



Affymetrix® Gene Profiling- Reagenzienkit



Transkript-Nachweiskit

Verwendungszweck

In-vitro-Diagnostikum

Gene Profiling-Reagenzien von Affymetrix® sind zur Gewinnung von markierten komplementären RNA-Zielen aus der purifizierten Gesamt-RNA frischer oder eingefrorener klinischer Gewebeproben für die Hybridisierung auf GeneChip® -Microarrays von Affymetrix vorgesehen sowie zur Messung von Fluoreszenzsignalen markierter RNA-Ziele mit Hilfe des GeneChip® -Microarray-Gerätesystems von Affymetrix.

Vorgesehen zur Verwendung mit separat von der FDA zugelassenen GeneChip-Mikroarray-Assays von Affymetrix, die die Verwendung von Gene Profiling-Reagenzien von Affymetrix erfordern.

Zusammenfassung

Der Transkript-Nachweiskit ist für die Fragmentierung des markierten cRNA-Ziels, die Hybridisierung, die Färbung und die Wäsche von Arrays für Genexpressionsanalysen optimiert. Es wird ein Hybridisierungscocktail angesetzt, der die markierten, fragmentierten Ziel- und Hybridisierungskontrollen enthält. Das Ziel wird sodann auf dem Array hybridisiert. Das Array wird unmittelbar nach der Hybridisierung gewaschen und mit einem Konjugat aus Streptavidin und Phycoerythrin gefärbt und anschließend gescannt.

Kitbestandteile

Das Analysezertifikat ist auf der Affymetrix-Website erhältlich.

Bestandteil	Bestell-Nr.	Volumen	Lagerung
Transkript-Nachweiskit A, Bestell-Nr. 901307			
Hybridisierungsmodul			
■ Pre-Hybridization Mix	901304	6,4 ml	2 bis 8 °C
■ 2x Hybridization Mix	901300	4,0 ml	2 bis 8 °C
■ DMSO	901303	0,8 ml	2 bis 8 °C
■ Nuclease-free Water	901332	5,0 ml	2 bis 8 °C
■ 5x Fragmentation Buffer	901301	192 µl	2 bis 8 °C
Färbemodul			
■ Stain Cocktail 1	901305	19,2 ml	2 bis 8 °C
■ Stain Cocktail 2	901306	19,2 ml	2 bis 8 °C
■ Array Holding Buffer (2 Einheiten)	901302	30,0 ml	2 bis 8 °C
Transkript-Nachweiskit B, Bestell-Nr. 901310			
Wash Buffer A (3 Einheiten)	901308	860 ml	2 bis 8 °C
Wash Buffer B	901309	640 ml	2 bis 8 °C
Transkript-Nachweiskit C, Bestell-Nr. 901312			
Oligo B2	901313	134,4 µl	-15 bis -30 °C
20x Hybridization Control	901311	400 µl	-15 bis -30 °C

Weitere, nicht in diesem Kit enthaltene Gene Profiling-Reagenzien

Produkt	Affymetrix-Bestell-Nr.
RNA-Kontrollkit	901285
Transkript-Synthese- und Markierungskit A, B	901286

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. In-vitro-Diagnostikum.
2. Mikrobielle Kontaminationen vermeiden, da sie zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.
3. Alle biologischen Proben sowie alle mit diesen in Kontakt kommenden Materialien sind als potenziell infektiös zu handhaben und mit den entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen in Übereinstimmung mit den nationalen, landesweiten und lokalen Auflagen zu entsorgen. Dazu zählt die Einhaltung der OSHA-Norm Bloodborne Pathogens Standard (29 CFR 1910.1030) für Blut und sonstige potenziell infektiöse Substanzen, die diesem Erlass unterliegen. Niemals mit dem Mund pipettieren. Probenkontakt mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
4. Bei der Entgegennahme, Handhabung und Entsorgung potenziell karzinogener Reagenzien die üblichen Vorsichtsmaßnahmen ergreifen.
5. Bei allen Schritten dieses Verfahrens muss eine Kreuzkontamination von Proben vermieden werden, da dies zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann.
6. Nach Möglichkeit stets ungepuderte Handschuhe verwenden, um das Einbringen von Puderpartikeln in Proben oder Kitsubstanzen zu vermeiden.
7. Dieses Produkt ist nach dem Öffnen 30 Tage lang stabil, wenn es bei der empfohlenen Temperatur gelagert wird.
8. Die Leistung von DMSO, Oligo B2 und 20X Hybridization Control wird durch bis zu acht Gefrierzyklen nachweislich nicht beeinträchtigt.

