

Scheda di riferimento rapido

Reagenti Gene Profiling Affymetrix®



Uso previsto

Per uso diagnostico in vitro

I reagenti Gene Profiling Affymetrix® sono destinati alla preparazione di un target di RNA complementare marcato a partire da RNA totale purificato da campioni clinici tissutali freschi o congelati per l'ibridazione di microarray GeneChip® Affymetrix e la misurazione dei segnali fluorescenti dell'RNA target marcato, utilizzando il sistema di strumentazione per microarray GeneChip® Affymetrix.

Sono destinati ad essere usati assieme ai test di microarray GeneChip Affymetrix, approvati separatamente dall'FDA, che specificano l'impiego di reagenti Gene Profiling Affymetrix.

Questa guida di riferimento rapido è destinata esclusivamente agli utenti esperti e funge da supplemento al *Manuale d'istruzioni dei reagenti Gene Profiling Affymetrix®* (n° di cat. 702749).

Procedura 1. Approntamento del ciclatore termico

I programmi di ciclatore termico usati sono elencati in ciascuna procedura riportata in questa guida di riferimento rapido.

vedere il capitolo 2 del *Manuale d'istruzioni dei reagenti Gene Profiling Affymetrix®* (n° di cat. 702749).

Procedura 2. Preparazione dei controlli Poly-A

Questa procedura richiede l'uso del kit di controllo RNA Affymetrix® (n° di cat. 901285).

Tabella 1. Diluizione seriale del controllo Poly-A

Quantità iniziale di RNA totale	Diluizioni seriali				Volume da aggiungere all'RNA totale
	Prima	Seconda	Terza	Quarta	
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

La tabella 1 funge da linea guida quando 100, 200, 500 o 1.000 ng di RNA totale vengono usati quali materiale iniziale. Nel caso di quantità di campione iniziale diverse da quelle qui elencate, è necessario calcolare le appropriate diluizioni, in modo da conseguire la stessa concentrazione finale proporzionale dei controlli preparati.

SUGGERIMENTO – Evitare di pipettare soluzioni in volumi inferiori a 2 µL per mantenere la precisione e l'uniformità di preparazione delle diluizioni.

- Usare la quarta diluizione (per 100 e 200 ng di RNA totale) per preparare la soluzione descritta nella successiva *Procedura 3. Preparazione della reazione di sintesi del 1° filamento di cDNA*.

Procedura 3. Preparazione della reazione di sintesi del 1° filamento di cDNA

Questa procedura prevede l'uso dei kit di sintesi e di marcatura dei trascritti Affymetrix® A (n° di cat. 901293) e B (n° di cat. 901298).

Tabella 2. Impostazioni di ciclatore termico ai fini della sintesi del 1° filamento di cDNA

Passo / metodo	Programma di incubazione	Programma di incubazione	Programma di conservazione	Volume della reazione
Sintesi del 1° filamento di cDNA	42°C per 2 ore	4°C per 10 minuti	4°C	10 µL

Tabella 3. Preparazione della miscela master del 1° filamento

Componente	Miscela master di lavoro Volumi sufficienti per 1 reazione (V)	Miscela master di lavoro Volumi sufficienti per 1 reazione x 1,15 (V x 1,15)	Numero desiderato di reazioni (R)	Volume totale richiesto (V x 1,15) x R
Tampone di sintesi del 1° filamento (1 st Strand Synthesis Buffer)	4 µL	4,6 µL		
Miscela enzimatica di sintesi del 1° filamento (1 st Strand Synthesis Enzyme Mix)	1 µL	1,15 µL		
Controllo Poly-A diluito (dalla procedura 2)	1 µL	1,15 µL		
Volume totale	6 µL	6,9 µL		

SUGGERIMENTO – Tirar fuori un reagente per volta e riporlo opportunamente quando non serve più. Usare una borsa frigo da banco per trasportare gli enzimi. Agitare delicatamente al vortex ed eseguire brevemente uno spin down di ciascun reagente, enzima compreso, prima di addizionarlo alla miscela master.

- Accendere il ciclatore termico almeno 15 minuti prima dell'uso.
- Preparare la miscela master del 1° filamento a temperatura ambiente, come indicato nella tabella 3.

