
4.2.13. Isısal Stresin Kofaktör, Prostetik Grup ve Taşıycıların Biyosentezine Etkisi 43
4.3. Proteomik Analizi 44
4.3.1 Sıcak Stresinin Protein Ekspresyonuna Etkisi – 2. Saat 46
4.3.2 Sıcak Stresinin Protein Ekspresyonuna Etkisi – 6. Saat 48
4.3.3 Sıcak Stresi Koşullarında Ekspresyonu Artan ve Azalan Proteinler 50
4.3.4 Soğuk Stresinin Protein Ekspresyonuna Etkisi – 2. Saat 52
4.3.5 Soğuk Stresinin Protein Ekspresyonuna Etkisi – 6. Saat 54
4.3.6 Soğuk Stresi Altında Ekspresyonu Artan ve Azalan Proteinler 56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 58

REFERANSLAR 61

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU..... 64

TABLO VE ŞEKİLLER

Tablo 1. MPYE Besi yeri içeriği (1 L için) 18

Tablo 2. Büyüme ve hidrojen üretim besi yerleri içeriği (1 L için) 19

Tablo 3. Mikro element solüsyonları bileşenleri (100 ml, 10X) 19

Tablo 4. Kontrol, soğuk ve sıcak stresi koşullarında üretilen toplam hidrojen, hidrojen üretim hızı, substrat dönüştürme verimliliği, molar verim, ışık dönüştürme verimliliği ve ürün verim faktörü . 29

Tablo 5. *R. capsulatus bakterisinin saflaştırılan total RNA derişimi ve saflığı. Deneyler 3 tekrar* halinde yapılmıştır. 31

Tablo 6. Soğuk stresinin (2. saat ve 6. saat) kontolle karşılaştırılmasından oluşturulan korelasyon katsayısı matrisi 33

Tablo 7. Sıcak stresinin (2. saat ve 6. saat) kontolle karşılaştırılmasından oluşturulan korelasyon katsayısı matrisi 34

Tablo 8. Sıcak stresi koşullarında iki saat tutulan hücrelerde, ekspresyonu 1,5 kat değişen proteinlerin listesi 46

Tablo 9. Sıcak stresi koşullarında iki saat tutulan hücrelerde, ekspresyonu 1,5 kat değişen proteinlerin listesi (6. Saat) 49

Tablo 10. Soğuk stresi koşullarında 2 saat bırakılmış olan örneklerde ekspresyonu en az 1,5 kat değişim gösteren proteinlerin listesi 52

Tablo 11. Altı saat süresince soğuk stresine maruz bırakılan örneklerde ekspresyonu en az 1,5 kat değişim gösteren proteinlerin listesi 55

Şekil 1. Günümüz hidrojen üretiminde kullanılan kaynaklar 13

Şekil 2. Elektron taşıma zinciri ve hidrojen metabolizmasında görev alan Nitrojenaz ve Hidrojenaz enzimi 15

Şekil 3. Mor kükürtsüz bakterilerde hidrojen üretim metabolizması ve diğer metabolik döngülerle ilişkisi. 16

Şekil 4. Reaktör ve hidrojen üretim düzeneğinin şematik gösterimi 20

Şekil 5. RNA ve protein örneklerinin toplanması için uygulanan deneysel düzenek (A: Asetat; G: Glutamat) 21

Şekil 6. ARTEMIS programının ana penceresinin görüntüsü 23

Şekil 7. Affymetrix GeneChip® 24

Şekil 8. Prokaryotik örnek hazılama şeması (Affymetrix Expression Analysis Technical Manual for Prokaryotic Target Preparation). 25

Şekil 9. Hidrojen üretim ortamında sıcaklık stresi altında bakteri büyümesi (A), pH değişimi (B), organik asit tüketimi (C) ve hidrojen üretimi (D). Kesikli çizgi stres uygulama zamanını göstermektedir. 27

Şekil 10. *Rhodobacter capsulatus* total RNA saflaştırması sonrasında elde edilen Bioanalyzer jel görüntüsü. 25. Hiza 5S rRNA, 38. Hiza 16S rRNA, 40. Hiza 23S rRNA bantlarını göstermektedir. 31

Şekil 11. *Rhodobacter capsulatus* total RNA'sından elde edilen Bioanalyzer elektroferogramı. 25. pik 5S rRNA, 38. pik 16S rRNA, 40. pik 23S rRNA bantlarını göstermektedir. 32

Şekil 12. *Rhodobacter capsulatus* Affymetrix GeneChip tarama dosyasından (.DAT) elde edilen görüntü. 32

Şekil 13. 2 ve 6. saatlerde soğuk stresinin kontrole göre değişimini gösteren profil grafiği. 33

Şekil 14. 2 ve 6 saat stress uygulaması sonrasında kontrole göre anlamlı değişim gösteren genlerin dağılım grafiği 34

Şekil 15. 2 ve 6. saatlerde sıcak stresinin kontrole göre değişimini gösteren profil grafiği. 35

Şekil 16. 2 ve 6 saat stress uygulaması sonrasında kontrole göre anlamlı değişim gösteren genlerin dağılım grafiği 35

Şekil 17. Soğuk stresi altında anlamlı değişim gösteren genlerin metabolik dağılımı 37

Şekil 18. Sıcak stresi altında anlamlı değişim gösteren genlerin metabolik dağılımı 37

Şekil 19. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) azot metabolizmasında değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı. 38

Şekil 20. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) elektron taşıma metabolizmasında değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı. 39

Şekil 21. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) fotosentez metabolizmasında değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı. 39

Şekil 22. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) protein sentezinde değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı 40

Şekil 23. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) hücre zarı ve duvarı biyosentezinde değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı. 41

Şekil 24. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) lipit metabolizmasında değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı. 41

Şekil 25. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) nükleik asit metabolizmasında değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı. 42

Şekil 26. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) taşıyıcı ve bağlayıcı protein biyosentezinde değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı. 43

Şekil 27. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) kofaktör, prostetik grup ve taşıyıcıların biyosentizinde değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı. 44

Şekil 28. 30°C iki saat birinci biyolojik tekrarın ilk teknik tekrar kromatogramı. 45

Şekil 29. 30°C iki saat birinci tekrarının üç teknik tekrarının tümü. Üç teknik tekrar incelendiğinde piklerin birbirleriyle örtüştükleri görülmektedir. Bu analizlerimizin tekrarlanabilir olduğunun göstergesidir. 45

Şekil 30 Pasta grafiği sıcak stresi durumda ekspresyonu artan proteinlerin hücresel işlevlerine göre dağılımı 51

Şekil 31. Pasta grafiği sıcak stresi durumda ekspresyonu azalan proteinlerin hücresel işlevlerine göre dağılımı 51

Şekil 32. Pasta grafiği soğuk stresi koşullarında yüksek miktarda sentezlenen proteinlerin hücresel işlevlerine göre yüzde dağılımlarını göstermektedir 57

Şekil 33. Pasta grafiği soğuk stresi koşullarında miktarı azalan proteinlerin hücresel işlevlerine göre yüzde dağılımlarını göstermektedir 58

ÖZET

Dünyadaki enerji kaynaklarının hızla tükenmesi ve fosil yakıtlarının çevre kirliliğine yol açması, yeni enerji kaynaklarının araştırılmasına neden olmuştur. Bunlar arasında çevre güvenliği açısından temiz ve ucuz olan hidrojen önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Biyolojik yolla hidrojen üretimi ile alternatif enerji elde edilebilmesi çalışmaları son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Organik maddelerin fotosentetik bakteriler tarafından kullanılarak hidrojene dönüştürülmesi temiz ve ucuz enerji elde edilmesi açısından olduğu kadar fabrika atıklarının etkin şekilde arındırılması açısından da çok önemlidir. *Rhodobacter capsulatus* oksijensiz ortamlarda ve ışık varlığında hidrojen üretebilen fotosentetik, zararsız, Gram negatif bir toprak bakterisidir. *R. capsulatus* bakterisinin kontrollü koşullar (sabit sıcaklık ve ışık) altında asetat kullanarak fotobiyoreaktörlerde yüksek verimde hidrojen üretebildiği gözlenmiştir. Ancak, doğal koşullar altında gece-gündüz sıcaklık değişimi hidrojen üretim verimini ciddi ölçüde etkilemektedir.

Bu çalışmada *R. capsulatus* bakterisinin soğuk ve sıcaklık stresi koşullarında gen ve protein ifadelerindeki değişim mikrodizin ve proteomik metotlarıyla analiz edilmiştir. Kontrol (30 °C) koşullarında 48 saat süreyle büyütülen bakteriler daha sonra soğuk (4°C) ve sıcak (42°C) stresine maruz bırakılarak belli aralıklarla RNA ve protein örnekleri saflaştırılmış, gen ve protein ifadelerindeki değişim sırasıyla mikrodizin ve LC-MS/MS yöntemleri ile araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, sıcak ve soğuk stresinin hidrojen üretimi, büyüme ve organik asit tüketimine etkisi ayrıca oluşturulan bir deney düzeneği ile araştırılmıştır.

Yapılan fizyolojik testler, sıcak stresi uygulamasının bakteri büyümesini tamamen durdurduğunu, soğuk stresi altında ise bakterilerin daha düşük bir büyüme hızında büyümeye devam ettiğini göstermiştir. Sıcak ve soğuk stresi hidrojen üretiminin durmasına yol açmıştır. Buna paralel olarak, organik asit (asetik asit) tüketim hızı soğuk stresinde yavaşlama gösterirken, sıcak stresine asetik asidin tamamen tüketilemediği gözlenmiştir.

Mikrodizin analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için GeneChip® *Rhodobacter capsulatus* Whole Genome Expression Array özel olarak ilk defa bu çalışmada tasarlanmış ve Affymetrix firmasına ürettirilmiştir. Toplamda mikrodizin üzerine 4052 prob seti yerleştirilmiştir. Çip ismi Affymetrix.GeneChip®.TR_RCH2a520699F olarak belirlenmiştir. *R. capsulatus* bakterisinden yüksek konsantrasyon ve saflıkta RNA saflaştırma protokolü optimize edilmiş, mikrodizin analizinde kullanılabilir nitelikte RNA saflaştırma protokolü geliştirilmiştir. RNA saflığı spektrofotometrik olarak (260/280 oranı), kalitesi ise elektroforetik olarak (Agilent Bioanalyzer 2100) test edilmiş, mikrodizin analizinde kullanılabilecek nitelikte oldukları anlaşıldıktan sonra analize devam edilmiştir. Mikrodizin analizi sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildikten sonra 2 kat ve üstü değişim gösteren genler, bağlı oldukları metabolik yolaklara göre kategorize edilerek, soğuk ve sıcaklık stresinin yol açtığı metabolik değişimler incelenmiştir. Buna göre sıcak stresinin en çok fotosentetik, elektron taşıma ve nitrojen metabolizmalarında görevli genlerin ekspresyonunu etkilediği görülmektedir. Bu metabolik yolaklar hidrojen üretiminde birincil derecede öneme sahiptir. Sıcaklık stresi altında hidrojen üretiminin durmasının ilgili genlerin ifadelerindeki azalmayla bağlantılı olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra, hücre zarı fonksiyonlarının korunmasında ve bütünlüğünün sağlanmasında ve hücre zarı onarımında rol alan genlerin ifadelerinin de sıcak stresi altında arttığı gözlenmiştir. Nükleik asit metabolizması da sıcaklık stresinden en çok etkilenen metabolizmalardan biri olarak görülmektedir. Proteomik analizinden elde edilen veriler mikrodizin sonuçlarını doğrular niteliktedir.

Soğuk stresi bakteride daha genel bir stres tepkisi yaratmıştır. Sıcak stresi altında daha çok zar yapısı ve fonksiyonu ile ilgili proteinlerin ve sıcak şoku proteinlerinin ekspresyonunda değişim gözlenirken, soğuk stresi altında enerji metabolizması, nükleik asit metabolizması, soğuk şoku proteinleri, global stres proteinleri, hücre zarı metabolizmasında yer alan proteinlerde ve daha birçok metabolik yolakta önemli

değişimler gözlenmiştir.

Proteomik ve mikrodizin analizleri paralel bir şekilde tamamlanmıştır. Bu proje sonucunda edinilen bilgiler, proje önerisinde belirlenen hedeflere ulaşıldığını göstermektedir. *Rhodobacter capsulatus* bakterisinde soğuk ve sıcaklık stresinin hidrojen üretim metabolizmasına etkilerinin incelenmesini amaçlayan bu projede oldukça fazla bilgi birikimi elde edilmiştir. Analiz sonuçlarının daha detaylı yorumlanması ve doğrulanması yönünde çalışmaların sonuçlanmasından sonra, bu bilgiler literatüre kazandırılacaktır.

Anahtar kelimeler: *Rhodobacter capsulatus*, hidrojen, soğuk stresi, sıcak stresi, mikrodizin, proteomik

ABSTRACT

The depleting world's energy sources and environmental pollution caused by fossil fuels led to search for new energy sources. Among them, hydrogen is an important alternative being cheap and clean in terms of environmental safety. Resarches about obtaining alternative energy by biological hydrogen production has gained great importance. Conversion of organic substrates into hydrogen by photosynthetic bacteria is important not only for clean and cheap energy production, but also for remediation of factory wastes efficiently. *Rhodobacter capsulatus* is a Gram -, non-pathogenic, photosynthetic soil bacterium that can produce hydrogen in anaerobic conditions in the presence of light. It has been observed that *Rhodobacter capsulatus* can produce hydrogen in photobioreactors under controlled conditions (constant temperature and light intensity) using acetate with high productivity. However, differences in day and night temperatures under natural conditions seriously affect hydrogen yield and productivity.

In this study, the analyses of changes in gene and protein expressions of *Rhodobacter capsulatus* under cold and heat stress were achieved by microarray and proteomics methods. Bacteria that were grown in control (30 °C) for 48 hours were then exposed to cold (4 °C) and heat (42 °C) stress. RNA and protein samples were isolated at certain intervals and changes in gene and protein expressions were analyzed by microarray and LC-MS/MS. Moreoever, the effects of cold and heat stress on hidrogen production, bacterial growth and organic acid consumtion were studied by an independent experimental set-up.

Physiological tests showed that heat stress application totally stopped bacterial growth and under cold stress bacteria continued to grow at a slower rate. Both cold and heat stress ceased hydrogen production. Similarly, acetate consumption rate decrased under cold stress, but under heat stress acetate consumption was not complete.

In order to make microarray analysis GeneChip® *Rhodobacter capsulatus* Whole Genome Expression Array was specially designed for the first time in this study and the microarray chips were manufactured by Affymetrix company. Totally 4052 probe sets were placed onto the microarray chips. The chip name was determined to be Affymetrix.GeneChip®.TR_RCH2a520699F. RNA isolation protocol for high yield and quality RNA from *Rhodobacter capsulatus* was optimized and an RNA isolation method for RNA having quality to be used in microarray studies was developed. The purity and quality of RNA were tested spectrophotometrically (260/280 ratio) and electrophoretically (Agilent Bioanalyzer 2100), respectively. After proving that RNAs were in a quality to be used in microarray studies, analyses were carried on. The data obtained from microarray was analysed statistically, then genes showing fold change of 2 and more were categorized according to the metabolic pathways they take place. Afterwards the metabolic changes caused by cold and heat stress were analyzed. According to the results, it was observed that heat stress affects the expressions of genes functioning in photosynthesis, electron transport and nitrogen metabolism at most. These metabolic pathways carry vital importance for hydrogen production. The cease of hydrogen production under heat stress was found to be correlated with the decrease in expression of related genes. Additionally, the expressions of the genes responsible for maintaining cell membrane functionality and integrity and cell membrane repair were observed to increase with heat stress. Data form proteomics analysis confirms these results.

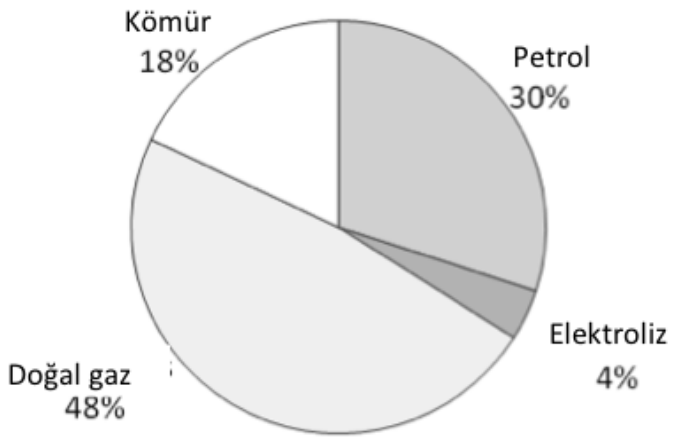
Cold stress generated a more general stress repsonse in bacteria. Under heat stress the expressions of genes related to cell membrane structure and function, and heat shock proteins changed, while under cold stres changes in the expression of genes related to energy metabolism, nucleic acid metabolism, cold shock proteins, global stress proteins, cell membrane metabolism and many important metabolic pathways were observed.

Proteomics and microarray analyses were compeleted in a parallel manner. The results obtained at the end of the project show that the goals at the beginning of the project were achieved successfully. A lot of information were obtained from this project which aimed to analyse the effects of cold and heat stress on the hydrogen production metabolism of *Rhodobacter capsulatus*. These information will be shared with the literature after studies towards validation and more detailed evaluations of the analysis results

Key words: *Rhodobacter capsulatus*, hydrogen, cold stress, heat stress, microarray, proteomics

1. GIRİŞ

Enerji gereksiniminin karşılanmasında fosil yakıtların kullanılması, sera gazlarının emisyonunu arttırmakta ve küresel ısınmaya yol açmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda tüm dünyayı yenilenebilir ve temiz enerji kaynaklarına yöneltmiş, bu konudaki araştırma ve uygulamalar hız kazanmıştır. Hidrojen, yakıldığında sadece su açığa çıkaran temiz bir enerji taşıyıcısıdır. Günümüzde hidrojen çoğunlukla fosil yakıtlardan elde edilmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Günümüz hidrojen üretiminde kullanılan kaynaklar (KOTHARI, 2008)

Ancak hidrojenin sürdürülebilir olabilmesi için temiz ve yenilenebilir bir şekilde üretilmesi gerekmektedir. Biyohidrojen, biyolojik yollardan yenilenebilir kaynaklar kullanılarak hidrojen üretimi, bu anlamda gelecek vadeden bir hidrojen üretim yöntemi olarak görülmektedir. Biyolojik hidrojen üretiminde kullanılan yöntemler aşağıdaki gibi gruplandırılabilir:

i. Mikroalg ve siyanobakteriler kullanılarak suyun biyofotolizi ile hidrojen üretimi (direk veya dolaylı biyofotoliz)
ii. Karanlık fermentasyon ile fermentatif bakteriler kullanılarak organik maddelerden biyohidrojen üretimi (fermentatif biyohidrojen)
iii. Fotofermentatif bakteriler kullanılarak ışık varlığında organik maddelerden biyohidrojen üretimi (fotofermentatif biyohidrojen)
iv. Hibrid sistemler (fermentatif ve fotofermentatif yolların ardışık olarak kullanılması)

Fermentatif bakteriler ışığa gerek duymadan, oksijensiz ortamlarda karanlık fermantasyon ile kompleks organik maddeleri (şeker, selüloz, nişasta gibi) basit organik bileşiklere (asetat, propionat, bütirat gibi) indirgeyerek yüksek hızda hidrojen üretimi sağlayabilmektedirler. Ancak bu yolla basit organik bileşiklerde bulunan enerji tam olarak hidrojene dönüştürülemez. Fotosentetik bakteriler ise ışıksız ortamda oluşan bu tür organik asit moleküllerini fotoheterotrofik koşullarda kullanarak hidrojene dönüştürürler. Bu nedenle hibrid sistemler, fermentatif ve fotofermentatif sistemlerin ardışık olarak kullanılması, yüksek hidrojen verimi eldesi vadetmektedir. Böyle bir sistemde, karanlık fermentasyon aşamasında elde edilen basit organik asitler fotofermentasyon ile CO_2'e kadar indirgenerek hidrojen üretim verimi arttırılabilir.

Rhodobacter capsulatus oksijensiz foroheterotrofik ortamlarda ve azot kıtlığında hidrojen üretebilen fotosentetik, gram negatif, mor-kükürtsüz bir bakteridir. *R. capsulatus*'un hidrojen metabolizmasında görev alan iki temel enzim vardır bunlar; nitrojenaz ve hidrojenaz enzimleridir. *R. capsulatus*, fotosentetik koşullarda ve azot kıtlığında, nitrojenaz enzimi ile basit organik asitleri kullanarak hidrojen üretir.

Fotosentetik hidrojen üretiminin temel avantajı, hidrojen üretimde güneş enerjisinden faydalanılmasıdır. Bu nedenle geliştirilen fotobiyoreaktörler, güneş enerjisinden optimal ölçüde faydalanacak şekilde tasarlanmalı ve dış ortam koşulları altında çalıştırılmalıdır. Yapılan çalışmalarda *R. capsulatus* bakterisinin kontrollü koşullar (sabit sıcaklık ve ışık) altında asetik asit kullanarak fotobiyoreaktörlerde yüksek verimde hidrojen üretebildiğini gösterilmiştir. Ancak, dış ortam koşulları altında yapılan çalışmalar gece-gündüz sıcaklık değişiminin hidrojen üretim verimini ciddi ölçüde etkilediğini göstermektedir. Bu nedenle reaktörlerin soğutulması veya ısıtılması gerekebilmekte, bu da fazladan enerji sarfiyatına yol açmaktadır. *R. capsulatus*'un optimal hidrojen üretimi sıcaklığı 30-32 °C'dir. Ancak dış ortam koşullarda reaktör sıcaklığı yaz aylarında gündüz 40 °C'nin üzerine çıkabilmekte, soğuk havalarda ise 10 °C'nin altına düşebilmektedir. Sıcaklık değişiminin hidrojen üretim verimi üzerine etkileri daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (ÖZGÜR, 2010). Buna göre, gün içinde 15 °C ile 40 °C arasındaki bir sıcaklık değişimi (Ankara'da çok daha ciddi günlük sıcaklık değişimleri gözlenebilmektedir) hidrojen üretim verimini %50 azaltmıştır.

Bu çalışmanın amacı hidrojen üretim koşulları altında farklı sıcaklık streslerine maruz bırakılan bakterilerin metabolik değişimlerinin mikrodizin ve proteomik yöntemleriyle araştırılarak değişen sıcaklık stresi etkisinin hidrojen metabolizmasına olan etkilerinin incelenmesidir. Mikrodizin çalışmalarında kullanılmak üzere *R. capsulatus* bakterisi için, internet veritabalarında mevcut olan genome sekansı kullanılarak "whole genome expression GeneChip" tasarlanmış ve Affymetrix firmasına ürettirilmiştir. Farklı sıcaklık streslerine maruz bırakılan bakteri kültürlerinden belli zaman aralıklarında örnekler alınmış ve RNA ve protein saflaştırmaları uzun optimizasyon çalışmalarının ardından başarı ile gerçekleştirilmiştir. Proje süresince ODTÜ Hidrojen Araştırma Laboratuvarı, ODTÜ Kimya Mühendisliği, ODTÜ Biyoloji Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Araştırma Laboratuvarı, ODTÜ Merkez Laboratuvarı Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi ve TÜBİTAK MAM GMBE'nin altyapı olanaklarından faydalanılmıştır.

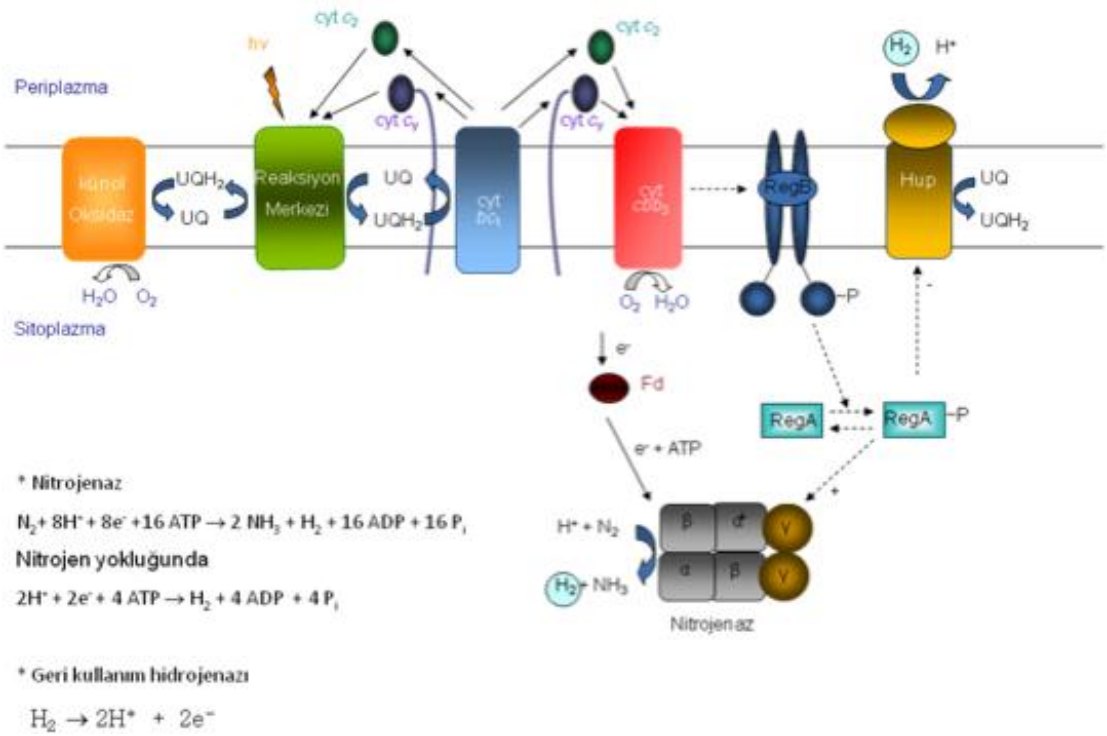
Çalışma sonucunda elde edilen veriler, soğuk ve sıcaklık stresine dayanıklı suşların geliştirilmesine yönelik yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Dünyadaki enerji kaynaklarının hızla tükenmesi ve fosil yakıtlarının çevre kirliliğine yol açması, yeni enerji kaynaklarının araştırılmasına neden olmuştur (BOCKRIS, 2002). Bunlar arasında çevre güvenliği açısından temiz, ve ucuz olan hidrojen önemli bir alternatif oluşturmaktadır (GOLTSOV ve VEZIROGLU, 2001). Organik maddelerin fotosentetik bakteriler tarafından kullanılarak hidrojene dönüştürülmesi temiz ve ucuz enerji elde edilmesi açısından olduğu kadar fabrika atıklarının etkin şekilde arındırılması açısından da çok önemlidir (TÜRKARSLAN, 1998; ARIK, 1996; EROĞLU, 1998). Yenilenebilir kaynaklardan, sürdürülebilir hidrojen üretimi amacıyla farklı biyolojik hidrojen üretim metotları uygulanmaktadır. Bunlar biyo-fotoliz, karanlık fermentasyon ve foto-fermentasyon olarak ayrılabilir (DAS ve VEZIROGLU, 2001; HALLENBECK ve BENEMANN, 2002). Biyo-fotoliz yöntemi ile hidrojen üretim hızı düşük olduğundan, diğer iki yöntem olan karanlık-fermentasyon ve foto-fermentasyon daha umut verici görülmektedir (HALL, 1995). Bu iki sistemin birlikte kullanılması hidrojen üretim verimini büyük ölçüde arttırmaktadır. Gıda üretimi yapan fabrikaların yan ürünleri veya atık suları hidrojen üretiminde hammadde olarak kullanıldığında, sistem atık rejenerasyonu yolu ile temiz enerji elde edilmesini sağlayabilir.

2.1 *Rhodobacter capsulatus*'un Hidrojen Üretim Metabolizması

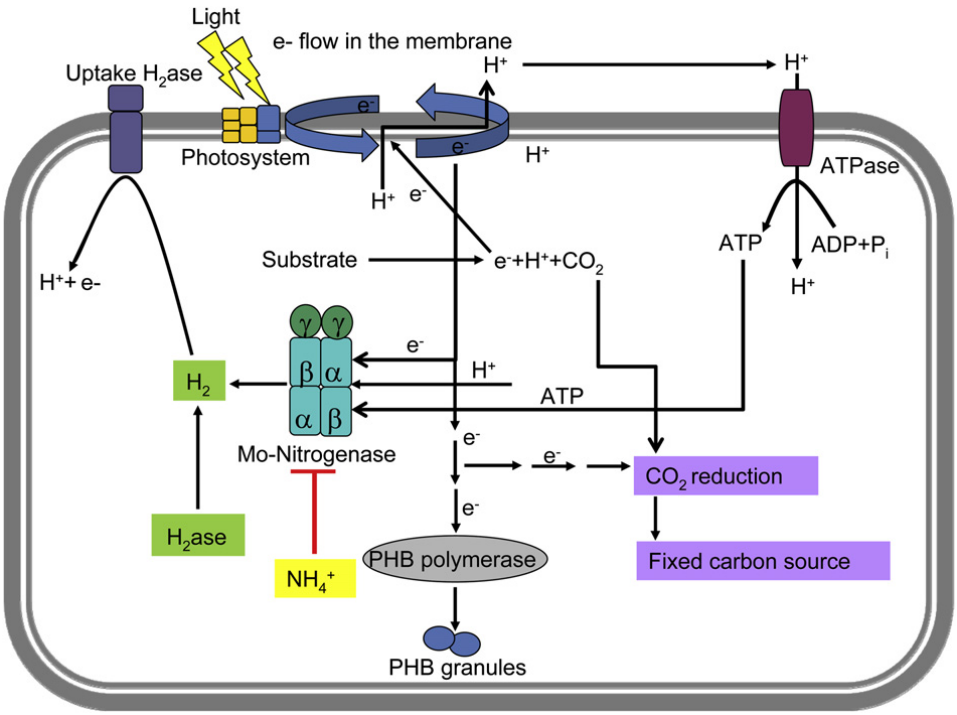
Fakültatif fotosentetik bir bakteri olan *Rhodobacter capsulatus* değişik çevre koşullarına uyum sağlayabilmekte olup fotosentez, oksijenli solunum, oksijensiz solunum veya fermentasyon gibi enerji dönüşüm yollarını kullanabilmektedir (IMHOFF, 1995). Enerji dönüşümünde görev alan elektron transfer zinciri, hücre iç zarına bağlı protein kompleksleri ve bunlar arasındaki elektron taşıyıcı sitokromlar aracılığı ile olmaktadır (DALDAL, 1994; ÖZTÜRK, 2008). *R. capsulatus* bakterisinde hidrojen üretilmesini sağlayan temel enzimler nitrojenaz ve hidrojenazdır (TAKAKUVA, 1980) (Şekil 2). Bakterinin sahip olduğu hidrojenaz enzimi, hücre zarına bağlıdır, [NiFe] içerir, doğrudan elektron transfer zinciri ile bağlantılıdır ve *hupSLC* genleri tarafından üretilir ve hidrojenin geri tüketimini katalize eder (PAUL, 1979; LECLERC, 1989).



Şekil 2. Elektron taşıma zinciri ve hidrojen metabolizmasında görev alan Nitrojenaz ve Hidrojenaz enzimi

Nitrojenaz enzimi N_2 fiksasyonunun yanı sıra azot kıtlığında ve fotoheterotrofik koşullarda redoks dengesini sağlamada görev alır (JOSHI ve TABITA, 1996). Bu koşullar altında nitrojenaz sistemi aktive olarak organik asitlerin (malat, asetat, laktat) oksitlenmesinden dolayı oluşan aşırı elektron yükünü fotonları indirgemede kullanarak yani hidrojene dönüştürerek uzaklaştırır (VIGNAIS, 1985). Bu yol ile birçok organik asitin fotosentetik ve azot kıtlığı altında hidrojene dönüştürüldüğü litaratürde gösterilmiştir (HILLMER ve GEST, 1977). Diğer fotosentetik bakteriler gibi *R.capsulatus* bakterisi de membrana bağlı geri kullanım hidrojenaz (uptake hydrogenase) enzimi sayesinde nitrojenaz enzimi tarafından üretilen H_2'i geri kullanarak bakterinin foto-ototrofik ve kemo-ototrofik (CO_2 karbon kaynağı, H_2 enerji kaynağı) büyümesini sağlamaktadır (VIGNAIS, 2001). Hidrojenaz enziminin üretilmesinin baskılanması ya da kromozomal mutasyon ile ortadan kaldırılması, elde edilen mutant bakterilere fotoheteretrofik koşullarda daha fazla hidrojen üretebilme kabiliyeti sağlamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda *hup*$^-$ (hidrojenazı silinmiş) *R. capsulatus* B10 soyunun laktat ve glutamat ortamında fotofermentasyon ile H_2 üretimleri test edilmiştir

(ZORIN, 1996). ODTÜ Biyohidrojen Grubu bünyesine yapılan benzer genetik manipulasyonlar ile (elektron taşıma zinciri ve hidrojen metabolizması üzerine) *R.capsulatus* MT1131 soyunun farklı mutantları elde edilerek test edilmiş, ayrıca yaban tipi ve sitokrom cbb_3 oksidazı olmayan soyların hidrojenaz enzimi kromozomdan silinerek daha fazla hidrojen üreten YO3 ve YO4 mutant bakterileri elde edilmiştir (ÖZTÜRK, 2006). Mor kükürtsüz bakterilerin hidrojen üretim metbolizmasının genel şeması ve diğer metabolik döngülerle ilişkisi Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Mor kükürtsüz bakterilerde hidrojen üretim metabolizması ve diğer metabolik döngülerle ilişkisi.

2.2 Çeşitli Stres Koşullarının Hidrojen Üretimine Etkisi

Mor kükürtsüz bakterilerin hidrojen üretiminde kullanılması üzerine literatürde birçok çalışma mevcuttur. Sıcaklığın hidrojen üretimi üzerine etkilerinin moleküler düzeyde incelendiği bir çalışma mevcut olmasa da, mor kükürtsüz bakterilerde farklı metabolik koşullar altında ifade edilen çeşitli sıcak stres (heat-shock, HSPs) ve soğuk stres (cold-shock, CSPs) proteinleri saptanmıştır. Diğer toprak bakterleri gibi *Rhodobacter* türleri de doğal ortamlarında çeşitli çevresel değişimlere maruz kalırlar. Bakterilerde sigma faktör denen stres proteinlerinin çevresel değişimlere adapte olmakta büyük rolü olduğu bilinmektedir. Çeşitli sigma faktörler farklı çevresel koşullarda (sıcaklık değişimi, besi yeri değişimi gibi) hızlı bir şekilde ifade edilerek bakterilerin bu değişime adapte olmasını sağlarlar. *R. sphaeroides*'te sıcaklık stresi altında $RpoH_I$ ve $RpoH_{II}$ denen sigma faktörlerinin ifadelerinin arttığı Green ve Donohue (2006) tarafından gösterilmiştir. *R. capsulatus*'da yine RpoH ifadesinin sıcaklık stresi ile arttığı gözlenmiştir (EMETZ ve KLUG, 1998). Sigma faktör transkripsiyon regülatorü olarak GroESL ailesine ait heat-shock protein (chaperonin) genlerinin transkripsiyonunu sağlar. Sigma faktör pozitif regülasyonu sağlarken, CIRCLE

element negatif regülasyonu sağlayarak normal sıcaklıklara dönüldüğünde stres proteinlerinin inaktivasyonunu sağlamaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda CIRCLE elementin *R. capsulatus*'da sıcaklık stresi regülasyonunda rol almadığı gözlenmiştir (JAGER, 2004). Soğuk stresi altında ise bakterilerde farklı bir regülasyon sisteminden bahsedilmektedir. Bakteriler soğuk stresine çeşitli metabolik değişimlerle adapte olurlar. Bunlar, i) hücre zarı akışkanlığının azalması, ii) RNA ve DNA ikincil yapılarının stabilizasyonu, iii) protein katlanmasının yavaşlaması ve iv) ribozomal fonksiyonların engellenmesi olarak sıralanabilir (PHADTARE, 2004). Bakterilerde soğuk stresi altında iki farklı protein ailesinin ifadesinin arttığı bilinmektedir. Cold shock proteinler (CSPs) soğuk stresine maruz bırakıldıktan kısa bir süre sonra ortaya çıkar. Stres süresinin uzaması soğuk aklimasyon proteinlerinin (cold acclimation proteins, CAPs) sentezlenmesine neden olur (PANOFF, 1998). CSP'ler küçük proteinler olup genellikle RNA'ya bağlanırlar ve böylece RNA stabilitesinin artmasını sağlarlar. Sıcaklık stresi ile ilgili çeşitli regülator proteinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin belirlenmesine rağmen, soğuk stresi ile ilgili *Rhodobacter* türlerinde literatür bilgisi oldukça sınırlıdır. *R. capsulatus* ile yapılan bir çalışmada soğuk stresi ile alakalı olduğu bilinen *cypA* mRNA'sının stabilitesinin soğuk stresi ile arttığı gözlenmiştir (JAGER, 2004).

Literatürde şimdiye kadar *Rhodobacter* türleri (*R. capsulatus* ve aynı aileden olana *R. sphaeroides*) üzerine birçok proteomik araştırma yapılmıştır. Örneğin mavi ışığa maruz bırakılan ve düşük oksijenli ortamda büyütülen mavi ışığın genome üzerindeki tüm gen ifadelerine olan etkisini ve fotosensör mekanizmasını açığa çıkarmak için *R. sphaeroides' in* transcriptom profili mavi ışık irradiasyonu altında incelenmiş ve *R. sphaeroides* bakterisinde, fotosistem oluşmasından sorumlu *puc* and *puf* operonlarının baskılandığı görülmüştür. Fakat fotooksidatif hasar düzeltme mekanizmasında görev alan bazı genlerin, örneğin deoxypyrimidine photolyase, glutathione peroxidase, ve quinol oxidoreductases gibi, ifadelerinde artış olduğu gözlenmiştir (BRAATSCH, 2004). Diğer bir çalışmada Mass and Time (AMT) Tag proteomik yaklaşımı kullanılarak *Rhodobacter sphaeroides 2.4.1.* soyuna ait aerobik ve fotosentetik kültürlerden sitoplazma, sitoplazmik hücre zarı, periplazma ve dış hücre zarı proteinleri fraksiyonları incelenerek yaklaşık 8300 peptit tanımlanmış ve proteinlerin lokalizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (CALLISTER, 2006). Yine *R. sphaeroides 2.4.1.* soyunda yapılan benzer bir çalışmada aerobik ve fotosentetik kültürlere ait proteomlar sıvı kromotograf-kütle spektrometri ile analiz edilerek yaklaşık 6,500 peptid yaklaşık 1,675 gen ürünü (%39 tahmini protein) belirlenmiştir. Oksijenli solunum ve fotosentetik ortamda büyütülen kültürlerde gözlenen proteinlerin karşılaştırılmaları her iki büyüme şekline biyoenerjitik model olarak yeni bilgi ve açıklama olanağı sunmuştur (CALLISTER, 2006). Yapılan bir başka çalışmada *R. capsulatus* DsbA mutant bakterisinin 35 ºC de solunumla büyümede yetersiz kalmasının nedeninin aşırı miktarda periplazmik proteaz DegP'nin üretilerek bakteriyi sıcaklığa hassas hale getirdiği gösterilmiştir (ÖNDER, 2008). Biyoteknoloji dergisinde (Biotechnology Journal) yayınlaman başka bir derlemede genel olarak ekonomik değeri yüksek mikroorganizmaların genomları bilinmesine rağmen litaratürde sadece birkaç örnek doğrudan proteomik yaklaşım kullanılarak ürün prosesinin optimizasyonunu sağlamada kullanıldığını göstermiştir (JOSIC ve KOVAC, 2008). Bahsedilen derleme makalede, proteomik yaklaşımın şimdiki ve geleceğin biyoproses tasarımına ve optimizasyonuna olan etkisi tartışılarak mikroorganizmanın veriminin artırılmasına ya da hedeflenen ürünü etkilemeye yönelik iyileştirmesine olan katkısı vurgulanmıştır. Mikroorganizmaya ait proteomik bilgisinin, çevresel faktörlerin değişimine (sıcaklık ve besin ortamı gibi) olan tepkisi ve adaptasyonu tahmin etmede büyük yardımı olacağı vurgulanmıştır.

Literatürdeki çalışmalardan da anlaşılacağı üzere *Rhodobacter* türlerinde transkriptomik ve proteomik yaklaşımlar uygunalanarak farklı çevresel koşullarda (oksijenli solunum, fotosentetik koşullar gibi) büyütülen kültürler üzerine araştırmalar yapılarak bu koşulların bakterinin enerji metabolizmasına etkileri aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ayrıca mikroorganizmalara ait proteomik bilgisinin hedeflenen ürünün eldesindeki verimliliği artırmasına ve çevresel faktörlerin olumsuz etkilerini önlemeye yönelik optimizasyon

çalışmalarına olan büyük katkısı vurgulamıştır. Bu proje kapsamında gerçeleştirilen çalışmalardan elde edilen veriler de bu bağlamda litaratüre büyük katkı sağlayacak ve *R. capsulatus* bakterisine ait elde edilen transkriptom ve proteomik bilgilerin fotofermantatif koşullarda ve basit organik asitler varlığında (asetat gibi) çevresel faktörlerin biyolojik hidrojen üretim metabolizmasına olan olumlu ve olumsuz etkileri açığa çıkarılarak proses optimizasyonunda ve genetik yöntemlerle soy geliştirilmesine (ÖZTÜRK, 2006) büyük yararı dokunacaktır.

Bu projede *R. capsulatus* (DSM1710) suşunun soğuk ve sıcaklık stresi uygulanarak hidrojen üretim koşulları altında metabolik değişimlerinin moleküler düzeyde mikrodizin ve proteomik yöntemleri kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu hedefe ulaşmak için aşağıda sıralanan çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

1. *R. capsulatus* için ekspresyon çipi tasarımı

2. Bakterilerin büyütülmesi ve stres uygulaması (Fizyolojik çalışmalar)

3. Mikrodizin analizi (RNA saflaştırma ve karakterizasyonları, cDNA sentezi optimizasyonları, mikrodizin veri analizi)

4. Proteomik analizi (LC-MS-MS)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Mikroorganizma

Rhodobater capsulatus DMS1710 suşu Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Alman Mikroorganizma Hücre Kültürü Koleksiyonu)'dan temin edildi.

3.2 Bakteri Aktivasyonu Besi Yeri

Rhodobacter capsulatus'un aktivasyonunda Tablo 1'de verilen MPYE (minimal peptone yeast extract) besi yeri kullanıldı. Katı besi yeri için MPYE besi yerine %1.5 oranında agar ilave edildi. Derin dondurucuda (-80 °C) gliserol stok olarak mufaza edilen bakteriler MPYE-agar katı besiyerine ekilerek 37 °C'de koloni oluşuncaya kadar inkübe edildi. Oluşan koloniler MPYE sıvı beri yerine aktarıldı ve 37°C, bakteri derişimi OD660nm'de 1.0'a ulaşıncaya kadar büyütüldü.

Tablo 1. MPYE Besi yeri içeriği (1 L için)

Madde	Miktar
Baktopepton	3 g
Yeast extract	3 g
MgCl	1.6 ml (1M stok solusyonundan)
CaCl	1ml (1M stok solusyonundan)

Tüm bileşenler distile suda çözülür, pH 7.0'ye ayarlanır ve otoklavlanarak sterilize edilir.

3.3 Bakteri Büyüme ve Hidrojen Üretim Besi Yeri

Aktive edilen bakteriler 20 mM asetat, 10 mM glutamat içeren Bieble-Phennig büyüme ortamına (Tablo 2) %10 (v/v) inokülasyonla aktarıldı. Büyüme için 50 ml'lik şişe reaktörler kullanıldı. Ortamdaki oksijen argon kullanılarak uzaklaştırıldı. Bakteriler 30 °C'de 2000 lux ışık şiddeti altında, oksijensiz koşullarda büyütüldü. Büyüyen bakteriler (OD_{660} değeri 1.-1.5 aralığında iken) 30 mM asetat, 2 mM glutamat içeren Bieble-Phennig hidrojen üretim ortamı (Tablo 2) içeren 150 ml'lik şişe reaktörlere inoküle edildi (%10 v/v). Argon kullanılarak oksijensiz ortam sağlandıktan sonra, reaktörler 30°C'de, 200 lux ışık şiddeti altında inkübe edildi. Üretilen hidrojen ölçeklendirilmiş gaz toplama tüpleri kullanılarak sıvı değişim yöntemi ile toplandı (Şekil 4). Hidrojen üretimi süresince günlük pH, büyüme ve organic asit analizleri için örnekler alındı. Üretilen gazdaki hidrojen oranı gaz kromatografisi ölçümleri ile takip edildi.

Tablo 2. Büyüme ve hidrojen üretim besi yerleri içeriği (1 L için)

Besi Yeri Bileşenleri	**Büyüme 20mM/10mM A/G**	**Hidrojen Üretimi 30 mM/2 mM A/G**
KH_2PO_4	3 g	3 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g	0.5 g
$CaCl_2.2H_2O$	0.05 g	0.05 g
Acetic acid	1.15 ml	2.29 ml
Na-Glutamate	1.85 g	0.36 g
Vitamin Solution (10x) *	0.1 ml	0.1 ml
Mikro Element Solüsyonu (10x) **	0.1 ml	0.1 ml
Fe-citrate (50x) ***	0.5 ml	0.5ml

Vitamin solüsyonu dışındaki bileşenler çözdürülüp pH 6.8'e ayarlandıktan sonra hacim 1 L'ye tamamlanır. 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Filtre sterilizasyonu yapılmış vitamin solüsyonu steril koşullarda eklenir.

*Vitamin Solüsyonu (100 ml, 10X): Tiamin (500 mg), Niacin (500 mg), Biotin (15 mg). 0.45 µm filtre ile sterilize edilir.
** Mikro Element Solusyonu Bileşenleri (100 ml, 10X)

Tablo 3. Mikro element solüsyonları bileşenleri (100 ml, 10X)

İçerik	**Miktar**
$ZnCl_2$	70 mg
$MnCl_2.4H_2O$	100 mg
H_3BO_3	60 mg
$CoCl_2.6H_2O$	200 mg
$CuCl_2.2H_2O$	20 mg
$NiCl_2.6H_2O$	20 mg
$NaMoO_4.2H_2O$	40 mg

HCl (25% v/v)	1 ml

Tüm bileşenler distile suda çözülür ve otoklavlanarak sterilize edildikten sonar 4 °C'de saklanır.

*** Demir Sitrat Solusonu (50X): 5 g demir sitrat 100 ml distile suda çözülür, otoklavlanarak sterilize edilir.

Şekil 4. Reaktör ve hidrojen üretim düzeneğinin şematik gösterimi

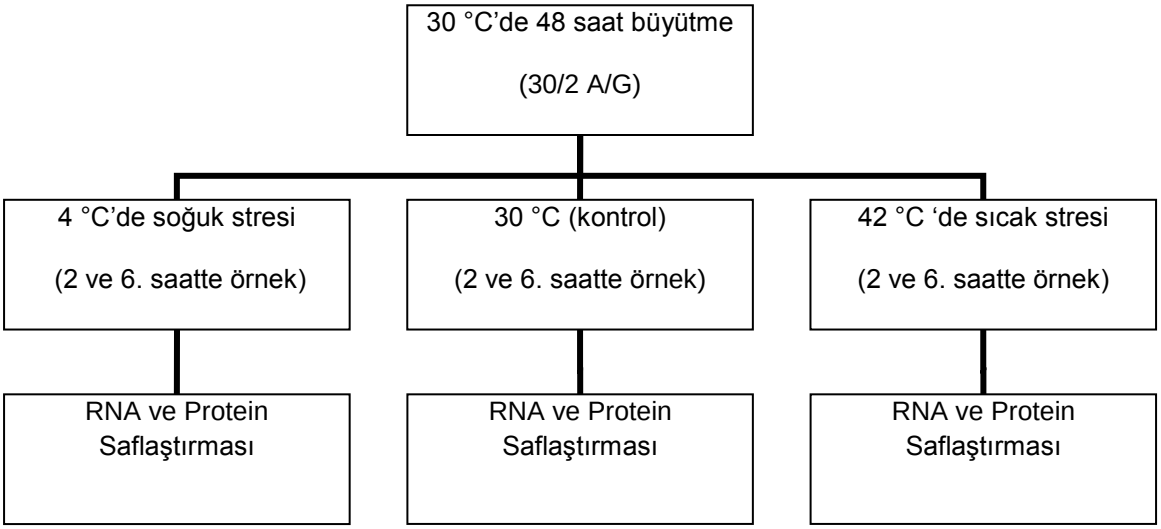
3.4 Analitik Ölçümler

Kültürlerdeki pH değişimi, büyüme, organik asit ve gaz kompozisyonu değişimi 7 gün süreyle günlük olarak takip edildi. Bakteri büyümesi spektrofotometrik olarak OD 660nm'de ölçüldü (Shimadzu UV-1201). pH değişimi pH metre (Mettler Toledo 3311) ile takip edildi. Organik asit analizi HPLC (Shimadzu 10A series) ölçümleri ile takip edildi. Bunun için, örnekler 45 µm naylon filtrelerden (Millipore, 13 mm) süzüldü ve Alltech IO-1000 (300 mm x 7.8 mm) HPLC kolonu ile analiz edildi. Mobil faz olarak 0.085 M H_2SO_4, 0.4 ml/dk akış hızında kullanıldı, basınç 66 psi'de sabit tutuldu. UV dedektörü (Shimatzu FCV-10T) ile 210 nm'de ölçümler alındı. Üretilen gazın kompozisyonu termal kondaktivite dedektörü bulunan gaz kromatografı (Agilent Technologies, 6890N) ile Supelco Carboxen 1010 kolonu kullanılarak tayin edildi. Argon 26ml/dk akış hızında taşıyıcı gaz olarak kullanıldı. Fırın, enjeksiyon ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 140, 160 ve 170 °C'de tutuldu.

3.5. Stres Uygulaması, Mikrodizin ve Proteomik Örneklerinin Toplanması

RNA saflaştırması için, 48 saat süresince 30°C'de hidrojen üretim koşulları altında büyütülen bakteriler, soğuk stresi için 4 °C'ye, sıcak stresi için ise 42 °C'ye ayarlanmış inkübatörlere alındı. Kontrol kültürleri 30 °C'de büyütülmeye devam edildi. Stresin verilmeye başlandığı saatte (0. saat), 2. ve 6. saatlerde RNA ve protein saflaştırması için örnekler alındı. Örnek alımlarında takip edilen deneysel düzenek Şekil 5'te

gösterilmiştir. Deney 3 biyolojik tekrar olacak şekilde yapıldı. RNA izolasyonu için reaktörlerden alınan bakteri örnekleri OD660 nm'de spektrofotometre ile ölçülerek hücre sayısı belirlendi. Herbir örnekte $1x10^9$ hücre/ml olacak şekilde 2 ml'lik eppendorf tüplerine konuldu. 12,000 g'de sentrifüjlendikten sonra sıvı azot içerisinde dondurularak -80 °C'de muhafaza edildi. Proteomik örnekleri mikrodizin analizi için toplanan örneklerle eş-zamanlı olarak aynı kültürlerden toplandı. 1 ml *R.capsulatus* kültürü en yüksek devirde (14.000 rpm) bir dakika döndürülerek çöktürüldü; süpernatan uzaklaştırıldı ve pelet 1 ml 50 mM NH_4HCO_3 ile yıkandı. Pelet iki kez daha yıkanıp uzun süreli saklama için -80 °C muhafaza edildi.



