

Affymetrix® Kit de Reagentes para Determinação do Perfil Genético

Kit para Síntese e Marcação 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 Síntese e Marcação de Transcriptos foi especificamente otimizado para produzir alvos de RNA complementar amplificados e biotinizados (cRNA) destinados à hibridação em arrays, para análise da expressão. O DNA molde para a reacção de TIV é, tipicamente, um cDNA de cadeia dupla contendo uma sequência de promotores de RNA Polimerase. Em experiências de marcação de alvos, a sequência de promotores é incorporada no modelo do cDNA utilizando um primer Oligo(dt)-Promotor na reacção de transcrição inversa inicial. É possível obter-se modelo de cDNA suficiente através de protocolos (descritos no *Guia do Utilizador dos Reagentes para Determinação do Perfil Genético Affymetrix*) realizados a partir de materiais iniciais de elevada qualidade. O análogo de nucleótido marcado é incorporado de forma eficiente no alvo de cRNA durante a reacção de marcação da transcrição *in vitro* mediada pela RNA polimerase como reagente pseudo-uridina. Os alvos de cRNA biotinizados são então purificados, fragmentados e hibridados em arrays de expressão.

Componentes do kit

O certificado de análise está disponível no site da Affymetrix.

Componente	P/N	Volume	Armazenamento
Kit A para síntese e marcação de transcriptos	P/N 901293		
Tampão para síntese da 1ª cadeia (1 st Strand Synthesis Buffer)	901287	128 µl	2 a 8 °C
Tampão para síntese da 2ª cadeia (2 nd Strand Synthesis Buffer)	901288	576 µl	2 a 8 °C
Tampão para transcrição <i>in-vitro</i> (<i>In-Vitro</i> Transcription Buffer)	901291	704 µl	2 a 8 °C
Grânulos magnéticos (Magnetic Beads)	901290	3 456 µl	2 a 8 °C
Tampão para lavagem de grânulos (Beads Wash Buffer)	901289	5 400 µl	2 a 8 °C
Água sem nucleases (Nuclease-free Water)	901292	1 648 µl	2 a 8 °C

Componente	P/N	Volume	Armazenamento
Kit B para síntese e marcação de transcriptos	P/N 901298		
Mistura de enzimas para síntese da 1ª cadeia (1 st Strand Synthesis Enzyme Mix)	901294	32 µl	-15 a -30 °C
Mistura de enzimas para síntese da 2ª cadeia (2 nd Strand Synthesis Enzyme Mix)	901295	64 µl	-15 a -30 °C
Mistura de enzima para transcrição <i>in-vitro</i> (<i>In-Vitro</i> Transcription Enzyme Mix)	901296	192 µl	-15 a -30 °C
Marcador de RNA (RNA Label)	901297	64 µl	-15 a -30 °C

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

Componente	P/N
Kit para Controlo do RNA	901285
Kit A, B e C para Detecção de Transcriptos	901299

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. Adote 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 20 dias quando armazenado à temperatura recomendada.
8. Foi determinado que o desempenho do kit não foi afectado até ao quarto ciclo de congelação-descongelação.

Informação sobre segurança

As folhas de segurança de materiais (MSDS) estão disponíveis em 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.

Indicações de instabilidade ou deterioração

Inspeccione as embalagens à chegada. Se o rótulo de segurança se encontrar aberto nas perfurações, não utilize o conteúdo da embalagem. Para assistência ao cliente ou assistência técnica, contacte a Affymetrix.

Procedimentos de trabalho

Procedimento 1: Preparação da reacção de síntese da 1ª cadeia de cDNA

Nota: Misture o tampão para síntese da 1ª cadeia e a mistura de enzima para síntese da 1ª cadeia antes de utilizar, submetendo a um vórtex suave seguido de breve centrifugação.

1. Prepare a mistura-mãe de 1ª Cadeia à temperatura ambiente, conforme descrito no Quadro 1.0. Prepare mais 15% de mistura-mãe de 1ª Cadeia, para garantir um volume suficiente para todos os poços. Misture submetendo a um vórtex suave seguido de breve centrifugação.

Quadro 1.0: Preparação da mistura-mãe de 1ª cadeia

Reagente	Volume/Reacção
Tampão para síntese da 1ª cadeia (1 st Strand Synthesis Buffer)	4 µl
Mistura de enzimas para síntese da 1ª cadeia (1 st Strand Synthesis Enzyme Mix)	1 µl
Controlo Poly-A (Poly-A Control) ¹	1 µl

1. O controlo Poly-A tem de ser diluído antes de ser utilizado nesta mistura-mãe. Consulte as instruções enviadas com o kit de controlo Poly-A. Em alternativa, pode encontrar instruções pormenorizadas no Manual de Ensaio para Determinação do Perfil Genético Affymetrix, que está disponível em www.affymetrix.com.