3. Aggiungere l'appropriata aliquota di controllo Poly-A diluito, creata nel corso della procedura 2, alla miscela master del 1° filamento, come indicato nella tabella 3.
4. Miscelare delicatamente al vortex la miscela master del 1° filamento. Eseguire un breve spin down della provetta.
5. Aggiungere 6 µL di miscela master del 1° filamento sul fondo dei pozzetti della piastra da 96 pozzetti.
6. Aggiungere 4 µL di campioni di RNA totale nei pozzetti appropriati. Usare un totale di 100 – 1.000 ng per reazione. Se l'RNA totale è inferiore a 4 µL, aggiungere fino a 4 µL di acqua priva di nucleasi. Miscelare delicatamente pipettando su e giù svariate volte.
7. Coprire la piastra con un foglio adesivo in alluminio, centrifugare a 370 x g per 10 secondi, a temperatura ambiente, e poi incubare usando il programma di sintesi del 1° filamento di cDNA. Usare un tampone di compressione ed il coperchio riscaldato.
8. Rimuovere entro 10 minuti dalla conservazione a 4°C alla fine del programma e procedere immediatamente con la *Procedura 4. Preparazione della reazione di sintesi del 2° filamento di cDNA*.

Procedura 4. Preparazione della reazione di sintesi del 2° filamento di cDNA

Questa procedura richiede l'uso dei kit di sintesi e di marcatura dei trascritti Affymetrix® A (n° di cat. 901293) e B (n° di cat. 901298).

Tabella 4. Impostazioni di ciclatore termico ai fini della sintesi del 2° filamento di cDNA

Passo / metodo	Programma di incubazione	Programma di incubazione	Programma di conservazione	Volume di reazione
Sintesi del 2° filamento di cDNA	16°C per 1 ora	4°C per 10 minuti	4°C	30 µL

Tabella 5. Preparazione della miscela master del 2° filamento

Componente	Miscela master di lavoro Volumi sufficienti per 1 reazione (V)	Miscela master di lavoro Volumi sufficienti per 1 reazione x 1,10 (V x 1,10)	Numero desiderato di reazioni (R)	Volume totale richiesto (V x 1,10) x R
Tampone di sintesi del 2° filamento (2 nd Strand Synthesis Buffer)	18 µL	19,8 µL		
Miscela enzimatica di sintesi del 2° filamento (2 nd Strand Synthesis Enzyme Mix)	2 µL	2,2 µL		
Volume totale	20 µL	22,0 µL		

SUGGERIMENTO – Tirar fuori un reagente per volta e riporlo opportunamente quando non serve più. Usare una borsa frigo da banco per trasportare gli enzimi. Agitare delicatamente al vortex ed eseguire brevemente uno spin down di ciascun reagente, enzima compreso, prima di addizionarlo alla miscela master.

1. Preparare la miscela master del 2° filamento a temperatura ambiente, come indicato nella tabella 5. Miscelare delicatamente al vortex. Eseguire un breve spin down della provetta.
2. Trasferire 20 µL di miscela master del 2° filamento contro la parete dei pozzetti appropriati.
3. Coprire la piastra con un nuovo foglio adesivo in alluminio, centrifugare a 370 x g per 10 secondi, a temperatura ambiente, e poi incubare usando il programma di sintesi del 2° filamento di cDNA.

IMPORTANTE! Non usare il coperchio riscaldato per questa incubazione.

4. Rimuovere entro 10 minuti dalla conservazione a 4°C alla fine del programma.
5. Procedere immediatamente con la *Procedura 5. Preparazione della reazione di trascrizione in vitro (IVT)*.

Procedura 5: Preparazione della reazione di trascrizione in vitro (IVT)

Questa procedura richiede l'uso dei kit di sintesi e di marcatura dei trascritti Affymetrix® A (n° di cat. 901293) e B (n° di cat. 901298).

Tabella 6. Impostazioni di ciclatore termico ai fini della reazione IVT

Passo / metodo	Programma di incubazione	Programma di incubazione	Programma di conservazione	Volume di reazione
Reazione IVT	40°C per 16 ore*		4°C	60 µL

* Il tempo di incubazione è specifico per 100 ng di RNA totale. La durata va regolata in base all'aliquota di RNA totale iniziale, usata per queste procedure

Tabella 7. Tempi consigliati di incubazione

Quantità di RNA totale	Durata consigliata di incubazione
100 ng	16 ore
500 ng	Da 4 ad 8 ore
1.000 ng	Da 2 a 4 ore

Tabella 8. Preparazione della miscela master IVT

Componente	Miscela master di lavoro Volumi sufficienti per:		Numero desiderato di reazioni (R)	Volume totale richiesto (V x 1,10) x R
	1 reazione (V)	1 reazione x 1,10 (V x 1,10)		
Tampone di trascrizione in vitro (In Vitro Transcription Buffer)	22 µL	24,2 µL		
RNA marcato (RNA Label)	2 µL	2,2 µL		
Miscela enzimatica di trascrizione in vitro (In Vitro Transcription Enzyme Mix)	6 µL	6,6 µL		
Volume totale	30 µL	33 µL		

SUGGERIMENTO – Rimuovere la provetta di RNA marcato e scongelarne il contenuto a temperatura ambiente.

