

AFFYMETRIX

WT 表达谱芯片

操作流程

一 总 RNA 的纯化 (RNeasy® Kit)

通常在使用TRIzol法抽提组织总RNA时，因为方法的限制，造成总RNA的纯度降低，影响探针的标记和芯片杂交。所以需使用QIAGEN RNeasy Kit进一步的纯化。详细操作原理和方法见Rneasy Mini Protocol for RNA Cleanup。

- 1 根据需纯化的样品数配制DNase I混合液，每个样品需要80μl的DNase I混合液，按10μl DNase I的储存液加入70μl Buffer RDD配制。
- 2 取经质检合格的总RNA≤100μg溶解于100μl RNase-free的水中，再加入350μl Buffer RLT并充分混匀
- 3 加入250μl无水乙醇，Tip头充分混匀。
- 4 将共计700μl含总RNA的溶液转入套在2ml离心管内的RNeasy mini柱子内，8,000g离心15 - 30秒，弃去滤过液。
- 5 加350μl Buffer RW1到离心柱内。盖上管盖，8,000g离心15s，弃去滤过液。
- 6 直接加入DNase I混合液（80μl）到离心柱膜上，室温放置15分钟。
- 7 加350μl Buffer RW1到离心柱内。盖上管盖，8,000g离心15s，弃去滤过液。
- 8 吸取500μl Buffer PRE到RNeasy mini柱子内，8,000g离心洗涤15秒，弃去滤过液，再用500μl Buffer PRE在8,000g离心洗涤2分钟，弃去滤过液和2ml套管，将RNeasy mini柱子转入一新的1.5ml Eppendorf管中。
- 9 吸取40μl RNase free的水，≥8000g离心洗脱1分钟。
- 10 重复步骤9一次。
- 11 测定 OD 值（通常 OD 数值在 1.8-2.1 之间）

二 反转录合成双链 cDNA

A、第一链 cDNA 合成

- 1、加 5 μ L 浓度调整到 20ng/ μ L (100ng) 的总 RNA 到反应管中。
- 2、按下表配制一链反应混合液

Component	1 sample(μ L)
First-Strand Buffer	4
First-Strand Enzyme	1
Total Volume	5

分装 5 μ L 上述混合液至总 RNA 反应管中。

- 3、轻柔混和，轻甩后，将上述混合液于 PCR 仪中运行如下程序：25 $^{\circ}$ C，1 小时；42 $^{\circ}$ C，1 小时；4 $^{\circ}$ C，2 分钟。
- 4、孵育结束后，瞬时离心收集液体至管底，把样品放在冰上 2 分钟，立即进行第二链合成。

B、第二链 cDNA 合成

- 1、按照下表准备 Second-Strand Master Mix：

Component	1 sample (μ L)
Second-Strand Buffer	18
Second-Strand Enzyme	2
总体 Total Volume	20

加 20 μ L 以上混合液到第一链 cDNA 合成反应管中，至总体积 30 μ L，混匀。

- 2、预先把 PCR 仪调至 16°C，放入反应管，PCR 仪中运行如下程序：16°C，1 小时；65°C，10 分钟；4°C，2 分钟。
- 3、孵育结束后，瞬时离心收集液体至管底，把样品放在冰上，立即进行体外转录。

三 体外转录及 cRNA 纯化

A、体外转录

1、在室温，按下表准备混和液：

Component	1 sample(μL)
IVT Buffer	24
IVT Enzyme	6
Total Volume	30

加入 30μL 混合液至 30μL 双链 cDNA 溶液中，轻轻混匀上述混合物，瞬时离心 5 秒。

2、40℃ 孵育 16 小时后放置于 4℃。

3、如果不立即纯化，可以暂时储存在-20℃或-70℃。

B、cRNA 的纯化

1、分装适量体积的 Nuclease-free Water 到排管中，放置 65℃保温，以备下面的步骤使用。

2、振荡装有纯化磁珠的瓶子，使聚集的磁珠重重新悬浮起来。在 60μL cRNA 中加入 100μL 悬浮好的磁珠，用移液器上下吸打混匀，并将混合液转移至 U 型孔板，再用移液器上下吸打混匀 10 次。室温静置 10 分钟。将 U 型孔板移至磁力架上，约 5 分钟后溶液变澄清。小心地吸出上清液并弃去。

3、在每个孔中加入 200μL 80% 乙醇，室温静置 30 秒。小心地吸出上清液并弃去，不要

碰到磁珠。该步骤重复两次（共三次洗涤），最后一次吸出上清后，静置 5 分钟，以干燥磁珠至无可见的液体，但不要过分干燥。

4、将 U 型孔板从磁力架上取下，在每个孔中加入 27 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热好的无核酸酶水，孵育 1 分钟。用移液器上下吹打 10 次，然后将 U 型孔板移至磁力架上并静置 5 分钟。小心吸取含有单链 cDNA 的上清至一个新的无核酸酶离心管中，并将离心管置于冰上。

