

AFFYMETRIX

3' IVT 表达谱芯片

操作指南

目录

第一章 总 RNA 的纯化 (RNeasy® Kit)	3
第二章 由 RNA 合成双链 DNA	5
一、反转录合成第一链 cDNA	5
二、反转录合成第二链 cDNA	6
第三章 生物素标记 cRNA 合成	7
三、体外转录合成标记 cRNA	7
四、aRNA 纯化	7
第四章 杂交、洗涤、染色、扫描芯片	9
五、片断化	9
六、杂交	9
七、洗涤、染色和扫描	10
第五章 材料和仪器	12
材料	12
仪器	12

第一章 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）



第二章 由RNA合成双链DNA

一、反转录合成第一链 cDNA

1、准备 Poly-A Control

按下表稀释 Poly-A Control:

表 1.1

起始总 RNA 量	连续稀释				加到样品中体积
	1	2	3	4	
50 ng	1: 20	1: 50	1: 50	1:20	2 μ l
100 ng	1: 20	1: 50	1: 50	1:10	2 μ l
250 ng	1: 20	1: 50	1: 50	1:4	2 μ l
500 ng	1: 20	1: 50	1: 50	1:2	2 μ l

2、准备总 RNA/Poly-A RNA Control混合液

在冰上按照下表准备总 RNA/Poly-A RNA Control混合液。

表 1.2

Component	Volume
Total RNA Sample (50-500 ng)	variable
Diluted Poly-A RNA Controls (Fourth Dilution)	2 μ L
Nuclease-free Water	variable
Total Volume	5 μ L

3、准备第一链反应混合液

- A、 在冰上溶解一链反应试剂
- B、 在冰上按照下表准备第一链反应混合液。

表1.3

Component	Amount
3'First-Strand Buffer Mix	4 μ L
3'First-Strand Enzyme Mix	1 μ L

Total volume	5 μ L
--------------	-----------

转移 5 μ L 准备好的第一链反应混合液到反应管。

4、加RNA/Poly-A RNA Control混合液

A、转移5 μ L准备好的RNA/Poly-A RNA Control混合液到已经分装好第一链反应混合液的反应管中，至总体积10 μ L。

B、轻轻振荡混匀，低速离心收集反应液到管底。

5、运行反应

A、在PCR仪上运行42 $^{\circ}$ C 2小时。

B、反应后低速离心收集反应液到管底，放置冰上并立即进行第二链 cDNA 合成反应。

二、反转录合成第二链 cDNA

1、准备第二链反应混合液

A、在冰上按照下表准备第二链反应混合液：

表2.1

Component	Amount
Nuclease-free Water	13 μ L
3'Second-Strand Buffer Mix	5 μ L
3'Second-Strand Enzyme Mix	2 μ L
Total Volume	20 μ L

B、轻轻振荡混匀，低速离心收集反应液到管底。

C、转移20 μ L第二链反应混合液至（10 μ L）cDNA样品管中，混匀，低速离心收集反应液到管底。

2、运行反应

A、在PCR仪上运行16 $^{\circ}$ C 1小时，65 $^{\circ}$ C 10 分钟。

B、反应后低速离心收集反应液到管底，放置冰上并立即进行 IVT。

第三章 生物素标记cRNA合成

三、体外转录合成标记 cRNA

1、准备 IVT 混合液

A、在室温按照下表准备 IVT 混合液。

表3.1

Component	Amount
3'IVT Biotin Label	4 μ L
3'IVT Labeling Buffer	20 μ L
3'IVT Enzyme Mix	6 μ L
Total volume	30 μ L

