

Cartão de Referência Rápida

Reagentes para Estabelecimento do Perfil Genético Affymetrix®



Uso a que se destina

Para uso em diagnóstico in vitro

Os Reagentes para Estabelecimento do Perfil Genético Affymetrix® destinam-se à preparação de RNA alvo complementar marcado, a partir de RNA total purificado proveniente de espécimes clínicos de tecido, frescos ou congelados, para a hibridação de microarrays GeneChip® Affymetrix e para a medição dos sinais de fluorescência do RNA alvo marcado, utilizando o GeneChip® Microarray Instrumentation System (Sistema para instrumentação de microarrays).

Destina-se a ser utilizado com ensaios para microarray GeneChip Affymetrix aprovados pela FDA separadamente, que especifiquem a utilização de reagentes para Estabelecimento do Perfil Genético.

Este guia de referência rápida destina-se apenas a utilizadores experientes, constituindo um suplemento ao *Guia do Utilizador dos Reagentes para Estabelecimento do Perfil Genético Affymetrix®* (P/N 702749).

Procedimento 1: Configuração do Termociclador

Os programas do Termociclador utilizados estão indicados em cada Procedimento deste Cartão de Referência Rápida.

Consulte o Capítulo 2 do *Guia do Utilizador dos Reagentes para Estabelecimento do Perfil Genético Affymetrix®* (P/N 702749).

Procedimento 2: Preparação dos Controlos Poly-A

Neste procedimento utiliza-se o Kit de Controlo de RNA Affymetrix® (P/N 901285).

Quadro 1: Diluição em Série d de Controlo Poly-A

Quantidade inicial de RNA total	Diluição em série				Volume a adicionar ao RNA total
	Primeiro	Segundo	Terceiro	Quarto	
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

O Quadro 1 fornece uma orientação quando se utilizam 100, 200, 500 ou 1 000 ng do RNA total como material de partida. Para quantidades iniciais de material de partida diferentes das aqui referidas, é necessário calcular as diluições adequadas para atingir a mesma concentração final dos controlos spike-in nas amostras.

SUGESTÃO: Quando preparar diluições, para manter a precisão e a consistência, evite pipetar soluções com volumes inferiores a 2 µL.

- Utilize a quarta diluição (para 100 e 200 ng de RNA total) para preparar a solução descrita a seguir, no *Procedimento 3: Preparação da reacção de síntese da 1ª Cadeia cDNA*.

Procedimento 3: Preparação da Reacção de Síntese da 1ª Cadeia cDNA

Neste procedimento são utilizados o Kit A (P/N 901293) e o Kit B (P/N 901298) para Síntese e Marcação de Transcriptos Affymetrix®.

Quadro 2: Definições do Termociclador para a Síntese da 1ª Cadeia cDNA

Passo / Método	Programa de incubação	Programa de incubação	Programa de manutenção	Volume da Reacção
Síntese da 1ª Cadeia de cDNA	42 °C durante 2 horas	4 °C durante 10 minutos	Manter a 4 °C	10 µL

Quadro 3: Preparação da Mistura-mãe da 1ª Cadeia

Componente	Volume de Mistura-mãe de trabalho suficiente para 1 reacção (V)	Volume de Mistura-mãe de trabalho suficiente para 1 reacção x 1,15 (V x 1,15)	Número de reacções pretendido (R)	Volume total necessário (V x 1,15) x R
Tampão de síntese da 1ª Cadeia	4 µL	4,6 µL		
Mistura de Enzima para síntese da 1ª Cadeia	1 µL	1,15 µL		
Controlo Poly-A diluído (do Procedimento 2)	1 µL	1,15 µL		
Volume total	6 µL	6,9 µL		

SUGESTÃO: Utilize um reagente de cada vez e, quando terminar, volte a guardá-lo no local adequado. Utilize um arrefecedor de bancada para transportar enzimas. Submeta a vórtice ligeiro e centrifugue cada reagente brevemente, incluindo a enzima, antes de adicionar à mistura-mãe.

- Ligue o termociclador, pelo menos 15 minutos antes de o utilizar.
- Prepare a Mistura-mãe da 1ª Cadeia à temperatura ambiente, de acordo com o Quadro 3.

