

## Affymetrix® Reagenskit voor genprofieling



### Transcriptdetectiekit

#### Beoogd gebruik

Voor gebruik bij in vitro diagnostiek

De genprofielingsreagentia van Affymetrix® zijn bestemd voor het prepareren van gelabelde complementair doel-RNA uit gezuiverd totaal RNA uit verse of ingevroren klinische weefselspecimens voor hybridisatie met GeneChip®-microarrays van Affymetrix en de meting van fluorescentiesignalen van gelabeld doel-RNA met behulp van het GeneChip®-microarray instrumentsysteem van Affymetrix.

Bestemd voor gebruik met afzonderlijk door de FDA goedgekeurde GeneChip-microarrayassays van Affymetrix die met genprofielingsassays van Affymetrix gebruikt dienen te worden.

#### Overzicht

De transcriptdetectiekit is geoptimaliseerd voor de fragmentatie van het gelabelde doel-cRNA, het hybridiseren, kleuren en wassen van arrays voor expressieanalyse. Er wordt een hybridisatiecocktail geprepareerd die het gelabelde, gefragmenteerde doel-RNA en de hybridisatiecontroles bevat. Het doel-RNA wordt vervolgens gehybridiseerd met de array. Onmiddellijk na hybridisatie wordt de array gewassen en gekleurd met streptavidine-fycoerythrineconjugaat; vervolgens wordt hij gescand.

#### Onderdelen van de kit

Het analysecertificaat is verkrijgbaar op de website van Affymetrix.

Onderdeel	Ond.-nr.	Volume	Bewaren bij
<b>Transcriptdetectiekit A ond.-nr. 901307</b>			
<b>Hybridisatiemodule</b>			
■ Prehybridisatiemengsel (Pre-Hybridization Mix)	901304	6,4 ml	2 tot 8 °C
■ 2x hybridisatiemengsel (2x Hybridization Mix)	901300	4,0 ml	2 tot 8 °C
■ DMSO	901303	0,8 ml	2 tot 8 °C
■ Nucleasevrij water (Nuclease-free Water)	901332	5,0 ml	2 tot 8 °C
■ 5x fragmentatiebuffer (5x Fragmentation Buffer)	901301	192 µl	2 tot 8 °C
<b>Kleuringsmodule</b>			
■ Kleuringscocktail 1 (Stain Cocktail 1)	901305	19,2 ml	2 tot 8 °C
■ Kleuringscocktail 2 (Stain Cocktail 2)	901306	19,2 ml	2 tot 8 °C
■ Array-holdingbuffer (2 eenheden) (Array Holding Buffer)	901302	30,0 ml	2 tot 8 °C
<b>Transcriptdetectiekit B ond.-nr. 901310</b>			
Wasbuffer A (3 eenheden) (Wash Buffer A)	901308	860 ml	2 tot 8 °C
Wasbuffer B (Wash Buffer B)	901309	640 ml	2 tot 8 °C

Onderdeel	Ond.-nr.	Volume	Bewaren bij
<b>Transcriptdetectiekit C ond.-nr. 901312</b>			
Oligo B2	901313	134,4 µl	-15 tot -30 °C
20x hybridisatiecontrole (20x Hybridization Control)	901311	400 µl	-15 tot -30 °C

#### Andere, niet met deze kit meegeleverde genprofielingsreagentia

Product	Affymetrix ond.-nr.
RNA-controlekit	901285
Transcriptsynthese- en labelingskit A, B	901286

#### Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

1. Voor gebruik bij in vitro diagnostiek.
2. Vermijd microbiële verontreiniging; dit kan tot foutieve resultaten leiden.
3. Alle biologische specimens en materialen waarmee deze in aanraking komen, moeten worden gehanteerd alsof ze in staat zijn infecties over te brengen en moeten worden afgevoerd met inachtneming van de juiste voorzorgen conform de Europese, nationale en plaatselijke voorschriften. Dit betekent dat de normen van de OSHA Bloodborne Pathogens Standard (29 CFR 1910.1030) voor bloed en andere mogelijk infectieuze materialen waarop deze wet van kracht is, moeten worden nageleefd. Pipetteer nooit met de mond. Zorg dat het specimen niet in aanraking komt met de huid en slijmvliezen.
4. De gebruikelijke voorzichtigheid is geboden tijdens het verkrijgen, hanteren en afvoeren van mogelijk carcinogene reagentia.
5. Tijdens alle stappen van deze procedure is voorzichtigheid geboden om kruisverontreiniging van monsters te voorkomen, omdat dit foutieve resultaten tot gevolg kan hebben.
6. Gebruik wanneer mogelijk poedervrije handschoenen om het introduceren van poederdeeltjes in het monster of in de materialen van de kit tot een minimum te beperken.
7. Wanneer dit product open is, is het 30 dagen lang stabiel mits het bij de aanbevolen opslagtemperatuur wordt bewaard.
8. Het is aangetoond dat de werking van DMSO, Oligo B2 en de 20x hybridisatiecontrole gedurende maximaal acht vries/dooi-cycli niet wordt beïnvloed.

#### Veiligheidsinformatie

Veiligheidsinformatiebladen (MSDS, Material Safety Data Sheet) zijn verkrijgbaar op [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com). Als een product een kit is of met meer dan één materiaal wordt geleverd, dient u het veiligheidsinformatieblad voor elk onderdeel te raadplegen voor informatie over gevaren.

#### Let op:

DMSO (dimethylsulfoxide): Ontbrandbare vloeistof, bijtend middel. Wordt gemakkelijk door de huid geabsorbeerd [CAS-nr. 67-68-5].

Het prehybridisatiemengsel, het 2x hybridisatiemengsel, de 5x fragmentatiebuffer, kleuringscocktail 1, kleuringscocktail 2, de array-holdingbuffer, wasbuffer A en wasbuffer B bevatten ≤ 0,10% natriumazide [CAS-nr. 26628-22-8].

#### Indicaties van instabiliteit of deterioratie

Inspecteer de verpakkingen bij ontvangst. Gebruik de reagentia niet als de reagensbuisjes geopend of doorgeprikt zijn. Neem voor klantenservice of technische ondersteuning contact op met Affymetrix.

#### Workflowprocedures

##### Procedure 1: Preparatie van de cRNA-fragmentatiereactie

1. Meng de 5x fragmentatiebuffer door middel van voorzichtig vortexen en centrifugeer hem kortstondig omlaag om de inhoud onder in het buisje op te vangen.
2. Tabel 1.0 toont het fragmentatiereactiemengsel voor cRNA-monsters met een eindconcentratie van 0,5 µg/µl. Bereken met behulp van de aangepaste cRNA-opbrengst het cRNA-volume dat nodig is om 15 µg aan de fragmentatiereactie toe te voegen.

**Tabel 1.0 Voorbeeld van de preparatie van de fragmentatiereactie**

Onderdeel	Hoeveelheid of volume
cRNA	15 µg
5x fragmentatiebuffer (5x Fragmentation Buffer)	6 µl
Nucleasevrij water (variabel) (Nuclease-free Water)	Voor uiteindelijk volume van 30 ml
Totaal volume	30 µl

3. Stel de reactie op in een stripbuisje van 0,2 ml.
4. Meng de inhoud door middel van voorzichtig vortexen en centrifugeer deze kortstondig omlaag om de inhoud onder in het buisje op te vangen.
5. Breng de stripbuisjes over naar een PCR-apparaat, dat is ingesteld op 35 minuten bij 94 °C en laten staan bij 4 °C. Dek de buisjes af met de verwarmde deksel. Start de methode en bevestig het juiste volume van de reactie voor deze stap: 30 µl.
6. Ga verder met procedure 2.

