



Prospecto adjunto
al producto

Affymetrix® Kit de reactivos para análisis de perfil de expresión génica

Kit de síntesis y marcado de transcritos



Uso indicado

Para diagnóstico in vitro

Los reactivos para análisis de perfil de expresión génica Affymetrix® están indicados para la preparación de la diana marcada de ARN complementario a partir de ARN total purificado procedente de muestras de tejido clínicas frescas o congeladas para hibridación con micromatrices Affymetrix GeneChip®, y para la cuantificación de señales de fluorescencia de la diana de ARN marcada mediante el uso del sistema instrumental de micromatrices Affymetrix GeneChip®.

Estos productos están indicados para emplearse con ensayos de micromatrices Affymetrix GeneChip, autorizados independientemente por la FDA, que requieran utilizar reactivos para análisis de perfil de expresión génica Affymetrix.

Resumen

El kit de síntesis y marcado de transcritos está optimizado específicamente para producir dianas de ARN complementario (ARNc) amplificado y biotinilado para hibridar con micromatrices de análisis de expresión. El ADN molde para la reacción de transcripción *in vitro* (TIV) suele ser ADNc bicatenario que contiene una secuencia promotora de ARN-polimerasa. En experimentos de marcado de dianas, la secuencia promotora se incorpora al ADNc molde con ayuda de un cebador con promotor de Oligo(dT) en la reacción inicial de transcripción inversa. Puede obtenerse una cantidad suficiente de ADNc molde siguiendo los protocolos descritos en el documento *Affymetrix Gene Profiling Reagents User Guide* a partir de materias primas de alta calidad. El análogo de nucleótido marcado se incorpora con eficiencia en la diana de ARNc durante la reacción de marcado de la transcripción *in vitro* mediada por la ARN-polimerasa como reactivo de pseudouridina. Posteriormente, las dianas de ARNc biotinilado se purifican, fragmentan e hibridan con micromatrices de expresión.

Componentes del kit

El certificado de análisis está disponible en el sitio web de Affymetrix.

Componente	N.º ref.	Volumen	Almacenamiento
Kit A de síntesis y marcado de transcrito N.º ref. 901293			
Tampón de síntesis de la 1.ª cadena (1 st Strand Synthesis Buffer)	901287	128 µl	2 a 8 °C
Tampón de síntesis de la 2.ª cadena (2 nd Strand Synthesis Buffer)	901288	576 µl	2 a 8 °C
Tampón de transcripción <i>in vitro</i> (<i>In-Vitro</i> Transcription Buffer)	901291	704 µl	2 a 8 °C
Perlas magnéticas (Magnetic Beads)	901290	3.456 µl	2 a 8 °C
Tampón de lavado de las perlas (Beads Wash Buffer)	901289	5.400 µl	2 a 8 °C
Agua libre de nucleasas (Nuclease-free Water)	901292	1.648 µl	2 a 8 °C

Componente	N.º ref.	Volumen	Almacenamiento
Kit B de síntesis y marcado de transcrito N.º ref. 901298			
Mezcla enzimática para síntesis de la 1.ª cadena (1 st Strand Synthesis Enzyme Mix)	901294	32 µl	-15 a -30 °C
Mezcla enzimática para síntesis de la 2.ª cadena (2 nd Strand Synthesis Enzyme Mix)	901295	64 µl	-15 a -30 °C
Mezcla enzimática para transcripción <i>in vitro</i> (<i>In-Vitro</i> Transcription Enzyme Mix)	901296	192 µl	-15 a -30 °C
Marcador de ARN (RNA Label)	901297	64 µl	-15 a -30 °C

Otros reactivos para análisis de perfil de expresión génica que no se suministran en este kit

Componente	N.º ref.
Kit de control de ARN	901285
Kit de detección de transcrito A, B, C	901299