3. Transfira o volume adequado de Controlo Poly-A diluído a partir do Procedimento 2 para a Mistura-mãe da 1ª Cadeia, de acordo com o Quadro 3.
4. Misture a Mistura-mãe da 1ª Cadeia submetendo a vórtice ligeiro. Centrifugue brevemente o tubo.
5. Adicione 6 µL da Mistura-mãe da 1ª Cadeia ao fundo dos poços da placa de 96 poços.
6. Adicione 4 µL do total de amostras de RNA aos poços adequados. Utilize um total de 100 a 1 000 ng por reacção; se o RNA total for inferior a 4 µL, adicione água sem nucleases até 4 µL. Misture com cuidado, pipetando para cima e para baixo várias vezes.
7. Cubra a placa com folha adesiva de alumínio, centrifugue a 370 x g durante 10 segundos à temperatura ambiente e, em seguida, incube utilizando o Programa de Síntese da 1ª Cadeia de cDNA. Utilize uma almofada de compressão e uma tampa aquecida.
8. Retire dentro dos 10 minutos de manutenção a 4 °C no final do programa e passe imediatamente ao *Procedimento 4: Preparação da Reacção de Síntese da 2ª Cadeia cDNA*.

Procedimento 4: Preparação da Reacção de Síntese da 2ª Cadeia cDNA.

Neste procedimento são utilizados o Kit A (P/N 901293) e o Kit B (P/N 901298) para Síntese e Marcação de Transcriptos Affymetrix®.

Quadro 4: Definições do Termociclador para a Síntese da 2ª Cadeia cDNA

Passo / Método	Programa de incubação	Programa de incubação	Programa de manutenção	Volume da Reacção
Síntese da 2ª Cadeia de cDNA	16 °C durante 1 hora	4 °C durante 10 minutos	Manter a 4 °C	30 µL

Quadro 5: Preparação da Mistura-mãe da 2ª Cadeia

Componente	Volume de Mistura-mãe de trabalho suficiente para 1 reacção (V)	Volume de Mistura-mãe de trabalho suficiente para 1 reacção x 1,10 (V x 1,10)	Número de reacções pretendido (R)	Volume total necessário (V x 1,10) x R
Tampão de síntese da 2ª Cadeia	18 µL	19,8 µL		
Mistura de Enzima para síntese da 2ª Cadeia	2 µL	2,2 µL		
Volume total	20 µL	22,0 µL		

SUGESTÃO: Utilize um reagente de cada vez e, quando terminar, volte a guardá-lo no local adequado. Utilize um arrefecedor de bancada para transportar enzimas. Submeta a vórtice ligeiro e centrifugue cada reagente, incluindo a enzima, antes de adicionar à mistura-mãe.

1. Prepare a Mistura-mãe da 2ª Cadeia à temperatura ambiente, de acordo com o Quadro 5. Misture submetendo a um vórtice ligeiro. Centrifugue brevemente o tubo.
2. Transfira 20 µL da Mistura-mãe de 2ª Cadeia para a parede lateral dos poços adequados.
3. Cubra a placa com folha adesiva de alumínio, centrifugue a 370 x g durante 10 segundos à temperatura ambiente e, em seguida, incube utilizando o Programa de Síntese da 2ª Cadeia de cDNA.

IMPORTANTE: Não utilize uma tampa aquecida para esta incubação.

4. Retire dentro dos 10 minutos de manutenção a 4 °C, no final do programa.
5. Passe imediatamente ao *Procedimento 5: Preparação da Reacção de Transcrição In Vitro (TIV)*.

Procedimento 5: Preparação da Reacção de Transcrição In Vitro (TIV)

Neste procedimento são utilizados o Kit A (P/N 901293) e o Kit B (P/N 901298) para Síntese e Marcação de Transcriptos Affymetrix®.

Quadro 6: Definições do Termociclador para a Reacção de TIV

Passo / Método	Programa de incubação	Programa de incubação	Programa de manutenção	Volume da Reacção
Reacção TIV	40 °C durante 16 horas*		Manter a 4 °C	60 µL

* O tempo de incubação é específico para 100 ng de RNA total. O tempo deve ser ajustado com base na quantidade de RNA total de partida utilizada nestes procedimentos

Quadro 7: Tempos de incubação recomendados

Quantidade de RNA total	Tempo de incubação recomendado
100 ng	16 horas
500 ng	4 a 8 horas
1 000 ng	2 a 4 horas

Quadro 8: Preparação da Mistura-mãe para TIV

Componente	Volumes de mistura-mãe de trabalho suficientes para:		Número pretendido de Reacções (R)	Volume total necessário (V x 1,10) x R
	1 Rxn (V)	1 Rxn x 1,10 (V x 1,10)		
Tampão para transcrição in-vitro	22 µL	24,2 µL		
Marcador de RNA	2 µL	2,2 µL		
Mistura de enzima para transcrição in-vitro	6 µL	6,6 µL		
Volume total	30 µL	33 µL		

SUGESTÃO: Retire o tubo de RNA marcado e deixe o conteúdo descongelar à temperatura ambiente.