5、Nanodrop 2000 测定 cRNA OD 值。

四 第二轮单链 cDNA 合成及 cDNA 纯化

A、第二轮单链 cDNA 合成

- 1、将上述 cRNA 调整至 625ng/μL，即 24μL，15μg 的 cRNA。
- 2、在 15μg 的 cRNA 加入 4μL 2nd-Cycle Primers。混匀，轻甩，收集液体到管底。立即开始下一步。
- 3、将上述混合液于 PCR 仪中运行如下程序：70℃，5 分钟；25℃，5 分钟；4℃，4 分钟。
混匀，离心。将样品置于冰上，立即开始下一步。
- 4、按下表配制反应混合液

Component	1 sample(μL)
2nd-Cycle ss-cDNA Buffer	8
2nd-Cycle ss-cDNA Enzyme	4
Total Volume	12

混匀，离心。将 12μL 反应混合液加入上述 28μL cRNA 与 Primer 的反应液中。再混匀，离心。

- 5、将配制好的 40μL 反应液置于 PCR 仪中，运行如下程序：25℃，10 分钟；42℃，90 分钟；70℃，10 分钟；4℃，2 分钟。程序结束后，轻甩，样品置于冰上。
- 6、在冰上，将 4μL RNase H 加入上一步的 40μL 单链 cDNA 样品中。混匀，离心。收集液体到管底，立即进行下一步。
- 7、将 44μL 混合液于 PCR 仪中运行如下程序：37℃，45 分钟；95℃，5 分钟；4℃，2

分钟。混匀，离心。

8 在离心后的混合液中加入 11 μ L 无核酸酶水。混匀，离心。

B、cDNA 纯化

1、分装适量体积的 Nuclease-free Water 到排管中，放置 65 $^{\circ}$ C 保温，以备下面的步骤使用。

2、振荡装有纯化磁珠的瓶子，使聚集的磁珠重重新悬浮起来。在 55 μ L 二轮扩增单链 cDNA 中加入 100 μ L 悬浮好的磁珠，用移液器上下吸打混匀，并将混合液转移至 U 型孔板。再加入 150 μ L 100% 乙醇，上下吸打混匀 10 次。室温静置 20 分钟。将 U 型孔板移至磁力架上，约 5 分钟后溶液变澄清。小心地吸出上清液并弃去。

3、在每个孔中加入 200 μ L 80% 乙醇，室温静置 30 秒。小心地吸出上清液并弃去，不要碰到磁珠。该步骤重复两次（共三次）最后一次吸出上清后，静置 5 分钟，以干燥磁珠至无可见的液体，但不要过分干燥。

4、将 U 型孔板从磁力架上取下，在每个孔中加入 30 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的无核酸酶水，孵育 1 分钟。用移液器上下吹打 10 次，然后将 U 型孔板移至磁力架上并静置 5 分钟。小心吸取含有单链 cDNA 的上清至一个新的无核酸酶离心管中，并将离心管置于冰上。

5、Nanodrop 2000 测定第二轮单链 cDNA OD 值。

五、片段化和标记

A、片断化

- 1、将上述 cDNA 调整至 176ng/ μ L，即 31.2 μ L，5.5 μ g 的 cDNA。
- 2、在冰上按下表配制片段化试剂

Component	1 sample(μ L)
Nuclease-free Water	10
10X cDNA Fragmentation Buffer	4.8
UDG, 10 U/ μ L	1
APE 1, 1,000 U/ μ L	1
Total Volume	16.8

混匀，离心。将 16.8 μ L 的片段化试剂加入 31.2 μ L 纯化后的单链 cDNA。再混匀，离心，收集液体至管底。

- 3、将 48 μ L 混合液于 PCR 仪中运行如下程序：37 $^{\circ}$ C，1 小时；93 $^{\circ}$ C，2 分钟；4 $^{\circ}$ C，2 分钟。混匀，离心。将样品置于冰上。

B、标记

- 1、转移 45 μ L 已片段化的单链 cDNA 至新管中。
- 2、在冰上按下表配制标记试剂

Component	1 sample(μ L)
-----------	--------------------

5X TdT Buffer	12
DNA Labeling Reagent, 5 mM	1
TdT, 30 U/ μ L	2
Total Volume	15

3、混匀，离心。将 15 μ L 的标记试剂加入 45 μ L 片段化后的单链 cDNA。再混匀，离心，收集液体至管底，立即进行下一步。

4、混合液于 PCR 仪中运行如下程序：37 $^{\circ}$ C，1 小时；70 $^{\circ}$ C，10 分钟；4 $^{\circ}$ C，2 分钟。混匀，离心。

六、 芯片杂交

1、将芯片和下列试剂平衡到室温 ,并将 20X Hybridization Controls 用 65°C 温育 5 分钟。

按照下表在 2mL 离心管中准备杂交液

Component	49 or 64- Format	100 or 81/4- Format	169-Format
Control Oligo B2 (3 nM)	3.7μL	2.5μL	1.7μL
20X Hybridization Controls	11μL	7.5μL	5μL
2X Hybridization Mix	110μL	75μL	50μL
DMSO	15.4μL	10.5μL	7μL
Nuclease-free Water	19.9μL	13.5μL	9.3μL
Total Volume	160μL	109μL	73μL