Advertencias y precauciones

1. Para diagnóstico in vitro.
2. Evite la contaminación microbiana, que puede producir resultados erróneos.
3. Todas las muestras y los materiales biológicos con los que éstos entren en contacto deben manejarse como si fueran capaces de transmitir infecciones y desecharse siguiendo las precauciones adecuadas, de conformidad con los reglamentos nacionales, regionales y municipales. Esto implica el acatamiento de la Norma sobre Patógenos de Transmisión Sanguínea OSHA (OSHA Bloodborne Pathogens Standard, 29 CFR 1910.1030) en el caso de sangre y otros materiales potencialmente infecciosos regulados por este decreto. No pipetee nunca con la boca. Evite que las muestras entren en contacto con la piel y las membranas mucosas.
4. Tome las precauciones estándares al obtener, manipular y desechar reactivos con potencial cancerígeno.
5. Cuide de evitar la contaminación cruzada de las muestras durante todos los pasos de este procedimiento; la contaminación podría ocasionar resultados erróneos.
6. Póngase guantes sin talco siempre que le sea posible, para reducir al mínimo la introducción de partículas de talco en las muestras o los materiales del kit.
7. Una vez abierto, este producto es estable durante 20 días si se lo almacena a la temperatura recomendada.
8. Se ha demostrado que el kit presenta el mismo rendimiento después de haber sido sometido a hasta cuatro ciclos de congelación y descongelación.

Información de seguridad

En www.affymetrix.com encontrará fichas técnicas sobre la seguridad de los materiales (MSDS). Si el producto es un kit o se suministra con más de un material, consulte la MSDS de cada componente para averiguar la información sobre peligros.

Indicaciones de inestabilidad o deterioro

Revise los envases a su llegada. Si la etiqueta a prueba de manipulación está abierta a la altura de las perforaciones, no utilice el contenido del envase. Para obtener atención al cliente o asistencia técnica, póngase en contacto con Affymetrix.

Procedimientos de trabajo

Procedimiento 1: Preparación de la reacción de síntesis de la 1.ª cadena de ADNc

Nota: Mezcle el tampón para síntesis de la 1.ª cadena y la mezcla enzimática para síntesis de la 1.ª cadena antes de utilizarlos, agitando las soluciones con suavidad en un vórtexy centrifugándolas brevemente.

1. Prepare la mezcla maestra de la 1.ª cadena a temperatura ambiente tal como se describe en la tabla 1.0. Elabore un 15% de más de la mezcla maestra de la 1.ª cadena a fin de garantizar que el volumen alcance para todos los pocillos. Agite con suavidad en un vórtexy luego centrifugue brevemente.

Tabla 1.0 Preparación de la mezcla maestra de la 1.ª cadena

Reactivo	Volumen/reacción
Tampón de síntesis de la 1.ª cadena (1 st Strand Synthesis Buffer)	4 µl
Mezcla enzimática para síntesis de la 1.ª cadena (1 st Strand Synthesis Enzyme Mix)	1 µl
Control de poli-A (Poly-A Control) ¹	1 µl

1. El control de poli-A se debe diluir antes de ser utilizado para preparar esta mezcla maestra. Consulte las instrucciones adjuntas al kit del control de poli-A. Como alternativa, encontrará instrucciones detalladas en la publicación *Affymetrix Gene Profiling Assay Manual*, disponible en www.affymetrix.com.

- Transfiera 6 µl de mezcla maestra de la 1.ª cadena (a temperatura ambiente) al fondo de los correspondientes pocillos de la placa de 96 pocillos apoyada sobre una gradilla plástica. Deseche la cantidad que sobre de mezcla maestra de la 1.ª cadena.
- Añada 4 µl de las muestras de ARN total (100 a 1.000 ng/reacción en total) a los correspondientes pocillos de la placa de 96 pocillos, aspirando el líquido y expulsándolo suavemente con la pipeta 3 veces para mezclar el contenido.
- Cubra la placa con lámina adhesiva de aluminio y fjela cuidadosamente con un rodillo de entintar para sellar las partes superiores.
- Centrifugue a 370 x g durante no más de 10 segundos a temperatura ambiente para depositar la solución en el fondo de los pocillos.
- Retire la placa de la centrifuga y transfírela a un termociclador que está configurado a 42 °C durante 2 horas, 4 °C durante 10 minutos y conservación a 4 °C para la reacción de síntesis de la 1.ª cadena. Cubra la placa con una almohadilla de compresión antes de cerrar la tapa calentada.
- Después de que finalice la incubación a 42 °C y antes de que transcurran 10 minutos de la incubación a 4 °C, retire la placa y centrifúguela a 370 x g durante no más de 10 segundos a temperatura ambiente para depositar la solución en el fondo de los pocillos. Extraiga la placa de la centrifuga y manténgala a temperatura ambiente.
- Prosiga inmediatamente a la preparación de la reacción de síntesis de la 2.ª cadena de ADNc.

