

## Affymetrix® Kit de Reagentes para Determinação do Perfil Genético

### Kit para Detecção de Transcriptos



#### Uso indicado

Para uso em diagnóstico in vitro

Os Reagentes para Determinação do Perfil Genético Affymetrix® destinam-se à preparação de RNA alvo complementar marcado, a partir de RNA total purificado proveniente de espécimes de tecido clínico, fresco ou congelado, para hibridação de microarrays Affymetrix GeneChip® e para a medição dos sinais de fluorescência do RNA alvo marcado, utilizando o Affymetrix GeneChip® Microarray Instrumentation System (Sistema para instrumentação de microarrays).

Destina-se a ser utilizado com ensaios para microarray Affymetrix GeneChip aprovado pela FDA separadamente, que especifique a indicação de Reagentes para Determinação do Perfil Genético Affymetrix.

#### Resumo

O Kit para Detecção de Transcriptos está otimizado para a fragmentação de alvo cRNA marcado, hibridação, coloração ou lavagem de arrays para análise da expressão. Prepara-se um cocktail de hibridação que inclua os controlos alvo e de hibridação marcados e fragmentados. O alvo é, seguidamente, hibridado para o array. Imediatamente após a hibridação, o array é lavado e corado com conjugado de estreptavidina ficoeritrina, sendo depois submetido a leitura.

#### Componentes do kit

O certificado de análise está disponível no site da Affymetrix.

Componente	P/N	Volume	Armazenamento
<b>Transcript Detection Kit A P/N 901307</b>			
<b>Módulo de hibridação</b>			
■ Mistura de Pré-hibridação (Pre-Hybridization Mix)	901304	6,4 ml	2 a 8 °C
■ 2x Mistura de hibridação (2x Hybridization Mix)	901300	4,0 ml	2 a 8 °C
■ DMSO	901303	0,8 ml	2 a 8 °C
■ Água sem nucleases (Nuclease-free Water)	901332	5,0 ml	2 a 8 °C
■ 5x Tampão de fragmentação (5x Fragmentation Buffer)	901301	192 µl	2 a 8 °C
<b>Módulo de corante</b>			
■ Cocktail de corante 1 (Stain Cocktail 1)	901305	19,2 ml	2 a 8 °C
■ Cocktail de corante 2 (Stain Cocktail 2)	901306	19,2 ml	2 a 8 °C
■ Tampão de fixação para array (Array Holding Buffer) (2 unidades)	901302	30,0 ml	2 a 8 °C
<b>Kit B para detecção de transcriptos P/N 901310</b>			
Tampão de lavagem A (Wash Buffer A) (3 unidades)	901308	860 ml	2 a 8 °C
Tampão de lavagem B (Wash Buffer B)	901309	640 ml	2 a 8 °C

Componente	P/N	Volume	Armazenamento
<b>Kit C para detecção de transcriptos P/N 901312</b>			
Oligo B2	901313	134,4 µl	-15 a -30 °C
20x Controlo de hibridação (20x Hybridization Control)	901311	400 µl	-15 a -30 °C

#### Outros Reagentes para Determinação do Perfil Genético não fornecidos com este kit

Produto	P/N Affymetrix
Kit para Controlo do RNA	901285
Kit A, B para Síntese e Marcação de Transcriptos	901286

#### Advertências e precauções

1. Para uso em diagnóstico in vitro.
2. Evite a contaminação microbiana, que pode causar resultados errados.
3. Todos os espécimes e materiais biológicos com os quais entrem em contacto devem ser manuseados como materiais passíveis de transmitir infecção e eliminados com os cuidados adequados, em conformidade com a legislação nacional e local em vigor. Este procedimento inclui o cumprimento da norma OSHA relativa a padrão de patógenos transmitidos pelo sangue (Bloodborne Pathogens Standard [29 CFR 1910.1030]) para sangue e outros materiais potencialmente infecciosos abrangidos por esta lei. Nunca pipetar com a boca. Evite o contacto dos espécimes com a pele e membranas mucosas.
4. Adopte os cuidados padrão durante a obtenção, manuseamento e eliminação de reagentes potencialmente cancerígenos.
5. Proceda com cuidado para evitar a contaminação cruzada de amostras durante todos os passos deste procedimento, em virtude de esta situação poder originar resultados errados.
6. Sempre que possível, utilize luvas sem pó para minimizar a introdução de partículas de pó em amostras ou materiais do kit.
7. Uma vez aberto, este produto permanece estável durante 30 dias quando armazenado à temperatura recomendada.
8. Foi determinado que o desempenho do DMSO, Oligo B2 e Controlo de Hibridação 20x não foram afectados até ao oitavo ciclo de congelação-descongelação.

