

# Κάρτα γρήγορης αναφοράς

## Αντιδραστήρια γονιδιακού προφίλ της Affymetrix®



### Χρήση για την οποία προορίζεται

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Τα αντιδραστήρια γονιδιακού προφίλ της Affymetrix® προορίζονται για την προετοιμασία σημασμένου συμπληρωματικού RNA-στόχου από απομονωμένο ολικό RNA που προέρχεται από πρόσφατα ή κατεψυγμένα κλινικά δείγματα ιστού για υβριδοποίηση στις μικροσυστοιχίες GeneChip® της Affymetrix, καθώς και για τη μέτρηση των σημάτων φθορισμού του σημασμένου RNA-στόχου με χρήση του συστήματος οργάνων μικροσυστοιχίας GeneChip® της Affymetrix.

Προορίζεται για χρήση με προσδιορισμούς μικροσυστοιχιών GeneChip της Affymetrix που έχουν εγκριθεί ξεχωριστά από τον FDA και οι οποίοι απαιτούν τη χρήση αντιδραστηρίων γονιδιακού προφίλ της Affymetrix.

Αυτός ο οδηγός γρήγορης αναφοράς προορίζεται για έμπειρους χρήστες μόνο και αποτελεί συμπλήρωμα του εγχειριδίου χρήσης των αντιδραστηρίων γονιδιακού προφίλ της Affymetrix® (P/N 702749).

### Διαδικασία 1: Ρύθμιση θερμικού κυκλοποιητή

Τα προγράμματα θερμικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιούνται παρατίθενται σε κάθε διαδικασία σε αυτή την κάρτα γρήγορης αναφοράς.

Δείτε το κεφάλαιο 2 του εγχειριδίου χρήσης των αντιδραστηρίων γονιδιακού προφίλ της Affymetrix® (P/N 702749).

### Διαδικασία 2: Παρασκευή μαρτύρων πολυαδενυλίωσης (Poly-A)

Το κιτ μάρτυρα RNA της Affymetrix® (P/N 901285) χρησιμοποιείται για αυτήν τη διαδικασία.

Πίνακας 1: Διαδοχική αραιώση αποθεματικού διαλύματος μάρτυρα πολυαδενυλίωσης

Αρχική ποσότητα ολικού RNA	Διαδοχική αραιώση				Όγκος που πρέπει να προστεθεί στο ολικό RNA
	Πρώτη	Δεύτερη	Τρίτη	Τέταρτη	
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

Στον πίνακα 1 παρατίθεται μια κατευθυντήρια οδηγία, όταν χρησιμοποιούνται 100, 200, 500 ή 1.000 ng ολικού RNA ως αρχικό υλικό. Για ποσότητες αρχικού δείγματος διαφορετικές από εκείνες που παρατίθενται εδώ, πρέπει να υπολογίζονται οι κατάλληλες αραιώσεις, με τις οποίες επιτυγχάνεται η ίδια τελική συγκέντρωση των μαρτύρων που εμβολιάζονται στα δείγματα.

**ΣΥΜΒΟΥΛΗ:** Αποφεύγετε την αναρρόφηση με πιπέτα διαλυμάτων των οποίων ο όγκος είναι μικρότερος από 2 μl, προκειμένου να διατηρηθεί η ακρίβεια και η συνέπεια κατά την παρασκευή των διαλυμάτων.

- Χρησιμοποιήστε το τέταρτο διάλυμα (για 100 και 200 ng ολικού RNA) για την παρασκευή του διαλύματος που περιγράφεται παρακάτω στη διαδικασία 3: Προετοιμασία της αντίδρασης σύνθεσης του 1<sup>ου</sup> κλώνου cDNA.

### Διαδικασία 3: Προετοιμασία της αντίδρασης σύνθεσης του 1<sup>ου</sup> κλώνου cDNA

Για αυτήν τη διαδικασία χρησιμοποιείται το κιτ A (P/N 901293) και το κιτ B (901298) σύνθεσης και σήμανσης μεταγραφών της Affymetrix®.