Şekil 5. RNA ve protein örneklerinin toplanması için uygulanan deneysel düzenek (A: Asetat; G: Glutamat)

3.6 RNA Saflaştırması ve Karakterizasyonu

Affymetrix firmasının prokaryotik çip hibridizasyonu protokolünde önerdiği minimum RNA miktarı 10 µg olarak belirtilmiştir. Çipe yüklenebilecek maksimum RNA solüsyonu miktarı ise 18 µl ile sınırlıdır. Bu durumda, RNA saflaştırmasında erişilmesi gereken minimum RNA miktarı 555 ng/µl'dir (10/18 = 0.555). Bir diğer önemli husus ise elde edilen RNA'nın yüksek saflıkta olmasıdır, ki bu $OD_{260/280}$ oranının 1.8 ile 2.1 arasında olması ile deneysel olarak ispatlanır.

RNA saflaştırması için, yaygın olarak kullanılan TRIZOL metodu takip edilmiştir. Protokol olarak Invitrogen'in TRIzol® Max. Bacterial RNA Isolation Kit için önerdiği protokol (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizolmax_man.pdf) baz alınmıştır.

RNA saflaştırması için $2x10^9$ bakteri içerdiği hesaplanan hücre hacmi eppendorflara koyuldu. Üzerine 200µL 5mg/mL lizozim eklendi ve pipet kullanarak karıştırıldı. 10 dakika her 5 dakikada bir vorteksleyecek şekilde 37 ºC'de inkübe edildi. 1 ml Trizol eklenip 5 dakika vortekslendi. 0.2 ml kloroform eklenip ve 15 sn çalkalanarak karıştırıldı. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra örnekler 15 dakika 12000 g'de 4 ºC'de santrifüjlendi. Santrifüjden sonra elde edilen 3 fazın (altta kırmızı- fenol/klorofom fazı, orta faz ve üstte RNA içeren renksiz sıvı faz) en üst fazı dikkatlice yeni bir ependorfa aktarıldı. RNA'yı çöktürmek için 0.5 ml soğuk izopropanol eklenip oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Örnekler 10 dakika 15000 g'de

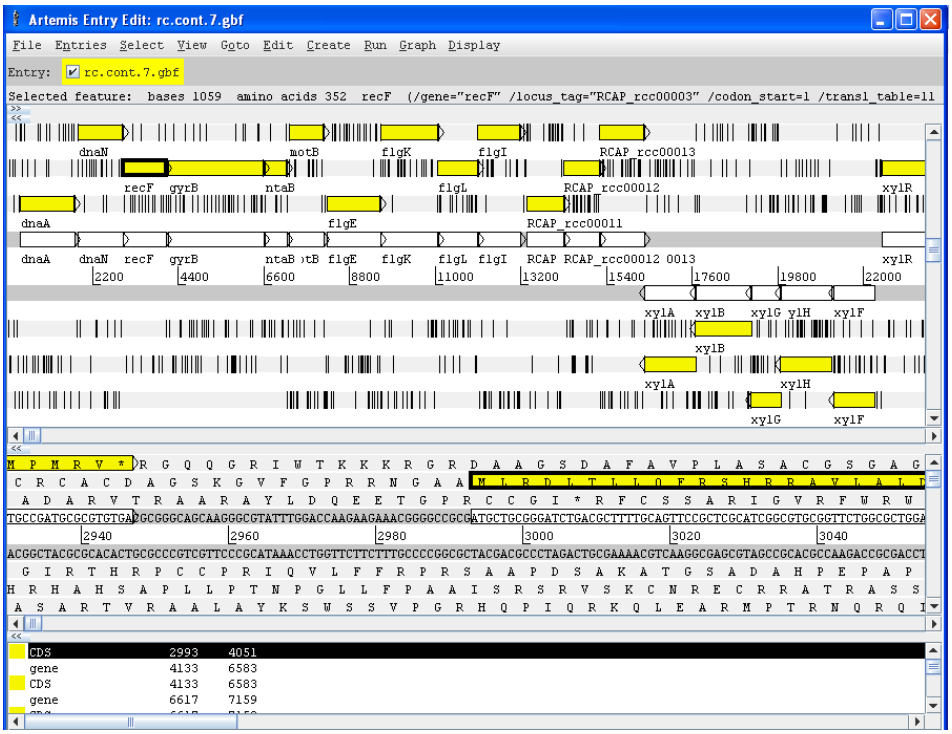
4 ºC'de santrifüjlendi ve supernatanı atıldı. Oluşan pellet 1 ml %75'lik soğuk etanolle tekrar çözüldü. Örnekler 5 dakika 7500 *g*'de 4 ºC'de santrifüjlenip peletin üzerindeki fazla etanol alındı ve havada kurumaya bırakıldı. Pelet 20-50 µl RNaz içermeyen suda pipetleme işlemi yaparak çözüldü ve 60ºC'de 10 dakika inkübe edildi.

Alınan örneklerden mikrodizin sistemi için gerekli olan yüksek miktar (≥ 550 ng/µl) ve saflıktaki (260/280 : 1.8-2.1) RNA'lar belirtilen koşullarda başarı ile saflaştırıldı. RNA miktarı NanoDrop™ ND100 spektrofotometre ile tayin edildi. Saflaştırılan RNA'ların saflık ve kalitesinin belirlenmesi Agilent 2100 Bioanalyzer (Expert_Prokaryote Total RNA Nano Çip) kullanılarak Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide'da belirtildiği üzere yapıldı.

3.7. *Rhodobacter capsulatus* için Mikrodizin Ekspresyon Çipinin Tasarlanması

Rhodobacter capsulatus bakterisinin tüm genomunun fiziksel haritası Prof. Dr. Robert Haselkorn ve ekibi tarafından çıkarılmış ve http://rhodo.img.cas.cz internet sitesine yüklenmiştir (HASELKORN, 2001, STRNADL, 2010). Mikrodizin çiplerinin hazırlanmasında bu sitede yer alan genom sekansı kullanılmıştır. *R. capsulatus*'un genomu dairesel bir kromozom ve bir adet plazmidden oluşmaktadır. Kromozom ve plazmidin uzunlukları sırasıyla 3.738.958 ve 132.962 baz çiftidir. Kromozom üzerinde 3531, plazmid üzerinde ise 154 açık okuma alanı mevcuttur. Ayrıca, 53 tRNA ve 4 rRNA operonu vardır. Bu açık okuma alanlarından 3100 tanesinin fonksiyonu belirlenmiştir, 610 tanesinin veritabanlarındaki hipotetik genlerle benzerlikleri olduğu bulunmuştur. Geriye kalan açık okuma alanlarının veritabanlarında herhangi bir homoloğu bulunmamaktadır. Bakterinin nükleotid sekansı kromozom için CP001312 ve plasmid için CP001313 erişim numaralarıyla GenBank'ta mevcuttur (Strnadl, 2010).

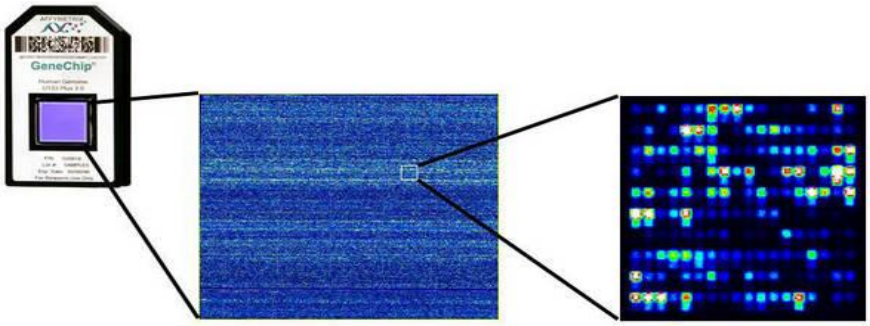
R. capsulatus genomunun bu özellikleri göz önüne alınarak tüm genom ekspresyon çipi tasarlandı. Öncelikle GeneChip® CustomExpress™ Array Design Guide'da belirtildiği üzere FASTA formatında sekans dosyası hazırlandı. Bunun yanında prob setlerinin isimlerinin, ürünlerinin ve fonksiyonlarının belirtildiği bir talimat dosyası hazırlandı. Genomda belirlenen tüm genlerin yanı sıra bazı intergenik bölgelerin de çip üzerinde bulunması istendi. Ekspresyon çiplerini üretecek olan Affymetrix firması ile görüşmelerin sonucunda çip kapasitesi göz önüne alınarak uzunluğu 300 baz çiftinden fazla olan intergenik bölgeler Sanger Enstitüsü (İngiltere) tarafından geliştirilen ARTEMIS programı kullanılarak belirlendi. Şekil 6'da ARTEMİS programının ana penceresinden görünümü verilmektedir.



Şekil 6. ARTEMIS programının ana penceresinin görüntüsü

Affymetrix Custom Array Design ekibine gönderilen sekans dosyasına 200 intergenik bölge ve bunların komplementer bölgelerinin sekansları da eklenmiştir. Aynı zamanda çipler üzerine hedef hazırlama, hibridizasyon kontrolü, hiza kontrolü ve kalite kontrolü için de problar yerleştirilmiştir. Hedef hazırlama kontrolleri *B. subtilis*'ten gelen ve Poly-A kontrolleri olan *dap, lys, phe, thr, trp* genleridir. Hibridizasyon kontrolleri ise *E. coli*'den gelen *bioB, bioC, bioD* ve P1 bakteriofajından gelen *cre* genidir. Hiza ve çip kalite kontrolleri için çip üzerine döşenen kenarlarda, köşelerdeki bloklar, çipin ortasında bırakılan boş blok ve çip ismi kullanılmaktadır.

R. capsulatus bakterisi için tasarlanan GeneChip'ler antisense DNA dizinleridir. Probları taşıyan her bir noktanın boyutu 11 mikron ve çip formatı 100-3660'dır. Problar genlerin ve genler arası bölgelerin 3' ucundaki 600 bazdan seçilmiştir. Her dizi (sekans) için tam eşleşen/eşleşmeyen prob (ortadaki bazda tek bir baz değişikliği) stratejisi ile 13 prob çifti üretilmiştir. Tüm sekanslar birbirleri ile karşılaştırılarak budanmıştır. Toplamda mikrodizin üzerine 4052 prob seti yerleştirilmiştir (Şekil 7). Çip ismi Affymetrix.GeneChip®.TR_RCH2a520699F olarak belirlendi.



Şekil 7. Affymetrix GeneChip®

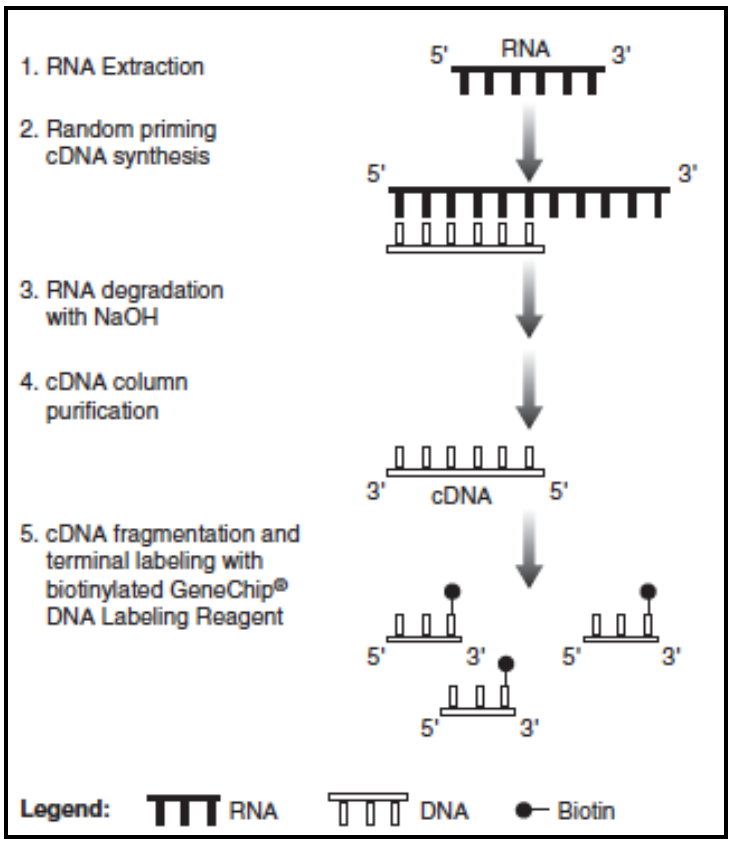
3.8 Mikrodizin Analizi

Saflaştırılan RNA'ların hibridizasyon öncesi cDNA sentezi dönüştürülmesi, saflaştırılması ve hibridizasyonunda Affymetrix firmasının önerdiği "Affymetrix Expression Analysis Technical Manual for Prokaryotic Target Preparation" protokolü takip edildi. cDNA sentezi,, fragmantasyon ve biyotin ile işaretleme aşamaları şematik olarak Şekil 8'de gösterilmiştir.

Biyotin ile işaretlenen fragmanlar ODTÜ Merkez Laboratuvar Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi'nde bulunan *Affymetrix Fluidics Station* cihazı kullanılarak hibridizasyon, yıkama ve tarama aşamaları tamamlanmıştır. Bu aşamalar "Affymetrix GeneCeneChip Expression Analysis Technical Manual" da (Ek 1) belirtilen metodlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin hibridizasyon için hazırlanmasında ve hibridizasyon sırasında kullanılan yöntemde, Affymetrix tarafından yüksek GC oranına sahip organizmalar için önerdiği protokol uygulanmıştır (Flex FS450_0002).

3.8.1 Veri Analizi

Mikrodizin veri analizi GeneChip Operating Software (GCOS) 1.4 (Affymetrix) kullanılarak yapıldı. Çipler GCOS ile tarandıktan sonra elde edilen data dosyaları GeneSpring GX 11 (Agilent) programı kullanılarak ileri veri analizi yapıldı.



Şekil 8. Prokaryotik örnek hazılama şeması (Affymetrix Expression Analysis Technical Manual for Prokaryotic Target Preparation).

3.9 Proteom Analizi

3.9.1 Örneklerin Hazırlanması

Proteom analizi TÜBİTAK MAM-GMBE'de bulunan LC-MS-MS cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Analizlerin yapılmasına yakın, örnekler -80 °C'den çıkarılarak buz üzerine alındı ve çözünmesi beklendi. Örneklerin üzerine 200 µl SDS (%4) eklendi ve hücre parçalanması başlatıldı. SDS eklendikten sonra hücreler buz üzerinde sonike edildi (6 saniye açık, 4 saniye kapalı ve 6 döngü olacak şekilde). Hücreler tamamen parçalanana kadar sonikasyon süresi arttırılabilir. Hücreler parçalandıktan sonra oluşan protein çözeltisini, büyük membran yapıları ve hücre duvarı ve parçalanmamış hücrelerden ayırmak için en yüksek devirde (14,000 rpm) 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Protein çözeltisinde bulunan SDS' i tamamen uzaklaştırmak için, protein çözeltisi gece boyu -20 °C' de kendi hacminin en az iki katı kadar önceden soğutulmuş aseton (%100) içerisinde bekletildi. Çökelme durumuna gelmiş olan proteinlerin tamamen pelet haline gelmeleri için 14,000 rpm hızda 15 dakika çevrildi, süpernatant aspiratörle uzaklaştırıldı. Oluşan pelet 10 dakika boyunca vakumlu kurutucuda kurutuldu. Kurutma işlemi bitince, pelet 200 µl RapiGest (1 mg/ml) deterjanı içerisinde çözüldü ve önceden bahsedildiği gibi sonike edildi. Sonike olmuş olan solüsyon 15 dakika santrifüj edilerek, süpernatanı protein miktar analizi için saklandı. Protein miktar analizi Bradford metoduna göre yapıldı. Protein örnekleri derişimleri 50 ng/µl olacak şekilde HPLC derece suyla seyreltildi. 50 µl örnek alınarak üzerine 5.5 µl DTT eklendi ve örnek 15 dakika

boyunca 60 °C sıcaklıkta inkübe edildi (bu işlem proteinlere üçüncül şeklini almasında yardımcı olan SH bağlarının kırılmasını ve üçüncül yapının bozulmasını sağlar). Daha sonra 6.1 µl IAA örnekler üzerine eklendi ve örnekler 30 dakika karanlık ortamda inkübe edildi (bu işlem DTT ile açılmış olan üçüncül yapının tekrar kazanılmasını SH gruplarını metilleyerek önlemektedir). 50 µl tripsin (1 mg/ml) eklenerek örnekler gece boyu 37 °C' de inkübasyona bırakıldı. Gece boyu inkübasyon sonucunda spesifik amino asit dizilerinde peptid bağları kırıldı. Tripsin ile muamele görmüş olan örneklerin üzerine, 3 µl TFA, 2 µl Asetonitril ve 5 µl phosphorylase B (kalibrant) eklendi ve hacimleri 200 µl olacak şekilde üzerleri 50 mM NH_4HCO_3 kullanılarak tamamlandı. Örnekler 2 saat boyunca 60 °C sıcaklıkta 600 rpm hızda çalkalandı ve örneklerin 20 µl'si LC-MS-MS viyallerine koyularak cihaza yüklendi.

3.9.2 Veri Analizleri

3.9.2.1 Protein İfade farklılıkları analizi

Bakteri protein ifade farklılıklarının ve metabolit miktarlarının belirlenmesinde takip edilecek örnek hazırlama protokolleri, ileri düzey kromatografik ayrıştırma yöntemleri, kütle spektroskopisi analiz protokolleri ve ham verilerin işlenebilmesi için kullanılacak biyoinformatik yazılımlar hakkında ayrıntılı metot tanımlamaları aşağıda belirtilmiştir. Farklı sıcaklık ve zaman aralıkalarında örneklenen bakteri kültürlerinden tüm protein (total protein) ekstrakte edilerek, ardından tuzlardan temizlendi ve sonra tripsinizasyon ile triptik peptitler elde edildi. Peptitlerin ve metabolitlerin kütle spektrometresi ile LC-MS^E temelli analizlerinden sonra da çeşitli biyoinformatik yazılımları ile protein ifade farklılıkları ve metabolit düzeyleri hesaplandı.

3.9.2.2 MS ve MS/MS Deney kurulumu

MS analizi kütle spektrometresi peptitlerin bütünü hakkında bilgi toplamak için gerçekleştirilir, MS/MS analizi ise peptitlerin amino asit dizisi hakkında bilgi toplamak için gerçekleştirilir. Peptitlerin analizi için kullanılan yöntem Waters'ın MS^E sistemi diye adlandırılan SYNAPT-HDMS sisteminde önce 5 eV daha sonra 25-40 eV çarpışma enerjisindeki analiz yöntemidir. Bu yöntemde her bir çarpışma enerjisinde 1.5 s kadar veri toplanıp ve belirli m/z aralığında olan yüklü parçacıklar taranır. Bu şekilde hem molekülün bütünü hakkında hem de onu oluşturan parçalar hakkında daha fazla bilgi alınabilmektedir. Yöntemin sağladığı avantajlar şunlardır: i) Teorik olarak tripsin ile bir proteinin parçalanmasından sonra elde edilebilecek triptik peptitlerin gerçekte kaç tanesinin görüldüğü % sekans tanımlamasını belirler, yani daha fazla peptit tanımlanmış ise protein tanımlaması daha güçlüdür. ii) Her bir peptitde parçalanma sonrasında oluşan *b* ve *y* iyon serileri olarak adlandırılan parçacıkların sayısının fazlalığı amino asit dizisinin daha doğru ve güvenilir bir şekilde belirlenmesini sağlar. Sonuç olarak MS^E yöntemi ile daha doğru ve daha fazla sayıda proteinin tanımlaması gerçekleştirilecektir.
Metabolit tanımlamaları için MarkerLynx yazılımı kullanıldı. Kromatografik ayrıştırmanın ardından kütle spektrometresine giren metabolit parçalanır ve parçalanma şablonuna göre de standart metabolit kütüphaneleri ile karşılaştırılarak metabolit tanımlaması gerçekleştirilir.

3.9.2.3 Karşılaştırmalı grup analizi

Karmaşık protein örneklerinden elde edilen triptik peptitlerin analizi esnasında binlerce kütle spektrası elde edilmektedir. Bu ham verilerden başlayarak protein miktarlarındaki değişimlerin hesaplanabilmesi için çeşitli yazılımların kullanılması gerekmektedir. Projede bakteri örneklerinden izole edilen proteinlerdeki ekspresyon farklılıklarının analizi için PLGS-$Expression^E$ modülü ve alternatif bir yöntem olarak da "İnsilicos Proteomics Pipeline" (IPP) platformu kullanıldı. Bu biyoinformatik yazılımlar ile her bir örnek gurubundaki protein farklılıkları hesaplandı.

3.9.2.4 PLGS Expression^{E} protein ekspresyon analizi

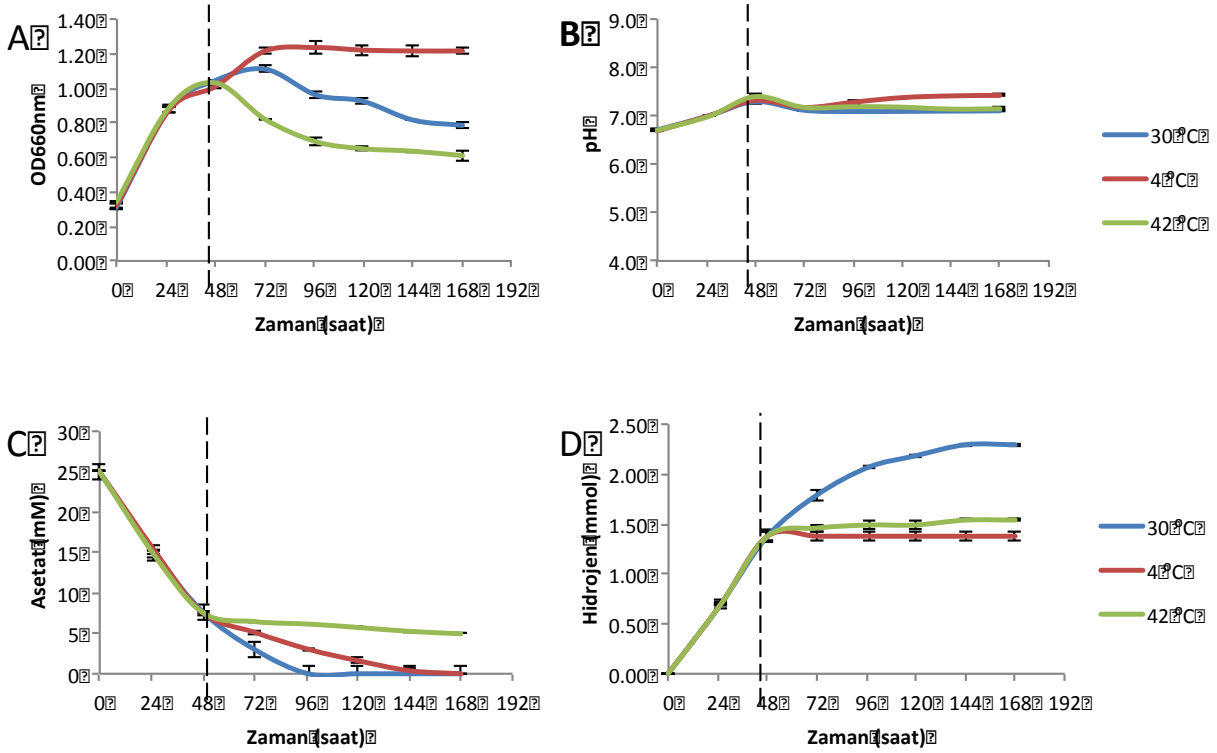
Protein miktarlarındaki değişimlerin hesaplanması için PLGS-Expression^{E} modül kullanıldı. Bu modül XML tabanlı informatik bileşenleri ile kalitatif ve kantitatif hesaplamaların gerçekleştirildiği protein biyobelirteç keşif platformudur. Bu analiz yönteminde her bir bakteri protein karışım örneği üç defa analiz edildi ve üç analizden en az iki tanesinde tanımlanan peptitler hesaplamalara dahil edildi. Yöntemde aynı bakteriden farklı sıcaklık ve zaman aralıklarında alınan örnekler grup olarak karşılaştırılarak grupları birbirinden ayıran proteinler tanımlandı. Expression^{E} modülü ile elde edilen veriler t-test filtrelemelerine tabi tutularak istatistiksel olarak anlam ifade eden protein farklılıklarının listelenmesi gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1 Fizyolojik Bulgular

Soğuk ve sıcaklık stresinin fizyolojik etkilerini gözlemlemek amacıyla, optimum koşullarda (30°C, 2000 lux, hidrojen üretim besi yeri) 48 saat boyunca büyütülen *R. capsulatus* bakterileri, bu süre sonunda soğuk (4 °C) ve sıcaklık (42 °C) streslerine maruz bırakıldı. Büyüme, pH değişimi ve organik asit tüketimi 7 gün boyunca günlük örnekler alınarak takip edildi.

R. capsulatus'un farklı sıcaklıklardaki (4 °C, 30 °C ve 42 °C) zamana bağlı bakteri büyümesi, pH değişimi ve asetik asit tüketim grafikleri Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Hidrojen üretim ortamında sıcaklık stresi altında bakteri büyümesi (A), pH değişimi (B), organik asit tüketimi (C) ve hidrojen üretimi (D). Kesikli çizgi stres uygulama zamanını göstermektedir.

R. capsulatus mezofilik bir bakteridir ve mezofilik bakteriler için optimum büyüme 20 °C ile 40 °C arasındadır. Sıcaklık değerleri bu aralığı aştığında bakteri büyümesi durur ve Şekil 9 'da da görüldüğü gibi bakteriler ölme fazına girerler. Yüksek sıcaklıklar proteinleri denature ettiğinden, büyüme ve diğer metabolizmalar için gerekli olan reaksiyonlar gerçekleşemez. Bu çalışmada inkübatör sıcaklığı 42 °C'ye ayarlanmıştır ancak ışıklandırmadan dolayı kültür sıcaklığı 43-44 °C'ye çıkmıştır. Soğuk stresi altında ise incubator sıcaklığı 4 °C'ye ayarlanmış fakat kültür sıcaklıkları 7-8 °C ölçülmüştür. İnkübator sıcaklığı 0 °C'ye ayarlandığında bile kültür sıcaklığı 7 °C'nin altına düşmemiştir. Soğuk stresi altında bakteriler kontrol koşuluna göre daha fazla büyüme göstermiştir. Corner ve Kotrola (1995) tarafından yapılan bir çalışmada ortamda asetik asit, sitrik asit ve laktik asit gibi organik asitlerin varlığında, *E. coli* bakterisinin 4 °C'de yaşaması bu asitlerin olmadığı ortamla karşılaştırıldığında artmıştır. Bu çalışmada ortamda asetik asitin bulunması *R. capsulatus*'un bu şekilde bir büyüme şekli göstermesinin nedeni olabilir.

Stres uygulamaya başlangıç saati olan 48. saate kadar ortamın pH'sı yükselmiş ancak kabul edilebilir aralıkta kalmıştır. Bu artışın nedeni ortamdaki asetik asitin bakteriler tarafından tüketilmesidir. Sıcak stresi pH'yı anlamlı biçimde etkilememiştir, ancak soğuk stresi altında ortam pH'sı 7.4'e kadar artmıştır. Sıcak stresi altında asetik asitin kullanımı durmuş ancak soğuk stresi uygulanmış bakteriler asetik asit kullanmaya devam etmiştir, bu durum soğuk stresine maruz kalan bakteri kültürlerinde pH artışının nedenidir.

Ortamdaki asetatın başlangıç derişimi 30 mM'dır. Bu asetatın tümü kontrol ve soğuk stresi altında tamamen tüketilirken, sıcak stresi altında ortamda 5mM asetat kalmıştır. Sıcak stresinin hücre üzerindeki başlıca etkisinin hücre zarı üzerinde olduğu bilinmektedir. Hücre zarına verilen bir hasar substratların hücre içine alınmasını etkiler. Doymamış yağ asit zincirinin doymuş yağ asit zincirine oranı *E. coli* ve birçok diğer bakteride artan sıcaklıkla birlikte azalır ve bu da hücre zarının akışkanlığını artırır (MEJIA, 1995). *R.capsulatus* bakteri hücrelerinin sıcak stresi altında asetatı hücre içine alamamaları, yüksek sıcaklığın hücre zarına zarar vermesinden kaynaklanabilir. Hücre zarı akışkanlığı soğuk stresinden de etkilenmektedir, böylece substat alımı yavaşlayabilir (PHADTARE, 2004). Şekil 9'da da görüldüğü üzere soğuk stresi altında asetat tüketim hızı optimum sıcaklıktakinden daha yavaştır. Asetat dönüştürme verimliliği hesaplanmış ve Tablo 4'te gösterilmiştir.

Molar hidrojen üretimi ideal gas kanununa, PV=nRT formülüne göre hesaplanmıştır. Bu formülde P atmosfer basıncını gösterir ve 1 atm olarak alınmıştır. V, üretilen hidrojeni litre cinsinden gösterirken, n üretilen hidrojenin molünü gösterir. R molar gaz sabitidir ve 0.082 $L.atm.mol^{-1}.K^{-1}$ ye eşittir. Sıcaklık Kelvin cinsinde alınmıştır ve T ile gösterilmiştir. Üretilen hidrojenin miktarı gaz kromatografisi ile ölçülmüştür. Tüm reaktörlerde üretilen gazın %85'i hidrojen %15'i ise CO_2'tir. Hidrojen üretimi hem soğuk hem sıcak stresi altında durmuştur. Hidrojen üretimi reaksiyonları enzimlerle katalizlendiğinden optimum sıcaklığın dışındaki sıcaklıklarda hidrojen üretimi beklenmemektedir. Anayrobik bakterilerden oluşan karışık kültürle karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi üzerinde sıcaklığın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hidrojenaz ve nitrojenaz enzimlerine sahip karışık kültür bakterilerinin hidrojen üretmesi için optimum sıcaklık 35 °C bulunmuştur ve sıcaklık 45 °C iken hidrojen üretimi belirgin şekilde azalmıştır (ZHANG ve SHEN, 2006). Araştımacılar bu azalmanın nedeninin enzim aktivitesi için gerekli olan sıcaklığın dışına çıkılması olduğu sonucuna varmışlardır.

Hidrojen üretimi analizi için bazı önemli parametreler vardır. Kümülatif hidrojen üretiminin yanında hidrojen üretim hızı, substrat dönüştürme verimliliği, molar verim, ışık dönüştürme verimliliği ve ürün verim faktörü (1 gram bakteri kuru ağırlığından üretilen toplam hidrojen) hidrojen üretimi analizinde ele alınması gereken parametrelerdir. Bu parametreler hesaplanmış ve Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Kontrol, soğuk ve sıcak stresi koşullarında üretilen toplam hidrojen, hidrojen üretim hızı, substrat dönüştürme verimliliği, molar verim, ışık dönüştürme verimliliği ve ürün verim faktörü

	Toplam hidrojen (mmol)	Hidrojen üretim hızı (mmol/L.h)		Substrat dönüştürme verimliliği (%)	Verim (mol_{H2}/mol_{asetat})	Işık dönüştürme verimliliği (%)	Ürün verim faktörü (mmol H2/gdcw)
		48. saatten önce	48. saatten sonra				
Kontrol (30ºC)	2.29	0.574	0.230	44.4	1.775	0.400	75.02
Soğuk stresi (4ºC)	1.38	0.574	0	26.7	1.077	0.242	40.63
Sıcak stresi (42ºC)	1.54	0.574	0.029	29.8	1.430	0.269	54.37

Hidrojen üretim hızı, hidrojen üretiminin zamana bağlı değişimini gösteren grafikteki doğrusal bölge dikkate alınarak hesaplandı. Hidrojen üretimi ilk 48 saatte tüm kültürlerde aynı hızda devam ederken stres (4 °C ve 42 °C) uygulamasının ardından hız sıfıra düştü. Kontrol kültüründe ise 48 saatten sonra daha düşük bir hızda devam etti.
Substrat (asetik asit) dönüşüm verimliliği,
Substrat değişim verimliliği = (üretilen toplam H_2 (mol) / toplam asetik asitten elde edilebilecek hidrojen (mol)) *100
formülüne göre hesaplandı. Bir mol asetik asitten üretilebilecek toplam hidrojen aşağıdaki stokiometrik dönüşüme göre 4 mol'dür.

$$C_2H_4O_2 + 2H_2O \rightarrow 4\ H_2 + 2\ CO_2$$

Buna göre, kontrol koşullarda substrat dönüşüm verimi stres koşullarından daha yüksektir. Benzer şekilde, molar verim (üretilen toplam hidrojen (mol)/ tüketilen toplam asetik asit (mol)) kontrol koşullarında daha yüksektir.

Işık dönüşüm verimliliği (sarf edilen ışık enerjisinin üretilen toplam hidrojen enerjisine oranı) fotofermentatif hidrojen üretiminde incelenmesi gereken önemli parametrelerden biridir. Bu parametre bakterilerin ışık enerjisini ne kadar verimlilikle hidrojen enerjisine dönüştürdüğünü gösteren bir veridir. Reaktör hacimleri

ve her bir reaktörün üzerine yansıyan toplam foton sayısı sabit olduğundan, en yüksek hidrojen üretiminin gözlendiği kontrol kültürlerinde ışık dönüşüm verimliliği en yüksektir. Işık dönüşüm verimliliği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\eta\,(\%) = \frac{33.6 \times \rho_{H_2} \times V_{H_2}}{I \times A \times t} \times 100$$

Bu fomülde 33.6 hidrojenin enerji yoğunluğunu (Watt.sa/g), ρ_{H2} hidrojenin özgül ağırlığını (0.089 g/L), V_{H2} üretilen toplam hidrojen miktarını (L), *I* ışık şiddetini (114.286 Watt/m^2), *A* ışıklandırılan yüzey alanını (55 ml reaktör için 0.002 m^2), *t* hidrojen üretim zamanını (saat) göstermektedir.

Ürün verim faktörü (üretilen toplam hidrojenin bakteri kuru ağırlığına oranı) bakterinin hidrojen üretim aktivitesini gösteren önemli bir değerdir. Reaktör içindeki toplam bakteri miktarının ne kadar verimle hidrojen ürettiğini saptamada kullanılır. Yüksek bakteri miktarı her zaman yüksek hidrojen verimi sağlanacağı anlamına gelmez. Önemli olan, bakterilerin substratı ve ışığı hidrojen üretimi için ne kadar verimle kullandığıdır. Diğer verilerde olduğu gibi ürün verim faktörü de kontrol koşullarında daha yüksek bulunmuştur.

Bu sonuçlar, soğuk ve sıcaklık stresinin hidrojen üretimini önemli miktarda etkilediğini göstermektedir. Dolayısıyla, yürütülen bu ön çalışmalar, mikrodizin ve proteomik çalışmalarında RNA ve protein ifadelerindeki değişimlerin belirtilen stres koşullarında rahatlıkla gözlenebileceğini göstermiştir.

4.2 Mikrodizin Analizi

Mikrodizin analizi için bakteriler kontrol koşullarında (30 °C)'de büyütüldükten sonra 4 °C ve 42 °C'ye ayarlanmış inkübatörlere alındı ve 2. ve 6. saatlerde örnekler toplanarak RNA saflaştırması gerçekleştirildi. Saflaştırılan RNA'lar ölçümü ve karakterizasyonlarının ardından mikrodizin analizi için kullanıldı.

4.2.1 RNA Saflaştırması Karakterizasyonu

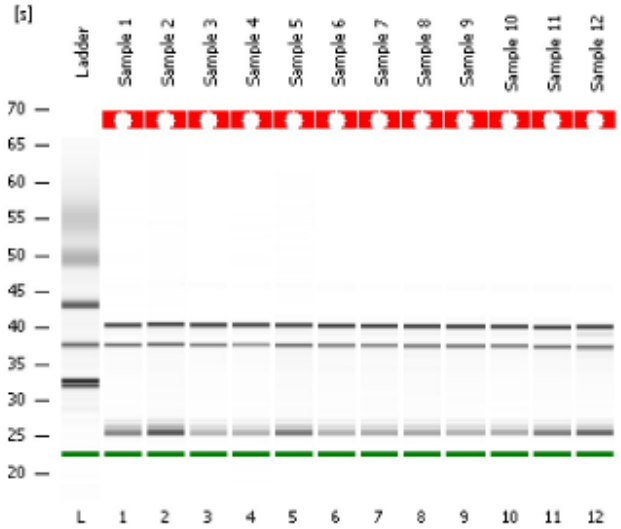
Affymetrix Expression Analysis Technical Manual'a göre prokaryotik mikrodizin analizinde cDNA sentezine başlamak için gerekli RNA miktarı 10 µg olmalıdır. Bu da, cDNA sentezi protokolüne göre kullanılabilen maksimum reaksiyon hacmi olan 18 µl'de 555 ng/µl RNA derişimine denk gelmektedir. Yüksek saflıkta ve konsantrasyonda RNA elde edebilmek için çeşitli RNA saflaştırma metodları (ticari RNA saflaştırma kitleri) denenmiştir. Ancak, bu kitlerden yüksek miktarda RNA eldesi sağlanamamıştır. Daha sonra RNA saflaştrması için sıkça kullanılan TRizol metodu ile denemeler yapılmış ve uzun optimizasyon çalışmalarının ardından TRizol (Invitrogen) kullanılarak yüksek saflıkta ve miktarda *Rhodobacter capsulatus* için RNA saflaştırma protokolü geliştirilmiştir.

Kontrol ve stres koşullarında 0, 2 ve 6. Saatlerde alınan örneklerden elde edilen RNA derişimleri ve saflıkları (260/280 oranı 1.8-2.1 aralığında olmalı) Tablo 5'te gösterilmiştir. Görüldüğü gibi, tüm örnekler gereken RNA derişiminde ve saflığında elde edilebilmiştir.

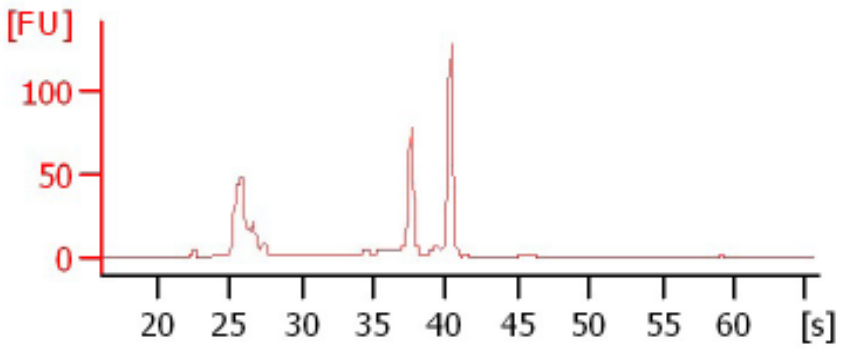
Tablo 5. *R. capsulatus bakterisinin saflaştırılan total RNA derişimi ve saflığı. Deneyler 3 tekrar* halinde yapılmıştır.

	0. saat		2. saat		6. saat	
	(ng/µl)	260/280	(ng/µl)	260/280	(ng/µl)	260/280
Kontrol (30ºC)	661.2	1.89	744.8	1.87	1035.8	1.9
	745.2	1.92	708.2	1.95	840.6	1.91
	739	1.79	738.4	1.81	764.9	1.79
Soğuk stresi (4ºC)	787.8	1.88	806.6	1.94	740	1.98
	1138.2	1.89	1138.2	1.81	943.2	1.97
	562.8	1.87	597.8	1.86	522.7	1.9
Sıcak stresi (42ºC)	1006.8	1.95	960.2	1.96	923.8	1.94
	907	1.87	862	1.9	1005.4	1.93
	650.4	1.86	633.4	1.88	744.8	1.87

RNA kalitesi ve bütünlüğü ayrıca Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı kullanılarak elektroforetik olarak da test edilmiştir. Şekil 10 ve 11, sırasıyla Bioanalyzer analizi sonucunda elde edilen örnek jel görüntüsünü ve elektroferogramı göstermektedir. Buna göre RNA'larda herhangi bir kırılma veya DNA kontaminasyonu gözlenmemiştir ve örnekler mikrodizin analizi için kullanılabilir.



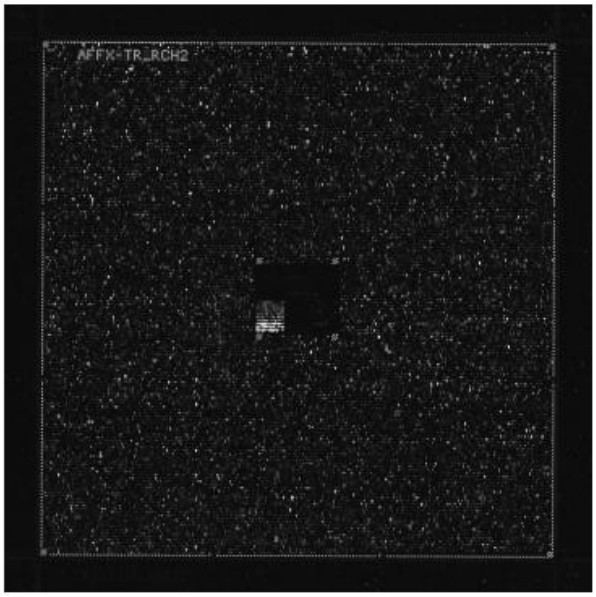
Şekil 10. *Rhodobacter capsulatus* total RNA saflaştırması sonrasında elde edilen Bioanalyzer jel görüntüsü. 25. Hiza 5S rRNA, 38. Hiza 16S rRNA, 40. Hiza 23S rRNA bantlarını göstermektedir.



Şekil 11. *Rhodobacter capsulatus* total RNA'sından elde edilen Bioanalyzer elektroferogramı. 25. pik 5S rRNA, 38. pik 16S rRNA, 40. pik 23S rRNA bantlarını göstermektedir.

4.2.2 Mikrodizin Verisi Kalite Kontrolü

Mikrodizin hibridizasyon sonuçlarının GCOS programı ile taranması sonucunda elde edilen dosyalar, veri güvenirliliği açısından incelenmiştir. .DAT dosyasından (mikrodizin tarama görüntüsü) elde edilen bir görüntü şekil 12'de gösterilmiştir. Kalite kontrol parametreleri (köşelerdeki satranç tahtası görüntüsü, kenarlardaki değişken parlaklık çerçevesi ve sol üst köşedeki çip ismi, vs) incelenmiş ve çip görüntüsünde herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. Rapor dosyaları (.RPT) incelendiğinde (her bir çip için background, noise, percent presence, Poly-A ve hibridizasyon kontrolleri bilgilerini analiz eder), tekrarlardan birinin (toplam 3 tekrar yapılmıştır) diğerlerinden farklılık gösterdiği saptanmış ve bu deney seti ileri analize dahil edilmemiştir.



Şekil 12. *Rhodobacter capsulatus* Affymetrix GeneChip tarama dosyasından (.DAT) elde edilen görüntü.

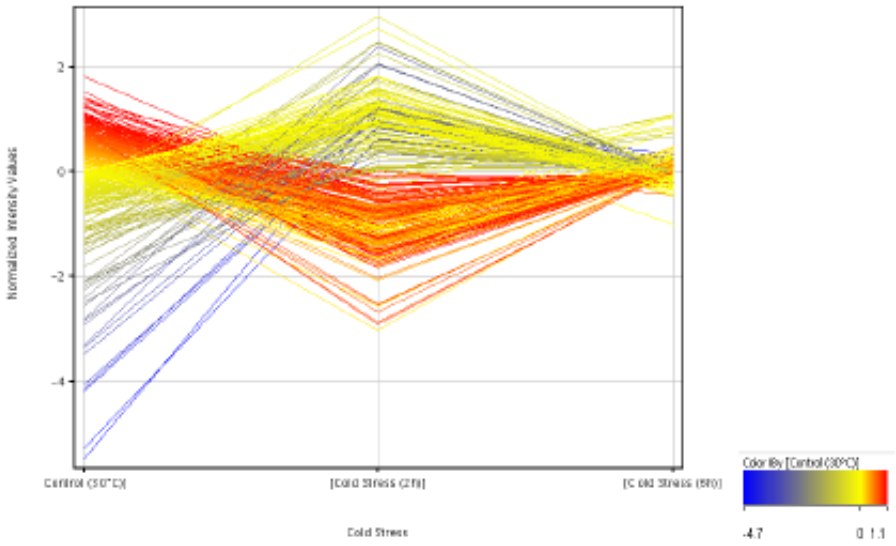
GeneSpring GX11 GeneChip Mikrodizin veri analizinde kullanılmıştır. Bunu için GCOS'tan elde edilen .CEL dosyaları programa yüklenmiş ve soğuk ve sıcak stresi için ayrı projeler oluşturulmuştur. Veriler uygun şekilde gruplandırılmış ve analiz sonuçları kıyaslanmıştır. Kıyaslama sonucunda, en az 2 kat değişim gösteren verilerden bir liste elde edilmiş ve signifikans analizi bu veriler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Verilerin yorumlanmasında One-way ANOVA kullanılmıştır ($p \leq 0.1$). Soğuk ve sıcak stresinin kontrole göre değişimleri ayrı ayrı analiz edilmiş, değişim gösteren genler metabolik yolaklara göre gruplandırılarak yorumlanmıştır.

4.2.3 Soğuk Stresi Altında Kontrole Göre Gen İfadesi Değişimi

Kalite kontrol analizini takiben veriler GeneSpring programına yüklenmiş ve gruplandırılmıştır. Veriler arasındaki korelasyon katsayıları Pearson korelasyonuna göre hesaplanmıştır (Tablo 6). Veriler arasındaki korelasyon katsayıları yüksek bulunmuş ve ileri veri analizine geçilmştir. Buna göre 328 genin (4052 prob üzerinden) soğuk stresi altında kontrole göre istatistiksel olarak ($p \leq 0.1$) farlılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu genlerin normalize edilmiş verilerinin profil grafiği Şekil 13'de gösterilmektedir.

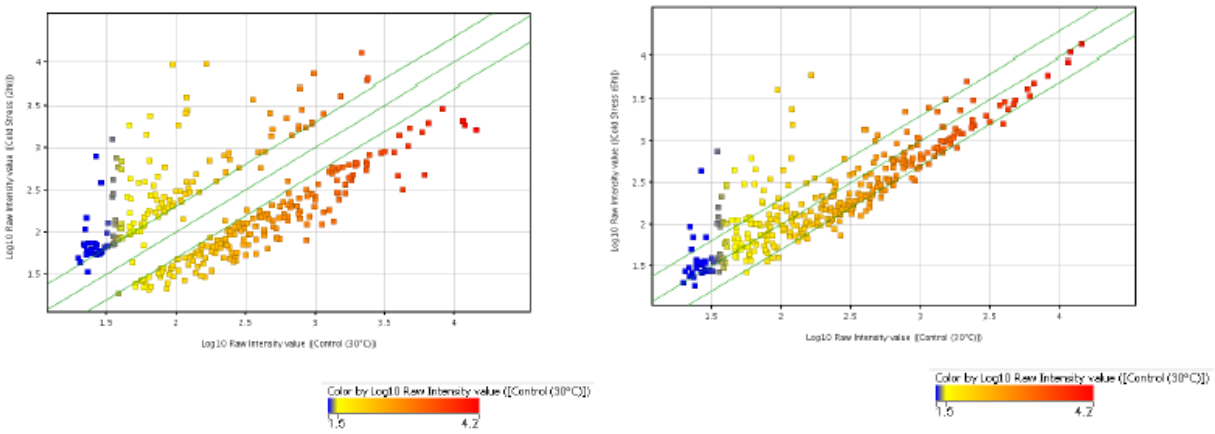
Tablo 6. Soğuk stresinin (2. saat ve 6. saat) kontolle karşılaştırılmasından oluşturulan korelasyon katsayısı matrisi

Array Name	0 h 30-1.CEL	0 h 30-2.CEL	6 h 4-1.CEL	6 h 4-2.CEL	2 h 4- 1.CEL	2 h 4- 2.CEL	Cold Stress
0 h 30-1.CEL	1.0	0.9742222	0.9519176	0.9649935	0.82934517	0.8572263	Control (30°C)
0 h 30-2.CEL	0.9742222	1.0	0.96643746	0.98530155	0.8729336	0.9003339	Control (30°C)
6 h 4-1.CEL	0.9519176	0.96643746	1.0	0.9849007	0.9155422	0.9072018	Cold Stress (6h)
6 h 4-2.CEL	0.9649935	0.98530155	0.9849007	1.0	0.9000022	0.9197164	Cold Stress (6h)
2 h 4- 1.CEL	0.82934517	0.8729336	0.9155422	0.9000022	1.0	0.9606503	Cold Stress (2h)
2 h 4- 2.CEL	0.8572263	0.9003339	0.9072018	0.9197164	0.9606503	1.0	Cold Stress (2h)



Şekil 13. 2 ve 6. saatlerde soğuk stresinin kontrole göre değişimini gösteren profil grafiği.

Profil grafiğine göre, 2 saat soğuk stresi sonrasında genlerde görülen değişim 6 saate göre daha fazladır. Bu durum bakterilerin soğuk sterine çabuk tepki göstermesi ve daha sonra adaptasyon sağlamasının bir sonucudur. Bakteriler çevresel değişimlere kısa sürede adapte olabilmektedirler. Şekil 14'te de görüleceği gibi, 2 saat soğuk stresi sonrasında anlamlı değişim gösteren gen sayısı, 6 saat soğuk stresi sonrasındakine göre çok daha fazladır. Bu durum bakterilerin soğuk stresine 6 saat sonra adapte olmaya başladığını göstermektedir.



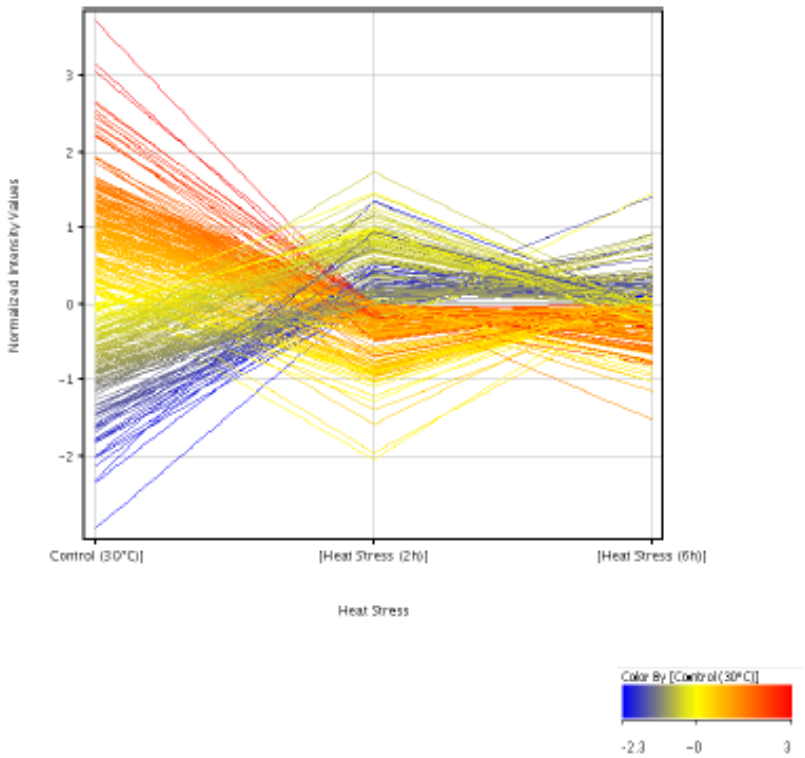
Şekil 14. 2 ve 6 saat stress uygulaması sonrasında kontrole göre anlamlı değişim gösteren genlerin dağılım grafiği

4.2.3 Sıcak Stresi Altında Kontrole Göre Gen İfadesi Değişimi

Sıcak stresi uygulaması sonucunda elde edilen veriler, soğuk stresi verilerinde olduğu gibi, kalite kontrolü açısından incelendikten sonra GeneSpring programına yüklenmiş ve benzer istatistiksel analizler yapılmıştır. Tablo 7 Pearson korelasyon analizi sonucunu göstermektedir. Buna göre, veriler arasındaki korelasyon oldukça yüksektir ve mikrodizin ileri analizi için kullanılabilir.

