

Affymetrix® Gene Profiling Reagent Kit

Kit di rilevazione dei trascritti



Usò previsto

Solo per uso diagnostico in vitro

I reagenti Gene Profiling Affymetrix sono utilizzati per la preparazione di un target di RNA complementare marcato a partire da RNA totale purificato da campioni clinici tissutali freschi o congelati per l'ibridazione di microarray GeneChip® Affymetrix e la misurazione dei segnali fluorescenti di RNA target marcato, utilizzando il sistema di strumentazione per microarray GeneChip® Affymetrix.

Il kit è destinato ad essere usato con i test per microarray GeneChip Affymetrix, approvati separatamente dall'ente statunitense FDA, specificanti l'uso dei reagenti Gene Profiling Affymetrix.

Sommario

Il kit di rilevazione trascritti è ottimizzato per la frammentazione del cRNA target marcato, l'ibridazione, la colorazione e il lavaggio di array per analisi di espressione. La preparazione di un cocktail di ibridazione comprende un target marcato e frammentato, nonché controlli di ibridazione. Il target è quindi ibridato con l'array. Una volta completata l'ibridazione, l'array viene immediatamente lavato e colorato con coniugato di ficoeritrina streptavidina, per essere poi sottoposto a scansione.

Componenti del kit

Il certificato di analisi è disponibile sul sito Web di Affymetrix.

Componente	N° di cat.	Volume	Conservazione
Kit di rilevazione dei trascritti A, n° di cat. 901307			
Modulo di ibridazione			
■ Miscela di preibridazione (Pre-Hybridization Mix)	901304	6,4 mL	da 2°C a 8°C
■ Miscela di ibridazione 2x (2x Hybridization Mix)	901300	4,0 mL	da 2°C a 8°C
■ DMSO	901303	0,8 mL	da 2°C a 8°C
■ Acqua priva di nucleasi (Nuclease-free Water)	901332	5,0 mL	da 2°C a 8°C
■ Tampone di frammentazione 5x (5x Fragmentation Buffer)	901301	192 µL	da 2°C a 8°C
Modulo di colorazione			
■ Tampone di colorazione 1 (Stain Cocktail 1)	901305	19,2 mL	da 2°C a 8°C
■ Tampone di colorazione 1 (Stain Cocktail 2)	901306	19,2 mL	da 2°C a 8°C
■ Tampone di conservazione degli array (Array Holding Buffer) (2 unità)	901302	30,0 mL	da 2°C a 8°C
Kit di rilevazione dei trascritti B, n° di cat. 901310			
Tampone di lavaggio A (Wash Buffer A) (3 unità)	901308	860 mL	da 2°C a 8°C
Tampone di lavaggio B (Wash Buffer B)	901309	640 mL	da 2°C a 8°C
Kit di rilevazione dei trascritti C, n° di cat. 901312			
Oligo B2	901313	134,4 µL	da -15°C a -30°C
20x Controllo di ibridazione (20x Hybridization Control)	901311	400 µL	da -15°C a -30°C

Altri kit di reagenti Gene Profiling non forniti in questo kit

Prodotto	N° di cat. Affymetrix
Kit di controllo RNA	901285
Kit di sintesi e di marcatura dei trascritti A, B	901286

Avvertenze e precauzioni

1. Solo per uso diagnostico in vitro
2. Evitare la contaminazione microbica che potrebbe causare risultati erranei.
3. Tutti i campioni biologici ed i materiali con cui vengono a contatto devono essere maneggiati come se fossero in grado di trasmettere infezioni e vanno smaltiti in conformità alla normativa vigente. Negli Stati Uniti ciò prevede l'ottemperanza al regolamento OSHA Bloodborne Pathogens Standard (29 CFR 1910.1030) relativo al sangue ed ad altri materiali potenzialmente infettivi. Non pipettare mai con la bocca. Evitare il contatto dei campioni con la pelle e le mucose.
4. Adottare precauzioni standard quando si ottengono, maneggiano e smaltiscono reagenti potenzialmente cancerogeni.
5. Evitare accuratamente la contaminazione crociata di campioni durante tutti i passaggi di questa procedura, poiché potrebbe condurre a risultati erranei.
6. Se possibile, utilizzare guanti privi di talco per minimizzare l'introduzione di particelle di polvere nel campione o nei materiali del kit.
7. Una volta aperto, questo prodotto è stabile per 30 giorni se conservato alla temperatura consigliata.
8. È stato dimostrato che il rendimento di DMSO, Oligo B2 e del controllo di ibridazione 20X non viene influenzato da un massimo di otto cicli di congelamento-scongelo.