Sicherheitsdaten

Sicherheitsdatenblätter (Material Safety Data Sheets, kurz: MSDS) stehen unter www.affymetrix.com zur Verfügung. Handelt es sich bei dem betreffenden Produkt um einen Kit oder einen Bestandteil einer Lieferung, bitte die Sicherheitsdatenblätter jedes einzelnen Bestandteils im Hinblick auf Gefahrendaten einsehen.

Vorsicht:

DMSO (Dimethylsulfoxid): brennbare Flüssigkeit, reizend. Leicht durch die Haut absorbierbar [CAS-Nr. 67-68-5].

Pre-Hybridization Mix, 2X Hybridization Mix, 5X Fragmentation Buffer, Stain Cocktail 1, Stain Cocktail 2, Array Holding Buffer, Wash Buffer A und Wash Buffer B enthalten ≤ 0,10 % Natriumazid [CAS-Nr. 26628-22-8].

Anzeichen für Instabilität oder Verfall

Die Packungen nach Erhalt inspizieren. Die Reagenzien nicht verwenden, falls die Reagenzröhrchen geöffnet oder punktiert sind. Für Kundendienst- oder technische Unterstützungsangelegenheiten bitte an Affymetrix wenden.

Arbeitsabläufe

Verfahren Nr. 1: Vorbereitung der cRNA-Fragmentierungsreaktion

1. Den 5X Fragmentation Buffer behutsam auf dem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt am Röhrchenboden zu sammeln.
2. Tabelle 1.0 zeigt das Fragmentierungsreaktionsgemisch für cRNA-Proben mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/µl. Anhand der angepassten cRNA-Ausbeute das erforderliche cRNA-Volumen für die Zugabe von 15 µg zur Fragmentierungsreaktion ermitteln.

Tabelle 1.0 Ansetzen der Probenfragmentierungsreaktion

Bestandteil	Menge bzw. Volumen
cRNA	15 µg
5X Fragmentation Buffer	6 µl
Nuclease-free Water (variable)	zu 30 µl Endvolumen
Gesamtvolumen	30 µl

3. Die Reaktion in einem 0,2-ml-Streifenröhrchen ansetzen.
4. Behutsam auf dem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt am Röhrchenboden zu sammeln.

- Die Streifenröhrchen in einen Thermocycler transferieren. Auf 35 min. bei 94 °C einstellen und bei 4 °C aufbewahren. Mit dem beheizten Deckel abdecken. Die Methode einleiten und das korrekte Reaktionsvolumen für diesen Schritt bestätigen: 30 µl.
- Mit Verfahren Nr. 2 fortfahren.

Verfahren Nr. 2: Hybridisierung

Dieser Abschnitt beschreibt das Anfertigen eines Arrays im 49er-Format.

Hinweis: DMSO verfestigt sich bei einer Lagertemperatur von 4 °C. Bitte sicherstellen, dass das Reagenz vor seinem Gebrauch vollständig aufgetaut ist.

Hinweis: Die Temperatur der Trockenheizblöcke auf 45 °C, 65 °C und 99 °C einstellen.

- Oligo B2 und 20X Hybridization Control aus dem Gefrierschrank entnehmen und bei Raumtemperatur auftauen.

WICHTIG: Es ist von größter Bedeutung, dass 20X Hybridization Control-Vorräte 5 Minuten lang auf 65 °C erwärmt werden, um die cRNA vor dem Aliquotieren wieder vollständig zu suspendieren.

- Das Hybridisierungs-Mastermix für ein oder mehrere Probenarray(s) gemäß Tabelle 2.0 bei Raumtemperatur ansetzen.

Tabelle 2.0 Hybridisierungs-Mastermix

Bestandteil	Mastermix-Arbeitsvolumina für 1 Sondenarray (V)	Mastermix-Arbeitsvolumina für 1 Sondenarray (V x 1,10)	Gewünschte Sondenarray-Anzahl (R)	Erforderliches Gesamtvolumen (V x 1,10) x R	Endverdünnung/Konzentration
Oligo B2 (3 nM)	4,2 µl	4,62 µl			50 pM
20X Hybridization Control (bioB, bioC, bioD, cre)	12,5 µl	13,75 µl			1,5, 5, 25 bzw. 100 pM
2X Hybridization Mix	125 µl	137,5 µl			1X
DMSO	25 µl	27,5 µl			10%
Nuclease-free Water	58,3 µl	64,13 µl			
Total Volume	225,0 µl	247,5 µl			

- Ein 225-µl-Aliquot des Hybridisierungs-Mastermixes in ein nukleasefreies 1,5-ml-Röhrchen geben.
 - Zum Ansetzen des Hybridisierungs-Cocktails für ein Sondenarray 25 µl fragmentierte cRNA aus dem im Vorhergehenden beschriebenen Verfahrensschritt Nr. 1.5 hinzugeben. Die cRNA-Endkonzentration im Hybridisierungs-Cocktail beträgt 0,05 µg/µl.
- Das Sondenarray unmittelbar vor Gebrauch auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen.