根据芯片格式分装适量 Hybridization Cocktail 到杂交反应管中。

2、根据芯片格式转移适量标记样品到 Hybridization Cocktail 管中。混匀，离心。

Component	49 or 64- Format	100 or 81/4- Format	169-Format
Fragmented and Labeled ss-DNA	60μL	41μL	27μL

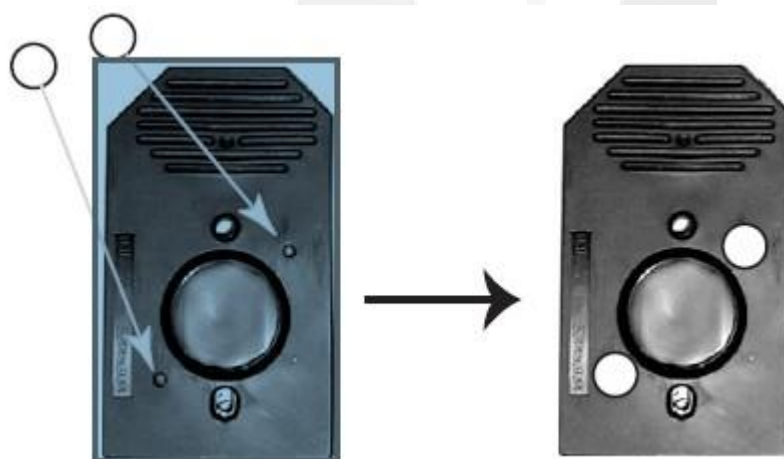
3、样品板放到预热的 PCR 仪中运行下面的程序： 95°C，5 分钟；45°C，5 分钟。

4、温浴后离心，收集样品到管底，立即进行下一步。

5、根据芯片格式加适量杂交液到芯片中。

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

6、如下图所示，小孔上贴上贴膜。



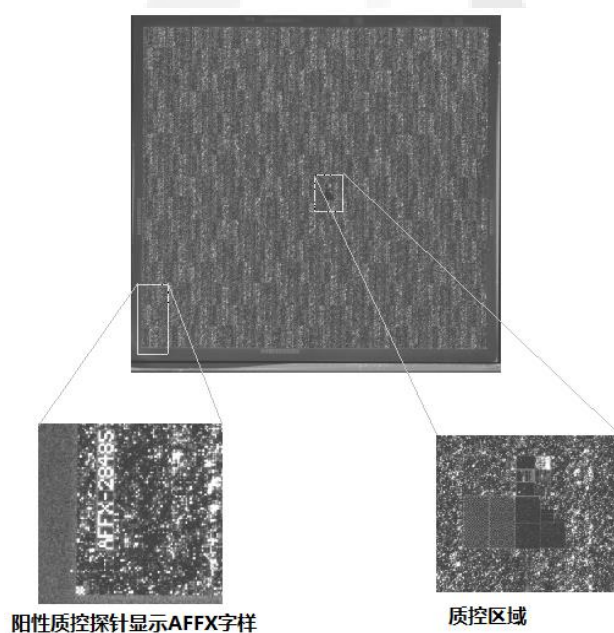
7、45°C，60 转/分钟，杂交 16 小时。

七、芯片洗涤

- 1、杂交 16 小时后，从芯片中取出杂交液，用同体积的 Array Holding Buffer 充满芯片。
- 2、分装 600 μ L Stain Cocktail 1 到标识 “1” 的管中。
- 3、分装 600 μ L Stain Cocktail 2 到标识 “2” 的管中。
- 4、分装 800 μ L Array Holding Buffer 到标识 “3” 的管中。
- 5、在洗涤工作站上运行相应洗涤程序。

八、图像采集及数据分析

- 1、芯片结果采用GeneChip® Scanner 3000 (Cat#00-00213, Affymetrix, Santa Clara, CA, US)进行扫描 ,用Command Console Software 4.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, US)读取原始数据。



- 2、原始数据数据采用Expression Console进行归一化处理。
- 3、常用芯片格式：

芯片类型	芯片格式
GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0	49-Format
GeneChip® Mouse Transcriptome Array 1.0	49-Format
GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array	100-Format
GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array	169-Format

GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array	100-Format
GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array	169-Format
GeneChip® Rat Gene 2.0 ST Array	100-Format
GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array	169-Format

附录：芯片实验所用仪器、芯片试剂表

仪器	生产商	货号
Spectrophotometer	Thermo Scientific	NanoDrop 2000
Magnetic Stand-96	Life Technologies	AM10027
Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	Life Technologies	4359659
GeneChip® Hybridization Oven 645	Affymetrix	00-0331
GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix	00-0079
GeneChip® Scanner 3000 7G	Affymetrix	00-0213

芯片/试剂	生产商	货号
GeneChip® WT PLUS Reagent Kit	Affymetrix	902280
GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit	Affymetrix	900720