



Agilent 基因表达谱芯片（单标） 操作流程

单标芯片实验操作流程

一、总 RNA 的纯化

Trizol 抽提的 RNA,因纯度不高,会影响探针的标记效率和芯片杂交结果,需使用 QIAGEN

RNeasy® Kit 纯化总 RNA,详细操作原理和方法见 RNeasy Mini Protocol。

- 1、取总 RNA≤100 µg 溶解于 100 µl RNase free 水中,加入 350 µl Buffer RLT 并充分混匀。
- 2、加入 250 µl 无水乙醇,Tip 头充分混匀。
- 3、将共计 700 µl 含总 RNA 的溶液转入套在 2 ml 离心管内的 RNeasy 柱子内,13200rpm 离心 15sec,弃去滤过液。
- 4、吸取 350 µl Buffer RW1 到 RNeasy mini 柱子内,13200rpm 离心 15sec,弃去滤过液。
- 5、将 10µl 的 DNase I 加入到 70µl 的 Buffer RDD,混匀。
- 6、将 80µl 的 mix 加入到柱子内,室温放置 15min。
- 7、吸取 350 µl Buffer RW1 到 RNeasy mini 柱子内,13200rpm 离心 15sec,弃去滤过液。
- 8、吸取 500 µl Buffer RPE 到 RNeasy mini 柱子内,13200rpm 离心 15sec,弃去滤过液。
- 9、重复步骤 8 一次。
- 10、换新的套管,13200rpm,2min。并将柱子转入到洗脱管中。
- 11、将 RNeasy mini 柱子转入收集管中。
- 12、吸取 30 µl RNase free 水,静置 1min,13200rpm 离心 1min。
- 13、重新将洗脱管中的 30ul 样品转回柱子,静置 1min,13200rpm 离心 1min。
- 14、Nano Drop 测得 RNA 浓度和 260/280。

二、荧光标记

(一) 准备单标的 spike in。

按照不同的 RNA 起始量,用 Dilution Buffer 稀释 spike-in。

起始 RNA		稀释情况				加样
总 RNA (ng)	mRNA (ng)	1st	2nd	3rd	4th	
10		1: 20	1: 25	1: 20	1:10	2
25		1: 20	1: 25	1: 20	1: 4	2
50		1: 20	1: 25	1: 20	1: 2	2
100		1: 20	1: 25	1: 20		2
200		1: 20	1: 25	1: 10		2
	5	1: 20	1: 25	1: 20		2

（二）反转录

1、配置如下反应溶液：

总 RNA 10–200ng	1.5μl
稀释好的 one-dye spike in	2.0μl
T7 Promoter Primer	0.8μl
Nuclease-free water (white cap)	1.0μl
总体积	5.3μl

2、PCR 仪器上 65℃保温 10min，冰浴 5min。

3、同时将 5X first strand buffer 在 80℃预热 3min，室温备用。

4、配置反转录 mix

5X First Strand Buffer	2.0μl
0.1 M DTT	1.0μl
10 mM dNTP mix	0.5μl
AffinityScript RNase Block Mix	1.2μl
总体积	4.7μl

5、将上述 4.7μl mix 加入变性后的冰浴的 RNA 中，混匀，离心。

6、PCR： 40℃反应 2 小时；70℃灭活 15 分钟；4℃反应 5 分钟。

（三）荧光标记

1、配置标记 mix

Nuclease-free water	0.75μl
5* transcription buffer	3.2μl
0.1M DTT	0.6μl
NTP mix	1.0μl
T7 RNA Polymerase Blend	0.21μl
Cy3-CTP	0.24μl
总	6.0μl

2、加入上述 6.0μl mix，混匀，离心。

3、PCR： 40℃反应 2 小时； 4℃反应 5 分钟。

（四）标记产物纯化

- 1、加 84ul 的 Nuclease-free water，总体积至 100ul。
- 2、加 350ul 的 RLT,混匀。
- 3、加 250ul 的无水乙醇，混匀，不要离心。
- 4、将 700ul 的 mix，转到柱子上。13000rpm，4℃离心 30sec。丢弃流过液。
- 5、加 500ul 的 RPE, 13000rpm，4℃离心 30sec。丢弃流过液。
- 6、另加 500ul 的 RPE, 13000rpm，4℃离心 60sec。丢弃流过液。。
- 7、换新的套管，13000rpm，4℃空转 30sec。并将柱子转入到洗脱管中。
- 8、加 30ul 的 Nuclease-free water，静置 1min，13000rpm，4℃离心 30sec。
- 9、重新将洗脱管中的 30ul 样品转回柱子，静置 1min，13000rpm，4℃离心 30sec。
- 10、用 NanoDrop 测得 RNA 浓度，Cy3 浓度，260/280。
- 11、探针量的要求：

