

Beknopte naslagkaart

Genprofielingsreagentia van Affymetrix®



Beoogd doel

Voor gebruik bij in vitro diagnostiek

De genprofielingsreagentia van Affymetrix® zijn bestemd voor de preparatie van gelabeld complementair doel-RNA uit gezuiverd totaal-RNA uit verse of ingevroren klinische weefsel-specimens 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 genprofielingsassays van Affymetrix gebruikt dienen te worden.

Deze beknopte naslagkaart dient uitsluitend voor ervaren gebruikers en dient als aanvulling op de *Affymetrix® Gene Profiling Reagents User Guide* (gebruikershandleiding voor genprofielingsreagentia van Affymetrix®) (onderdeelnr. 702749).

Procedure 1: Opstelling van het PCR-apparaat

De voor PCR-apparaten gebruikte programma's staan bij elke procedure in deze beknopte naslagkaart vermeld.

Zie hoofdstuk 2 van de *Affymetrix® Gene Profiling Reagents User Guide* (gebruikershandleiding voor genprofielingsreagentia van Affymetrix®) (onderdeelnr. 702749).

Procedure 2: Preparatie van poly-A-controles

De Affymetrix® RNA-controlekit (onderdeelnr. 901285) wordt voor deze procedure gebruikt.

Tabel 1: Seriële verdunning van de voorraad poly-A-controles

Aanvangshoeveelheid totaal-RNA	Seriële verdunning				Volume toe te voegen aan totaal-RNA
	Eerste	Tweede	Derde	Vierde	
100 ng	1:20	1:50	1:50	1:5	1 µl
200 ng	1:20	1:50	1:50	1:2,5	1 µl
500 ng	1:20	1:50	1:50		1 µl
1.000 ng	1:20	1:50	1:25		1 µl

Tabel 1 is een leidraad voor gebruik van 100, 200, 500 of 1.000 ng totaal-RNA als startmateriaal. Voor andere aanvangshoeveelheden van monsters dan hier vermeld, moeten de betreffende verdunningen worden berekend die dezelfde eindconcentratie van de gespikete controles in de monsters opleveren.

TIP: Pipetteer geen oplossingen in volumes van minder dan 2 µl om bij de preparatie van de verdunningen precies en consequent te blijven.

1. Gebruik de vierde verdunning (voor 100 en 200 ng totaal-RNA) voor de preparatie van de oplossing die vervolgens in *Procedure 3: Preparatie van de eerstestrenge-cDNA-synthesereactie* wordt beschreven.

Procedure 3: Preparatie van de eerstestrenge-cDNA-synthesereactie

De Affymetrix® transcriptiesynthese- en labelingkit A (onderdeelnr. 901293) en -kit B (onderdeelnr. 901298) worden voor deze procedure gebruikt.

Tabel 2: Instellingen van het PCR-apparaat voor de eerstestrenge-cDNA-synthese

Stap / methode	Incubatieprogramma	Incubatieprogramma	Houdprogramma	Reactievolumen
Eerstestrenge-cDNA-synthese	42 °C gedurende 2 uur	4 °C gedurende 10 minuten	laten staan bij 4 °C	10 µl

Tabel 3: Preparatie van het eerstestrengebasmengsel

Onderdeel	Volume werkbasmengsel voldoende voor 1 reactie (V)	Volume werkbasmengsel voldoende voor 1 reactie x 1,15 (V x 1,15)	Gewenst aantal reacties (R)	Totaal vereist volume (V x 1,15) x R
Eerstestrenge-synthese-buffer (1 st -Strand Synthesis Buffer)	4 µl	4,6 µl		
Enzymmengsel voor eerstestrenge-synthese (1 st -Strand Synthesis Enzyme Mix)	1 µl	1,15 µl		
Verdunde poly-A-controle (uit procedure 2)	1 µl	1,15 µl		
Totaal volume	6 µl	6,9 µl		

TIP: Haal één reagens tegelijkertijd uit de voorraadruimte en breng het na afloop naar zijn juiste plaats in de voorraadruimte terug. Gebruik een tafelmodel koeler om enzymen te transporteren. Vortex elk reagens, inclusief het enzym, voorzichtig en centrifugeer het kortstondig omlaag voordat u het aan het basismengsel toevoegt.