- Preparare la miscela master IVT a temperatura ambiente, come indicato nella tabella 8. Miscelare delicatamente al vortex. Eseguire un breve spin down della provetta.
- Trasferire 30 µL di miscela master IVT contro la parete di ciascun pozzetto contenente 30 µL di reazione di 2° filamento.
- Incubare la reazione IVT nel modo indicato nelle tabelle 6 e 7. Usare un tampone di compressione ed il coperchio riscaldato.
- Dopo l'incubazione, procedere con la *Procedura 6. Purificazione del cRNA dalla reazione IVT.*

Procedura 6. Purificazione del cRNA dalla reazione IVT

Questa procedura richiede il kit di sintesi e di marcatura dei trascritti A Affymetrix® (n° di cat. 901293).

SUGGERIMENTO

- Aliquotare 400 µL di acqua priva di nucleasi in una provetta da 1,5 mL priva di nucleasi. Questo volume è sufficiente per 8 reazioni. Porre acqua priva di nucleasi a 60°C per almeno 10 minuti su un blocco riscaldatore.
- Aggiungere 12,6 mL di etanolo puro nel flacone del tampone di lavaggio delle perline prima del primo uso e miscelare per inversione.

1. Legame del cRNA

- Agitare delicatamente il flacone di perline magnetiche per risospendere le particelle eventualmente sedimentate. Trasferire 975 µL di perline magnetiche nello scomparto piccolo del recipiente.
- Aggiungere 108 µL di perline magnetiche a ciascun campione, miscelare e trasferire il tutto nel pozzetto separato di una piastra con fondo a U.
- Agitare per 2 minuti a media velocità su un agitatore per piastre.
- Porre la piastra su una base magnetica e catturare le perline magnetiche per 5 – 10 minuti, finché non si forma un pellet e la soluzione si chiarifica.
- Quando la soluzione è limpida, rimuovere e smaltire il supernatante senza disturbare le perline.

2. Lavaggio delle perline

- Trasferire 4 mL di tampone di lavaggio delle perline nello scomparto grande del recipiente.
- Dopo aver posto la piastra su una base magnetica, aggiungere 200 µL di soluzione di lavaggio delle perline in ciascun campione, senza disturbare le perline. Incubare per 25 – 35 secondi a temperatura ambiente.
- Aspirare e smaltire il supernatante senza disturbare le perline.
- Ripetere un'altra volta i precedenti passi 2A e 2B.
- Attendere per 5 – 7 minuti che la piastra si asciughi all'aria. Non coprirla.
- Rimuovere la piastra dal sostegno magnetico.

3. Eluizione del cRNA

IMPORTANTE!: Quando si usa la pipetta a ripetizione, predisporre due aliquote extra da 30 µL: smaltire i primi 30 µL prima di aggiungere l'acqua ai campioni e non usare gli ultimi 30 µL della soluzione di eluizione.

- Aggiungere 30 µL di acqua priva di nucleasi preriscaldata (a 60°C), versandola con una pipetta a ripetizione contro la parete di ciascun pozzetto, senza disturbare il pellet.
- Coprire la piastra con il coperchio e trasferirla sull'agitatore. Agitare la piastra ad alta velocità per un minuto.
- Controllare che il pellet sia completamente disperso. Spostare la piastra su un sostegno magnetico e lasciar sedimentare le perline per 3 – 4 minuti. La soluzione dovrebbe essere limpida, con tutte le perline raccolte contro il magnete.
- Trasferire 30 µL di supernatante, contenente il cRNA eluito, in una provetta per PCR priva di nucleasi.
- Procedere con la *Procedura 7. Quantificazione del cRNA*, oppure conservare a –80°C.

Procedura 7. Quantificazione del cRNA

Fare riferimento al capitolo 2 del *Manuale d'istruzioni dei reagenti Gene Profiling Affymetrix®* (n° di cat. 702749).

Usare la resa bilanciata nella *Procedura 8. Preparazione della reazione di frammentazione del cRNA.*

Procedura 8. Preparazione della reazione di frammentazione del cRNA

Questa procedura richiede acqua priva di nucleasi ed il tampone di frammentazione 5X, contenuto nel kit di rilevazione dei trascritti A (n° di cat. 901307).