- Transfira 6 µl de mistura-mãe de 1ª cadeia (temperatura ambiente), para os poços apropriados da placa de 96 poços colocada num suporte de plástico. Elimine o que sobrar da mistura-mãe de 1ª cadeia.
- Adicione 4 µl das amostras de RNA total (total de 100 ng a 1 000 ng/rxn) aos poços adequados da placa de 96 poços, pipetando suavemente, para cima e para baixo, 3 vezes, para misturar.
- Cubra a placa com folha adesiva de alumínio e sele os topos com um rolo.
- Centrifugue a 370 x g, durante um máximo de 10 segundos, à temperatura ambiente, para colher a solução do fundo dos poços.
- Retire a placa da centrífuga e transfira para um termociclador, programado para 42 °C durante 2 horas, 4 °C durante 10 minutos e 4 °C para manter, para a reacção de síntese da 1ª cadeia. Cubra a placa com uma almofada de compressão antes de fechar a tampa aquecida.
- Retire a placa após a conclusão da incubação a 42 °C, nos 10 minutos seguintes à incubação, a 4 °C, e centrifugue a placa a 370 x g, durante um máximo de 10 segundos, à temperatura ambiente, para colher a solução do fundo dos poços. Retire a placa da centrifugadora e mantenha à temperatura ambiente.
- Continue imediatamente com a preparação da reacção de síntese da 2ª cadeia de cDNA.

Procedimento 2: Preparação da reacção de síntese da 2ª cadeia de cDNA

Nota: Misture o tampão para síntese da 2ª cadeia e a mistura de enzima para síntese da 2ª cadeia antes de utilizar, submetendo a um vórtex suave seguido de breve centrifugação.

- Prepare a mistura-mãe de 2ª cadeia num tubo de 1,5 ml sem nuclease, à temperatura ambiente, conforme descrito no Quadro 2.0. Prepare mais 10% de mistura-mãe de 2ª cadeia, para garantir um volume suficiente para todos os poços. Misture submetendo a um vórtex suave seguido de breve centrifugação.

Quadro 2.0: Preparação da mistura-mãe de 2ª cadeia

Reagente	Volume/Reacção
Tampão para síntese da 2ª cadeia (2 nd Strand Synthesis Buffer)	18 µl
Mistura de enzimas para síntese da 2ª cadeia (2 nd Strand Synthesis Enzyme Mix)	2 µl

- Retire cuidadosamente a folha de adesiva de alumínio da placa que está colocada no suporte de plástico.
- Transfira 20 µl de mistura-mãe de 2ª cadeia para a parede lateral dos poços adequados da placa de 96 poços, à temperatura ambiente.
- Cubra a placa com folha adesiva de alumínio e sele a parte superior com um rolo. Elimine o que sobrar da mistura-mãe de 2ª cadeia.
- Centrifugue a 370 x g, durante um máximo de 10 segundos, à temperatura ambiente, para colher a solução do fundo dos poços.
- Retire a placa da centrifugadora e transfira para um termociclador, programado para 16 °C durante 1 hora, 4 °C durante 10 minutos e mantenha a 4 °C para a reacção de síntese da 2ª cadeia.

Importante: Não cubra a placa com a tampa aquecida durante a incubação a 16 °C.

- Retire a placa após a conclusão da incubação a 16 °C; nos 10 minutos seguintes à incubação a 4 °C and e centrifugue a placa a 370 x g, durante um máximo de 10 segundos, à temperatura ambiente, para colher a solução do fundo dos poços. Retire a placa da centrifugadora e mantenha à temperatura ambiente.

- Continue imediatamente com a preparação da reacção de transcrição *in-vitro*.

Procedimento 3: Preparação da reacção de transcrição *in-vitro* (TIV)

Nota: Misture o tampão para transcrição *in-vitro*, a mistura para enzima de transcrição *in-vitro* e o marcador de RNA antes de utilizar, submetendo a ligeiro vórtex seguido de breve centrifugação.

- Prepare a mistura-mãe para TIV à temperatura ambiente, conforme descrito no Quadro 3.0. Prepare mais 10% de mistura-mãe para TIV, para garantir um volume suficiente para todos os poços. Misture submetendo a um vórtex suave seguido de breve centrifugação.

Quadro 3.0: Preparação da mistura-mãe para TIV

Reagente	Volume/Reacção
Tampão para transcrição <i>in-vitro</i> (<i>In-Vitro</i> Transcription Buffer)	22 µl
Marcador de RNA (RNA Label)	2 µl
Mistura de enzima para transcrição <i>in-vitro</i> (<i>In-Vitro</i> Transcription Enzyme Mix)	6 µl