1. Zet het PCR-apparaat ten minste 15 minuten vóór gebruik aan.
2. Prepareer het eerstestrengebasmengsel op kamertemperatuur overeenkomstig tabel 3.

- Breng het toepasselijke volume van de verdunde poly-A-controle uit procedure 2 over naar het eerstestrensbasismengsel overeenkomstig tabel 3.
- Meng het eerstestrensbasismengsel door het voorzichtig te vortexen. Centrifugeer het buisje kortstondig omlaag.
- Voeg 6 µl van het eerstestrensbasismengsel toe onder in de wells van een 96-wells plaat.
- Voeg 4 µl van de totaal-RNA-monsters toe aan de betreffende wells. Gebruik in totaal 100 tot 1.000 ng per reactie; als het totaal-RNA minder dan 4 µl bedraagt, voegt u nucleasevrij water toe tot 4 µl. Meng het voorzichtig door het diverse malen op en neer te pipetteren.
- Dek de plaat af met zelfklevende aluminiumfolie, centrifugeer hem 10 seconden lang op kamertemperatuur bij 370 x g en incubeer hem volgens het eerstestrensbasismengsel-programma. Gebruik een compressiepad en een verwarmde deksel.
- Verwijder de plaat binnen 10 minuten nadat hij is blijven staan bij 4 °C aan het einde van het programma en ga onmiddellijk verder met *Procedure 4: Preparatie van de tweedestrensbasismengsel-cDNA-synthesereactie*.

Procedure 4: Preparatie van de tweedestrensbasismengsel-cDNA-synthesereactie

De Affymetrix® transcriptsynthese- en labelingkit A (onderdeelnr. 901293) en -kit B (onderdeelnr. 901298) worden voor deze procedure gebruikt.

Tabel 4: Instellingen van het PCR-apparaat voor de tweedestrensbasismengsel-cDNA-synthese

Stap / methode	Incubatieprogramma	Incubatieprogramma	Houdprogramma	Reaktievolumen
Tweedestrensbasismengsel-cDNA-synthese	16 °C gedurende 1 uur	4 °C gedurende 10 minuten	laten staan bij 4 °C	30 µl

Tabel 5: Preparatie van het tweedestrensbasismengsel

Onderdeel	Volumen werkbasis-mengsel voldoende voor 1 reactie (V)	Volumen werkbasis-mengsel voldoende voor 1 reactie x 1,10 (V x 1,10)	Gewenst aantal reacties (R)	Totaal vereist volume (V x 1,10) x R
Tweedestrensbasismengsel-cDNA-synthese-buffer (2 nd -Strand Synthesis Buffer)	18 µl	19,8 µl		
Enzymmengsel voor tweedestrensbasismengsel (2 nd -Strand Synthesis Enzyme Mix)	2 µl	2,2 µl		
Totaal volume	20 µl	22,0 µl		

TIP: Haal één reagens tegelijkertijd uit de voorraadruimte en breng het na afloop naar zijn juiste plaats in de voorraadruimte terug. Gebruik een tafelmodel koeler om enzymen te transporteren. Vortex elk reagens, inclusief het enzym, voorzichtig en centrifugeer het kortstondig omlaag voordat u het aan het basismengsel toevoegt.

- Prepareer het tweedestrensbasismengsel op kamertemperatuur overeenkomstig tabel 5. Meng het door het voorzichtig te vortexen. Centrifugeer het buisje kortstondig omlaag.
- Breng 20 µl van het tweedestrensbasismengsel over naar de zijwand van de betreffende wells.
- Dek de plaat af met nieuwe zelfklevende aluminiumfolie, centrifugeer de plaat 10 seconden lang op kamertemperatuur bij 370 x g en incubeer hem volgens het tweedestrensbasismengsel-cDNA-synthese-programma.

