

Affymetrix® Reagenskit voor genprofilering



Transcriptsynthese- en labelingkit

Beoogd gebruik

Voor gebruik bij in vitro diagnostiek

De genprofilingsreagentia van Affymetrix® zijn bestemd voor het prepareren van gelabeld 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 genprofilingsassays van Affymetrix gebruikt dienen te worden.

Overzicht

De transcriptsynthese- en labelingkit is specifiek geoptimaliseerd voor het produceren van geamplificeerd en gebiotinyleerd complementair doel-RNA (doel-cRNA) voor het hybridiseren met arrays voor expressieanalyse. Het template-DNA voor de IVT reactie is gewoonlijk dubbelstrengs cDNA dat een RNA-polymerasepromotorsequentie bevat. Bij experimenten met gelabeld doel-cRNA wordt de promotorsequentie in het cDNA-template opgenomen door gebruik te maken van een oligo(dT)-promotorprimer in de initiële reverse transcriptiereactie. Met gebruikmaking van de protocollen (beschreven in de *Affymetrix Gene Profiling Reagents User Guide [gebruikershandleiding voor genprofilingsreagentia van Affymetrix]*) kan voldoende cDNA-template worden verkregen uit hoogwaardige startmaterialen. Het gelabelde nucleotideanalooq wordt efficiënt in het doel-cRNA opgenomen tijdens de *in vitro* transcriptielabelingreactie die door het RNA-polymerase als een pseudo-uridinereagens wordt gemedieerd. Het gebiotinyleerde doel-cRNA wordt vervolgens gezuiverd, gefragmenteerd en gehybridiseerd met expressiearrays.

Onderdelen van de kit

Het analysecertificaat is verkrijgbaar op de website van Affymetrix.

Onderdeel	Ond.-nr.	Volume	Bewaren bij
Transcriptsynthese- en labelingkit A ond.nr. 901293			
Eerstestrengthssynthesebuffer (1 st Strand Synthesis Buffer)	901287	128 µl	2 tot 8 °C
Tweedestrengthssynthesebuffer (2 nd Strand Synthesis Buffer)	901288	576 µl	2 tot 8 °C
<i>In vitro</i> transcriptiebuffer (<i>In-Vitro</i> Transcription Buffer)	901291	704 µl	2 tot 8 °C
Magnetische beads (Magnetic Beads)	901290	3.456 µl	2 tot 8 °C
Beads-wasbuffer (Beads Wash Buffer)	901289	5.400 µl	2 tot 8 °C
Nucleasevrij water (Nuclease-free Water)	901292	1.648 µl	2 tot 8 °C

Onderdeel	Ond.-nr.	Volume	Bewaren bij
Transcriptsynthese- en labelingkit B ond.-nr. 901298			
Enzymmengsel voor eerstestrengthssynthese (1 st Strand Synthesis Enzyme Mix)	901294	32 µl	-15 tot -30 °C
Enzymmengsel voor tweedestrengthssynthese (2 nd Strand Synthesis Enzyme Mix)	901295	64 µl	-15 tot -30 °C
Enzymmengsel voor <i>in vitro</i> transcriptie (<i>In-Vitro</i> Transcription Enzyme Mix)	901296	192 µl	-15 tot -30 °C
RNA label	901297	64 µl	-15 tot -30 °C

Andere, niet met deze kit meegeleverde genprofilingsreagentia

Onderdeel	Ond.-nr.
RNA-controlekit	901285
Transcriptdetectiekit A, B, C	901299

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 20 dagen lang stabiel mits het bij de aanbevolen opslagtemperatuur wordt bewaard.
8. Het is aangetoond dat de werking van de kit gedurende maximaal acht vries/dooi-cycli niet wordt beïnvloed.

Veiligheidsinformatie

Veiligheidsinformatiebladen (MSDS, Material Safety Data Sheet) zijn verkrijgbaar op 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.

Indicaties van instabiliteit of deterioratie

Inspecteer de verpakkingen bij ontvangst. Als het verzegelde label bij de perforaties is geopend, mag de inhoud van de verpakking niet worden gebruikt. Neem voor klantenservice of technische ondersteuning contact op met Affymetrix.