Tabella 9. Impostazioni di ciclatore termico ai fini della frammentazione

Passo / metodo	Programma di incubazione	Programma di incubazione	Programma di conservazione	Volume di reazione
Frammentazione	94°C per 35 minuti	4°C per 10 minuti	4°C	30 µL

Tabella 10. Preparazione della reazione di frammentazione

Componente	Aliquota o Volume
cRNA	15 µg
Tampone di frammentazione 5x (5X Fragmentation Buffer)	6 µL
Acqua priva di nucleasi (Nuclease-free Water)	Variabile; fino a 30 µL di volume finale
Volume totale	30 µL

1. Impostare la reazione in una provetta per strisce da 0,2 mL, come indicato nella tabella 10, usando la resa bilanciata di cRNA, evidenziata nel corso della procedura 7, per calcolare il volume di cRNA richiesto per aggiungere 15 µg alla reazione di frammentazione.
2. Miscelare delicatamente al vortex ed eseguire un breve spin down per depositare il contenuto sul fondo della provetta.
3. Incubare nel ciclatore termico usando il metodo di frammentazione. Coprire con il coperchio riscaldato.

Procedura 9. Preparazione del cocktail di ibridazione del target

Questa procedura richiede i kit di rilevazione dei trascritti Affymetrix® A (n° di cat. 901307) e C (n° di cat. 901312).

Tabella 11. Preparazione della miscela master di ibridazione

Componente	Miscela master di lavoro Volumi sufficienti per 1 array di sonde (V)	Miscela master di lavoro Volumi sufficienti per 1 array di sonde x 1,10 (V x 1,10)	Numero di array di sonde desiderati (R)	Volume totale richiesto (V x 1,10) x R	Diluizione/ Concentrazione finale
Oligo B2 (3 nM)	4,2 µL	4,62 µL			50 pM
Controllo di ibridazione 20X (20X Hybridization Control) (bioB, bioC, bioD, cre)	12,5 µL	13,75 µL			1,5, 5, 25 e 100 pM, rispettivamente
Miscela di ibridazione 2X (2X Hybridization Mix)	125 µL	137,5 µL			1X
DMSO	25 µL	27,5 µL			10%
Acqua priva di nucleasi (Nuclease-free Water)	58,3 µL	64,13 µL			
Volume totale	225,0 µL	247,5 µL			

SUGGERIMENTO

- Estrarre dal congelatore l'Oligo B2 ed il controllo di ibridazione 20X e scongelarli a temperatura ambiente.
- Il DMSO si solidifica a 4°C. Accertarsi che il reagente sia completamente scongelato prima dell'uso.
- Impostare le temperature dei blocchi riscaldatori su 45°C, 65°C e 99°C.

IMPORTANTE! È imperativo che gli stock del controllo di ibridazione 20X vengano riscaldati a 65°C per 5 minuti in modo da risospendere completamente il cRNA prima di prelevare aliquote.

1. Preparare la miscela master di ibridazione a temperatura ambiente per 1 o più array, come indicato nella tabella 11.
2. Aliquotare 225 µL di miscela master di ibridazione in una provetta da 1,5 mL priva di nucleasi.
3. Aggiungere 25 µL di cRNA frammentato nel corso della procedura 8 per preparare il cocktail di ibridazione per un array di sonde. La concentrazione finale di cRNA nel cocktail di ibridazione è pari a 0,05 µg/µL.
4. Equilibrare l'array di sonde a temperatura ambiente immediatamente prima dell'uso.
5. Riscaldare il cocktail di ibridazione sul blocco riscaldatore a 99°C per 5 minuti.
6. Nel frattempo, bagnare l'array delle sonde con 200 µL di miscela di preibridazione, riempiendolo attraverso uno dei setti.
7. Incubare l'array delle sonde riempito con miscela di preibridazione a 45°C per 10 minuti a 60 giri/minuto.
8. Trasferire il cocktail di ibridazione riscaldato nel corso del passo 5 su un blocco riscaldatore a 45°C. Riscaldarlo per 5 minuti.
9. Centrifugare la miscela di ibridazione alla massima velocità in una microcentrifuga per 5 minuti in modo da formare un pellet con il materiale insolubile.
10. Rimuovere l'array dal forno di ibridazione ed estrarre la miscela di preibridazione. Rabboccare l'array con il volume appropriato di miscela di ibridazione chiarificata, evitando il materiale insolubile sedimentato sul fondo della provetta.
11. Collocare l'array delle sonde in un forno di ibridazione impostato su 45°C. Farlo ruotare a 60 giri/minuto.
12. Ibridare per 17 ± 1 ore.

Per uso diagnostico in vitro.

Numero di catalogo 703026 IT Rev. 1

© 2011 Affymetrix, Inc. Tutti i diritti riservati. Affymetrix®, Axiom™, Command Console®, DMET™, GeneAtlas™, GeneChip®, GeneChip-compatible™, GeneTitan®, Genotyping Console™, myDesign™, NetAffx®, OncoScan™, Powered by Affymetrix™, Procarta® e QuantiGene® sono marchi di fabbrica o marchi depositati di Affymetrix, Inc. Tutti gli altri marchi di fabbrica sono proprietà dei rispettivi detentori.