

Affymetrix® Gene Profiling Reagent Kit



Kit di sintesi e di marcatura 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 sintesi e di marcatura dei trascritti è ottimizzato specificamente per la produzione di target di RNA complementari (cRNA) biotinilati e amplificati per ibridare in array per l'analisi di espressione. Il DNA stampo per la reazione IVT è tipicamente un cDNA a doppio filamento contenente una sequenza promotrice di RNA polimerasi. In esperimenti di marcatura del target, la sequenza promotrice è incorporata nello stampo di cDNA grazie all'impiego di un primer promotore di Oligo(dT) nella reazione iniziale di trascrizione inversa. Seguendo i protocolli (descritti nel *manual di istruzioni dei reagenti Gene Profiling Affymetrix*), è possibile ottenere una quantità sufficiente di stampo di cDNA da materiali iniziale di alta qualità. L'analogo nucleotide marcato è incorporato efficientemente nel target cRNA durante la reazione di marcatura di trascrizione *in vitro* mediata dall'RNA polimerasi come reagente di pseudouridina. I target cRNA biotinilati sono successivamente purificati, frammentati e ibridati agli array di espressione.

Componenti del kit

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

Componente	N° di cat.	Volume	Conservazione
Kit di sintesi e di marcatura dei trascritti A, n° di cat. 901293			
Tampone di sintesi del 1° filamento (1 st Strand Synthesis Buffer)	901287	128 µL	da 2°C a 8°C
Tampone di sintesi del 2° filamento (2 nd Strand Synthesis Buffer)	901288	576 µL	da 2°C a 8°C
Tampone di trascrizione <i>in vitro</i> (<i>In-Vitro</i> Transcription Buffer)	901291	704 µL	da 2°C a 8°C
Perline magnetiche (Magnetic Beads)	901290	3 456 µL	da 2°C a 8°C
Tampone di lavaggio delle perline (Beads Wash Buffer)	901289	5 400 µL	da 2°C a 8°C
Acqua priva di nucleasi (Nuclease-free Water)	901292	1 648 µL	da 2°C a 8°C

Componente	N° di cat.	Volume	Conservazione
Kit di sintesi e di marcatura dei trascritti B, n° di cat. 901298			
Miscela enzimatica di sintesi del 1° filamento (1 st Strand Synthesis Enzyme Mix)	901294	32 µL	da -15°C a -30°C
Miscela enzimatica di sintesi del 2° filamento (2 nd Strand Synthesis Enzyme Mix)	901295	64 µL	da -15°C a -30°C
Miscela enzimatica di trascrizione <i>in vitro</i> (<i>In-Vitro</i> Transcription Enzyme Mix)	901296	192 µL	da -15°C a -30°C
Marcatura RNA (RNA Label)	901297	64 µL	da -15°C a -30°C

Altri materiali necessari ma non inclusi nel kit

Componente	N° di cat.
Kit di controllo RNA	901285
Kit di rilevazione dei trascritti A, B, C	901299

Avvertenze e precauzioni

- Solo per uso diagnostico in vitro.
- Evitare la contaminazione microbica che potrebbe causare risultati erranei.
- 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.
- Adottare precauzioni standard quando si ottengono, maneggiano e smaltiscono reagenti potenzialmente cancerogeni.
- Evitare accuratamente la contaminazione crociata di campioni durante tutti i passaggi di questa procedura, poiché potrebbe condurre a risultati erranei.
- Se possibile, utilizzare guanti privi di talco per minimizzare l'introduzione di particelle di polvere nel campione o nei materiali del kit.
- Una volta aperto, questo prodotto è stabile per 20 giorni se conservato alla temperatura consigliata.
- È stato dimostrato che il rendimento del kit non viene influenzato da un massimo di quattro 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.

Indicazioni di instabilità o deterioramento

Al momento dell'arrivo, ispezionare le confezioni. Se l'etichetta antimanomissione è forata, non utilizzare il contenuto della confezione. Per richiedere assistenza o supporto tecnico, rivolgersi ad Affymetrix.