Hinweis: Es ist wichtig, dass die Sondenarrays vollständig auf Raumtemperatur äquilibrieren können. Insbesondere bekommen die Gummisepten leicht Risse, wenn sie nicht auf Raumtemperatur äquilibriert werden. Dies kann Leckagen zur Folge haben.

- Den Hybridisierungs-Cocktail in einem Heizblock 5 Minuten lang auf 99 °C erhitzen.
- Unterdessen das Sondenarray mit 200 µl Pre-Hybridization Mix befeuchten, das dazu durch eines der Septen eingefüllt wird.
- Das mit Pre-Hybridization Mix gefüllte Sondenarray 10 Minuten lang bei 45 °C und 60 U/min. im Hybridisierungssofen inkubieren.
- Den im vorhergehenden Schritt Nr. 4 bei 99 °C erhitzten Hybridisierungs-Cocktail 5 Minuten lang in einen 45-°C-Heizblock transferieren.
- Den Hybridisierungs-Cocktail in einer Mikrozentrifuge bei Raumtemperatur und maximaler Drehzahl 5 Minuten lang zentrifugieren, um alle unlöslichen Substanzen aus dem Hybridisierungsgemisch zu sammeln.
- Das Sondenarray aus dem Hybridisierungssofen nehmen. Das Sondenarray mit einer sauberen Pipettenspitze entlüften und das Pre-Hybridization Mix mit Hilfe einer Mikropipette aus dem Sondenarray extrahieren. Das Array mit den 200 µl geklärten Hybridisierungs-Cocktails auffüllen, wobei alle unlöslichen Substanzen am Röhrchenboden zu vermeiden sind.

- Auf jedes der beiden Septen behutsam einen Haftpunkt aufbringen. Druck auf den Haftpunkt ausüben, um sicherzustellen, dass er flach bleibt. Lassen sich die Haftpunkte nicht glatt anbringen, d. h. falls Erhebungen, Blasen, Risse oder gewellte Ränder erkennbar sind, nicht versuchen, den Haftpunkt zu glätten. Den Haftpunkt entfernen und einen neuen anbringen.

- Das Sondenarray im Hybridisierungssofen platzieren. Auf 45 °C einstellen und mit 60 U/min. rotieren.

- 17 ± 1 Std. hybridisieren.

- Gegen Ende der 17-stündigen Hybridisierung mit Schritt 3 fortfahren, um die Reagenzien für die Wasch- und Färbeschritte vorzubereiten, die unmittelbar nach dem Abschluss der Hybridisierung auszuführen sind.

Hinweis: Ausführliche Angaben zum Affymetrix-Hybridisierungssofen 645 enthalten das Benutzerhandbuch *Affymetrix Hybridization Oven 645 User's Guide*, Bestell-Nr. 08-0255 und die Kurzanleitung *Affymetrix Hybridization Oven 645 Quick Reference Card*, Bestell-Nr. 08-0256.

Verfahren Nr. 3: Waschen und Färben des Sondenarrays

Das Array nach der 17 ± 1 Std. dauernden Hybridisierung aus dem Hybridisierungssofen nehmen. Die Haftpunkte entfernen und das Sondenarray durch Einführen einer sauberen Pipette in eines der Septen entlüften und mit Hilfe einer Pipette den Hybridisierungs-Cocktail durch das verbleibende Septum extrahieren. Das Sondenarray vollständig mit 250 µl Wash Buffer A auffüllen.

Hinweis: Das Sondenarray kann jetzt bis zum Waschen und Färben bei 4 °C und vor Licht geschützt bis zu 3 Stunden lang gelagert werden. Vor dem Waschen und Färben bei Raumtemperatur äquilibrieren.

Vorbereiten der Färbereagenzien

Die folgenden Reagenzien vorbereiten. Die angegebenen Volumina sind ausreichend für 1 Sondenarray.

- Stain Cocktail 1, Stain Cocktail 2 und Array Holding Buffer aus der Lagerung bei 2 bis 8 °C entnehmen.
- Die Flaschen durch behutsames Auftippen gut durchmischen.
- Aliquote der folgenden Reagenzien herstellen:
- 600 µl Stain Cocktail 1 in ein bernsteinfarbenes 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen geben.
- 600 µl Stain Cocktail 2 in ein (durchsichtiges) 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen geben.
- 800 µl Array Holding Buffer in ein (durchsichtiges) 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen geben.
- Alle Röhrchen zentrifugieren, um alle evtl. vorhandenen Luftbläschen zu entfernen.

