

# Nugen FFPE

## 操作流程

## 一． 样本前处理

如果客户使用的 RNA 抽提试剂盒不包括去交联的步骤，按照以下步骤去交联：

1. 加 2.5 $\mu$ L 总 RNA(100ng)到 8 连管中。
2. 加入 2.5 $\mu$ L100mM Tris-HCl (pH 8.0)。
3. 70 $^{\circ}$ C 孵育样本 15 分钟，然后冷却至 4 $^{\circ}$ C。
4. 稍离心，放置冰上。
5. 立即进行第一链 cDNA 合成。

## 二.cDNA 第一链合成

从-20 $^{\circ}$ C中取出第一链引物（蓝色：A1），第一链混合缓冲液（蓝色：A2），第一链合成酶（蓝色：A3）和无核酸酶水（绿色：D1）。

1. 稍离心 A3 后置于冰上，其他试剂置于室温融化，包括无核酸酶水。融化后振荡、稍离心并将试剂放置冰上。
2. 在 RNA 中加入 2 $\mu$ L A1 VER8 。
3. 盖上盖子并轻弹 PCR 管 6-8 次，在微型离心机中轻微离心 2s 后置于冰上。
4. 将 PCR 管放置于预热至 65 $^{\circ}$ C的 PCR 仪中孵育 2 分钟，取出后置于冰上迅速冷却。
5. 引物退火结束后，在带盖子的 1.5 $\mu$ L 离心管中按表 1 的体积比例混合 A2 和 A3 以

制备第一链反应混合液：

Table 1 First Strand Master Mix:

First Strand Buffer Mix (blue: A2 VER 3)	First Strand Enzyme Mix (blue: A3 VER 1)
2.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L

6. 将 PCR 管在微型离心机中离心 2s ,在每个 PCR 管中加入 3 $\mu$ L 的第一链反应混合液。

7. 盖上盖子并轻弹 PCR 管 6-8 次，在微型离心机中轻微离心 2s 后置于冰上。
8. 将 PCR 管放置于预热好的 PCR 仪中。按照以下程序进行反应：  
  
4°C – 2 分钟；  
  
25°C – 30 分钟；  
  
42°C – 15 分钟；  
  
70°C – 15 分钟，4°C 恒温放置。
9. 待温度降至 4°C，从 PCR 仪中取出反应管，轻弹 6-8 次，离心 2s 后置于冰上。

### 三. cDNA 第二链合成

1. 从 4°C 取出 Agencourt RNAClean XP purification beads，放置于室温备用。
2. 从 -20°C 中取出第二链混合缓冲液（黄色：B1）和第一链合成酶（黄色：B2）。
3. 稍离心 B2 后放置冰上。
4. 在室温下融化 B1，振荡混匀，稍离心后放置冰上。
5. 在带盖子的 1.5μL 离心管中按表 2 的体积比例混合 B1 和 B2 以制备第二链反应混合液：

Table 2 Second Strand Master Mix:

Second Strand Buffer Mix (yellow: B1 VER 3)	Second Strand Enzyme Mix (yellow: B2 VER 2)
9.7μL	0.3μL

6. 在每个第一链反应管中加入 10μL 第二链反应混合液。
7. 盖上盖子并轻弹反应管 6-8 下，在微型离心机中离心 2s 置于冰上。
8. 将 PCR 管放置于预热好的 PCR 仪中。按照以下程序进行反应：  
  