Procedimiento 2: Preparación de la reacción de síntesis de la 2.ª cadena de ADNc

Nota: Mezcle el tampón para síntesis de la 2.ª cadena y la mezcla enzimática para síntesis de la 2.ª cadena antes de utilizarlos, agitando las soluciones con suavidad en un vórtex y centrifugándolas brevemente.

- Prepare la mezcla maestra de la 2.ª cadena en un tubo de 1,5 ml libre de nucleasas a temperatura ambiente tal como se describe en la tabla 2.0. Elabore un 10% de más de la mezcla maestra de la 2.ª cadena a fin de garantizar que el volumen alcance para todos los pocillos. Agite con suavidad en un vórtex y luego centrifugue brevemente.

Tabla 2.0 Preparación de la mezcla maestra de la 2.ª cadena

Reactivo	Volumen/reacción
Tampón de síntesis de la 2.ª cadena (2 nd Strand Synthesis Buffer)	18 µl
Mezcla enzimática para síntesis de la 2.ª cadena (2 nd Strand Synthesis Enzyme Mix)	2 µl

- Retire cuidadosamente la lámina adhesiva de aluminio de la placa apoyada sobre la gradilla plástica.
- Transfiera 20 µl de mezcla maestra de la 2.ª cadena al interior de la pared lateral de los correspondientes pocillos de la placa de 96 pocillos a temperatura ambiente.
- Cubra la placa con lámina adhesiva de aluminio y fjela cuidadosamente con un rodillo de entintar para tapar la parte superior. Deseche la cantidad que sobre de mezcla maestra de la 2.ª cadena.
- Centrifugue a 370 x g durante no más de 10 segundos a temperatura ambiente para depositar la solución en el fondo de los pocillos.
- Retire la placa de la centrifuga y transfírela a un termociclador configurado a 16 °C durante 1 hora, 4 °C durante 10 minutos y conservación a 4 °C para la reacción de síntesis de la 2.ª cadena.

Importante: No cubra la placa con la tapa calentada durante la incubación a 16 °C.

- Después de que finalice la incubación a 16 °C y antes de que transcurran 10 minutos de la incubación a 4 °C, retire la placa y centrifúguela a 370 x g durante no más de 10 segundos a temperatura ambiente para

depositar la solución en el fondo de los pocillos. Extraiga la placa de la centrifuga y manténgala a temperatura ambiente.

- Prosiga inmediatamente a la preparación de la reacción de transcripción *in vitro*.

Procedimiento 3: Preparación de la reacción de transcripción *in vitro* (TIV)

Nota: Mezcle el tampón de transcripción *in vitro*, la mezcla enzimática para transcripción *in vitro* y el marcador de ARN antes de utilizarlos, agitando las soluciones con suavidad en un vórtex y centrifugándolas brevemente.

- Prepare la mezcla maestra de TIV a temperatura ambiente tal como se describe en la tabla 3.0. Elabore un 10% de más de la mezcla maestra de TIV a fin de garantizar que el volumen alcance para todos los pocillos. Agite con suavidad en un vórtex y luego centrifugue brevemente.