#### Informação sobre segurança

As folhas de segurança de materiais (MSDS) estão disponíveis em [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com). Se o produto for um kit ou incluir mais de um material, consulte a MSDS relativa a cada componente para obter informações sobre os riscos.

#### Atenção:

DMSO (Sulfóxido de dimetilo): Combustível líquido, irritante. Facilmente absorvível pela pele [CAS# 67-68-5].

A Mistura de Pré-Hibridação, Mistura de Hibridação 2X, Tampão de Fragmentação 5X, Cocktail de Corante 1, Cocktail de Corante 2, Tampão de Fixação para Array, Tampão de Lavagem A, e Tampão de Lavagem B contém ≤ 0,10% de Azida de Sódio [CAS# 26628-22-8].

#### Indicações de instabilidade ou deterioração

Inspeccione as embalagens à chegada. Não utilize os reagentes se os frascos de reagentes se encontrarem abertos ou furados. Para assistência ao cliente ou assistência técnica, contacte a Affymetrix.

#### Procedimentos de trabalho

##### Procedimento 1: Preparação da reacção de fragmentação do cRNA

1. Misture o 5X tampão de fragmentação submetendo a vórtex suave e centrifugue brevemente para colher o conteúdo do fundo do tubo.
2. A Tabela 1.0 indica a mistura da reacção de fragmentação para amostras de cRNA, numa concentração final de 0,5 µg/µl. Utilizando a quantidade obtida ajustada de cRNA, calcule o volume de cRNA necessário para adicionar 15 µg à reacção fragmentação.

Quadro 1.0: Preparação da reacção de fragmentação amostra

Componente	Quantidade ou volume
cRNA	15 µg
5X Tampão de fragmentação (5X Fragmentation Buffer)	6 µl

Componente	Quantidade ou volume
Água sem nucleases (Nuclease-free Water) (variável)	Até perfazer 30 µL de volume final
Volume total	30 µl

3. Prepare a reacção numa tira de tubos de 0,2 ml.
4. Misture submetendo a vórtex suave e centrifugue brevemente para colher o conteúdo do fundo do tubo.
5. Transfira as tiras de tubos para um termociclador, definido a 94 °C durante 35 minutos e mantenha a 4 °C. Tape com a tampa aquecida. Inicie o método e confirme o volume apropriado da reacção para este passo: 30 µl.
6. Avance para o Procedimento 2.

### Procedimento 2: Hibridação

Esta secção descreve a preparação para um array de formato 49.

**Nota:** O DMSO solidifica quando armazenado a 4 °C. Certifique-se de que o reagente está totalmente descongelado antes de o utilizar.

**Nota:** Defina a temperatura dos blocos de calor seco para 45 °C, 65 °C e 99 °C.

1. Retire o Oligo B2 e o 20X controlo de hibridação do congelador e descongele à temperatura ambiente.

**IMPORTANTE:** É indispensável que o controlo de hibridação 20X seja aquecido a 65 °C durante 5 minutos, para ressuspender completamente o cRNA antes de aliquotar.

2. Prepare a mistura-mãe de hibridação à temperatura ambiente, para um ou para vários probe arrays, conforme indicado no Quadro 2.0.