- Retire cuidadosamente a folha adesiva de alumínio da placa que está colocada no suporte de plástico.
- Transfira 30 µl de mistura-mãe para TIV para a parede lateral dos poços adequados da placa de 96 poços contendo os 30 µl de reacção da 2ª cadeia.
- Cubra a placa com folha adesiva de alumínio e sele os topos com um rolo.
- Centrifugue a 370 x g, durante um máximo de 10 segundos, à temperatura ambiente, para colher a solução do fundo dos poços.
- Retire a placa da centrífuga e transfira para um termociclador programado para 40 °C durante 16 horas*, 4 °C para manter a reacção de TIV. Cubra a placa com uma almofada de compressão antes de fechar a tampa aquecida.
**Tempo de incubação optimizado para 100 ng de RNA total, comercialmente disponível, extraído de células Ela. O tempo deve ser ajustado com base na identidade, qualidade e quantidade inicial de RNA total utilizando no teste.*
- Retire a placa após 40 °C de incubação (quando o visor do termociclador indicar uma temperatura de 4 °C), centrifugue a placa a 370 x g, durante um máximo de 10 segundos, à temperatura ambiente, para colher a solução do fundo dos poços. Retire a placa da centrífuga e mantenha à temperatura ambiente. Possiga com a purificação do cRNA.

Procedimento 4: Purificação do cRNA a partir da reacção de transcrição *in-vitro* (TIV)

Importante: Antes de iniciar a purificação, transfira a água sem nuclease para um tubo de 1,5 ml. Aqueça a água sem nuclease a 60 °C, durante pelo menos 10 minutos, no bloco de calor, deixando a água sem nuclease a 60 °C até utilizar.

Importante: Antes de utilizar o tampão para lavagem de grânulos do kit, adicione 12,6 ml de etanol a 100% ao tampão para lavagem de grânulos e assinale a caixa de verificação, iniciais e data.

- Agite suavemente o frasco com os grânulos magnéticos para ressuspender as partículas que possam ter assentado.
- Adicione 108 µl de solução de grânulos magnéticos à mistura da reacção para TIV. Misture, pipetando suavemente para cima e para baixo.
- Transfira amostras da placa de 96 poços para a placa de 96 poços com fundo em U.
- Transfira a placa com fundo em U para o agitador de placas e agite a uma velocidade média, durante 2 minutos, à temperatura ambiente.
- Coloque a placa num suporte magnético e deixe que os grânulos formem aglomerados durante 5 a 10 minutos até a solução ficar límpida e os grânulos se aglomerarem em torno do íman.
- Depois da mistura ficar transparente retire e rejeite o sobrenadante utilizando uma pipeta multi-canal, sem interferir com os grânulos.
- Deixe a placa no suporte magnético e lave cada amostra com 200 µl de tampão para lavagem de grânulos duas vezes, retirando todo o sobrenadante após cada lavagem. Incube durante 25-35 segundos à temperatura ambiente durante cada lavagem.
- Deixe a placa secar ao ar durante 5 a 7 minutos, no suporte magnético.
- Retire a placa do suporte magnético e utilize uma pipeta de repetição para adicionar 30 µl de água sem nuclease, aquecida a 60 °C, à parede lateral de cada amostra utilizando uma micropipeta.

Importante: Devido às elevadas temperaturas da Água Sem Nuclease, quando utilizar a pipeta de repetição, tenha em conta a utilização de dois volumes suplementares de 30 µl: rejeite os primeiros 30 µl antes de adicionar às amostras e não utilize os últimos 30 µl da solução de eluição. É importante seguir as recomendações aqui descritas para garantir que os volumes correctos são dispensados a cada amostra.

10. Transfira a placa com fundo em U para um agitador. Agite a alta velocidade durante um minuto. Pode-se utilizar um micropipetador para desfazer totalmente o aglomerado, se este não se dissolver.
11. Desloque a placa para um suporte magnético e deixe os grânulos assentar durante 3 a 4 minutos.
12. Quando a solução ficar transparente e os grânulos tiverem assentado, retire 30 µl de sobrenadante sem interferir no aglomerado. Transfira o sobrenadante contendo o cRNA eluído para uma nova placa de 96 poços ou para tubos individuais.

O *Guia do Utilizador dos Reagentes para Determinação do Perfil Genético Affymetrix* apresenta passos e instruções pormenorizadas para os procedimentos anteriormente referidos, que estão disponíveis em www.affymetrix.com.

Limitações do procedimento

O armazenamento e manuseamento adequado dos reagentes e das amostras é essencial para o desempenho. Não guarde o Kit B para síntese e marcação de transcriptos num congelador frost-free. Todo o equipamento laboratorial utilizado para preparar o alvo durante este procedimento deve estar calibrado e em bom estado de manutenção para garantir a precisão. Uma medição incorrecta dos reagentes pode afectar o resultado do procedimento.

Patentes

Os produtos podem estar cobertos por uma ou mais das seguintes patentes: Patente dos EUA nº 6,864,059. Este produto é fornecido sob licença da Asuragen, Inc.

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.

Asuragen® é uma marca comercial registada da Asuragen, 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 4.0: 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
	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

Fabricado pela Asuragen® para a Affymetrix, Inc.

 Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
Países Baixos
Telefone: +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: supporteurope@affymetrix.com
Tel: +44 (0) 1628 552550
Fax: +44 (0) 1628 552585
www.affymetrix.com