### Procedure 2: Hybridisatie

Dit gedeelte beschrijft de preparatie voor een 49-microtiter-array.

**NB:** DMSO wordt een vaste stof als het bij 4 °C wordt bewaard. Zorg dat het reagens helemaal is ontdooid voordat u het gebruikt. Het verdient aanbeveling DMSO na het eerste gebruik bij kamertemperatuur te bewaren.

**NB:** Stel de temperatuur van de drogewarmteblokken in op 45 °C, 65 °C en 99 °C.

1. Verwijder Oligo B2 en de 20x hybridisatiecontrole uit de vriezer en laat deze bij kamertemperatuur ontdoien.

**BELANGRIJK:** Het is van het grootste belang dat voorraden 20x hybridisatiecontrole 5 minuten lang tot een temperatuur van 65 °C worden verwarmd om het cRNA opnieuw in suspensie te brengen alvorens aliquots aan te maken.

2. Prepareer het hybridisatiebasismengsel op kamertemperatuur voor een of meer probe arrays, zoals uiteengezet in tabel 2.0.

**Tabel 2.0 Hybridisatiebasismengsel**

Onderdeel	Volumes werkbasis-mengsel voldoende voor 1 probe array (V)	Volumes werkbasis-mengsel voldoende voor 1 probe array (V x 1,10)	Gewenst aantal probe arrays (R)	Totaal vereist volume (V x 1,10) x R	Uiteindelijke verdunding/concentratie
Oligo B2 (3 nM)	4,2 µl	4,62 µl			50 pM
20x hybridisatiecontrole (20X Hybridization Control) (bioB, bioC, bioD, cre)	12,5 µl	13,75 µl			respectievelijk 1,5, 5, 25 en 100 pM
2x hybridisatie-mengsel (2X Hybridization Mix)	125 µl	137,5 µl			1X
DMSO	25 µl	27,5 µl			10%
Nucleasevrij water (Nuclease-free Water)	58,3 µl	64,13 µl			
Totaal volume	225,0 µl	247,5 µl			

- a. Maak een aliquot aan van 225 µl hybridisatiebasismengsel in een nucleasevrij buisje van 1,5 ml.
  - b. Voeg 25 µl gefragmenteerd cRNA uit bovenstaande procedure 1.5 toe om de hybridisatiecocktail voor één probe array te prepareren. De eindconcentratie cRNA in de hybridisatiecocktail is 0,05 µg/µl.
3. Equilibreer de probe array onmiddellijk vóór gebruik op kamertemperatuur.

**NB:** Het is belangrijk dat de probe arrays helemaal op kamertemperatuur worden geëquilibreerd. Met name kunnen er barsten ontstaan in de rubberen septa, als deze niet op kamertemperatuur zijn geëquilibreerd; dit kan lekkage tot gevolg hebben.

4. Verhit de hybridisatiecocktail 5 minuten lang in een warmteblok tot een temperatuur van 99 °C.
5. Bevochtig de probe array intussen met 200 µl prehybridisatiemengsel door hem via een van de septa te vullen.
6. Incubeer de met prehybridisatiemengsel gevulde probe array 10 minuten lang op 60 tpm bij een temperatuur van 45 °C in de hybridisatieoven.
7. Breng de hybridisatiecocktail, die in bovenstaande stap 4 tot 99 °C is verhit, over naar een warmteblok met een temperatuur van 45 °C en houd hem daar 5 minuten.
8. Laat de hybridisatiecocktail 5 minuten lang op maximale snelheid in een microcentrifuge op kamertemperatuur centrifugeren om al het onoplosbare materiaal uit het hybridisatiemengsel op te vangen.
9. Verwijder de probe array uit de hybridisatieoven. Ontlucht de probe array met de tip van een schone pipet en extraheer het prehybridisatiemengsel met behulp van een micropipetteerapparaat uit de probe array. Vul de array bij met de 200 µl van de gezuiverde hybridisatiecocktail en vermijd daarbij eventueel onoplosbaar materiaal onder in het buisje.
10. Breng zorgvuldig één kleefsticker aan op beide septa. Druk ze aan om ervoor te zorgen dat de spots plat blijven. Als de kleefstickers niet plat kunnen worden aangebracht (m.a.w. als u bobbel, luchtbel, scheuren of gegolfde randen ziet), mag u niet proberen om de sticker glad te strijken. Verwijder de sticker en breng een nieuwe sticker aan.
11. Plaats de probe array in de hybridisatieoven en stel deze in op 45 °C. Laat hem draaien op 60 tpm.
12. Hybridiseer hem gedurende 17 ± 1 uur.
13. Vlak voor het einde van de 17 uur durende hybridisatie gaat u verder met stap 3 om de reagentia te prepareren voor de was- en kleuringsstappen die onmiddellijk na afloop van de hybridisatie vereist zijn.