BELANGRIJK: Gebruik geen verwarmde deksel voor deze incubatie.

- Verwijder hem binnen 10 minuten nadat de plaat is blijven staan bij 4 °C aan het einde van het programma.
- Ga onmiddellijk verder met *Procedure 5: Preparatie van de in vitro transcriptiereactie (IVT reactie)*.

Procedure 5: Preparatie van de in vitro transcriptiereactie (IVT reactie)

De Affymetrix® transcriptsynthese- en labelingkit A (onderdeelnr. 901293) en -kit B (onderdeelnr. 901298) worden voor deze procedure gebruikt.

Tabel 6: Instellingen van het PCR-apparaat voor de IVT reactie

Stap / methode	Incubatieprogramma	Incubatieprogramma	Houdprogramma	Reactivolumen
IVT reactie	40 °C gedurende 16 uur*		laten staan bij 4 °C	60 µl

* De incubatietijd is specifiek voor 100 ng totaal-RNA. De tijd moet worden aangepast aan de hand van de aanvangshoeveelheid totaal-RNA dat bij deze procedures wordt gebruikt.

Tabel 7: Aanbevolen incubatietijden

Hoeveelheid totaal-RNA	Aanbevolen incubatietijd
100 ng	16 uur
500 ng	4 tot 8 uur
1.000 ng	2 tot 4 uur

Tabel 8: Preparatie van IVT basismengsel

Onderdeel	Volumen werkbasis-mengsel voldoende voor:		Gewenst aantal reacties (R)	Totaal vereist volume (V x 1,10) x R
	1 reactie (V)	1 reactie x 1,10 (V x 1,10)		
In vitro transcriptiebuffer (In Vitro Transcription Buffer)	22 µl	24,2 µl		
RNA-label	2 µl	2,2 µl		

Onderdeel	Volumen werkbasismengsel voldoende voor:		Gewenst aantal reacties (R)	Totaal vereist volume (V x 1,10) x R
	1 reactie (V)	1 reactie x 1,10 (V x 1,10)		
Enzymmengsel voor in vitro transcriptie (In Vitro Transcription Enzyme Mix)	6 µl	6,6 µl		
Totaal volume	30 µl	33 µl		

TIP: Verwijder het buisje met het RNA-label en laat de inhoud op kamertemperatuur ontdooien.

1. Prepareer het IVT basismengsel op kamertemperatuur overeenkomstig tabel 8. Meng het door het voorzichtig te vortexen. Centrifugeer het buisje kortstondig omlaag.
2. Breng 30 µl van het IVT basismengsel over naar de zijwand van elke well die 30 µl van de tweedestrensreactie bevat.
3. Incubeer de IVT reactie overeenkomstig tabel 6 en 7. Gebruik een compressiepad en een verwarmde deksel.
4. Ga na de incubatie verder met *Procedure 6: Zuivering van het cRNA uit de IVT reactie*.

Procedure 6: Zuivering van het cRNA uit de IVT reactie

De Affymetrix® transcriptsynthese- en labelingkit A (onderdeelnr. 901293) wordt voor deze procedure gebruikt.

TIP:

- **Maak een aliquot aan van 400 µl nucleasevrij water in een nucleasevrij buisje van 1,5 ml. Dit volume is voldoende om 8 reacties te verwerken. Plaats het nucleasevrij water gedurende ten minste 10 minuten op een warmteblok bij 60 °C.**
 - **Voeg vóór het eerste gebruik 12,6 ml 100% ethanol toe aan de fles met beads-wasbuffer en meng door inversie.**
1. Binding van cRNA
 - A. Schud de flacon met magnetische beads voorzichtig om eventuele magnetische deeltjes die zijn bezonken opnieuw in suspensie te brengen. Breng 975 µl magnetische beads over naar het kleine compartiment van de trog.
 - B. Voeg 108 µl magnetische beads toe aan elk monster, meng het en breng het over naar een aparte well van een plaat met een U-vormige bodem.
 - C. Laat het 2 minuten lang op middelhoge snelheid schudden op een plaatschudder.
 - D. Zet de plaat op een magnetische standaard en vang de magnetische beads gedurende 5 à 10 minuten op totdat de beads pelletiseren en de oplossing helder is.
 - E. Wanneer de oplossing transparant is, verwijdert u het supernatans en werpt u het weg zonder de beads te verstoren.
 2. De beads wassen
 - A. Breng 4 ml van de beads-wasbuffer over naar het grote compartiment van de trog.
 - B. Terwijl de plaat op een magnetische standaard ligt, voegt u 200 µl van de beads-wasoplossing aan elk monster toe zonder de beads te verstoren. Incubeer 25 à 35 seconden lang op kamertemperatuur.
 - C. Aspireer het supernatans zonder de beads te verstoren en werp het supernatans weg.
 - D. Herhaal bovenstaande stap 2A en 2B nogmaals.
 - E. Laat de plaat 5 à 7 minuten lang aan de lucht drogen terwijl deze zich op de magnetische standaard bevindt. Dek de plaat niet af.
 - F. Verwijder de plaat van de magnetische standaard.
 3. Elutie van cRNA

BELANGRIJK: Bij gebruik van de repeteerpipet dient u genoeg te hebben voor twee extra volumes van 30 µl: werp de eerste 30 µl weg voordat u het aan de monsters toevoegt; gebruik de laatste 30 µl van de elutieoplossing niet.

 - A. Voeg met behulp van een repeteerpipet 30 µl voorverwarmd (60 °C) nucleasevrij water toe aan de zijwand van elke well zonder de korrel te verstoren.
 - B. Dek de plaat af met de deksel en breng hem over naar het schudapparaat. Laat de plaat één minuut lang op hoge snelheid schudden op de plaatschudder.
 - C. Controleer of de korrel volledig gedispergeerd is. Zet de plaat op een magnetische standaard en laat de beads 3 à 4 minuten bezinken. De oplossing dient helder te zijn, met alle beads tegen de magneet gepelletiseerd.
 - D. Breng 30 µl van het supernatans, dat het uitgewassen cRNA bevat, over naar een nucleasevrij PCR-buisje.
 - E. Ga verder met *Procedure 7: Kwantificatie van het cRNA*, of bewaar het bij -80 °C.

Procedure 7: Kwantificatie van het cRNA

Raadpleeg hoofdstuk 2 van de *Affymetrix® Gene Profiling Reagents User Guide* (gebruikershandleiding voor genprofileringsreagentia van Affymetrix®) (onderdeelnr. 702749).

Gebruik de aangepaste opbrengst in *Procedure 8: Preparatie van de cRNA-fragmentatiereactie*.

Procedure 8: Preparatie van de cRNA-fragmentatiereactie

Nucleasevrij water en de 5x fragmentatiebuffer uit de transcriptdetectiekit (onderdeelnr. 901307) worden voor deze procedure gebruikt.

Tabel 9: Instellingen van het PCR-apparaat voor de fragmentatie

Stap / methode	Incubatieprogramma	Incubatieprogramma	Houdprogramma	Reactievolumen
Fragmentatie	94 °C gedurende 35 minuten	4 °C gedurende 10 minuten	laten staan bij 4 °C	30 µl

Tabel 10: Preparatie van de fragmentatiereactie

Onderdeel	Hoeveelheid of volume
cRNA	15 µg
5x fragmentatiebuffer (5X Fragmentation Buffer)	6 µl
Nucleasevrij water (Nuclease-free water)	Variabel, voor uiteindelijk volume van 30 µl
Totaal volume	30 µl

1. Stel de reactie op in een stripbuisje van 0,2 ml overeenkomstig tabel 10 en gebruik de aangepaste cRNA-opbrengst uit procedure 7 om het cRNA-volume te berekenen dat nodig is om 15 µg aan de fragmentatiereactie toe te voegen.
2. Meng de inhoud door middel van voorzichtig vortexen en centrifugeer deze kortstondig omlaag om de inhoud onder in het buisje op te vangen.
3. Incubeer dit in het PCR-apparaat volgens de fragmentatiemethode. Dek het buisje af met de verwarmde deksel.