Informazioni sulla sicurezza

La scheda tecnica dei materiali (MSDS) è disponibile presso www.affymetrix.com. Se il prodotto è un kit, oppure è composto da più di un materiale, fare riferimento alla scheda tecnica MSDS di ciascun componente per informazioni sui rischi.

Attenzione!

DMSO (dimetilsolfossido): liquido combustibile, irritante. Facilmente assorbito per contatto con la pelle [n° CAS# 67-68-5].

La miscela di preibridazione, la miscela di ibridazione 2x, il tampone di frammentazione 5x, i tamponi di colorazione 1 e 2, il tampone di conservazione degli array ed i tamponi di lavaggio A e B contengono ≤0,10% di azoturo di sodio [n° CAS# 26628-22-8].

Indicazioni di instabilità o deterioramento

All'arrivo, ispezionare le confezioni. Non utilizzare i reagenti se i flaconi sono stati aperti o forati. Per richiedere assistenza o supporto tecnico, rivolgersi ad Affymetrix.

Procedure di lavoro

Procedura 1. Preparazione della reazione di frammentazione del cRNA

1. Miscelare delicatamente a vortice il tampone di frammentazione 5x ed eseguire un breve spin down per depositare il contenuto sul fondo della provetta.
2. La tabella 1.0 presenta la miscela di reazione di frammentazione per campioni di cRNA a una concentrazione finale di 0,5 µg/µL. Utilizzando la resa rettificata di cRNA, riporta il volume calcolato di cRNA richiesto per aggiungere 15 µg alla reazione di frammentazione.

Tabella 1.0. Preparazione della reazione di frammentazione di un campione

Componente	Quantità o volume
cRNA	15 µg
Tampone di frammentazione 5x (5X Fragmentation Buffer)	6 µL
Acqua priva di nucleasi (Nuclease-free Water) (variabile)	Fino al volume finale di 30 µL
Volume totale	30 µL

3. Impostare la reazione in una provetta per strisce da 0,2 mL.
4. Miscelare delicatamente a vortice ed eseguire un breve spin down per depositare il contenuto sul fondo della provetta.
5. Trasferire le provette per strisce in un ciclatore termico, impostato su 94°C per 35 minuti e conservarle a 4°C. Coprire con il coperchio riscaldato. Avviare la metodica e confermare il volume appropriato della reazione per questo passaggio: 30 µL.
6. Passare alla procedura 2.

Procedura 2. Ibridazione

Questa sezione descrive la preparazione di un array a 49 formati.

Nota bene. Il DMSO si solidifica se conservato alla temperatura di 4°C. Prima dell'uso, verificare che il reagente sia completamente scongelato.

Nota bene. Impostare la temperatura dei blocchi riscaldatori su 45°C, 65°C e 99°C.

1. Estrarre l'Oligo B2 ed il controllo ibridazione 20X dal congelatore e scongelarli a temperatura ambiente.

IMPORTANTE! È necessario scaldare le scorte di controllo di ibridazione 20X a 65°C per 5 minuti per risospendere completamente il cRNA prima di aliquotare.

2. Preparare una miscela master di ibridazione a temperatura ambiente per array di sonde singoli o multipli, come evidenziato nella Tabella 2.0.

Tabella 2.0. Miscela master di ibridazione

Componente	Miscela master di lavoro Volumi sufficienti per 1 array di sonde (V)	Miscela master di lavoro Volumi sufficienti per 1 array di sonde x 1,10 (V x 1,10)	Numero di array di sonde desiderati (R)	Volume totale richiesto (V x 1,10) x R	Diluizione/ Concentrazione finale
Oligo B2 (3 nM)	4,2 µL	4,62 µL			50 pM
Controllo di ibridazione 20X (20X Hybridization Control) (bioB, bioC, bioD, cre)	12,5 µL	13,75 µL			rispettivamente 1,5, 5, 25 e 100 pM
Miscela di ibridazione 2x (2X Hybridization Mix)	125 µL	137,5 µL			1X
DMSO	25 µL	27,5 µL			10%
Acqua priva di nucleasi (Nuclease-free Water)	58,3 µL	64,13 µL			
Volume totale	225,0 µL	247,5 µL			