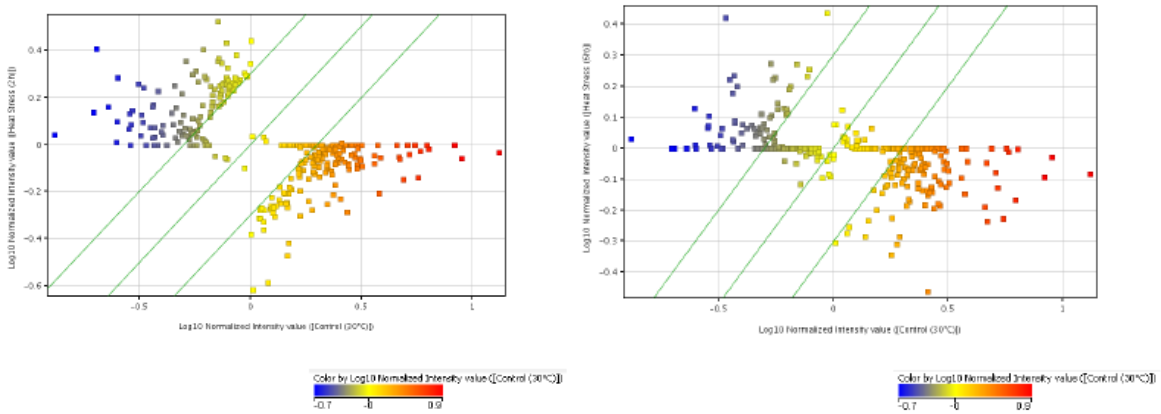
Tablo 7. Sıcak stresinin (2. saat ve 6. saat) kontolle karşılaştırılmasından oluşturulan korelasyon katsayısı matrisi

Array Name	2 h 42- 1.CEL	2 h 42- 2.CEL	0 h 30-1.CEL	0 h 30-2.CEL	6 h 42-1.CEL	6 h 42-2.CEL	Heat Stress
2 h 42- 1.CEL	1.0	0.9651744	0.92097586	0.94062454	0.97186685	0.94591707	Heat Stress (2h)
2 h 42- 2.CEL	0.9651744	1.0	0.90602577	0.9198543	0.96672875	0.95779616	Heat Stress (2h)
0 h 30-1.CEL	0.92097586	0.90602577	1.0	0.97334653	0.93265754	0.93874365	Control (30°C)
0 h 30-2.CEL	0.94062454	0.9198543	0.97334653	1.0	0.9409767	0.9436911	Control (30°C)
6 h 42-1.CEL	0.97186685	0.96672875	0.93265754	0.9409767	1.0	0.9869541	Heat Stress (6h)
6 h 42-2.CEL	0.94591707	0.95779616	0.93874365	0.9436911	0.9869541	1.0	Heat Stress (6h)



Şekil 15. 2 ve 6. saatlerde sıcak stresinin kontrole göre değişimini gösteren profil grafiği.

İstatistiksel analizler sonucunda, sıcaklık stresinin *R. capsulatus* genomunda 293 gende anlamlı değişime neden olduğu saptanmıştır (one-way ANOVA, p≤ 0.1). Bu genlerin normalize edilmiş intensite değerleri göz önünde bulundurularak oluşturulmuş profil grafiği Şekil 15'te gösterilmiştir.



Şekil 16. 2 ve 6 saat stress uygulaması sonrasında kontrole göre anlamlı değişim gösteren genlerin dağılım grafiği

Şekil 16'da 2 ve 6 saat sıcaklık stresine maruz bırakılan bakterilerdeki gen değişiminin dağılım grafiği (Scatter Plot) verilmiştir. Bu grafiklerden de anlaşılacağı gibi, kontrol ile karşılaştırıldığında, 2 saat sıcaklık stresi sonrasında değişim gösteren gen miktarı 6 saatekine yakındır. Soğuk stresindeki gibi bir adaptasyon sıcak stresi uygulanan bakterilerde görülmemiştir.

Elde edilen bu sonuçlardan sonra, 12 ve 24. saatlerde bakteri örnekleri alınmamıştır, çünkü, zaman geçtikçe gen ifadelerindeki değişimler azalmaktadır. Bu nedenle, stres faktörlerinin gen ifadesi üzerine etkilerinin en yoğun olarak gözlendiği 2 ve 6. saatler analiz edilmiştir.

4.2.4 Soğuk ve Sıcaklık Stresinde Değişim Gösteren Genlerin İncelenmesi

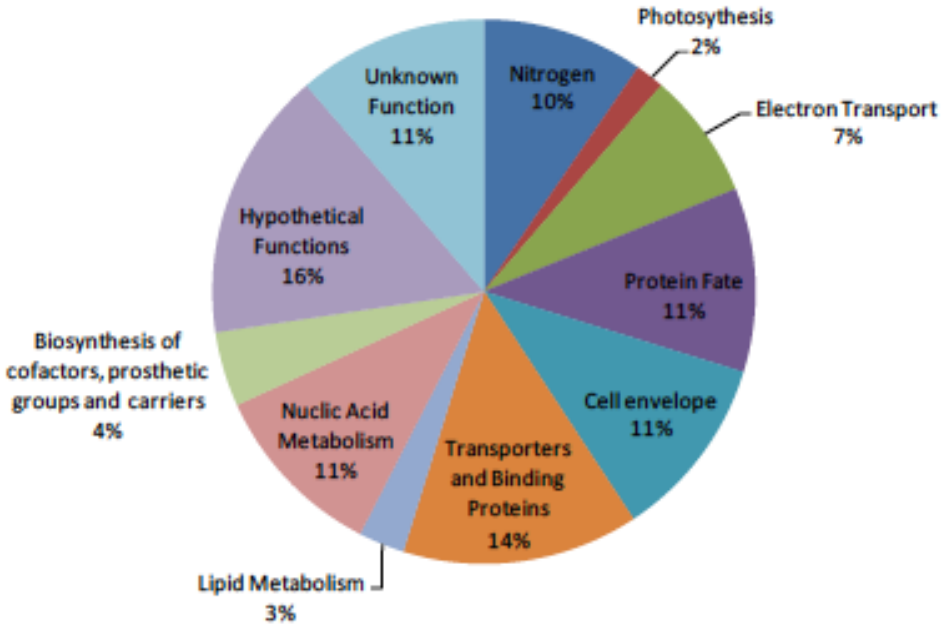
Stres koşulları altında değişim gösteren genler bağlı oldukları metabolik yolaklara göre gruplandırılmış ve stresin metabolik etkisi bu yolla incelenmiştir. Şekil 17 ve 18, sırasıyla soğuk ve sıcak stresleri altında değişim gösteren genlerin metabolik yolaklara göre ayrılması ve bunların toplam değişime oranının (%) hesaplanması sonucunda elde edilen grafikleri göstermektedir. Buna göre, soğuk ve sıcaklık streslerinden en çok etkilenen genler azot, fotosentez ve elektron taşıma yolaklarında fonksiyon gösterenlerdir. Bu metabolik yolakların hidrojen üretimine önemli etkileri vardır. Mor-kükürtsüz bakterilerde hidrojen üretimi nitrojen metabolizması ile birinci dereceden bağlantılıdır, çünkü hidrojen üretimi nitrojenaz enzimi tarafından katalizlenir.

Ayrıca, ısısal streste genel olarak gözlenmesi beklenen hücre zarı sentezinde rol alan genlerin ifadesinde ve hücre zarında yer alan taşıyıcı veya bağlanma proteinlerini sentezleyen genlerin ifadelerinde ciddi oranda değişim görülmektedir. Bu durum, ısısal stresin ilk olarak hücre zarını etkilemesinden ve hücre zarı akışkanlığında değişime yol açmasından kaynaklanır.

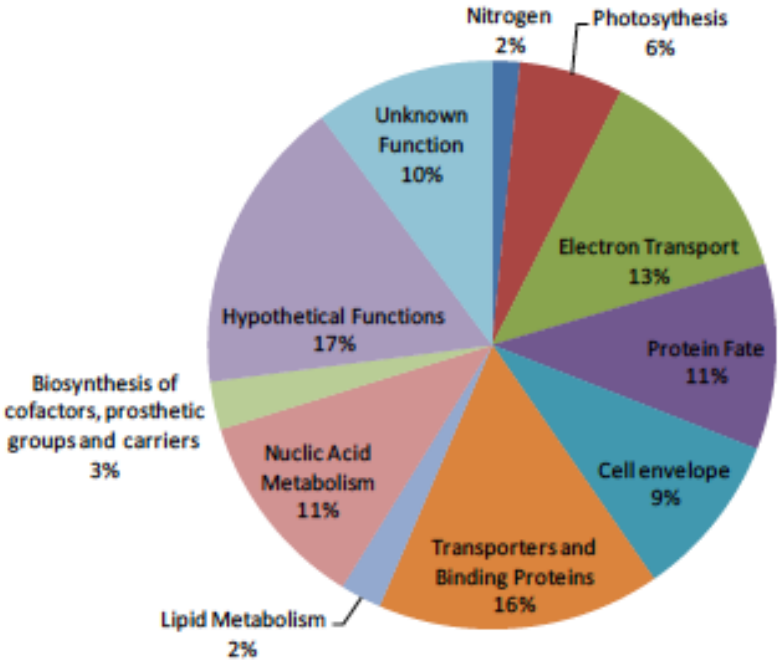
R. capsulatus genom adlandırmasının (annotation) %100 tamamlanmadığı için, değişim gösteren genlerin önemli bir kısmının fonksiyonu bilinememekte veya hipotetik fonksiyonları bilinebilmektedir.

Soğuk ve sıcak stresi karşılaştırıldığında, iki stres arasındaki farklılık daha çok azot, fotosentez ve elektron taşıma zincirlerindeki proteinlerin sentezinde fonksiyon gösteren genlerin ifadesinde göze çarpmaktadır. Soğuk stresi sonrasında azot metabolizmasında daha çok değişim gözlenirken, sıcak stresi sonrasında elektron taşıma zinciri ve fotosentetik genlerde daha fazla değişim gözlenmiştir. Bu durum sıcak stresinin zar yapısını daha fazla etkilediği şeklinde yorumlanabilir, çünkü fotosentez ve elektron taşımada görevli proteinler çoğunlukla *R. capsulatus* hücre iç zarlarına entegredir.

Raporun bundan sonraki kısmında, her bir metabolik yolağa bağlı değişimler ayrı ayrı incelenecek ve detaylı analiz değerlendirmesi yapılacaktır. Burada yer alan değerlerin kontrole göre göreceli değişimler olduğu, dolayısıyla kantitatif değişimleri değil, göreceli olarak kat değişimlerini (fold change) ifade ettiği unutulmamalıdır. Değişim gösteren önemli genlerin listesi Ek-2'de verilmiştir.



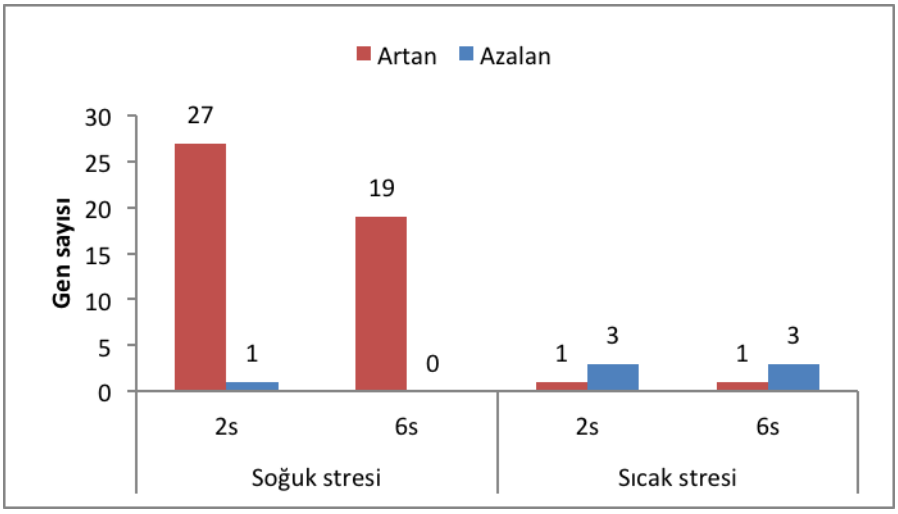
Şekil 17. Soğuk stresi altında anlamlı değişim gösteren genlerin metabolik dağılımı



Şekil 18. Sıcak stresi altında anlamlı değişim gösteren genlerin metabolik dağılımı

4.2.5 Isısal Stresin Azot Metabolizmasına Etkisi

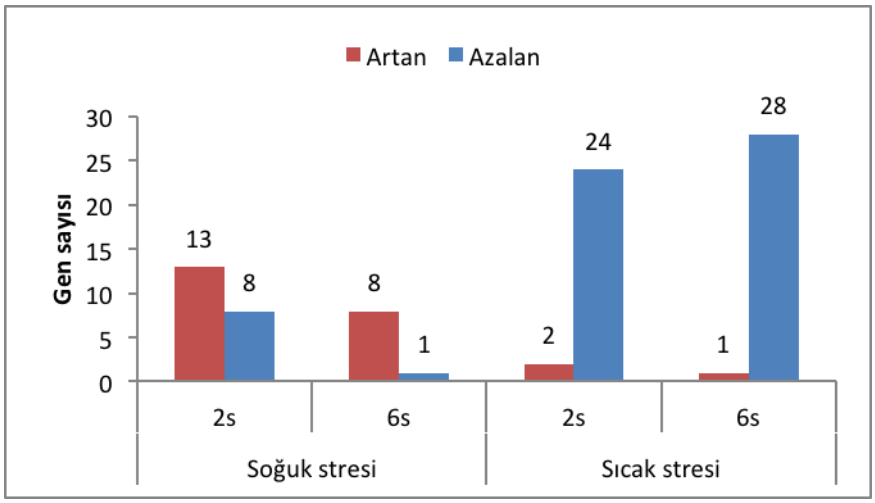
Azot metabolizması, hidrojen üretimini birinci derecede etkileyen metabolik yolaklardan biridir, çünkü, mor kükürtsüz bakterilerde hidrojen üretimi azot fiksasyonunda görev alan nitrojenaz enzimi tarafından katalizlenir. Şekil 19'da soğuk ve sıcak streslerinde anlamlı ölçüde değişim gösteren nitrojen metabolizmasında görevli genlerin sayısı gösterilmektedir. Buna göre, 2 ve 6. Saatler sonunda soğuk stresi sonrasında artış gösteren gen sayısı oldukça fazla iken sıcak stresinde bu genlerde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Soğuk stresi azot metabolizmasında görev alan *nif* genlerinin ifadesinde kontrole göre önemli derecede (99 kata kadar) artışa neden olmuştur. Hidrojen üretiminin soğuk stresi altında durması, nitrojenaz enzimin soğuk stresi adaptasyonunda farklı bir rol üstlendiği şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 19. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) azot metabolizmasında değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı.

4.2.6. Isısal Stresin Elektron Taşıma Zincirine Etkisi

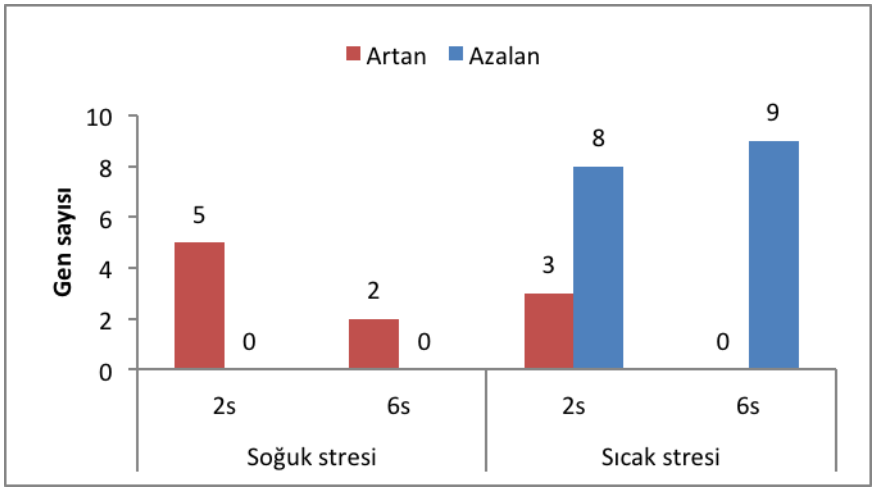
Stres koşulları altında elektron taşıma zinciri proteinlerin sentezinde görevli genlerin sayısındaki değişim Şekil 20'de verilmiştir. Sıcak stresi genel olarak gen ifadesinde düşüşe yol açarken, soğuk stresinde ifadesi artan genlerin sayısı daha fazladır. Artış gösteren gen sayısı, 2. saatte 6. saate göre daha fazladır. Değişim gösteren genler incelendiğinde, ferrodoksin genlerinin soğuk stresi altında arttığı ancak sıcak stresi altında ferrodoksin V'in azaldığı görülmektedir. Elektron taşıma kompleksi proteinlerinin sentezinde görev alan *rnf* genlerinin soğuk stresi altında ciddi ölçüde arttığı gözlenmiştir. Ferrodoksin ve flovodoksin nitrojenaz enzimine elektron taşıyan proteinlerdir. Rnf proteinleri de fotosentetik koşullarda nitrojenaza elektron transferi yaparlar. Dolayısıyla bu proteinler elektron taşıma zincirini nitrojenaza bağlarlar.Nitrojenaz genlerinde görülen artışla paralel olarak elektron taşıma zincirindeki görevli bu genlerin ifadesinde artış anlamlı bir değişim olarak değerlendirilebilir.



Şekil 20. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) elektron taşıma metabolizmasında değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı.

4.2.7. Isısal Stresin Fotosentez Metabolizmasına Etkisi

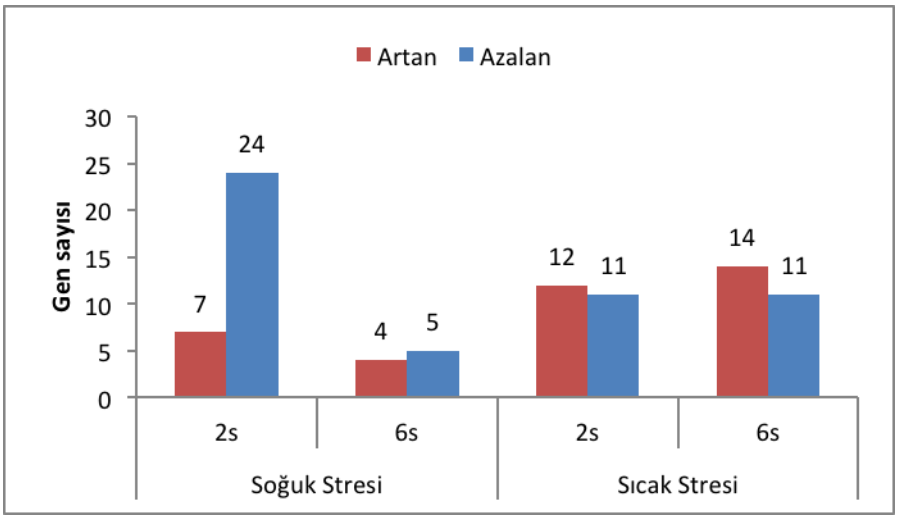
Şekil 21 sıcak ve soğuk stresi altında fotosentez metabolizmasında anlamlı değişim gösteren genleri göstermektedir. Soğuk stresi genel olarak gen ifadesinde artışa neden olurken, sıcak stresinde bu değişim düşüş yönünde olmuştur. Sıcak stresi LH I ve LH II proteinlerinin sentezinde rol alan *pufL*, *pufM*, *pucA ve pucC* genlerinin ifadesinde düşüşe neden olmuştur. Bazı trikarboksilik asit döngüsünde rol alan transkriptlerde de düşüş gözlenmiştir.



Şekil 21. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) fotosentez metabolizmasında değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı.

4.2.8. Isısal Stresin Protein Sentezine Etkisi

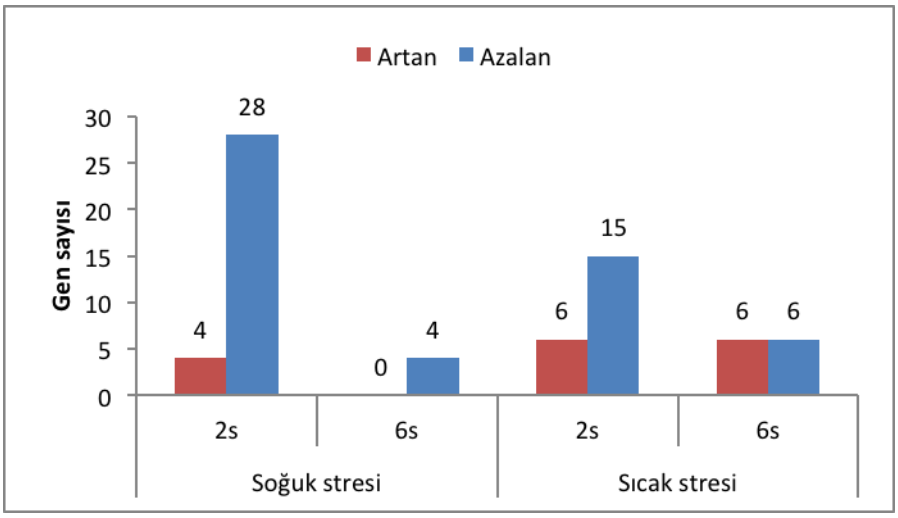
Şekil 22'de de görüldüğü gibi, 2 saat soğuk stresi sonrasında protein metabolizmasındaki genlerin çoğu düşüş göstermiştir. Bu genlerden bazıları proteazlar (*hslU*, *hslV*, *clpA*, *clpP*, *clpS*, *lon)*, şaperonlar (GroS, GroL, DnaK ve DnaJ)) ve şaperoninlerdir. Sıcak stresi proteinleri olan şaperonlar protein katlanmasında, onarımında ve parçalanmasında görev alırlar. ClpB şaperonunun soğuk stresi altında 12 kat düşüş gösterdiği, sıcak şok proteini geni *ibpA*'nın da benzer şekilde 13 kat düşüş gösterdiği anlaşılmaktadır. Sıcak stresinde de soğuk stresinde oldıuğu gibi proteaz generinin ve bazı şaperonin (*HslO)* ve şaperonların (*clpB*) ifadesinde düşüş gözlenmiştir. Ancaki 30S ve 50S ribozomal protein genlerinin ifadesinde her iki stres koşulunda da artış gözlenmiştir.



Şekil 22. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) protein sentezinde değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı

4.2.9. Isısal Stresin Hücre Zarı ve Duvarı Biyosentezine Etkisi

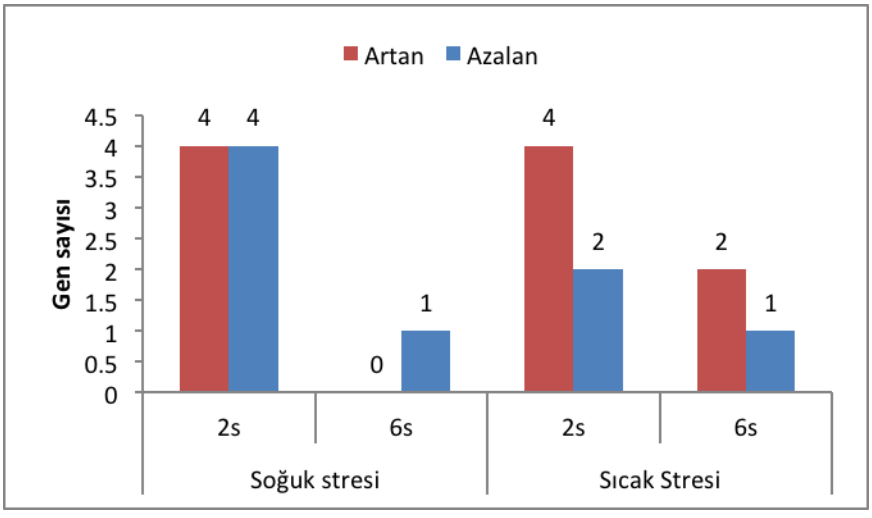
Hücre zarı ve duvarı biyosentezinde görevli genlerin ifadesinde 2 saat soğuk stresi sonunda değişim gösteren genlerin çoğunda azalma görülmüş, fakat 6 saat sonrasında birçok genin iadesi kontrol düzeyine yükselmiştir (Şekil 23). Bu durum bakterilerin hücre zarı ve duvarı yapısını belirleyen genlerin ifadelerini soğuk/sıcak adaptasyonunu sağlamak için hızlıca değiştirdiğini, 6 saat sonunda gen adaptasyonun büyük ölçüde sağlandığını ve gen ifadelerinin normal seviyelere döndüğünü göstermektedir. Isısal stresten ilk etkilenen hücre zarı ve duvarının yapısını belirleyen bu değişim, bakterilerin strese maruz kaldığında buna hızlı bir şekilde adapte olmak için geliştirdikleri bir mekanizma olabilir. Değişen genlerin birçoğunun hücre zarı proteinlerini sentezlemede rol aldığı ve bazılarının soğuk ve sıcak sterinde görev aldığı görülmüştür.



Şekil 23. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) hücre zarı ve duvarı biyosentezinde değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı.

4.2.10. Isısal Stresin Lipit Metabolizmasına Etkisi

Yağ asitlerinin yapısı sıcaklık değişimine oldukça duyarlıdır. Sıcaklık stresinin lipit metabolizmasına etkisi lipitlerin en çok yer aldığı hücre zarı yapısına direk etki eder. Hücre zarı bütünlüğünün sağlanması bakteri açısından yaşamsal öneme sahiptir; çünkü besinlerin hücre içerisine taşınmasında hücre zarı birincil öneme sahiptir. Soğuk stresi ilk iki saate lipit metabolizmasında yer alan gen ifadelerinde artış ve azalış yönünde değişime neden olurken, 6 saat sonunda hemen hepsi kontrol düzeyine dönmüştür. Sıcaklık stresi ilk 2 saat sonunda artış gösteren genlerin sayısı daha fazla iken, 6 saat hem artış hem azalış gösteren genlerde kontrol seviyesine geri dönüş gözlenmiştir (Şekil 24). Bu bakteriler ısısal strese adaptasyonunun bir sonucu olarak yorumlanabilir.

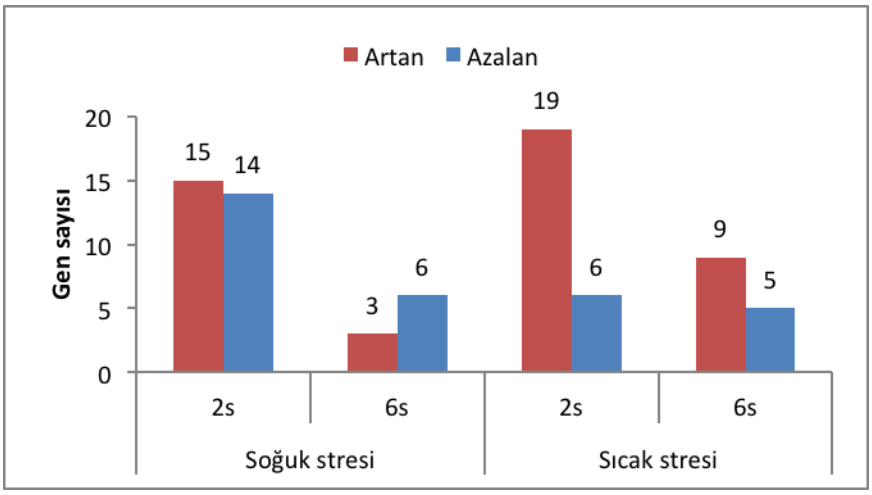


Şekil 24. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) lipit metabolizmasında değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı.

Yağ asiti sentezinde kritik role sahip olan asil taşıyıcı proteini, sıcak ve soğuk stresi altında ilk 2 saatte artış göstermiştir. Soğuk stresi asetil-CoA karboksilaz karboksil transferaz α ve β genlerinin ifadesinde düşüşe neden olmuştur. Yağ asidi sentezinin ilk reaksiyonunu katalize eden asetil-CoA karboksilaz geninin ifadesinde her iki stres koşulunda da azalma gözlenmiştir. Fosfotidilkolin sentezinde görev alan fosfotodiletanolamin N-metiltransferaz geni sıcaklık stresi altında azalma göstermiştir. Ayrıca izoprenoid sentezinde rol alan izopentil difosfat δ-izomeraz geni ifadesinde de artış gözlenmiştir. Bu veriler, bakterinin ısısal stres altında zarar gören hücre zarının bütünlüğünü sağlamak ve yenilemek için lipit metabolizmasında rol alan genleri aktive ettiğini göstermektedir.

4.2.11. Isısal Stresin Nükleik Asit Metabolizmasına Etkisi

DNA sentezi, rekombinasyonu, transkripsiyon regülatörleri ve transkripsiyon faktörlerinin sentezinden sorumlu genlerin birçoğunda stres koşulları altında ciddi değişimler gözlenmiştir (Şekil 25). Diğer metabolik yolaklardaki değişimlere benzer olarak, nükleik asit metabolizması genlerinin birçoğu 6 saat sonrasında kontrol seviyesine dönmüştür.



Şekil 25. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) nükleik asit metabolizmasında değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı.

RNA parçalanmasında ve RNA düzeyinin kontrolünde yer alan Ribonükleaz E, RNA şaperon Hfg ve poliribonükleotidil transferaz genlerinin ifadelerinde soğuk stresi altında artış gözlenmiştir. Alernatif sigma faktör RpoN, σ^{54} faktörü soğuk stresi altında 2 saat sonrasında 6 kat artış göstermiştir. Bu protein *nifA* genini tanıyarak nitrojenaz ve diğer *nif* genlerinin sentezinde rol alır. Bu artış, nitrojenaz genlerinde gözlenen artış ile paralellik göstermektedir.

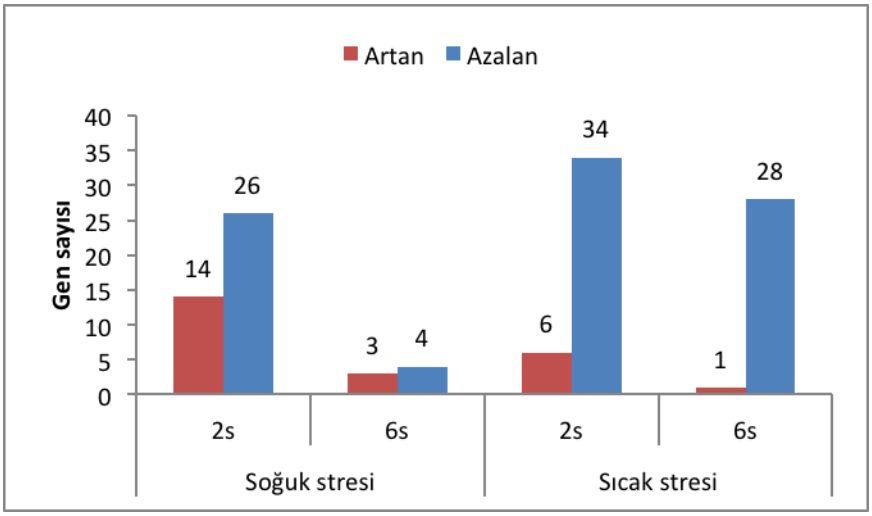
RNA polimeraz sentezini tetikleyen transkripsiyon faktörü NusG ifadesinde ve tRNA olgunlaşmasında görev alan ribonükleaz P ifadesinde sıcaklık stresi altında artış gözlenmiştir.

DNA onarımında görev alan *uvrB* geninde sıcaklık stresi altında düşüş gözlenirken, yine DNA onarımında rol aldığı düşünülen *recA* geni ifadesinde artış gözlenmiştir. Ayrıca DNA metilasyonunda rol alan DNA metiltransferaz geni her iki stres koşulunda da artış göstermiştir. Dolayısıyla, *R. Capsulatus*'ta sıcaklık stresi altında DNA metilasyonu ve *recA* ifadesi DNA onarımında rol alıyor olabilir.

4.2.12. Isısal Stresin Taşıyıcı ve Bağlayıcı Protein Biyosentezine Etkisi

Şekil 26'dan da anlaşılacağı gibi ısısal stres altında taşıyıcı ve bağlayıcı protein biyosentezinde görev alan birçok genin ifadesinde azalma gözlenmiştir. Sıcak stresinin soğuk stresine göre bu gruptaki genlerin ifadesini daha fazla etkilediği görülmektedir. Düşüş gözlemlenen genlerin birçoğu amino asit ve peptit taşımasında görev alan ve poliamin ABC transporters olarak adlandırılan proteinlerin sentezinden sorumlu genlerde görülmüştür. Ayrıca spermidin/putresin ABC transporter (*potD, potF, potG, potH*) genlerinin ifadesinde belirgin düşüşler görülmüştür. Spermidin ve putresinler, nükleik asit ve protein sentezi için gerekli olduğu gibi, RNA ve DNA'ın ikincil yapılarının korunmasında ve hücre zarının stabilizasyonunda da görev alırlar. Bu sonuçlar, sıcaklık stresinde *R. capsulatus*'un büyüyememesinin önemli nedenlerinden biri olabilir. Karbonhidrat ve organik asit taşıyıcılarından sorumlu genlerin ifadelerinde sıcak stresi altında düşüş gözlenmesi, asetik asitin sıcak stresinde tamamen tüketilememesinin bir nedeni olabilir.

Soğuk stresi amino asit ve peptid taşıyıcılarından sorumlu genlerin bazılarında artış bazılarında ise azalışa neden olmuştur. Fe ve Mo taşıyıcı proteinlerinden sorumlu genlerin ifadesinde 2 kat artış gözlenmiştir. Nitrojenaz enziminin kofaktörü olan bu iki katyonun hücre içine alınmasını sağlayan genlerin ifadelerindeki artış, nitrojenaz genlerinin ifadelerinde artışla paralellik göstermiştir.

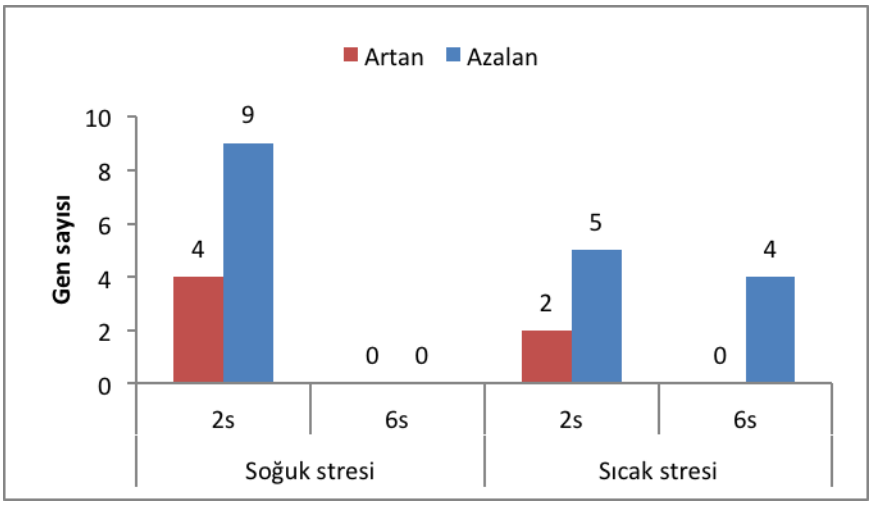


Şekil 26. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) taşıyıcı ve bağlayıcı protein biyosentezinde değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı.

4.2.13. Isısal Stresin Kofaktör, Prostetik Grup ve Taşıyıcıların Biyosentezine Etkisi

Sıcak ve soğuk stresi iki saat sonunda kofaktör, prosetik grup ve taşıyıcıların sentezinden sorumlu genlerde de değişime neden olmuştur (Şekil 27). Yağda çözünen ve elektron taşıma zincirinde rol alan ubiquinon ve menaquinonun sentezinden sorumlu genlerde soğuk stresi altında azalış gözlenmiştir. Folik asit biyosentezinden sorumlu genlerde soğuk ve sıcaklık stresleri düşüşe yol açmıştır. Folik asit hücrede nükleik asit biyosentezi da dahil olmak üzere çeşitli reaksiyonlarda kofaktör veya koenzim olarak yer alır. Folik asit biyosentezindeki düşüş büyüme ve DNA onarım işlevlerinde yavaşlamaya yol açmış olabilir.

Sıcaklık stresi asil taşıyıcısı olarak görev alan pantotenat ve koenzim A genlerinin ifadelerinde sıcaklık stresi altında düşüşe neden olmuştur. Asil taşıyıcı koenzimler özellikle yağ asitlerinin sentezinde kritik rol oynamaktadır.

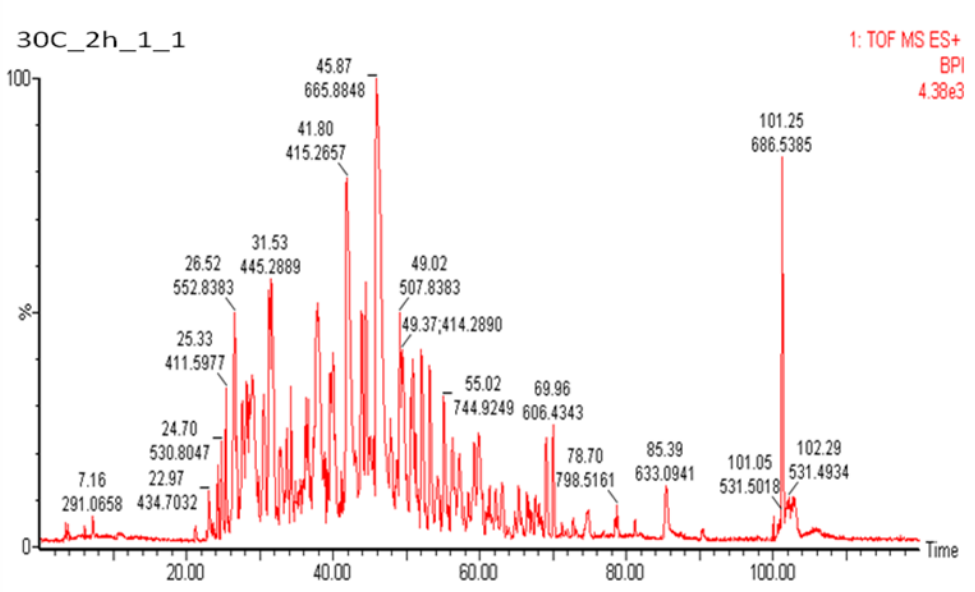


Şekil 27. Soğuk ve sıcak stresi sonrasında (2 ve 6 saat) kofaktör, prostetik grup ve taşıyıcıların biyosentizinde değişim gösteren (artan/azalan) genlerin sayısı.

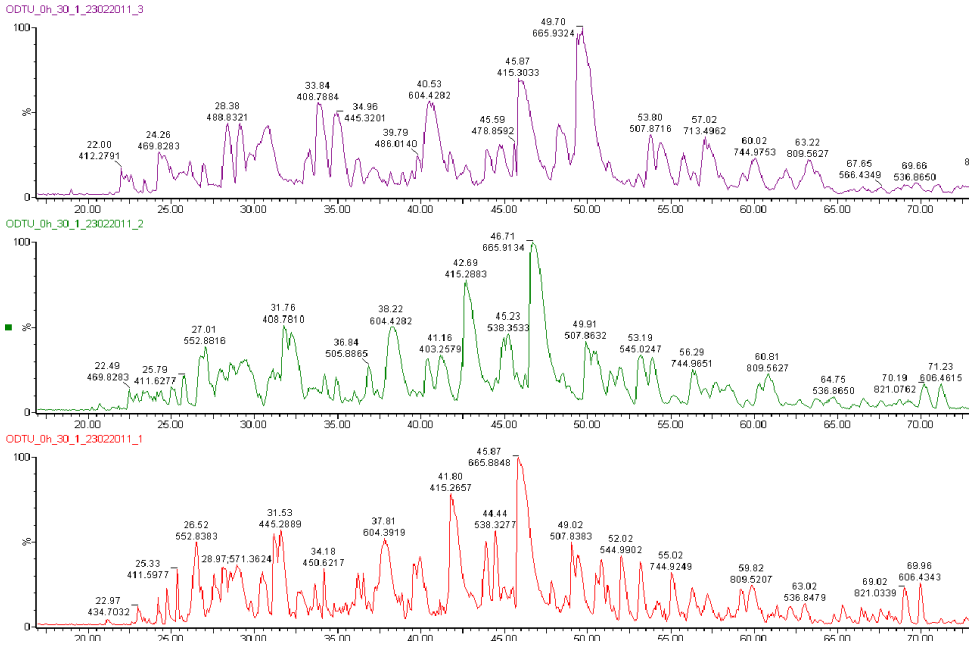
Fe/S proteinlerini kodlayan *sufC* ve *sufD* genlerinin ifadeleri sıcaklık stresi altında 4 – 6 kat azalmıştır. Fe/S proteinlerinin hücre içinde önemli fonksiyonları vardır. Örneğin nitrojenaz ve fotosistem I arasında köprü görevi görürler. SufC proteini ATPaz olarak fonksiyon gösterirken, SufD proteini demirin asimilasyonunda önemli role sahiptir. Bu genlerdeki düşüşle fotosentez ve elektron taşımadan sorumlu genlerde gözlenen düşüş paralellik göstermektedir.

4.3. Proteomik Analizi

Bu kısımda, sıcak ve soğuk stresine maruz bırakılmış olan *R. capsulatus* hücrelerinin detaylı proteomik analizleri yer almaktadır. Örnek hazırlama aşaması sonrası LC-MS/MS cihazına verilen nümunelerden bazıları için elde edilen kromotogram örnekleri Şekil 28 ve Şekil 29'da görülmektedir. Burada sıcak ve soğuk streslerinin 2. ve 6. saatlerde protein ifadesine etkileri kontrol koşullarındaki protein ifadeleri ile karşılaştırılmış, en az 1.5 kat değişim gösteren proteinler dikkate alınarak veriler analiz edilmiştir.



Şekil 28. 30°C iki saat birinci biyolojik tekrarın ilk teknik tekrar kromatogramı.



Şekil 29. 30°C iki saat birinci tekrarının üç teknik tekrarının tümü. Üç teknik tekrar incelendiğinde piklerin birbirleriyle örtüştükleri görülmektedir. Bu analizlerimizin tekrarlanabilir olduğunun göstergesidir.

4.3.1 Sıcak Stresinin Protein Ekspresyonuna Etkisi – 2. Saat

Sıcak stresine (42 °C) maruz kalmış hücrelerin protein ekspresyon seviyeleri optimum büyüme koşullarında (30 °C) büyüyen hücrelerin profilleriyle karşılaştırıldığında, Tablo 8'de listelenen 36 proteinin ekspresyon seviyelerinin 1,5 kat veya daha fazla miktarda değişiklik gösterdiği görülmüştür. 16 adet proteinin ekspresyon seviyesi sıcak stresi koşullarında artarken, 20 proteinin ekspresyonunun optimum büyüme koşullarında sıcak stresi koşullarından daha yüksek olduğu görülmüştür. Sıcak stresi koşullarında ekspresyonu artan proteinler arasında elektron transfer zincirinde görevli "cytochrome *c*, ferrodoxin I, thioredoxin, cytochrome *c* oxidase and light harvesting protein B870" gibi sitokrom proteinleri ve ışık enerjisini kullanılabilir kılmakta yararlanılan proteinlerin ekspresyonları artış göstermiştir. Ayrıca, şaperon görevi gören "dnaK, 60 kDa chaperonin and 10 kDa chaperonin" gibi ısı stresi proteinlerinin (ısp) (heat shock proteins) ekspresyonları da artış göstermiştir. Ekspresyonu sıcak stresi koşullarında artış gösteren bir diğer protein grubuda ribozom alt birimleridir; "30S ribosomal protein S5, 30S ribosomal protein S15 and 30S ribosomal protein S10" gibi ribozom alt birimlerinin ekspresyonları sıcak stresiyle ilintili olarak artış göstermiştir. Bir membran taşıma proteini olan "ABC transporter" ve bir salgı proteini olan "HlyD family protein" ekspresyonlarınında sıcak stresi uygulandığında, artış gösterdiği proteome analizleri sonucunda anlaşılmıştır. Sıcak stresi koşullarında ekspresyonu en fazla artış gösteren proteinin, bir membran proteini kabul edilen bir lipoprotein (lipoprotein putative) olduğu görülmüştür.

Sıcak stresi koşullarında ekspresyonu azalan proteinler içerisinde transkripsiyon mekanizmasında görevli olan "DNA directed RNA polymerase subunit, autoinducer binding elongation factor Ts and Polyribonucleotide nucleotidyl transferase" gibi proteinler bulunmaktadır. Transkripsiyon mekanizmasının yanı sıra translasyon mekanizması da sıcak stresinden etkilenmiştir, bazı translasyon proteinlerinin ekspresyonu azalma göstermiştir. Ribozomal proteinler; 50S ribosomal protein L4, 30S ribosomal protein S16, 50S ribosomal protein L13, 50S ribosomal protein L24", sıcak stresine maruz kaldıklarında ekspresyonları optimum sıcaklıktaki ekspresyonlarına göre daha azdır. Ayrıca amino asit metabolizmasında görevli "adenosylhomocysteinase, arginine biosynthesis bifunctional protein" gibi proteinler ve nükleotid metabolizması içerisinde görev alan "polyribonucleotide nucleotidyl transferase ve nucleoside diphosphate kinase" proteinlerinin ekspresyonları da sıcak stresi uygulandığında azalmıştır. Sıcak stresi uygulandığında ekpresyonu en fazla düşen protein DNA kontollü RNA polimeraz enzimidir.

Tablo 8. Sıcak stresi koşullarında iki saat tutulan hücrelerde, ekspresyonu 1,5 kat değişen proteinlerin listesi

Erişim Numarası	Tanım	Proteinlerin ekspresyon Oranı (42°C-2. saat/30°C-2. Saat)	Yüksek Ekspresyonun olduğu sıcaklık ve saat
D5AQ86	Lipoprotein putative	-	Sadece 42°C-2. saat te üretiliyor
D5ANC2	Cytochrome c	2.72	
D5ALD3	Chaperone protein dnaK	2.59	
D5AMD2	60 kDa chaperonin	2.16	
D5AM12	30S ribosomal protein S5	2.08	

D5AMD1	10 kDa chaperonin	1.95	
D5AMF5	Cytochrome c class I	1.95	
D5ARY6	Ferredoxin I	1.86	
D5AMH5	Pyrimidine ABC transporter periplasmic pyrimi	1.82	
D5AKF9	Thioredoxin 1	1.82	
D5AP85	Light harvesting protein B 870 alpha subunit	1.73	
D5ALX6	30S ribosomal protein S15	1.63	
D5ALZ3	30S ribosomal protein S10	1.62	
D5AQ91	Bacterioferritin	1.55	
D5ARP7	Cytochrome c oxidase Cbb3 type subunit III	1.54	
D5ANM8	Secretion protein HlyD family	1.54	
D5ALX9	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	0.64	
D5ALZ5	50S ribosomal protein L4	0.62	
D5AUC8	Elongation factor Ts	0.52	
D5ARP3	UspA domain protein	0.49	
D5AM62	30S ribosomal protein S16	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AQ41	50S ribosomal protein L13	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AM06	50S ribosomal protein L24	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AKH2	Adenosylhomocysteinase	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AP86	Photosynthetic reaction center L subunit	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5ANH3	Molybdenum ABC transporter periplasmic molybd	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5ALY9	30S ribosomal protein S12	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor

D5AMD0	Inorganic pyrophosphatase	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5ALS1	Protease Do	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AM23	Autoinducer binding transcriptional regulator	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5APG1	Hydrogenase large subunit	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5ALC7	Arginine biosynthesis bifunctional protein Arg	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AU26	Nucleoside diphosphate kinase	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5ARX4	HesB YadR YfhF family protein	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5APB8	Dihydrolipoyllysine residue succinyltransferas	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AM21	DNA directed RNA polymerase subunit alpha	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor

4.3.2 Sıcak Stresinin Protein Ekspresyonuna Etkisi – 6. Saat

Altı saat süreyle 42 °C' de sıcak stresi uygulanmış olan örneklerin, optimum sıcaklıkta büyümüş olan (6. saat örneği) örnekle karşılaştırılması sonucunda Tablo 9'da listelenmiş olan 28 proteinin ekspresyon seviyelerinin değiştiği gözlenlendi. Bu 28 proteinin 16 adetinin ekspresyon seviyeleri sıcak stresi koşullarında, 12 proteinin ekspresyonuysa optimum koşullarda daha yüksek olarak bulundu.

Ekspresyonu sıcak stresi koşullarında en fazla yükselen protein, elektron taşıma zinciri elemanlarından biri olan "Electron transfer flavoprotein beta subunit protein" olarak belirlendi. Bu proteinin optimum koşullarındaki ekspresyonu sıcak stresi koşullardakiyle karşılaştırılınca çok düşük (bazal seviye) hatta hiç denebilecek düzeydedir. Flavoproteinlerin yanı sıra " Light harvesting protein B800- 850 beta chain ve succinate dehydrogenase flavoprotein subunit" gibi elektron taşıma sisteminde görevli diğer proteinlerin ekspresyonunun sıcak stresi koşullarında arttığı gözlenmiştir.

Lipoproteinlerin ekspresyonu 6 saat sıcak stresine maruz kalmış örneklerde de ortaya çıkmıştır. Ayrıca membran taşıma (HlyD family secretion protein ve ABC transporter subunit) ve hareketlilikle ilgili (OmpA-MotB) proteinlerin ekspresyonun sıcak stresine bir cevap olarak 6. saat örneklerinde yükseldiği görülmüştür. Isı şoku protein ailesine mensup şaperon ve şaperoninlerin ekspresyonları sıcak stresi uygulanmasıyla artmıştır. Aminoasit ve peptid sentezinden sorumlu "citrate synthetase" ve ribozomal alt birimlerin (L3, L27, S5) ekspresyonlarıda artan sıcaklıkla optimum seviyeye göre yükselmiştir.

Altı saat süreyle uygulanan sıcak stresi sonrasında ekspresyonu azalan proteinler, farklı metabolik yolaklarda görevlidirler. Transkripsiyonda görevli olan “DNA directed RNA polymerase subunit” and “Elongation factor Ts”, elektron taşıma sistemi elemanlarından “cytochrome c2” , “Trimethylamine N oxide reductase” ve “Light harvesting protein B800-850 gamma chain”, ligasyonda görevli “Phosphoribosylformylglycinamidin synthatase”, demir-sülfür bağlanmasında görevli “HesB YarD YthF family protein”, soğuk şoku proteini “CspA2” ve ribozom birleşmesinde görevli ribozom alt birimleri “50S L1, 30S S12” proteinlerinin ekspresyonları sıcak şoku uygulandığında azalmıştır.