**NB:** Voor uitgebreide informatie over het gebruik van hybridisatieoven 645 van Affymetrix kunt u de *Affymetrix Hybridization Oven 645 User's Guide* (gebruikershandleiding voor hybridisatieoven 645 van Affymetrix) (ond.-nr. 08-0255) en de *Affymetrix Hybridization Oven 645 Quick Reference Card* (beknopte naslagkaart voor hybridisatieoven 645 van Affymetrix) (ond.-nr. 08-0256) raadplegen.

### Procedure 3: Wassen en kleuren van de probe array

Na een hybridisatie van 17 ± 1 uur verwijdert u de array uit de hybridisatieoven. Verwijder de kleefstickers en ontlucht de probe array door de tip van een schone pipet in een van de septa in te brengen en extraheer de hybridisatiecocktail met een pipetteerapparaat door het resterende septum. Vul de probe array helemaal bij met 250 µl wasbuffer A.

**NB:** Zo nodig kan de probe array op dit punt maximaal 3 uur lang bij een temperatuur van 4 °C worden bewaard (tegen licht beschermd), voordat u verder gaat met wassen en kleuren. Equilibreer hem tot kamertemperatuur voordat u gaat wassen en kleuren.

### De kleuringsreagentia prepareren

Prepareer de volgende reagentia. De aangeduide volumes zijn voldoende voor 1 probe array.

1. Verwijder kleuringscocktail 1, kleuringscocktail 2 en de array-holdingbuffer uit de voorraadruimte bij 2 tot 8 °C.
2. Tik lichtjes tegen de flesjes om ze goed te mengen.
3. Maak aliquots aan met de volgende reagentia:
4. 600 µl kleuringscocktail 1 in een amberkleurig microcentrifugebuisje van 1,5 ml.
5. 600 µl kleuringscocktail 2 in een (transparant) microcentrifugebuisje van 1,5 ml.
6. 800 µl array-holdingbuffer in een (transparant) microcentrifugebuisje van 1,5 ml.
7. Centrifugeer alle buisjes omlaag om eventueel aanwezige luchtballen te verwijderen.

**NB:** Kleuringscocktail 1 is lichtgevoelig. Zorg dat u bij het aanmaken van een aliquot amberkleurige microcentrifugebuisjes gebruikt.

### Het fluidicsstation opstellen

Volg de aanwijzingen in de *Gene Profiling Reagents User Guide* (gebruikershandleiding voor genprofileringsreagentia).

### Het fluidicsstation gebruiken

Nadat u het fluidicsstation hebt opgesteld en gepriemd, kunt u nu het fluidicsstation in uw assay gebruiken.

1. Klik op de knop Fluidics op het linker workflowpaneel. De fluidicsworklist verschijnt.
2. Als u de informatie handmatig invoert, selecteert u een record met een testverzoek met het ID van de gewenste array en voert u het nummer van het fluidicsstation in het veld Station # en het modulenummer in het veld Module # in voor het testverzoek.