Hinweis: Der Stain Cocktail 1 ist lichtempfindlich. Beim Aliquotieren bitte unbedingt bernsteinfarbene Mikrozentrifugenröhrchen verwenden.

Einrichten der Fluidikstation

Die Anweisungen des Benutzerhandbuchs *Gene Profiling Reagents User Guide* befolgen.

Arbeiten mit der Fluidikstation

Nach dem Einrichten und Vorfüllen der Fluidikstation kann diese für den Assay genutzt werden.

- Klicken Sie auf die Schaltfläche „Fluidics“ (Fluidik) im linken Arbeitsablaufbereich. Die Fluidics Worklist (Fluidik-Arbeitsliste) wird aufgerufen.
- Wählen Sie bei manueller Dateneingabe einen Testanforderungsdatensatz mit der gewünschten Array-ID und geben Sie für die Testanforderung die Nummer der Fluidikstation in das Feld „Station #“ ein und die Modulnummer in das Feld „Module #“.
- Bei niedergedrücktem Kartuschenhebel (Auswurfposition) das entsprechende Sondenarray in das ausgewiesene Modul der Fluidikstation einsetzen. Anschließend bestätigen, dass der Kartuschenhebel wieder nach oben bewegt wurde (in die arretierte Position).
- Alle evtl. im Probenhalter des verwendeten Fluidikstationsmoduls (bzw. der verwendeten Fluidikstationsmodule) verbliebenen Mikrozentrifugenröhrchen entfernen.
- Wird mit einem Barcodeleser gearbeitet, die einzelnen Arrays scannen und unmittelbar danach das für die Arrayverarbeitung vorgesehene Fluidikstationsmodul. Die am Array befindliche Array-ID identifiziert die jeweilige, für die betreffende Array-ID registrierte Testanforderung. Der Status der Testanforderung wechselt zu „Ready“ (einsatzbereit).
- Wählen Sie die Testanforderungen in der AMDS aus.
- Klicken Sie auf die Start-Schaltfläche der Symbolleiste des Bereichs „Fluidics Worklist“ (Fluidik-Arbeitsliste).

8. Die Anweisungen im LCD-Fenster der Fluidikstation befolgen, d. h. drei Experiment-Probenröhrchen (die Mikrozentrifugenröhrchen) in die Probenhalter 1, 2 und 3 der Fluidikstation einsetzen.
 - a. Ein Röhrchen mit 600 µl Stain Cocktail 1 in Probenhalter 1 einsetzen.
 - b. Ein Röhrchen mit 600 µl Stain Cocktail 2 in Probenhalter 2 einsetzen.
 - c. Ein Röhrchen mit 800 µl Array Holding Buffer in Probenhalter 3 einsetzen.
 - d. Den Nadelhebel herunterdrücken, um die Nadeln in ihren Positionen zu arretieren und den Lauf zu starten.

Wenn der Lauf beginnt, zeigen das Dialogfeld der Fluidikstation am Arbeitsstationsbildschirm und das LCD-Fenster den Status der Wäsche und Färbung während der Protokollausführung an.

9. Nach dem Abschluss des Protokolls zeigt das LCD-Fenster der Fluidikstation die Meldung EJECT & INSPECT CARTRIDGE (Kartusche auswerfen und inspizieren) an.

10. Zum Entnehmen der Sondenarrays aus den Fluidikstationsmodulen zunächst den Kartuschenhebel in die Auswurfposition herunterdrücken.

11. Das Sondenarrayfenster auf große Blasen oder Luft einschüsse überprüfen.

- Weist das Sondenarray keine großen Blasen auf, kann es gescannt werden. Den Kartuschenhebel hochziehen, um den Waschblock zu arretieren und mit Schritt 4 fortfahren: dem Scannen des Sondenarrays.

- Bei Vorliegen von Blasen folgendermaßen vorgehen:

Das Sondenarray wieder in den Sondenarrayhalter einsetzen. 800 µl Array Holding Buffer in Probenhalter 3 geben. Die Anweisungen im LCD-Fenster befolgen. Den Kartuschenhebel behutsam nach oben in die arretierte (geschlossene) Position drücken, um den Waschblock zu arretieren.

Die Fluidikstation entleert das Sondenarray und füllt es anschließend mit einem frischen Volumen Array Holding Buffer.

