



Packungsbeilage

## Affymetrix® Gene Profiling- Reagenzienkit

## Transkript-Synthese- und Markierungskit



### 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-Synthese- und Markierungskit ist speziell für die Herstellung amplifizierter und biotinylierter komplementärer RNA-Ziele (cRNA-Ziele) für die Hybridisierung auf Arrays für Genexpressionsanalysen optimiert. Bei der DNA-Matrize für die IVT-Reaktion handelt es sich normalerweise um doppelsträngige cDNA mit einer RNA-Polymerase-Promotersequenz. Bei Zielmarkierungsexperimenten wird die Promotersequenz in der anfänglichen Reverse-Transkription-Reaktion mit Hilfe eines Oligo(dT)-Promoterprimers in die cDNA-Matrize eingebaut. Aus qualitativ hochwertigen Ausgangsmaterialien lassen sich mit den (im Gene Profiling-Reagenz-Benutzerhandbuch *Affymetrix Gene Profiling Reagents User Guide*) beschriebenen Protokollen ausreichende cDNA-Matrizenmengen gewinnen. Das markierte Nukleotid-Analogon wird während der Markierungsreaktion der *In-vitro*-Transkription in effizienter Weise in das cRNA-Ziel eingebaut, wobei RNA-Polymerase als vermittelndes Pseudouridin-Reagenz dient. Anschließend werden die biotinylierten cRNA-Ziele purifiziert, fragmentiert und auf Expressionsarrays hybridisiert.

### Kitbestandteile

Das Analysezertifikat ist auf der Affymetrix-Website erhältlich.

Bestandteil	Bestell-Nr.	Volumen	Lagerung
<b>Transkript-Synthese- und Markierungskit A Bestell-Nr. 901293</b>			
1 <sup>st</sup> Strand Synthesis Buffer	901287	128 µl	2 bis 8 °C
2 <sup>nd</sup> Strand Synthesis Buffer	901288	576 µl	2 bis 8 °C
<i>In-Vitro</i> Transcription Buffer	901291	704 µl	2 bis 8 °C
Magnetic Beads	901290	3.456 µl	2 bis 8 °C
Beads Wash Buffer	901289	5.400 µl	2 bis 8 °C
Nuclease-free Water	901292	1.648 µl	2 bis 8 °C
<b>Transkript-Synthese- und Markierungskit B Bestell-Nr. 901298</b>			
1 <sup>st</sup> Strand Synthesis Enzyme Mix	901294	32 µl	-15 bis -30 °C
2 <sup>nd</sup> Strand Synthesis Enzyme Mix	901295	64 µl	-15 bis -30 °C
<i>In-Vitro</i> Transcription Enzyme Mix	901296	192 µl	-15 bis -30 °C
RNA Label	901297	64 µl	-15 bis -30 °C

### Weitere, nicht in diesem Kit enthaltene Gene Profiling-Reagenzien

Bestandteil	Bestell-Nr.
RNA-Kontrollkit	901285
Transkript-Nachweiskit A, B, C	901299

### 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 20 Tage lang stabil, wenn es bei der empfohlenen Temperatur gelagert wird.
8. Die Kitleistung wird durch bis zu vier Gefrierzyklen nachweislich nicht beeinträchtigt.

### Sicherheitsdaten

Sicherheitsdatenblätter (Material Safety Data Sheets, kurz: MSDS) stehen unter [www.affymetrix.com](http://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.

### Anzeichen für Instabilität oder Verfall

Die Packungen nach Erhalt inspizieren. Den Packungsinhalt nicht verwenden, falls das Sicherheitsetikett an den Perforationen offen ist. Zur Anforderung von Kundendienst oder technischer Unterstützung bitte an Affymetrix wenden.

### Arbeitsabläufe

#### Verfahren Nr. 1: Ansetzen der Strang-1-cDNA-Synthesereaktion

**Hinweis:** Den 1<sup>st</sup> Strand Synthesis Buffer und das 1<sup>st</sup> Strand Synthesis Enzyme Mix durch behutsames Mischen mit dem Vortexmischer und anschließendes kurzes Zentrifugieren für den Gebrauch vorbereiten.