3. Breng de betreffende probe array in de aangewezen module van het fluidicsstation in terwijl de cartridgehendel in de stand omlaag, ofwel de uitwerpstand, staat. Na afloop controleert u of de cartridgehendel naar de stand omhoog, ofwel ingeschakeld, is teruggekeerd.
4. Verwijder microcentrifugebuisjes die in de monsterhouder van de gebruikte module(s) van het fluidicsstation resterend.
5. Als u een barcodelezer gebruikt, scan dan elke array en scan vervolgens onmiddellijk de module van het fluidicsstation die de array zal verwerken. Het array-ID op de array identificeert het juiste testverzoek dat voor dat array-ID is geregistreerd. De status van het testverzoek verandert in Ready.
6. Selecteer de testverzoeken in AMDS.
7. Klik op de knop Start op de werkbalk van het fluidicsworklistpanel.
8. Volg de instructies op het LCD-venster van het fluidicsstation door de drie buisjes met de monsters van het experiment (de microcentrifugebuisjes) in monsterhouder 1, 2 en 3 op het fluidicsstation te plaatsen.
  - a. Plaats één buisje met 600 µl kleuringscocktail 1 in monsterhouder 1.
  - b. Plaats één buisje met 600 µl kleuringscocktail 2 in monsterhouder 2.
  - c. Plaats één buisje met 800 µl array-holdingbuffer in monsterhouder 3.
  - d. Duw de naaldhendel omlaag om de naalden in positie aan te drukken en de productiegang te starten.

Wanneer de productiegang begint, geven het dialoogvenster van het fluidicsstation op de workstationcomputer en het LCD-venster de status van het wassen en de kleuring weer naarmate het protocol vordert.
9. Wanneer het protocol is voltooid, geeft het LCD-venster op het fluidicsstation het bericht EJECT & INSPECT CARTRIDGE weer.
10. Verwijder de probe arrays uit de modules van het fluidicsstation door eerst de cartridgehendel omlaag te duwen naar de uitwerpstand.
11. Controleer op het venster van de probe array of er sprake is van grote bellen of luchtzakken.
  - Als er zich geen grote bellen in de probe array bevinden, is de probe array klaar om te scannen. Trek de cartridgehendel omhoog om het wasblok in te schakelen en ga verder met procedure 4: Scan van de probe array.
  - Als er bellen aanwezig zijn, handelt u als volgt:  
Zet de probe array weer terug in de probe array-houder. Voeg 800 µl array-holdingbuffer toe aan buisje 3 in monsterhouder 3. Volg de instructies op het LCD-venster. Schakel het wasblok in door de cartridgehendel voorzichtig naar de ingeschakelde, ofwel de gesloten, stand te duwen.  
Het fluidicsstation leegt de probe array en vult hem vervolgens met een vers volume array-holdingbuffer. Wanneer dit voltooid is, geeft het LCD-venster EJECT & INSPECT CARTRIDGE weer. Verwijder de probe array nogmaals en inspecteer hem op bellen. Als er geen bellen aanwezig zijn, is hij klaar om te scannen. Trek de cartridgehendel omhoog om het wasblok te sluiten en ga verder met procedure 4: Scan van de probe array.

**NB:** Als de poging de probe array zonder bellen te vullen niet slaagt, moet de array met behulp van een micropipet handmatig worden gevuld met array-holdingbuffer. Bij overmatig wassen doet zich verlies van intensiteit van het signaal voor.

12. Als u de arrays niet meteen scant, houdt u de probe arrays op een temperatuur van 4 °C, in het donker, totdat u klaar bent om te scannen.

#### Procedure 4: Scan van de probe array

Volg de aanwijzingen in de *Gene Profiling Reagents User Guide* (gebruikershandleiding voor genprofileringsreagentia).

Uitgebreide stapsgewijze instructies voor de bovenstaande procedures zijn opgenomen in de *Affymetrix Gene Profiling Reagents User Guide* (gebruikershandleiding voor genprofileringsreagentia van Affymetrix), die te vinden is op [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com).