Procedure di lavoro

Procedura 1. Preparazione della reazione di sintesi del 1° filamento di cDNA

Nota bene. Prima dell'uso, miscelare delicatamente a vortice il tampone e la miscela enzimatica di sintesi del 1° filamento, agitando il tutto delicatamente al vortex prima di imprimere una breve centrifugazione.

- Preparare la miscela master del 1° filamento a temperatura ambiente, come indicato nella tabella 1.0. Preparare un 15% in più di miscela master del 1° filamento per accertarsi di disporre di un volume sufficiente di mix per tutti i pozzetti. Miscelare agitando delicatamente al vortex prima di imprimere una breve centrifugazione.

Tabella 1.0 Preparazione della miscela master del 1° filamento

Reagente	Volume/Reazione
Tampone di sintesi del 1° filamento (1 st Strand Synthesis Buffer)	4 µL
Miscela enzimatica di sintesi del 1° filamento (1 st Strand Synthesis Enzyme Mix)	1 µL
Controllo Poly-A (Poly-A Control) ¹	1 µL

1. Il controllo Poly-A va diluito prima di usarlo in questa miscela master. Consultare le istruzioni allegate al kit di controllo Poly-A. In alternativa, vedere le istruzioni dettagliate fornite nel Manuale d'istruzione dei reagenti Gene Profiling Affymetrix, accessibile sul sito www.affymetrix.com.

- Trasferire 6 µL di miscela master del 1° filamento (a temperatura ambiente) sul fondo degli appropriati pozzetti della piastra a 96 pozzetti appoggiata su un rack in plastica. Eliminare qualsiasi residuo di miscela master del 1° filamento
- Aggiungere 4 µL di campioni di RNA totale nei pozzetti appropriati della piastra a 96 pozzetti, pipettando delicatamente su e giù tre volte per miscelare.
- Coprire la piastra con una lamina adesiva e sigillare accuratamente i coperchi con un sigillante.
- Centrifugare a 370 x g per non più di 10 secondi a temperatura ambiente per depositare la soluzione sul fondo dei pozzetti.
- Rimuovere la piastra dalla centrifuga e trasferirla in un ciclatore termico impostato a 42°C per 2 ore, 4°C per 10 minuti e mantenerla a 4°C per la reazione di sintesi del 1° filamento. Coprire la piastra con un tampone di compressione prima di chiudere il coperchio riscaldato.
- Rimuovere la piastra una volta completata l'incubazione a 42°C, entro 10 minuti dall'incubazione a 4°C, e centrifugare la piastra a 370 x g per non più di 10 secondi, a temperatura ambiente, in modo da depositare la soluzione sul fondo dei pozzetti. Rimuovere la piastra dalla centrifuga e conservarla a temperatura ambiente.
- Procedere immediatamente con la preparazione della reazione di sintesi del 2° filamento di cDNA.

Procedura 2. Preparazione della reazione di sintesi del 2° filamento di cDNA

Nota bene. Prima dell'uso, miscelare delicatamente a vortice il tampone e la miscela enzimatica di sintesi del 2° filamento, agitando il tutto delicatamente al vortex prima di imprimere una breve centrifugazione.

- Preparare la miscela master del 2° filamento in una provetta da 1,5 mL priva di nucleasi, a temperatura ambiente, come indicato nella tabella 2.0. Preparare un 10% in più di miscela master del 2° filamento per accertarsi di disporre di un volume sufficiente di mix per tutti i pozzetti. Miscelare agitando delicatamente al vortex prima di imprimere una breve centrifugazione.