**Quadro 2.0: Mistura-mãe de hibridação**

Componente	Mistura-mãe de trabalho Volumes suficientes para 1 Probe Array (V)	Mistura-mãe de trabalho Volumes suficientes para 1 Probe Array (V x 1,10)	Número pretendido de Probe arrays (R)	Volume total necessário (V x 1,10) x R	Diluição/Concentração Final
Oligo B2 (3 nM)	4,2 µl	4,62 µl			50 pM
20X Controlo de hibridação (Hybridization Control) (bioB, bioC, bioD, cre)	12,5 µl	13,75 µl			1,5, 5, 25 e 100 pM respectivamente
2X Mistura de hibridação (Hybridization Mix)	125 µl	137,5 µl			1X
DMSO	25 µl	27,5 µl			10%
Água sem nucleases (Nuclease-free Water)	58,3 µl	64,13 µl			
Volume total	225,0 µl	247,5 µl			

- a. Aliquote 225 µl da mistura de hibridação num tubo de 1,5 ml sem nucleases.
  - b. Adicione 25 µl de cRNA fragmentado do procedimento 1,5 acima para preparar o cocktail de hibridação para um probe array. A concentração final de cRNA no cocktail de hibridação é de 0,05 µg/µl.
3. Equilibre o probe array à temperatura ambiente, imediatamente antes de utilizar.

**Nota:** É importante deixar os probe arrays equilibrarem totalmente à temperatura ambiente. Em particular, se as tampas de borracha não forem equilibradas à temperatura ambiente, podem apresentar tendência para rachar, o que pode originar fugas.

4. Aqueça o cocktail de hibridação até 99 °C, durante 5 minutos, num bloco de calor.
5. Entretanto, humedeça o probe array com 200 µl de mistura de pré-hibridação, enchendo-o através de uma das tampas.
6. Incube o probe array cheia de mistura de pré-hibridação a 45 °C, durante 10 minutos, a 60 rpm no forno de hibridação.
7. Transfira o cocktail de hibridação que foi aquecido a 99 °C, no Passo 4 acima, para um bloco de calor a 45 °C, durante 5 minutos.

8. Centrifugue o cocktail de hibridação à velocidade máxima durante 5 minutos, à temperatura ambiente, para recolher qualquer material insolúvel da mistura de hibridação.
9. Retire o probe array do forno de hibridação. Ventile o probe array com a ponta de uma pipeta limpa e extraia a mistura de pré-hibridação do probe array, utilizando um micropipetador. Volte a encher o array com os 200 µl do cocktail de hibridação clarificado, evitando o depósito de qualquer material insolúvel no fundo do tubo.
10. Procedendo com cuidado, aplique um rótulo adesivo redondo a cada uma das duas tampas. Exerça pressão para se certificar de que o rótulo permanece liso. Se não conseguir aplicar o rótulo de modo a que este fique liso; ou seja, se observar altos, bolhas, rasgos ou extremidades reviradas, não tente alisá-lo. Retire o rótulo redondo e aplique um novo.
11. Coloque o probe array no forno de hibridação, seleccione 45 °C. Rode a 60 rpm.
12. Hibride durante 17 ± 1 horas.
13. Durante a última parte da hibridação de 17 horas avance para o Passo 3 para preparar reagentes para os passos de lavagem e coloração, necessários imediatamente após a conclusão da hibridação.

**Nota:** Para informações detalhadas sobre o uso do Forno de Hibridação 645 Affymetrix, consulte o *Guia do Utilizador do Forno de Hibridação 645 Affymetrix*, P/N 08-0255 e o *Cartão de Referência Rápida do Forno de hibridação 645 Affymetrix*, P/N 08-0256.

### Procedimento 3: Lavagem e coloração do probe array

Após 17 ± 1 horas de hibridação, retire o array do forno de hibridação. Retire os rótulos adesivos redondos e ventile o probe array inserindo a ponta de uma pipeta limpa numa das tampas e extraia o cocktail de hibridação com um pipetador, através da tampa que resta. Volte a encher totalmente o probe array, com 250 µl de tampão de lavagem A.

**Nota:** Nesta altura, se necessário, pode armazenar o probe array a 4 °C, ao abrigo da luz, durante um máximo de 3 horas, antes de prosseguir com a lavagem e coloração. Equilibre à temperatura ambiente antes de proceder à lavagem e coloração.

#### Preparação dos reagentes de coloração

Prepare os seguintes reagentes. Os volumes apresentados são suficientes para 1 probe array.