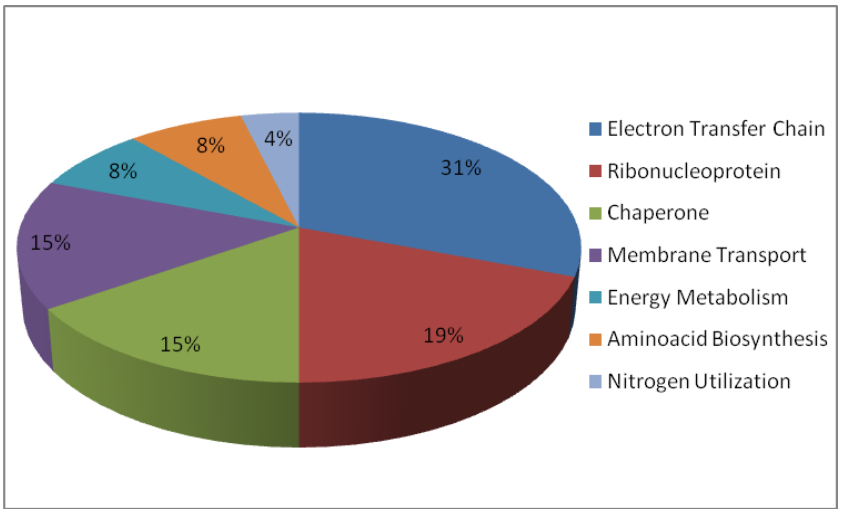
Tablo 9. Sıcak stresi koşullarında iki saat tutulan hücrelerde, ekspresyonu 1,5 kat değişen proteinlerin listesi (6. Saat)

Erişim Numarası	Tanım	Proteinlerin ekspresyon Oranı (42°C-6. saat/30°C-6. Saat)	Yüksek Ekspresyonun olduğu sıcaklık ve saat
D5AL53	Electron transfer flavoprotein beta subunit	-	Sadece 42°C-6. saat te üretiliyor
D5ALZ4	50S ribosomal protein L3	-	Sadece 42°C-6. saat te üretiliyor
D5ANL7	Lipoprotein putative	-	Sadece 42°C-6. saat te üretiliyor
D5AL39	50S ribosomal protein L27	-	Sadece 42°C-6. saat te üretiliyor
D5ANM8	Secretion protein HlyD family	-	Sadece 42°C-6. saat te üretiliyor
D5AT08	ABC transporter periplasmic substrate binding	-	Sadece 42°C-6. saat te üretiliyor
D5ARB4	OmpA MotB domain protein	-	Sadece 42°C-6. saat te üretiliyor
D5AU14	Phosphoglycerate kinase	-	Sadece 42°C-6. saat te üretiliyor
D5ALD3	Chaperone protein dnaK	2.59	
D5AMD1	10 kDa chaperonin	1.73	
D5AMD2	60 kDa chaperonin	1.72	
D5AM12	30S ribosomal protein S5	1.58	
D5ASM0	Nitrogen regulatory protein P II 2	1.54	
D5ALN3	Citrate synthase	1.54	
D5APC6	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	1.51	
D5AU15	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	0.66	

D5AMI7	Light harvesting protein B 800 850 gamma chai	0.64	
D5ASA6	Cytochrome c2 1	0.64	
D5AMI3	Pyridine nucleotide disulfide oxidoreductase f	0.58	
D5ALY3	50S ribosomal protein L1	0.58	
D5AMB4	Cold shock protein CspA 2	-	Sadece 30°C-6. saat te üretiliyor
D5AP69	Trimethylamine N oxide reductase	-	Sadece 30°C-6. saat te üretiliyor
D5AUC8	Elongation factor Ts	-	Sadece 30°C-6. saat te üretiliyor
D5ALY9	30S ribosomal protein S12	-	Sadece 30°C-6. saat te üretiliyor
D5AVB7	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase Pu	-	Sadece 30°C-6. saat te üretiliyor
D5ARX4	HesB YadR YfhF family protein	-	Sadece 30°C-6. saat te üretiliyor
D5AM21	DNA directed RNA polymerase subunit alpha	-	Sadece 30°C-6. saat te üretiliyor

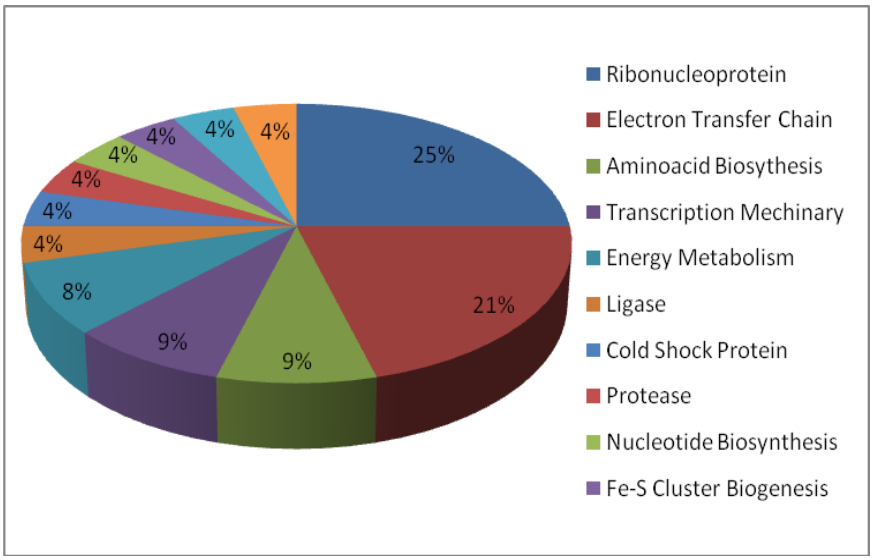
4.3.3 Sıcak Stresi Koşullarında Ekspresyonu Artan ve Azalan Proteinler

Sıcak şoku koşullarında ekspresyonu artan, Şekil 30'da pasta grafiği ile ifade edilen, birbirinden farklı 26 tane protein tespit edilmiştir. Yüksek miktarda ifadelenen proteinler farklı hücresel fonksiyonları yerine getirmektedirler. Sekiz protein farklı elektron transfer zincirlerinde (fotosentetik ve solunumsal), beş protein ribozom yapısında, dört protein membran taşımasında (hem hücre dışı hem de periplasmik boşluğa), dört protein sıcak stresi proteinleri ailesine mensup şaperonlar, iki protein enerji metabolizmasında, bir protein aminoasit biyosentezinde ve bir protein nitrojen metabolizmasının regülasyonunda görev almaktadır.



Şekil 30 Pasta grafiği sıcak stresi durumda ekspresyonu artan proteinlerin hücresel işlevlerine göre dağılımı

Şekil 31'de dağılımları gösterilen 24 proteinin ekspresyonu sıcak stresine tepki olarak azalmaktadır. Ekspresyonu azalan proteinler hücresel işlevlerine göre çeşitlidirler. Ekspresyonu azalan 6 protein, ribozom yapısında görev alan ribonükleoproteinlerdir. Ayıca beş adet elektron transfer zinciri elemanı proteinin, enerji metabolizmasında görevli iki proteinin, amino asit biyosentezi ve transkripsiyonda görevli ikişer proteinin ekspresyonu optimum koşullardaki ekspresyonlarından daha düşük seviyededir. Bu proteinlere ek olarak, bir protein katlanmasına yardımcı proteinle ve nükleotid metabolizmasında görevli bir proteinin ekspresyonları da optimum koşullarda sıcak stresi koşullarından daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 31. Pasta grafiği sıcak stresi durumda ekspresyonu azalan proteinlerin hücresel işlevlerine göre dağılımı

4.3.4 Soğuk Stresinin Protein Ekspresyonuna Etkisi – 2. Saat

Tablo 10'da listelenmiş olan 34 proteinin ekspresyonu optimum koşullarda büyütülen hücrelerin protein ekspresyon seviyeleri, soğuk stresine maruz bırakılan hücrelerle karşılaştırıldığında 1.5 kat veya daha fazla değişim göstermiştir. Altı proteinin ekspresyonu sıcak stresi koşullarında artarken, 28 proteinin ekspresyon seviyesi optimum koşullarda daha yüksek bulunmuştur.

Membran yapısında bulunan lipoproteinlerin ekspresyonu soğuk stresi koşullarında optimum koşullara göre daha yüksektir. Elektron taşıma zinciri proteinleri olan sitokromların ekspresyonuda soğuk stresi uygulandığında artış göstermiştir. Sitokrom c' nin ekspresyonu soğuk stresi koşullarında optimum koşullardaki ekspresyonun 1,58 katıdır. Soğuk stresine karşı ekspresyonu artış gösteren proteinler, elektron taşıma zinciri proteinin sitokrom c, DNA organizasyonunda görevli "HU-1", ligasyonda görevli "Phosphoribosylformylglycinamidine synthase" ve soğuk şoku proteini CspD' dir.

Soğuk stresiyle birlikte ekspresyonu azalan proteinler hücresel ödevlerine göre çok çeşitlidirler. Ekspresyonu azalan proteinler, ribozom oluşumu, aminoasit biyosentezi, periplazmik ve membran taşınımı, genel stres cevabı, glikoliz, TCA döngüsü, klorofil sentezi, transkripsiyon regülasyonu, elektron transferi gibi kritik metabolik yolaklarda görevlidirler. DNA kontrolündeki RNA polimeraz ekspresyonu soğuk stresi uygulanmasıyla dramatik bir düşüş göstermektedir. Soğuk şoku proteini "Csp A" nın ekspresyonu soğuk stresi koşullarında azalmıştır. Bir diğer stres proteini "UspA doamin protein"in ekspresyonu da sıcak stresine tepki olarak azalma göstermiştir. Ribozom oluşumu ve protein biyosentezinde görevli olan, 50S L1 and L24 and 30S S18,S17 ve S8 proteinlerinin ekspresyonları optimum koşullardaki ekspresyon seviyeleriyle karşılaştırılınca, soğuk stresi koşullarında daha düşüktür. Benzer şekilde, aminoasit biyosentezinde görev alan proteinlerin ekspresyonları da soğuk stresi koşullarında düşmüştür. "S adenosylmethionine synthase" ve "Adenosylhomocysteinase" gibi aminoasit biyosentezinden sorumlu enzimlerin miktarı soğuk stresi koşullarında yarıya düşmüştür. Elektron taşıma zinciri proteinleri olan "pyridine nucleotide transhydrogenase alpha", "photosynthetic reaction center L subunit" ve "succinate dehydrogenase flavoprotein subunit" proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin soğuk stresi koşullarında daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Enerji metabolizmasında görevli olan "phosphoglycerate kinase", "Dihydrolipoyllysine residue succinyl transferase", "Pyridine nucleotide transhydrogenase alpha" proteinleri daha az ekpres olmuştur. "Inorganic pyrophosphotase" ekspresyonu en dramtaik düşüşü göstermiştir, soğuk stresi koşullarında ekspresyonu nerdeyse sıfırdır.

Tablo 10. Soğuk stresi koşullarında 2 saat bırakılmış olan örneklerde ekspresyonu en az 1,5 kat değişim gösteren proteinlerin listesi

Erişim Numarası	Tanım	Proteinlerin ekspresyon Oranı (4°C-2. saat/30°C-2. Saat)	Yüksek Ekspresyonun olduğu sıcaklık ve saat
D5AQ86	Lipoprotein putative	-	Sadece 4°C-2. saat te üretiliyor
D5ASK4	Pirin domain protein	-	Sadece 4°C-2. saat te üretiliyor
D5AVB7	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase Pu	-	Sadece 4°C-2. saat te üretiliyor

D5ANC2	Cytochrome c	1.58	
D5AR60	Cold shock like protein CspD	1.52	
D5ALF8	DNA binding protein HU 1	1.52	
D5ARK7	S adenosylmethionine synthase	0.59	
D5AMB4	Cold shock protein CspA 2	0.58	
D5AUW5	30S ribosomal protein S18	0.53	
D5ARR0	Porphobilinogen deaminase	0.53	
D5AT08	ABC transporter periplasmic substrate binding	0.48	
D5AMI4	Light harvesting protein B 800 850 beta chain	0.39	
D5ANH3	Molybdenum ABC transporter periplasmic molybd	0.3	
D5AKP1	Sigma 54 modulation protein ribosomal protein	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AM09	30S ribosomal protein S8	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5ALY3	50S ribosomal protein L1	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5ALX9	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AM06	50S ribosomal protein L24	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AKH2	Adenosylhomocysteinase	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AP69	Trimethylamine N oxide reductase	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AP86	Photosynthetic reaction center L subunit	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5APC6	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5ARP3	UspA domain protein	-	Sadece 30°C-2. saat te

			üretiliyor
D5AMD0	Inorganic pyrophosphatase	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AM04	30S ribosomal protein S17	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5ALS1	Protease Do	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AM23	Autoinducer binding transcriptional regulator	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5APG1	Hydrogenase large subunit	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5APA8	Pyridine nucleotide transhydrogenase alpha su	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5ALC7	Arginine biosynthesis bifunctional protein Arg	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AU26	Nucleoside diphosphate kinase	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5APB8	Dihydrolipoyllysine residue succinyltransferas	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AU14	Phosphoglycerate kinase	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor
D5AM21	DNA directed RNA polymerase subunit alpha	-	Sadece 30°C-2. saat te üretiliyor

4.3.5 Soğuk Stresinin Protein Ekspresyonuna Etkisi – 6. Saat

Tablo 11'de listelenmiş olan 24 proteinin ekspresyonları soğuk stresi durumunda optimum koşullardaki ekspresyon seviyelerinden en az 1,5 kat veya daha fazla farklılık göstermiştir. Soğuk stresi koşullarında 18 proteinin ekspresyonu artarken, 6 proteinin ekspresyonunun optimum koşullarda daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Soğuk stresi koşullarında ekspresyonu artan proteinler, "Sigma 54 modulation protein ribosomal protein, Cold shock like protein CspD, OmpA-MotB domain protein, UspA domain protein" gibi soğuk stresi proteinleri, "Secretion protein HlyD family, Lipoprotein putative" gibi membran yapı ve taşıma proteinleri, "Light harvesting protein B 800 850 beta chain, electron transfer flavoprotein beta subunit and cytochrome c oxidase Cbb3 type subunit III" elektron transfer zinciri proteinleridir. "ABC transporter periplasmic

substrate binding" membran taşıma proteininin normal koşullardaki ekspresyonu, soğuk koşullardaki ekspresyonundan çok daha düşüktür. Nükleotid biyosentezinde görevli olan "Nucleoside diphosphate kinase ve Pyridine nucleotide transhydrogenase alpha" proteinlerinin ekspresyonu, öte yandan, soğuk stresi koşullarında artmıştır.

"DNA directed RNA polymerase subunit, autoinducer binding elongation factor "Ts" ve Polyribonucleotide nucleotidyl transferase" gibi transkripsiyon mekanizmasında görevli proteinlerin ekspresyonu azalmıştır. Transkripsiyon mekanizmasıyla beraber translasyon mekanizmasında görevli proteinlerin ekspresyonları da düşmüştür. Ribozomal proteinler, "50S ribosomal protein L4, 30S ribosomal protein S16, 50S ribosomal protein L13, 50S ribosomal protein L24", optimum koşullarda soğuk stresi uygulandığı durumdan daha fazla sentezlenmektedirler. Ayrıca aminoasit metabolizmasında görev alan "adenosylhomocysteinase, arginine biosynthesis bifunctional protein" proteinleri soğuk stresi koşullarında daha az sentezlenirler.

Tablo 11. Altı saat süresince soğuk stresine maruz bırakılan örneklerde ekspresyonu en az 1,5 kat değişim gösteren proteinlerin listesi

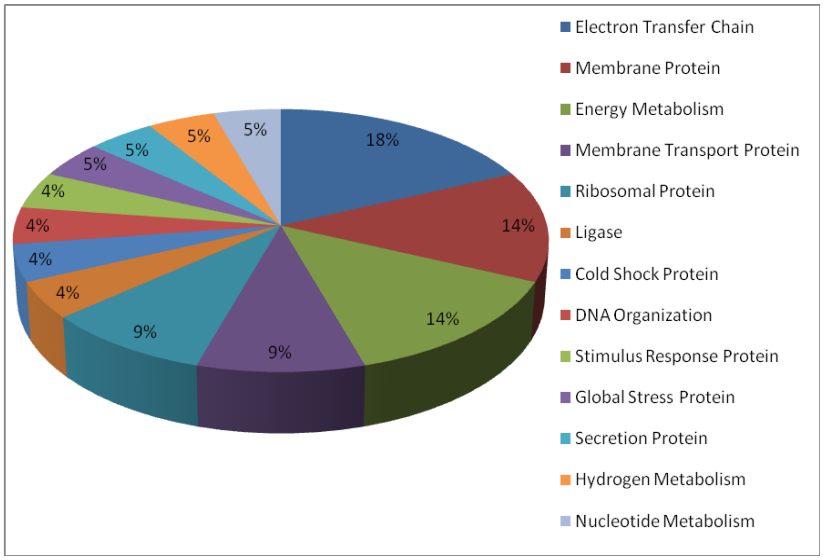
Erişim Numarası	Tanım	Proteinlerin ekspresyon Oranı (4°C-6. saat/30°C-6. Saat)	Yüksek Ekspresyonun olduğu sıcaklık ve saat
D5AKU8	Propanediol utilization protein PduB	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5AKP1	Sigma 54 modulation protein ribosomal protein	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5AL53	Electron transfer flavoprotein beta subunit	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5ALX9	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5ARP7	Cytochrome c oxidase Cbb3 type subunit III	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5ARP3	UspA domain protein	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5AL39	50S ribosomal protein L27	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5AUJ3	Isocitrate dehydrogenase NADP	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5ALG7	Lipoprotein putative	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5ANM8	Secretion protein HlyD family	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor

D5AT08	ABC transporter periplasmic substrate binding	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5ARB4	OmpA MotB domain protein	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5APG1	Hydrogenase large subunit	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5APA8	Pyridine nucleotide transhydrogenase alpha su	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5AU26	Nucleoside diphosphate kinase	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5AU14	Phosphoglycerate kinase	-	Sadece 4°C-6. saat te üretiliyor
D5AMI4	Light harvesting protein B 800 850 beta chain	2.8	
D5AR60	Cold shock like protein CspD	1.86	
D5AUD7	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 1	0.58	
D5AQ86	Lipoprotein putative	0.49	
D5AM09	30S ribosomal protein S8	-	Sadece 30°C-6. saat te üretiliyor
D5AM06	50S ribosomal protein L24	-	Sadece 30°C-6. saat te üretiliyor
D5AU15	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	-	Sadece 30°C-6. saat te üretiliyor
D5AVB7	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase Pu	-	Sadece 30°C-6. saat te üretiliyor

4.3.6 Soğuk Stresi Altında Ekspresyonu Artan ve Azalan Proteinler

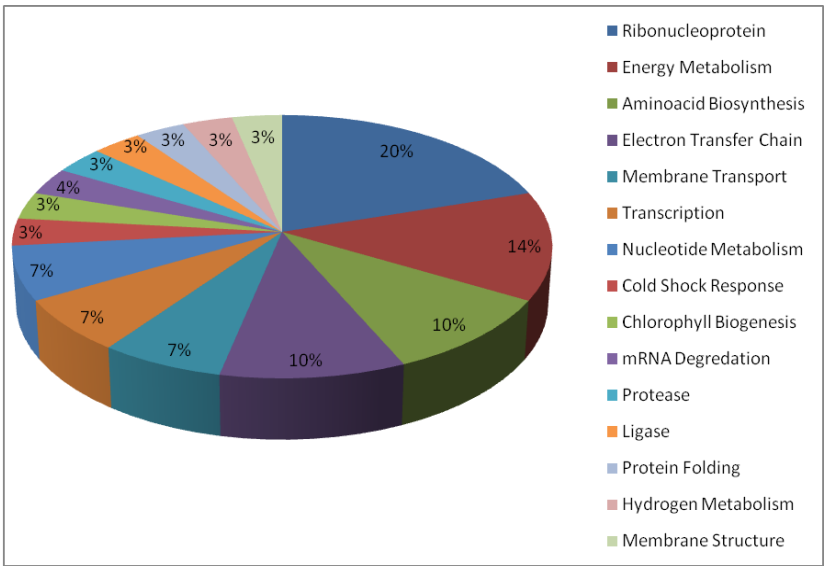
Şekil 32'de dağılımları gösterilen 22 protein, soğuk stresi uygulanmış *R.capsulatus* kültürlerinde artış gösteren proteinlerdir. Ekspresyonu artan proteinlerin dördü elektron taşıma zinciri proteini, üçü membran proteini (membran integral protein veya membrana bağlı protein), ikisi membran taşımasında görevli protein, üç proteinden oluşan diğer bir grubun enerji metabolizmasında görevli protein, ikisinin ribozomal protein (bir sigma faktörü ve bir ribonükleoprotein) olduğu proteomik analizler sonucunda belirlenmiştir. Bu proteinlere ek olarak bir ligaz, bir soğuk şoku proteini, bir DNA' ya bağlanan protein, bir global stres

faktörü, bir salgı proteini, hidrojen metabolizmasında görevli bir enzimin altbirimi ve nükleotid metabolizmasında görevli bir enzimin ekspresyonu da soğuk stresi koşullarında artış göstermiştir.



Şekil 32. Pasta grafiği soğuk stresi koşullarında yüksek miktarda sentezlenen proteinlerin hücresel işlevlerine göre yüzde dağılımlarını göstermektedir

Şekil 33'de sıcak stresine tepki olarak miktarı azalan 30 proteinin hücresel işlevlerine göre dağılımları görülmektedir. Azalan proteinler, ribonükleoprotein (altı protein), enerji metabolizması proteinleri (dört protein), elektron taşıma zinciri proteinleri (üç protein), aminoasit biyosentezi proteinleri (üç protein), transkripsiyon faktörleri (iki proein), nükleotid biyosentezinde görevli enzimler (iki protein), bir soğuk stresi proteini, klorofil biyosentezinde görevli bir enzim, mRNA degredasyonunda görevli bir enzim, bir proteaz, bir integral membran proteini, bir protein katlanma proteini, bir lipaz ve hidrojen metabolizmasında görevli bir enzimdir.



Şekil 33. Pasta grafiği soğuk stresi koşullarında miktarı azalan proteinlerin hücresel işlevlerine göre yüzde dağılımlarını göstermektedir

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada fotosentetik biyohidrojen üretiminde kullanılan *R. capsulatus* bakterisinin soğuk ve sıcaklık stresi koşullarında gen ve protein ifadelerindeki değişim mikrodizin ve proteomik metotlarıyla analiz edilmiştir. Kontrol (30 °C) koşullarında 48 saat süreyle büyütülen bakteriler daha sonra soğuk (4°C) ve sıcak (42°C) stresine maruz bırakılarak RNA ve protein örnekleri saflaştırılmış, gen ve protein ifadelerindeki değişim sırasıyla mikrodizin ve LC-MS/MS yöntemleri ile araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, sıcak ve soğuk stresinin hidrojen üretimi, büyüme ve organik asit tüketimine etkisi ayrıca oluşturulan bir deney düzeneği ile araştırılmıştır.

Yapılan fizyolojik testler, sıcak stresi uygulamasının bakteri büyümesini tamamen durdurduğunu, soğuk stresi altında ise bakterilerin daha düşük bir büyüme hızında büyümeye devam ettiğini göstermiştir. Sıcak ve soğuk stresi hidrojen üretiminin durmasına yol açmıştır. Buna paralel olarak, organik asit (asetik asit) tüketim hızı soğuk stresinde yavaşlama gösterirken, sıcak stresine asetik asidin tamamen tüketilemediği gözlenmiştir.

Mikrodizin analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için GeneChip® *Rhodobacter capsulatus* Whole Genome Expression Array özel olarak ilk defa bu çalışmada tasarlanmış ve Affymetrix firmasına ürettirilmiştir. Toplamda mikrodizin üzerine 4052 prob seti yerleştirilmiştir. Çip ismi Affymetrix.GeneChip®.TR_RCH2a520699F olarak belirlenmiştir. *R. capsulatus* bakterisinden yüksek konsantrasyon ve saflıkta RNA saflaştırma protokolü TRizol (Invitrogen) kullanılarak başarı ile optimize edilmiş, mikrodizin analizinde kullanılabilir nitelikte RNA saflaştırma protokolü geliştirilmiştir. RNA saflığı spektrofotometrik olarak (260/280 oranı), kalitesi ise elektroforetik olarak (Agilent Bioanalyzer 2100) test edilmiş, mikrodizin analizinde kullanılabilecek nitelikte oldukları anlaşıldıktan sonra analize devam edilmiştir. Mikrodizin analizi sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildikten sonra 2 kat ve üstü değişim gösteren genler, bağlı oldukları metabolik yolaklara göre kategorize edilerek, soğuk ve sıcaklık stresinin yol açtığı metabolik değişimler incelenmiştir. Buna göre sıcak stresinin en çok fotosentetik, elektron taşıma ve nitrojen metabolizmalarında görevli genlerin ekspresyonunu etkilediği

görülmektedir. Bu metabolik yolaklar hidrojen üretiminde birincil derecede öneme sahiptir. Sıcaklık stresi altında hidrojen üretiminin durmasının ilgili genlerin ifadelerindeki azalmayla bağlantılı olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra, hücre zarı fonksiyonlarının korunmasında ve bütünlüğünün sağlanmasında ve hücre zarı onarımında rol alan genlerin de sıcak stresi altında arttığı gözlenmiştir. Nükleik asit metabolizması da sıcaklık stresinden en çok etkilenen metabolizmalardan biri olarak görülmektedir. Proteomik analizinden elde edilen veriler mikrodizin sonuçlarını doğrular niteliktedir. Örneğin, sıcak stresi altında elektron taşıma zincirinde yer alan proteinlerin, hücre zarı taşıyıcı proteinlerinin ve nükleik asit metabolizmasında yer alan proteinlerin ekspresyonlarında artış gözlenmektedir. DNA sentezi ve onarımında rol alan proteinlerde ve bunlara bağlı genlerin ekspresyon seviyelerinde artış görülmektedir. Sıcaklık stresinin sıcak şok proteinlerinin (şaperon ve şaperoninler) ekspresyonunda artışa neden olduğu görülmüş, bu değişim gen ekspresyonu seviyesinde de gözlenmiştir. Sıcak şoku koşullarında; şaperon sentezinin yanı sıra hücre bölünmesiyle ilgili proteinlerin ekspresyonlarının da artığı bilinmektedir (NEPPLE ve BACHOFEN, 1997). ZapA protein ailesi gibi hücre bölünme protein ailelerinin ekspresyonlarının sıcaklık stresisnde arttıkları gözlemlenmiştir. Sıcak şoku, soğuk şoku gibi hücrenin protein profilini dramatik şekilde etkilemektedir (YURAve NAKAHIGASHI, 2001). Protein profilini değiştirmek için hem proteazlar (dnaK) hem de ribozom alt yapılarının sentezi artmaktadır sıcaklık stresinde artmaktadır.

Taşıyıcı ve bağlayıcı proteinlerin sentezinden sorumlu genlerinde, kofaktör biyosentezi genlerinde, prostetik grupların taşınmasında rol alan proteinlerin sentezinden sorumlu genlerde de soğuk ve sıcaklık stres altında değişimler gözlenmiştir.

Soğuk stresi bakteride daha genel bir stres tepkisi yaratmıştır. Sıcak stresi altında daha çok zar yapısı ve fonksiyonu ile ilgili proteinlerin ekspresyonunda ve sıcak şok proteinlerinin ekspresyonunda değişim gözlenirken, soğuk stresi altında enerji metabolizması, nükleik asit metabolizması, soğuk şok proteinleri, global stres proteinleri, hücre zarı metabolizmasında ye alan proteinler ve daha birçok metabolik yolakta önemli değişimler gözlenmiştir.

Nitrojen metabolizması ve nitrojenaz genlerinin ekspresyonunda soğuk stresi altında görülen artış, proteomik analizlerde de gözlemlenmiştir. Özellikle azot metabolizmasında görev alan sigma 54 faktörü ve “Nitrogenase iron protein 2” nin ekspresyonu seviyesinde artışlar proteomik analizlerle de gözlenmiştir. Nitrojenaz enzimi amino asitler için gerekli olan azot fiksasyonunda görev almaktadır. Stres koşullarında nitrojen metabolismasına yönelik proteinlerdeki artış savunma mekanizması olarak geliştirilmiş olabilir. Soğuk stresinde ayrıca geri kullanım hizrojenaz (uptake hydrogenase) enzimi ve elektron transfer zincirinde görev alan bazı proteinlerde artışlar gözlemlenmiştir. Soğuk stresinde hidrojen üretiminin azalması ve tamamen durması bu bulgularla desteklenmektedir.

Bu proje kapsamında gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen verilerin oldukça fazla olması, uzun süreli bir metabolik analiz gerektirmektedir. Bu nedenle, verilerin kıyaslanması ve yorumlanması ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir.

Ayrıca, elde edilen verilerin diğer yöntemlerle doğrulanması gerekebilmektedir, çünkü bu metotlar, özellikle mikrodizin analizi, “high throughput” yani yüksek miktarda çıktısı olan fakat güvenilirliği sorgulanabilen metotlardır. Bu nedenle, mikrodizin analizinden elde edilen bazı verilerin, kantitatif PZR (Q-PCR) gibi güvenilirliği daha yüksek olan bir başka moleküler metot ile doğrulanması gerekmektedir. Bu konudaki çalışmalar laboratuvarımızda devam etmektedir. Benzer şekilde, LC-MS-MS sistemi ile elde edilen verilerin, biyokimyasal yöntemler ile, örneğin enzim aktivitesi ölçümleri yapılarak, doğrulanması verilerin güvenilirliğini arttıracaktır.

Bu proje sonunda edinilen bilgiler, proje önerisinde belirlenen hedeflere ulaşıldığını göstermektedir.

Rhodobacter capsulatus bakterisinde soğuk ve sıcaklık stresinin hidrojen üretim metabolizmasına etkilerinin incelenmesini amaçlayan bu projede oldukça fazla bilgi birikimi elde edilmiştir. Literatürde ilk kez *R. capsulatus* için özel bir GeneChip Ekspresyon mikrodizini bu çalışma kapsamında tasarlanmıştır. Tasarlanan çip uygulamada başarılı sonuçlar vermiştir. Proteomik ve mikrodizin analizleri paralel bir şekilde tamamlanmıştır. Analiz sonuçlarının yorumlanması ve doğrulanması yönünde çalışmalarımız devam etmektedir. Çalışmalardan elde edilen verilerle iki yüksek lisans tezi tamamlanmıştır. Ayrıca, bu çalışma kapsamında geliştirilen çiplerle bir doktora öğrencisi mikdodizin kullanarak *R. capsulatus* asetik asit metabolizması ile ilgili çalışmalar yürütmektedir. Yine bu proje desteği alan bursiyer öğrencilerden biri, *R. capsulatus*'un farklı büyüme koşullarındaki protein değişimlerini proteom analizleri ile çalışmaktadır. Elde edilen verilerin yüksek nitelikli uluslararası bilimsel dergilerde yayınlanması için çalışmalarımız devam etmektedir.

REFERANSLAR

Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide (n.d.) 14 Aralık 2011'de http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/G2938-90035_QuickRNA6000Nano.pdf'den alınmıştır.

ARIK, T., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L., Sediroğlu, V., Eroğlu, I., Photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. Hydrogen Energy Progress XI, Proceedings of the 11th World Energy Conferences, Stuttgart, vol 3, 1996. p. 2417-24.

BRAATSCH, S., Moskvin, O.V., Klug, G., Gomelsky, M., Responses of the *Rhodobacter sphaeroides* transcriptome to blue light under semiaerobic conditions. *J Bacteriol*., 186(22), 7726-35, (2004).

BOCKRIS, JO'M., The origin of ideas on a hydrogen economy and its solution to the decay of the environment, *Int J Hydrogen Energy*, 27, 731–40, (2002).

CALLISTER, S.J., Nicora, C.D., Zeng, X., Roh, J.H., Dominguez, M.A., Tavano, C.L., Monroe, M.E., Kaplan, S., Donohue, T.J., Smith, R.D., Lipton, M.S., Comparison of aerobic and photosynthetic *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 proteomes, *J Microbiol Methods*, 67(3), 424-36 (2006).

CONNER, D.E., Kotrola, J.S., Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions, *Appl. Environ. Microbiol*., 61(1), 382-385, (1995).

DALDAL, F., Gray, K., Grooms, M., Myllykallio, H., Moomaw, C., Slaughter, C., *Rhodobacter capsulatus* contains a novel cb-type cytochrome c oxidase without a Cu`A Center, *Biochemistry*, 33, 3120-3127, (1994).

DAS, D., Veziroğlu, T.N.. Hydrogen production by biological processes: A survey of literature, *Int. J. Hydrogen Energy*, 26, 13-28, (2001).

EMETZ, D., Klug, G., Cloning and characterizationof the *rpoH* gene of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.*, 260, 212-217, (1998).

EROGLU, I., Aslan, K., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L., Continuous hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. In: Zaborsky OR, editor. Biohydrogen. New York: Plenum Press, 1998. p. 143-50.

GeneChip® customexpress™ array design guide (n.d.). 28 Ocak 2011'de http://media.affymetrix.com/support/technical/other/custom_design_manual.pdf'den alınmıştır.

GOLTSOV, V.A., Veziroglu, N.T., From hydrogen economy to hydrogen civilization, *Int J Hydrogen Energy*, 26, 909–915, (2001).

GREEN, H.A., Donohue, T.J., Activity of *Rhodobacter sphaeroides* RpoHII, a second member of the heat shock sigma factor family, *J. Bacteriol*., 188 (6), 5712-5721, (2006).

HALL, D.O., Markov, S.A., Watanable, Y., Rao, K.K.,. The potential application of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies, *Photosynthesis Research*, 46, 159-167, (1995).

HALLENBECK, P., Benemann, J., Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1185–1193, (2002).

HASELKORN, R., Lapidus, A., Kogan, Y., Vlcek, C., Paces, J., Paces, V., ve arkadaşları, The *Rhodobacter capsulatus* genome. *Photosynthesis Research*, 70, 43–52, (2001).

HILLMER, P., Gest, H., H_2 metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: H_2 production by growing cultures, *J Bacteriol*., 129 (2), 724–731, (1977).

IMHOFF, F. J., Taxonomy and Physiology of Phototrophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria. Kluwer Academic Publishers. Chapter 1, 1995.

JAGER, S., Hackenberg,E.E., Klug, G., Temperature-dependent processing of the cspA mRNA in *Rhodobacter capsulatus*, *Microbiology*, 150, 687–695, (2004).

JOSHI, H. M., Tabita, F.R., A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation. Proc Natl Acad Sci USA,1996.

JOSIC D., Kovac, S., Application of proteomics in biotechnology – Microbial proteomics, *Biotechnol*., 3, 496-509, (2008).

KOTHARI, R., Buddhi, D., Sawhney, R.L. Comparison of environmental and economic aspects of various hydrogen production methods. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12, 553–563, (2008).

LECLERC, M., Colbeau, A., Cauvin, B., Vignais, P. M., Cloning and sequencing of the genes encoding the large and the small subunits of the H_2 uptake hydrogenase (*hup*) *of Rhodobacter capsulatus*, *Mol. Gen. Genet,* 214, 97–107, (1988).

MEJIA, R., Eichelmann, M.C.G., Fernández, M.S., Membrane fluidity of *Escherichia coli* during heat-shock, *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes*,1239 (2), 195-200, (1995).

NEPPLE, B. B., Bachofen, R., Induction of stress proteins in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides, FEMSMicrobiologyLetters*, 153 (1), 173-180, (1997).

ÖNDER, Ö., Turkarslan, S., Sun, D., Daldal, F., Overproduction or absence of the periplasmic protease DegP severely compromises bacterial growth in the absence of the dithiol:disulfide oxidoreductase DsbA. *Mol. Cellular Proteomics*, 2, M700433-MCP200, (2008).

ÖZGÜR, E., Uyar, B., Öztürk, Y., Yücel, M., Gündüz, U., Eroğlu, İ., Biohydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* on acetate at fluctuating temperatures, *Resources, Conservation and Recycling*, 54, 310–314, (2010).

ÖZTÜRK, Y., Lee, D.W., Mandacı, S., Osyczk, A., Prince, R., Daldal, F.,. Soluble Variants of *Rhodobacter capsulatus* membrane-anchored cytochrome cy are efficient photosynthetic electron carriers, *JBC March J Biol Chem.*, 283 (20), 13964-13972, (2008).

ÖZTÜRK, Y., Yücel, M., Daldal, F., Mandacı, S., Gündüz, U., Türker, L., Eroğlu, İ. Hydrogen production by using *Rhodobacter capsulatus* mutants with genetically modified electron transfer chains. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1545 – 1552, (2006).

PANOFF, J.M., Thammavongs, B., Guéguen, M., Boutibonnes, P., Cold stress responses in mesophilic bacteria, *Cryobiology*., 36(2), 75-83, (1998).

PAUL, F., Colbeau, A., Vignais. P. M., Phosphorylation coupled to H_2 oxidation by chromatophores from *Rhodopseudomonas capsulata*, *FEBS Lett*., 106, 29–33, (1979).

PHADTARE, S., Recent developments in bacterial cold-shock response, *Curr. Issues Mol. Biol*., 6, 125-136, (2004).

STRNAD, H., Lapidus, A., Paces, J., Ulbrich, P., Vlcek, C., Paces, V., Haselkorn.,R., Complete genome sequence of the photosynthetic purple nonsulfur bacterium Rhodobacter capsulatus SB 1003, J*. Bacteriol.*, doi:10.1128/JB.00366-10, (2010).

SYNDER, L., Champness, W., Molecular Genetics of Bacteria, ASM Press, Washingtn DC, USA. (2007).

TAKAKUVA, S., Odom, J.M., Vignais, P.M., Hydrogenase activity in *Rhodoseudomonas capsulata*: relationship with nitrogenase activity, *J Bacreriol*.,144, 141-148, (1980).

TÜRKARSLAN, S., Yigit, D. , Aslan, K., Eroğlu, I., Gündüz U., Photobiological hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 by utilization of waste water from milk industry, Zaborsky OR, ed: Biohydrogen. New York: Plenum Press, (1998), Pp: 151-6.

VIGNAIS, P. M., Colbeau, A., Willison, J. C., Jouanneau, Y., Willison, J . C., Hydrogenase, nitrogenase and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 26, 155-234, (1985).

VIGNAIS, P. M., Billoud, B., Meyer, J., Classification and phylogeny of hydrogenases, *FEMS Microbiol. Rev*. 25, 455–501, (2001).

YURA, T., Nakahigashi, K., Regulation of the heat-shock response, *Curr Opin Microbiol*., 2 (2):153-8. (2001).

ZHANG, Y., Shen, J., Effect of temperature ans iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(4), 441-446, (2006).

ZORIN, N. A., Lissolo, T., Colbeau, A., Vignais, P.M., Increased hydrogen photoproduction by *Rhodobactor capsulatus* strain deficient in uptake hydrogenase, *J Marine Biotechnol*, 4, 28-33, (1996).

TÜBİTAK

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No:108T455
Proje Başlığı: Soğuk ve sıcaklık stresinin *Rhodobacter capsulatus* bakterisinde hidrojen üretim metabolizması üzerine etkileri
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. Meral Yücel, Prof. Dr. İnci Eroğlu, Dr. Yavuz Öztürk, Nurçin Çelik Öztürk
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, 06530, Ankara. TÜBİTAK-MAM GMBE Araştırma Merkezi, Gebze, Kocaeli
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK, Tunus Caddesi No:80 06100 Kavaklıdere / Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15. 10.2008 – 15.10.2011
Öz (en çok 70 kelime): Bu çalışmada *R. capsulatus* bakterisinin gen ve protein ekspresyonundaki değişimlerin ısısal stres altında, hidrojen üretim koşullarında araştırılması hedeflenmiştir. Gen ekspresyonu değişimi *R. capsulatus* GeneChip ekspresyon mikrodizini kullanılarak, proteom analizi ise LC-MS-MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel analize tabi tutularak anlamlı değişim gösteren gen ve proteinler bağlı oldukları metabolik yolaklara göre gruplandırılarak yorumlanmıştır. Stres koşulları altında nitrojen, enerji, elektron taşıma ve nükleik asit metabolizmasında görevli gen ve proteinlerin ekspresyonunda anlamlı değişimler gözlenmiştir.
Anahtar Kelimeler: *Rhodobacter capsulatus*, proteomik, mikrodizin, soğuk stresi, sıcaklık stresi, biyohidrojen
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? **Evet** ☐ **Gerekli Değil** ☒ Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Projeden Yapılan Yayınlar:

Yüksek lisans tezi: Muazzez Gürgan Doğan (2011) Sıcak ve Soğuk Stresinin *Rhodobacter capsulatus* Bakterisinin Hidrojen Üretim Metabolizması Üzerine Etkilerinin Mikrodizin Yöntemi ile İncelenmesi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, Türkiye.

Yüksek lisans tezi: Abdülmecit Gökçe (2011) *Rhodobacter capsulatus* Bakterisinin Sıcak ve Soğuk Stresi Tepkilerinin Proteomik Analizleri ve Sıcağa Dayanıklı Mutantların Evrimsel Mühendisliği. İstanbulTeknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

Konfereans başvurusu: The effects of cold and heat stress on biohydrogen production by *Rhodobacter capsulatus*. World Hydrogen Energy Conference 2012, Toronto, Kanada.

GeneChip®
Expression Analysis Technical Manual

With Specific Protocols for Using the GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit

P/N 702232 Rev. 3

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Contents

CHAPTER 1 Overview 1

CHAPTER CONTENTS 3

INTRODUCTION AND OBJECTIVES 4

EXPLANATION OF GENECHIP® PROBE ARRAYS 4

GENECHIP® EXPRESSION ANALYSIS OVERVIEW 5
- Step 1: Target Preparation 5
- Step 2: Target Hybridization 6
- Step 3: Fluidics Station Setup 6
- Step 4: Probe Array Washing and Staining 6
- Step 5: Probe Array Scan 6
- Step 6: Data Analysis 7

PRECAUTIONS 7

TERMINOLOGY 8

INTERFERING CONDITIONS 8

INSTRUMENTS 8

REFERENCES 8

LIMITATIONS 9

CHAPTER 2 Eukaryotic Target Preparation 11

CHAPTER CONTENTS 13

INTRODUCTION 14

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED 17

TOTAL RNA AND mRNA ISOLATION FOR ONE-CYCLE TARGET LABELING ASSAY 20
Isolation of RNA from Yeast 20
Isolation of RNA from Arabidopsis 21
Isolation of RNA from Mammalian Cells or Tissues 21
Precipitation of RNA 22
Quantification of RNA 23

TOTAL RNA ISOLATION FOR TWO-CYCLE TARGET LABELING ASSAY 24

ONE-CYCLE cDNA SYNTHESIS 25
Step 1: Preparation of Poly-A RNA Controls for One-Cycle cDNA Synthesis (Spike-in Controls) 25
Step 2: First-Strand cDNA Synthesis 28
Step 3: Second-Strand cDNA Synthesis 31

TWO-CYCLE cDNA SYNTHESIS 33
Step 1: Preparation of Poly-A RNA Controls for Two-Cycle cDNA Synthesis (Spike-in Controls) 33
Step 2: First-Cycle, First-Strand cDNA Synthesis 36
Step 3: First-Cycle, Second-Strand cDNA Synthesis 38
Step 4: First-Cycle, IVT Amplification of cRNA 40
Step 5: First-Cycle, Cleanup of cRNA 42
Step 6: Second-Cycle, First-Strand cDNA Synthesis 44
Step 7: Second-Cycle, Second-Strand cDNA Synthesis 46

CLEANUP OF DOUBLE-STRANDED cDNA FOR BOTH THE ONE-CYCLE AND TWO-CYCLE TARGET LABELING ASSAYS 48

SYNTHESIS OF BIOTIN-LABELED cRNA FOR BOTH THE ONE-CYCLE AND TWO-CYCLE TARGET LABELING ASSAYS 50

CLEANUP AND QUANTIFICATION OF BIOTIN-LABELED cRNA 52
Step 1: Cleanup of Biotin-Labeled cRNA 52
Step 2: Quantification of the cRNA 54
Step 3: Checking Unfragmented Samples by Gel Electrophoresis 55

FRAGMENTING THE cRNA FOR TARGET PREPARATION 57

CHAPTER 3 Eukaryotic Target Hybridization 59

CHAPTER CONTENTS 61

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED 62

EUKARYOTIC TARGET HYBRIDIZATION 63

CHAPTER 4 Prokaryotic Target Preparation 67

CHAPTER CONTENTS 69

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED 71

REAGENT PREPARATION 72

TOTAL RNA ISOLATION 72

cDNA SYNTHESIS 74
Step 1: Preparation of Poly-A RNA Controls 74
Step 2: cDNA Synthesis 76
Step 3: Removal of RNA 77
Step 4: Purification and Quantitation of cDNA 78

cDNA FRAGMENTATION 79

TERMINAL LABELING 80

CHAPTER 5 Prokaryotic Target Hybridization 83

CHAPTER CONTENTS 85

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED 85

PROKARYOTIC TARGET HYBRIDIZATION 86

CHAPTER 6 Prokaryotic Arrays: Washing, Staining and Scanning 89

CHAPTER CONTENTS 91

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED 92

EXPERIMENT AND FLUIDICS STATION SETUP 94
Step 1: Defining File Locations 94
Step 2: Entering Experiment Information 95
Step 3: Preparing the Fluidics Station 96

PROBE ARRAY WASH AND STAIN 97
Preparing the Stain Reagents 98
Using the Fluidics Station 450/250 98
Using the Fluidics Station 400 102

PROBE ARRAY SCAN 107
Handling the GeneChip® Probe Array 107
Scanning the Probe Array 108

SHUTTING DOWN THE FLUIDICS STATION 109

CUSTOMIZING THE PROTOCOL 111

APPENDIX A Alternative Protocols for One-Cycle cDNA Synthesis 113

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED 115

ALTERNATIVE PROTOCOL FOR ONE-CYCLE cDNA SYNTHESIS FROM TOTAL RNA 116
Step 1: First-Strand cDNA Synthesis 116
Step 2: Second-Strand cDNA Synthesis 118

ALTERNATIVE PROTOCOL FOR ONE-CYCLE cDNA SYNTHESIS FROM PURIFIED POLY-A mRNA 119
Step 1: First-Strand cDNA Synthesis 119
Step 2: Second-Strand cDNA Synthesis 121

APPENDIX B Alternative Protocol for Eukaryotic Target Hybridization 123

INTRODUCTION AND OBJECTIVES 126

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED 127

REAGENT PREPARATION 128

EUKARYOTIC TARGET HYBRIDIZATION 129

APPENDIX C Alternative Protocol for Prokaryotic Target Hybridization 133

INTRODUCTION AND OBJECTIVES 135

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED 136

REAGENT PREPARATION 137

PROKARYOTIC TARGET HYBRIDIZATION 138

APPENDIX D Alternative Protocol for Prokaryotic Arrays: Washing, Staining and Scanning 141

INTRODUCTION AND OBJECTIVES 144

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED 145

REAGENT PREPARATION 146

EXPERIMENT AND FLUIDICS STATION SETUP 147
Step 1: Defining File Locations 147
Step 2: Entering Experiment Information 148
Step 3: Preparing the Fluidics Station 149

PROBE ARRAY WASH AND STAIN 150
Using the Fluidics Station 450/250 155
Using the Fluidics Station 400 157

PROBE ARRAY SCAN 159
Handling the GeneChip® Probe Array 159
Scanning the Probe Array 160

SHUTTING DOWN THE FLUIDICS STATION 161

CUSTOMIZING THE PROTOCOL 162

APPENDIX E List of Controls on GeneChip® Probe Arrays 165

CONTROL GENES ON GENECHIP® EUKARYOTIC PROBE ARRAYS 167

CONTROL GENES ON GENECHIP® PROKARYOTIC PROBE ARRAYS 168

APPENDIX G Contact Information 169

AFFYMETRIX TECHNICAL SUPPORT 171

SUPPLIER CONTACT INFORMATION 172

Chapter 1

Overview

Chapter 1

Chapter Contents

Introduction and Objectives 4
Explanation of GeneChip® Probe Arrays 4
GeneChip® Expression Analysis Overview 5
Precautions 7
Terminology 8
Interfering Conditions 8
Instruments 8
References. 8
Limitations 9

This Chapter Contains:

- An overview of GeneChip® Expression Analysis.
- A summary of the procedures covered in the remainder of the manual.

Introduction and Objectives

Welcome to the *Affymetrix GeneChip® Expression Analysis Technical Manual*. This manual is a technical guide for using GeneChip expression analysis probe arrays. All protocols included in this manual have been used successfully by scientists at Affymetrix, or have been recommended by our collaborators during the development of particular products. The field of mRNA gene expression monitoring is rapidly evolving and periodic technical updates to this manual will reflect the newest protocols and information for using GeneChip probe arrays. This manual applies to all GeneChip 3' eukaryotic arrays in cartridge format and GeneChip prokaryotic arrays in cartridge format.

As an Affymetrix GeneChip user, your feedback is welcome. Please contact our technical support team with any input on how we can improve this resource.

Explanation of GeneChip® Probe Arrays

GeneChip probe arrays are manufactured using technology that combines photolithography and combinatorial chemistry.[1,2] Up to 1.3 million different oligonucleotide probes are synthesized on each array. Each oligonucleotide is located in a specific area on the array called a probe cell. Each probe cell contains hundreds of thousands to millions of copies of a given oligonucleotide.

Probe arrays are manufactured in a series of cycles. Initially, a glass substrate is coated with linkers containing photolabile protecting groups. Then, a mask is applied that exposes selected portions of the probe array to ultraviolet light. Illumination removes the photolabile protecting groups enabling selective nucleoside phosphoramidite addition only at the previously exposed sites. Next, a different mask is applied and the cycle of illumination and chemical coupling is performed again. By repeating this cycle, a specific set of oligonucleotide probes is synthesized with each probe type in a known location. The completed probe arrays are packaged into cartridges.

During the laboratory procedure described in this manual, biotin-labeled RNA or DNA fragments referred to as the "target" are hybridized to the probe array. The hybridized probe array is stained with streptavidin phycoerythrin conjugate and scanned by the GeneArray® Scanner or the GeneChip® Scanner 3000. The amount of

[1] *Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, v.1 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY p 21-52 (1989).*

[2] *See www.affymetrix.com for current GeneChip technology references.*

light emitted at 570 nm is proportional to the bound target at each location on the probe array.

GeneChip® Expression Analysis Overview

The following major steps outline GeneChip expression analysis:

1. Target Preparation
2. Target Hybridization
3. Fluidics Station Setup
4. Probe Array Washing and Staining
5. Probe Array Scan
6. Data Analysis

Due to the differences in the RNA species between eukaryotic and prokaryotic organisms, different target labeling protocols have been optimized. Chapters 2 through 6 provide detailed protocols for target preparation, hybridization, array washing, and staining for eukaryotic and prokaryotic arrays, respectively. Please refer to the sections in this manual for detailed protocols appropriate for your arrays.