Procedure 9: Preparatie van de doelhybridisatiecocktail

De Affymetrix® transcriptdetectiekit A (onderdeelnr. 901307) en -kit C (onderdeelnr. 901312) worden voor deze procedure gebruikt.

Tabel 11: Preparatie van het hybridisatiebasismengsel

Onderdeel	Volumes werkbasmengsel voldoende voor 1 probe array (V)	Volumes werkbasmengsel voldoende voor 1 probe array x 1,10 (V x 1,10)	Gewenst aantal probe arrays (R)	Totaal vereist volume (V x 1,10) x R	Uiteindelijke verdunning/concentratie
Oligo B2 (3 nM)	4,2 µl	4,62 µl			50 pM
20x hybridisatiecontrole (20X Hybridization Control) (bioB, bioC, bioD, cre)	12,5 µl	13,75 µl			respectievelijk 1,5; 5; 25 en 100 pM
2x hybridisatiemengsel (2X Hybridization Mix)	125 µl	137,5 µl			1X
DMSO	25 µl	27,5 µl			10%
Nucleasevrij water (Nuclease-free water)	58,3 µl	64,13 µl			
Totaal volume	225,0 µl	247,5 µl			

TIP:

- Verwijder Oligo B2 en de 20x hybridisatiecontrole uit de vriezer en laat deze op kamertemperatuur ontdooien.
- DMSO wordt een vaste stof bij 4 °C; zorg dat het reagens helemaal is ontdooid voordat u het gebruikt.
- Stel de temperatuur van de warmteblokken in op 45 °C, 65 °C en 99 °C.

BELANGRIJK: Het is van het grootste belang dat voorraden van de 20x hybridisatiecontrole 5 minuten lang tot een temperatuur van 65 °C worden verwarmd om het cRNA opnieuw helemaal in suspensie te brengen alvorens aliquots aan te maken.

1. Prepareer het hybridisatiebasismengsel op kamertemperatuur voor een of meer probe arrays overeenkomstig tabel 11.
2. Maak een aliquot aan van 225 µl hybridisatiebasismengsel in een nucleasevrij buisje van 1,5 ml.
3. Voeg 25 µl gefragmenteerd cRNA uit procedure 8 toe om de hybridisatiecocktail voor één probe array te prepareren. De eindconcentratie cRNA in de hybridisatiecocktail is 0,05 µg/µl.
4. Equilibreer de probe array onmiddellijk vóór gebruik op kamertemperatuur.
5. Verhit de hybridisatiecocktail 5 minuten lang in een warmteblok tot een temperatuur van 99 °C.
6. Bevochtigt de probe array intussen met 200 µl prehybridisatiemengsel door hem via een van de septa te vullen.
7. Incubeer de met prehybridisatiemengsel gevulde probe array 10 minuten lang op 60 tpm bij een temperatuur van 45 °C.
8. Breng de hybridisatiecocktail, die in bovenstaande stap 5 is verhit, over naar een warmteblok met een temperatuur van 45 °C en houd hem daar 5 minuten.
9. Laat de hybridisatiecocktail 5 minuten lang op maximale snelheid in een microcentrifuge centrifugereren om al het onoplosbare materiaal van het hybridisatiemengsel op te vangen.
10. Verwijder de array uit de hybridisatieoven en verwijder het prehybridisatiemengsel. Vul de array bij met het toepasselijke volume van de gezuiverde hybridisatiecocktail en vermijd daarbij eventueel onoplosbaar materiaal onder in het buisje.
11. Plaats de probe array in een op 45 °C ingestelde hybridisatieoven. Laat hem draaien op 60 tpm.
12. Hybridiseer hem gedurende 17 ± 1 uur.

Voor gebruik bij in vitro diagnostiek.

Onderdeelnr. 703026 NL rev. 1

© 2011 Affymetrix, Inc. Alle rechten voorbehouden. 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. Alle andere handelsmerken zijn eigendom van hun respectieve eigenaars.