

实验方法

1.实验试剂仪器

1.1 主要试剂:

试剂名称	试剂来源	货号
LowInput Quick-Amp Labeling Kit, one-color(24*)	Agilent	5190-2305
Gene Expression Wash Pack	Agilent	5188-5327
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent	5188-4242
Gene Expression Wash Pack	Agilent	5188-5327
RNA Spike In Kit, one-color	Agilent	5188-5282
Package 20 backings, 8 HD arrays per slide	Agilent	G2534-60015
Package 20 backings, 4 arrays per slide	Agilent	G2534-60012
QIAGEN RNeasy® Mini Kit	Qiagen	74106
Chip	Agilent	

1.2 主要仪器耗材

仪器名称	仪器来源	型号
扫描仪	Agilent	G2505C
杂交炉	Agilent	G2545A
2100	Agilent	G2939A
2100 振荡器	Agilent	9600
NanoDrop	Thermo	2000
PCR 仪	ABI	9700
离心机	eppendorf	5418
浓缩仪	eppendorf	5301
离心机	其林贝尔	LX-200
离心机-1	其林贝尔	LX-300
振荡器-1	其林贝尔	GL-88B
磁力搅拌器	其林贝尔	GL-3250B

金属浴-2	博日	HB-100
金属浴-3	博日	CHB-100
电热恒温培养箱	精宏实验设备	XMTD-8222
冰箱	荣事达	BCD-265F

实验步骤:

一、总 RNA 的纯化 (QIAGEN RNeasy® Mini Kit)

如果总 RNA 的纯度不高, 会影响探针的标记效率和芯片杂交结果。所以使用 QIAGEN RNeasy® Kit 纯化总 RNA, 详细操作原理和方法见 RNeasy Mini Protocol。

- 1、取总 RNA $\leq 100\mu\text{g}$ 溶解于 $100\mu\text{l}$ RNase free 水中, 加入 $350\mu\text{l}$ Buffer RLT 并充分混匀。
- 2、加入 $250\mu\text{l}$ 无水乙醇, Tip 头充分混匀。
- 3、将共计 $700\mu\text{l}$ 含总 RNA 的溶液转入套在 2ml 离心管内的 RNeasy 柱子内, $\geq 8000\text{g}$ 离心 30 秒, 弃去滤过液。
- 4、吸取 $500\mu\text{l}$ Buffer RPE 到 RNeasy mini 柱子内, $\geq 8000\text{g}$ 离心洗涤 30 秒, 弃去滤过液, 再用 $500\mu\text{l}$ Buffer RPE 在 $\geq 8000\text{g}$ 离心洗涤 2min, 弃去滤过液和 2ml 的套管, 将 RNeasy mini 柱子转入一新的 1.5ml Eppendorf 管中。
- 5、吸取 $40\mu\text{l}$ RNase free 的水, $\geq 8000\text{g}$ 离心洗脱 1min。
- 6、重复步骤 5 一次。

二、cDNA 第一链和第二链一步法合成

1、取 $0.2\mu\text{g}$ RNA 于 0.2ml 离心管中, 如下配置反应溶液:

200ng total RNA(5ng polyA+ RNA)	$\rightarrow 2.5\mu\text{l}$
Spike Mix	$2\mu\text{l}$
Random Primer	$0.8\mu\text{l}$
total	$5.3\mu\text{l}$

2、 65°C 保温 10 分钟, 冰浴 5 分钟

注意: 提前把 $5\times\text{First Strand Buffer}$ 在 80°C 预热 3-4 分钟

3、配置如下 cDNA 合成体系:

c DNA Master Mix- $4.7\mu\text{l}$	1^*	5^*
$5^*\text{First Strand Buffer}$	$2\mu\text{l}$	$10\mu\text{l}$

0.1M DTT	1 μ l	5 μ l
10mM Dntp mix	0.5 μ l	2.5 μ l
AffinityScript Rnase Block Mix	1.2 μ l	6 μ l