B、轻轻振荡混匀，低速离心收集反应液到管底。

C、转移30 μ L IVT混合液至（30 μ L）双链cDNA样品管中，混匀，低速离心收集反应液到管底。

2、运行反应

A、在PCR仪上运行40℃，时间长度依赖于起始RNA投入量，见下表。

表3.2

RNA Amount	IVT Incubation Time
50 – 250 ng	16 hours
100 – 500 ng	4 hours

3、立即纯化或-20℃保存。

四、aRNA 纯化

提前在65℃预热Nuclease-free Water 10分钟以上。

1、加Purification Beads混合液

A、加100 μ L Purification Beads混合液到每个样品(60 μ L)。

B、转移样品到U型板。

C、用枪上下混匀10次。

2、 aRNA Binding

A、孵育10分钟。

3、 RNA Binding磁珠收集

A、转移U型板到磁力架上放置约5分钟。

B、小心吸取上清，丢弃，取下U型板。

4、 洗涤磁珠

A、加200 μ L 80% ethanol Wash Solution到每个样品，振荡30 秒。

B、小心吸取上清，丢弃。

C、重复A-B二次，室温干燥5分钟至无液体。

5、 aRNA 洗脱

A、加27 μ L预热的（65℃）Nuclease-free Water到每个样品中孵育1 分钟，从磁珠上洗脱下纯化后的aRNA。

B、用枪上下混匀10次

C、转移U型板到磁力架上放置约5分钟。

D、转移上清到一个新的nuclease-free管中。

保存 aRNA 在-20℃以下的温度或者放在冰上进行定量和片断化。

第四章 杂交、洗涤、染色、扫描芯片

五、片断化

1、准备aRNA片断化混合液。

表5.1

Component	49/64 Format	1 00 or 81/4-Format	169/400-Format
aRNA	15 μ g (in 32 μ L)	12 μ g (in 25.6 μ L)	7.5 μ g (in 16 μ L)
3' Fragmentation Buffer	8 μ L	6.4 μ L	4 μ L
Nuclease-free Water	Variable (up to 40 μ L final volume)	Variable (up to 32 μ L final volume)	Variable (up to 20 μ L final volume)

2、片断化反应。

A、94℃反应35分钟。

B、反应结束后立即放置冰上。

3、电泳检测片断化产物片段大小，约为35-200nt。

4、立即进行杂交实验或冻存。

六、杂交

1、按照下表根据杂交芯片种类准备杂交液。

表6.1

Component	49 (Standard) / 64 Format	100 (Midi)	169 (Mini) / 400 (Micro)	Final Dilution
Fragmented and Labeled aRNA	11 μ g (29.4 μ L)	10 μ g (26.7 μ L)	5 μ g (13.3 μ L)	0.05 μ g/ μ L
Control Oligonucleotide B2 (3 nM)	3.7 μ L	3.3 μ L	1.7 μ L	50 pM
20X Hybridization Controls	11 μ L	10 μ L	5 μ L	1.5, 5, 25, And

(bioB, bioC, bioD, cre)				100 pM respectively
2X Hybridization Mix	110 μ L	100 μ L	50 μ L	1X
DMSO	22 μ L	20 μ L	10 μ L	10%
Nuclease-free Water	43.9 μ L	40 μ L	20 μ L	
Total Volume	220 μ L	200 μ L	100 μ L	

- 2、在室温平衡芯片。
- 3、99℃加热杂交液5分钟。
- 4、同时加适量（见表6.2）预杂交液到芯片。

表6.2

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

- 5、芯片预热10分钟。
- 6、杂交液99℃加热后，45℃放置5分钟。
- 7、最大速度离心杂交液5分钟。
- 8、加杂交液到芯片里，45℃，60rpm杂交16小时。

七、洗涤、染色和扫描

- 1、准备好洗涤工作站和扫描仪。
- 2、分别分装 600 μ L stain1，600 μ L stain2，800 μ L Array Holding Buffer，放置到洗涤工作站的相应位置。
- 3、选择相应的洗涤程序，按下软件开始洗涤染色按钮进行洗涤染色芯片。

4、芯片洗涤染色后放进扫描仪，按下软件开始扫描按钮进行扫描芯片。



第五章 材料和仪器

材料

1. RNeasy mini kit, QIAGEN, P/N 74104
2. 3' IVT Express Kit , Affymetrix, P/N 902415
3. GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit, Affymetrix, P/N 900720

仪器

1. Hybridization Oven 645: Affymetrix, 00-0331 (110/220V)
2. Fluidics Station 450: Affymetrix, P/N 00-0079
3. GeneChip® Scanner 3000: Affymetrix, P/N 00-00212