#### Beperkingen van de procedure

De juiste bewaring en hantering van reagentia en monsters zijn van wezenlijk belang voor de prestatie daarvan.

#### Beperkte licentie

Onderhevig aan de voorwaarden van Affymetrix m.b.t. tot uw gebruik van producten van Affymetrix kent Affymetrix u een niet-exclusieve, niet-overdraagbare, niet verder te licentiëren licentie toe voor gebruik van dit product van Affymetrix, uitsluitend overeenkomstig de handleiding en de door Affymetrix verstrekte schriftelijke instructies. U erkent en gaat akkoord dat, uitgezonderd zoals in de voorwaarden van Affymetrix uitdrukkelijk is uiteengezet, met dit product van Affymetrix geen recht op of licentie voor enig octrooi of andere intellectuele eigendom in eigenschap van of in licentie gegeven door Affymetrix, wordt overgedragen of geïmpliceerd. In het bijzonder wordt er geen recht op licentie overgedragen of geïmpliceerd voor gebruik van dit product van Affymetrix in combinatie met een product dat niet door Affymetrix voor dergelijk gebruik wordt geleverd of gelicentieerd of specifiek wordt aanbevolen.

#### Handelsmerken

Affymetrix®, Axiom™, Command Console®, DMET™, GeneAtlas™, GeneChip®, GeneChip-compatible™, GeneTitan®, Genotyping Console™, myDesign™, NetAffx®, OncoScan™, Powered by Affymetrix™, Procarta®, en QuantiGene® zijn handelsmerken of gedeponeerde handelsmerken van Affymetrix, Inc. Alle andere handelsmerken zijn eigendom van hun respectieve eigenaars.

#### Copyright

© 2009-2011 Affymetrix, Inc. Alle rechten voorbehouden.

#### Tabel met symbolen

De onderstaande tabel toont de grafische symbolen die op het productetiket, de bijsluiters en de gebruikershandleiding van Affymetrix zijn gebruikt.

Tabel 3.0 Grafische symbolen voor productinformatie

Symbool / Etiket	Tekst
	Onderdeel-/catalogusnummer
	Lotnummer
	Uiterste gebruiksdatum JJJ-MM De uiterste gebruiksdatum van de kit is de laatste dag van de maand.
	Temperatuurlimiet
	Inhoud voldoende voor "n" testen
Xi	Irriterend
	Gevaren
	Gebruiksaanwijzing raadplegen
	Fabrikant
	Medisch hulpmiddel voor <i>in vitro</i> diagnostiek
	Europese conformiteit
	Gemachtigde vertegenwoordiger in de Europese Unie

Deze bijsluiter is in vertaling verkrijgbaar op de website van Affymetrix.

#### Contactinformatie

Affymetrix, Inc.,  
3420 Central Expressway,  
Santa Clara, CA 95051 VS

Emergo Europe  
Molenstraat 15  
2513 BH, Den Haag  
Nederland  
Tel: 070.345.8570  
Fax: 070.346.7299

Neem voor technische ondersteuning contact op met Affymetrix op het betreffende onderstaande e-mailadres of telefoonnummer.

#### Affymetrix, Inc.

3420 Central Expressway  
Santa Clara, CA 95051 VS  
E-mail: [support@affymetrix.com](mailto:support@affymetrix.com)  
Tel: 1-888-362-2447 (1-888-DNA-CHIP)  
Fax: 1-408-731-5441

#### Affymetrix UK Ltd

Voyager, Mercury Park,  
Wycombe Lane, Wooburn Green,  
High Wycombe HP10 0HH  
Verenigd Koninkrijk  
E-mail: [supporteurope@affymetrix.com](mailto:supporteurope@affymetrix.com)  
Tel: +44 (0) 1628 552550  
Fax: +44 (0) 1628 552585  
[www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)