STEP 1: TARGET PREPARATION

This manual describes procedures using GeneChip® reagent kits for preparing biotinylated target from purified eukaryotic and prokaryotic RNA samples suitable for hybridization to GeneChip expression probe arrays. For more information on these procedures, please contact Affymetrix Technical Support at 1-888-DNA-CHIP, +44 (0)1628 552550 in Europe, or +81-(0)3-5730-8200 in Japan.

For eukaryotic samples, using protocols referenced in Chapter 2, double-stranded cDNA is synthesized from total RNA or purified poly-A messenger RNA isolated from tissue or cells. An *in vitro* transcription (IVT) reaction is then done to produce biotin-labeled cRNA from the cDNA. The cRNA is fragmented before hybridization.

For prokaryotic samples, Chapter 4 describes a detailed protocol to isolate total RNA followed by reverse transcription with random hexamers to produce cDNA. After fragmentation by DNase I, the cDNA is end-labeled with biotin by terminal transferase.

STEP 2: TARGET HYBRIDIZATION

A hybridization cocktail is prepared, including the fragmented target, and probe array controls. It is then hybridized to the probe array during a 16-hour incubation. The hybridization process is described in the respective sections for the different probe array types. Refer to Chapter 3 for hybridization of eukaryotic samples, and Chapter 5 for prokaryotic samples.

STEP 3: FLUIDICS STATION SETUP

Specific experimental information is defined using Affymetrix® Microarray Suite or GeneChip Operating Software (GCOS) on a PC-compatible workstation. The probe array type, sample description, and comments are entered and saved with a unique experiment name. The fluidics station is then prepared for use by priming with the appropriate buffers. Refer to the *GeneChip® Expression Wash, Stain and Scan User Manual*, P/N 702731 for information on fluidics station setup for eukaryotic samples, and Chapter 6 for prokaryotic samples. For more information on the fluidics station, refer to the *GeneChip® Fluidics Station User's Guide*.

STEP 4: PROBE ARRAY WASHING AND STAINING

Immediately following hybridization, the probe array undergoes an automated washing and staining protocol on the fluidics station. The *GeneChip® Expression Wash, Stain and Scan User Manual*, P/N 702731 provides information for eukaryotic samples, and Chapter 6 provides information for prokaryotic samples.

STEP 5: PROBE ARRAY SCAN

Once the probe array has been hybridized, washed, and stained, it is scanned. Each workstation running Affymetrix Microarray Suite or GCOS can control one scanner. The software defines the probe cells and computes an intensity for each cell.

Each complete probe array image is stored in a separate data file identified by the experiment name and is saved with a data image file (.dat) extension.

Review the scanner user's manual for safety precautions and for more information on using the scanner.

STEP 6: DATA ANALYSIS

The .dat image is analyzed for probe intensities; results are reported in tabular and graphical formats. Information on data analysis is provided in the enclosed *GeneChip® Expression Analysis: Data Analysis Fundamentals* booklet (P/N 701190).

Precautions

1. FOR RESEARCH USE ONLY; NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
2. Avoid microbial contamination, which may cause erroneous results.

WARNING ▲

All biological specimens and materials with which they come into contact should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions in accordance with federal, state, and local regulations. This includes adherence to the OSHA Bloodborne Pathogens Standard (29 CFR 1910.1030) for blood-derived and other samples governed by this act. Never pipet by mouth. Avoid specimen contact with skin and mucous membranes.

3. Exercise standard precautions when obtaining, handling, and disposing of potentially carcinogenic reagents.
4. Exercise care to avoid cross contamination of samples during all steps of this procedure, as this may lead to erroneous results.
5. Use powder-free gloves whenever possible to minimize introduction of powder particles into sample or probe array cartridges.

Terminology

Probes	The oligonucleotides on the surface of the probe arrays are called probes because they probe, or interrogate, the sample.
Target	The target is the labeled nucleic acid that is being interrogated. It is hybridized to the probes on the array.
Probe Cell	Specific areas on the probe array that contain oligonucleotides of a specific sequence.

Interfering Conditions

CAUTION

Wear powder-free gloves throughout procedure. Take steps to minimize the introduction of exogenous nucleases. Water used in the protocols below is molecular biology grade (nuclease free).

Proper storage and handling of reagents and samples is essential for robust performance.

All laboratory equipment used to prepare the target during this procedure should be calibrated and carefully maintained to ensure accuracy, as incorrect measurement of reagents may affect the outcome of the procedure.

Instruments

The *GeneChip Expression Analysis Technical Manual* is designed for use in a system consisting of a Fluidics Station, a Hybridization Oven 640, and a Scanner.

References

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, v.1* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY p 21-52 (1989).
2. See www.affymetrix.com for current GeneChip technology references.

Limitations

- The results of the assay are dependent upon the quality of the input RNA, subsequent proper handling of nucleic acids and other reagents.
- The results should be evaluated by a qualified individual.

IMPORTANT !

Do not store enzymes in a frost-free freezer.

Chapter 2

Eukaryotic Target Preparation

Chapter 2

Chapter Contents

Introduction 14
Reagents and Materials Required 17
Total RNA and mRNA Isolation for One-Cycle Target Labeling Assay. 20
Isolation of RNA from Yeast 20
Isolation of RNA from Arabidopsis 21
Isolation of RNA from Mammalian Cells or Tissues 21
Precipitation of RNA 22
Quantification of RNA 23
Total RNA Isolation for Two-Cycle Target Labeling Assay 24
One-Cycle cDNA Synthesis 25
Step 1: Preparation of Poly-A RNA Controls for One-Cycle cDNA Synthesis (Spike-in Controls). 25
Step 2: First-Strand cDNA Synthesis 28
Step 3: Second-Strand cDNA Synthesis 31
Two-Cycle cDNA Synthesis. 33
Step 1: Preparation of Poly-A RNA Controls for Two-Cycle cDNA Synthesis (Spike-in Controls) 33
Step 2: First-Cycle, First-Strand cDNA Synthesis. 36
Step 3: First-Cycle, Second-Strand cDNA Synthesis 38
Step 4: First-Cycle, IVT Amplification of cRNA 40
Step 5: First-Cycle, Cleanup of cRNA 42
Step 6: Second-Cycle, First-Strand cDNA Synthesis 44
Step 7: Second-Cycle, Second-Strand cDNA Synthesis 46
Cleanup of Double-Stranded cDNA for Both the One-Cycle and Two-Cycle Target Labeling Assays 48
Synthesis of Biotin-Labeled cRNA for Both the One-Cycle and Two-Cycle Target Labeling Assays 50

Cleanup and Quantification of Biotin-Labeled cRNA 52
Step 1: Cleanup of Biotin-Labeled cRNA 52
Step 2: Quantification of the cRNA 54
Step 3: Checking Unfragmented Samples by Gel Electrophoresis 55
Fragmenting the cRNA for Target Preparation 57

This Chapter Contains:

- Complete One-Cycle Target Labeling Assay with 1 to 15 µg of total RNA or 0.2 to 2 µg of poly-A mRNA
- Complete Two-Cycle Target Labeling Assay with 10 to 100 ng of total RNA

Introduction

This chapter describes the assay procedures recommended for eukaryotic target labeling in expression analysis using GeneChip® brand probe arrays. Following the protocols and using high-quality starting materials, a sufficient amount of biotin-labeled cRNA target can be obtained for hybridization to at least two arrays in parallel. The reagents and protocols have been developed and optimized specifically for use with the GeneChip system.

Depending on the amount of starting material, two procedures are described in detail in this manual. Use the following table to select the most appropriate labeling protocol for your samples:

Table 2.1

Total RNA as Starting Material	mRNA as Starting Material	Protocol
1 µg – 15 µg	0.2 µg – 2 µg	One-Cycle Target Labeling
10 ng – 100 ng	N/A	Two-Cycle Target Labeling

The One-Cycle Eukaryotic Target Labeling Assay experimental outline is represented in Figure 2.1. Total RNA (1 µg to 15 µg) or mRNA (0.2 µg to 2 µg) is first reverse transcribed using a T7-Oligo(dT) Promoter Primer in the first-strand cDNA synthesis reaction. Following RNase H-mediated second-strand cDNA synthesis, the double-stranded cDNA is purified and serves as a

template in the subsequent *in vitro* transcription (IVT) reaction. The IVT reaction is carried out in the presence of T7 RNA Polymerase and a biotinylated nucleotide analog/ribonucleotide mix for complementary RNA (cRNA) amplification and biotin labeling. The biotinylated cRNA targets are then cleaned up, fragmented, and hybridized to GeneChip expression arrays.

For smaller amounts of starting total RNA, in the range of 10 ng to 100 ng, an additional cycle of cDNA synthesis and IVT amplification is required to obtain sufficient amounts of labeled cRNA target for analysis with arrays. The Two-Cycle Eukaryotic Target Labeling Assay experimental outline is also represented in Figure 2.1. After cDNA synthesis in the first cycle, an unlabeled ribonucleotide mix is used in the first cycle of IVT amplification. The unlabeled cRNA is then reverse transcribed in the first-strand cDNA synthesis step of the second cycle using random primers. Subsequently, the T7-Oligo(dT) Promoter Primer is used in the second-strand cDNA synthesis to generate double-stranded cDNA template containing T7 promoter sequences. The resulting double-stranded cDNA is then amplified and labeled using a biotinylated nucleotide analog/ribonucleotide mix in the second IVT reaction. The labeled cRNA is then cleaned up, fragmented, and hybridized to GeneChip expression arrays.

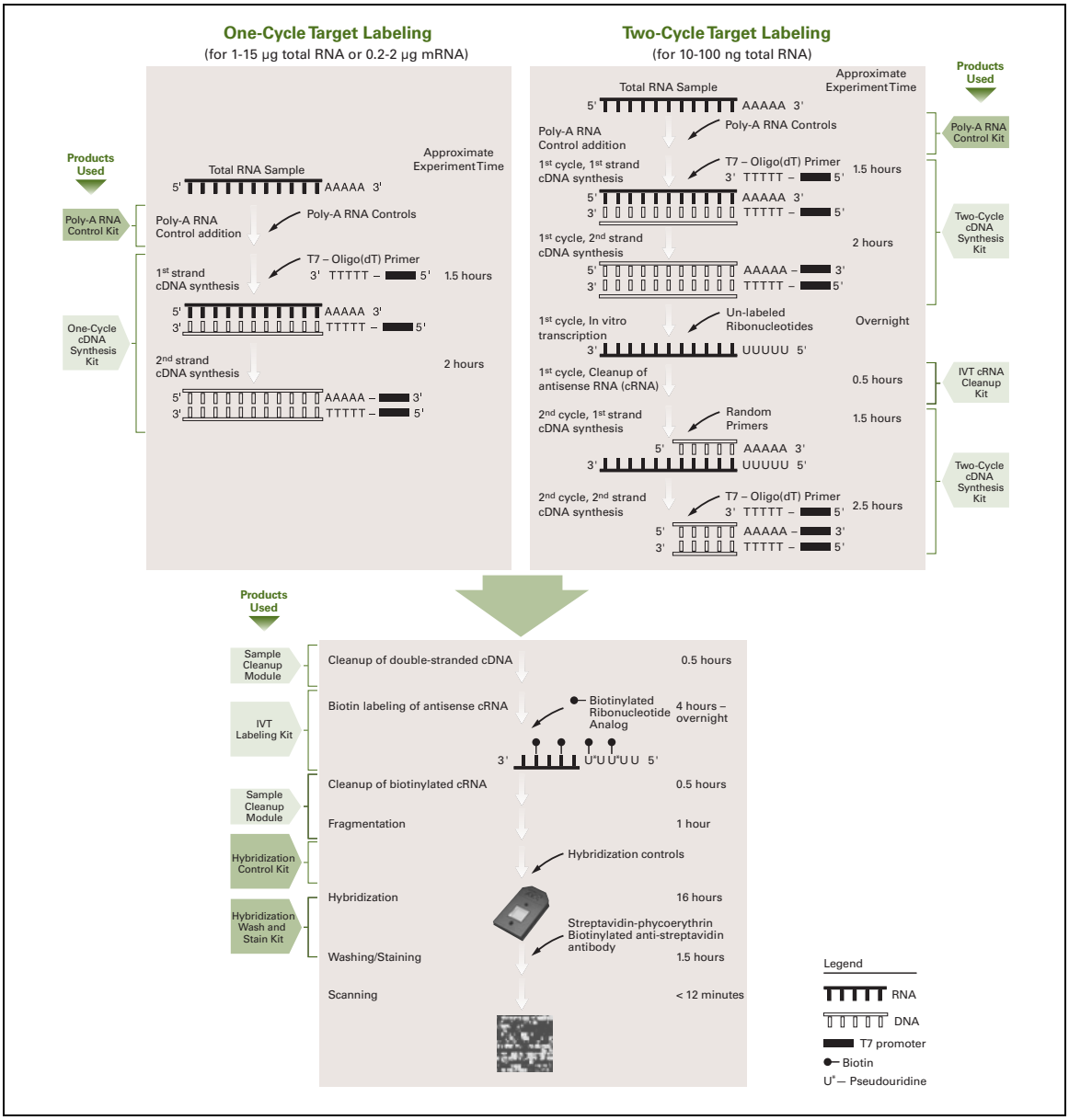


Figure 2.1
GeneChip® Eukaryotic Labeling Assays for Expression Analysis

Reagents and Materials Required

The following reagents and materials are recommendations and have been tested and evaluated by Affymetrix scientists. Information and part numbers listed are based on U.S. catalog information. For supplier information, please refer to the Supplier Reference List in Appendix G of this manual.

IMPORTANT ! **Do not store enzymes in a frost-free freezer.**

Total RNA Isolation

- TRIzol Reagent: Invitrogen Life Technologies, P/N 15596-018, or QIAzol™ Lysis Reagent: QIAGEN, P/N 79306
- RNeasy Mini Kit: QIAGEN, P/N 74104

Poly-A mRNA Isolation

- Oligotex Direct mRNA Kit (isolation of mRNA from whole cells): QIAGEN, P/N 72012, 72022, or 72041
- Oligotex mRNA Kit (isolation of mRNA from total RNA): QIAGEN, P/N 70022, 70042, or 70061
- QIAshredder: QIAGEN, P/N 79654 (Required only for use with QIAGEN Oligotex Direct Kit)
- DEPC-Treated Water: Ambion, P/N 9920

One-Cycle Target Labeling

- GeneChip® One-Cycle Target Labeling and Control Reagents: Affymetrix, P/N 900493. A convenient package containing all required labeling and control reagents to perform 30 one-cycle labeling reactions. Each of these components may be ordered individually (described below) as well as in this complete kit. Contains:
  - 1 GeneChip® IVT Labeling Kit (Affymetrix, P/N 900449)
  - 1 GeneChip® One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix, P/N 900431)
  - 1 GeneChip® Sample Cleanup Module (Affymetrix, P/N 900371)
  - 1 GeneChip® Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix, P/N 900433)
  - 1 GeneChip® Hybridization Control Kit (Affymetrix, P/N 900454)

Two-Cycle Target Labeling

- GeneChip® Two-Cycle Target Labeling and Control Reagents: Affymetrix, P/N 900494. A convenient package containing required labeling and control reagents to perform 30 two-cycle labeling reactions. Each of these components may be ordered individually (described below) as well as in this complete kit. Contains:
  - 1 GeneChip® IVT Labeling Kit (Affymetrix, P/N 900449)
  - 1 GeneChip® Two-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix, P/N 900432)
  - 1 GeneChip® Sample Cleanup Module (Affymetrix, P/N 900371)
  - 1 GeneChip® IVT cRNA Cleanup Kit (Affymetrix, 900547)
  - 1 GeneChip® Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix, P/N 900433)
  - 1 GeneChip® Hybridization Control Kit (Affymetrix, P/N 900454)
- MEGAscript® High Yield Transcription Kit: Ambion Inc, P/N 1334 Purchased separately from Ambion, Inc. (2 kits required to complete 30 reactions)

Miscellaneous Reagents

- 10X TBE: Cambrex, P/N 50843
- Absolute ethanol (stored at –20°C for RNA precipitation; store ethanol at room temperature for use with the GeneChip Sample Cleanup Module and IVT cRNA Kit)
- 80% ethanol (stored at –20°C for RNA precipitation; store ethanol at room temperature for use with the GeneChip Sample Cleanup Module)
- SYBR Green II: Cambrex, P/N 50523; or Molecular Probes, P/N S7586 (optional)
- Pellet Paint: Novagen, P/N 69049-3 (optional)
- Glycogen: Ambion, P/N 9510 (optional)
- 3M Sodium Acetate (NaOAc): Sigma-Aldrich, P/N S7899
- Ethidium Bromide: Sigma-Aldrich, P/N E8751
- 1N NaOH
- 1N HCl

Miscellaneous Supplies

- Sterile, RNase-free, microcentrifuge vials, 1.5 mL: USA Scientific, P/N 1415-2600 (or equivalent)
- Micropipettors, (P-2, P-20, P-200, P-1000): Rainin Pipetman or equivalent
- Sterile-barrier, RNase-free pipette tips (Tips must be pointed, not rounded, for efficient use with the probe arrays) Beveled pipette tips may cause damage to the array septa and cause leakage.
- Mini agarose gel electrophoresis unit with appropriate buffers
- UV spectrophotometer
- Bioanalyzer
- Non-stick RNase-free microfuge tubes, 0.5 mL and 1.5 mL: Ambion, P/N12350 and P/N 12450, respectively

Total RNA and mRNA Isolation for One-Cycle Target Labeling Assay

Protocols are provided for preparing labeled cRNA from either total RNA or purified poly-A mRNA. It was found that results obtained from samples prepared by both of these methods are similar, but not identical. Therefore, to get the best results, it is suggested to only compare samples prepared using the same type of RNA material.

Please review precautions and interfering conditions in Chapter 1.

IMPORTANT !

The quality of the RNA is essential to the overall success of the analysis. Since the most appropriate protocol for the isolation of RNA can be source dependent, we recommend using a protocol that has been established for the tissues or cells being used. In the absence of an established protocol, using one of the commercially available kits designed for RNA isolation is suggested.

When using a commercial kit, follow the manufacturer's instructions for RNA isolation.

ISOLATION OF RNA FROM YEAST

Total RNA

Good-quality total RNA has been isolated successfully from yeast cells using a hot phenol protocol described by Schmitt, *et al. Nucl Acids Res* 18:3091-3092 (1990).

Poly-A mRNA

Affymetrix recommends first purifying total RNA from yeast cells before isolating poly-A mRNA from total RNA. Good-quality mRNA has been successfully isolated from total RNA using QIAGEN's Oligotex mRNA Kit. A single round of poly-A mRNA selection provides mRNA of sufficient purity and yield to use as a template for cDNA synthesis. Two rounds of poly-A mRNA selection will result in significantly reduced yield and are not generally recommended.

ISOLATION OF RNA FROM ARABIDOPSIS

Total RNA

TRIzol Reagent from Invitrogen Life Technologies has been used to isolate total RNA from Arabidopsis. Follow the instructions provided by the supplier and, when necessary, use the steps outlined specifically for samples with high starch and/or high lipid content. QIAzol Lysis Reagent from QIAGEN can also be used.

Poly-A mRNA

Arabidopsis poly-A mRNA has been successfully isolated using QIAGEN's Oligotex products. However, other standard isolation products are likely to be adequate.

ISOLATION OF RNA FROM MAMMALIAN CELLS OR TISSUES

Total RNA

High-quality total RNA has been successfully isolated from mammalian cells (such as cultured cells and lymphocytes) using the RNeasy Mini Kit from QIAGEN.

If mammalian tissue is used as the source of RNA, it is recommended to isolate total RNA with a commercial reagent, such as TRIzol or QIAzol reagents.

IMPORTANT !

If going directly from TRIzol-isolated total RNA to cDNA synthesis, it may be beneficial to perform a second cleanup on the total RNA before starting. After the ethanol precipitation step in the TRIzol extraction procedure, perform a cleanup using the QIAGEN RNeasy Mini Kit. Much better yields of labeled cRNA are obtained from the *in vitro* transcription-labeling reaction when this second cleanup is performed.

Poly-A mRNA

Good-quality mRNA has been successfully isolated from mammalian cells (such as cultured cells and lymphocytes) using QIAGEN's Oligotex Direct mRNA kit and from total RNA using the Oligotex mRNA kit. If mammalian tissue is used as the source of mRNA, total

RNA should be first purified using a commercial reagent, such as TRIzol, and then using a poly-A mRNA isolation procedure or a commercial kit. QIAzol™ Lysis Reagent from QIAGEN can also be used.

PRECIPITATION OF RNA

Total RNA

It is not necessary to precipitate total RNA following isolation or cleanup with the RNeasy Mini Kit. Adjust elution volumes from the RNeasy column to prepare for cDNA synthesis based upon expected RNA yields from your experiment. Ethanol precipitation is required following TRIzol or QIAzol reagent isolation and hot phenol extraction methods; see methods on page 23 for details.

Poly-A mRNA

Most poly-A mRNA isolation procedures will result in dilution of RNA. It is necessary to concentrate mRNA prior to the cDNA synthesis.

Precipitation Procedure

1. Add 1/10 volume 3M NaOAc, pH 5.2, and 2.5 volumes ethanol.*
2. Mix and incubate at –20°C for at least 1 hour.
3. Centrifuge at ≥ 12,000 x g in a microcentrifuge for 20 minutes at 4°C.
4. Wash pellet twice with 80% ethanol.
5. Air dry pellet. Check for dryness before proceeding.
6. Resuspend pellet in DEPC-treated H_2O. The appropriate volume for resuspension depends on the expected yield and the amount of RNA required for the cDNA synthesis. Please read ahead to the cDNA synthesis protocol in order to determine the appropriate resuspension volume at this step.

*Addition of Carrier to Ethanol Precipitations

Adding carrier material has been shown to improve the RNA yield of precipitation reactions.

- **Pellet Paint**
  Addition of 0.5 µL of Pellet Paint per tube to nucleic acid precipitations makes the nucleic acid pellet easier to visualize and helps reduce the chance of losing the pellet during washing steps. The pellet paint does not appear to affect the outcome of subsequent steps in this protocol; however, it can contribute to the absorbance at 260 nm when quantifying the mRNA.
- **Glycogen**
  Addition of 0.5 to 1 µL of glycogen (5 mg/mL) to nucleic acid precipitations aids in visualization of the pellet and may increase recovery. The glycogen does not appear to affect the outcome of subsequent steps in this protocol.

QUANTIFICATION OF RNA

Quantify RNA yield by spectrophotometric analysis using the convention that 1 absorbance unit at 260 nm equals 40 µg/mL RNA.

- The absorbance should be checked at 260 and 280 nm for determination of sample concentration and purity.
- The A_{260}/A_{280} ratio should be close to 2.0 for pure RNA (ratios between 1.9 and 2.1 are acceptable).
- Integrity of total RNA samples can also be assessed qualitatively on an Agilent 2100 Bioanalyzer. Refer to Figure 2.2 for an example of good-quality total RNA sample.

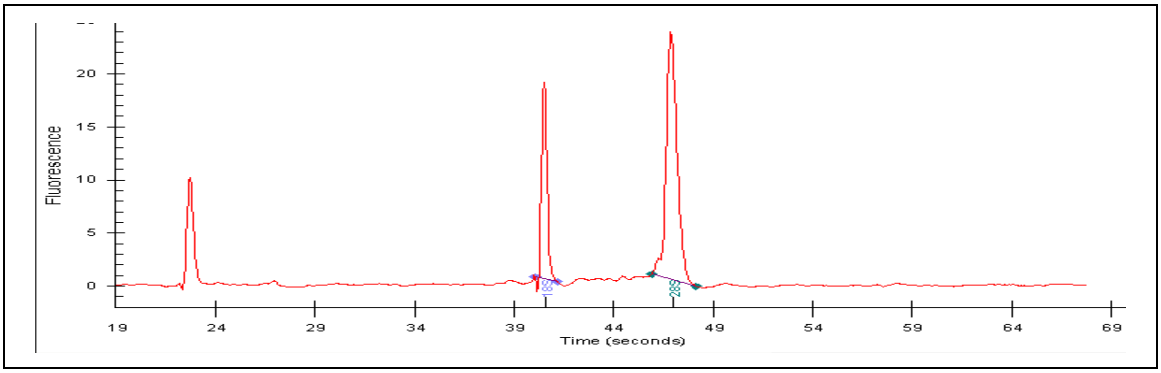


Figure 2.2
Electropherogram (from the Agilent 2100 Bioanalyzer) for HeLa Total RNA. For a high-quality total RNA sample, two well-defined peaks corresponding to the 18S and 28S ribosomal RNAs should be observed, similar to a denaturing agarose gel, with ratios approaching 2:1 for the 28S to 18S bands.

Total RNA Isolation for Two-Cycle Target Labeling Assay

Several commercial kits and protocols are currently available for total RNA isolation from small samples (tissues, biopsies, LCM samples, etc.). Select the one that is suitable for processing of your samples and follow the vendor-recommended procedures closely since high-quality and high-integrity starting material is essential for the success of the assay.

One-Cycle cDNA Synthesis[1]

STEP 1: PREPARATION OF POLY-A RNA CONTROLS FOR ONE-CYCLE cDNA SYNTHESIS (SPIKE-IN CONTROLS)

Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit is used for this step.

Designed specifically to provide exogenous positive controls to monitor the entire eukaryotic target labeling process, a set of poly-A RNA controls is supplied in the GeneChip Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit.

Each eukaryotic GeneChip probe array contains probe sets for several *B. subtilis* genes that are absent in eukaryotic samples (*lys, phe, thr,* and *dap*). These poly-A RNA controls are *in vitro* synthesized, and the polyadenylated transcripts for the *B. subtilis* genes are pre-mixed at staggered dilutions. The concentrated **Poly-A Control Stock** can be diluted with the **Poly-A Control Dil Buffer** and spiked directly into RNA samples to achieve the final dilutions (referred to as a ratio of copy number) summarized in Table 2.2.

Table 2.2
Final Dilutions of Poly-A RNA Controls in Samples

Poly-A RNA Spike	Final Dilution (estimated ratio of copy number)
lys	1:100,000
phe	1:50,000
thr	1:25,000
dap	1:6,667

The controls are then amplified and labeled together with the samples. Examining the hybridization intensities of these controls on GeneChip arrays helps to monitor the labeling process independently from the quality of the starting RNA samples. Anticipated relative signal strength follows the order of *lys* < *phe* < *thr*< *dap*.

The **Poly-A RNA Control Stock** and **Poly-A Control Dil Buffer** are provided with the kit to prepare the appropriate serial dilutions based

[1] *Users who do not purchase this Kit may be required to obtain a license under U.S. Patent Nos. 5,716,785, 5,891,636, 6,291,170, and 5,545,522 or to purchase another licensed kit.*

on Table 2.3. This is a guideline when 1, 5, or 10 µg of total RNA or 0.2 µg of mRNA is used as starting material. For starting sample amounts other than those listed here, calculations are needed in order to perform the appropriate dilutions to arrive at the same proportionate final dilution of the spike-in controls in the samples.

IMPORTANT !

Use non-stick RNase-free microfuge tubes to prepare all of the dilutions.

Table 2.3
Serial Dilutions of Poly-A RNA Control Stock

Starting Amount		Serial Dilutions			Spike-in Volume
Total RNA	mRNA	First	Second	Third	
1 µg		1:20	1:50	1:50	2 µL
5 µg		1:20	1:50	1:10	2 µL
10 µg	0.2 µg	1:20	1:50	1:5	2 µL

TIP

Avoid pipetting solutions less than 2 µL in volume to maintain precision and consistency when preparing the dilutions.

For example, to prepare the poly-A RNA dilutions for 5 µg of total RNA:

1. Add 2 µL of the **Poly-A Control Stock** to 38 µL of **Poly-A Control Dil Buffer** for the First Dilution (1:20).
2. Mix thoroughly and spin down to collect the liquid at the bottom of the tube.
3. Add 2 µL of the First Dilution to 98 µL of **Poly-A Control Dil Buffer** to prepare the Second Dilution (1:50).
4. Mix thoroughly and spin down to collect the liquid at the bottom of the tube.
5. Add 2 µL of the Second Dilution to 18 µL of **Poly-A Control Dil Buffer** to prepare the Third Dilution (1:10).
6. Mix thoroughly and spin down to collect the liquid at the bottom of the tube.
7. Add 2 µL of this Third Dilution to 5 µg of sample total RNA.

NOTE

The First Dilution of the poly-A RNA controls can be stored up to six weeks in a non-frost-free freezer at –20°C and frozen-thawed up to eight times.

STEP 2: FIRST-STRAND cDNA SYNTHESIS

One-Cycle cDNA Synthesis Kit is used for this step.

NOTE

1. Briefly spin down all tubes in the Kit before using the reagents.

2. Perform all of the incubations in thermal cyclers. The following program can be used as a reference to perform the first-strand cDNA synthesis reaction in a thermal cycler; the 4°C holds are for reagent addition steps:

70°C	**10 minutes**
4°C	**hold**
42°C	**2 minutes**
42°C	**1 hour**
4°C	**hold**

1. Mix RNA sample, diluted poly-A RNA controls, and T7-Oligo(dT) Primer.

Table 2.4
RNA/T7-Oligo(dT) Primer Mix Preparation for 1 to 8 µg of total RNA, or 0.2 to 1 µg of mRNA

Component	Volume
Sample RNA	variable
Diluted poly-A RNA controls	2 µL
T7-Oligo(dT) Primer, 50 µM	2 µL
RNase-free Water	variable
Total Volume	12 µL

Table 2.5
RNA/T7-Oligo(dT) Primer Mix Preparation for 8.1 to 15 µg of total RNA, or > 1 µg of mRNA

Component	Volume
Sample RNA	variable
Diluted poly-A RNA controls	2 µL
T7-Oligo(dT) Primer, 50 µM	2 µL
RNase-free Water	variable
Total Volume	11 µL

A. Place total RNA (1 µg to 15 µg) or mRNA sample (0.2 µg to 2 µg) in a 0.2 mL PCR tube.

B. Add 2 µL of the appropriately diluted poly-A RNA controls (See *Step 1: Preparation of Poly-A RNA Controls for One-Cycle cDNA Synthesis (Spike-in Controls)* on page 25).

C. Add 2 µL of 50 µM **T7-Oligo(dT) Primer**.

D. Add **RNase-free Water** to a final volume of 11 or 12 µL (see Table 2.4 and Table 2.5).

E. Gently flick the tube a few times to mix, and then centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube.

F. Incubate the reaction for 10 minutes at 70°C.

G. Cool the sample at 4°C for at least 2 minutes.

H. Centrifuge the tube briefly (~5 seconds) to collect the sample at the bottom of the tube.

2. In a separate tube, assemble the First-Strand Master Mix.

A. Prepare sufficient **First-Strand Master Mix** for all of the RNA samples. When there are more than 2 samples, it is prudent to include additional material to compensate for potential pipetting inaccuracy or solution lost during the process. The following recipe, in Table 2.6, is for a single reaction.

Table 2.6
Preparation of First-Strand Master Mix

Component	Volume
5X 1st Strand Reaction Mix	4 µL
DTT, 0.1M	2 µL
dNTP, 10 mM	1 µL
Total Volume	7 µL

B. Mix well by flicking the tube a few times. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the master mix at the bottom of the tube.

3. Transfer 7 µL of **First-Strand Master Mix** to each RNA/T7-Oligo(dT) Primer mix for a final volume of 18 or 19 µL. Mix thoroughly by flicking the tube a few times. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube, and immediately place the tubes at 42°C.
4. Incubate for 2 minutes at 42°C.
5. Add the appropriate amount of **SuperScript II** to each RNA sample for a final volume of 20 µL.
   - For 1 to 8 µg of total RNA: 1 µL **SuperScript II**
   - For 8.1 to 15 µg of total RNA: 2 µL **SuperScript II**
   - For every µg of mRNA add 1 µL **SuperScript II**.
   - For mRNA quantity less than 1 µg, use 1 µL **SuperScript II**.

   Mix thoroughly by flicking the tube a few times. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube, and immediately place the tubes at 42°C.
6. Incubate for 1 hour at 42°C; then cool the sample for at least 2 minutes at 4°C.

IMPORTANT !

Cooling the samples at 4°C is required before proceeding to the next step. Adding the Second-Strand Master Mix directly to solutions that are at 42°C will compromise enzyme activity.

After incubation at 4°C, centrifuge the tube briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube and immediately proceed to *Step 3: Second-Strand cDNA Synthesis*.

STEP 3: SECOND-STRAND cDNA SYNTHESIS

One-Cycle cDNA Synthesis Kit is used for this step.

NOTE **The following program can be used as a reference to perform the second-strand cDNA synthesis reaction in a thermal cycler.**

16°C	**2 hours**
4°C	**hold**
16°C	**5 minutes**
4°C	**hold**

1. In a separate tube, assemble Second-Strand Master Mix.

NOTE **It is recommended to prepare Second-Strand Master Mix immediately before use.**

   A. Prepare sufficient Second-Strand Master Mix for all of the samples. When there are more than 2 samples, it is prudent to include additional material to compensate for potential pipetting inaccuracy or solution lost during the process. The following recipe, in Table 2.7, is for a single reaction.

Table 2.7
Preparation of Second-Strand Master Mix

Component	Volume
RNase-free Water	91 µL
5X 2nd Strand Reaction Mix	30 µL
dNTP, 10 mM	3 µL
E. coli DNA ligase	1 µL
E. coli DNA Polymerase I	4 µL
RNase H	1 µL
Total Volume	130 µL

   B. Mix well by gently flicking the tube a few times. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the solution at the bottom of the tube.

2. Add 130 µL of Second-Strand Master Mix to each first-strand synthesis sample from *Step 2: First-Strand cDNA Synthesis* for a total volume of 150 µL.

   Gently flick the tube a few times to mix, and then centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube.

3. Incubate for 2 hours at 16°C.

4. Add 2 µL of **T4 DNA Polymerase** to each sample and incubate for 5 minutes at 16°C.

5. After incubation with T4 DNA Polymerase add 10 µL of EDTA, 0.5M and proceed to *Cleanup of Double-Stranded cDNA for Both the One-Cycle and Two-Cycle Target Labeling Assays* on page 48.

   Do not leave the reactions at 4°C for long periods of time.

Two-Cycle cDNA Synthesis[1]

STEP 1: PREPARATION OF POLY-A RNA CONTROLS FOR TWO-CYCLE cDNA SYNTHESIS (SPIKE-IN CONTROLS)

Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit is used for this step.

Designed specifically to provide exogenous positive controls to monitor the entire eukaryotic target labeling process, a set of poly-A RNA controls are supplied in the GeneChip Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit.

Each eukaryotic GeneChip probe array contains probe sets for several *B. subtilis* genes that are absent in eukaryotic samples (*lys, phe, thr,* and *dap*). These poly-A RNA controls are *in vitro* synthesized, and the polyadenylated transcripts for these *B. subtilis* genes are pre-mixed at staggered dilutions. The concentrated **Poly-A Control Stock** can be diluted with the **Poly-A Control Dil Buffer** and spiked directly into the RNA samples to achieve the final dilutions (referred to as a ratio of copy number) summarized below:

Table 2.8
Final Dilutions of Poly-A RNA Controls in Samples

Poly-A RNA Spike	Final Dilution (estimated ratio of copy number)
lys	1:100,000
phe	1:50,000
thr	1:25,000
dap	1:6,667

The controls are then amplified and labeled together with the samples. Examining the hybridization intensities of these controls on GeneChip arrays helps to monitor the labeling process independently from the quality of the starting RNA samples. Anticipated relative signal strength follows the order of *lys* < *phe* < *thr*< *dap*.

The **Poly-A RNA Control Stock** and **Poly-A Control Dil Buffer** are provided with the kit to prepare the appropriate serial dilutions based on Table 2.9. This is a guideline when 10, 50, or 100 ng of total RNA

[1] *Users who do not purchase this Kit may be required to obtain a license under U.S. Patent Nos. 5,716,785, 5,891,636, 6,291,170, and 5,545,522 or to purchase another licensed kit.*

is used as starting material. For other intermediate starting sample amounts, calculations are needed in order to perform the appropriate dilutions to arrive at the same proportionate final concentration of the spike-in controls in the samples.

IMPORTANT !

- **The dilution scheme outlined below is different from the previous protocol developed for the Small Sample Target Labeling vII. Closely adhere to the recommendation below to obtain the desired final concentrations of the controls.**
- **Use non-stick RNase-free microfuge tubes to prepare the dilutions.**

Table 2.9
Serial Dilutions of Poly-A RNA Control Stock

Starting Amount of Total RNA	Serial Dilutions				Volume to Add into 50 µM T7-Oligo(dT) Primer
	First	Second	Third	Fourth	
10 ng	1:20	1:50	1:50	1:10	2 µL
50 ng	1:20	1:50	1:50	1:2	2 µL
100 ng	1:20	1:50	1:50		2 µL

TIP

Avoid pipetting solutions less than 2 µL in volume to maintain precision and consistency when preparing the dilutions.

For example, to prepare the poly-A RNA dilutions for 10 ng of total RNA:

1. Add 2 µL of the **Poly-A Control Stock** to 38 µL of **Poly-A Control Dil Buffer** to prepare the First Dilution (1:20).
2. Mix thoroughly and spin down to collect the liquid at the bottom of the tube.
3. Add 2 µL of the First Dilution to 98 µL of **Poly-A Control Dil Buffer** to prepare the Second Dilution (1:50).
4. Mix thoroughly and spin down to collect the liquid at the bottom of the tube.
5. Add 2 µL of the Second Dilution to 98 µL of **Poly-A Control Dil Buffer** to prepare the Third Dilution (1:50).
6. Mix thoroughly and spin down to collect the liquid at the bottom of the tube.
7. Add 2 µL of the Third Dilution to 18 µL of **Poly-A Control Dil Buffer** to prepare the Fourth Dilution (1:10).
8. Use the Fourth Dilution to prepare the solution described next.

NOTE **The first dilution of the poly-A RNA controls (1:20) can be stored in a non-frost-free freezer at –20°C up to six weeks and frozen-thawed up to eight times.**

Preparation of T7-Oligo(dT) Primer/Poly-A Controls Mix

Prepare a fresh dilution of the **T7-Oligo(dT) Primer** from 50 µM to 5 µM. The diluted poly-A RNA controls should be added to the concentrated **T7-Oligo(dT) Primer** as follows, using a non-stick RNase-free microfuge tube. The following recipe is sufficient for 10 samples.

Table 2.10
Preparation of T7-Oligo(dT) Primer/Poly-A Controls Mix

Component	Volume
T7-Oligo(dT) Primer, 50 µM	2 µL
Diluted Poly-A RNA controls (Table 2.9)	2 µL
RNase-free Water	16 µL
Total Volume	20 µL

STEP 2: FIRST-CYCLE, FIRST-STRAND cDNA SYNTHESIS

Two-Cycle cDNA Synthesis Kit is used for this step.

NOTE

1. Briefly spin down all tubes in the Kit before using the reagents.

2. Perform all of the incubations in thermal cyclers. The following program can be used as a reference to perform the First-Cycle, First-Strand cDNA synthesis reaction in a thermal cycler; the 4°C holds are for reagent addition steps:

70°C	**6 minutes**
4°C	**hold**
42°C	**1 hour**
70°C	**10 minutes**
4°C	**hold**

1. Mix total RNA sample and the T7-Oligo(dT) Primer/Poly-A Controls Mix.

Table 2.11
Preparation of Total RNA Sample/T7-Oligo(dT) Primer/Poly-A Controls Mix

Component	Volume
Total RNA sample	variable (10 – 100 ng)
T7-Oligo(dT) Primer/Poly-A Controls Mix	2 µL
RNase-free Water	variable
Total Volume	5 µL

A. Place total RNA sample (10 to 100 ng) in a 0.2 mL PCR tube.

B. Add 2 µL of the T7-Oligo(dT) Primer/Poly-A Controls Mix (See *Step 1: Preparation of Poly-A RNA Controls for Two-Cycle cDNA Synthesis (Spike-in Controls)* on page 33).

C. Add **RNase-free Water** to a final volume of 5 µL.

D. Gently flick the tube a few times to mix, then centrifuge the tubes briefly (~5 seconds) to collect the solution at the bottom of the tube.

E. Incubate for 6 minutes at 70°C.

F. Cool the sample at 4°C for at least 2 minutes. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the sample at the bottom of the tube.

2. In a separate tube, assemble the First-Cycle, First-Strand Master Mix.

   A. Prepare sufficient **First-Cycle, First-Strand Master Mix** for all of the total RNA samples. When there are more than 2 samples, it is prudent to include additional material to compensate for potential pipetting inaccuracy or solution lost during the process. The following recipe, in Table 2.12, is for a single reaction.

Table 2.12
Preparation of First-Cycle, First-Strand Master Mix

Component	Volume
5X 1st Strand Reaction Mix	2.0 µL
DTT, 0.1M	1.0 µL
RNase Inhibitor	0.5 µL
dNTP, 10 mM	0.5 µL
SuperScript II	1.0 µL
Total Volume	5.0 µL

   B. Mix well by gently flicking the tube a few times. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the solution at the bottom of the tube.

3. Transfer 5 µL of **First-Cycle, First-Strand Master Mix** to each total RNA sample/T7-Oligo(dT) Primer/Poly-A Controls Mix (as in Table 2.11) from the previous step for a final volume of 10 µL.

   Mix thoroughly by gently flicking the tube a few times. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube, and immediately place the tubes at 42°C.

4. Incubate for 1 hour at 42°C.

5. Heat the sample at 70°C for 10 minutes to inactivate the RT enzyme, then cool the sample for at least 2 minutes at 4°C.

   After the 2 minute incubation at 4°C, centrifuge the tube briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube and immediately proceed to *Step 3: First-Cycle, Second-Strand cDNA Synthesis* on page 38.

IMPORTANT !

Cooling the sample at 4°C is required before proceeding to the next step. Adding the First-Cycle, Second-Strand Master Mix directly to solutions that are at 70°C will compromise enzyme activity.

STEP 3: FIRST-CYCLE, SECOND-STRAND cDNA SYNTHESIS

Two-Cycle cDNA Synthesis Kit is used for this step.

NOTE

The following program can be used as a reference to perform the First-cycle, Second-strand cDNA synthesis reaction in a thermal cycler. For the 16°C incubation, turn the heated lid function off. If the heated lid function cannot be turned off, leave the lid open. Use the heated lid for the 75°C incubation.

16°C 2 hours
75°C 10 minutes
4°C hold

1. In a separate tube, assemble the First-Cycle, Second-Strand Master Mix.

TIP

It is recommended to prepare this First-Cycle, Second-Strand Master Mix immediately before use. Prepare this First-Cycle, Second-Strand Master Mix for at least 4 reactions at one time for easier and more accurate pipetting.

   A. Prepare sufficient **First-Cycle, Second-Strand Master Mix** for all samples. When there are more than 2 samples, it is prudent to include additional material to compensate for potential pipetting inaccuracy or solution lost during the process. The following recipe, in Table 2.13, is for a single reaction.

Table 2.13
Preparation of First-Cycle, Second-Strand Master Mix

Component	Volume
RNase-free Water	4.8 µL
Freshly diluted $MgCl_2$, 17.5 mM*	4.0 µL
dNTP, 10 mM	0.4 µL
E. coli DNA Polymerase I	0.6 µL
RNase H	0.2 µL
Total Volume	10.0 µL

** Make a fresh dilution of the $MgCl_2$ each time. Mix 2 µL of $MgCl_2$, 1M with 112 µL of RNase-free Water.*

B. Mix well by gently flicking the tube a few times. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the solution at the bottom of the tube.

2. Add 10 µL of the **First-Cycle, Second-Strand Master Mix** to each sample from *Step 2: First-Cycle, First-Strand cDNA Synthesis* reaction for a total volume of 20 µL.

Gently flick the tube a few times to mix, and then centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube.

3. Incubate for 2 hours at 16°C, then 10 minutes at 75°C and cool the sample at least 2 minutes at 4°C. Turn the heated lid function off only for the 16°C incubation.

After the 2 minute incubation at 4°C, centrifuge the tube briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube. Proceed to *Step 4: First-Cycle, IVT Amplification of cRNA* on page 40.

NOTE **No cDNA cleanup is required at this step.**

STEP 4: FIRST-CYCLE, IVT AMPLIFICATION OF cRNA

MEGAscript® T7 Kit (purchased separately from Ambion, Inc.) is used for this step.

NOTE

The following program can be used as a reference to perform the First-cycle, IVT Amplification of cRNA reaction in a thermal cycler.

37°C 16 hours

4°C hold

1. In a separate tube, assemble the First-Cycle, IVT Master Mix at room temperature.

   A. Prepare sufficient **First-Cycle, IVT Master Mix** for all of the samples. When there are more than 2 samples, it is prudent to include additional material to compensate for potential pipetting inaccuracy or solution lost during the process. The following recipe, in Table 2.14, is for a single reaction.

Table 2.14
Preparation of First-Cycle, IVT Master Mix

Component	Volume
10X Reaction Buffer	5 µL
ATP Solution	5 µL
CTP Solution	5 µL
UTP Solution	5 µL
GTP Solution	5 µL
Enzyme Mix	5 µL
Total Volume	30 µL

   B. Mix well by gently flicking the tube a few times. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the solution at the bottom of the tube.

2. Transfer 30 µL of **First-Cycle, IVT Master Mix** to each cDNA sample.

   At room temperature, add 30 µL of the **First-Cycle, IVT Master Mix** to each 20 µL of cDNA sample from *Step 3: First-Cycle, Second-*

Strand cDNA Synthesis on page 38 for a final volume of 50 µL.

Gently flick the tube a few times to mix, then centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube.

3. Incubate for 16 hours at 37°C.

   After the 16 hour incubation at 37°C, centrifuge the tube briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube. The sample is now ready to be purified in *Step 5: First-Cycle, Cleanup of cRNA* on page 42. Alternatively, samples may be stored at –20°C for later use.

STEP 5: FIRST-CYCLE, CLEANUP OF cRNA

IVT cRNA Cleanup Kit is used for this step.

Reagents to be Supplied by User

- Ethanol, 96-100% (v/v)
- Ethanol, 80% (v/v)

All other components needed for cleanup of cRNA are supplied with the GeneChip® IVT cRNA Cleanup Kit.

IMPORTANT !

BEFORE STARTING please note:

- **IVT cRNA Wash Buffer is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add 20 mL of ethanol (96-100%), as indicated on the bottle, to obtain a working solution, and checkmark the box on the left-hand side of the bottle label to avoid confusion.**
- **IVT cRNA Binding Buffer may form a precipitate upon storage. If necessary, redissolve by warming in a water bath at 30°C, and then place the buffer at room temperature.**
- **All steps of the protocol should be performed at room temperature. During the procedure, work without interruption.**

1. Add 50 µL of **RNase-free Water** to the IVT reaction and mix by vortexing for 3 seconds.
2. Add 350 µL **IVT cRNA Binding Buffer** to the sample and mix by vortexing for 3 seconds.
3. Add 250 µL ethanol (96-100%) to the lysate, and mix well by pipetting. Do not centrifuge.
4. Apply sample (700 µL) to the **IVT cRNA Cleanup Spin Column** sitting in a **2 mL Collection Tube**. Centrifuge for 15 seconds at ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm). Discard flow-through and Collection Tube.
5. Transfer the spin column into a new **2 mL Collection Tube** (supplied). Pipet 500 µL **IVT cRNA Wash Buffer** onto the spin column. Centrifuge for 15 seconds at ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm) to wash. Discard flow-through.

NOTE

IVT cRNA Wash Buffer is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to the IVT cRNA Wash Buffer before use (see IMPORTANT note above before starting).

6. Pipet 500 µL 80% (v/v) ethanol onto the spin column and centrifuge for 15 seconds at ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm). Discard flow-through.
7. Open the cap of the spin column and centrifuge for 5 minutes at maximum speed (≤ 25,000 x g). Discard flow-through and Collection Tube.

   Place columns into the centrifuge using every second bucket. Position caps over the adjoining bucket so that they are oriented in the opposite direction to the rotation (i.e., if the microcentrifuge rotates in a clockwise direction, orient the caps in a counterclockwise direction). This avoids damage of the caps.

TIP

Label the collection tubes with the sample name. During centrifugation some column caps may break, resulting in loss of sample information.

   Centrifugation with open caps allows complete drying of the membrane.

8. Transfer spin column into a new **1.5 mL Collection Tube** (supplied), and pipet 13 µL of **RNase-free Water** directly onto the spin column membrane. Ensure that the water is dispensed directly onto the membrane. Centrifuge 1 minute at maximum speed (≤ 25,000 x g) to elute. The average volume of eluate is 11 µL from 13 µL RNase-free Water.
9. To determine cRNA yield for samples starting with 50 ng or higher, remove 2 µL of the cRNA, and add 78 µL of water to measure the absorbance at 260 nm. Use 600 ng of cRNA in the following *Step 6: Second-Cycle, First-Strand cDNA Synthesis*.

   For starting material less than 50 ng, or if the yield is less than 600 ng, use the entire eluate for the Second-Cycle, First-Strand cDNA Synthesis Reaction.

   Samples can be stored at –20°C for later use, or proceed to *Step 6: Second-Cycle, First-Strand cDNA Synthesis* described next.

STEP 6: SECOND-CYCLE, FIRST-STRAND cDNA SYNTHESIS

Two-Cycle cDNA Synthesis Kit is used for this step.

NOTE

The following program can be used as a reference to perform the Second-Cycle, First-Strand cDNA synthesis reaction in a thermal cycler; the 4°C holds are for reagent addition steps:

70°C	**10 minutes**
4°C	**hold**
42°C	**1 hour**
4°C	**hold**
37°C	**20 minutes**
95°C	**5 minutes**
4°C	**hold**

1. Mix cRNA and diluted random primers.
   - **A.** Make a fresh dilution of the **Random Primers** (final concentration 0.2 µg/µL). Mix 2 µL of **Random Primers, 3 µg/µL**, with 28 µL **RNase-free Water**.
   - **B.** Add 2 µL of diluted random primers to purified cRNA from *Step 5: First-Cycle, Cleanup of cRNA*, substep 9 on page 43 and add **RNase-free Water** for a final volume of 11 µL.
   - **C.** Incubate for 10 minutes at 70°C.
   - **D.** Cool the sample at 4°C for at least 2 minutes. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the sample at the bottom of the tube.
2. In a separate tube, assemble the Second-Cycle, First-Strand Master Mix.
   - **A.** Prepare sufficient **Second-Cycle, First-Strand Master Mix** for all of the samples. When there are more than two samples, it is prudent to include additional material to compensate for potential pipetting inaccuracy or solution lost during the process. The following recipe, in Table 2.15, is for a single reaction.

Table 2.15
Preparation of Second-Cycle, First-Strand Master Mix

Component	Volume
5X 1st Strand Reaction Mix	4 µL
DTT, 0.1M	2 µL
RNase Inhibitor	1 µL
dNTP, 10 mM	1 µL
SuperScript II	1 µL
Total Volume	9 µL

B. Mix well by gently flicking the tube a few times. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the solution at the bottom of the tube.

3. Transfer 9 µL of **Second-Cycle, First-Strand Master Mix** to each cRNA/random primer sample from *Step 6: Second-Cycle, First-Strand cDNA Synthesis*, substep 1 on page 44, for a final volume of 20 µL.

Mix thoroughly by gently flicking the tube a few times. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube and place the tubes at 42°C immediately.

4. Incubate for 1 hour at 42°C, then cool the sample for at least 2 minutes at 4°C.

After the incubation at 4°C, centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube.