1. Das Strang-1-Mastermix gemäß Tabelle 1.0 bei Raumtemperatur ansetzen. 15 % mehr des Strang-1-Mastermix es zubereiten, um sicherzustellen, dass ein ausreichendes Volumen für alle Vertiefungen verfügbar ist. Zum Mischen behutsam mit dem Vortexmischer mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tabelle 1.0 Ansetzen des Strang-1-Mastermixes

Reagenz	Volumen/Reaktion
1 <sup>st</sup> Strand Synthesis Buffer	4 µl
1 <sup>st</sup> Strand Synthesis Enzyme Mix	1 µl
Poly-A Control <sup>1</sup>	1 µl

<sup>1</sup> Die Poly-A Control muss vor ihrer Verwendung in diesem Mastermix verdünnt werden. Siehe die dem Poly-A Control-Kit beiliegenden Anweisungen. Ausführliche Anweisungen enthält auch das Gene Profiling-Assay-Handbuch „Affymetrix Gene Profiling Assay Manual“, das unter [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com) aufrufbar ist.

2. 6 µl Strang-1-Mastermix (Raumtemperatur) auf die Böden der entsprechenden Vertiefungen der 96-Well-Platte transferieren, die sich auf einem Kunststoffgestell befindet. Alle eventuellen Reste des Strang-1-Mastermixes entsorgen.
3. 4 µl der Gesamt-RNA-Proben (insgesamt 100 ng auf 1000 ng/rxn) in die entsprechenden Vertiefungen der 96-Well-Platte hinzugeben (zum Mischen behutsam 3 Mal mit einer Pipette ansaugen und absinken lassen).

- Die Platte mit Aluklebefolie abdecken und die Oberseiten sorgfältig mit einer Walze abdichten.
- Mit 370 g maximal 10 Sekunden lang bei Raumtemperatur zentrifugieren, um die Lösung an den Vertiefungsböden zu sammeln.
- Die Platte aus der Zentrifuge nehmen und in einen Thermocycler transferieren, der für die Strang-1-Synthesereaktion auf 2 Stunden bei 42 °C, 10 Minuten bei 4 °C und Aufbewahrung bei 4 °C eingestellt ist. Die Platte vor dem Schließen des beheizten Deckels mit einem Compression Pad bedecken.
- Die Platte nach dem Abschluss der Inkubation bei 42 °C entnehmen (innerhalb von 10 Minuten der Inkubation bei 4 °C) und die Platte mit 370 g maximal 10 Sekunden lang bei Raumtemperatur zentrifugieren, um die Lösung an den Vertiefungsböden zu sammeln. Die Platte aus der Zentrifuge nehmen und bei Raumtemperatur aufbewahren.
- Sofort mit dem Ansetzen der Strang-2-cDNA-Synthesereaktion fortfahren.

## Verfahren Nr. 2: Ansetzen der Strang-2-cDNA-Synthesereaktion

**Hinweis:** Den 2<sup>nd</sup> Strand Synthesis Buffer und das 2<sup>nd</sup> Strand Synthesis Enzyme Mix durch behutsames Mischen mit dem Vortexmischer und anschließendes kurzes Zentrifugieren für den Gebrauch vorbereiten.

- Das Strang-2-Mastermix gemäß Tabelle 2.0 bei Raumtemperatur in einem nukleasefreien 1,5-ml-Röhrchen ansetzen. 10 % mehr des Strang-2-Mastermixes zubereiten, um sicherzustellen, dass ein ausreichendes Volumen für alle Vertiefungen verfügbar ist. Zum Mischen behutsam mit dem Vortexmischer mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

**Tabelle 2.0 Vorbereitung des Strang-2-Mastermixes**

Reagenz	Volumen/Reaktion
2 <sup>nd</sup> Strand Synthesis Buffer	18 µl
2 <sup>nd</sup> Strand Synthesis Enzyme Mix	2 µl

- Behutsam die Aluklebefolie von der auf einem Kunststoffgestell befindlichen Platte entfernen.
- Bei Raumtemperatur 20 µl Strang-2-Mastermix in die Seitenwand der entsprechenden Vertiefungen der 96-Well-Platte transferieren.
- Die Platte mit Aluklebefolie abdecken und die Oberseite sorgfältig mit einer Walze abdichten. Alle eventuellen Reste des Strang-2-Mastermixes entsorgen.
- Bei 370 g maximal 10 Sekunden lang bei Raumtemperatur zentrifugieren, um die Lösung an den Vertiefungsböden zu sammeln.
- Die Platte aus der Zentrifuge nehmen und in einen Thermocycler transferieren, der für die Strang-2-Synthesereaktion auf 1 Stunde bei 16 °C, 10 Minuten bei 4 °C und Aufbewahrung bei 4 °C eingestellt ist.