Πίνακας 2: Ρυθμίσεις θερμικού κυκλοποιητή για τη σύνθεση 1<sup>ου</sup> κλώνου cDNA

Βήμα / Μέθοδος	Πρόγραμμα επώασης	Πρόγραμμα επώασης	Πρόγραμμα διατήρησης	Όγκος αντίδρασης
Σύνθεση 1 <sup>ου</sup> κλώνου cDNA	42 °C για 2 ώρες	4 °C για 10 λεπτά	διατήρηση στους 4 °C	10 μl

Πίνακας 3: Παρασκευή μείγματος αντιδραστηρίων του 1<sup>ου</sup> κλώνου

Συστατικό	Όγκος μείγματος αντιδραστηρίων εργασίας επαρκής για 1 αντίδραση (V)	Όγκος μείγματος αντιδραστηρίων εργασίας επαρκής για 1 αντίδραση x 1,15 (V x 1,15)	Επιθυμητός αριθμός αντιδράσεων (R)	Συνολικός όγκος που απαιτείται (V x 1,15) x R
Ρυθμιστικό διάλυμα σύνθεσης 1 <sup>ου</sup> κλώνου (1 <sup>st</sup> -Strand Synthesis Buffer)	4 μl	4,6 μl		
Μείγμα ενζύμων σύνθεσης 1 <sup>ου</sup> κλώνου (1 <sup>st</sup> -Strand Synthesis Enzyme Mix)	1 μl	1,15 μl		
Αραιωμένος μάρτυρας πολυαδενυλίωσης (από τη διαδικασία 2)	1 μl	1,15 μl		
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>6 μl</b>	<b>6,9 μl</b>		

**ΣΥΜΒΟΥΛΗ:** Παίρνετε ένα αντιδραστήριο κάθε φορά και επιστρέφετέ το στον κατάλληλο χώρο φύλαξης μόλις τελειώσετε. Χρησιμοποιήστε επιτραπέζια συσκευή ψύξης για τη μεταφορά των ενζύμων. Εκτελέστε ήπια ανάδευση σε ανακινήτρια τύπου vortex και σύντομη φυγοκέντρωση κάθε αντιδραστηρίου, συμπεριλαμβανομένου του ενζύμου, πριν από την προσθήκη στο μείγμα αντιδραστηρίων.

- Ενεργοποιήστε τον θερμικό κυκλοποιητή τουλάχιστον 15 λεπτά πριν από τη χρήση.
- Παρασκευάστε το μείγμα αντιδραστηρίων του 1<sup>ου</sup> κλώνου σε θερμοκρασία δωματίου σύμφωνα με τον πίνακα 3.

- Μεταφέρετε τον κατάλληλο όγκο αραιωμένου μάρτυρα πολυαδενυλίωσης από τη διαδικασία 2 στο μείγμα αντιδραστηρίων 1<sup>ου</sup> κλώνου σύμφωνα με τον πίνακα 3.
- Εκτελέστε ήπια ανάδευση του μείγματος αντιδραστηρίων 1<sup>ου</sup> κλώνου σε ανακινητήρα τύπου vortex. Εκτελέστε σύντομη φυγοκέντρηση του σωληναρίου.
- Προσθέστε 6 μl του μείγματος αντιδραστηρίων 1<sup>ου</sup> κλώνου στον πυθμένα των πηγαδιών της πλάκας 96 πηγαδιών.
- Προσθέστε 4 μl δειγμάτων ολικού RNA στα κατάλληλα πηγάδια. Χρησιμοποιήστε συνολικά 100 έως 1000 ng ανά αντίδραση. Εάν η ποσότητα ολικού RNA είναι μικρότερη από 4 μl, προσθέστε έως 4 μl νερού ελεύθερου νουκλεασών. Αναμείξτε με ήπιες κινήσεις αναρροφώντας με την πιπέτα και εκχύνοντας ξανά το περιεχόμενο πολλές φορές.
- Καλύψτε την πλάκα με αυτοκόλλητο φύλλο αλουμινίου, φυγοκεντρήστε σε 370 x g για 10 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια επωάστε χρησιμοποιώντας πρόγραμμα σύνθεσης του 1<sup>ου</sup> κλώνου cDNA. Χρησιμοποιήστε επίθεμα συμπίεσης και θερμαινόμενο καπάκι.
- Στο τέλος του προγράμματος, αφαιρέστε το δείγμα εντός 10 λεπτών από την έναρξη του σταδίου διατήρησης στους 4 °C και προχωρήστε αμέσως στη διαδικασία 4: Προετοιμασία της αντίδρασης σύνθεσης του 2<sup>ου</sup> κλώνου cDNA.