1. Prepare a Mistura-mãe de TIV à temperatura ambiente, de acordo com o Quadro 8. Misture submetendo a um vórtice ligeiro. Centrifugue brevemente o tubo.
2. Transfira 30 µL da Mistura-mãe de TIV para a parede lateral de cada poço contendo 30 µL de reacção de 2ª Cadeia.
3. Incube a reacção de TVI de acordo com os Quadro 6 e 7. Utilize uma almofada de compressão e uma tampa aquecida.
4. Após a incubação, passe ao *Procedimento 6: Purificação do cRNA da reacção de TIV*.

Procedimento 6: Purificação do cRNA da Reacção de TIV

Neste procedimento utiliza-se o Kit A de Síntese e Marcação de Transcripto Affymetrix® (P/N 901293).

SUGESTÃO:

- Aliquote 400 µL de água sem nucleases num tubo de 1,5 mL sem nucleases. Este volume é suficiente para processar 8 reacções. Coloque a água sem nucleases a 60 °C durante, pelo menos, 10 minutos num bloco de calor.
- Adicione 12,6 mL de etanol a 100% à garrafa Tampão para Lavagem de Grânulos antes da primeira utilização, e misture por inversão.

1. Ligação do cRNA

- A. Agite suavemente o frasco com Grânulos Magnéticos para ressuspender quaisquer partículas magnéticas que possam ter assentado. Transfira 975 µL de grânulos magnéticos para o pequeno compartimento da depressão.
- B. Adicione 108 µL de Grânulos Magnéticos a cada amostra, misture e transfira para um poço separado de uma placa com fundo em U.
- C. Agite durante 2 minutos, à velocidade média, no agitador de placas.
- D. Desloque a placa para um suporte magnético e capture os grânulos magnéticos durante 5 a 10 minutos, até se formar um aglomerado e a solução ficar límpida.
- E. Depois de a solução ficar transparente, retire e rejeite o sobrenadante sem interferir com os grânulos.

2. Lavagem dos grânulos

- A. Transfira 4 mL de Tampão para Lavagem de Grânulos para o maior compartimento da depressão.
- B. Mantendo a placa num suporte magnético, adicione 200 µL de Solução de Lavagem de Grânulos, sem interferir com os grânulos. Incube durante 25 a 35 segundos à temperatura ambiente.
- C. Aspire o sobrenadante sem interferir com os grânulos e rejeite-o.
- D. Repita os passos 2A e 2B acima, mais uma vez.
- E. Deixe a placa secar ao ar durante 5 a 7 minutos, no suporte magnético. Não tape a placa.
- F. Retire a placa do suporte magnético.

3. Eluição do cRNA

IMPORTANTE: Quando utilizar uma pipeta de repetição, deixe ficar dois volumes suplementares de 30 µL: rejeite os primeiros 30 µL antes de adicionar as amostras e não utilize os últimos 30 µL da solução de eluição.

- A. Utilizando uma pipeta de repetição, adicione 30 µL de água sem nucleases pré-aquecida (60 °C) à parede lateral de cada poço sem interferir com o aglomerado.
- B. Cubra a placa com a tampa e transfira para o agitador. Agite a alta velocidade durante um minuto no agitador de placas.
- C. Verifique se o aglomerado está totalmente disperso. Desloque a placa para um suporte magnético e deixe os grânulos assentar durante 3 a 4 minutos. A solução deve ficar límpida, com todos os grânulos aglomerados contra o íman.
- D. Transfira 30 µL do sobrenadante, que contém o cRNA eluído, para um tubo PCR sem nucleases.
- E. Passe ao *Procedimento 7: Quantificação do cRNA*, ou armazenado a -80 °C.

Procedimento 7: Quantificação do cRNA

Consulte o Capítulo 2 do *Guia do Utilizador dos Reagentes para Estabelecimento do Perfil Genético Affymetrix®* (P/N 702749).

Utilize o rendimento ajustado do *Procedimento 8: Preparação da Reacção de Fragmentação do cRNA*.

Procedimento 8: Preparação da Reacção de Fragmentação do cRNA

Neste procedimento são utilizados Água sem Nucleases e Tampão de Fragmentação 5X do Kit A (P/N 901307) para Detecção de Transcripto.