- a. Aliquotare 225 µL di miscela master di ibridazione in una provetta da 1,5 mL di acqua priva di nucleasi.
 - b. Aggiungere 25 µL di cRNA frammentato a seguito della precedente procedura 1.5 per preparare il cocktail di ibridazione per un array di sonde. La concentrazione finale di cRNA nel cocktail di ibridazione è pari a 0,05 µg/µL.
3. Equilibrare l'array di sonde a temperatura ambiente immediatamente prima dell'uso.

Nota bene. È importante lasciare equilibrare completamente gli array di sonde a temperatura ambiente. Nello specifico, se i setti di gomma non sono equilibrati a temperatura ambiente possono incrinarsi e causare perdite.

 4. Scaldare il cocktail di ibridazione a 99°C per 5 minuti su un blocco riscaldatore.
 5. Nel frattempo, bagnare l'array di sonde con 200 µL di miscela di preibridazione, addizionati attraverso uno dei setti.
 6. Incubare l'array di sonde, riempito con la miscela di preibridazione, a 45°C per 10 minuti a 60 giri/min nel forno di ibridazione.
 7. Trasferire il cocktail di ibridazione scaldato a 99°C, citato nel precedente passaggio 4, su un blocco riscaldatore a 45°C per 5 minuti.
 8. Centrifugare il cocktail di ibridazione alla massima velocità in una microcentrifuga per 5 minuti a temperatura ambiente per rimuovere qualsiasi materiale insolubile dalla miscela di ibridazione.
 9. Rimuovere l'array di sonde dal forno di ibridazione. Sfiatare l'array di sonde, forandolo con il puntale di una pipetta pulita, ed estrarre la miscela di preibridazione dall'array di sonde con un micropipettatore. Riempire l'array con 200 µL di cocktail di ibridazione chiarificato, evitando qualsiasi materiale insolubile depositato sul fondo della provetta.
 10. Applicare con cura un bollino adesivo su ciascuno dei due setti. Premere sui bollini per garantire che aderiscano bene. Se i bollini adesivi non vengono applicati bene, ovvero se si osservano protuberanze, bolle, strappi, oppure orli arricciati, non tentare di appianarli. Sostituire semplicemente il bollino con uno nuovo.
 11. Inserire l'array di sonde nel forno di ibridazione, impostato su 45°C. Ruotare a 60 giri/min.
 12. Ibridare per circa 17 ± 1 ore.
 13. Prima dello scadere delle 17 ore di ibridazione, eseguire la procedura 3 e preparare i reagenti per i n passi di lavaggio e colorazione richiesti immediatamente dopo il completamento dell'ibridazione.

Nota bene. Per informazioni dettagliate sull'utilizzo del forno di ibridazione Affymetrix 645, consultare il *Manuale d'istruzioni*, n° di cat. 08-0255, e la *Scheda di riferimento rapido del forno di ibridazione Affymetrix 645*, n° di cat. 08-0256.

Procedura 3. Lavaggio e colorazione e dell'array di sonde

Dopo 17 ± 1 ore di ibridazione estrarre l'array dal forno di ibridazione. Rimuovere i bollini adesivi e sfiatare l'array, forando uno dei setti con il puntale di una pipetta pulita ed estraendo il cocktail di ibridazione con un pipettatore attraverso il setto restante. Riempire completamente l'array di sonde con 250 µL di tampone di lavaggio A.

Nota bene. A questo punto, se necessario, è possibile conservare l'array di sonde alla temperatura di 4°C, al riparo dalla luce, per un massimo di 3 ore, prima di procedere con il lavaggio e la colorazione. Equilibrare a temperatura ambiente prima del lavaggio e della colorazione.

Preparazione dei reagenti di colorazione

Preparare i seguenti reagenti. I volumi indicati sono sufficienti per 1 array di sonde.