Workflowprocedures

Procedure 1: Preparatie van de eerstestrengths cDNA-synthesereactie

NB: Meng de eerstestrengthssynthesebuffer en het enzymmengsel de eerstestrengthssynthese vóór gebruik voor door ze voorzichtig te vortexen en vervolgens kortstondig te centrifugeren.

1. Prepareer het eerstestrengthsbasismengsel op kamertemperatuur zoals beschreven in tabel 1.0. Maak 15% extra eerstestrengthsbasismengsel om te zorgen dat er voldoende volume beschikbaar is voor alle wells. Meng ze door ze voorzichtig te vortexen en vervolgens kortstondig te centrifugeren.

Table 1.0 Preparatie van het eerstestrensbasismengsel

Reagens	Volume/reactie
Eerstestrenssynthesebuffer (1 st Strand Synthesis Buffer)	4 µl
Enzymmengsel voor eerstestrenssynthese (1 st Strand Synthesis Enzyme Mix)	1 µl
Poly-A-controle (Poly-A Control) ¹	1 µl

1. De poly-A-controle moet vóór gebruik in dit basismengsel worden verdund. Raadpleeg de met de poly-A-controlekit meegeleverde instructies. Ook zijn er uitgebreide instructies opgenomen in de Affymetrix Gene Profiling Assay Manual (handleiding voor de genprofielingsassay van Affymetrix), die te vinden is op www.affymetrix.com.

- Breng 6 µl eerstestrensbasismengsel (op kamertemperatuur) over naar de bodem van de betreffende wells van de 96-wells plaat, die op een kunststof rek rust. Werp eventueel resterend eerstestrensbasismengsel weg.
- Voeg 4 µl van de totaal-RNA-monsters (in totaal 100 µg tot 1000 µg/reactie) toe aan de betreffende wells van de 96-wells plaat en pipetteer ze voorzichtig driemaal op en neer om ze te mengen.
- Dek de plaat af met zelfklevende aluminiumfolie en verzegel de bovenkant zorgvuldig met een rol.
- Centrifugeer ten hoogste 10 seconden lang op kamertemperatuur bij 370 x g om de oplossing onder in de wells op te vangen.
- Verwijder de plaat uit de centrifuge en breng hem over naar een PCR-apparaat, dat ingesteld is op 2 uur bij 42 °C, 10 minuten bij 4 °C en laat staan bij 4 °C voor de eerstestrenssynthesereactie. Dek de plaat af met een compressiepad voordat u de verwarmde deksel sluit.
- Verwijder de plaat na afloop van de incubatie bij 42 °C binnen 10 minuten na incubatie bij 4 °C en centrifugeer de plaat ten hoogste 10 seconden lang op kamertemperatuur bij 370 x g om de oplossing onder in de wells op te vangen. Verwijder de plaat uit de centrifuge en houd hem op kamertemperatuur.
- Ga onmiddellijk verder met de preparatie van de tweedestrensbasismengsel.

Procedure 2: Preparatie van de tweedestrensbasismengsel

NB: Meng de tweedestrensbasismengsel en het enzymmengsel voor de tweedestrensbasismengsel vóór gebruik door ze voorzichtig te vortexen en vervolgens kortstondig te centrifugeren.

1. Prepareer het tweedestrensbasismengsel in een 1,5 ml nucleasevrij buisje op kamertemperatuur zoals beschreven in tabel 2.0. Maak 10% extra tweedestrensbasismengsel om te zorgen dat er voldoende volume beschikbaar is voor alle wells. Meng ze door ze voorzichtig te vortexen en vervolgens kortstondig te centrifugeren.