1×芯片	cRNA>5ug	Cy3 >6pmol/ug
2×芯片	cRNA>3.75ug	Cy3 >6pmol/ug
4×芯片	cRNA>1.65ug	Cy3 >6pmol/ug
5×芯片	cRNA>0.825ug	Cy3 >6pmol/ug

三、芯片杂交

- 1、按以下表格配片段化 mix

Components	1x	2x	4x	8x
Cy3-cRNA	5 μg	3.75 μg	1.65 μg	600 ng
10X Blocking Agent	50 μL	25 μL	11 μL	5 μL
Nuclease-free water	bring volume to 240 μL	bring volume to 120 μL	bring volume to 52.8 μL	bring volume to 24 μL
25X Fragmentation Buffer	10 μL	5 μL	2.2 μL	1 μL
Total Volume	250 μL	125 μL	55 μL	25 μL

- 2、60℃保温 30min。
- 3、冰浴 1min，短暂离心。
- 4、加等体积的 2x GEx Hybridization Buffer HI-RPM，混匀。

Components	1x	2x	4x	8x
cRNA from Fragmentation Mix	250 μL	125 μL	55 μL	25 μL
2x GEx Hybridization Buffer HI-RPM	250 μL	125 μL	55 μL	25 μL

- 5、13,000rpm，离心 1min。
- 6、置于冰上。
- 7、将杂交仓放在水平桌面上，放上带垫圈盖玻片。

8、按以下体积加入样品。

Components	1x	2x	4x	8x
Volume Prepared	500 μ L	250 μ L	110 μ L	50 μ L
Volume to Hybridize	490 μ L	240 μ L	100 μ L	40 μ L

9、将芯片上带有“Agilent”面朝下，盖到盖玻片上。

10、迅速组装好杂交仓。

11、在杂交炉中，65℃，10rpm，杂交 17h。

四、芯片洗涤和扫描

1、洗液 1 和洗液 2 加入 2ml 的 10% Triton X-102，洗液 2 需要 37℃ 预热过夜。

2、将已经完成杂交的芯片从杂交炉中取出，拆开杂交仓，按以下步骤洗涤芯片。

拆片	GE Wash Buffer 1	室温	
洗 1	GE Wash Buffer 1	室温	1min
洗 2	GE Wash Buffer 2	37° C	1min

3、将洗好的芯片装入片夹中，放入扫描仪进行扫描。

扫描参数如下：

规格	Dye channel	Scan region	Scan resolution (μ m)	Tiff
1×244K 2×105K 4×44K 8×15K	Green	Scan Area (61 x 21.6 mm)	5	20 bit
1×1M 2×400K 4×180K 8×60K	Green	Scan Area (61 x 21.6 mm)	3	20 bit

仪器和试剂

1、主要仪器

仪器名称	公司	型号 Cat#
Thermocycler	MJ	PTC-100
Hybridization oven	Agilent technologies Santa Clara, US	G2545A
Hybridization Chamber	Agilent technologies Santa Clara, US	G2534A
Agilent Microarray Scanner	Agilent technologies Santa Clara, US	G2565CA
NanoDrop ND-1000 UV-VIS spectrophotometer	Nanodrop	ND1000

2、主要试剂

试剂名称	公司	货号 Cat#
RNeasy mini Kit(250)	QIAGEN GmbH, Germany	74106
RNeasy micro Kit(50)	QIAGEN GmbH, Germany	74106
RNase-free DNase set(50)	QIAGEN GmbH, Germany	79254
Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color	Agilent technologies Santa Clara, US	5190-2305
RNA Spike-In Kit, One-Color	Agilent technologies Santa Clara, US	5188-5282
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent technologies Santa Clara, US	5188-5242
Gene Expression Wash Buffer Kit	Agilent technologies Santa Clara, US	5188-5327