## Διαδικασία 4: Προετοιμασία της αντίδρασης σύνθεσης του 2<sup>ου</sup> κλώνου cDNA

Για αυτήν τη διαδικασία χρησιμοποιείται το kit A (P/N 901293) και το kit B (901298) σύνθεσης και σήμανσης μεταγραφών της Affymetrix®.

Πίνακας 4: Ρυθμίσεις θερμικού κυκλοποιητή για τη σύνθεση 2<sup>ου</sup> κλώνου cDNA

Βήμα / Μέθοδος	Πρόγραμμα επώασης	Πρόγραμμα επώασης	Πρόγραμμα διατήρησης	Όγκος αντίδρασης
Σύνθεση 2 <sup>ου</sup> κλώνου cDNA	16 °C για 1 ώρα	4 °C για 10 λεπτά	διατήρηση στους 4 °C	30 μl

Πίνακας 5: Παρασκευή μείγματος αντιδραστηρίων του 2<sup>ου</sup> κλώνου

Συστατικό	Όγκος μείγματος αντιδραστηρίων εργασίας επαρκής για 1 αντίδραση (V)	Όγκος μείγματος αντιδραστηρίων εργασίας επαρκής για 1 αντίδραση x 1,10 (V x 1,10)	Επιθυμητός αριθμός αντιδράσεων (R)	Συνολικός όγκος που απαιτείται (V x 1,10) x R
Ρυθμιστικό διάλυμα σύνθεσης 2 <sup>ου</sup> κλώνου (2 <sup>nd</sup> -Strand Synthesis Buffer)	18 μl	19,8 μl		
Μείγμα ενζύμων σύνθεσης 2 <sup>ου</sup> κλώνου (2 <sup>nd</sup> -Strand Synthesis Enzyme Mix)	2 μl	2,2 μl		
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>20 μl</b>	<b>22,0 μl</b>		

**ΣΥΜΒΟΥΛΗ:** Παίρνετε ένα αντιδραστήριο κάθε φορά και επιστρέφετέ το στον κατάλληλο χώρο φύλαξης μόλις τελειώνετε. Χρησιμοποιήστε επιτραπέζια συσκευή ψύξης για τη μεταφορά των ενζύμων. Εκτελέστε ήπια ανάδευση σε ανακινητήρα τύπου vortex και σύντομη φυγοκέντρηση κάθε αντιδραστηρίου, συμπεριλαμβανομένου του ενζύμου, πριν από την προσθήκη στο μείγμα αντιδραστηρίων.

- Παρασκευάστε το μείγμα αντιδραστηρίων του 2<sup>ου</sup> κλώνου σε θερμοκρασία δωματίου σύμφωνα με τον πίνακα 5. Αναμείξτε με ήπια ανάδευση σε ανακινητήρα τύπου vortex. Εκτελέστε σύντομη φυγοκέντρηση του σωληναρίου.
- Μεταφέρετε 20 μl του μείγματος αντιδραστηρίων του 2<sup>ου</sup> κλώνου στο πλευρικό τοίχωμα των κατάλληλων πηγαδιών.
- Καλύψτε την πλάκα με καινούριο αυτοκόλλητο φύλλο αλουμινίου, φυγοκεντρήστε σε 370 x g για 10 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια επωάστε χρησιμοποιώντας πρόγραμμα σύνθεσης του 2<sup>ου</sup> κλώνου cDNA.

**ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ:** Μη χρησιμοποιείτε θερμαινόμενο καπάκι για αυτή την επώαση.

- Στο τέλος του προγράμματος, αφαιρέστε το δείγμα εντός 10 λεπτών από την έναρξη του σταδίου διατήρησης στους 4 °C.
- Προχωρήστε αμέσως στη διαδικασία 5: Προετοιμασία της αντίδρασης in vitro μεταγραφής (IVT).

## Διαδικασία 5: Προετοιμασία της αντίδρασης in vitro μεταγραφής (IVT)

Για αυτήν τη διαδικασία χρησιμοποιείται το kit A (P/N 901293) και το kit B (901298) σύνθεσης και σήμανσης μεταγραφών της Affymetrix®.