4°C – 1 分钟；  
  
25°C – 10 分钟；

50°C – 30 分钟；

80°C – 20 分钟，4°C 恒温放置。

9. 将反应管从 PCR 仪中取出，轻弹 6-8 次，微型离心机中离心 2s 后置于冰上。

## 四. 纯化 cDNA

1. 实验前应确保 Agencourt RNAClean XP beads 完全达到室温。

2. 严格按照下面的要求配制 70%乙醇洗液：使用最近开封的试剂在实验当天配制新鲜的 70%乙醇。充分混合量取的乙醇和水。

3. 颠倒试剂管来重悬磁珠。在磁珠加到样本中之前确保磁珠重悬彻底。重悬后，不能离心磁珠。

4. 在室温条件下，加 32μL ( 1.6 倍体积 ) 的磁珠到每个反应管中，用移液器吹打 10 次混合。

5. 室温放置 10 分钟。

6. 反应管在磁力架上放置 5 分钟至溶液完全清澈。

7. 反应管继续放置在磁力架上，小心地吸取 45μL binding buffer，弃之。

8. 反应管继续放置在磁力架上，加 200μL 新鲜配制的 70%乙醇，放置 30 秒钟。

9. 用移液器吸去 70%乙醇。

10. 重复洗 2 次。

11. 在磁力架上空气干燥磁珠 15-20 分钟。仔细观察每个管子确保乙醇全部挥发。

## 五. SPIA® 扩增

1. 从-20°C中取出 SPIA® 缓冲混合液 ( 红色 : C2 )，SPIA 引物混合液 ( 红色 : C1 )

和 SPIA 酶液 ( 红色 : C3 ) 。

2. 在冰上融化 C3 , 轻轻地颠倒 5 次混匀 , 稍离心后放置冰上。确保酶完全混匀并没有泡沫。

3. 室温融化 C1 和 C2 , 振荡混匀 , 稍离心后放置冰上。

4. 在带盖子的 1.5μL 离心管中按表 3 的体积比例混合 C1 , C2 和 C3 以制备 SPIA 反应混合液。

注意 : C3 必须是最后加入。

Table 3 SPIA Master Mix:

Spia® Buffer Mix (red: C2 VER10)	Spia® Primer Mix (red: C1 VER9)	Spia® Enzyme Mix (red: C3 VER7)
80μL	40μL	40μL

5. 加 160μL 的 SPIA Master Mix 到结合在干的磁珠上的双链 cDNA 的反应管中。使用设置到 80μL 的移液器剧烈吹打 10 次。最大限度地重悬磁珠 , 从管壁上吹下大部分的磁珠。

6. 转移一半的反应体积 ( 80μL ) 至新管中。

7. 将 PCR 管放置于预热好的 PCR 仪中。按照以下程序进行反应 :

4°C – 1 分钟 ;

47°C – 60 分钟 ;

95°C – 5 分钟 ; 4°C 恒温放置。

8. 从 PCR 仪中取出反应管 , 稍离心后放置冰上。

9. 合并两个分装一半体积反应液的反应管。

10. 转移反应管到磁力架上 , 放置 5 分钟 , 至溶液完全清澈。

11. 小心吸取全部上清液 , 转移到一个新管中。这时可以丢弃磁珠。

## 六. 纯化已扩增的 cDNA

1. 取一新的 1.5mL 离心管，加入 800 $\mu$ L QIAGEN PB 缓冲液。
2. 加入 160 $\mu$ L 扩增的 cDNA 产物。
3. 振荡 5s 后再离心 2s。
4. 将 QIAquick® 纯化柱放入收集管中。
5. 取 480 $\mu$ L 样本混合液加入到纯化柱中，13,000rpm 离心 1 分钟。弃废液，将纯化柱重新放于收集管中。
6. 将剩余的样本混合液加到纯化柱中，13,000 rpm 离心 1 分钟。弃废液。将纯化柱放回收集管中。
7. 加入 700 $\mu$ L 80%的乙醇。13,000 rpm 离心 1 分钟。弃废液。
8. 重复步骤 7 一次。
9. 13,000rpm 离心 1 分钟，去除残液。
10. 用吸水纸去除纯化柱末端的残液。
11. 将纯化柱放置一新的收集管中，做标示。
12. 在纯化柱的中央加入 30 $\mu$ L 无核酸酶水（绿色：D1）。
13. 室温孵育 5 分钟。
14. 13,000rpm 离心 1 分钟收集约 30 $\mu$ L 纯化的 cDNA 样本。
15. 涡旋混合样本，瞬时离心。
16. 测定吸收值前用水 1：20 稀释 cDNA，Nanodrop 测定 O.D.260，O.D.280 和 O.D.320。
17. 纯度：O.D.260–320/O.D.280–320 > 1.8。