Tabel 2.0 Preparatie van het tweedestrensbasismengsel

Reagens	Volume/reactie
Tweedestrenssynthesebuffer (2 nd Strand Synthesis Buffer)	18 µl
Enzymmengsel voor tweedestrenssynthese (2 nd Strand Synthesis Enzyme Mix)	2 µl

2. Verwijder de zelfklevende aluminiumfolie voorzichtig van de plaat die op een kunststof rek rust.
3. Breng 20 µl tweedestrensbasismengsel op kamertemperatuur over in de zijwand van de betreffende wells van de 96-wells plaat.
4. Dek de plaat af met zelfklevende aluminiumfolie en verzegel de bovenkant zorgvuldig met een rol. Werp eventueel resterend tweedestrensbasismengsel weg.
5. Centrifugeer ten hoogste 10 seconden lang op kamertemperatuur bij 370 x g om de oplossing onder in de wells op te vangen.
6. Verwijder de plaat uit de centrifuge en breng hem over naar een PCR-apparaat, dat ingesteld is op 1 uur bij 16 °C, 10 minuten bij 4 °C en laat staan bij 4 °C voor de tweedestrenssynthesereactie.

Belangrijk: Dek de plaat niet af met de verwarmde deksel tijdens de incubatie bij 16 °C.

7. Verwijder de plaat na afloop van de incubatie bij 16 °C binnen 10 minuten na incubatie bij 4 °C en centrifugeer de plaat ten hoogste 10 seconden lang op kamertemperatuur bij 370 x g om de oplossing onder in de wells op te vangen. Verwijder de plaat uit de centrifuge en houd hem op kamertemperatuur.

8. Ga onmiddellijk verder met de preparatie van de in vitro transcriptiereactie.

Procedure 3: Preparatie van de in vitro transcriptiereactie (IVT reactie)

NB: Meng de in vitro transcriptiebuffer, het enzymmengsel voor de in vitro transcriptie en het RNA-label vóór gebruik door ze voorzichtig te vortexen en vervolgens kortstondig te centrifugeren.

1. Prepareer het IVT basismengsel op kamertemperatuur zoals beschreven in tabel 3.0. Maak 10% extra IVT basismengsel om te zorgen dat er voldoende volume beschikbaar is voor alle wells. Meng ze door ze voorzichtig te vortexen en vervolgens kortstondig te centrifugeren.

Tabel 3.0 Preparatie van het IVT basismengsel

Reagens	Volume/reactie
In vitro transcriptiebuffer (In-Vitro Transcription Buffer)	22 µl
RNA label	2 µl
Enzymmengsel voor in vitro transcriptie (In-Vitro Transcription Enzyme Mix)	6 µl

2. Verwijder de zelfklevende aluminiumfolie voorzichtig van de plaat die op een kunststof rek rust.
 3. Breng 30 µl IVT basismengsel over in de zijwand van de betreffende wells van de 96-wells plaat die de 30 µl van de tweedestrensbasismengsel bevat.
 4. Dek de plaat af met zelfklevende aluminiumfolie en verzegel de bovenkant zorgvuldig met een rol.
 5. Centrifugeer ten hoogste 10 seconden lang op kamertemperatuur bij 370 x g om de oplossing onder in de wells op te vangen.
 6. Verwijder de plaat uit de centrifuge en breng hem over naar een PCR-apparaat, dat ingesteld is op 16 uur* lang bij 40 °C, en laat staan bij 4 °C voor de IVT reactie. Dek de plaat af met een compressiepad voordat u de verwarmde deksel sluit.
- *De incubatietijd is geoptimaliseerd met behulp van 100 µg commercieel verkrijgbaar totaal RNA dat uit HeLa-cellen is geëxtraheerd. De tijd moet worden aangepast aan de hand van de identiteit, kwaliteit en aanwezigheidsgraad van totaal RNA dat in de assay wordt gebruikt.*
7. Verwijder de plaat na incubatie bij 40 °C (wanneer het display van het PCR-apparaat een temperatuur van 4 °C aangeeft) en centrifugeer de plaat ten hoogste 10 seconden lang op kamertemperatuur bij 370 x g om de oplossing onder in de wells op te vangen. Verwijder de plaat uit de centrifuge en houd hem op kamertemperatuur. Ga verder met de zuivering van het cRNA.

Procedure 4: Zuivering van het cRNA uit de in vitro transcriptiereactie (IVT reactie)

Belangrijk: Voordat u met de zuivering begint, brengt u nucleasevrij water in een 1,5 ml-buisje over. Plaats het nucleasevrije water vervolgens ten minste 10 minuten lang bij 60 °C op het warmteblok en houd het nucleasevrije water op 60 °C totdat u het gebruikt.