1. Retire o cocktail corante 1, o cocktail corante 2 e o tampão de fixação para array do local de armazenagem a 2-8 °C.
2. Bata ligeiramente nos frascos para misturar bem.
3. Aliquote os seguintes reagentes:
4. 600 µl de cocktail corante 1 num frasco de microcentrifuga âmbar de 1,5 ml.
5. 600 µl de cocktail corante 2 num frasco de microcentrifuga (transparente) de 1,5 ml.
6. 800 µl de tampão de fixação de array num frasco de microcentrifuga (transparente) de 1,5 ml.
7. Centrifugue todos os frascos para eliminar a presença de quaisquer bolhas de ar.

**Nota:** O cocktail corante 1 é sensível à luz. Não se esqueça de utilizar frascos de microcentrifuga âmbar durante a aliquotagem.

#### Preparar a estação de fluidicos

Siga as instruções do *Guia do Utilizador dos Reagentes para Determinação do Perfil Genético*

#### Utilização da estação de fluidicos

Depois de ter preparado e ferrado a estação de fluidicos, pode utilizá-la no teste que vai realizar.

1. Faça clique no botão Fluidics (Fluidicos) existente na parte esquerda do painel do fluxo de trabalho. É exibida a Fluidics Worklist (Lista de Trabalho de Fluidicos).
2. Se estiver a introduzir a informação manualmente, seleccione um registo de pedido de teste com o ID do Array pretendido e introduza o número da estação de fluidicos no campo Station # (Nº da Estação) e número de módulo no campo Module # (Módulo Nº), para o pedido de teste.
3. Insira o array probe adequado no módulo designado da estação de fluidicos quando a alavanca de comando do cartucho estiver posicionada para baixo ou na posição de ejeção. Quando terminar, verifique se a alavanca de comando do cartucho ficou posicionada para cima, ou na posição de activada.
4. Retire qualquer frasco de microcentrifuga que permaneça no porta-amostras do(s) módulo(s) da estação de fluidicos que está a utilizar.
5. Se estiver a utilizar um leitor de código de barras, efectue a leitura de cada array e depois efectue imediatamente a leitura do módulo da estação de fluidicos que vai processar o array. A ID existente no Array identifica o pedido de teste adequado registado nessa ID do Array. O estado do pedido de teste muda para Preparado.

6. Seleccione os pedidos de teste no AMDS.
7. Faça um clique no botão Start (Iniciar) na barra de ferramentas do painel da Lista de Trabalho dos Fluidicos.
8. Siga as instruções apresentadas na janela de LCD da estação de fluidicos colocando os três frascos de amostra (os frascos da microcentrifuga), nos porta-amostras 1, 2 e 3 da estação de fluidicos.
  - a. Coloque um frasco com 600 µl de cocktail corante 1, no porta-amostras 1.
  - b. Coloque um frasco com 600 µl de cocktail corante 2, no porta-amostras 2.
  - c. Coloque um frasco contendo 800 µl de tampão de fixação para array, no porta-amostras 3.
  - d. Prima a alavanca das agulhas para colocar as agulhas em posição e para iniciar a sessão.

Quando a sessão é iniciada, a caixa de diálogo Fluidics Station (Estação de Fluidicos) do terminal da estação de trabalho e o visor da janela do LCD vão exibindo o estado da lavagem e da coloração à medida que o protocolo decorre.

9. Quando o protocolo estiver concluído, a janela de LCD da estação de fluidicos exibe a mensagem EJECT & INSPECT CARTRIDGE (Ejectar e Inspeccionar Cartucho).
10. Retire os probe arrays dos módulos da estação de fluidicos, começando por premir a alavanca de comando do cartucho para a posição de ejeção.
11. Verifique a janela do probe array para detectar quaisquer bolhas de grande dimensão ou bolsas de ar.

- Se o probe array não apresentar grandes bolhas, está preparada para a leitura. Puxe a alavanca do cartucho para activar o bloco de lavagem e continue no Passo 4: Leitura do probe array.
- Se constatar a presença de bolhas, proceda do seguinte modo:

Volte a colocar o probe array no respectivo suporte. Adicione 800 µl de Tampão de Fixação de Array ao frasco nº 3 do suporte de amostras 3. Siga as instruções exibidas na janela de LCD. Active o bloco de lavagem empurrando suavemente a alavanca de comando do cartucho para a posição de activado ou fechado.

