

Verwendungszweck

In-vitro-Diagnostikum

Die 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®-Mikroarrays von Affymetrix vorgesehen sowie zur Messung von Fluoreszenzsignalen markierter RNA-Ziele mit Hilfe des GeneChip®-Mikroarray-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.

Diese Kurzanleitung ist ausschließlich für erfahrene Benutzer vorgesehen und ergänzt das Gene Profiling-Reagenz-Benutzerhandbuch von Affymetrix (*Affymetrix® Gene Profiling Reagents User Guide*, Bestell-Nr. 702749).

Verfahren Nr. 1: Einrichtung des Thermocyclers

Die anzuwendenden Thermocyclerprogramme sind in dieser Kurzanleitung bei jedem Verfahren aufgeführt.

Siehe Kapitel 2 des Gene Profiling-Reagenz-Benutzerhandbuchs von Affymetrix (*Affymetrix® Gene Profiling Reagents User Guide*, Bestell-Nr. 702749).

Verfahren Nr. 2: Herstellung der Poly-A-Kontrollen

Für dieses Verfahren wird der RNA Control-Kit von Affymetrix® (Bestell-Nr. 901285) benötigt.

Tabelle 1: Serielle Verdünnung von Poly-A Control-Substanz

Gesamt-RNA-Ausgangsmenge	Serielle Verdünnungen				Der Gesamt-RNA zuzusetzende Volumen
	1.	2.	3.	4.	
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

Bei Verwendung von 100, 200, 500 oder 1.000 ng Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial dient Tabelle 1 als Richtlinie. Bei anderen, hier nicht aufgeführten Ausgangsmengen ist anhand von Berechnungen zu ermitteln, mit welchen Verdünnungen eine gleiche Endkonzentration der zugesetzten Kontrollen in den Proben erzielt wird.

TIPP: Das Pipettieren von Lösungsvolumina von weniger als 2 µl ist zu vermeiden, um die Präzision und Einheitlichkeit beim Herstellen der Verdünnungen zu wahren.

- Die vierte Verdünnung (für 100 und 200 ng Gesamt-RNA) zur Herstellung der im Folgenden unter *Verfahren Nr. 3, Ansetzen der Strang-1-cDNA-Synthesereaktion*, beschriebenen Lösung verwenden.

Verfahren Nr. 3: Ansetzen der Strang-1-cDNA-Synthesereaktion

Für dieses Verfahren werden die Transkript-Synthese- und Markierungskits A (Bestell-Nr. 901293) und B (901298) von Affymetrix® benötigt.

Tabelle 2: Thermocycler-Einstellungen für die Strang-1-cDNA-Synthese

Schritt/Methode	Inkubationsprogramm	Inkubationsprogramm	Aufbewahrungsprogramm	Reaktionsvolumen
Strang-1-cDNA Synthese	2 Std. bei 42 °C	10 Minuten bei 4 °C	Aufbewahrung bei 4 °C	10 µl

Tabelle 3: Herstellung des Strang-1-Mastermixes

Bestandteil	Für 1 Reaktion ausreichendes Mastermix-Arbeitsvolumen (V)	Für 1 Reaktion ausreichendes Mastermix-Arbeitsvolumen x 1,15 (V x 1,15)	Gewünschte Anzahl von Reaktionen (R)	Erforderliches Gesamtvolumen (V x 1,15) x R
1 st -Strand Synthesis Buffer	4 µl	4,6 µl		
1 st -Strand Synthesis Enzyme Mix	1 µl	1,15 µl		
Verdünnte Poly-A Control (aus Verfahren Nr. 2)	1 µl	1,15 µl		
Gesamtvolumen	6 µl	6,9 µl		

TIPP: Jeweils nur ein Reagenz herausnehmen und nach Abschluss an den ordnungsgemäßen Lagerplatz zurückstellen. Für den Enzymtransport einen kleinen Kühlbehälter verwenden. Jedes Reagenz, einschließlich des Enzyms, vor dem Zugeben zum Mastermix behutsam mit dem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren.