Tabla 3.0 Preparación de la mezcla maestra de TIV

Reactivo	Volumen/reacción
Tampón de transcripción <i>in vitro</i> (<i>In-Vitro</i> Transcription Buffer)	22 µl
Marcador de ARN (RNA Label)	2 µl
Mezcla enzimática para transcripción <i>in vitro</i> (<i>In-Vitro</i> Transcription Enzyme Mix)	6 µl

- Retire cuidadosamente la lámina adhesiva de aluminio de la placa apoyada sobre la gradilla plástica.
 - Transfiera 30 µl de mezcla maestra de TIV al interior de la pared lateral de los correspondientes pocillos de la placa de 96 pocillos que contiene los 30 µl de la reacción de la 2.ª cadena.
 - Cubra la placa con lámina adhesiva de aluminio y fjela cuidadosamente con un rodillo de entintar para tapar las partes superiores.
 - Centrifugue a 370 x g durante no más de 10 segundos a temperatura ambiente para depositar la solución en el fondo de los pocillos.
 - Retire la placa de la centrifuga y transfírela a un termociclador que está configurado a 40 °C durante 16 horas* y conservación a 4 °C para la reacción de TIV. Cubra la placa con una almohadilla de compresión antes de cerrar la tapa calentada.
- *El tiempo de incubación se optimizó con 100 ng de ARN total comercial extraído de células HeLa. El tiempo se debe ajustar en función de la identidad, calidad y cantidad inicial de ARN total empleado en el análisis.*
- Después de la incubación a 40 °C (una vez que el termociclador muestre una temperatura de 4 °C), retire la placa y centrifúguela a 370 x g durante no más de 10 segundos a temperatura ambiente para depositar la solución en el fondo de los pocillos. Extraiga la placa de la centrifuga y manténgala a temperatura ambiente. Prosiga a la purificación del ARNc.

Procedimiento 4: Purificación del ARNc procedente de la reacción de transcripción *in vitro* (TIV)

Importante: Antes de iniciar el paso de purificación, transfiera el agua libre de nucleasas a un tubo de 1,5 ml. Caliente el agua libre de nucleasas a 60 °C sobre el bloque térmico durante 10 minutos, como mínimo, y consérvela a esa temperatura hasta el momento de utilizarla.

Importante: Antes de utilizar el tampón de lavado de perlas del kit por primera vez, añádale 12,6 ml de etanol al 100% y ponga una marca en la casilla de verificación y anote sus iniciales y la fecha.

- Agite suavemente el frasco de perlas magnéticas para resuspender las partículas que se hayan sedimentado.
- Añada 108 µl de solución de perlas magnéticas a cada mezcla de reacción de TIV. Aspire el líquido y expúlselo suavemente con la pipeta para mezclar su contenido.
- Transfiera las muestras de la placa de 96 pocillos a la placa de 96 pocillos con fondo en U.
- Transfiera la placa con fondo en U al agitador de placas; agite la placa a velocidad mediana durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- Coloque la placa sobre el soporte magnético y deje que las perlas se acumulen durante 5 a 10 minutos hasta que formen un aglomerado contra el imán y la solución esté transparente.
- Una vez que la solución esté transparente, aspire el sobrenadante con una pipeta multicanal y deséchelo (sin perturbar las perlas).
- Deje la placa en el soporte magnético y lave cada muestra con 200 µl de tampón de lavado de perlas dos veces, eliminando todo el sobrenadante después de cada lavado. Incube durante 25-35 segundos a temperatura ambiente durante cada lavado.

8. Deje que la placa se seque al aire unos 5 a 7 minutos sobre el soporte magnético.
9. Retire la placa del soporte magnético y añada 30 µl de agua libre de nucleasas (calentada a 60 °C) a la pared lateral de cada pocillo de muestra mediante una pipeta repetidora.

Importante: Debido a la alta temperatura del agua libre de nucleasas, cuando utilice la pipeta repetidora tenga en cuenta dos volúmenes adicionales de 30 µl: deseche los primeros 30 µl antes de la adición a las muestras y no utilice los últimos 30 µl de la solución de elución. Es importante que siga la recomendación descrita en este documento para cerciorarse de dispensar los volúmenes correctos a cada muestra.