**Wichtig:** Die Platte während der 16 °C-Inkubation nicht mit dem beheizten Deckel abdecken.

- Die Platte nach dem Abschluss der Inkubation bei 16 °C entnehmen (innerhalb von 10 Minuten der Inkubation bei 4 °C) und die Platte mit 370 g maximal 10 Sekunden lang bei Raumtemperatur zentrifugieren, um die Lösung an den Vertiefungsböden zu sammeln. Die Platte aus der Zentrifuge nehmen und bei Raumtemperatur aufbewahren.
- Sofort mit dem Ansetzen der In-vitro-Transkriptionsreaktion fortfahren.

## Verfahren Nr. 3: Ansetzen der In-vitro-Transkriptionsreaktion (IVT-Reaktion)

**Hinweis:** Den In-vitro Transcription Buffer, das In-vitro Transcription Enzyme Mix und RNA Label durch behutsames Mischen mit dem Vortexmischer und anschließendes kurzes Zentrifugieren für den Gebrauch vorbereiten.

- Das IVT-Mastermix gemäß Tabelle 3.0 bei Raumtemperatur ansetzen. 10 % mehr des IVT-Mastermixes zubereiten, um sicherzustellen, dass ein ausreichendes Volumen für alle Vertiefungen verfügbar ist. Zum Mischen behutsam mit dem Vortexmischer mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

**Tabelle 3.0 Ansetzen des IVT-Mastermixes**

Reagenz	Volumen/Reaktion
In-Vitro Transcription Buffer	22 µl
RNA Label	2 µl
In-Vitro Transcription Enzyme Mix	6 µl

- Behutsam die Aluklebefolie von der auf einem Kunststoffgestell befindlichen Platte entfernen.

- 30 µl IVT-Mastermix in die Seitenwand der entsprechenden Vertiefungen der 96-Well-Platte transferieren, die die 30 µl der Strang-2-Reaktion enthalten.
- Die Platte mit Aluklebefolie abdecken und die Oberseiten sorgfältig mit einer Walze abdichten.
- Bei 370 g maximal 10 Sekunden lang bei Raumtemperatur zentrifugieren, um die Lösung an den Vertiefungsböden zu sammeln.
- Die Platte aus der Zentrifuge entnehmen und in einen Thermocycler transferieren, der für die IVT-Reaktion auf 16 Stunden\* bei 40 °C, Aufbewahrung bei 4 °C eingestellt ist. Die Platte vor dem Schließen des beheizten Deckels mit einem Compression Pad bedecken.

\*Die optimale Inkubationsdauer ergab sich bei Einsatz von 100 ng handelsüblichen RNA-Extrakt aus HeLa-Zellen. Die Zeitdauer ist der Art, Qualität und Ausgangsmenge der für den Assay verwendeten Gesamt-RNA anzupassen.

- Die Platte nach der Inkubation bei 40 °C entnehmen (wenn das Thermocycler-Display eine Temperatur von 4 °C anzeigt) und die Platte mit 370 g maximal 10 Sekunden lang bei Raumtemperatur zentrifugieren, um die Lösung an den Vertiefungsböden zu sammeln. Die Platte aus der Zentrifuge nehmen und bei Raumtemperatur aufbewahren. Mit dem Purifizieren der cRNA fortfahren.

## Verfahren Nr. 4: Purifizieren der cRNA der In-vitro-Transkriptionsreaktion (IVT-Reaktion)

**Wichtig:** Vor dem Beginn der Purifizierung Nuclease-free Water in ein 1,5-ml-Röhrchen transferieren. Das Nuclease-free Water mindestens 10 Minuten lang bei 60 °C auf dem Heizblock platzieren, so dass das Nuclease-free Water nuklov dem Gebrauch eine Temperatur von 60 °C hat.