Quadro 9: Configuração da Fragmentação no Termociclador

Passo / Método	Programa de incubação	Programa de incubação	Programa de manutenção	Volume da Reação
Fragmentação	94 °C durante 35 minutos	4 °C durante 10 minutos	Manter a 4 °C	30 µL

Quadro 10: Preparação da Reação de Fragmentação

Componente	Quantidade ou volume
cRNA	15 µg
Tampão de fragmentação 5 X	6 µL
Água sem nucleases	Variável; até perfazer 30 µL de volume final
Volume total	30 µL

1. Prepare a reação numa tira de tubos de 0,2 ml, de acordo com o Quadro 10, utilizando o rendimento de cRNA ajustado do Procedimento 7, para calcular o volume de cRNA necessário para adicionar 15 µg à reação de fragmentação.
2. Misture submetendo a vórtice suave e centrifugue brevemente para colher o conteúdo do fundo do tubo.
3. Incube no termociclador utilizando o método de fragmentação. Tape com a tampa aquecida.

Procedimento 9: Preparação do Cocktail de Hibridação Alvo

Neste procedimento são utilizados o Kit A (P/N 901307) e o Kit C (P/N 901312) para Detecção de Transcritos Affymetrix®.

Quadro 11: Preparação da Mistura-mãe de Hibridação

Componente	Volumes de Mistura-mãe de trabalho suficiente para 1 Probe Array (V)	Volumes de Mistura-mãe de trabalho suficiente para 1 Probe Array x 1,10 (V x 1,10)	Número de Probe Arrays pretendidos (R)	Volume total necessário (V x 1,10) x R	Concentração/Diluição Final
Oligo B2 (3 nM)	4,2 µL	4,62 µL			50 pM
Controlo de hibridação 20x (bioB, bioC, bioD, cre)	12,5 µL	13,75 µL			1,5, 5, 25 e 100 pM respectivamente
Mistura de hibridação 2x	125 µL	137,5 µL			1X
DMSO	25 µL	27,5 µL			10%
Água sem nucleases	58,3 µL	64,13 µL			
Volume total	225,0 µL	247,5 µL			

SUGESTÃO:

- ❑ Retire o Oligo B2 e o Controlo de Hibridação 20x do congelador e descongele à temperatura ambiente.
- ❑ O DMSO solidifica quando armazenado a 4 °C; certifique-se de que o reagente está totalmente descongelado antes de o utilizar.
- ❑ Defina a temperatura dos blocos de calor para 45 °C, 65 °C e 99 °C.

IMPORTANTE: É indispensável que os stocks de Controlo de Hibridação 20x sejam aquecidos a 65 °C durante 5 minutos, para ressuspender completamente o cRNA antes de aliquotar.

1. Prepare a Mistura-mãe de Hibridação à temperatura ambiente para 1 ou mais arrays, de acordo com o Quadro 11.
2. Aliquote 225 µL da Mistura-mãe de Hibridação num tubo de 1,5 mL sem nucleases.
3. Adicione 25 µL de cRNA fragmentado do Procedimento 8 para preparar o cocktail de hibridação para um probe array. A concentração final de cRNA no cocktail de hibridação é de 0,05 µg/µL.
4. Equilibre o probe array à temperatura ambiente, imediatamente antes de utilizar.
5. Aqueça o Cocktail de Hibridação até atingir 99 °C, durante 5 minutos, num bloco de calor.
6. Entretanto, humedea o probe array com 200 µL de Mistura de Pré-hibridação, enchendo-o através de uma das tampas.
7. Incube o probe array cheio de Mistura de Pré-hibridação a 45 °C, durante 10 minutos, a 60 rpm.
8. Transfira o Cocktail de Hibridação que foi aquecido no passo 5 acima, para um bloco de calor a 45 °C, durante 5 minutos.
9. Centrifugue o Cocktail de Hibridação à velocidade máxima durante 5 minutos, numa microcentrifuga, para recolher qualquer material insolúvel da mistura de hibridação.
10. Retire o array do forno de hibridação e retire a Mistura de Pré-hibridação. Volte a encher o array com o volume adequado do Cocktail de Hibridação clarificado, evitando o depósito de qualquer material insolúvel no fundo do tubo.
11. Coloque o probe array num forno de hibridação regulado para 45 °C. Rode a 60 rpm.
12. Hibride durante 17 ± 1 hora.

Para uso em diagnóstico in vitro.

P/N 703026 PT Rev. 1

© 2011 Affymetrix, Inc. Todos os direitos reservados. Affymetrix®, Axiom™, Command Console®, DMET™, GeneAtlas™, GeneChip®, GeneChip-compatible™, GeneTitan®, Genotyping Console™, myDesign™, NetAffx®, OncoScan™, Powered by Affymetrix™, Procarta®, e QuantiGene® são marcas comerciais ou marcas registadas da Affymetrix, Inc. Todas as outras marcas comerciais são propriedade dos respectivos proprietários.