- Den Thermocycler mindestens 15 Minuten vor Gebrauch einschalten.
- Das Strang-1-Mastermix gemäß Tabelle 3 bei Zimmertemperatur herstellen.
- Das korrekte Volumen verdünnter Poly-A Control aus Verfahren Nr. 2 gemäß Tabelle 3 in das Strang-1-Mastermix transferieren.

- Das Strang-1-Mastermix durch behutsames Vortexen mischen. Das Röhrchen kurz zentrifugieren.
- Auf den Boden der Vertiefungen einer 96-Well-Platte 6 µl Strang-1-Mastermix geben.
- 4 µl Gesamt-RNA-Proben in die korrekten Vertiefungen geben. Pro Reaktion insgesamt 100 bis 1000 ng verwenden; falls die Gesamt-RNA in weniger als 4 µl vorliegt, mit nukleasefreiem Wasser auf 4 µl auffüllen. Zum Mischen behutsam mit der Pipette ansaugen und wieder absinken lassen.
- Die Platte mit Aluklebefolie abdecken, bei 370 g und Zimmertemperatur 10 Sekunden lang zentrifugieren und anschließend mit dem Programm für die Strang-1-cDNA-Synthese inkubieren. Mit Druckpolster und beheiztem Deckel arbeiten.
- Innerhalb von 10 Minuten nach der Aufbewahrung bei 4 °C zum Programmabschluss entnehmen und unverzüglich mit *Verfahren Nr. 4, Ansetzen der Strang-2-cDNA-Synthesereaktion*, fortfahren.

Verfahren Nr. 4: Ansetzen der Strang-2-cDNA-Synthesereaktion

Für dieses Verfahren werden die Transkript-Synthese- und Markierungskits A (Bestell-Nr. 901293) und B (901298) von Affymetrix® benötigt.

Tabelle 4: Thermocycler-Einstellungen für die Strang-2-cDNA-Synthese

Schritt/Methode	Inkubationsprogramm	Inkubationsprogramm	Aufbewahrungsprogramm	Reaktionsvolumen
Strang-2-cDNA-Synthese	1 Std. bei 16 °C	10 Minuten bei 4 °C	Aufbewahrung bei 4 °C	30 µl

Tabelle 5: Herstellung des Strang-2-Mastermixes

Bestandteil	Für 1 Reaktion ausreichendes Mastermix- Arbeitsvolumen (V)	Für 1 Reaktion ausreichendes Mastermix- Arbeitsvolumen x 1,10 (V x 1,10)	Gewünschte Anzahl von Reaktionen (R)	Erforderliches Gesamtvolumen (V x 1,10) x R
2 nd -Strand Synthesis Buffer	18 µl	19,8 µl		
2 nd -Strand Synthesis Enzyme Mix	2 µl	2,2 µl		
Gesamtvolumen	20 µl	22,0 µl		

TIPP: Jeweils nur ein Reagenz herausnehmen und nach Abschluss an den ordnungsgemäßen Lagerplatz zurückstellen. Für den Enzymtransport einen kleinen Kühlbehälter verwenden. Jedes Reagenz, einschließlich des Enzyms, vor dem Zugeben zum Mastermix behutsam mit dem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren.

- Das Strang-2-Mastermix gemäß Tabelle 5 bei Zimmertemperatur herstellen. Durch behutsames Vortexen mischen. Das Röhrchen kurz zentrifugieren.
- 20 µl Strang-2-Mastermix an die Seitenwände der entsprechenden Vertiefungen transferieren.
- Die Platte mit frischer Aluklebefolie abdecken, bei 370 g und Zimmertemperatur 10 Sekunden lang zentrifugieren und anschließend mit dem Programm für die Strang-2-cDNA-Synthese inkubieren.

WICHTIG: Für diese Inkubation keinen beheizten Deckel verwenden.

- Innerhalb von 10 Minuten nach der Aufbewahrung bei 4 °C zum Programmabschluss entnehmen.
- Unverzüglich mit *Verfahren Nr. 5, Ansetzen der In-vitro-Transkriptionsreaktion (IVT-Reaktion)*, fortfahren.