**Wichtig:** Vor dem ersten Gebrauch des Beads Wash Buffer des Kits 12,6 ml Ethanol (100 %) zum Beads Wash Buffer geben und das Kästchen markieren, mit Initialen und Datum versehen.

- Die Magnetic Beads-Flasche behutsam rütteln, um evtl. abgesetzte Partikel zu resuspendieren.
- In jedes IVT-Reaktionsgemisch 108 µl Magnetic Beads-Lösung geben. Zum Mischen behutsam mit einer Pipette ansaugen und absinken lassen.
- Die Proben aus der 96-Well-Platte in die U-Boden-96-Well-Platte transferieren.
- Die U-Boden-Platte auf den Plattenrüttler stellen und mit mittlerer Geschwindigkeit 2 Minuten lang bei Raumtemperatur rütteln.
- Die Platte auf dem Magnetständer platzieren und die Beads 5 bis 10 Minuten lang pelletieren lassen, bis die Lösung klar ist und die Beads am Magneten ein Pellet bilden.
- Nachdem die Mischung transparent ist, den Überstand mit Hilfe einer Mehrkanalpipette entfernen und entsorgen, ohne dabei die Beads zu stören.
- Die Platte auf dem Magnetständer belassen und jede Probe zweimal mit 200 µl Beads Wash Buffer waschen. Dabei nach jeder Wäsche den gesamten Überstand entfernen. Während jeder Wäsche 25–35 Sekunden lang bei Raumtemperatur inkubieren.
- Die Platte auf dem Magnetständer 5 bis 7 Minuten lang lufttrocknen lassen.
- Die Platte vom Magnetständer nehmen, und anschließend mit Hilfe einer Repetierpipette jeweils 30 µl in auf 60 °C erhitztes Nuclease-free Water in alle Probenvertiefungen geben (über die Seitenwände).

**Wichtig:** Aufgrund der hohen Temperatur des Nuclease-free Water beim Arbeiten mit der Repetierpipette zwei zusätzliche 30-µl-Volumina vorsehen: die ersten 30 µl vor dem Zugeben zu den Proben entsorgen, und die letzten 30 µl der Eluierungslösung nicht verwenden. Die Beachtung dieser Empfehlung ist wichtig für die Gewährleistung der korrekten Volumenabgabe in die einzelnen Proben.

- Die U-Boden-Platte auf einen Rüttler stellen. Eine Minute lang mit hoher Geschwindigkeit rütteln. Falls sich das Pellet nicht löst, kann es mit Hilfe einer Mikropipette vollständig aufgelöst werden.
- Die Platte auf den Magnetständer stellen und die Beads 3 bis 4 Minuten lang absetzen lassen.
- Nachdem die Lösung transparent ist und sich die Beads abgesetzt haben, 30 µl des Überstands entfernen, ohne dabei das Pellet zu stören. Den Überstand mit der eluierten cRNA in eine neue 96-Well-Platte oder einzelne Röhrchen transferieren.

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

## Grenzen des Verfahrens

Unerlässliche Voraussetzungen für eine gute Leistung sind die korrekte Lagerung und Handhabung der Reagenzien und Proben. Den Transkript-Synthese- und Markierungskit B nicht in einem selbstabtauenden Gefrierschrank lagern. Sämtliche für die Zielvorbereitung verwendeten Laborutensilien sind zur Gewährleistung der Genauigkeit zu kalibrieren und zu warten. Eine inkorrekte Reagenzienbemessung kann das Verfahrensergebnis beeinträchtigen.

## Patente

Die Produkte sind evtl. unter mindestens einem der folgenden Patente geschützt: US-Patentnr. 6,864,059. Dieses Produkt wird unter Lizenz von Asuragen, Inc. bereitgestellt.

## 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 keine 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.

Asuragen® ist eine eingetragene Marke von Asuragen, 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 4.0 Grafische Symbole für die Kennzeichnung

Symbol/ Kennzeichen	Angabe
	Teile-/Bestell-Nr.
	Chargennummer
	Verfallsdatum JJJ-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 In-vitro-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  
Hergestellt von Asuragen® für Affymetrix, Inc.

 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](http://www.affymetrix.com)