Πίνακας 6: Ρυθμίσεις θερμικού κυκλοποιητή για την αντίδραση IVT

Βήμα / Μέθοδος	Πρόγραμμα επώασης	Πρόγραμμα επώασης	Πρόγραμμα διατήρησης	Όγκος αντίδρασης
Αντίδραση IVT	40 °C για 16 ώρες*		διατήρηση στους 4 °C	60 μl

\* Ο χρόνος επώασης είναι συγκεκριμένος για 100 ng ολικού RNA. Ο χρόνος θα πρέπει να προσαρμόζεται με βάση την αρχική ποσότητα ολικού RNA που χρησιμοποιείται σε αυτές τις διαδικασίες

Πίνακας 7: Συνιστώμενοι χρόνοι επώασης

Ποσότητα ολικού RNA	Συνιστώμενος χρόνος επώασης
100 ng	16 ώρες
500 ng	4 έως 8 ώρες
1.000 ng	2 έως 4 ώρες

Πίνακας 8: Παρασκευή μείγματος αντιδραστηρίων IVT

Συστατικό	Όγκοι μείγματος αντιδραστηρίων εργασίας επαρκείς για:		Επιθυμητός αρ. αντιδρ. (R)	Συνολικός όγκος που απαιτείται (V x 1,10) x R
	1 αντιδρ. (V)	1 αντιδρ. x 1,10 (V x 1,10)		
Ρυθμιστικό διάλυμα in vitro μεταγραφής (In Vitro Transcription Buffer)	22 μl	24,2 μl		
Διάλυμα μορίου σήμανσης RNA (RNA Label)	2 μl	2,2 μl		

Συστατικό	Όγκοι μείγματος αντιδραστηρίων εργασίας επαρκείς για:		Επιθυμητός αρ. αντιδρ. (R)	Συνολικός όγκος που απαιτείται (V x 1,10) x R
	1 αντιδρ. (V)	1 αντιδρ. x 1,10 (V x 1,10)		
Μείγμα ενζύμων in vitro μεταγραφής (In Vitro Transcription Enzyme Mix)	6 μl	6,6 μl		
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>30 μl</b>	<b>33 μl</b>		

**ΣΥΜΒΟΥΛΗ:** Λάβετε το σωληνάριο διαλύματος μορίου σήμανσης RNA και αφήστε το περιεχόμενο να αποψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

1. Παρασκευάστε το μείγμα αντιδραστηρίων IVT σε θερμοκρασία δωματίου σύμφωνα με τον πίνακα 8. Αναμείξτε με ήπια ανάδευση σε ανακινητήρα τύπου vortex. Εκτελέστε σύντομη φυγοκέντρηση του σωληναρίου.
2. Μεταφέρετε 30 μl του μείγματος αντιδραστηρίων IVT στο πλευρικό τοίχωμα κάθε πηγαδιού που περιέχει 30 μl της αντίδρασης του 2<sup>ου</sup> κλώνου.
3. Επώαστε την αντίδραση IVT σύμφωνα με τους πίνακες 6 και 7. Χρησιμοποιήστε επίθεμα συμπίεσης και θερμαινόμενο καπάκι.
4. Μετά την επώαση, προχωρήστε στη διαδικασία 6: Κάθαρση cRNA από την αντίδραση IVT.

**Διαδικασία 6: Κάθαρση cRNA από την αντίδραση IVT**

Για αυτήν τη διαδικασία χρησιμοποιείται το kit A (P/N 901293) σύνθεσης και σήμανσης μεταγραφών της Affymetrix®.

**ΣΥΜΒΟΥΛΗ:**

- Λάβετε ένα κλάσμα των 400 μl νερού ελεύθερου νουκλεασών σε σωληνάριο 1,5 ml ελεύθερο νουκλεασών. Αυτός ο όγκος επαρκεί για τη διενέργεια 8 αντιδράσεων. Τοποθετήστε το νερό ελεύθερο νουκλεασών σε θερμοκρασία 60 °C για τουλάχιστον 10 λεπτά σε θερμομπλόκ.
- Προσθέστε 12,6 ml αιθανόλης 100% στη φιάλη ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης σφαιριδίων πριν από την πρώτη χρήση και αναμείξτε αναστρέφοντας.