Verfahren Nr. 5: Ansetzen der In-vitro-Transkriptionsreaktion (IVT-Reaktion)

Für dieses Verfahren werden die Transkript-Synthese- und Markierungskits A (Bestell-Nr. 901293) und B (901298) von Affymetrix® benötigt.

Tabelle 6: Thermocycler-Einstellungen für die IVT-Reaktion

Schritt/Methode	Inkubationsprogramm	Inkubationsprogramm	Aufbewahrungsprogramm	Reaktionsvolumen
IVT-Reaktion	16 Std. bei 40 °C*		Aufbewahrung bei 4 °C	60 µl

* Die Inkubationsdauer ist spezifisch für 100 ng Gesamt-RNA. Die Zeitdauer ist den bei diesen Verfahren verwendeten Ausgangsmengen an Gesamt-RNA anzupassen.

Tabelle 7: Empfohlene Inkubationsdauern

Schritt/Methode	Empfohlene Inkubationsdauer
100 ng	16 Stunden
500 ng	4 bis 8 Stunden
1.000 ng	2 bis 4 Stunden

Tabelle 8: Herstellung des IVT-Mastermixes

Bestandteil	Mastermix-Arbeitsvolumina ausreichend für:		Gewünschte Reaktionsanzahl (R)	Erforderliches Gesamtvolumen (V x 1,10) x R
	1 Reaktion (V)	1 Reaktion x 1,10 (V x 1,10)		
In Vitro Transcription Buffer	22 µl	24,2 µl		
RNA Label	2 µl	2,2 µl		

Bestandteil	Mastermix-Arbeitsvolumina ausreichend für:		Gewünschte Reaktionsanzahl (R)	Erforderliches Gesamtvolumen (V x 1,10) x R
	1 Reaktion (V)	1 Reaktion x 1,10 (V x 1,10)		
In Vitro Transcription Enzyme Mix	6 µl	6,6 µl		
Gesamtvolumen	30 µl	33 µl		

TIPP: Rörchen mit RNA Label entnehmen und Inhalt bei Zimmertemperatur auftauen lassen.

- Das IVT-Mastermix gemäß Tabelle 8 bei Zimmertemperatur herstellen. Durch behutsames Vortexen mischen. Das Rörchen kurz zentrifugieren.
- 30 µl IVT-Mastermix an die Seitenwände aller Vertiefungen transferieren, die 30 µl Strang-2-Reaktion enthalten.
- Die IVT-Reaktion gemäß den Tabellen 6 und 7 inkubieren. Mit Druckpolster und beheiztem Deckel arbeiten.
- Nach der Inkubation mit *Verfahren Nr. 6, Purifizieren der cRNA aus der IVT-Reaktion*, fortfahren.

Verfahren Nr. 6: Purifizieren der cRNA aus der IVT-Reaktion

Für dieses Verfahren wird der Transkriptsynthese- und Markierungskit A von Affymetrix® (Bestell-Nr. 901293) benötigt.

TIPP:

- Ein 400-µl-Aliquot Nuclease-free Water in ein nukleasefreies 1,5-ml-Rörchen geben. Dieses Volumen ist ausreichend für 8 Reaktionen. Das Nuclease-free Water mindestens 10 Minuten lang bei 60 °C auf einen Heizblock stellen.
- Vor dem ersten Gebrauch 12,6 ml Ethanol (100 %) in die Flasche mit Beads Wash Buffer hinzugeben und durch Überkopfdrehen mischen.

1. cRNA-Bindung

- Die Magnetic Beads-Flasche behutsam schütteln, um evtl. abgesetzte Magnetpartikel zu resuspendieren. In das kleine Fach der Wanne 975 µl Magnetic Beads transferieren.
- Zu jeder Probe 108 µl Magnetic Beads hinzugeben, mischen und in eine separate Vertiefung einer U-Boden-Platte transferieren.
- Auf einem Plattenrüttler bei mittlerer Geschwindigkeit 2 Minuten lang rütteln.
- Die Platte auf einen Magnetständer stellen und die Magnetic Beads 5 bis 10 Minuten erfassen, bis sich ein Pellet bildet und die Lösung klar ist.
- Nachdem die Lösung transparent ist, den Überstand entfernen, ohne dabei die Beads zu stören.