Nach dem Abschluss dieses Vorgangs zeigt das LCD-Fenster EJECT & INSPECT CARTRIDGE (Kartusche auswerfen und inspizieren) an. Das Sondenarray erneut entnehmen und auf Luftblasen inspizieren. Sind keine Luftblasen vorhanden, kann das Array gescannt werden. Den Hebel hochziehen, um den Waschblock zu arretieren und mit Schritt 4 fortfahren: dem Scannen des Sondenarrays.

Hinweis: Lässt sich das Sondenarray nicht ohne Blasen füllen, das Array mit Hilfe einer Mikropipette manuell mit Array Holding Buffer füllen. Übermäßiges Waschen führt zu Signalintensitätsverlusten.

12. Werden die Sondenarrays nicht sofort gescannt, sind sie bis zum Scannen bei 4 °C im Dunkeln zu lagern.

Verfahren Nr. 4: Scannen des Sondenarrays

Die Anweisungen des Benutzerhandbuchs *Gene Profiling Reagents User Guide* befolgen.

Ausführliche schrittweise Anweisungen für die im Vorhergehenden aufgeführten Verfahren sind dem Affymetrix-Reagenz-Benutzerhandbuch (*Affymetrix Gene Profiling Reagents User Guide*) zu entnehmen, das unter www.affymetrix.com aufrufbar ist.

Grenzen des Verfahrens

Unerlässliche Voraussetzungen für eine gute Leistung sind die korrekte Lagerung und Handhabung der Reagenzien und Proben.

Beschränkte Lizenz

Affymetrix gewährt Ihnen im Rahmen der für Sie geltenden Geschäftsbedingungen zur Nutzung von Affymetrix-Produkten eine einfache, nicht übertragbare, nicht unterlizenzierbare Lizenz für die ausschließlich in Übereinstimmung mit dem Handbuch und den schriftlichen Anweisungen von Affymetrix erfolgende Nutzung dieses Affymetrix-Produkts. Sie nehmen zur Kenntnis und erklären sich damit einverstanden, dass vorbehaltlich ausdrücklich anders lautender Bestimmungen in den Geschäftsbedingungen von Affymetrix mit diesem Affymetrix-Produkt keine Rechte oder Lizenzen auf im Besitz von Affymetrix befindliche oder durch Affymetrix lizenzierte Patente oder sonstiges geistiges Eigentum gewährt oder impliziert werden. Insbesondere werden kein Rechte oder Lizenzen für die Nutzung dieses Affymetrix-Produkts in Verbindung mit einem nicht für derartige Zwecke von Affymetrix bereit gestellten, lizenzierten oder speziell empfohlenen Produkt gewährt oder impliziert.

Marken

Affymetrix®, Axiom™, Command Console®, DMET™, GeneAtlas™, GeneChip®, GeneChip-compatible™, GeneTitan®, Genotyping Console™, myDesign™, NetAffx®, OncoScan™, Powered by Affymetrix™, Procarta® und QuantiGene® sind Marken oder eingetragene Marken von Affymetrix, Inc. Alle sonstigen Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

Urheberrecht

© 2009-2011 Affymetrix, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Symboltabelle

Die folgende Tabelle enthält die Legende der grafischen Symbole, die auf dem Affymetrix-Produktetikett, in den Packungsbeilagen und im Benutzerhandbuch vorkommen.

Tabelle 3.0 Grafische Symbole für die Kennzeichnung

Symbol/ Kennzeichen	Angabe
	Teile-/Bestell-Nr.
	Chargennummer
	Verfallsdatum JJJJ-MM Kit verfällt am letzten Tag des Monats.
	Temperaturbeschränkung
	Enthält eine ausreichende Menge für < n > Tests
Xi	Reizstoff
	Gefährdungen
	Gebrauchsanweisung einsehen
	Hersteller
	Medizingerät für die <i>In-vitro</i> -Diagnostik
	Europa-Konformität
	Autorisierte Vertretung in der Europäischen Union

Übersetzungen dieser Packungsbeilage sind auf der Affymetrix-Website erhältlich.

Kontaktinformationen

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



Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH, Den Haag
Niederlande
Ruf: +31.70.345.8570
Fax: +31.70.346.7299

Bei technischen Unterstützungsangelegenheiten bitte unter der im Folgenden aufgeführten E-Mail-Adresse oder Rufnummer an Affymetrix wenden.

Affymetrix, Inc.

3420 Central Expressway
Santa Clara, CA 95051 USA
E-mail: 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
Vereinigtes Königreich
E-mail: supporteurope@affymetrix.com
Tel: +44 (0) 1628 552550
Fax: +44 (0) 1628 552585
www.affymetrix.com