A estação de fluidicos retira o líquido do probe array procedendo depois ao seu enchimento com um volume fresco de tampão de fixação para array. Quando esta operação estiver concluída, a janela de LCD exibe a mensagem EJECT & INSPECT CARTRIDGE (Ejectar e Inspeccionar Cartucho). Uma vez mais, retire o probe array e inspeccione-o para detectar a presença de bolhas. Se não existirem bolhas, está preparada para a leitura. Puxe a alavanca do cartucho para cima, para fechar o bloco de lavagem, e continue no Procedimento 4: Leitura do probe array.

**Nota:** Se a tentativa para encher o probe array sem originar bolhas não for bem sucedida, deve encher o array manualmente com tampão de fixação do array, utilizando uma micropipeta. Uma lavagem excessiva resulta em perda da intensidade do sinal.

12. Se não proceder à leitura imediata dos arrays, mantenha os probe arrays a 4 °C e num local escuro, até poder efectuar a leitura.

#### Procedimento 4: Leitura do probe array

Siga as instruções do Guia do Utilizador dos Reagentes para Determinação do Perfil Genético.

O Guia do Utilizador dos Reagentes para Determinação do Perfil Genético Affymetrix apresenta passos e instruções pormenorizados para os procedimentos anteriormente referidos, estando disponível em [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com).

#### Limitações do procedimento

O armazenamento e manuseamento adequado dos reagentes e das amostras é essencial para o desempenho.

#### Licença limitada

Em conformidade com os termos e condições da Affymetrix, que regem a utilização dos produtos Affymetrix, a Affymetrix concede-lhe uma licença não exclusiva, não transferível e não sublicenciável de utilização deste produto Affymetrix, apenas de acordo com o manual e instruções escritas fornecidas pela Affymetrix. Você compreende e concorda que, exceptuando o expressamente definido nos termos e condições Affymetrix, não está coberto nem implícito por este produto Affymetrix qualquer direito ou licença em relação a qualquer patente ou outra propriedade intelectual que seja propriedade ou licenciável pela Affymetrix. Em particular, não é transmitido qualquer direito ou licença para utilizar este produto Affymetrix em combinação com um produto não fornecido, licenciado ou especialmente recomendado pela Affymetrix para essa utilização.

#### Marcas comerciais

Affymetrix®, Axiom™, Command Console®, DMET™, GeneAtlas™, GeneChip®, GeneChip-compatible™, GeneTitan®, Genotyping Console™, myDesign™,

NetAffx®, OncoScan™, Powered by Affymetrix™, Procarta®, e QuantiGene® são marcas comerciais ou marcas registadas da Affymetrix, Inc. Todas as outras marcas comerciais são propriedade dos respectivos proprietários.

#### Copyright

© 2009-2011 Affymetrix, Inc. Todos os direitos reservados.

#### Quadro de símbolos

O quadro abaixo apresenta a legenda dos símbolos gráficos utilizados nos rótulos do produto Affymetrix, nos Folhetos Informativos e no Guia do Utilizador.

Quadro 3.0: Símbolos gráficos para uso na rotulagem

Símbolo / rótulo	Definição
	Nº da peça/de catálogo
	Número do lote
	Data de Validade AAAA-MM, A data de validade do kit termina no último dia do mês.
	Limitação da temperatura
	Contém o suficiente para < n > testes
Xi	Irritante
	Perigos
	Consultar as Instruções de Utilização
	Fabricante
	Apenas para avaliação do desempenho em diagnóstico <i>in vitro</i>
	Conformidade Europeia
	Representante autorizado na União Europeia

No site da Affymetrix estão disponíveis versões traduzidas desta literatura.

#### Contactos

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

Emergo Europe  
Molenstraat 15  
2513 BH, The Hague  
Países Baixos  
Telephone: +31.70.345.8570  
Fax: +31.70.346.7299

Para assistência técnica, contacte a Affymetrix através do endereço de correio electrónico ou número de telefone indicados abaixo.

#### Affymetrix, Inc.

3420 Central Expressway  
Santa Clara, CA 95051 EUA  
Correio electrónico: 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  
Reino Unido  
Correio electrónico: suporteurope@affymetrix.com  
Tel: +44 (0) 1628 552550  
Fax: +44 (0) 1628 552585  
[www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)