5. Add 1 µL of **RNase H** to each sample for a final volume of 21 µL.

Mix thoroughly by gently flicking the tube a few times. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube and incubate for 20 minutes at 37°C.

6. Heat the sample at 95°C for 5 minutes. Cool the sample for at least 2 minutes at 4°C; then, proceed directly to *Step 7: Second-Cycle, Second-Strand cDNA Synthesis* on page 46.

STEP 7: SECOND-CYCLE, SECOND-STRAND cDNA SYNTHESIS

Two-Cycle cDNA Synthesis Kit is used for this step.

NOTE **The following program can be used as a reference to perform the Second-Cycle, Second-Strand cDNA Synthesis reaction in a thermal cycler. For the 16°C incubations turn the heated lid function off. If the heated lid function cannot be turned off, leave the lid open. The 4°C holds are for reagent addition steps:**

70°C	**6 minutes**
4°C	**hold**
16°C	**2 hours**
4°C	**hold**
16°C	**10 minutes**
4°C	**hold**

1. Add 4 µL of diluted T7-Oligo(dT) Primer to each sample.
   - **A.** Make a fresh dilution of the T7-Oligo(dT) Primer (final concentration 5 µM). Mix 2 µL of **T7-Oligo(dT) Primer, 50 µM**, with 18 µL of **RNase-free Water**.
   - **B.** Add 4 µL of diluted T7-Oligo(dT) Primer to the sample from *Step 6: Second-Cycle, First-Strand cDNA Synthesis*, substep 6 on page 45 for a final volume of 25 µL.
   - **C.** Gently flick the tube a few times to mix, and then centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube.
   - **D.** Incubate for 6 minutes at 70°C.
   - **E.** Cool the sample at 4°C for at least 2 minutes. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect sample at the bottom of the tube.

IMPORTANT **Cooling the samples at 4°C is required before proceeding to the next step. Adding the Second-Strand Master Mix directly to solutions that are at 70°C will compromise enzyme activity.**

TIP **It is recommended to prepare the Second-Cycle, Second-Strand Master Mix immediately before use.**

2. In a separate tube, assemble the Second-Cycle, Second-Strand Master Mix.

A. Prepare sufficient **Second-Cycle, Second-Strand Master Mix** for all of the samples. When there are more than two samples, it is prudent to include additional material to compensate for potential pipetting inaccuracy or solution lost during the process. The following recipe, in Table 2.16, is for a single reaction.

Table 2.16
Preparation of Second-Cycle, Second-Strand Master Mix

Component	Volume
RNase-free Water	88 µL
5X 2nd Strand Reaction Mix	30 µL
dNTP, 10 mM	3 µL
E. coli DNA Polymerase I	4 µL
Total Volume	125 µL

B. Mix well by gently flicking the tube a few times. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the master mix at the bottom of the tube.

3. Add 125 µL of the **Second-Cycle, Second-Strand Master Mix** to each sample from *Step 7: Second-Cycle, Second-Strand cDNA Synthesis*, substep 1 on page 46, for a total volume of 150 µL.

   Gently flick the tube a few times to mix, then centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of tube.

4. Incubate for 2 hours at 16°C.

5. Add 2 µL of **T4 DNA Polymerase** to the samples for a final volume of 152 µL. Gently flick the tube a few times to mix, and then centrifuge briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube.

6. Incubate for 10 minutes at 16°C, then cool the sample at 4°C for at least 2 minutes. Centrifuge briefly (~5 seconds) to collect sample at the bottom of the tube.

   After the incubation at 4°C, centrifuge the tube briefly (~5 seconds) to collect the reaction at the bottom of the tube. Proceed to *Cleanup of Double-Stranded cDNA for Both the One-Cycle and Two-Cycle Target Labeling Assays* on page 48. Alternatively, immediately freeze the sample at –20°C for later use. Do not leave the reaction at 4°C for long periods of time.

Cleanup of Double-Stranded cDNA for Both the One-Cycle and Two-Cycle Target Labeling Assays

Sample Cleanup Module is used for cleaning up the double-stranded cDNA.

Reagents to be Supplied by User

- Ethanol, 96-100% (v/v)

All other components needed for cleanup of double-stranded cDNA are supplied with the GeneChip Sample Cleanup Module.

IMPORTANT !

BEFORE STARTING, please note:

- **cDNA Wash Buffer is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add 24 mL of ethanol (96-100%), as indicated on the bottle, to obtain a working solution, and checkmark the box on the left-hand side of the bottle label to avoid confusion.**
- **All steps of the protocol should be performed at room temperature. During the procedure, work without interruption.**
- **If cDNA synthesis was performed in a reaction tube smaller than 1.5 mL, transfer the reaction mixture into a 1.5 or 2 mL microfuge tube (not supplied) prior to addition of cDNA Binding Buffer.**

1. Add 600 µL of **cDNA Binding Buffer** to the double-stranded cDNA synthesis preparation. Mix by vortexing for 3 seconds.
2. Check that the color of the mixture is yellow (similar to cDNA Binding Buffer without the cDNA synthesis reaction).

NOTE

If the color of the mixture is orange or violet, add 10 µL of 3M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow.

3. Apply 500 µL of the sample to the **cDNA Cleanup Spin Column** sitting in a **2 mL Collection Tube** (supplied), and centrifuge for 1 minute at ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm). Discard flow-through.
4. Reload the spin column with the remaining mixture and centrifuge as above. Discard flow-through and Collection Tube.
5. Transfer spin column into a new **2 mL Collection Tube**

(supplied). Pipet 750 µL of the **cDNA Wash Buffer** onto the spin column. Centrifuge for 1 minute at ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm). Discard flow-through.

NOTE

cDNA Wash Buffer is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to the cDNA Wash Buffer before use (see IMPORTANT note on page 48 before starting).

6. Open the cap of the spin column and centrifuge for 5 minutes at maximum speed (≤ 25,000 x g). Discard flow-through and Collection Tube.

TIP

Label the collection tubes with the sample name. During centrifugation some column caps may break, resulting in loss of sample information.

Place columns into the centrifuge using every second bucket. Position caps over the adjoining bucket so that they are oriented in the opposite direction to the rotation (i.e., if the microcentrifuge rotates in a clockwise direction, orient the caps in a counterclockwise direction). This avoids damage of the caps.

Centrifugation with open caps allows complete drying of the membrane.

7. Transfer spin column into a 1.5 mL Collection Tube, and pipet 14 µL of **cDNA Elution Buffer** directly onto the spin column membrane. Incubate for 1 minute at room temperature and centrifuge 1 minute at maximum speed (≤ 25,000 x g) to elute.

   Ensure that the cDNA Elution Buffer is dispensed directly onto the membrane. The average volume of eluate is 12 µL recovered from the 14 µL of Elution Buffer.

NOTE

We do not recommend RNase treatment of the cDNA prior to the *in vitro* transcription and labeling reaction; the carry-over ribosomal RNA does not seem to inhibit the reaction.

We do not recommend gel analysis or spectrophotometric quantitation for cDNA prepared from total RNA. This is due to the presence of other nucleic acid species in the sample that can interfere with the results.

8. After cleanup, please proceed to *Synthesis of Biotin-Labeled cRNA for Both the One-Cycle and Two-Cycle Target Labeling Assays* on page 50.

Synthesis of Biotin-Labeled cRNA for Both the One-Cycle and Two-Cycle Target Labeling Assays

GeneChip IVT Labeling Kit is used for this step.

NOTE

This kit is only used for the IVT labeling step for generating biotin-labeled cRNA. For the IVT amplification step using unlabeled ribonucleotides in the First Cycle of the Two-Cycle cDNA Synthesis Procedure, a separate kit is recommended (MEGAscript® T7 Kit, Ambion, Inc.). Use only nuclease-free water, buffers, and pipette tips.

IMPORTANT

Store all reagents in a –20°C freezer that is not self-defrosting. Prior to use, centrifuge all reagents briefly to ensure that the solution is collected at the bottom of the tube.

The Target Hybridizations and Array Washing protocols have been optimized specifically for this IVT Labeling Protocol. Closely follow the recommendations described below for maximum array performance.

1. Use the following table to determine the amount of cDNA used for each IVT reaction following the cDNA cleanup step.

Table 2.17
IVT Reaction Set Up

Starting Material	Volume of cDNA to use in IVT
Total RNA	
10 to 100 ng	all (~12 µL)
1.0 to 8.0 µg	all (~12 µL)
8.1 to 15 µg	6 µL
mRNA	
0.2 to 0.5 µg	all (~12 µL)
0.6 to 1.0 µg	9 µL
1 to 2.0 µg	6 µL

2. Transfer the needed amount of template cDNA to RNase-free microfuge tubes and add the following reaction components in the

order indicated in the table below. If more than one IVT reaction is to be performed, a master mix can be prepared by multiplying the reagent volumes by the number of reactions. Do not assemble the reaction on ice, since spermidine in the **10X IVT Labeling Buffer** can lead to precipitation of the template cDNA.

Table 2.18

Component	Volume
Template cDNA*	variable (see Table 2.17)
RNase-free Water	variable (to give a final reaction volume of 40 µL)
10X IVT Labeling Buffer	4 µL
IVT Labeling NTP Mix	12 µL
IVT Labeling Enzyme Mix	4 µL
Total Volume	40 µL

**0.5 to 1 µg of the 3'-Labeling Control can be used in place of the template cDNA sample in this reaction as a positive control for the IVT components in the kit.*

3. Carefully mix the reagents and collect the mixture at the bottom of the tube by brief (~5 seconds) microcentrifugation.
4. Incubate at 37°C for 16 hours. To prevent condensation that may result from water bath-style incubators, incubations are best performed in oven incubators for even temperature distribution, or in a thermal cycler.

NOTE

Overnight IVT reaction time has been shown to maximize the labeled cRNA yield with high-quality array results. Alternatively, if a shorter incubation time (4 hours) is desired, 1 µL (200 units) of cloned T7 RNA polymerase (can be purchased directly from Ambion, P/N 2085) can be added to each reaction and has been shown to produce adequate labeled cRNA yield within 4 hours. The two different incubation protocols generate comparable array results, and users are encouraged to choose the procedure that best fits their experimental schedule and process flow.

5. Store labeled cRNA at –20°C, or –70°C if not purifying immediately. Alternatively, proceed to *Cleanup and Quantification of Biotin-Labeled cRNA* on page 52.

Cleanup and Quantification of Biotin-Labeled cRNA

Sample Cleanup Module is used for cleaning up the biotin-labeled cRNA.

Reagents to be Supplied by User

- Ethanol, 96-100% (v/v)
- Ethanol, 80% (v/v)

All other components needed for cleanup of biotin-labeled cRNA are supplied with the GeneChip Sample Cleanup Module.

STEP 1: CLEANUP OF BIOTIN-LABELED cRNA

IMPORTANT !

BEFORE STARTING please note:

- **It is essential to remove unincorporated NTPs, so that the concentration and purity of cRNA can be accurately determined by 260 nm absorbance.**
- **DO NOT extract biotin-labeled RNA with phenol-chloroform. The biotin will cause some of the RNA to partition into the organic phase. This will result in low yields.**
- **Save an aliquot of the unpurified IVT product for analysis by gel electrophoresis.**
- **IVT cRNA Wash Buffer is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add 20 mL of ethanol (96-100%), as indicated on the bottle, to obtain a working solution, and checkmark the box on the left-hand side of the bottle label to avoid confusion.**
- **IVT cRNA Binding Buffer may form a precipitate upon storage. If necessary, redissolve by warming in a water bath at 30°C, and then place the buffer at room temperature.**
- **All steps of the protocol should be performed at room temperature. During the procedure, work without interruption.**

1. Add 60 µL of **RNase-free Water** to the IVT reaction and mix by vortexing for 3 seconds.
2. Add 350 µL **IVT cRNA Binding Buffer** to the sample and mix by vortexing for 3 seconds.
3. Add 250 µL ethanol (96-100%) to the mixture, and mix well by pipetting. Do not centrifuge.

4. Apply sample (700 µL) to the IVT **cRNA Cleanup Spin Column** sitting in a **2 mL Collection Tube**. Centrifuge for 15 seconds at ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm). Discard flow-through and Collection Tube.
5. Transfer the spin column into a new **2 mL Collection Tube** (supplied). Pipet 500 µL **IVT cRNA Wash Buffer** onto the spin column. Centrifuge for 15 seconds at ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm) to wash. Discard flow-through.

NOTE

IVT cRNA Wash Buffer is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to the IVT cRNA Wash Buffer before use (see IMPORTANT note on page 52 before starting).

6. Pipet 500 µL 80% (v/v) ethanol onto the spin column and centrifuge for 15 seconds at ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm). Discard flow-through.
7. Open the cap of the spin column and centrifuge for 5 minutes at maximum speed (≤ 25,000 x g). Discard flow-through and Collection Tube.

   Place columns into the centrifuge using every second bucket. Position caps over the adjoining bucket so that they are oriented in the opposite direction to the rotation (i.e., if the microcentrifuge rotates in a clockwise direction, orient the caps in a counterclockwise direction). This avoids damage of the caps.

TIP

Label the collection tubes with the sample name. During centrifugation some column caps may break, resulting in loss of sample information.

   Centrifugation with open caps allows complete drying of the membrane.
8. Transfer spin column into a new **1.5 mL Collection Tube** (supplied), and pipet 11 µL of **RNase-free Water** directly onto the spin column membrane. Ensure that the water is dispensed directly onto the membrane. Centrifuge 1 minute at maximum speed (≤ 25,000 x g) to elute.
9. Pipet 10 µL of **RNase-free Water** directly onto the spin column membrane. Ensure that the water is dispensed directly onto the membrane. Centrifuge 1 minute at maximum speed (≤ 25,000 x g) to elute.

10. For subsequent photometric quantification of the purified cRNA, we recommend dilution of the eluate between 1:100 fold and 1:200 fold.
11. Store cRNA at –20°C, or –70°C if not quantitated immediately. Alternatively, proceed to *Step 2: Quantification of the cRNA*.

STEP 2: QUANTIFICATION OF THE cRNA

Use spectrophotometric analysis to determine the cRNA yield. Apply the convention that 1 absorbance unit at 260 nm equals 40 µg/mL RNA.

- Check the absorbance at 260 nm and 280 nm to determine sample concentration and purity.
- Maintain the A_{260}/A_{280} ratio close to 2.0 for pure RNA (ratios between 1.9 and 2.1 are acceptable).

For quantification of cRNA when using total RNA as starting material, an adjusted cRNA yield must be calculated to reflect carryover of unlabeled total RNA. Using an estimate of 100% carryover, use the formula below to determine adjusted cRNA yield:

adjusted cRNA yield = RNAm - (total RNAi) (y)

RNAm = amount of cRNA measured after IVT (µg)
total RNAi = starting amount of total RNA (µg)
y = fraction of cDNA reaction used in IVT

Example: Starting with 10 µg total RNA, 50% of the cDNA reaction is added to the IVT, giving a yield of 50 µg cRNA. Therefore, adjusted cRNA yield = 50 µg cRNA - (10 µg total RNA) (0.5 cDNA reaction) = 45.0 µg.

Use adjusted yield in *Fragmenting the cRNA for Target Preparation* on page 57.

NOTE

Please refer to Chapter 3 *Eukaryotic Target Hybridization* for the amount of cRNA required for one array hybridization experiment. The amount varies depending on the array format. Please refer to the specific probe array package insert for information on the array format.

STEP 3: CHECKING UNFRAGMENTED SAMPLES BY GEL ELECTROPHORESIS

Gel electrophoresis of the IVT product is done to estimate the yield and size distribution of labeled transcripts. The following are examples of typical cRNA products examined on an Agilent 2100 Bioanalyzer.

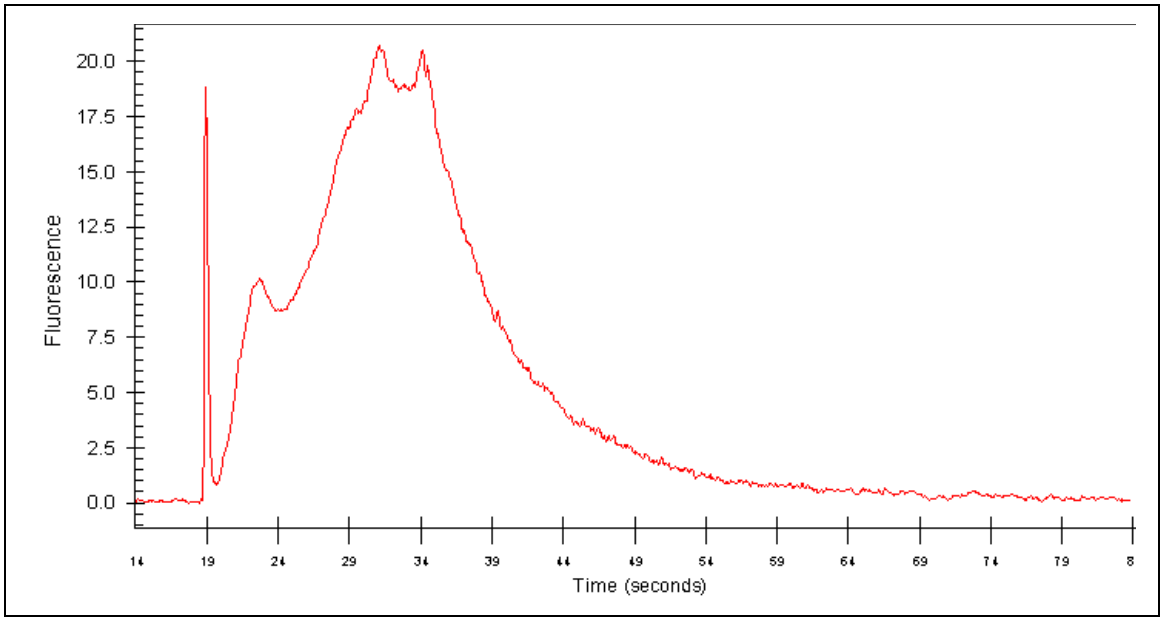


Figure 2.3
Biotin-labeled cRNA from One-Cycle cDNA Synthesis Kit. Bioanalyzer electropherogram for labeled cRNA from HeLa total RNA using the One-Cycle Kit. This electropherogram displays the nucleotide size distribution for 400 ng of labeled cRNA resulting from one round of amplification. The average size is approximately 1580 nt.

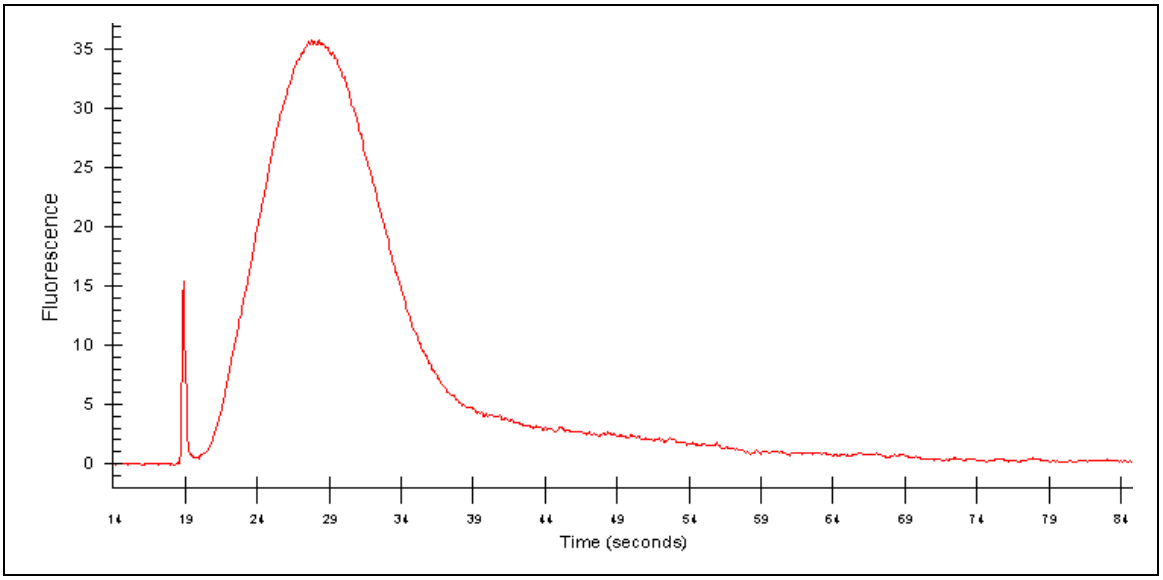


Figure 2.4
Biotin-labeled cRNA from Two-Cycle cDNA Synthesis Kit. Bioanalyzer electropherogram for labeled cRNA from HeLa total RNA using the Two-Cycle Kit. This electropherogram displays the nucleotide size distribution for 400 ng of labeled cRNA resulting from two rounds of amplification. The average size is approximately 850 nt.

Fragmenting the cRNA for Target Preparation

Sample Cleanup Module is used for this step.

Fragmentation of cRNA target before hybridization onto GeneChip probe arrays has been shown to be critical in obtaining optimal assay sensitivity.

Affymetrix recommends that the cRNA used in the fragmentation procedure be sufficiently concentrated to maintain a small volume during the procedure. This will minimize the amount of magnesium in the final hybridization cocktail. Fragment an appropriate amount of cRNA for hybridization cocktail preparation and gel analysis (refer to Chapter 3, *Eukaryotic Target Hybridization*).

1. The Fragmentation Buffer has been optimized to break down full-length cRNA to 35 to 200 base fragments by metal-induced hydrolysis.

   The following table shows suggested fragmentation reaction mix for cRNA samples at a final concentration of 0.5 µg/µL. Use adjusted cRNA concentration, as described in *Step 2: Quantification of the cRNA* on page 54. The total volume of the reaction may be scaled up or down dependent on the amount of cRNA to be fragmented.

Table 2.19
Sample Fragmentation Reaction by Array Format*

Component	49/64 Format	100 Format
cRNA	20 µg (1 to 21 µL)	15 µg (1 to 21 µL)
5X Fragmentation Buffer	8 µL	6 µL
RNase-free Water (variable)	to 40 µL final volume	to 30 µL final volume
Total Volume	40 µL	30 µL

**Please refer to specific probe array package insert for information on array format.*

2. Incubate at 94°C for 35 minutes. Put on ice following the incubation.
3. Save an aliquot for analysis on the Bioanalyzer. A typical fragmented target is shown in Figure 2.5.

   The standard fragmentation procedure should produce a distribution of RNA fragment sizes from approximately 35 to 200 bases.

4. Store undiluted, fragmented sample cRNA at –20°C (or –70°C for longer-term storage) until ready to perform the hybridization, as described in Chapter 3, *Eukaryotic Target Hybridization*.

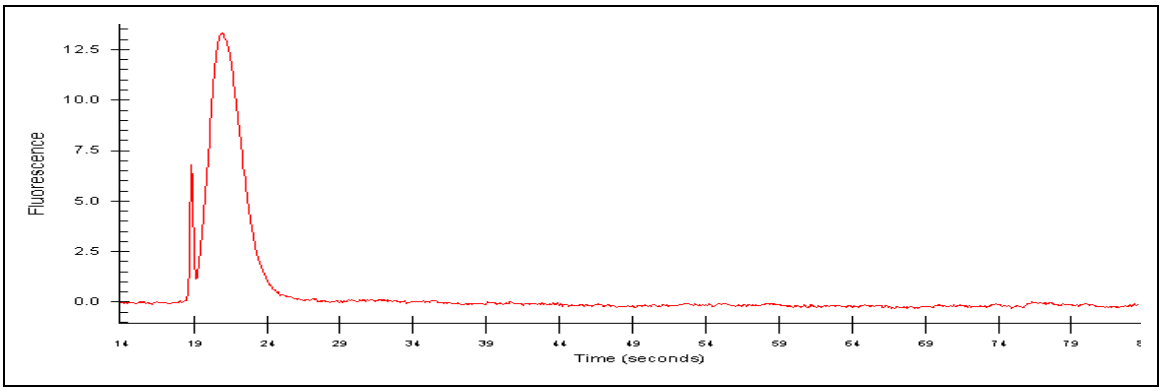


Figure 2.5
Fragmented cRNA. Bioanalyzer electropherogram for fragmented labeled cRNA from HeLa total RNA. This electropherogram displays the nucleotide size distribution for 150 ng of fragmented labeled cRNA resulting from one round of amplification. The average size is approximately 100 nt.

Chapter 3

Eukaryotic Target Hybridization

Chapter 3

Chapter Contents

Reagents and Materials Required 62
Eukaryotic Target Hybridization 63

This Chapter Contains:

- Detailed steps for preparing the eukaryotic hybridization mix containing labeled target and control cRNA.
- Instructions for hybridizing the target mix to a eukaryotic GeneChip® probe array.

After completing the procedures described in this chapter, the hybridized probe array is ready for washing, staining, and scanning, as detailed in the *GeneChip® Expression Wash, Stain and Scan User Manual*, P/N 702731.

Reagents and Materials Required

The following reagents and materials have been tested and evaluated by Affymetrix scientists. Information and part numbers listed are based on U.S. catalog information. For supplier information, please refer to the Supplier Reference List in Appendix G of this manual.

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

  Hybridization Module from Box 1:

  - Pre-Hybridization Mix
  - 2X Hybridization Mix
  - DMSO
  - Nuclease-free Water

- GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit: Affymetrix, P/N 900454 (30 reactions) or P/N 900457 (150 reactions), both contain Control cRNA and Control Oligo B2
- Control Oligo B2, 3 nM: Affymetrix, P/N 900301

Miscellaneous Supplies

- Hybridization Oven 640: Affymetrix, P/N 800138 (110V) or 800139 (220V)
- Sterile, RNase-free, microcentrifuge vials, 1.5 mL: USA Scientific, P/N 1415-2600 (or equivalent)
- Micropipettors, (P-2, P-20, P-200, P-1000): Rainin Pipetman (or equivalent)
- Sterile-barrier pipette tips and non-barrier pipette tips
- Heatblock

Eukaryotic Target Hybridization

Please refer to the table below for the necessary amount of cRNA required for the specific probe array format used. These preparations take into account that it is necessary to make extra hybridization cocktail due to a small loss of volume (10-20 µL) during each hybridization.

1. Mix the following for each target, scaling up volumes if necessary for hybridization to multiple probe arrays.

IMPORTANT **If using the GeneChip IVT Labeling Kit to prepare the target, a final concentration of 10% DMSO needs to be added in the hybridization cocktail for optimal results.**

NOTE **DMSO will solidify when stored at 4°C. Please ensure that the reagent is completely thawed prior to use. After the first use, it is recommended to store DMSO at room temperature.**

Table 3.1
Hybridization Cocktail for Single Probe Array*

Component	49 Format (Standard) / 64 Format Array	100 Format (Midi) Array	169 Format (Mini) Array /400 Format (Micro) Array	Final Dilution
Fragmented and Labeled cRNA†	15 µg	10 µg	5 µg	0.05 µg/µL
Control Oligonucleotide B2 (3 nM)	5 µL	3.3 µL	1.7 µL	50 pM
20X Eukaryotic Hybridization Controls (*bioB*, *bioC*, *bioD*, *cre*)	15 µL	10 µL	5 µL	1.5, 5, 25, and 100 pM respectively
2X Hybridization Mix	150 µL	100 µL	50 µL	1X
DMSO	30 µL	20 µL	10 µL	10%
Nuclease-free Water	to final volume of 300 µL	to final volume of 200 µL	to final volume of 100 µL	
Total Volume	300 µL	200 µL	100 µL	

Please refer to specific probe array package insert for information on array format.
†Please see Chapter 2 for the amount of adjusted fragmented cRNA to use when starting from total RNA.*

IMPORTANT **It is imperative that frozen stocks of 20X GeneChip Eukaryotic Hybridization Controls are heated to 65°C for 5 minutes to completely resuspend the cRNA before aliquoting.**

2. Equilibrate probe array to room temperature immediately before use.

NOTE **It is important to allow the arrays to equilibrate to room temperature completely. Specifically, if the rubber septa are not equilibrated to room temperature, they may be prone to cracking, which can lead to leaks.**

3. Heat the hybridization cocktail to 99°C for 5 minutes in a heat block.
4. Meanwhile, wet the array with an appropriate volume of Pre-Hybridization Mix (see Table 3.2) by filling it through one of the septa.

Table 3.2
Probe Array Cartridge Volumes for Pre-Hybridization Mix and Hybridization Cocktail

Array	Volume
49 Format (Standard)	200 µL
64 Format	200 µL
100 Format (Midi)	130 µL
169 Format (Mini)	80 µL
400 Format (Micro)	80 µL

NOTE **Each array has two septa (see Figure 3.1 for location of the probe array septa). In order to fill the array, first vent the array chamber by inserting a clean, unused pipette tip into one of the septa; then insert the pipette tip of a micropipettor into the remaining septum to fill.**

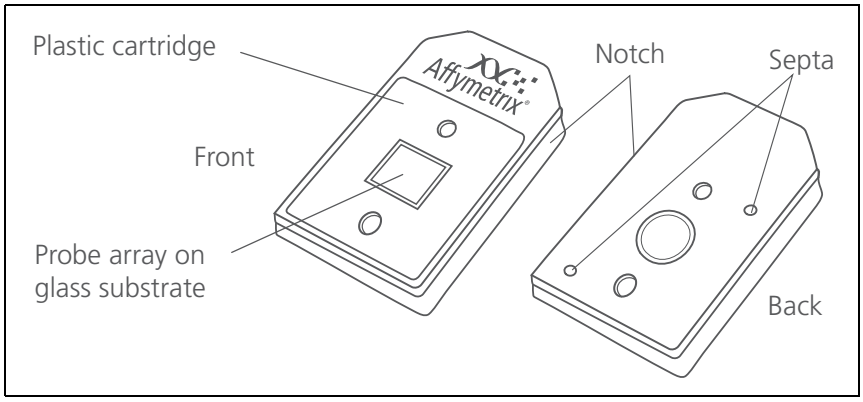


Figure 3.1
GeneChip® Probe Array

5. Incubate the probe array filled with Pre-Hybridization Mix at 45°C for 10 minutes with rotation.
6. Transfer the hybridization cocktail that has been heated at 99°C, in Step 3, to a 45°C heat block for 5 minutes.
7. Spin the hybridization cocktail at maximum speed in a microcentrifuge for 5 minutes to collect any insoluble material from the hybridization mixture.
8. Remove the array from the hybridization oven. Vent the array with a clean pipette tip and extract the Pre-Hybridization Mix from the array with a micropipettor. Refill the array with the appropriate volume of the clarified hybridization cocktail, avoiding any insoluble matter at the bottom of the tube (see Table 3.2).
9. Place probe array into the hybridization oven, set to 45°C.
10. To avoid stress to the motor, load probe arrays in a balanced configuration around the axis. Rotate at 60 rpm.
11. Hybridize for 16 hours.

    During the latter part of the 16-hour hybridization, proceed to the *GeneChip® Expression Wash, Stain and Scan User Manual*, P/N 702731, to prepare reagents for the washing and staining steps required immediately after completion of hybridization.

Chapter 4

Prokaryotic Target Preparation

Chapter 4

Chapter Contents

Reagents and Materials Required 71
Reagent Preparation 72
Total RNA Isolation 72
cDNA Synthesis 74
Step 1: Preparation of Poly-A RNA Controls 74
Step 2: cDNA Synthesis 76
Step 3: Removal of RNA 77
Step 4: Purification and Quantitation of cDNA. 78
cDNA Fragmentation. 79
Terminal Labeling 80

This Chapter Contains:

This chapter describes the assay procedures recommended for use with the GeneChip® *P. aeruginosa* Genome Array and the GeneChip® *E. coli* arrays. The assay utilizes reverse transcriptase and random hexamer primers to produce DNA complementary to the RNA. The cDNA products are then fragmented by DNase I and labeled with terminal transferase and biotinylated GeneChip® DNA Labeling Reagent at the 3' termini.

This protocol is presented as a recommendation only, and has not been validated by Affymetrix.

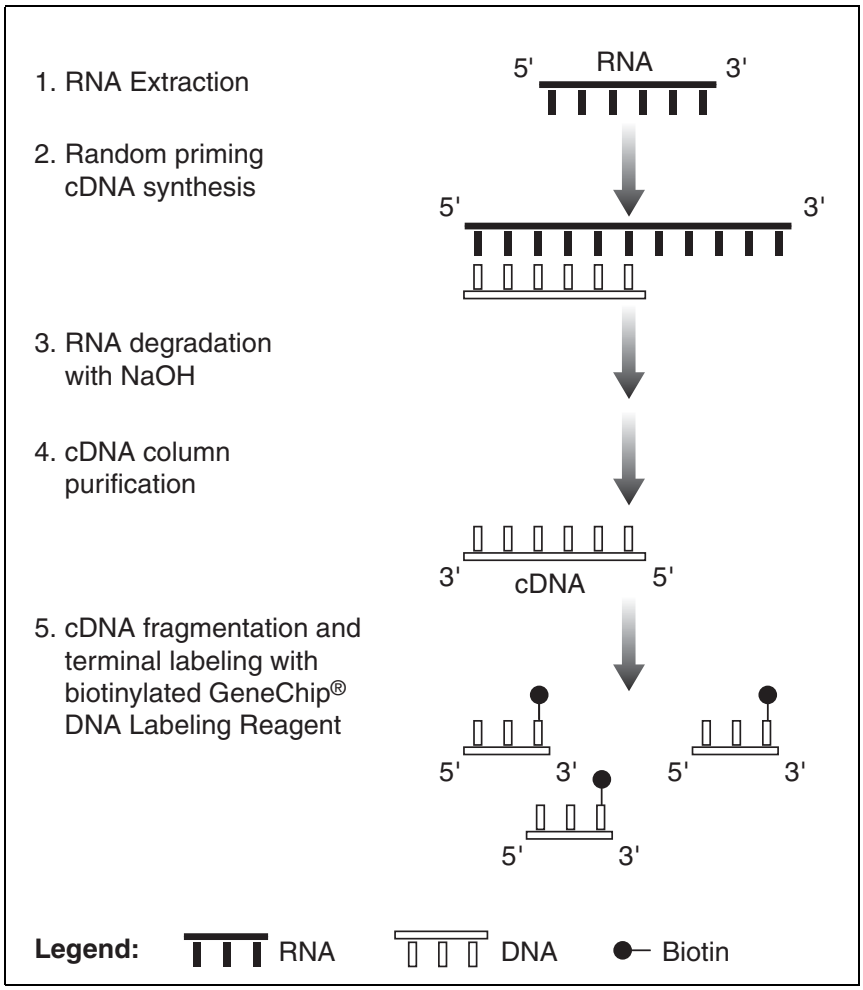


Figure 4.1
Target Labeling for Prokaryotic GeneChip® Antisense Arrays

Reagents and Materials Required

The following reagents and materials are recommendations and have been tested and evaluated by Affymetrix scientists. Information and part numbers listed are based on U.S. catalog information. For supplier information, please refer to the Supplier Reference List in Appendix G of this manual.

Labeling

- dNTP: Invitrogen Life Technologies, P/N 18427-013
- Random Primers, 3 µg/µL: Invitrogen Life Technologies, P/N 48190-011
- GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit: Affymetrix, P/N 900433
- SuperScript II™ Reverse Transcriptase: Invitrogen Life Technologies, P/N 18064-071
- SUPERase•In™: Ambion, P/N 2696
- Nuclease-free Water: Ambion, P/N 9930
- NaOH, 1N solution: VWR Scientific Products, P/N MK469360
- HCl, 1N solution: VWR Scientific Products, P/N MK638860
- MinElute PCR Purification Kit: QIAGEN, P/N 28004
- 10X DNase I Buffer: USB, P/N 78331
- Deoxyribonuclease I (DNase I): Pierce, P/N 89835
- GeneChip® DNA Labeling Reagent: Affymetrix, P/N 900542
- Terminal Deoxynucleotidyl Transferase: Promega, P/N M1875
- EDTA, 0.5M, pH 8.0: Invitrogen Life Technologies, P/N 15575-020
- Non-stick RNase-free microfuge tubes, 0.5 mL and 1.5 mL: Ambion, P/N 12350 and P/N 12450, respectively

Gel-Shift Assay

- Novex XCell SureLock™ Mini-Cell: Invitrogen Life Technologies, P/N EI0001
- 4-20% TBE Gel, 1.0 mm, 12 well: Invitrogen Life Technologies, P/N EC62252
- Sucrose Gel Loading Dye, 5X: Amresco, P/N E-274
- 10X TBE Running Buffer
- SYBR Gold: Molecular Probes, P/N S-11494
- 10 bp and 100 bp DNA ladder: Invitrogen Life Technologies, P/N 10821-015 and 15628-019, respectively
- ImmunoPure NeutrAvidin: Pierce Chemical, P/N 31000
- 1M Tris, pH 7.0: Ambion, P/N 9850G
- PBS, pH 7.2: Invitrogen Life Technologies, P/N 20012-027

Reagent Preparation

75 ng/µL Random Primers

For 1000 µL:

25 µL of 3 µg/µL Random Primers

975 µL of Nuclease-free H_2O

Store at –20°C in a non-frost-free freezer.

2 mg/mL NeutrAvidin

Resuspend 10 mg NeutrAvidin in 5 mL PBS solution. Store at 4°C.

Total RNA Isolation

As starting material for the cDNA synthesis procedure, total RNA can be isolated by using standard procedures for bacterial RNA isolation or various commercial RNA isolation kits.

For *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli*, we have successfully used the QIAGEN® RNeasy Mini Purification Kit. Caution should be used to minimize chromosomal DNA contamination during the isolation, due to the high sensitivity of the assay. It is suggested that no more than

1 X 10^9 cells are applied to a single purification column. Also, use the lysozyme at a concentration of 1 mg/mL, and not the recommended 400 µg/mL. Additional DNase I treatment may be required to eliminate DNA contamination when the bacterial culture is grown at high density.

After purification, RNA concentration is determined by absorbance at 260 nm on a spectrophotometer (1 absorbance unit = 40 µg/mL RNA). The A_{260}/A_{280} ratio should be approximately 2.0, with ranges between 1.8 to 2.1 considered acceptable. We recommend checking the quality of RNA by running it on an agarose gel prior to starting the assay. The 23S and 16S rRNA bands should be clear without any obvious smears. Any indication of the presence of chromosomal DNA contamination (high molecular weight bands or smears on the gel) would require additional DNase treatment before proceeding to cDNA synthesis.

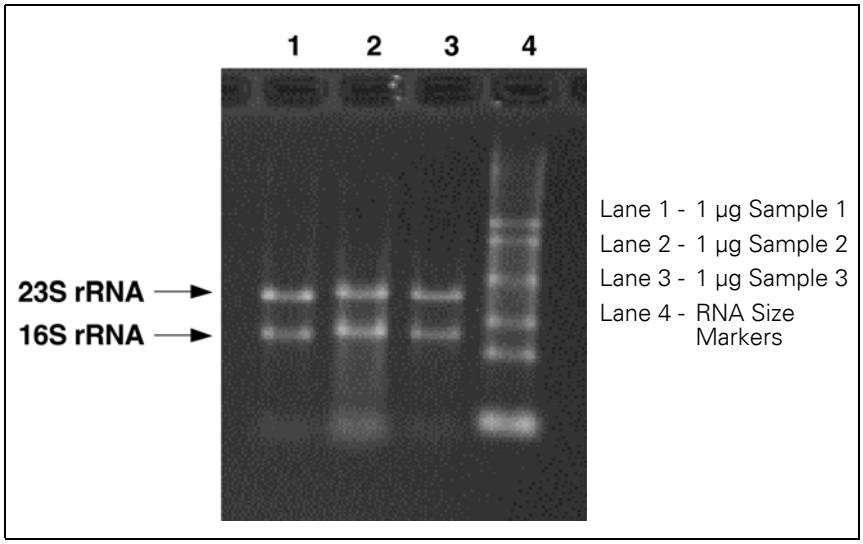


Figure 4.2
Typical RNA preparation from *E. coli*

cDNA Synthesis

The following protocol starts with 10 µg of total RNA. Incubations are performed in a thermal cycler.

NOTE **The integrity of total RNA is essential for the success of the assay. Exercise precautions and follow standard laboratory procedures when handling RNA samples.**

STEP 1: PREPARATION OF POLY-A RNA CONTROLS

The **Poly-A RNA Control Stock** and **Poly-A Control Dil Buffer** are provided with the Poly-A RNA Control Kit (P/N 900433) to prepare the appropriate serial dilutions based on the following recommendation:

Table 4.1
Serial Dilutions of Poly-A RNA Control Stock

Array Format*	Serial Dilutions		Spike-in Volumes
	First	Second	
169 Format (Mini)	1:20	1:16	2 µL
100 Format (Midi)	1:20	1:20	2 µL
49 Format (Standard)	1:20	1:13	2 µL

Please refer to specific probe array package insert for information on array format.

TIP **Avoid pipetting solutions less than 2 µL in volume to maintain precision and consistency when preparing the dilutions.**

The **Poly-A RNA Control Stock** contains *in vitro* synthesized, polyadenylated transcripts for *B. subtilis* genes that are pre-mixed at staggered concentrations. The concentrations of the spikes in the stock solution are: *lys* 7.6 nM, *phe* 15.2 nM, *thr* 30.4 nM, and *dap* 114.0 nM. Following the recommended dilutions as shown above, the final concentrations of the spikes in the hybridization cocktail (Table 5.1 on page 86) are *lys* 0.256 pM, *phe* 0.511 pM, *thr* 1.022 pM, and *dap* 3.833 pM.

NOTE **We strongly recommend using control transcripts to monitor the assay sensitivity and performance. Probe sets for these control genes from *B. subtilis* have been tiled on the GeneChip® *P. aeruginosa* Genome Array and *E. coli* arrays.**

For example, to prepare the poly-A RNA dilutions for a 100 format array:

IMPORTANT !

Use non-stick RNase-free microfuge tubes to prepare all of the dilutions.

A. Add 2 µL of the **Poly-A RNA Control Stock** to 38 µL of **Poly-A Control Dil Buffer** for the First Dilution (1:20).

B. Mix thoroughly and spin down to collect the liquid at the bottom of the tube.

C. Add 2 µL of the First Dilution to 38 µL of **Poly-A Control Dil Buffer** to prepare the Second Dilution (1:20).

D. Mix thoroughly and spin down to collect the liquid at the bottom of the tube.

E. Add 2 µL of this Second Dilution to the total RNA as indicated in Table 4.2.

NOTE

The First Dilution of the poly-A RNA controls can be stored up to six weeks in a non-frost-free freezer at –20°C and frozen-thawed up to eight times.

STEP 2: cDNA SYNTHESIS

1. Prepare the following mixture for primer annealing:

Table 4.2
RNA/Primer Hybridization Mix

Component	Volume	Final Dilution
Total RNA	10 µg	0.33 µg/µL
75 ng/µL Random Primers	10 µL	25 ng/µL
Diluted poly-A RNA controls	2 µL	Variable
Nuclease-free H_2O	Up to 30.0 µL	—
Total Volume	30 µL	

NOTE

The random primers supplied by Invitrogen Life Technologies are oligodeoxynucleotides composed mainly of hexamers. Random primers of different length or GC content have been successfully applied to the procedure.

2. Incubate the RNA/Primer mix at the following temperatures:
   - 70°C for 10 minutes
   - 25°C for 10 minutes
   - Chill to 4°C
3. Prepare the reaction mix for cDNA synthesis. Briefly centrifuge the reaction tube to collect sample at the bottom and add the cDNA synthesis mix from Table 4.3 to the RNA/primer hybridization mix.

Table 4.3
cDNA Synthesis Components

Component	Volume	Final Dilution
RNA/Primer hybridization mix (from previous step)	30 µL	
5X 1st Strand Buffer	12 µL	1X
100 mM DTT	6 µL	10 mM
10 mM dNTPs	3 µL	0.5 mM
SUPERase•In (20 U/µL)	1.5 µL	0.5 U/µL
SuperScript II (200 U/µL)	7.5 µL	25 U/µL
Total Volume	60 µL	

4. Incubate the reaction at the following temperatures:
   - 25°C for 10 minutes
   - 37°C for 60 minutes
   - 42°C for 60 minutes
   - Inactivate SuperScript II at 70°C for 10 minutes
   - Chill to 4°C

STEP 3: REMOVAL OF RNA

1. Add 20 µL of 1N NaOH and incubate at 65°C for 30 minutes.
2. Add 20 µL of 1N HCl to neutralize.

STEP 4: PURIFICATION AND QUANTITATION OF cDNA

1. Use MinElute PCR Purification Columns to clean up the cDNA synthesis product (for detailed protocol, see MinElute PCR Purification Kit Protocols provided by the supplier). Elute the product with 12 µL of EB Buffer (supplied with the kit). The average volume of eluate is 11 µL from 12 µL of EB Buffer.
2. Quantify the purified cDNA product by 260 nm absorbance (1.0 A_{260} unit = 33 µg/mL of single-stranded DNA).

NOTE

Typical yields of cDNA are 3 to 7 µg. A minimum of 1.5 µg of cDNA is required for subsequent procedures to obtain sufficient material to hybridize onto the array and to perform necessary quality control experiments.

cDNA Fragmentation

1. Prepare the following reaction mix:

Table 4.4
Fragmentation Reaction

Component	Volume	Dilution
10X DNase I Buffer	2 µL	1X
cDNA	10 µL	–
DNase I (see note below)	X µL	0.6 U/µg of cDNA
Nuclease-free H_2O	Up to 20 µL	–
Total Volume	20 µL	

NOTE **Use all remaining cDNA purified from the previous step in this reaction. Do not proceed if the yield is lower than 1.5 µg. Dilute DNase I to 0.6 U/µL in 1X One-Phor-All Buffer. Prepare fresh dilution each time immediately before use.**

IMPORTANT **It is anticipated that DNase I enzyme activity may vary from lot to lot. A titration assay is strongly recommended for each new lot of enzyme to determine the dosage of the DNase I (unit of DNase I per µg of cDNA) to be used in the fragmentation reaction. 0.6U for each µg of cDNA can be used as a starting point for the titration.**

2. Incubate the reaction at 37°C for 10 minutes.
3. Inactivate DNase I at 98°C for 10 minutes.
4. The fragmented cDNA is applied directly to the terminal labeling reaction. Alternatively, the material can be stored at –20°C for later use.

NOTE **To examine the fragmentation result, load ~200 ng of the product on a 4% to 20% acrylamide gel and stain with SYBR Gold. The majority of the fragmented cDNA should be in the 50 to 200 base-pairs range.**

Terminal Labeling

Use GeneChip® DNA Labeling Reagent (Affymetrix, P/N 900542) to label the 3' termini of the fragmentation products.

1. Prepare the following reaction mix:

Table 4.5
Terminal Label Reaction

Component	Volume
5X Reaction Buffer	10 µL
GeneChip DNA Labeling Reagent, 7.5 mM	2 µL
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase	2 µL
Fragmentation cDNA Product	Up to 20 µL
H_2O	16 µL
Total Volume	50 µL

2. Incubate the reaction at 37°C for 60 minutes.
3. Stop the reaction by adding 2 µL of 0.5M EDTA.
4. The target is ready to be hybridized onto probe arrays, as described in *Prokaryotic Target Hybridization* on page 83. Alternatively, it may be stored at –20°C for later use.

To estimate the labeling efficiency, a gel-shift assay can be performed (see below). In general, greater than 90% of the fragments should be labeled and, therefore, shifted.

Gel-Shift Assay

The efficiency of the labeling procedure can be assessed using the following procedure. This quality control protocol prevents hybridizing poorly labeled target onto the probe array. The addition of biotin residues is monitored in a gel-shift assay, where the fragments are incubated with avidin prior to electrophoresis. The nucleic acids are then detected by staining, as shown in the gel photograph Figure 4.3. The procedure takes approximately 90 minutes to complete.

NOTE

The absence of a shift pattern indicates poor biotin labeling. The problem should be addressed before proceeding to the hybridization step.

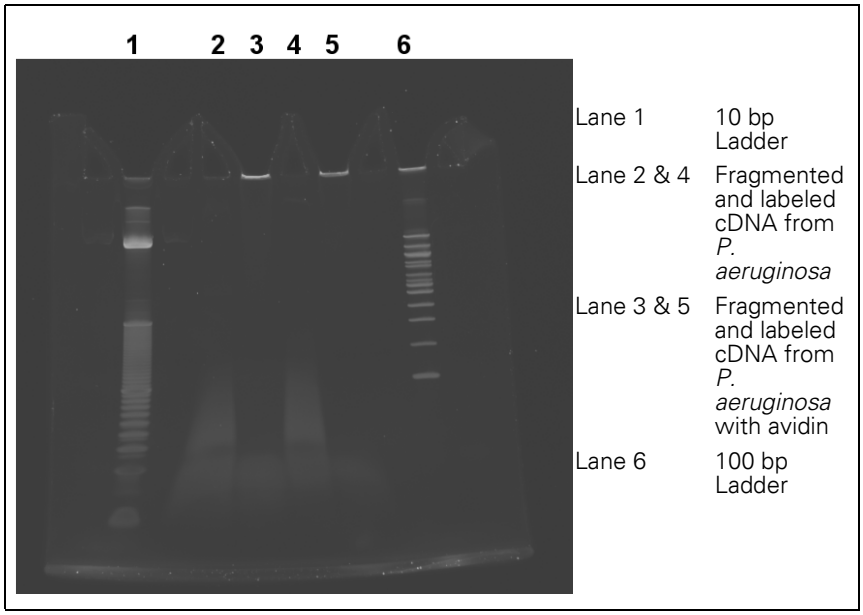


Figure 4.3
Gel-shift for monitoring *P. aeruginosa* target labeling efficiency. Notice that the majority of the avidin-conjugated product, in both lanes 3 and 5, is highlighted as a bright band towards the top of the gel.

1. Prepare a NeutrAvidin solution of 2 mg/mL in PBS.
2. Place a 4% to 20% TBE gel into the gel holder and load system with 1X TBE Buffer.
3. For each sample to be tested, remove two 150 to 200 ng aliquots of fragmented and biotinylated sample to fresh tubes.
4. Add 5 µL of 2 mg/mL NeutrAvidin to one of the two tubes for each sample tested.
5. Mix and incubate at room temperature for 5 minutes.
6. Add loading dye to all samples to a final concentration of 1X loading dye.
7. Prepare 10 bp and 100 bp DNA ladders (1 µL ladder +7 µL water+2 µL loading dye for each lane).
8. Carefully load samples and two ladders on gel. Each well can hold a maximum of 20 µL.
9. Run the gel at 150 volts until the front dye (red) almost reaches the bottom. The electrophoresis takes approximately 1 hour.

10. While the gel is running, prepare at least 100 mL of a 1X solution of SYBR Gold for staining.

NOTE

SYBR Gold is light sensitive. Therefore, use caution and shield the staining solution from light. Prepare a new batch of stain at least once a week.

11. After the gel is complete, break open cartridge and stain the gel in 1X SYBR Gold for 10 minutes.
12. Place the gel on the UV light box and produce an image following standard procedure. Be sure to use the appropriate filter for SYBR Gold.

Chapter 5

Prokaryotic Target Hybridization

Chapter 5

Chapter Contents

Reagents and Materials Required 85
Prokaryotic Target Hybridization 86

This Chapter Contains:

This chapter contains detailed steps for preparing the hybridization mix, and instructions for hybridizing the target mix to the GeneChip® *P. aeruginosa* Genome Array and GeneChip® *E. coli* arrays. The hybridized probe array is then ready for washing, staining, and scanning as detailed in Chapter 6.

Reagents and Materials Required

The following reagents and materials have been tested and evaluated by Affymetrix scientists. Information and part numbers listed are based on U.S. catalog information. For supplier information, please refer to the Supplier Reference List in Appendix G of this manual.