18. 产量：假设 1 O.D.260 单链 DNA=33 $\mu$ g/mL。

计算：总产量（微克）=（稀释样本的 O.D.260–320 值） $\times$ （稀释倍数） $\times$  33  $\times$  0.03。

19. 纯化后的 cDNA 产物可以保存在–20°C。

## 七. 片段化已扩增的 cDNA

1. 从–20°C中取出片段化缓冲混合液（橙色：FL1）和片段化酶液（橙色：FL2）。
2. 将 FL1 于室温中融化，振荡混匀 2 秒，微型离心机中离心 2s。置于冰上。
3. 上下颠倒管子 3 次混匀 FL2。在微型离心机中离心 2s 后置于冰上。
4. 在带盖子的 1.5 $\mu$ L 离心管中按表 4 的体积比例混合 FL1 和 FL2 以制备片段化反应

混合液：

Table 4 Fragmentation Master Mix:

Fragmentation Buffer Mix (orange: FL1)	Fragmentation Enzyme Mix (orange: FL2)
5 $\mu$ L	2 $\mu$ L

5. 在置于冰上的架子上放置 0.2mL PCR 管。
6. 在一个反应中，每个 PCR 管加入 25 $\mu$ L（含 5 $\mu$ g cDNA）SPIA™纯化过的 cDNA。

如果有必要，加水使每份样本的体积达到 25 $\mu$ L。

7. 每个样本中加入 7 $\mu$ L 片段化反应混合液。
8. 用移液器上下吹打 8-10 次混匀。
9. 盖上盖子，振荡并离心 2s 确保充分混匀。
10. 将反应管置于预热好的 PCR 仪中：37°C 孵育 30 分钟，95°C 孵育 2 分钟，冷却至 4°C。
11. 将反应管移出 PCR 仪，离心 2s 后置于冰上。立即做好标记。

## 八. 标记已片段化的 cDNA

1. 从-20℃取出标记缓冲液 ( 橙色 : FL3 ) , 标记液 ( 橙色 : FL4 ) 和标记酶液 ( 橙色 : FL5 ) 。
2. 将所有试剂迅速置于冰上。
3. 将 FL3 和 FL4 于室温中融化 , 振荡混匀 2s , 微型离心机中离心 2s 后置于冰上。
4. 上下颠倒管子 3 次混匀 FL5。在微型离心机中离心 2s 后置于冰上。
5. 在带盖子的 1.5μL 离心管中按表 5 的体积比例混合 FL3 , FL4 和 FL5 以制备标记反应混合液 :

Table 5 Labeling Master Mix:

Labeling Buffer Mix (orange: FL3)	Labeling Reagent (orange: FL4)	Labeling Enzyme Mix (orange: FL5)
15μL	1.5μL	1.5μL

6. 用移液器吹打混匀混合液 , 并将其低速离心后置于冰上。混合液要立即使用。
7. 将 0.2mL PCR 管置于冰上。在每份片段化后的 cDNA 样本中加入 18μL 标记反应混合液。
8. 用移液器上下吹打 8-10 次混匀。
9. 盖上盖子 , 振荡并离心 2s 确保充分混匀。
10. 将反应管置于预热好的 PCR 仪中 : 37℃孵育 60 分钟 , 70℃孵育 10 分钟 , 冷却至 4℃。
11. 反应结束后 , 将反应管从 PCR 仪中移出 , 离心 2 秒收集冷凝液。
12. 片段化且标记好的 cDNA 可立即进行芯片杂交 , 或-20℃保存。

## 九. 芯片杂交



1. 在 1.5/15mL 无核酸酶的离心管中，按表 6 配制杂交混合液：

Table 6 Hybridization Cocktail:

Component	Sample(μL)
Control Oligonucleotide B2	3.7
20×Eukaryotic Hybridization Controls (bioB, bioC, bioD, cre)	11
2×Hybridization Buffer	110
DMSO	22
Water	23.3
Total Volume	170

2. 在 0.2mL PCR 管中加入 170μL 杂交混合液。
3. 在杂交混合液中加入 50μL 片段化的、生物素标记的、扩增的 cDNA。
4. 使用前取出芯片，平衡至室温。
5. 杂交液 99°C 孵育 2 分钟，45°C 孵育 5 分钟。
6. 同时，加 200μL 预杂交液到芯片内。
7. 把加有预杂交液的芯片放到杂交炉中，45°C 转动 10 分钟预杂交。
8. 杂交混合液在离心机中以最大速度离心 5 分钟。
9. 从杂交炉中取出芯片，用移液器吸出预杂交液。每张芯片需要换一个新的枪头。
10. 加 200μL 杂交液到芯片。
11. 60 转/分钟，45°C 杂交 18 小时。

## 十. 洗涤和染色

1. 在洗涤工作站对话框中，从实验类型下拉菜单中选择实验名称。芯片类型会自动出现。
2. 在实验流程下拉菜单中，选择 FS450\_0004 (标准格式芯片)。洗涤工作站按下表工作：

Table 7:

	Fludics Station 450, FS450-0004
Post Hyb Wash #1	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
Stain	Stain the probe array for 10minutes with Stain Cocktail 1 at 25°C
Post Stain Wash	10 cycles of 4 mixes/cycle with Wash Buffer A at 25°C
2nd Stain	Stain the probe array for 10minutes with Stain Cocktail 2 at 25°C
3rd Stain	Stain the probe array for 10minutes with Stain Cocktail 3 at 25°C
Final Wash	15 cycles of 4 mixes/cycle with Wash Buffer A at 30°C. The holding temperature is 25°C
Holding Buffer	Fill the probe array with Array Holding Buffer
• Wash Buffer A = non-stringent wash buffer • Wash Buffer B = stringent wash buffer	

3. 在洗涤工作站对话框中选择运行，按照根据洗涤工作站的 LCD 窗口，开始洗片和染色。
4. 当托座位于下面或者弹出的位置，将芯片放入洗涤工作站的指定模块中，然后将托座调整到上面或者占用位置。
5. 洗涤工作站模块被使用时，需取走样本架上的离心管。
6. 如果提示 “Load Vials 1-2-3” 时，在样本架 1，2，3 位置放置 3 个实验样本管/离心管：
  - 1) 样本架 1 放置的离心管中装有 600μL Stain Cocktail 1。
  - 2) 样本架 2 放置的离心管中装有 600μL Stain Cocktail 2。
  - 3) 样本架 3 放置的离心管中装有 800μL Array Holding Buffer。
7. 向下按压针到位开始运行。
8. 运行结束后或在适当的提示下，移去上述离心管并用 3 个空离心管代替。
9. 通过下压托座到弹出位置，从洗涤工作站模块上取出芯片。

## 十一. 芯片扫描

1. 在扫描仪菜单中选择运行。也可在工具栏中点击开始键。
2. 根据扫描的芯片类型选择实验名称。
3. 一旦实验选择完成，点击开始键。
4. 打开扫描仪上的样本门，将芯片放入。不要用力将芯片放入舱内。关闭样本门。
5. 在扫描仪对话框中点击 OK，样本门自动关闭。

## 十二. 数据读取

1. 通过 Affymetrix 7G 型激光共聚焦扫描仪获取图像文件，通过 AGCC3.1 生成.cel 文件。

## 十三. 实验仪器与试剂

Ovation FFPE WTA System	NuGEN Technologies Cat. # 3403-12
FL-Ovation™ cDNA Biotin Module V2	NuGEN Technologies Cat. # 4200-12
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen Cat. # 28104
Genechip Hybridization Wash and Stain Kit	Affymetrix Cat. #900720
GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit (20x Eukaryotic Hybridization Controls, Control Oligo B2)	Affymetrix Cat. # 900454