Tabella 2.0 Preparazione della miscela master del 2° filamento

Reagente	Volume/Reazione
Tampone di sintesi del 2° filamento (2 nd Strand Synthesis Buffer)	18 µL
Miscela enzimatica di sintesi del 2° filamento (2 nd Strand Synthesis Enzyme Mix)	2 µL

- Rimuovere accuratamente il foglio adesivo in alluminio dalla piastra appoggiata su un rack in plastica.
- Trasferire 20 µL di miscela master del 2° filamento contro la parete laterale degli appropriati pozzetti della piastra a 96 pozzetti, a temperatura ambiente.
- Coprire la piastra con un foglio adesivo in alluminio e sigillare accuratamente il coperchio con un rullo. Eliminare gli eventuali residui di miscela master del 2° filamento.
- Centrifugare a 370 x g per non più di 10 secondi, a temperatura ambiente, depositando la soluzione sul fondo dei pozzetti.
- Rimuovere la piastra dalla centrifuga e trasferirla in un ciclatore termico impostato su 16°C per un'ora ed a 4°C per 10 minuti. La piastra va mantenuta a 4°C per la reazione di sintesi del 2° filamento.

Importante! Non coprire la piastra con il coperchio riscaldato durante l'incubazione a 16°C.

- Rimuovere la piastra una volta completata l'incubazione a 16°C, entro 10

minuti dall'incubazione a 4°C, e centrifugare la piastra a 370 x g per non più di 10 secondi, a temperatura ambiente, in modo da depositare la soluzione sul fondo dei pozzetti. Rimuovere la piastra dalla centrifuga e conservarla a temperatura ambiente.

- Procedere immediatamente con la preparazione della reazione di trascrizione *in vitro*.

Procedura 3. Preparazione della reazione di trascrizione *in vitro* (IVT)

Nota bene. Prima dell'uso, miscelare il tampone e la miscela enzimatica di trascrizione *in vitro* e la marcatura RNA, agitando il tutto delicatamente al vortex prima di imprimere una breve centrifugazione.

- Preparare la miscela master IVT a temperatura ambiente, come riportato nella tabella 3.0. Preparare un 10% in più di miscela master IVT per assicurare un volume sufficiente per tutti i pozzetti. Miscelare agitando delicatamente al vortex prima di imprimere una breve centrifugazione.

Tabella 3.0 Preparazione della miscela master IVT

Reagente	Volume/Reazione
Tampone di trascrizione <i>in vitro</i> (In-Vitro Transcription Buffer)	22 µL
Marcatura RNA (RNA Label)	2 µL
Miscela enzimatica di trascrizione <i>in vitro</i> (In-Vitro Transcription Enzyme Mix)	6 µL

- Rimuovere accuratamente il foglio adesivo in alluminio dalla piastra appoggiata su un rack in plastica.
 - Trasferire 30 µL di miscela master IVT contro la parete laterale dei pozzetti appropriati della piastra a 96 pozzetti contenenti 30 µL di reazione del 2° filamento.
 - Coprire la piastra con un foglio adesivo in alluminio sigillando accuratamente i coperchi con un rullo.
 - Centrifugare a 370 x g per non più di 10 secondi a temperatura ambiente, depositando la soluzione sul fondo dei pozzetti.
 - Rimuovere la piastra dalla centrifuga e trasferirla in un ciclatore termico impostato a 40°C per 16 ore*. La piastra va mantenuta a 4°C per la reazione IVT. Coprire la piastra con un tampone di compressione prima di chiudere il coperchio riscaldato.
- *Il tempo di incubazione è stato ottimizzato utilizzando 100 ng di RNA totale disponibile in commercio estratto da cellule HeLa. Il tempo va impostato in base all'identità, alla qualità e alla quantità iniziale di RNA totale utilizzato nel test.*
- Estrarre la piastra dopo l'incubazione a 40°C (quando il display del ciclatore termico visualizza una temperatura di 4 °C) e centrifugarla a 370 x g per non più di 10 secondi, a temperatura ambiente, in modo da depositare la soluzione sul fondo dei pozzetti. Rimuovere la piastra dalla centrifuga e conservarla a temperatura ambiente. Procedere con la purificazione del cRNA.