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

  Hybridization Module, Box 1

  - 2X Hybridization Mix
  - DMSO
  - Nuclease-free Water

- Control Oligo B2, 3 nM: Affymetrix, P/N 900301

Miscellaneous Supplies

- Hybridization Oven 640: Affymetrix, P/N 800138 (110V) or 800139 (220V)
- Sterile, RNase-free, microcentrifuge vials, 1.5 mL: USA Scientific, P/N 1415-2600 (or equivalent)
- Micropipettors, (P-2, P-20, P-200, P-1000): Rainin Pipetman (or equivalent)
- Sterile-barrier pipette tips and non-barrier pipette tips

Prokaryotic Target Hybridization

After determining that the fragmented cDNA is labeled with biotin, prepare the hybridization cocktail. The minimum amount of cDNA product required for target hybridization is 1 µg. The solution is stable for approximately 6 to 8 hours at 4°C. The following protocol can be used for freshly prepared or frozen hybridization cocktail. Re-use of prokaryotic sample has not been thoroughly tested and, therefore, is not recommended.

1. Prepare the following hybridization cocktail.

NOTE **DMSO will solidify when stored at 4°C. Please ensure that the reagent is completely thawed prior to use. After the first use, it is recommended to store DMSO at room temperature.**

Table 5.1
Hybridization Cocktail for Single Probe Array*

Component	49 Format (Standard)	100 Format (Midi)	169 Format (Mini)	Final Dilution or Amount
Fragmented and Labeled cDNA	Up to 50 µL	Up to 50 µL	25 µL	0.5 – 7.0 µg
Control Oligonucleotide B2 (3 nM)	3.3 µL	2.2 µL	1.3 µL	50 pM
2X Hybridization Mix	100 µL	65 µL	40 µL	1X
DMSO	–	10.2 µL	6.2 µL	7.8% (or 0%)
Nuclease-free Water	to a final volume of 200 µL	to a final volume of 130 µL	7.5 µL	
Total Volume	200 µL	130 µL	80 µL	

**Please refer to specific probe array package insert for information on array format.*

2. Equilibrate probe array to room temperature immediately before use.

NOTE

It is important to allow the arrays to equilibrate to room temperature completely. Specifically, if the rubber septa are not equilibrated to room temperature, they may be prone to cracking, which leads to leaks.

3. Based on the format of the array type used, refer to Table 5.2 to add the appropriate volume of hybridization cocktail.

Table 5.2
Probe Array Cartridge Volumes for Hybridization Cocktail

Array	Volume
49 Format (Standard)	200 µL
100 Format (Midi)	130 µL
169 Format (Mini)	80 µL

NOTE

Each array has two septa (see Figure 5.1 for location of the probe array septa). In order to fill the array, first vent the array chamber by inserting a clean, unused pipette tip into one of the septa; then insert the pipette tip of a micropipettor into the remaining septum to fill.

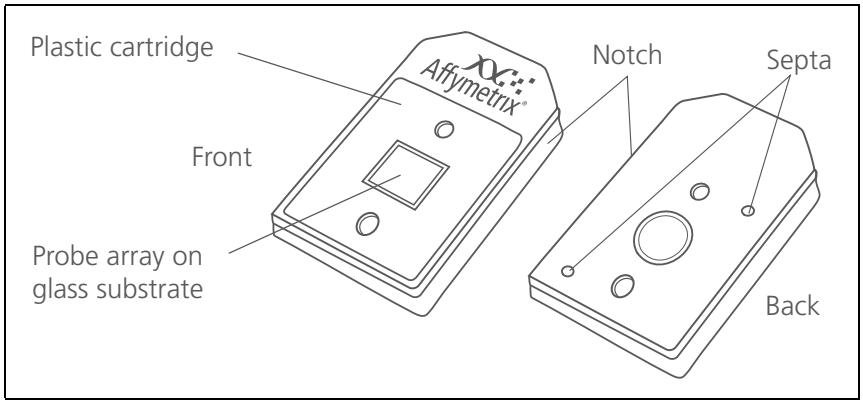


Figure 5.1
GeneChip® Probe Array

4. Place probe array in the hybridization oven set at the temperatures indicated below.
   - *P. aeruginosa* 50°C
   - *E. coli* 45°C

NOTE

The hybridization temperature of 50°C is higher than that used for other expression assays. The increased hybridization temperature is required due to the high GC content of *P. aeruginosa*.

5. To avoid stress to the motor, load probe arrays in a balanced configuration around axis. Rotate at 60 rpm.
6. Hybridize for 16 hours.

   During the latter part of the 16-hour hybridization, proceed to Chapter 6 to prepare reagents for the washing and staining steps required immediately after completion of hybridization.

Chapter 6

Prokaryotic Arrays: Washing, Staining and Scanning

Chapter 6

Chapter Contents

Reagents and Materials Required 92
Experiment and Fluidics Station Setup 94
Step 1: Defining File Locations 94
Step 2: Entering Experiment Information 95
Step 3: Preparing the Fluidics Station 96
Probe Array Wash and Stain 97
Preparing the Stain Reagents 98
Using the Fluidics Station 450/250 98
Using the Fluidics Station 400 102
Probe Array Scan 107
Handling the GeneChip® Probe Array 107
Scanning the Probe Array 108
Shutting Down the Fluidics Station 109
Customizing the Protocol 111

This Chapter Contains:

- Instructions for using the Fluidics Station 400 or 450/250 to automate the washing and staining of GeneChip *P. aeruginosa* and GeneChip *E. coli* arrays.
- Instructions for scanning probe arrays using the GeneArray® Scanner or the GeneChip® Scanner 3000.

After completing the procedures described in this chapter, the scanned probe array image (.dat file) is ready for analysis, as explained in the enclosed *GeneChip Expression Analysis: Data Analysis Fundamentals* booklet (P/N 701190).

Reagents and Materials Required

The following reagents and materials have been tested and evaluated by Affymetrix scientists. Information and part numbers listed are based on U.S. catalog information. For supplier information, please refer to the Supplier Reference List in Appendix G of this manual.

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

  Stain Module, Box 1

  - Stain Cocktail 1
  - Stain Cocktail 2
  - Array Holding Buffer

  Wash Buffers A and B, Box 2

  - Wash Buffer A (P/N 900721)
  - Wash Buffer B (P/N 900722)

- RNase-free water

Miscellaneous Supplies

- Fluidics Station 450: Affymetrix, P/N 00-0079
- GeneChip® Scanner 3000: Affymetrix, P/N 00-00212
- Sterile, RNase-free, microcentrifuge vials, 1.5 mL: USA Scientific, P/N 1415-2600 (or equivalent)
- Sterile, RNase-free, microcentrifuge vials, 1.5 mL, amber: USA Scientific, P/N 1615-5507 (or equivalent)
- Micropipettors, (P-2, P-20, P-200, P-1000), Rainin Pipetman (or equivalent)
- Sterile-barrier pipette tips and non-barrier pipette tips
- Tygon Tubing, 0.04″ inner diameter: Cole-Parmer, P/N H-06418-04
- Tough-Spots™, Label Dots: USA Scientific, P/N 9185-0000
- Media Bottle, SQ, 1,000 mL: Affymetrix, P/N 400119
- Media Bottle, SQ, 500 mL (set of 3): Affymetrix, P/N 400118
- Bottle Cap, Pre-Drilled (set of 4): Affymetrix, P/N 400137

Experiment and Fluidics Station Setup

STEP 1: DEFINING FILE LOCATIONS

Before working with Affymetrix® Microarray Suite it is important to define where the program will store and look for files.

NOTE

For GeneChip® Operating Software (GCOS), this step is not necessary. Proceed directly to *Step 2: Entering Experiment Information*.

1. Launch Microarray Suite from the workstation and select **Tools → Defaults → File Locations** from the menu bar.
2. The File Locations window displays the locations of the following files:
   - Probe Information (library files, mask files)
   - Fluidics Protocols (fluidics station scripts)
   - Experiment Data (.exp, .dat, .cel, and .chp files are all saved to location selected here)
3. Verify that all three file locations are set correctly and click **OK**.

   Contact Affymetrix Technical Support if you have any questions regarding this procedure.

STEP 2: ENTERING EXPERIMENT INFORMATION

To wash, stain, and scan a probe array, an experiment must first be registered in GCOS or Microarray Suite. Please follow the instructions detailed in the *"Setting Up an Experiment"* section of the appropriate *GeneChip® Operating Software User's Guide* or *Microarray Suite User's Guide*.

The fields of information required for registering experiments in Microarray Suite are:

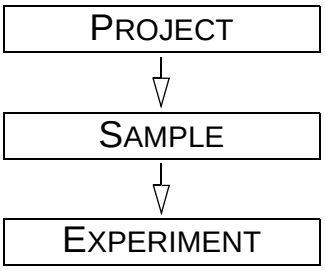
- Experiment Name
- Probe Array Type

In GCOS, three additional fields are required:

- Sample Name
- Sample Type
- Project

Sample templates, experiment templates, and array barcodes can also be employed in GCOS to standardize and simplify the registration process. Please see the GCOS User's Guide for more information.

The Project, Sample Name, and Experiment Name fields establish a sample hierarchy that organizes GeneChip gene expression data in GCOS. In terms of the organizational structure, the Project is at the top of the hierarchy, followed by Sample Name, and then Experiment Name.



STEP 3: PREPARING THE FLUIDICS STATION

The Fluidics Station 400, or 450/250 is used to wash and stain the probe arrays. It is operated using GCOS/Microarray Suite.

Setting Up the Fluidics Station

1. Turn on the Fluidics Station using the switch on the lower left side of the machine.
2. Select **Run** → **Fluidics** from the menu bar.

   The Fluidics Station dialog box appears with a drop-down list for selecting the experiment name for each of the fluidics station modules. A second list is accessed for choosing the Protocol for each of the four fluidics station modules.

NOTE **Refer to the appropriate *GeneChip® Fluidics Station User's Guide* for instructions on connecting and addressing multiple fluidics stations.**

Priming the Fluidics Station

Priming ensures that the lines of the fluidics station are filled with the appropriate buffers and the fluidics station is ready for running fluidics station protocols.

Priming should be done:

- When the fluidics station is first started
- When wash solutions are changed
- Before washing if a shutdown has been performed
- If the LCD window instructs the user to prime

1. Select **Protocol** in the Fluidics Station dialog box.
2. Choose **Prime** or **Prime_450** for the respective modules in the **Protocol** drop-down list.
3. Ensure that the designated Fluidics Station Wash A and Wash B media bottles are clean. Transfer **Wash Buffer A** and **Wash Buffer B** from the kit to the clean, empty Fluidics Station bottles.
4. If using Microarray Suite, click **Run** for each module to begin priming. If using GCOS, select the **All Modules** check box, then click **Run**.

Probe Array Wash and Stain

NOTE

The wash and stain procedure described below is different from previous recommended protocols. Closely adhere to the following recommendations for best results.

After 16 hours of hybridization remove the array from the hybridization oven. Vent the array by inserting a clean pipette tip into one of the septa, and extract the hybridization cocktail with a pipettor through the remaining septum. Refill the probe array completely with the appropriate volume of **Wash Buffer A**, as given in Table 6.1.

Table 6.1
Probe Array Cartridge Volumes for Wash Buffer A and Array Holding Buffer

Array	Total Fill Volume
49 Format (Standard)	250 µL
100 Format (Midi)	160 µL
169 Format (Mini)	100 µL

NOTE

If necessary, at this point, the probe array can be stored at 4°C for up to 3 hours before proceeding with washing and staining. Equilibrate the probe array to room temperature before washing and staining.

This procedure takes approximately 75 to 90 minutes to complete.

PREPARING THE STAIN REAGENTS

Prepare the following reagents. Volumes given are sufficient for one probe array.

1. Remove Stain **Cocktail** 1, **Stain Cocktail** 2, and **Array Holding Buffer** from the Stain Module, Box 1.
2. Gently tap the bottles to mix well.
3. Aliquot the following reagents:
   - **A.** 600 µL of **Stain Cocktail** 1 into a 1.5 mL amber microcentrifuge vial.
   - **B.** 600 µL of **Stain Cocktail** 2 into a 1.5 mL (clear) microcentrifuge vial.
   - **C.** 800 µL of **Array Holding Buffer** into a 1.5 mL (clear) microcentrifuge vial.
4. Spin down all vials to remove the presence of any air bubbles.

NOTE **Stain Cocktail 1 is light-sensitive. Please be sure to use amber microcentrifuge vials when aliquoting.**

IMPORTANT **The 600 µL of Stain Cocktail 1 will be used for the first and third stain. If using the Fluidics Station 400, after the first staining step is completed, save the vial with the Stain Cocktail 1 solution and reuse for the third staining step.**

For instructions on how to use the solutions and determining which Fluidics Script(s) fits your application, please follow the instructions for using the Fluidics Station 450/250, which can be found on page 98, or the instructions for using the Fluidics Station 400, which can be found on page 102.

USING THE FLUIDICS STATION 450/250

Washing and Staining the Probe Array

1. In the Fluidics Station dialog box on the workstation, select the correct experiment name from the drop-down **Experiment** list. The **Probe Array Type** appears automatically.

2. In the **Protocol** drop-down list, select the appropriate antibody amplification protocol to control the washing and staining of the probe array format being used: Table 6.2 and Table 6.3.

Table 6.2
Fluidics Protocols for Fluidics Station 450/250

	FS450_0006	Flex FS450_0002	Modified Flex FS450_0002 for *P. aeruginosa* Array*	FS450_0005
Array Format	169	100	100	49
Post Hyb Wash #1	10 cycles of 2 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 2 mixes/ cycle with Wash Buffer A at **30°C**	10 cycles of 2 mixes/ cycle with Wash Buffer A at **25°C**	10 cycles of 2 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 25°C
Post Hyb Wash #2	4 cycles of 15 mixes/ cycle with Wash Buffer B at 50°C	**6** cycles of 15 mixes/ cycle with Wash Buffer B at 50°C	**4** cycles of 15 mixes/ cycle with Wash Buffer B at 50°C	4 cycles of 15 mixes/ cycle with Wash Buffer B at 45°C
1st Stain	Stain the probe array for 300 seconds with Stain Cocktail 1 at 35°C	Stain the probe array for **300 seconds** with Stain Cocktail 1 at **35°C**	Stain the probe array for **600 seconds** with Stain Cocktail 1 at **25°C**	Stain the probe array for 600 seconds with Stain Cocktail 1 at 25°C.
Post Stain Wash	10 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 30°C
2nd Stain	Stain the probe array for 300 seconds with Stain Cocktail 2 at 35°C	Stain the probe array for **300 seconds** with Stain Cocktail 2 at **35°C**	Stain the probe array for **600 seconds** with Stain Cocktail 2 at **25°C**	Stain the probe array for 600 seconds with Stain Cocktail 2 at 25°C
3rd Stain	Stain the probe array for 300 seconds with Stain Cocktail 1 at 35°C	Stain the probe array for **300 seconds** with Stain Cocktail 1 at **35°C**	Stain the probe array for **600 seconds** with Stain Cocktail 1 at **25°C**	Stain the probe array for 600 seconds with Stain Cocktail 1 at 25°C.
Final Wash	15 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 35°C	15 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at **35°C**	15 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at **30°C**	15 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 30°
Array Holding Buffer	Fill the probe array with Array Holding Buffer	Fill the probe array with Array Holding Buffer	Fill the probe array with Array Holding Buffer	Fill the probe array with Array Holding Buffer

*Refer to Table 6.3 for instructions on how to modify Flex FS450_0002.

Table 6.3
Modification of Flex FS450_0002 for GeneChip® *P. aeruginosa* Array

GeneChip *P. aeruginosa* Genome Array requires a modification to the **Flex FS450_0002** protocol. See below for details.

The **Flex FS450_0002** fluidics protocol must be modified. Please follow the instructions carefully to make the modifications. Additionally, it is highly recommended that you save your new *P. aeruginosa* fluidics protocol under a different name to avoid confusion.

1. Modify and save the fluidics protocol for the assay:
   a. Modify the fluidics protocol by using **Tools → Edit Protocol** drop-down list and selecting **Flex FS450_0002** within the Protocol Name window.
   b. Change the following parameters: (Enter the new parameters by highlighting the default values and typing in the new values.)
      i) **Wash A1 Temperature** from 30°C to 25°C;
      ii) **Number of Wash B Cycles** from 6 to 4;
      iii) **Stain Temperature (C)** from 35°C to 25°C;
      iv) **First Stain Time (seconds)** from 300 to 600 seconds;
      v) **Second Stain Time (seconds)** from 300 to 600 seconds;
      vi) **Third Stain Time (seconds)** from 300 to 600 seconds; and
      vii) **Wash A3 Temperature** from 35°C to 30°C.
   c. Save the modified fluidics protocol by highlighting **Flex FS450_0002** within the Protocol Name window and typing over with an assigned protocol name (e.g., Pae_cDNA). Click **Save**. The new fluidics protocol should be present in the Protocol drop-down list and is used in the subsequent steps.
2. Select the name of the newly modified protocol (e.g., Pae_cDNA) from the **Protocol** drop-down list in the Fluidics Station dialog box. Select **Run** in the Fluidics Station dialog box to begin the washing and staining. Follow the instructions in the LCD window on the fluidics station.

   If you are unfamiliar with inserting and removing probe arrays from the fluidics station modules, please refer to the appropriate User's Guide for your GeneChip® Fluidics Station 450/250.

3. Choose **Run** in the Fluidics Station dialog box to begin the washing and staining. Follow the instructions in the LCD window on the fluidics station.

If you are unfamiliar with inserting and removing probe arrays from the fluidics station modules, please refer to the appropriate *Fluidics Station User's Guide*, or *Quick Reference Card* (P/N 08-0093 for the FS-450/250 fluidics stations).

4. Insert the appropriate probe array into the designated module of the fluidics station while the cartridge lever is down, or in the eject position. When finished, verify that the cartridge lever is returned to the up, or engaged, position.
5. Remove any microcentrifuge vial(s) remaining in the sample holder of the fluidics station module(s) being used.
6. Follow the instructions on the LCD window of the fluidics station by placing the three experiment sample vials (the microcentrifuge vials) into the sample holders 1, 2, and 3 on the fluidics station.
   A. Place one vial containing 600 µL **Stain Cocktail** 1 in sample holder 1.
   B. Place one vial containing 600 µL **Stain Cocktail** 2 in sample holder 2.
   C. Place one vial containing 800 µL of **Array Holding Buffer** in sample holder 3.
   D. Press down on the needle lever to snap needles into position and to start the run.

   The run begins. The Fluidics Station dialog box at the workstation terminal and the LCD window display the status of the washing and staining as the protocol progresses.
7. When the protocol is complete, the LCD window displays the message **EJECT & INSPECT CARTRIDGE**.
8. Remove the probe arrays from the fluidics station modules by first pressing down the cartridge lever to the eject position.
9. Check the probe array window for large bubbles or air pockets.
   - If the probe array has no large bubbles, it is ready to scan on the GeneArray® Scanner, or the GeneChip® Scanner 3000. Pull up on the cartridge lever to close the washblock and proceed to *Probe Array Scan* on page 107.
   - If bubbles are present, do the following:

     Return the probe array to the probe array holder. Follow instructions on the LCD window. Engage the washblock by gently pushing up on the cartridge lever to the engaged, or closed, position.

     The fluidics station will drain the probe array and then fill it with a fresh volume of **Array Holding Buffer**. When it is finished, the LCD window will display **EJECT AND INSPECT CARTRIDGE**. Again, remove the probe array and

inspect it for bubbles. If no bubbles are present, it is ready to scan. Pull up on the cartridge lever to close the washblock and proceed to *Probe Array Scan* on page 107.

If attempt to fill the probe array without bubbles is unsuccessful, the array should be filled manually with **Array Holding Buffer** using a micropipette. Excessive washing will result in a loss of signal intensity.

10. Keep the probe arrays at 4°C and in the dark until ready for scanning.
11. If there are no more samples to hybridize, shut down the fluidics station following the procedure in *Shutting Down the Fluidics Station* on page 109.

NOTE

For proper cleaning and maintenance of the fluidics station, including the bleach protocol, refer to the appropriate *GeneChip® Fluidics Station User's Guide* for instructions.

USING THE FLUIDICS STATION 400

Washing and Staining the Probe Array

1. In the Fluidics Station dialog box on the workstation, select the correct experiment name in the drop-down **Experiment** list. The probe array type will appear automatically.
2. In the **Protocol** drop-down list, select the appropriate antibody amplification protocol to control the washing and staining of the probe array format being used: Table 6.4 and Table 6.5.

Table 6.4
Fluidics Protocols for Fluidics Station 400

	Mini_prok2v1	FlexMidi_euk2v3	Modified FlexMidi_euk2v3 for *P. aeruginosa* Array*	ProkGE_WS2
Array Format	169	100	100	49
Post Hyb Wash #1	10 cycles of 2 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 2 mixes/ cycle with Wash Buffer A at **30°C**	10 cycles of 2 mixes/ cycle with Wash Buffer A at **25°C**	10 cycles of 2 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 25°C
Post Hyb Wash #2	4 cycles of 15 mixes/ cycle with Wash Buffer B at 50°C	**6** cycles of 15 mixes/ cycle with Wash Buffer B at 50°C	**4** cycles of 15 mixes/ cycle with Wash Buffer B at 50°C	4 cycles of 15 mixes/ cycle with Wash Buffer B at 45°C
1st Stain	Stain the probe array for 300 seconds with Stain Cocktail 1 at 35°C	Stain the probe array for **300 seconds** with Stain Cocktail 1 at **35°C**	Stain the probe array for **600 seconds** with Stain Cocktail 1 at **25°C**	Stain the probe array for 600 seconds with Stain Cocktail 1 at 25°C.
Post Stain Wash	10 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 30°C
2nd Stain	Stain the probe array for 300 seconds with Stain Cocktail 2 at 35°C	Stain the probe array for **300 seconds** with Stain Cocktail 2 at **35°C**	Stain the probe array for **600 seconds** with Stain Cocktail 2 at **25°C**	Stain the probe array for 600 seconds with Stain Cocktail 2 at 25°C
3rd Stain	Stain the probe array for 300 seconds with Stain Cocktail 3 at 35°C	Stain the probe array for **300 seconds** with Stain Cocktail 3 at **35°C**	Stain the probe array for **600 seconds** with Stain Cocktail 3 at **25°C**	Stain the probe array for 600 seconds with Stain Cocktail 3 at 25°C
Final Wash	15 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 35°C. The holding temperature is 25°C.	15 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at **35°C**. The holding temperature is 25°C.	15 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at **30°C**. The holding temperature is 25°C.	15 cycles of 4 mixes/ cycle with Wash Buffer A at 30°. The holding temperature is 25°C.
Array Holding Buffer	N/A - manual process	N/A - manual process	N/A - manual process	N/A - manual process

**Refer to Table 6.5 for instructions on how to modify FlexMidi_euk2v3.*

Table 6.5
Modification of FlexMidi_euk2v3 for GeneChip® *P. aeruginosa* Array

GeneChip *P. aeruginosa* Genome Array requires a modification to the **FlexMidi_euk2v3** protocol. See below for details.

The **FlexMidi_euk2v3** fluidics protocol must be modified. Please follow the instructions carefully to make the modifications. Additionally, it is highly recommended that you save your new *P. aeruginosa* fluidics protocol under a different name to avoid confusion.

1. Modify and save the fluidics protocol for the assay:
   a. Modify the fluidics protocol by using **Tools** → **Edit Protocol** drop-down list and selecting **FlexMidi_euk2v3** within the Protocol Name window.
   b. Change the following parameters: (Enter the new parameters by highlighting the default values and typing in the new values.)
      i) **Wash A1 Temperature** from 30°C to 25°C;
      ii) **Number of Wash B Cycles** from 6 to 4;
      iii) **Stain Temperature (C)** from 35°C to 25°C;
      iv) **First Stain Time (seconds)** from 300 to 600 seconds;
      v) **Second Stain Time (seconds)** from 300 to 600 seconds;
      vi) **Third Stain Time (seconds)** from 300 to 600 seconds; and
      vii) **Wash A3 Temperature** from 35°C to 30°C.
   c. Save the modified fluidics protocol by highlighting **FlexMidi_euk2v3** within the Protocol Name window and typing over with an assigned protocol name (e.g., Pae_cDNA). Click **Save**. The new fluidics protocol should be present in the Protocol drop-down list and is used in the subsequent steps.
2. Select the name of the newly modified protocol (e.g., Pae_cDNA) from the **Protocol** drop-down list in the Fluidics Station dialog box. Select **Run** in the Fluidics Station dialog box to begin the washing and staining. Follow the instructions in the LCD window on the fluidics station.

   If you are unfamiliar with inserting and removing probe arrays from the fluidics station modules, please refer to the appropriate User's Guide for your GeneChip® Fluidics Station 400.

3. Choose **Run** in the Fluidics Station dialog box to begin the washing and staining. Follow the instructions on the LCD window on the fluidics station.

   If you are unfamiliar with inserting and removing probe arrays from the fluidics station modules, please refer to the *Fluidics Station 400 User's Guide*, *Fluidics Station 400 Video In-Service CD* (P/N 900374), or *Quick Reference Card* (P/N 08-0072).

4. Insert the appropriate probe array into the designated module of the fluidics station while the cartridge lever is in the EJECT position. When finished, verify that the cartridge lever is returned to the ENGAGE position.

5. Remove any microcentrifuge tube remaining in the sample holder of the fluidics station module(s) being used.

6. When the LCD window indicates **LOAD 1ST STAIN**, place a microcentrifuge tube containing 600 µL of **Stain Cocktail** 1 into the sample holder, making sure that the metal sampling needle is in the tube with its tip near the bottom.

   The Fluidics Station dialog box and the LCD window display the status of the washing and staining as they progress.

7. When the LCD window indicates **LOAD 2ND STAIN**, replace the microcentrifuge vial containing the **Stain Cocktail** 1 with a microcentrifuge vial containing **Stain Cocktail** 2 into the sample holder, making sure that the metal sampling needle is in the vial with its tip near the bottom.

IMPORTANT !

Do not dispose the vial containing Stain Cocktail 1. Be sure to save the Stain Cocktail 1 vial for use in Step 8.

8. When the LCD window indicates **LOAD 3RD STAIN**, replace the microcentrifuge vial containing **Stain Cocktail** 2 with the saved microcentrifuge vial containing 600 µL of **Stain Cocktail** 1 (retained from the previous step) into the sample holder. Verify that the metal sampling needle is in the vial with its tip near the bottom.

   The Fluidics Station dialog box and the LCD window display the status of the washing and staining as they progress. When the wash is complete, the LCD window displays the message **EJECT CARTRIDGE**.

9. Remove microcentrifuge vial containing stain and replace with an empty microcentrifuge tube.
10. Remove the probe arrays from the fluidics station modules by first moving the cartridge lever to the **EJECT** position.
11. Fill the probe array manually with **Array Holding Buffer** as follows:

    A. Vent one of the septa with a clean pipette tip. Drain the **Wash Buffer A** from the remaining septum of the probe array using a micropipettor. Refill the array completely with **Array Holding Buffer**. Refer to Table 6.1 for the fill volume specific to the array type used.

    B. Inspect the array and ensure that no bubbles are present. The probe array is ready to be scanned on the GeneChip Scanner 3000 or the GeneArray Scanner.

    C. Pull up on the cartridge lever to engage wash board and proceed to *Probe Array Scan* on page 107.

    If you do not scan the arrays right away, keep the probe arrays at 4°C and in the dark until ready for scanning.

    If there are no more samples to hybridize, shut down the fluidics station following the procedure outlined in the section, *Shutting Down the Fluidics Station* on page 109.

NOTE

For proper cleaning and maintenance of the fluidics station, including the bleach protocol, refer to the appropriate *GeneChip® Fluidics Station User's Guide* for instructions.

Probe Array Scan

The scanner is also controlled by Affymetrix Microarray Suite or GCOS. The probe array is scanned after the wash protocols are complete. Make sure the laser is warmed up prior to scanning by turning it on at least 15 minutes before use if you are using the Agilent GeneArray® Scanner, or 10 minutes if you are using the GeneChip® Scanner 3000. If the probe array was stored at 4°C, warm to room temperature before scanning. Refer to the Microarray Suite or GCOS online help and the appropriate scanner user's manual for more information on scanning.

WARNING ▲ **The scanner uses a laser and is equipped with a safety interlock system. Defeating the interlock system may result in exposure to hazardous laser light.**

NOTE **You must have read and be familiar with the operation of the scanner before attempting to scan a probe array. Please refer to the *Microarray Suite User's Guide* (P/N 08-0081), *GeneChip Operating Software User's Guide* (P/N 701439), or to the *GeneChip® Scanner 3000 Quick Reference Card* (P/N 08-0075).**

HANDLING THE GENECHIP® PROBE ARRAY

Before you scan the probe array, follow the directions in this section on handling the probe array. If necessary, clean the glass surface of the probe array with a non-abrasive towel or tissue before scanning. Do not use alcohol to clean glass.

Before scanning the probe array cartridge, follow this procedure to apply Tough-Spots™ to the probe array cartridge to prevent the leaking of fluids from the cartridge during scanning.

IMPORTANT ! **Apply the spots just before scanning.**

1. On the back of the probe array cartridge, clean excess fluid from around septa.
2. Carefully apply one Tough-Spot to each of the two septa. Press to ensure that the spots remain flat. If the Tough-Spots do not apply smoothly; that is, if you observe bumps, bubbles, tears or curled

edges, do not attempt to smooth out the spot. Remove the spot and apply a new spot. See Figure 6.1.

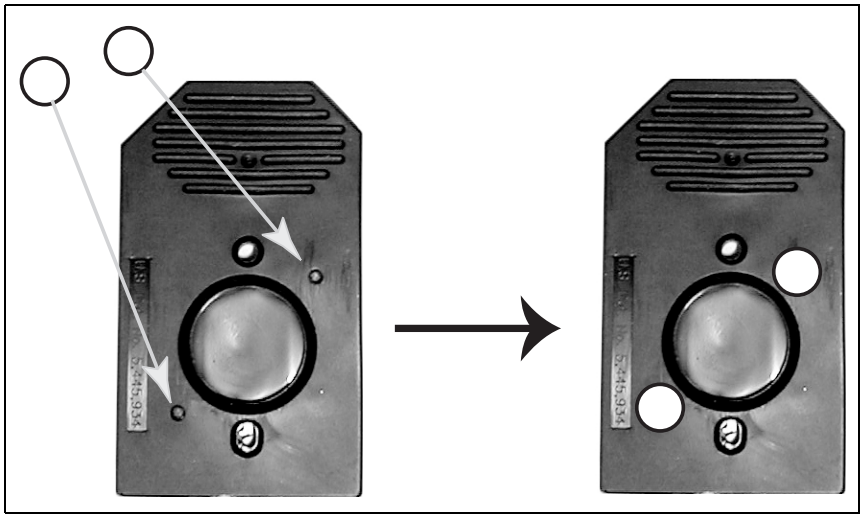


Figure 6.1
Applying Tough-Spots™ to the Probe Array Cartridge

3. Insert the cartridge into the scanner and test the autofocus to ensure that the Tough-Spots do not interfere with the focus. If you observe a focus error message, remove the spot and apply a new spot. Ensure that the spots lie flat.

SCANNING THE PROBE ARRAY

1. Select **Run** → **Scanner** from the menu bar. Alternatively, click the Start Scan icon in the tool bar.

   The Scanner dialog box appears with a drop-down list of experiments that have not been run.

2. Select the experiment name that corresponds to the probe array to be scanned.

   A previously run experiment can also be selected by using the **Include Scanned Experiments** option box. After selecting this option, previously scanned experiments appear in the drop-down list.

3. By default, for the GeneArray® Scanner only, after selecting the experiment the number [2] is displayed in the **Number of Scans** box to perform the recommended 2X image scan. For the GeneChip® Scanner 3000, only one scan is required.

4. Once the experiment has been selected, click the **Start** button.

   A dialog box prompts you to load a sample into the scanner.

5. If you are using the GeneArray® Scanner, click the **Options** button to check for the correct pixel value and wavelength of the laser beam.

   - Pixel value = 3 µm
   - Wavelength = 570 nm

   If you are using the GeneChip Scanner 3000, pixel resolution and wavelength are preset and cannot be changed.

6. Open the sample door on the scanner and insert the probe array into the holder. Do not force the probe array into the holder. Close the sample door of the scanner. If you are using the GeneChip Scanner 3000, do not attempt to close the door by hand. The door closes automatically through the User Interface when start scan is selected or the scanner goes into stand-by mode.

7. Click **OK** in the Start Scanner dialog box.

The scanner begins scanning the probe array and acquiring data. When Scan in Progress is Selected from the **View** menu, the probe array image appears on the screen as the scan progresses.

Shutting Down the Fluidics Station

1. After removing a probe array from the probe array holder, the LCD window displays the message **ENGAGE WASHBLOCK.**

2. If you are using the FS-400, latch the probe array holder by gently pushing up until a light click is heard. Engage the washblock by firmly pushing up on the cartridge lever to the **ENGAGE** position.

   If you are using the FS-450, gently lift up the cartridge lever to engage, or close, the washblock.

   The fluidics station automatically performs a Cleanout procedure. The LCD window indicates the progress of the Cleanout procedure.

3. When the fluidics station LCD window indicates **REMOVE VIALS**, the Cleanout procedure is complete.

4. Remove the sample microcentrifuge vial(s) from the sample holder(s).

5. If no other hybridizations are to be performed, place wash lines into a bottle filled with deionized water.
6. Select **Shutdown** or **Shutdown_450** for all modules from the drop-down **Protocol** list in the Fluidics Station dialog box. Click the **Run** button for all modules.

   The Shutdown protocol is critical to instrument reliability. Refer to the appropriate *Fluidics Station User's Guide* for more information.
7. After Shutdown protocol is complete, flip the ON/OFF switch of the fluidics station to the OFF position.

IMPORTANT !

To maintain the cleanliness of the fluidics station and obtain the highest quality image and data possible, a weekly bleach protocol and a monthly decontamination protocol are highly recommended. Please refer to the appropriate *GeneChip® Fluidics Station User's Guide* for further detail.

Customizing the Protocol

There may be times when the fluidics protocols need to be modified. Modification of protocols must be done before downloading the protocol to the fluidics station. Protocol changes will not affect runs in progress. For more specific instructions, refer to the Microarray Suite/ GCOS online help.

1. Select **Tools** → **Edit Protocol** from the menu bar.
2. In the Edit Protocol dialog box under Protocol Name, click the arrow to open a list of protocols. Click the protocol to be changed.

   The name of the protocol is displayed in the **Protocol Name** text box. The conditions for that protocol are displayed on the right side of the Edit Protocol dialog box.
3. Select the items to be changed and input the new parameters as needed, keeping parameters within the ranges shown below in Table 6.6.

Table 6.6
Valid Ranges for Wash/Stain Parameters

Parameter	Valid Range
Wash Temperature for A1, B, A2, or A3 (°C)	15 to 50
Number of Wash Cycles for A1, B, A2, or A3	0 to 99
Mixes / Wash Cycle for A1, B, A2, or A3	1 to 99
Stain Time (seconds)	0 to 86,399
Stain Temperature (°C)	15 to 50
Holding Temperature (°C)	15 to 50
• Wash A1 corresponds to Post Hyb Wash #1 in Table 6.2 and Table 6.4. • Wash B corresponds to Post Hyb Wash #2 in Table 6.2 and Table 6.4. • Wash A2 corresponds to Post Stain Wash in Table 6.2 and Table 6.4. • Wash A3 corresponds to Final Wash in Table 6.2 and Table 6.4.	

   Enter **0** (zero) for hybridization time if hybridization step is not required. Likewise, enter **0** (zero) for the stain time if staining is not required. Enter **0** (zero) for the number of wash cycles if a wash step is not required.
4. To return to the default values for the protocol selected, click the **Defaults** button.

5. Once all the protocol conditions are modified as desired, change the name of the edited protocol in the **Protocol Name** box.

CAUTION

If the protocol is saved without entering a new "Protocol Name," the original protocol parameters will be overwritten.

6. Click **Save**, then close the dialog box.

Appendix A

Alternative Protocols for One-Cycle cDNA Synthesis

Appendix A

Appendix Contents

Reagents and Materials Required 115
Alternative Protocol for One-Cycle cDNA Synthesis from Total RNA 116
Alternative Protocol for One-Cycle cDNA Synthesis from Purified Poly-A mRNA 119

Reagents and Materials Required

The following reagents and materials are recommendations and have been tested and evaluated by Affymetrix scientists. Information and part numbers listed are based on U.S. catalog information. For supplier information, please refer to the Supplier Reference List in Appendix G of this manual.

- GeneChip® T7-Oligo(dT) Promoter Primer Kit, 5´ - GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-$(dT)_{24}$ - 3´ 50 µM, HPLC purified: Affymetrix, P/N 900375
- SuperScript™ II: Invitrogen Life Technologies, P/N 18064-014 or SuperScript Choice System for cDNA Synthesis: Invitrogen Life Technologies, P/N 18090-019.

NOTE

SuperScript Choice System contains, in addition to SuperScript II Reverse Transcriptase, other reagents for cDNA synthesis. However, not all components provided in the Choice System are used in the GeneChip cDNA synthesis protocol.

- *E. coli* DNA Ligase: Invitrogen Life Technologies, P/N 18052-019
- *E. coli* DNA Polymerase I: Invitrogen Life Technologies, P/N 18010-025
- *E. coli* RNase H: Invitrogen Life Technologies, P/N 18021-071
- T4 DNA Polymerase: Invitrogen Life Technologies, P/N 18005-025
- 5X Second-strand buffer: Invitrogen Life Technologies, P/N 10812-014
- 10 mM dNTP: Invitrogen Life Technologies, P/N 18427-013
- 0.5M EDTA

Alternative Protocol for One-Cycle cDNA Synthesis from Total RNA

This protocol is a supplement to instructions provided in the Invitrogen Life Technologies SuperScript Choice system. Please note the following before proceeding:

- Read all information and instructions that come with reagents and kits.
- Use the GeneChip T7-Oligo(dT) Promoter Primer Kit[1] for priming first-strand cDNA synthesis in place of the oligo(dT) or random primers provided with the SuperScript Choice kit. The GeneChip T7-Oligo(dT) Promoter Primer Kit provides high-quality HPLC-purified T7-Oligo(dT) Primer, which is essential for this reaction.

T7-Oligo(dT) Primer

5´ - GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-$(dT)_{24}$ - 3´

STEP 1: FIRST-STRAND cDNA SYNTHESIS

Starting material: High-quality total RNA (5.0 µg to 20.0 µg)

NOTE **When using the GeneChip Sample Cleanup Module for the cDNA and IVT cRNA cleanup steps, there is a potential risk of overloading the columns if greater than the recommended amount of starting material is used.**

After purification, the RNA concentration is determined by absorbance at 260 nm on a spectrophotometer (one absorbance unit = 40 µg/mL RNA). The A_{260}/A_{280} ratio should be approximately 2.0, with ranges between 1.9 to 2.1 considered acceptable. We recommend checking the quality of the RNA by running it on an agarose gel prior to starting the assay. The rRNA bands should be clear without any obvious smearing patterns from degradation.

Before starting cDNA synthesis, the correct volumes of DEPC-treated H_2O and Reverse Transcriptase (RT) must be determined. These volumes will depend on both the concentration and total volume of RNA that is being added to the reaction.

[1] *Users who do not purchase the GeneChip T7-Oligo(dT) Promoter Primer Kit may be required to obtain a license under U.S. Patent Nos. 5,716,785, 5,891,636, 6,291,170, and 5,545,522 or to purchase another licensed kit.*

IMPORTANT !

Use Table A.1 and Table A.2 for variable component calculations. Determine the volumes of RNA and SuperScript II RT required in Table A.1, then calculate the amount of DEPC-treated H_2O needed in Step 1 Table A.2 to bring the final First-Strand Synthesis volume to 20 µL.

Table A.1
Reverse Transcriptase Volumes for First-Strand cDNA Synthesis Reaction

Total RNA (µg)	SuperScript II RT (µL), 200 U/µL
5.0 to 8.0	1.0
8.1 to 16.0	2.0
16.1 to 20.0	3.0

NOTE

The combined volume of RNA, DEPC-treated H_2O and SuperScript II RT should not exceed 11 µL as indicated in Table A.2.

Table A.2
First-Strand cDNA Synthesis Components

	Reagents in Reaction	Volume	Final Dilution or Amount in Reaction
1: Primer Hybridization Incubate at 70°C for 10 minutes. Quick spin and put on ice	DEPC-treated H_2O (variable) T7-Oligo(dT) Primer, 50 µM RNA (variable)	for final reaction volume of 20 µL 2 µL 5.0 to 20 µg	 100 pmol 5.0 to 20 µg
2: Temperature Adjustment Add to the above tube and mix well Incubate at **42°C** for 2 minutes	5X First-Strand cDNA buffer 0.1M DTT 10 mM dNTP mix	4 µL 2 µL 1 µL	1X 10 mM DTT 500 µM each
3: First-Strand Synthesis Add to the above tube and mix well Incubate at **42°C** for 1 hr	SuperScript II RT (variable) (200 U/µL)	See Table A.1	200U to 600U
Total Volume		20 µL	

NOTE

The above incubations have been changed from the SuperScript protocols and are done at 42°C.

STEP 2: SECOND-STRAND cDNA SYNTHESIS

1. Place First-Strand reactions on ice. Centrifuge briefly to bring down condensation on sides of tube.
2. Add to the First-Strand synthesis tube the reagents listed in the following Second-Strand Final Reaction Composition Table (Table A.3).

Table A.3
Second-Strand Final Reaction Composition

Component	Volume	Final Dilution or Amount in Reaction
DEPC-treated water	91 µL	
5X Second-Strand Reaction Buffer	30 µL	1X
10 mM dNTP mix	3 µL	200 µM each
10 U/µL *E. coli* DNA Ligase	1 µL	10U
10 U/µL *E. coli* DNA Polymerase I	4 µL	40U
2 U/µL *E. coli* RNase H	1 µL	2U
Total Volume	150 µL	

3. Gently tap tube to mix. Then, briefly spin in a microcentrifuge to remove condensation and incubate at 16°C for 2 hours in a cooling waterbath.
4. Add 2 µL [10U] T4 DNA Polymerase.
5. Return to 16°C for 5 minutes.
6. Add 10 µL 0.5M EDTA.
7. Proceed to cleanup procedure for cDNA, *Cleanup of Double-Stranded cDNA for Both the One-Cycle and Two-Cycle Target Labeling Assays* on page 48, or store at –20°C for later use.

Alternative Protocol for One-Cycle cDNA Synthesis from Purified Poly-A mRNA

This protocol is a supplement to instructions provided in the Invitrogen Life Technologies SuperScript Choice system. Please note the following before proceeding:

- Read all information and instructions that come with reagents and kits.
- Use the GeneChip T7-Oligo(dT) Promoter Primer Kit[1] for priming first-strand cDNA synthesis in place of the oligo(dT) or random primers provided with the SuperScript Choice kit. The GeneChip T7-Oligo(dT) Promoter Primer Kit provides high-quality HPLC-purified T7-Oligo(dT) Primer, which is essential for this reaction.
- It is recommended that each step of this protocol is checked by gel electrophoresis.

T7-Oligo(dT) Primer

5´ - GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-$(dT)_{24}$ - 3´

STEP 1: FIRST-STRAND cDNA SYNTHESIS

Starting material: High-quality poly-A mRNA (0.2 µg to 2.0 µg).

NOTE

When using the GeneChip Sample Cleanup Module for the cDNA and IVT cRNA cleanup steps, there is a potential risk of overloading the columns if greater than the recommended amount of starting material is used.

Before starting cDNA synthesis, the correct volumes of DEPC-treated H_2O and Reverse Transcriptase (RT) must be determined. These volumes will depend on both the concentration and total volume of mRNA that is being added to the reaction. For every µg of mRNA, you will need to add 1 µL of SuperScript II RT (200 U/µL). For mRNA quantity ≤ 1 µg, use 1 µL of SuperScript II RT. Synthesis reactions should be done in a polypropylene tube (RNase-free).

[1] *Users who do not purchase the GeneChip T7-Oligo(dT) Promoter Primer Kit may be required to obtain a license under U.S. Patent Nos. 5,716,785, 5,891,636, 6,291,170, and 5,545,522 or to purchase another licensed kit.*

IMPORTANT !

Use Table A.4 for variable component calculations. Determine volumes of mRNA and SuperScript II RT required, and then calculate the amount of DEPC-treated H_2O needed in the Primer Hybridization Mix step to bring the final First-Strand Synthesis reaction volume to 20 µL.

Table A.4
First-Strand cDNA Synthesis Components

	Reagents in Reaction	Volume	Final Dilution or Amount in Reaction
1: Primer Hybridization Incubate at 70°C for 10 minutes Quick spin and put on ice	DEPC-treated H_2O (variable) T7-Oligo(dT) Primer, 50 µM mRNA (variable)	for final reaction volume of 20 µL 2 µL 0.2 to 2 µg	 100 pmol 0.2 to 2 µg
2: Temperature Adjustment Add to the above tube and mix well Incubate at 37°C for 2 minutes	5X First-Strand cDNA buffer 0.1M DTT 10 mM dNTP mix	4 µL 2 µL 1 µL	1X 10 mM 500 µM each
3: First-Strand Synthesis Add to the above tube and mix well Incubate at 37°C for 1 hour	SuperScript II RT (variable) (200 U/µL)	1 µL per µg mRNA	200U to 400U
Total Volume		20 µL	

STEP 2: SECOND-STRAND cDNA SYNTHESIS

1. Place First-Strand reactions on ice. Centrifuge briefly to bring down condensation on sides of tube.
2. Add to the First-Strand synthesis tube the reagents listed in the following Second-Strand Final Reaction Composition Table (Table A.5).

Table A.5
Second-Strand Final Reaction Composition

Component	Volume	Final Dilution or Amount in Reaction
DEPC-treated water	91 µL	
5X Second-Strand Reaction Buffer	30 µL	1X
10 mM dNTP mix	3 µL	200 µM each
10 U/µL *E. coli* DNA Ligase	1 µL	10U
10 U/µL *E. coli* DNA Polymerase I	4 µL	40U
2 U/µL *E. coli* RNase H	1 µL	2U
Total Volume	150 µL	

3. Gently tap tube to mix. Then, briefly spin in a microcentrifuge to remove condensation and incubate at 16°C for 2 hours in a cooling waterbath.
4. Add 2 µL [10 U] T4 DNA Polymerase.
5. Return to 16°C for 5 minutes.
6. Add 10 µL 0.5M EDTA.
7. Proceed to cleanup procedure for cDNA, *Cleanup of Double-Stranded cDNA for Both the One-Cycle and Two-Cycle Target Labeling Assays* on page 48, or store at –20°C for later use.

Appendix B

Alternative Protocol for Eukaryotic Target Hybridization

Appendix B

Appendix Contents

Introduction and Objectives 126
Reagents and Materials Required 127
Reagent Preparation 128
Eukaryotic Target Hybridization 129

This Appendix Contains:

- Introduction and objectives for information provided in this Appendix.
- Detailed steps for preparing the eukaryotic hybridization mix containing labeled target and control cRNA.
- Instructions for hybridizing the target mix to a eukaryotic GeneChip® probe array.

After completing the procedures described in this chapter, the hybridized probe array is ready for washing, staining, and scanning, as detailed in the *GeneChip® Expression Wash, Stain and Scan User Manual*, P/N 702731.

Introduction and Objectives

Affymetrix offers a complete set of GeneChip reagents developed specifically for use with GeneChip® 3' eukaryotic arrays in cartridge format and GeneChip® prokaryotic arrays in cartridge format. GeneChip® reagent kits include the One- and Two-Cycle cDNA Synthesis Kits, IVT Labeling Kits, Sample Cleanup Modules, and Hybridization, Wash, and Stain Kits. For best results, it is highly recommended that all GeneChip reagents are used for target preparation, hybridization, wash, and staining when using GeneChip arrays.

The information and protocols described in this Appendix have been provided by Affymetrix in previous revisions of the *GeneChip® Expression Analysis Technical Manual* describing hybridization, wash, and staining procedures for GeneChip 3' eukaryotic arrays in cartridge format. These protocols should be closely followed when the GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit is not used.

Reagents and Materials Required

The following reagents and materials are recommendations and have been tested and evaluated by Affymetrix scientists. Information and part numbers listed are based on U.S. catalog information. For supplier information, please refer to the Supplier Reference List in Appendix G of this manual.

- Water, Molecular Biology Grade: Cambrex, P/N 51200
- Bovine Serum Albumin (BSA) solution (50 mg/mL): Invitrogen Life Technologies, P/N 15561-020
- Herring Sperm DNA: Promega Corporation, P/N D1811
- GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit: Affymetrix, P/N 900454 (30 reactions) or P/N 900457 (150 reactions), contains Control cRNA and Control Oligo B2
- Control Oligo B2, 3 nM: Affymetrix, P/N 900301 (can be ordered separately)
- 5 M NaCl, RNase-free, DNase-free: Ambion, P/N 9760G
- MES hydrate SigmaUltra: Sigma-Aldrich, P/N M5287
- MES Sodium Salt: Sigma-Aldrich, P/N M5057
- EDTA Disodium Salt, 0.5 M solution (100 mL): Sigma-Aldrich, P/N E7889
- DMSO: Sigma-Aldrich, P/N D5879
- Surfact-Amps 20 (Tween-20), 10%: Pierce Chemical, P/N 28320

Miscellaneous Supplies

- Hybridization Oven 640: Affymetrix, P/N 800138 (110V) or 800139 (220V)
- Sterile, RNase-free, microcentrifuge vials, 1.5 mL: USA Scientific, P/N 1415-2600 (or equivalent)
- Micropipettors, (P-2, P-20, P-200, P-1000): Rainin Pipetman (or equivalent)
- Sterile-barrier pipette tips and non-barrier pipette tips
- Heatblock

Reagent Preparation

12X MES Stock Buffer

(1.22 M MES, 0.89M [Na^+])

For 1,000 mL:

64.61 g of MES hydrate

193.3 g of MES Sodium Salt

800 mL of Molecular Biology Grade water

Mix and adjust volume to 1,000 mL.

The pH should be between 6.5 and 6.7. Filter through a 0.2 µm filter.

IMPORTANT ! **Do not autoclave. Store at 2°C to 8°C, and shield from light. Discard solution if yellow.**

2X Hybridization Buffer

(Final 1X concentration is 100 mM MES, 1 M [Na^+], 20 mM EDTA, 0.01% Tween-20)

For 50 mL:

8.3 mL of 12X MES Stock Buffer

17.7 mL of 5 M NaCl

4.0 mL of 0.5 M EDTA

0.1 mL of 10% Tween-20

19.9 mL of water

Store at 2°C to 8°C, and shield from light

Eukaryotic Target Hybridization

Please refer to Table B.1 for the necessary amount of cRNA required for appropriate probe array format. These recipes take into account that it is necessary to make extra hybridization cocktail due to a small loss of volume (10 to 20 µL) during each hybridization.