10. Transfiera la placa con fondo en U a un agitador; agítela a alta velocidad durante un minuto. Si el aglomerado no pasa a la solución, puede emplear una micropipeta para disgregarlo completamente.
11. Traslade la placa al soporte magnético y deje que las perlas se sedimenten durante 3 ó 4 minutos.
12. Una vez que la solución esté transparente y se hayan sedimentado las perlas, aspire 30 µl de sobrenadante sin perturbar el aglomerado. Transfiera el sobrenadante que contiene el ARNc eluido a una nueva placa de 96 pocillos o a tubos individuales.

Encontrará pasos e instrucciones detallados sobre los procedimientos anteriores en el documento *Affymetrix Gene Profiling Reagents User Guide* que puede consultarse en www.affymetrix.com.

Limitaciones del procedimiento

Para lograr el rendimiento apropiado es esencial almacenar y manejar los reactivos y muestras correctamente. No almacene el kit B de síntesis y marcado de transcritos en un refrigerador sin escarcha. Todos los equipos de laboratorio utilizados para preparar la diana durante este procedimiento deben ser objeto de calibración y mantenimiento para garantizar su exactitud. La medición incorrecta de los reactivos puede afectar el resultado del procedimiento.

Patentes

Los productos pueden estar amparados por una o varias de las patentes siguientes: patente estadounidense 6 864 059. Este producto se suministra bajo licencia de Asuragen, Inc.

Licencia limitada

Sujeto a los términos y condiciones de Affymetrix que rigen su uso de los productos Affymetrix, Affymetrix le otorga una licencia no exclusiva, intransferible y no cesible para utilizar este producto Affymetrix sólo de conformidad con el manual y las instrucciones escritas suministrados por Affymetrix. Usted entiende y acepta que, salvo lo estipulado expresamente en los términos y condiciones de Affymetrix, este producto Affymetrix no confiere ni implica ningún derecho o licencia a ninguna patente u otra propiedad intelectual que Affymetrix posea o para la cual conceda licencias. En particular, no se confiere ni implica ningún derecho o licencia de uso de este producto Affymetrix en conjunción con un producto no suministrado, vendido bajo licencia o recomendado específicamente por Affymetrix para dicho uso.

Trademarks

Affymetrix®, Axion™, Command Console®, DMET™, GeneAtlas™, GeneChip®, GeneChip-compatible™, GeneTitan®, Genotyping Console™, myDesign™, NetAffx®, OncoScan™, Powered by Affymetrix™, Procarta® y QuantiGene® son marcas comerciales o registradas de Affymetrix, Inc.

Asuragen® es una marca registrada de Asuragen, Inc.

Todas las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivas compañías.












Copyright

© 2009-2011 Affymetrix, Inc. Reservados todos los derechos.

Tabla de símbolos

En la tabla siguiente se indica la leyenda de los símbolos gráficos empleados en la etiqueta, los prospectos adjuntos y el manual del usuario de productos Affymetrix.

Tabla 4.0 Símbolos gráficos utilizados en el etiquetado

Símbolo / Etiqueta	Declaración
	Número de pieza/referencia
	Número de lote
	Fecha de caducidad AAAA-MM El kit caduca el último día del mes.
	Límites de temperatura
	Contiene una cantidad suficiente para < n > pruebas
Xi	Irritante
	Peligros
	Consultar las instrucciones de uso
	Fabricado por
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Conformidad europea
	Representante autorizado en la Unión Europea

En el sitio web de Affymetrix encontrará versiones traducidas de este prospecto.

Información de contacto

 Affymetrix, Inc.
3420 Central Expressway
Santa Clara, CA 95051 EE. UU.
Fabricado por Asuragen® para Affymetrix, Inc.

 Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
Países Bajos
Teléfono: +31.70.345.8570
Fax: +31.70.346.7299

Para obtener asistencia técnica, comuníquese con Affymetrix escribiendo a la dirección electrónica o llamando al teléfono apropiado:

Affymetrix, Inc.

3420 Central Expressway
Santa Clara, CA 95051 EE. UU.
Correo 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
Correo electrónico: supporteurope@affymetrix.com
Tel: +44 (0) 1628 552550
Fax: +44 (0) 1628 552585
www.affymetrix.com