**1. Δέσμευση cRNA**

- A. Ανακινήστε τη φιάλη μαγνητικών σφαιριδίων με ήπιες κινήσεις, για να επαναωρησέτε τυχόν μαγνητικά σωματίδια τα οποία ενδέχεται να έχουν καθιζάνει. Μεταφέρετε 975 μl μαγνητικών σφαιριδίων στο μικρό διαμέρισμα του δοχείου αντιδραστηρίων.
- B. Προσθέστε 108 μl μαγνητικών σφαιριδίων σε κάθε δείγμα, αναμείξτε και μεταφέρετε σε ξεχωριστό πηγάδι πλάκας με στρογγυλό πυθμένα.
- Γ. Ανακινήστε για 2 λεπτά σε μέτρια ταχύτητα σε ανακινητήρα πλακών.
- Δ. Μεταφέρετε την πλάκα σε μαγνητική βάση στήριξης και επάγετε δέσμευση των μαγνητικών σφαιριδίων για 5 έως 10 λεπτά, έως ότου σχηματιστεί ίζημα και το διάλυμα γίνει διαυγές.
- Ε. Μόλις το διάλυμα γίνει διαυγές, αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο χωρίς να αναταράξετε τα σφαιρίδια.

**2. Πλύση των σφαιριδίων**

- A. Μεταφέρετε 4 ml του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης σφαιριδίων στο μεγάλο διαμέρισμα του δοχείου αντιδραστηρίων.
- B. Έχοντας την πλάκα σε μαγνητική βάση στήριξης, προσθέστε 200 μl διαλύματος πλύσης σφαιριδίων σε κάθε δείγμα, χωρίς να αναταράξετε τα σφαιρίδια. Επώαστε για 25 έως 35 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Γ. Αναρροφήστε το υπερκείμενο χωρίς να αναταράξετε τα σφαιρίδια και απορρίψτε το.
- Δ. Επαναλάβετε ακόμα μία φορά τα παραπάνω βήματα 2A και 2B.
- Ε. Αφήστε την πλάκα να στεγνώσει στον αέρα για 5 έως 7 λεπτά, τοποθετημένη επάνω στη μαγνητική βάση στήριξης. Μην καλύπτετε την πλάκα.
- ΣΤ. Αφαιρέστε την πλάκα από τη μαγνητική βάση στήριξης.

**3. Έκλυση cRNA**

**ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ:** Όταν χρησιμοποιείτε την επαναληπτική πιπέτα, υπολογίστε να αναρροφήσετε δύο επιπλέον δόσεις όγκου των 30 μl: απορρίψτε τα πρώτα 30 μl προτού ξεκινήσετε την προσθήκη του διαλύματος στα δείγματα και μη χρησιμοποιήσετε τα τελευταία 30 μl του διαλύματος έκλυσης.

- A. Προσθέστε 30 μl νερού ελεύθερου νουκλεασών που έχει προθερμανθεί (60 °C), στο πλευρικό τοίχωμα κάθε πηγαδιού, χρησιμοποιώντας επαναληπτική πιπέτα χωρίς να αναταράξετε το ίζημα.
- B. Καλύψτε την πλάκα με το καπάκι και μεταφέρετέ την στον ανακινητήρα. Ανακινήστε σε υψηλή ταχύτητα για ένα λεπτό σε ανακινητήρα πλακών.
- Γ. Ελέγξτε ότι το ίζημα έχει διασπαρεί πλήρως. Μεταφέρετε την πλάκα σε μαγνητική βάση στήριξης και αφήστε τα σφαιρίδια να καθιζάνουν για 3 έως 4 λεπτά. Το διάλυμα θα πρέπει να είναι διαυγές και όλα τα σφαιρίδια να σχηματίζουν ένα ίζημα πάνω από τον μαγνήτη.
- Δ. Μεταφέρετε 30 μl του υπερκείμενου, το οποίο περιέχει το εκλυόμενο cRNA σε σωληνάριο PCR ελεύθερο νουκλεασών.
- Ε. Προχωρήστε στη διαδικασία 7: Ποσοτικός προσδιορισμός του cRNA ή φύλαξη σε θερμοκρασία -80 °C.