Procedura 4. Purificazione del cRNA dalla reazione di trascrizione *in vitro* (IVT)

Importante! Prima di iniziare la purificazione, trasferire acqua priva di nucleasi nella provette da 1,5 mL. Riscaldare l'acqua priva di nucleasi a 60°C per almeno 10 minuti sul blocco riscaldante e mantenerla a tale temperatura pronta per l'uso.

Importante! Prima del primo impiego del tampone di lavaggio delle perline contenuto nel kit, è necessario addizionarvi 12,6 mL di etanolo puro ed apporre un segno di spunta nella casella di controllo, le iniziali e la data.

- Agitare delicatamente il contenitore di perline magnetiche per risospendere le particelle eventualmente depositate.
- Aggiungere 108 µL di soluzione di perline magnetiche in ciascuna miscela di reazione IVT. Miscelare pipettando delicatamente su e giù.
- Trasferire i campioni dalla piastra a 96 pozzetti alla piastra a 96 pozzetti con fondo a U.
- Porre la piastra con fondo a U nell'agitatore per piastre, quindi agitare a velocità media per 2 minuti a temperatura ambiente.
- Posizionare la piastra sul sostegno magnetico e attendere che le perline si raggruppino per 5-10 minuti finché la soluzione non risulta limpida e le perline non formano un pellet sul magnete.
- Quando la miscela è limpida, utilizzare una pipetta multicanale per rimuovere e scartare il supernatante senza toccare le perline.

7. Lasciare la piastra sul sostegno magnetico e lavare due volte ciascun campione con 200 µl di tampone di lavaggio delle perline, rimuovendo tutto il supernatante dopo ciascun lavaggio. Incubare per 25-35 secondi a temperatura ambiente durante ciascun lavaggio.
8. Attendere per 5-7 minuti che la piastra si asciughi all'aria sul sostegno magnetico.
9. Rimuovere la piastra dal sostegno magnetico, quindi aggiungere 30 µL di acqua priva di nucleasi, riscaldata a 60°C, contro la parete di ciascun pozzetto del campione, utilizzando una pipetta a ripetizione.

Importante! A causa dell'alta temperatura dell'acqua priva di nucleasi, quando si usa la pipetta a ripetizione, predisporre due aliquote extra da 30 µL: smaltire i primi 30 µL prima di aggiungere l'acqua ai campioni e non usare gli ultimi 30 µL della soluzione di eluizione. È importante attenersi a questo suggerimento per garantire l'aggiunta del volume giusto in ogni campione.

10. Porre la piastra con fondo a U in un agitatore. Agitare ad alta velocità per un minuto. Si può usare un micropipettatore per rompere il pellet qualora non venga risospeso in soluzione.
11. Posizionare la piastra sul sostegno magnetico e attendere che le perline si depositino per 3-4 minuti.
12. Quando la soluzione risulta limpida e le perline si sono depositate, rimuovere 30 µL di supernatante senza disturbare il pellet. Trasferire in una nuova piastra da 96 pozzetti o in provette singole il supernatante contenente il cRNA eluito.

I passaggi e le istruzioni dettagliati per le procedure sopra riportate sono riportati nel *manuale d'istruzione 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. Non conservare il kit di sintesi e di marcatura dei trascritti B in un congelatore autosbrinatori. Tutte le apparecchiature di laboratorio utilizzate per preparare il target durante questa procedura vanno calibrate e mantenute in buone condizioni per assicurarne la precisione. La misurazione errata dei reagenti può compromettere il risultato della procedura.

Brevetti

I prodotti potrebbero essere tutelati da uno o più dei seguenti brevetti: brevetto U.S.A. no. 6.864.059. Questo prodotto viene fornito sotto licenza di Asuragen, Inc.

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.

Asuragen® è un marchio depositato di Asuragen, 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 4.0. 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

Prodotto da Asuragen® per Affymetrix, Inc.

 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