4、将上述 4.7 μ l mix 加入变性后冰浴的 RNA 中。

5、用枪头混匀，之后离心。

6、PCR:

40°C 2hour

70°C 15min

move to ice 5min

三、荧光标记 cRNA 合成

1、如下配置 Transcription mix:

Transcription Master Mix-6 μ l	1 *	5 *
H ₂ O	0.75 μ l	3.75 μ l
5*Transcription buffer	3.2 μ l	16 μ l
0.1M DTT	0.6 μ l	3 μ l
NTP mix	1 μ l	5 μ l
Cy3-CTP	0.21 μ l	1.05 μ l
T7 RNA Polymerase Blend	0.24 μ l	1.2 μ l

2、加入 6 μ l Transcription mix 并混匀

3、PCR:

40°C 2hours

四、cRNA 纯化 (QIAGEN RNeasy® Mini Kit)

QIAGEN RNeasy Mini kit 纯化 cRNA，具体方法可参见 QIAGEN 公司随试剂盒提供的操作手册。

1、加入 84 μ l RNase free 水，加入 350 μ l Buffer RLT 并充分混匀。

2、加入 250 μ l 无水乙醇，Tip 头充分混匀。

3、将共计 700 μ l 含总 RNA 的溶液转入套在 2 ml 离心管内的 RNeasy 柱子内， $\geq 8000g$ 离心 15-30sec，弃去滤过液。

4、吸取 500 μ l Buffer RPE 到 RNeasy mini 柱子内， $\geq 8000g$ 离心洗涤 15—30sec，弃去滤过液，再用 500 μ l Buffer RPE 在 $\geq 8000g$ 离心洗涤 2min，弃去滤过液和 2ml 的套管，将 RNeasy mini 柱

子转入一新的 1.5ml Eppendorf 管中。

5、吸取 30 μ l RNase free 的水，静置 1min , $\geq 8000g$ 离心洗脱 1min。

6、重复步骤 5 一次。

五、 cRNA 浓度测定

1. cRNA 质控

用分光光度计分析 RNA 浓度。

需要在 260 和 280nm 测定吸光度来确定样品的浓度和纯度

A260/A280 应接近 2.0 为较纯的 RNA(比值在 1.9-2.1 也可)

2. 按下面的计算公式确定调整 cRNA 的含量:

调整 cRNA 含量=RNAm-(total RNAi)(y)

RNAm=IVT 后测得 cRNA 量 (μ g)

total RNAi=开始总 RNA 的量 (μ g)

y=在 IVT 过程中加入的双链 cDNA 产物占全部 cDNA 产物的百分数

六、 荧光分子浓度及掺入率计算

Cy3- 浓度 ($\text{pmol}/\mu\text{l}$) = $A_{552}/0.15$

Cy3- 掺入率 ($\text{pmol}/\mu\text{g}$) = Cy3- 浓度/cRNA 浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

七、 cRNA 样品片段化和芯片杂交

1、按下表配制片段化混合液，然后在 60 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30min 进行片段化，冰浴 1min

Fragmentation mix-55 μl /25 μl	4*	8*
cRNA	1.65ug	600ng
10*Blocking Agent	11 μl	5 μl
water	\rightarrow 52.8 μl	\rightarrow 24 μl
25*Fragmentation Buffer	2.2 μl	1 μl

2、加入 2X GEx Hybridization Buffer 混匀

Hybridization mix	4*	8*
cRNA from Fragmentation Mix	55 μl	25 μl
2*GE Hyb Hi-RPM Buffer	55 μl	25 μl
total	110 μl	50 μl

3、上芯片，65 $^{\circ}\text{C}$ 17 小时，10rpm 滚动杂交

八、 芯片洗涤

- 1、取出芯片于洗液 1 中洗涤 1 分钟
- 2、再将芯片放入洗液 2 中洗涤 1 分钟（37℃）

九、 芯片扫描

- 1、Agilent 扫描仪中扫描，分辨率为 3 μ m /5 μ m，扫描仪自动以 100%扫描一次。