1. Mix the following for each target, scaling up volumes for hybridization to multiple probe arrays.

IMPORTANT ! **If using the GeneChip IVT Labeling Kit to prepare the target, a final concentration of 10% DMSO needs to be added in the hybridization cocktail for optimal results.**

Table B.1
Hybridization Cocktail for Single Probe Array*

Component	49 Format (Standard) / 64 Format Array	100 Format (Midi) Array	169 Format (Mini) Array / 400 Format (Micro) Array	Final Dilution
Fragmented cRNA†	15 µg	10 µg	5 µg	0.05 µg/µL
Control Oligonucleotide B2 (3 nM)	5 µL	3.3 µL	1.7 µL	50 pM
20X Eukaryotic Hybridization Controls (*bioB*, *bioC*, *bioD*, *cre*)	15 µL	10 µL	5 µL	1.5, 5, 25, and 100 pM respectively
2X Hybridization Buffer	150 µL	100 µL	50 µL	1X
Herring Sperm DNA (10 mg/mL)	3 µL	2 µL	1 µL	0.1 mg/mL
BSA (50 mg/mL)	3 µL	2 µL	1 µL	0.5 mg/mL
DMSO‡	30 µL	20 µL	10 µL	10%
H_2O	to final volume of 300 µL	to final volume of 200 µL	to final volume of 100 µL	
Total Volume	300 µL	200 µL	100 µL	

Please refer to specific probe array package insert for information on array format.

†*Please see Chapter 2, for amount of adjusted fragmented cRNA to use when starting from total RNA.*

‡*Note that the addition of DMSO is different from previous recommendations. Follow this protocol for best results on arrays when using the GeneChip IVT Labeling Kit.*

IMPORTANT !

It is imperative that frozen stocks of 20X GeneChip Eukaryotic Hybridization Controls are heated to 65°C for 5 minutes to completely resuspend the cRNA before aliquotting.

2. Equilibrate probe array to room temperature immediately before use.

NOTE

It is important to allow the arrays to equilibrate to room temperature completely. Specifically, if the rubber septa are not equilibrated to room temperature, they may be prone to cracking, which can lead to leaks.

3. Heat the hybridization cocktail to 99°C for 5 minutes in a heat block.
4. Meanwhile, wet the array by filling it through one of the septa (see Figure B.1 for location of the probe array septa) with appropriate volume of 1X Hybridization Buffer using a micropipettor and appropriate tips Table B.2.

NOTE

It is necessary to use two pipette tips when filling the probe array cartridge: one for filling and the second to allow venting of air from the hybridization chamber.

5. Incubate the probe array filled with 1X Hybridization Buffer at 45°C for 10 minutes with rotation.

Table B.2
Probe Array Cartridge Volumes

Array	Hybridization Volume	Total Fill Volume
49 Format (Standard)	200 µL	250 µL
64 Format	200 µL	250 µL
100 Format (Midi)	130 µL	160 µL
169 Format (Mini)	80 µL	100 µL
400 Format (Micro)	80 µL	100 µL

6. Transfer the hybridization cocktail that has been heated at 99°C, in step 3, to a 45°C heat block for 5 minutes.
7. Spin hybridization cocktail(s) at maximum speed in a microcentrifuge for 5 minutes to remove any insoluble material from the hybridization mixture.
8. Remove the buffer solution from the probe array cartridge and fill with appropriate volume Table B.2 of the clarified hybridization cocktail, avoiding any insoluble matter at the bottom of the tube.
9. Place probe array into the Hybridization Oven, set to 45°C.

   Avoid stress to the motor; load probe arrays in a balanced configuration around the axis. Rotate at 60 rpm.
10. Hybridize for 16 hours.

    During the latter part of the 16-hour hybridization, proceed to the *GeneChip® Expression Wash, Stain and Scan User Manual*, P/N 702731, to prepare reagents required immediately after completion of hybridization.

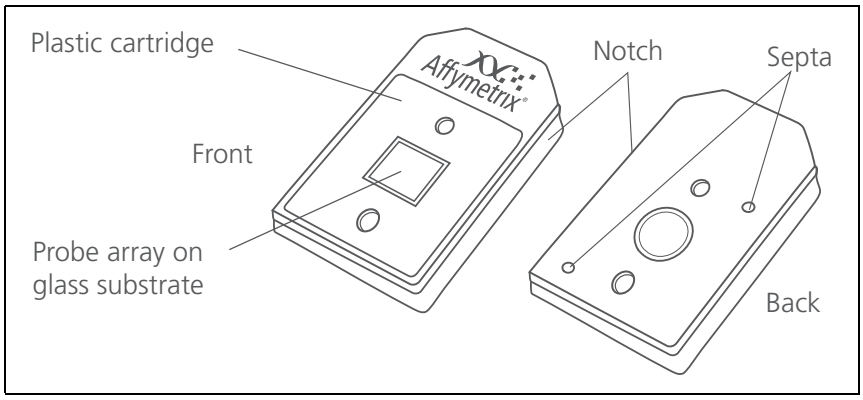


Figure B.1
GeneChip® Probe Array

Appendix C

Alternative Protocol for Prokaryotic Target Hybridization

Appendix C

Appendix Contents

Introduction and Objectives 135
Reagents and Materials Required 136
Reagent Preparation 137
Prokaryotic Target Hybridization 138

This Appendix Contains:

- Introduction and objectives for information provided in this Appendix.
- Steps for preparing the hybridization mix, and instructions for hybridizing the target mix to the GeneChip® *P. aeruginosa* Genome Array and GeneChip® *E. coli* arrays. The hybridized probe array is then ready for washing, staining, and scanning as detailed in Appendix D.

Introduction and Objectives

Affymetrix offers a complete set of GeneChip reagents developed specifically for use with GeneChip® 3' eukaryotic arrays in cartridge format and GeneChip® prokaryotic arrays in cartridge format. GeneChip® reagent kits include the One- and Two-Cycle cDNA Synthesis Kits, IVT Labeling Kits, Sample Cleanup Modules, and Hybridization, Wash, and Stain Kits. For best results, it is highly recommended that all GeneChip reagents are used for target preparation, hybridization, wash, and staining when using GeneChip arrays.

The information and protocols described in this Appendix have been provided by Affymetrix in previous revisions of the *GeneChip® Expression Analysis Technical Manual* describing hybridization, wash, and staining procedures for GeneChip prokaryotic arrays in cartridge format. These protocols should be closely followed when the GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit is not used.

Reagents and Materials Required

The following reagents and materials are recommendations and have been tested and evaluated by Affymetrix scientists. Information and part numbers listed are based on U.S. catalog information. For supplier information, please refer to the Supplier Reference List in Appendix G of this manual.

- Water, Molecular Biology Grade: Cambrex, P/N 51200
- Bovine Serum Albumin (BSA) solution, 50 mg/mL: Invitrogen Life Technologies, P/N 15561-020
- Herring Sperm DNA: Promega Corporation, P/N D1811
- Control Oligo B2, 3 nM: Affymetrix, P/N 900301 (can be ordered separately)
- NaCl, 5M, RNase-free, DNase-free: Ambion, P/N 9760G
- MES hydrate SigmaUltra: Sigma-Aldrich, P/N M5287
- MES Sodium Salt: Sigma-Aldrich, P/N M5057
- EDTA Disodium Salt, 0.5M solution (100 mL): Sigma-Aldrich, P/N E7889

Miscellaneous Reagents

- 100% DMSO: Sigma-Aldrich, P/N D2650
- Surfact-Amps 20 (Tween-20), 10%: Pierce Chemical, P/N 28320

Miscellaneous Supplies

- Hybridization Oven 640: Affymetrix, P/N 800138 (110V) or 800139 (220V)
- Sterile, RNase-free, microcentrifuge vials, 1.5 mL: USA Scientific, P/N 1415-2600 (or equivalent)
- Micropipettors, (P-2, P-20, P-200, P-1000): Rainin Pipetman (or equivalent)
- Sterile-barrier pipette tips and non-barrier pipette tips

Reagent Preparation

12X MES Stock Buffer

(1.22M MES, 0.89 M [Na^+])

For 1,000 mL:

64.61 g of MES hydrate

193.3 g of MES Sodium Salt

800 mL of Molecular Biology Grade water

Mix and adjust volume to 1,000 mL.

The pH should be between 6.5 and 6.7. Filter through a 0.2 µm filter.

IMPORTANT !

Do not autoclave, store at 2°C to 8°C, and shield from light. Discard solution if yellow.

2X Hybridization Buffer (50 mL)

(Final 1X concentration is 100mM MES, 1 M [Na^+], 20 mM EDTA, 0.01% Tween-20)

For 50 mL:

8.3 mL of 12X MES Stock Buffer

17.7 mL of 5 M NaCl

4.0 mL of 0.5 M EDTA

0.1 mL of 10% Tween-20

19.9 mL of water

Store at 2°C to 8°C, and shield from light.

Prokaryotic Target Hybridization

After determining that the fragmented cDNA is labeled with biotin, prepare the hybridization solution mix. The minimum amount of cDNA product required for target hybridization is 1 µg. The solution is stable for approximately 6 to 8 hours at 4°C. The following protocol can be used for freshly prepared or frozen hybridization cocktail. Re-use of prokaryotic sample has not been thoroughly tested and, therefore, is not recommended.

1. Prepare the following hybridization solution mix.

Table C.1
Hybridization Cocktail for Single Probe Array*

Component	49 Format (Standard)	100 Format (Midi)	169 Format (Mini)	Final Dilution or Amount
Fragmented and Labeled cDNA	Up to 50 µL	Up to 50 µL	25 µL	0.5 – 7.0 µg
Control Oligonucleotide B2 (3 nM)	3.3 µL	2.2 µL	1.3 µL	50 pM
2X Hybridization Buffer	100 µL	65 µL	40 µL	1X
100% DMSO	–	10.2 µL	6.2 µL	7.8% (or 0%)
10 mg/mL Herring Sperm DNA	2.0 µL	1.3 µL	0.8 µL	0.1 mg/mL
50 mg/mL BSA	2.0 µL	1.3 µL	0.8 µL	0.5 mg/mL
Molecular Biology Grade Water	42.7 µL	–	5.9 µL	
Total Volume	200 µL	130 µL	80 µL	

**Please refer to specific probe array package insert for information on array format.*

2. Equilibrate probe array to room temperature immediately before use.

NOTE

It is important to allow the arrays to normalize to room temperature completely. Specifically, if the rubber septa are not equilibrated to room temperature, they may be prone to cracking, which leads to leaks.

3. Add the indicated amount of hybridization solution mix to the probe array. Refer to specific probe array package insert for information on array format.

NOTE

It is necessary to use two pipette tips when filling the probe array cartridge: one for filling and the second to allow venting of air from the hybridization chamber.

4. Place probe array in the hybridization oven set at the temperatures indicated below.
   - *P. aeruginosa* Array 50°C
   - *E. coli Antisense* arrays 45°C

NOTE

The hybridization temperature of 50°C is higher than that used for other expression assays. The increased hybridization temperature is required due to the high GC content of *P. aeruginosa*.

5. Avoid stress to the motor; load probe arrays in a balanced configuration around axis. Rotate at 60 rpm.
6. Hybridize for 16 hours.

   During the latter part of the 16-hour hybridization, proceed to Appendix D, *Alternative Protocol for Prokaryotic Arrays: Washing, Staining and Scanning* to prepare reagents required immediately after completion of hybridization.

Appendix D

Alternative Protocol for Prokaryotic Arrays: Washing, Staining and Scanning

Appendix D

Appendix Contents

Introduction and Objectives 144
Reagents and Materials Required 145
Reagent Preparation 146
Experiment and Fluidics Station Setup 147
Step 1: Defining File Locations 147
Step 2: Entering Experiment Information 148
Step 3: Preparing the Fluidics Station 149
Probe Array Wash and Stain 150
Using the Fluidics Station 450/250 155
Using the Fluidics Station 400 157
Probe Array Scan 159
Handling the GeneChip® Probe Array 159
Scanning the Probe Array 160
Shutting Down the Fluidics Station 161
Customizing the Protocol 162

This Appendix Contains:

- Introduction and objectives for information provided in this Appendix.
- Instructions for using the Fluidics Station 400 or 450/250 to automate the washing and staining of GeneChip *P. aeruginosa* and GeneChip *E. coli* arrays.
- Instructions for scanning probe arrays using the GeneArray® Scanner or the GeneChip® Scanner 3000.

After completing the procedures described in this chapter, the scanned probe array image (.dat file) is ready for analysis, as explained in the enclosed *GeneChip Expression Analysis: Data Analysis Fundamentals* booklet (P/N 701190).

Introduction and Objectives

Affymetrix offers a complete set of GeneChip reagents developed specifically for use with GeneChip® 3' eukaryotic arrays in cartridge format and GeneChip® prokaryotic arrays in cartridge format. GeneChip® reagent kits include the One- and Two-Cycle cDNA Synthesis Kits, IVT Labeling Kits, Sample Cleanup Modules, and Hybridization, Wash, and Stain Kits. For best results, it is highly recommended that all GeneChip reagents are used for target preparation, hybridization, wash, and staining when using GeneChip arrays.

The information and protocols described in this Appendix have been provided by Affymetrix in previous revisions of the *GeneChip® Expression Analysis Technical Manual* describing hybridization, wash, and staining procedures for GeneChip prokaryotic arrays in cartridge format. These protocols should be closely followed when the GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit is not used.

Reagents and Materials Required

The following reagents and materials are recommendations and have been tested and evaluated by Affymetrix scientists. Information and part numbers listed are based on U.S. catalog information. For supplier information, please refer to the Supplier Reference List in Appendix G of this manual.

- Water, Molecular Biology Grade: Cambrex, P/N 51200
- Nuclease-free Water: Ambion, P/N 9930
- Bovine Serum Albumin (BSA) solution, 50 mg/mL: Invitrogen Life Technologies, P/N 15561-020
- R-Phycoerythrin Streptavidin: Molecular Probes, P/N S-866
- NaCl, 5M, RNase-free, DNase-free: Ambion, P/N 9760G
- PBS, pH 7.2: Invitrogen Life Technologies, P/N 20012-027
- 20X SSPE (3 M NaCl, 0.2M NaH_2PO_4, 0.02 M EDTA): Cambrex, P/N 51214
- Goat IgG, Reagent Grade: Sigma-Aldrich, P/N I 5256
- Anti-streptavidin antibody (goat), biotinylated: Vector Laboratories, P/N BA-0500
- Surfact-Amps 20 (Tween-20), 10%: Pierce Chemical, P/N 28320
- Bleach (5.25% Sodium Hypochlorite): VWR Scientific, P/N 37001-060 (or equivalent)
- ImmunoPure Streptavidin: Pierce Chemical, P/N 21125

Miscellaneous Supplies

- Sterile, RNase-free, microcentrifuge vials, 1.5 mL: USA Scientific, P/N 1415-2600 (or equivalent)
- Micropipettors, (P-2, P-20, P-200, P-1000): Rainin Pipetman (or equivalent)
- Sterile-barrier pipette tips and non-barrier pipette tips
- Tygon Tubing, 0.04″ inner diameter: Cole-Parmer, P/N H-06418-04
- Tough-Spots, Label Dots: USA Scientific, P/N 9185-0000

Reagent Preparation

Wash Buffer A: Non-Stringent Wash Buffer

(6X SSPE, 0.01% Tween-20)

For 1,000 mL:

300 mL of 20X SSPE

1.0 mL of 10% Tween-20

699 mL of water

Filter through a 0.2 µm filter.

Store at room temperature.

Wash Buffer B: Stringent Wash Buffer

(100 mM MES, 0.1 M [Na^+], 0.01% Tween-20)

For 1,000 mL:

83.3 mL of 12 X MES Stock Buffer (see Appendix C for reagent preparation)

5.2 mL of 5M NaCl

1.0 mL of 10% Tween-20

910.5 mL of water

Filter through a 0.2 µm filter

Store at 2°C to 8°C and shield from light.

2X Stain Buffer

(final 1X concentration: 100 mM MES, 1 M [Na^+], 0.05% Tween-20)

For 250 mL:

41.7 mL of 12X MES Stock Buffer (see Appendix C)

92.5 mL of 5M NaCl

2.5 mL of 10% Tween-20

113.3 mL of water

Filter through a 0.2 µm filter.

Store at 2°C to 8°C and shield from light.

10 mg/mL Goat IgG Stock

Resuspend 50 mg in 5 mL 150 mM NaCl.

Store at 4°C.

NOTE **If a larger volume of the 10 mg/mL IgG stock is prepared, aliquot and store at –20°C until use. After the solution has been thawed it should be stored at 4°C. Avoid additional freezing and thawing.**

1 mg/mL Streptavidin Stock

Resuspend 5 mg in 5 mL of PBS.

Store at 4°C.

Experiment and Fluidics Station Setup

STEP 1: DEFINING FILE LOCATIONS

Before working with Affymetrix® Microarray Suite it is important to define where the program stores and looks for files.

NOTE **For GeneChip® Operating Software (GCOS), this step is not necessary. Proceed directly to Step 2: Entering Experiment Information.**

1. Launch Microarray Suite from the workstation and select **Tools** → **Defaults** → **File Locations** from the menu bar.

   The File Locations window displays the locations of the following files:

   - Probe Information (library files, mask files)
   - Fluidics Protocols (fluidics station scripts)
   - Experiment Data (.exp, .dat, .cel, and .chp files are all saved to location selected here)

2. Verify that all three file locations are set correctly and click **OK**.

   Contact Affymetrix Technical Support if you have any questions regarding this procedure.

STEP 2: ENTERING EXPERIMENT INFORMATION

To wash, stain, and scan a probe array, an experiment must first be registered in GCOS or Microarray Suite. Please follow the instructions detailed in the "*Setting Up an Experiment*" section of the appropriate GCOS or Microarray Suite User's Guide.

The fields of information required for registering experiments in Microarray Suite are:

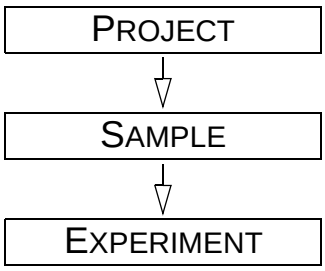
- Experiment Name
- Probe Array Type

In GCOS, three additional fields are required:

- Sample Name
- Sample Type
- Project

Sample templates, Experiment templates, and array barcodes can also be employed in GCOS to standardize and simplify the registration process. Please see the GCOS User's Guide for more information.

The Project, Sample Name, and Experiment Name fields establish a sample hierarchy that organizes GeneChip gene expression data in GCOS. In terms of the organizational structure, the Project is at the top of the hierarchy, followed by Sample Name, and then Experiment Name.



STEP 3: PREPARING THE FLUIDICS STATION

The Fluidics Station 400, or 450/250 is used to wash and stain the probe arrays. It is operated using GCOS/Microarray Suite.

Setting Up the Fluidics Station

1. Turn on the Fluidics Station using the switch on the lower left side of the machine.
2. Select **Run** → **Fluidics** from the menu bar.

   The Fluidics Station dialog box appears with a drop-down list for selecting the experiment name for each of the fluidics station modules. A second list is accessed for choosing the Protocol for each of the four fluidics station modules.

NOTE **Refer to the appropriate GeneChip® Fluidics Station User's Guide for instructions on connecting and addressing multiple fluidics stations.**

Priming the Fluidics Station

Priming ensures that the lines of the fluidics station are filled with the appropriate buffers and the fluidics station is ready for running fluidics station protocols.

Priming should be done:

- When the fluidics station is first started
- When wash solutions are changed
- Before washing if a shutdown has been performed
- If the LCD window instructs the user to prime

1. Select **Protocol** in the Fluidics Station dialog box.
2. Choose **Prime** or **Prime_450** for the respective modules in the **Protocol** drop-down list.
3. Change the intake buffer reservoir A to **Non-stringent Wash Buffer** and intake buffer reservoir B to **Stringent Wash Buffer**.
4. For MAS, click Run for each module to begin priming. In GCOS, select the **All Modules** check box, then click **Run**.

Probe Array Wash and Stain

Following hybridization, the wash and stain procedures are carried out by the Fluidics Station. A modified FlexMidi_euk2v3 fluidics script (FlexMidi_euk2v3_450, if you are using the FS-450) is used for the GeneChip *P. aeruginosa* Genome Array, and the ProkGE-WS2 fluidics script (ProkGE-WS2_450, if you are using the FS-450) is used for the GeneChip *E. coli* arrays. The procedures take approximately 75 and 90 minutes, respectively, to complete. The use of streptavidin in the first part of the stain procedure enhances the overall signal.

After 16 hours of hybridization, remove the hybridization cocktail from the probe array and fill the probe array completely with the appropriate volume of Non-Stringent Wash Buffer (Wash Buffer A), as given in Table D.1.

NOTE

If necessary, at this point, the probe array can be stored at 4°C for up to 3 hours before proceeding with washing and staining. Equilibrate the probe array to room temperature before washing and staining.

Table D.1
Probe Array Cartridge Volumes

Array	Hybridization Volume	Total Fill Volume
49 Format (Standard)	200 µL	250 µL
64 Format	200 µL	250 µL
100 Format (Midi)	130 µL	160 µL
169 Format (Mini)	80 µL	100 µL
400 Format (Micro)	80 µL	100 µL

Preparing the Staining Reagents

1. Prepare the following stain and wash solutions the day of the procedure. The solutions are stable for approximately 6 to 8 hours at 4°C. Volumes given are sufficient for one probe array.

   Streptavidin Phycoerythrin (SAPE) should be stored in the dark at 4°C, either foil wrapped or kept in an amber tube. Remove SAPE from the refrigerator and tap the tube to mix well before preparing stain solution.

Do not freeze SAPE. Always prepare the SAPE stain solution fresh, on the day of use.

Table D.2
Streptavidin Solution Mix - Vial 1

Component	Volume	Final Dilution
2X Stain Buffer	300.0 µL	1X
50 mg/mL BSA	24.0 µL	2 mg/mL
1 mg/mL Streptavidin	6.0 µL	10 µg/mL
Nuclease-free H_20	270.0 µL	—
Total Volume	600 µL	

Table D.3
Antibody Solution Mix - Vial 2

Component	Volume	Final Concentration
2X MES Stain Buffer	300.0 µL	1X
50 mg/mL BSA	24.0 µL	2 mg/mL
10 mg/mL Normal Goat IgG	6.0 µL	0.1 mg/mL
0.5 mg/mL Anti-streptavidin Antibody, biotinylated	6.0 µL	5 µg/mL
Nuclease-free H_20	264.0 µL	—
Total Volume	600 µL	

Table D.4
SAPE Solution Mix - Vial 3

Component	Volume	Final Concentration
2X MES Stain Buffer	300.0 µL	1X
50 mg/mL BSA	24.0 µL	2 mg/mL
1 mg/mL Streptavidin Phycoerythrin	6.0 µL	10 µg/mL
Nuclease-free H_20	270.0 µL	—
Total Volume	600 µL	

2. In the Fluidics Station dialog box on the workstation, select the correct experiment name from the drop-down **Experiment** list. The probe array type will appear automatically.

   Arrays & Fluidics Protocols

   - Array: GeneChip *E. coli* Genome 2.0 Array
     Protocol: Mini_prok2v1(if using FS-450, Mini_prok2v1_450)
   - Array: GeneChip *E. coli* Antisense Genome Array
     Protocol: ProkGE-WS2 (if using FS-450, ProkGE-WS2_450)
   - Array: GeneChip *P. aeruginosa* Genome Array
     Protocol: Modified FlexMidi_euk2v3*
     (*See Table D.5. If using FS-450, FlexMidi_euk2v3_450)

IMPORTANT !

Fluidics protocols are specific to array format and content. Follow procedures below for specific arrays.

3. Choose **Run** in the Fluidics Station dialog box to begin the washing and staining. Follow the instructions in the LCD window on the fluidics station when using the Fluidics Station 400.

   If you are unfamiliar with inserting and removing probe arrays from the fluidics station modules, please refer to the appropriate *User's Guide* for your GeneChip® Fluidics Station 400, or 450/250.

Table D.5
Modification of FlexMidi_euk2v3 for GeneChip® *P. aeruginosa* Array

GeneChip *P. aeurginosa* Genome Array requires a modification to the **FlexMidi_euk2v3** (or the **FlexMidi_euk2v3_450**) protocol. See below for details.

The **FlexMidi_euk2v3** (or the **FlexMidi_euk2v3_450**) fluidics protocol must be modified. Please follow the instructions carefully to make the modifications. Additionally, it is highly recommended that you save your new *P. aeruginosa* fluidics protocol under a different name to avoid confusion.

1. Modify and save the fluidics protocol for the assay:
   a. Modify the fluidics protocol by using **Tools → Edit Protocol** drop-down list and selecting **FlexMidi_euk2v3** (or the **FlexMidi_euk2v3_450**) within the Protocol Name window.
   b. Change the following parameters: (Enter the new parameters by highlighting the default values and typing in the new values.)
      i) **Wash A1 Temperature** from 30°C to 25°C;
      ii) **Number of Wash B Cycles** from 6 to 4;
      iii) **Stain Temperature (C)** from 35°C to 25°C;
      iv) **First Stain Time (seconds)** from 300 to 600 seconds;
      v) **Second Stain Time (seconds)** from 300 to 600 seconds;
      vi) **Third Stain Time (seconds)** from 300 to 600 seconds; and
      vii) **Wash A3 Temperature** from 35°C to 30°C.
   c. Save the modified fluidics protocol by highlighting **FlexMidi_euk2v3** (or the **FlexMidi_euk2v3_450**) within the Protocol Name window and typing over with an assigned protocol name (e.g., Pae_cDNA). Click **Save**.
      The new fluidics protocol should be present in the Protocol drop-down list and is used in the subsequent steps.
2. Select the name of the newly modified protocol (e.g., Pae_cDNA) from the **Protocol** drop-down list in the Fluidics Station dialog box. Select **Run** in the Fluidics Station dialog box to begin the washing and staining. Follow the instructions in the LCD window on the fluidics station.

   If you are unfamiliar with inserting and removing probe arrays from the fluidics station modules, please refer to the appropriate User's Guide for your GeneChip® Fluidics Station 400, or 450/250.

Table D.6
Fluidics Scripts Prokaryotic Arrays

Format	Fluidics Scripts*
169	Mini_prok2v1
100	modified FlexMidi_Euk2v3
49	ProkGE_WS2

**When using the Fluidics Station 450 or 250 add _450 at the end of the fluidics script's name.*

Table D.7
Fluidics Protocols

	Mini_prok2v1*	FlexMidi_euk2v3†	Modified FlexMidi_euk2v3 for *P. aeruginosa* Array	ProkGE_WS2‡
Post Hyb Wash #1	10 cycles of 2 mixes/cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 2 mixes/cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 2 mixes/cycle with Wash Buffer A at 25°C	10 cycles of 2 mixes/cycle with Wash Buffer A at 25°C
Post Hyb Wash #2	4 cycles of 15 mixes/cycle with Wash Buffer B at 50°C	**6** cycles of 15 mixes/cycle with Wash Buffer B at 50°C	**4** cycles of 15 mixes/cycle with Wash Buffer B at 50°C	4 cycles of 15 mixes/cycle with Wash Buffer B at 45°C
1st Stain	Stain the probe array for 300 seconds in Streptavidin Solution Mix at 35°C	Stain the probe array for **300 seconds** in SAPE Solution Mix at **35°C**	Stain the probe array for **600 seconds** in Streptavidin Solution Mix at **25°C**	Stain the probe array for 600 seconds in Streptavidin Solution Mix at 25°C.
Post Stain Wash	10 cycles of 4 mixes/cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 4 mixes/cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 4 mixes/cycle with Wash Buffer A at 30°C	10 cycles of 4 mixes/cycle with Wash Buffer A at 30°C
2nd Stain	Stain the probe array for 300 seconds in Antibody Solution Mix at 35°C	Stain the probe array for **300 seconds** in Antibody Solution Mix at **35°C**	Stain the probe array for **600 seconds** in Antibody Solution Mix at **25°C**	Stain the probe array for 600 seconds in Antibody Solution Mix at 25°C.
3rd Stain	Stain the probe array for 300 seconds in SAPE Solution Mix at 35°C	Stain the probe array for **300 seconds** in SAPE Solution Mix at **35°C**	Stain the probe array for **600 seconds** in SAPE Solution Mix at **25°C**	Stain the probe array for 600 seconds in SAPE Solution Mix at 25°C.
Final Wash	15 cycles of 4 mixes/cycle with Wash Buffer A at 35°C. The holding temperature is 25°C	15 cycles of 4 mixes/cycle with Wash Buffer A at **35°C**. The holding temperature is 25°C.	15 cycles of 4 mixes/cycle with Wash Buffer A at **30°C**. The holding temperature is 25°C.	15 cycles of 4 mixes/cycle with Wash Buffer A at 30°C. The holding temperature is 25°C.

**Mini_prok2v1_450 fot the FS-450/250*
†FlexMidi_Euk2v3_450 for the FS-450/250
‡ProkGE_WS2_450 for the FS-450/250

USING THE FLUIDICS STATION 450/250

Washing and Staining the Probe Array

1. In the Fluidics Station dialog box on the workstation, select the correct experiment name from the drop-down **Experiment** list.

   The **Probe Array Type** appears automatically.

2. In the **Protocol** drop-down list, select the appropriate antibody amplification protocol to control the washing and staining of the probe array format being used: Table D.6.

3. Choose **Run** in the Fluidics Station dialog box to begin the washing and staining. Follow the instructions in the LCD window on the fluidics station.

   If you are unfamiliar with inserting and removing probe arrays from the fluidics station modules, please refer to the appropriate *Fluidics Station User's Guide*, or *Quick Reference Card* (P/N 08-0093 for the FS-450/250 fluidics stations).

4. Insert the appropriate probe array into the designated module of the fluidics station while the cartridge lever is down, or in the eject position. When finished, verify that the cartridge lever is returned to the up, or engaged, position.

5. Remove any microcentrifuge vial(s) remaining in the sample holder of the fluidics station module(s) being used.

6. If prompted to "Load Vials 1-2-3," place the three experiment sample vials (the microcentrifuge vials) into the sample holders 1, 2, and 3 on the fluidics station.

   A. Place one vial containing streptavidin solution in sample holder 1.

   B. Place one vial containing the anti-streptavidin biotinylated antibody solution in sample holder 2.

   C. Place one vial containing the streptavidin phycoerythrin (SAPE) solution in sample holder 3.

   D. Press down on the needle lever to snap needles into position and to start the run.

   The run begins. The Fluidics Station dialog box at the workstation terminal and the LCD window display the status of the washing and staining as the protocol progresses.

7. When the protocol is complete, the LCD window displays the message **EJECT CARTRIDGE**.
8. Remove the probe arrays from the fluidics station modules by first pressing down the cartridge lever to the eject position.
9. Lift up on the needle lever to disengage the needles from the microcentrifuge vials. Remove the three microcentrifuge vials from the needle holders.
10. Check the probe array window for large bubbles or air pockets.
    - If bubbles are present, refer to Table D.8.
    - If the probe array has no large bubbles, it is ready to scan on the GeneArray® Scanner, or the GeneChip® Scanner 3000. Pull up on the cartridge lever to close the washblock and proceed to *Probe Array Scan* on page 159.
11. If there are no more samples to hybridize, shut down the fluidics station following the procedure in *Shutting Down the Fluidics Station* on page 161.
12. Keep the probe arrays at 4°C and in the dark until ready for scanning.
13. Lift up on the cartridge lever to close the washblock.

NOTE

For proper cleaning and maintenance of the fluidics station, including the bleach protocol, refer to the appropriate *GeneChip® Fluidics Station User's Guide* for instruction.

Table D.8
If Bubbles Are Present

Return the probe array to the probe array holder. Engage the washblock by gently pushing up on the cartridge lever to the engage position. The fluidics station will drain the probe array and then fill it with a fresh volume of the last wash buffer used. When it is finished, the LCD window will display **EJECT CARTRIDGE.** Again, remove the probe array and inspect it for bubbles. If no bubbles are present, it is ready to scan. Proceed to *Probe Array Scan* on page 159. If several attempts to fill the probe array without bubbles are unsuccessful, the array should be filled with **Wash Buffer A (non-stringent buffer)** manually, using a micropipette. Excessive washing will result in a loss of signal intensity.

USING THE FLUIDICS STATION 400

Washing and Staining the Probe Array

1. In the Fluidics Station dialog box on the workstation, select the correct experiment name in the drop-down **Experiment** list. The probe array type will appear automatically.
2. In the **Protocol** drop-down list, select the appropriate antibody amplification protocol to control the washing and staining of the probe array format being used: Table D.6.
3. Choose **Run** in the Fluidics Station dialog box to begin the washing and staining. Follow the instructions on the LCD window on the fluidics station.

   If you are unfamiliar with inserting and removing probe arrays from the fluidics station modules, please refer to the *Fluidics Station 400 User's Guide*, *Fluidics Station 400 Video In-Service CD* (P/N 900374), or *Quick Reference Card* (P/N 08-0072).
4. Insert the appropriate probe array into the designated module of the fluidics station while the cartridge lever is in the EJECT position. When finished, verify that the cartridge lever is returned to the ENGAGE position.
5. Remove any microcentrifuge tube remaining in the sample holder of the fluidics station module(s) being used.
6. Place a microcentrifuge tube containing the streptavidin solution into the sample holder, making sure that the metal sampling needle is in the tube with its tip near the bottom

   The Fluidics Station dialog box and the LCD window display the status of the washing and staining as they progress.
7. When the LCD window indicates, replace the microcentrifuge vial containing the streptavidin stain with a microcentrifuge vial containing antibody stain solution into the sample holder, making sure that the metal sampling needle is in the vial with its tip near the bottom.
8. When the LCD window indicates, replace the microcentrifuge vial containing antibody solution with the microcentrifuge vial containing the streptavidin phycoerythrin (SAPE) solution.
9. When the protocol is complete, the LCD window displays the message **EJECT CARTRIDGE**.

10. Remove microcentrifuge vial containing stain and replace with an empty microcentrifuge tube.
11. Remove the probe arrays from the fluidics station modules by first moving the cartridge lever to the **EJECT** position.
12. Check the probe array window for large bubbles or air pockets.
    - If bubbles are present, refer to Table D.9.
    - If the probe array has no large bubbles, it is ready to scan on the GeneChip Scanner 3000 or the GeneArray® Scanner. ENGAGE washblock and proceed to *Probe Array Scan* on page 159.

    If you do not scan the arrays right away, keep the probe arrays at 4°C and in the dark until ready for scanning.

    If there are no more samples to hybridize, shut down the fluidics station following the procedure outlined in the section, *Shutting Down the Fluidics Station* on page 161.

NOTE **For proper cleaning and maintenance of the fluidics station, including the bleach protocol, refer to the appropriate *GeneChip® Fluidics Station User's Guide* for instruction.**

Table D.9
If Bubbles Are Present

Return the probe array to the probe array holder. Latch the probe array holder by gently pushing it up until a light click is heard. Engage the washblock by firmly pushing up on the cartridge lever to the **ENGAGE** position. The fluidics station will drain the probe array and then fill it with a fresh volume of the last wash buffer used. When it is finished, the LCD window displays **EJECT CARTRIDGE** again, remove the probe array and inspect it again for bubbles. If no bubbles are present, it is ready to scan. Proceed to *Probe Array Scan* on page 159. If several attempts to fill the probe array without bubbles are unsuccessful, the array should be filled with **Wash Buffer A (non-stringent buffer)** manually, using a micropipette. Excessive washing will result in a loss of signal intensity.

Probe Array Scan

The scanner is also controlled by Affymetrix Microarray Suite or GCOS. The probe array is scanned after the wash protocols are complete. Make sure the laser is warmed up prior to scanning by turning it on at least 15 minutes before use if you are using the Agilent GeneArray® Scanner, or 10 minutes if you are using the GeneChip® Scanner 3000. If the probe array was stored at 4°C, warm to room temperature before scanning. Refer to the Microarray Suite or GCOS online help and the appropriate scanner user's manual for more information on scanning.

WARNING ▲ **The scanner uses a laser and is equipped with a safety interlock system. Defeating the interlock system may result in exposure to hazardous laser light.**

NOTE **You must have read and be familiar with the operation of the scanner before attempting to scan a probe array. Please refer to the Microarray Suite User's Guide (P/N 08-0081) or to the GeneChip® Scanner 3000 quick reference card (P/N 08-0075).**

HANDLING THE GENECHIP® PROBE ARRAY

Before you scan the probe array, follow the directions in this section on handling the probe array. If necessary, clean the glass surface of the probe array with a non-abrasive towel or tissue before scanning. Do not use alcohol to clean glass.

Before scanning the probe array cartridge, follow this procedure to apply Tough-Spots™ to the probe array cartridge to prevent the leaking of fluids from the cartridge during scanning.

IMPORTANT ! **Apply the spots just before scanning. Do not use them in the hyb process.**

1. On the back of the probe array cartridge, clean excess fluid from around septa.
2. Carefully apply one Tough-Spot to each of the two septa. Press to ensure that the spots remain flat. If the Tough-Spots do not apply smoothly; that is, if you observe bumps, bubbles, tears or curled

edges, do not attempt to smooth out the spot. Remove the spot and apply a new spot. See Figure D.1.

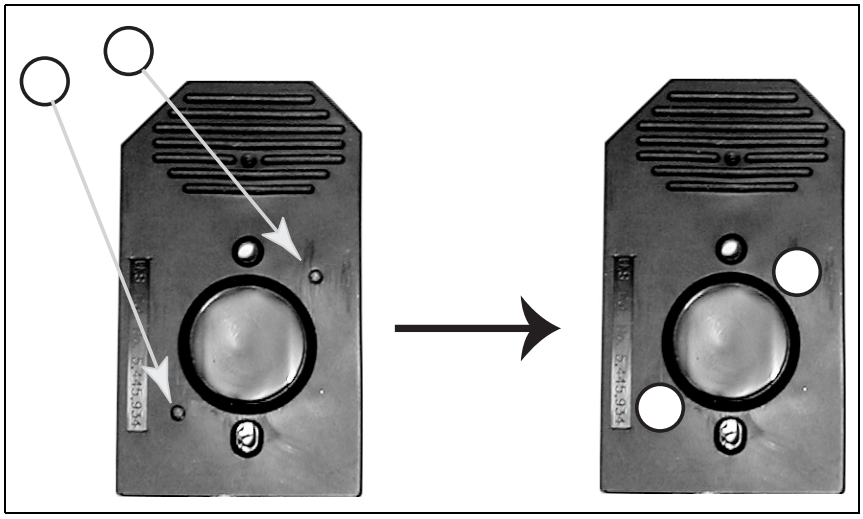


Figure D.1
Applying Tough-Spots™ to the Probe Array Cartridge

3. Insert the cartridge into the scanner and test the autofocus to ensure that the Tough-Spots do not interfere with the focus. If you observe a focus error message, remove the spot and apply a new spot. Ensure that the spots lie flat.

SCANNING THE PROBE ARRAY

1. Select **Run** → Scanner from the menu bar. Alternatively, click the Start Scan icon in the tool bar.

   The Scanner dialog box appears with a drop-down list of experiments that have not been run.

2. Select the experiment name that corresponds to the probe array to be scanned.

   A previously run experiment can also be selected by using the **Include Scanned Experiments** option box. After selecting this option, previously scanned experiments appear in the drop-down list.

3. By default, for the Agilent® GeneArray® Scanner only, after selecting the experiment the number [2] is displayed in the **Number of Scans** box to perform the recommended 2X image scan. For the GeneChip® Scanner 3000, only one scan is required.

4. Once the experiment has been selected, click the Start button.

   A dialog box prompts you to load a sample into the scanner.

5. If you are using the GeneArray® Scanner, click the Options button to check for the correct pixel value and wavelength of the laser beam.

   - Pixel value = 3 µm
   - Wavelength = 570 nm

   If you are using the GeneChip Scanner 3000, pixel resolution and wavelength are preset and cannot be changed.

6. Open the sample door on the scanner and insert the probe array into the holder. Do not force the probe array into the holder. Close the sample door of the scanner. If you are using the GeneChip Scanner 3000, do not attempt to close the door by hand. The door closes automatically through the User Interface when start scan is selected or the scanner goes into stand-by mode.

7. Click OK in the Start Scanner dialog box.

   The scanner begins scanning the probe array and acquiring data. When Scan in Progress is Selected from the **View** menu, the probe array image appears on the screen as the scan progresses.

Shutting Down the Fluidics Station

1. After removing a probe array from the probe array holder, the LCD window displays the message ENGAGE **WASHBLOCK.**

2. If you are using the FS-400, latch the probe array holder by gently pushing up until a light click is heard. Engage the washblock by firmly pushing up on the cartridge lever to the **ENGAGE** position.

   If you are using the FS-450, gently lift up the cartridge lever to engage, or close, the washblock.

   The fluidics station automatically performs a Cleanout procedure. The LCD window indicates the progress of the Cleanout procedure.

3. When the fluidics station LCD window indicates REMOVE **VIALS**, the Cleanout procedure is complete.

4. Remove the sample microcentrifuge vial(s) from the sample holder(s).

5. If no other hybridizations are to be performed, place wash lines into a bottle filled with deionized water.
6. Select Shutdown or Shutdown_450 for all modules from the drop-down **Protocol** list in the Fluidics Station dialog box. Click the **Run** button for all modules.

   The Shutdown protocol is critical to instrument reliability. Refer to the appropriate *Fluidics Station User's Guide* for more information.
7. After Shutdown protocol is complete, flip the ON/OFF switch of the fluidics station to the OFF position.

IMPORTANT !

To maintain the cleanliness of the fluidics station and obtain the highest quality image and data possible, a weekly bleach protocol and a monthly decontamination protocol are highly recommended. Please refer to the appropriate *GeneChip® Fluidics Station User's Guide* for further detail.

Customizing the Protocol

There may be times when the fluidics protocols need to be modified. Modification of protocols must be done before downloading the protocol to the fluidics station. Protocol changes will not affect runs in progress. For more specific instructions, refer to the Microarray Suite/GCOS online help.

1. Select **Tools** → Edit Protocol from the menu bar.
2. In the Edit Protocol dialog box under Protocol Name, click the arrow to open a list of protocols. Click the protocol to be changed.

   The name of the protocol is displayed in the **Protocol Name** text box. The conditions for that protocol are displayed on the right side of the Edit Protocol dialog box.
3. Select the items to be changed and input the new parameters as needed, keeping parameters within the ranges shown in Table D.10.

Table D.10
Valid Ranges for Wash/Stain Parameters

Parameter	Valid Range
Wash Temperature for A1, B, A2, or A3 (°C)	15 to 50
Number of Wash Cycles for A1, B, A2, or A3	0 to 99
Mixes / Wash Cycle for A1, B, A2, or A3	1 to 99
Stain Time (seconds)	0 to 86,399
Stain Temperature (°C)	15 to 50
Holding Temperature (°C)	15 to 50
• Wash A1 corresponds to Post Hyb Wash #1 in Table D.7. • Wash B corresponds to Post Hyb Wash #2 in Table D.7. • Wash A2 corresponds to Post Stain Wash in Table D.7. • Wash A3 corresponds to Final Wash in Table D.7.	

4. To return to the default values for the protocol selected, click the Defaults button.
5. Once all the protocol conditions are modified as desired, change the name of the edited protocol in the **Protocol Name** box.

CAUTION 

If the protocol is saved without entering a new "Protocol Name," the original protocol parameters will be overwritten.

6. Click **Save**, then close the dialog box.

   Enter **0** (zero) for hybridization time if hybridization step is not required. Likewise, enter **0** (zero) for the stain time if staining is not required. Enter **0** (zero) for the number of wash cycles if a wash step is not required.

Appendix E

List of Controls on GeneChip® Probe Arrays

Appendix E

Appendix Contents

Control Genes on GeneChip® Eukaryotic Probe Arrays 167
Control Genes on GeneChip® Prokaryotic Probe Arrays. 168

Control Genes on GeneChip® Eukaryotic Probe Arrays

Table E.1
Control Genes on GeneChip® Eukaryotic Probe Arrays

Origin of Organism	Control Gene Name	Utility for GeneChip® Experiments	Associated Affymetrix Products
synthetic	B2 Oligo	Grid alignment.	Control Oligo B2, P/N 900301, also as part of the Hybridization Control Kit P/N 900454 or 900457
E. coli P1 Bacteriophage	*bioB* *bioC* *bioD* *cre*	Antisense biotinylated cRNA are used as hybridization controls.	GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit, P/N 900454 or P/N 900457
B. subtilis	*lys* *phe* *thr* *dap*	Poly-A-tailed sense RNA can be spiked into isolated RNA samples as controls for the labeling and hybridization process. The spikes can also be used to estimate assay sensitivity.	GeneChip Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit, P/N 900433

Control Genes on GeneChip® Prokaryotic Probe Arrays

Table E.2
Control Genes on GeneChip® Prokaryotic Probe Arrays

Origin of Organism	Control Gene Name	Utility for GeneChip® Experiments	Associated Affymetrix Products
synthetic	B2 Oligo	Grid alignment.	Control Oligo B2, P/N 900301, also as part of the Hybridization Control Kit P/N 900454 or 900457
B. subtilis	*lys* *phe* *thr* *dap*	Sense RNA can be spiked into purified sample RNA as control for the labeling and hybridization process. The spikes can also be used to estimate assay sensitivity.	GeneChip Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit, P/N 900433

Appendix G

Contact Information

Appendix G

Appendix Contents

Affymetrix Technical Support 171
Supplier Contact Information 172

Affymetrix Technical Support

Affymetrix provides technical support via phone or e-mail. To contact Affymetrix Technical Support:

Affymetrix Inc.
3420 Central Expressway
Santa Clara, CA 95051
USA

Tel: 1-888-362-2447 (1-888-DNA-CHIP)
Fax: 1-408-731-5441
E-mail: support@affymetrix.com

Affymetrix UK Ltd
Voyager, Mercury Park,
Wycombe Lane, Wooburn Green,
High Wycombe HP10 0HH
United Kingdom

UK and Others Tel: +44 (0) 1628 552550
France Tel: 0800919505
Germany Tel: 01803001334
E-mail: supporteurope@affymetrix.com

Affymetrix Japan, K.K.
Mita NN Bldg., 16 F
4-1-23 Shiba, Minato-ku,
Tokyo 108-0014 Japan

Tel: +81-(0)3-5730-8200
Fax: +81-(0)3-5730-8201
E-mail: supportjapan@affymetrix.com

www.affymetrix.com

Supplier Contact Information

Table 1.G.1

Supplier	Web Site
Ambion	www.ambion.com
Amersham Biosciences	www.amershambiosciences.com
Amresco	www.amresco-inc.com
BD Biosciences	www.bdbiosciences.com/
BioWhittaker Molecular Applications / Cambrex	www.cambrex.com
Brinkmann Instruments	www.brinkmann.com
Cole-Parmer	www.coleparmer.com
Corning Life Sciences	www.corning.com/lifesciences/
CLONTECH	www.bdbiosciences.com/clontech/
Epicentre Technologies	www.epicentre.com
Eppendorf	www.eppendorf.com
Invitrogen Life Technologies	www.invitrogen.com
Millipore Corp	www.millipore.com
Molecular Probes	www.probes.com
New England Biolabs	www.neb.com
Novagen	www.emdbiosciences.com
Pierce Chemical	www.piercenet.com
Promega Corporation	www.promega.com
Proligo	www.gensetoligos.com
QIAGEN	www.qiagen.com
Rainin	www.rainin.com
Roche Diagnostics	www.roche-applied-science.com
Sigma-Aldrich	www.sigma-aldrich.com
USA Scientific	www.usascientific.com
USB	www.usbweb.com
Vector Laboratories	www.vectorlabs.com
VWR Scientific Products	www.vwrsp.com

EK-2

SOĞUK VE SICAK STRESİNDE DEĞİŞİM GÖSTEREN ÖNEMLİ GENLER

Gen	İşlev	Soğuk stresi		Sıcak stresi	
		Reg.	Fold change	Reg.	Fold Change
nifB	nitrogenase cofactor biosynthesis protein	Up	6.317	-	-
nifD	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	Up	59.112	-	-
nifH	nitrogenase iron protein	Up	99.953	-	-
nifK	nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	Up	29.376	-	-
nifN	nitrogenase molybdenum-iron cofactor biosynthesis protein	Up	6.598	-	-
anfD	nitrogenase iron-iron protein, alpha subunit	Up	23.486	-	-
anfH	nitrogenase iron protein	Up	33.189	-	-
anfG	nitrogenase iron-iron protein, delta subunit	Up	37.180	-	-
glnA	glutamine synthetase	Up	2.249	Down	5.476
glnB	nitrogen regulatory protein P-II	Up	2.756	Down	2.532
atpF	ATP synthase F0, B subunit	Up	3.575	-	-
atpC	ATP synthase F1, epsilon subunit	-	-	Down	2.559
atpD	ATP synthase F1, beta subunit	-	-	Down	6.198
pufL	photosynthetic reaction center, L subunit	-	-	Down	3.864
pufM	photosynthetic reaction center, M subunit	-	-	Down	3.102
pucA	light-harvesting protein B-800/850, alpha chain	-	-	Down	2.053
pucC	PucC protein	-	-	Down	2.221
sdhA	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	-	-	Down	2.147
sdhB	succinate dehydrogenase, iron-sulfur subunit	-	-	Down	3.508
fba	fructose-bisphosphate aldolase	Up	2.056	-	-
fbp	fructose-bisphosphatase	Up	2.748	-	-
hupA	hydrogenase, small subunit	-	-	Down	2.436
hupB	hydrogenase, large subunit	Up	3.407	Down	3.744
nuoA, B,C,DE,G,H,	NADH-quinone oxidoreductase	-	-	Down	2.118-3.101
fdxN	ferredoxin I	Up	13.582	-	-
fdxC	ferredoxin IV	Up	23.668	-	-
rnfA,B,CD,E,G	electron transport complex protein	Up	7.218-20.417	-	-
	50S ribosomal proteins	Up	4.036	Up	3.899-8.431
	30S ribosomal proteins	Up	5.586	Up	12.697

clpS	ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS	Down	3.602	-	-
groS	chaperonin GroS	Down	6.357	-	-
groL	chaperonin GroL	Down	8.799	-	-
clpP	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpX	Down	2.995	-	-
ibpA	small heat shock protein IbpA	Down	13.262	-	-
clpA	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpA	Down	3.889	-	-
clpB	chaperone ClpB	-	-	Down	2.580
clpP	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpX	-	-	Down	3.859
lon	ATP-dependent protease La	Down	5.656	Down	4.331
	Peptidases	Down	2.960-2.430	Down	2.238-3.963
mdoH, lpxD, exoD	Biosynthesis of surface polysaccharides and lipopolysaccharides	Down	4.527, 2.652, 2.716	-	-
ftsI,	Biosynthesis of murein sacculus and peptidoglycan ,	-	-	Down	2.279, 2.222
acpP	acyl carrier protein	Up	3.545	Up	4.132
pmtA, idi	Biosynthesis of fatty acids and phospholipids	-	-	Up	3.117, 4.085
phbB	acetoacetyl-CoA reductase	Up	2.664	-	-
mopA	molybdenum transport operon repressor MopA	up	2.673	-	-
rpoN	RNA polymerase sigma-54 factor	up	6.031	-	-
hfq	RNA chaperone Hfq	up	2.452	-	-
rne	ribonuclease E	up	3.679	-	-
pnp	Degradation of RNA	up	6.457	-	-
nusG	transcription antitermination protein	-	-	up	3.113
rnp	ribonuclease P	-	-	up	2.065
rpoH	RNA polymerase sigma-32 factor	-	-	down	3.361
rpoD	RNA polymerase sigma factor	-	-	down	2.919
modB	molybdenum ABC transporter, permease protein ModB	up	3.113	-	-
potA,B,D,F,G,H,I	spermidine/putrescine ABC transporter, periplasmic spermidine/putrescine-binding protein	-	-	down	2.010-14.108
dctP	Trasnsporter for organic acids, carbohydrates, alcohols	-	-	down	10.165