1. Estrarre dal frigorifero a 2°C– 8°C i cocktail di colorazione 1 e 2 ed il tampone di conservazione degli array.
2. Picchiettare delicatamente le bottiglie per miscelare bene.
3. Aliquotare i seguenti reagenti:
4. 600 µL di tampone di colorazione 1 in una fiala gialla da 1,5 mL per microcentrifuga.
5. 600 µL di tampone di colorazione 2 in una fiala (trasparente) da 1,5 mL per microcentrifuga.
6. 800 µL di tampone di sostegno array in una fiala (trasparente) da 1,5 mL per microcentrifuga.
7. Eseguire lo spin down su tutte le fiale per eliminare eventuali bolle d'aria.

Nota bene. Il cocktail di colorazione 1 è fotosensibile. Per aliquotarlo, è necessario utilizzare fiale gialle per microcentrifuga.

Impostazione della stazione fluidica

Seguire le istruzioni nel *Manuale d'istruzioni dei reagenti Gene Profiling*

Utilizzo della stazione fluidica

Impostare ed effettuare il priming della stazione fluidica per usarla ai fini del test.

1. Fare clic sul pulsante Fluidics [Fluidica] nel pannello sinistro del flusso di lavoro. È visualizzato l'elenco di lavoro Fluidics Worklist.
2. Se le informazioni vengono immesse manualmente, scegliere un record di richiesta di test e salvarlo con l'ID di array desiderato, quindi richiedere il test, immettendo il numero della stazione fluidica nel campo Station # e il numero di modulo nel campo Module #.
3. Inserire l'appropriato array di sonde nel modulo designato della stazione fluidica con la leva della cartuccia nella posizione inferiore o di estrazione. Terminata l'operazione, verificare che la leva della cartuccia sia ritornata nella posizione superiore o di aggancio.
4. Rimuovere le eventuali fiale per microcentrifuga rimaste nei portacampioni dei moduli della stazione fluidica in dotazione.
5. Se si usa un lettore di codici a barre, eseguire la scansione di ciascun array e, subito dopo quella del modulo della stazione fluidica che analizzerà l'array. L'ID dell'array identifica l'opportuna richiesta di test registrata per tale ID. Lo stato della richiesta di test ridiventa Ready [Pronto].
6. Selezionare le richieste di test sull'AMDS.
7. Fare clic sul pulsante di avviamento Start nella barra degli strumenti del pannello dell'elenco di lavoro Fluidics Worklist.
8. Seguire le istruzioni riportate nella finestra a LCD della stazione fluidica, inserendo i tre flaconi di campione per l'esperimento (i flaconi per microcentrifuga) nei portacampioni 1, 2 e 3 della stazione fluidica.
 - a. Inserire un flacone contenente 600 µL di tampone di colorazione 1 nel portacampioni 1.
 - b. Inserire un flacone contenente 600 µL di tampone di colorazione 2 nel portacampioni 2.
 - c. Inserire un flacone contenente 800 µL di tampone di conservazione degli array nel portacampioni 3.
 - d. Premere sulla leva degli aghi per farli scattare in posizione e avviare il processo.

All'inizio della serie, la finestra di dialogo Fluidics Station [Stazione fluidica] del terminale della stazione di lavoro e la finestra a LCD visualizzano lo stato del lavaggio e della colorazione durante lo svolgimento del protocollo.

9. Una volta completato il protocollo, il messaggio EJECT & INSPECT CARTRIDGE [Estrai ed esamina la cartuccia] viene visualizzato nella finestra a LCD nella stazione fluidica.
10. Rimuovere gli array di sonde dai moduli della stazione fluidica, premendo prima di tutto la leva della cartuccia nella posizione di estrazione.
11. Verificare che nella finestra dell'array di sonde non siano presenti grosse bolle o sacche d'aria.

- Se l'array di sonde non presenta grosse bolle d'aria, l'array è pronto per la scansione. Tirare verso l'alto la leva della cartuccia per azionare il blocco del lavaggio, quindi procedere con la procedura 4, *Scansione dell'array di sonde*.
- Se sono presenti bolle, procedere come segue:

Rimettere l'array di sonde nell'apposito contenitore. Aggiungere 800 µL di tampone di conservazione degli array nel flacone no 3 del portacampioni 3, Seguire le istruzioni visualizzate nella finestra a LCD. Azionare il blocco di lavaggio spingendo delicatamente la leva della cartuccia verso l'alto, nella posizione inserita o chiusa

La stazione fluidica provvede allo scarico dell'array di sonde, seguito dal riempimento con un nuovo volume di tampone di conservazione degli array. Una volta terminata l'operazione, appare nella finestra a LCD il messaggio EJECT & INSPECT CARTRIDGE [Estrai ed esamina cartuccia]. Ancora una volta, rimuovere l'array di sonde e controllare che non vi siano bolle. Se non se ne notano, procedere con la scansione. Tirare verso l'alto la leva per chiudere il blocco di lavaggio, quindi passare alla procedura 4, *Scansione dell'array di sonde*.