2. Beads-Wäsche

- 4 ml des Beads Wash Buffer in das große Fach der Wanne transferieren.
- Bei auf einem Magnetständer ruhender Platte 200 µl Bead Wash Solution zu jeder Probe hinzugeben, ohne die Beads zu stören. Bei Zimmertemperatur 25 bis 35 Sekunden lang inkubieren.
- Den Überstand aspirieren, ohne die Beads zu stören, und entsorgen.
- Die vorhergehenden Schritte 2A und 2B noch einmal wiederholen.
- Die Platte auf dem Magnetständer 5 bis 7 Minuten lang lufttrocknen lassen. Die Platte nicht abdecken.
- Die Platte vom Magnetständer nehmen.

3. cRNA Eluierung

WICHTIG: Beim Arbeiten mit der Repetierpipette zwei zusätzliche 30 µl Volumina vorsehen: die ersten 30 µl vor dem Hinzugeben zu den Proben entsorgen, und die letzten 30 µl der Eluierungslösung nicht verwenden.

- Mit Hilfe einer Repetierpipette 30 µl vorgewärmtes (60 °C) Nuclease-free Water an die Seitenwände jeder Vertiefung zugeben, ohne das Pellet zu stören.
- Die Platte mit dem Deckel abdecken und auf den Rüttler transferieren. Eine Minute lang mit hoher Geschwindigkeit auf dem Plattenrüttler rütteln.
- Sicherstellen, dass das Pellet vollständig dispergiert wird. Die Platte auf einen Magnetständer stellen und die Beads 3 bis 4 Minuten lang absetzen lassen. Die Lösung sollte klar sein und alle Beads sollten als Pellet am Magneten anliegen.
- 30 µl des Überstands, der die eluierte cRNA enthält, in ein nukleasefreies PCR-Rörchen transferieren.
- Mit *Verfahren Nr. 7, Quantifizierung der cRNA*, fortfahren oder bei -80 °C aufbewahren.

Verfahren Nr. 7: Quantifizierung der cRNA

Siehe Kapitel 2 des Gene Profiling-Reagenzien-Benutzerhandbuchs von Affymetrix (*Affymetrix® Gene Profiling Reagents User Guide*, Bestell-Nr. 702749).

Die angepasste Ausbeute für *Verfahren Nr. 8, Ansetzen der cRNA-Fragmentierungsreaktion*, verwenden.

Verfahren Nr. 8: Ansetzen der cRNA-Fragmentierungsreaktion

Für dieses Verfahren werden Nuclease-free Water und der 5X Fragmentation Buffer aus Transkript-Nachweiskit A (Bestell-Nr. 901307) benötigt.

Tabelle 9: Thermocycler-Einstellung für die Fragmentierung

Schritt/Methode	Inkubationsprogramm	Inkubationsprogramm	Aufbewahrungsprogramm	Reaktionsvolumen
Fragmentierung	35 Minuten bei 94 °C	10 Minuten bei 4 °C	Aufbewahrung bei 4 °C	30 µl

Tabelle 10: Ansetzen der Fragmentierungsreaktion

Bestandteil	Menge bzw. Volumen
cRNA	15 µg
5X Fragmentation Buffer	6 µl
Nuclease-free water	variabel, auf 30 µl Endvolumen bringen
Gesamtvolumen	30 µl

1. Die Reaktion gemäß Tabelle 10 in einem 0,2-ml-Streifenröhrchen ansetzen; dabei die angepasste cRNA-Ausbeute aus Verfahren Nr. 7 heranziehen, um das benötigte cRNA-Volumen für einen 15-µg-Zusatz zur Fragmentierungsreaktion zu berechnen.
2. Behutsam auf dem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Gehalt am Röhrchenboden zu sammeln.
3. Unter Anwendung der Fragmentierungsmethode im Thermocycler inkubieren. Mit dem beheizten Deckel abdecken.