**Διαδικασία 7: Ποσοτικός προσδιορισμός του cRNA**

Ανατρέξτε στο κεφάλαιο 2 του εγχειριδίου χρήσης των αντιδραστηρίων γονιδιακού προφίλ της Affymetrix® (P/N 702749).

Χρησιμοποιήστε το ποσοτικά προσδιορισμένο προϊόν στη διαδικασία 8: Προετοιμασία της αντίδρασης κατακερματισμού του cRNA.

**Διαδικασία 8: Προετοιμασία της αντίδρασης κατακερματισμού του cRNA**

Για αυτήν τη διαδικασία χρησιμοποιείται νερό ελεύθερο νουκλεασών και το ρυθμιστικό διάλυμα κατακερματισμού 5X από το kit A ανίχνευσης μεταγραφών (P/N 901307).

Πίνακας 9: Ρύθμιση θερμικού κυκλοποιητή για τον κατακερματισμό

Βήμα / Μέθοδος	Πρόγραμμα επώασης	Πρόγραμμα επώασης	Πρόγραμμα διατήρησης	Όγκος αντίδρασης
Κατακερματισμός	94 °C για 35 λεπτά	4 °C για 10 λεπτά	διατήρηση στους 4 °C	30 μl

**Πίνακας 10: Προετοιμασία αντίδρασης κατακερματισμού**

Συστατικό	Ποσότητα ή όγκος
cRNA	15 µg
Ρυθμιστικό διάλυμα κατακερματισμού 5X (5X Fragmentation Buffer)	6 µl
Νερό ελεύθερο νουκλεασών (Nuclease-free water)	Μεταβλητός, έως τελικό όγκο 30 µl
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>30 µl</b>

1. Εκτελέστε την αντίδραση σε ταινίες σωληναρίων των 0,2 ml σύμφωνα με τον πίνακα 10, χρησιμοποιώντας το ποσοτικά προσδιορισμένο προϊόν cRNA που σχηματίστηκε στη διαδικασία 7 για τον υπολογισμό του όγκου του cRNA που απαιτείται για την προσθήκη 15 µg στην αντίδραση κατακερματισμού.
2. Αναμειξτε με ήπια ανάδευση σε ανακινητήρα τύπου vortex και εκτελέστε σύντομη φυγοκέντρηση, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
3. Επωάστε σε θερμικό κυκλοποιητή χρησιμοποιώντας τη μέθοδο κατακερματισμού. Καλύψτε με το θερμαινόμενο καπάκι.

## Διαδικασία 9: Παρασκευή του κοκτέιλ υβριδοποίησης στόχου

Για αυτήν τη διαδικασία χρησιμοποιείται το kit A (P/N 901307) και το kit Γ (P/N 901312) ανίχνευσης μεταγραφών της Affymetrix®.

**Πίνακας 11: Παρασκευή του μείγματος αντιδραστηρίων υβριδοποίησης**

Συστατικό	Όγκοι μείγματος αντιδραστηρίων εργασίας επαρκείς για 1 συστοιχία ανιχνευτών (V)	Όγκοι μείγματος αντιδραστηρίων εργασίας επαρκείς για 1 συστοιχία ανιχνευτών x 1,10 (V x 1,10)	Επιθυμητός αριθμός συστοιχιών ανιχνευτών (R)	Συνολικός όγκος που απαιτείται (V x 1,10) x R	Τελική αραιώση/ συγκέντρωση
Αντιδραστήριο ολιγονουκλεοτιδίου B2 (Oligo B2) (3 nM)	4,2 µl	4,62 µl			50 pM
Μάρτυρας υβριδοποίησης 20X (20X Hybridization Control) (bioB, bioC, bioD, cre)	12,5 µl	13,75 µl			1,5, 5, 25 και 100 pM αντίστοιχα
Διάλυμα μείγματος υβριδοποίησης 2X (2X Hybridization Mix)	125 µl	137,5 µl			1X
DMSO	25 µl	27,5 µl			10%
Νερό ελεύθερο νουκλεασών (Nuclease-free Water)	58,3 µl	64,13 µl			
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>225,0 µl</b>	<b>247,5 µl</b>			

### ΣΥΜΒΟΛΗ:

- ❑ Βγάλτε το αντιδραστήριο ολιγονουκλεοτιδίου B2 και τον μάρτυρα υβριδοποίησης 20X από την κατάψυξη και αποψύξτε τα σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❑ Το DMSO στερεοποιείται σε θερμοκρασία 4 °C. Βεβαιωθείτε ότι το αντιδραστήριο έχει αποψυχθεί πλήρως πριν από τη χρήση.
- ❑ Ρυθμίστε τη θερμοκρασία των θερμομπλόκ στους 45 °C, τους 65 °C και τους 99 °C.

**ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ:** Επιβάλλεται τα αποθεματικά διαλύματα των μαρτύρων υβριδοποίησης 20X να θερμαίνονται σε θερμοκρασία 65 °C για 5 λεπτά, ώστε το cRNA να επαναιωρείται πλήρως πριν από τον διαχωρισμό κλασμάτων.

1. Παρασκευάστε το μείγμα αντιδραστηρίων υβριδοποίησης σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ή περισσότερες συστοιχίες σύμφωνα με τον πίνακα 11.
2. Μεταφέρετε κλάσμα 225 µl του μείγματος αντιδραστηρίων υβριδοποίησης σε σωληνάριο των 1,5 ml, ελεύθερο νουκλεασών.
3. Προσθέστε 25 µl κατακερματισμένου cRNA από τη διαδικασία 8 για να παρασκευάσετε το κοκτέιλ υβριδοποίησης για μια συστοιχία ανιχνευτών. Η τελική συγκέντρωση του cRNA στο κοκτέιλ υβριδοποίησης είναι 0,05 µg/µl.
4. Εξισορροπήστε τη συστοιχία ανιχνευτών σε θερμοκρασία δωματίου αμέσως πριν από τη χρήση.
5. Θερμάνετε το κοκτέιλ υβριδοποίησης σε θερμοκρασία 99 °C για 5 λεπτά σε θερμομπλόκ.
6. Εν τω μεταξύ, διαβρέξτε τη συστοιχία ανιχνευτών με 200 µl μείγματος προ-υβριδοποίησης, πληρώνοντάς τη μέσω ενός από τα διαφράγματα.
7. Επωάστε τη συστοιχία ανιχνευτών με το μείγμα προ-υβριδοποίησης σε θερμοκρασία 45 °C για 10 λεπτά σε 60 rpm.
8. Μεταφέρετε το κοκτέιλ υβριδοποίησης το οποίο έχει θερμανθεί στο βήμα 5, σε θερμομπλόκ ρυθμισμένο στους 45 °C για 5 λεπτά.
9. Φυγοκεντρήστε το κοκτέιλ υβριδοποίησης σε μικροφυγόκεντρο, στη μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά, προκειμένου να συλληχθεί τυχόν αδιάλυτο υλικό από το μείγμα υβριδοποίησης.
10. Αφαιρέστε τη συστοιχία από τον κλίβανο υβριδοποίησης και αφαιρέστε το μείγμα προ-υβριδοποίησης. Επαναπληρώστε τη συστοιχία με τον κατάλληλο όγκο του κοκτέιλ υβριδοποίησης το οποίο έχει υποβληθεί σε διάγνωση, αποφεύγοντας τη λήψη τυχόν αδιάλυτης σωματιδιακής ύλης που βρίσκεται στον πυθμένα του σωληναρίου.
11. Τοποθετήστε τη συστοιχία ανιχνευτών στον κλίβανο υβριδοποίησης ο οποίος έχει ρυθμιστεί σε θερμοκρασία 45 °C. Υποβάλλετε σε περιστροφή σε 60 rpm.
12. Πραγματοποιήστε υβριδοποίηση για 17 ± 1 ώρες.

### Για in vitro διαγνωστική χρήση.

P/N 703026 EL Avθ. 1

© 2011 Affymetrix, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος. Affymetrix®, Axiom™, Command Console®, DMET™, GeneAtlas™, GeneChip®, GeneChip-compatible™, GeneTitan®, Genotyping Console™, myDesign™, NetAffx®, OncoScan™, Powered by Affymetrix™, Procarta®, και QuantiGene® είναι εμπορικά σήματα ή σήματα κατατεθέντα της Affymetrix, Inc. Όλα τα υπόλοιπα εμπορικά σήματα αποτελούν ιδιοκτησία των αντίστοιχων κατόχων τους.