Belangrijk: Voordat u de beads-wasbuffer uit de kit voor het eerst gebruikt, voegt u 12,6 ml 100% ethanol toe aan de beads-wasbuffer, kruist u het aankruisvakje aan, ondertekent en dateert u het.

1. Schud het flesje met magnetische beads voorzichtig om de deeltjes die zijn bezonken opnieuw in suspensie te brengen.
2. Voeg 108 µl van de oplossing met de magnetische beads toe aan elk IVT reactiemengsel. Meng ze door ze voorzichtig op en neer te pipetteren.
3. Breng monsters van de 96-wells plaat over naar de 96-wells plaat met U-bodem.
4. Breng de plaat met U-bodem over naar het plaatschudapparaat en schud hem 2 minuten lang op kamertemperatuur op middelhoge snelheid.
5. Zet de plaat op de magnetische standaard en laat de beads 5 à 10 minuten lang korrelvormig worden totdat de oplossing helder is en de beads een korrel vormen tegen de magneet.
6. Wanneer het mengsel transparant is, verwijdert u het supernatans met behulp van een multikanaalspipet zonder de beads te verstoren en werpt u het supernatans weg.
7. Laat de plaat op de magnetische standaard en was elk monster tweemaal met 200 µl beads-wasbuffer, waarbij u telkens na het wassen al het supernatans verwijdert. Incubeer 25 à 35 seconden op kamertemperatuur gedurende elke wasprocedure.
8. Laat de plaat 5 à 7 minuten aan de lucht drogen, terwijl de plaat zich op de magnetische standaard bevindt.

9. Verwijder de plaat van de magnetische standaard en voeg vervolgens 30 µl van het tot 60 °C verwarmde nucleasevrije water met behulp van een repetiteerpipet toe aan de zijwand van elke monsterwell.

Belangrijk: Vanwege de hoge temperatuur van het nucleasevrije water dient u bij gebruik van de repetiteerpipet genoeg te hebben voor twee extra volumes van 30 µl: werp de eerste 30 µl weg voordat u het nucleasevrije water aan de monsters toevoegt; gebruik de laatste 30 µl van de elutieoplossing niet. Het is belangrijk om de hier beschreven aanbeveling op te volgen om u ervan te verzekeren dat de juiste volumes aan elk monster worden toegevoegd.

10. Breng de plaat met U-bodem over naar een schudapparaat. Schud gedurende één minuut op hoge snelheid. Er kan een micropipetteerapparaat worden gebruikt om de korrels geheel op te breken als ze niet zijn opgelost.

11. Zet de plaat op de magnetische standaard en laat de beads 3 à 4 minuten bezinken.

12. Wanneer de oplossing transparant is en de beads bezonken zijn, verwijdert u 30 µl van het supernatans zonder de korrels te verstoren. Breng het supernatans die het uitgewassen cRNA bevat over naar een nieuwe 96-wells plaat of naar afzonderlijke buisjes.

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.

Beperkingen van de procedure

De juiste opslag en hantering van reagentia en monsters zijn van wezenlijk belang voor de prestatie daarvan. Bewaar transcriptiesynthese- en labelingkit B niet in een vorstvrije vriezer. Alle laboratoriumapparatuur die gebruikt wordt om het doel-cRNA tijdens deze procedure te prepareren, moeten worden gekalibreerd en onderhouden om te zorgen dat deze nauwkeurig is. Een incorrecte meting van reagentia kan van invloed zijn op de resultaten van de procedure.

Octrooien

De producten kunnen door een of meer van de volgende octrooien worden beschermd: Amerikaans octrooinr.: 6,864,059. Dit product wordt verstrekt onder licentie van Asuragen, Inc.

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 of 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.

Asuragen® is een gedeponeed handelsmerk van Asuragen, 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 4.0 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
	IMedisch 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

Vervaardigd door Asuragen® voor Affymetrix, Inc.



Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH, The 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
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
Tel: +44 (0) 1628 552550
Fax: +44 (0) 1628 552585
www.affymetrix.com