Verfahren Nr. 9: Herstellung des Ziel-Hybridisierungscocktails

Für dieses Verfahren werden die Transkript-Nachweiskits A (Bestell-Nr. 901307) und C (Bestell-Nr. 901312) von Affymetrix® benötigt.

Tabelle 11: Herstellung des Hybridisierungsmastermixes

Bestandteil	Für 1 Sondenarray ausreichende Mastermix- Arbeitsvolumina (V)	Für 1 Sondenarray ausreichende Mastermix- Arbeitsvolumina x 1,10 (V x 1,10)	Gewünschte Sondenarray-Anzahl (R)	Erforderliches Gesamtvolumen (V x 1,10) x R	Endverdünnung/ -konzentration
Oligo B2 (3 nM)	4,2 µl	4,62 µl			50 pM
20X Hybridization Control (bioB, bioC, bioD, cre)	12,5 µl	13,75 µl			1,5, 5, 25 bzw. 100 pM
2X Hybridization Mix	125 µl	137,5 µl			1X
DMSO	25 µl	27,5 µl			10%
Nuclease-free Water	58,3 µl	64,13 µl			
Gesamtvolumen	225,0 µl	247,5 µl			

TIPP:

- Oligo B2 und 20X Hybridization Control aus dem Gefrierschrank entnehmen und bei Zimmertemperatur auftauen.
- DMSO verfestigt sich bei 4 °C. Bitte sicherstellen, dass das Reagenz vor Gebrauch vollständig aufgetaut ist.
- Die Temperaturen der Heizblöcke auf 45 °C, 65 °C und 99 °C einstellen.

WICHTIG: Es ist von größter Bedeutung, dass 20X Hybridization Control-Vorräte 5 Minuten lang auf 65 °C erwärmt werden, um die cRNA vor dem Aliquotieren wieder vollständig zu suspendieren.

1. Das Hybridisierungsmastermix für 1 Array oder mehrere Arrays gemäß Tabelle 11 bei Zimmertemperatur herstellen.
2. Ein 225-µl-Aliquot des Hybridisierungsmastermixes in ein nukleasefreies 1,5-ml-Röhrchen geben.
3. Zum Ansetzen des Hybridisierungscocktails für ein Sondenarray 25 µl fragmentierte cRNA aus Verfahren Nr. 8 hinzugeben. Die cRNA-Endkonzentration im Hybridisierungscocktail beträgt 0,05 µg/µl.
4. Das Sondenarray unmittelbar vor Gebrauch auf Zimmertemperatur äquilibrieren lassen.
5. Den Hybridisierungscocktail in einem Heizblock 5 Minuten lang auf 99 °C erhitzen.
6. Unterdessen das Sondenarray mit 200 µl Pre-Hybridization Mix befeuchten, das dazu durch eines der Septen eingefüllt wird.
7. Das mit Pre-Hybridization Mix gefüllte Sondenarray 10 Minuten lang bei 45 °C und 60 U/min. inkubieren.
8. Den im vorhergehenden Schritt Nr. 5 erhitzten Hybridisierungscocktail für 5 Minuten in einen 45-°C-Heizblock transferieren.
9. Den Hybridisierungscocktail in einer Mikrozentrifuge 5 Minuten lang mit maximaler Drehzahl zentrifugieren, um alle unlöslichen Substanzen des Hybridisierungsmixes zu sammeln.
10. Das Array aus dem Hybridisierungssofen nehmen und das Pre-Hybridization Mix entfernen. Das Array mit dem korrekten Volumen geklärten Hybridisierungscocktails auffüllen, wobei alle unlöslichen Substanzen am Röhrchenboden zu vermeiden sind.
11. Das Sondenarray in einem Hybridisierungssofen platzieren. Auf 45 °C einstellen und mit 60 U/min. rotieren.
12. 17 ± 1 Std. hybridisieren.

In-vitro-Diagnostikum.

Bestell-Nr. 703026 DE Rev. 1

© 2011 Affymetrix, Inc. Alle Rechte vorbehalten. 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. Alle sonstigen Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.