Nota bene. Se non si riesce a riempire l'array di sonde senza creare bolle, è possibile riempire manualmente l'array con tampone di conservazione degli array utilizzando una micropipetta. Un lavaggio eccessivo provoca una perdita di intensità del segnale.

12. Se si decide di non eseguire subito la scansione, conservare gli array di sonde a una temperatura di 4°C e al buio finché non si procede con la scansione.

Procedura 4. Scansione dell'array di sonde

Seguire le istruzioni nel *Manuale d'istruzioni dei reagenti Gene Profiling*.

I passi e le istruzioni dettagliati relativi alle procedure indicate in precedenza sono riportati nel *Manuale d'istruzioni dei reagenti Gene Profiling Affymetrix*, accessibile sul sito www.affymetrix.com.

Limitazioni della procedura

La buona conservazione e l'appropriato maneggio dei reagenti e dei campioni sono essenziali ai fini del buon rendimento del test.

Licenza limitata

L'impiego dei prodotti Affymetrix è soggetto alle clausole ed alle condizioni che governano l'uso dei prodotti Affymetrix. Affymetrix concede una licenza non esclusiva, non trasferibile e senza non cedibile quale licenza secondaria d'uso di questo prodotto Affymetrix, in conformità esclusiva al manuale e alle istruzioni scritte fornite da Affymetrix. È necessario leggere e concordare che, fatto salvo quanto esplicitamente stabilito nelle clausole e nelle condizioni di Affymetrix, questo prodotto Affymetrix non concede né implica alcun diritto o licenza in merito ad alcun brevetto o proprietà intellettuali di Affymetrix o concedibili su licenza dalla stessa. Nello specifico, l'utilizzo di questo prodotto Affymetrix non concede né implica alcun diritto o licenza in combinazione con un prodotto non fornito, concesso su licenza o specificamente consigliato da Affymetrix per tale uso.

Marchi di fabbrica

Affymetrix®, Axiom™, Command Console®, DMET™, GeneAtlas™, GeneChip®, GeneChip-compatible™, GeneTitan®, Genotyping Console™, myDesign™, NetAffx®, OncoScan™, Powered by Affymetrix™, Procarta® e QuantiGene® sono marchi di fabbrica o marchi depositati di Affymetrix, Inc. Tutti gli altri marchi sono proprietà dei rispettivi detentori.












Copyright

© 2009-2011 Affymetrix, Inc. Tutti i diritti riservati.

Tabella dei simboli

La tabella seguente riporta la legenda dei simboli grafici riportati sull'etichetta dei prodotti Affymetrix, sui foglietti illustrativi e sul manuale d'istruzioni.

Tabella 3.0. Simboli grafici usati per le etichette

Simbolo / Dicitura	Descrizione
	Numero di parte/catalogo
	Numero di lotto
	Data di scadenza AAAA-MM. Il kit scade l'ultimo giorno del mese.
	Limitazione di temperatura
	Contenuto sufficiente per < n > test
Xi	Sostanza irritante
	Pericoli
	Leggere le istruzioni per l'uso
	Produttore
	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>
	Omologazione europea
	Rappresentante autorizzato per la l'Unione europea

Versioni tradotte di questo foglietto illustrativo sono disponibili presso il sito Web di Affymetrix.

Informazioni sui contatti

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



Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH, L'Aia
Paesi Bassi
Phone: +31.70.345.8570
Fax: +31.70.346.7299

Per richiedere supporto tecnico, rivolgersi a Affymetrix inviando una e-mail all'apposito l'indirizzo oppure telefonando al numero riportato sotto.

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
Regno Unito
E-mail: supporteurope@affymetrix.com
Tel: +44 (0) 1628 552550
Fax: +44 (0) 1628 552585
www.affymetrix.com