

## Reactivos para análisis de perfil de expresión génica Affymetrix®



### Uso indicado

Para diagnóstico in vitro

Los reactivos para análisis de perfil de expresión génica Affymetrix® están indicados para la preparación de la diana marcada de ARN complementario a partir de ARN total purificado procedente de muestras de tejido clínicas frescas o congeladas para hibridación con micromatrices Affymetrix GeneChip®, y para la cuantificación de señales de fluorescencia de la diana marcada de ARN mediante el uso del sistema instrumental de micromatrices Affymetrix GeneChip®.

Estos productos están indicados para emplearse con ensayos de micromatrices Affymetrix GeneChip, autorizados independientemente por la FDA, que requieran utilizar reactivos para análisis de perfil de expresión génica Affymetrix.

Esta guía de consulta rápida está destinada únicamente a usuarios experimentados y es complementaria al documento Affymetrix® Gene Profiling Reagents User Guide (n.º de ref. 702749).

### Procedimiento 1: Configuración del termociclador

Los programas del termociclador empleados se enumeran en cada procedimiento de esta guía de consulta rápida.

Consulte el capítulo 2 del documento Affymetrix® Gene Profiling Reagents User Guide (n.º de ref. 702749).

### Procedimiento 2: Preparación de los controles de poli-A

Para este procedimiento se emplea el kit de control de ARN Affymetrix® (n.º de ref. 901285).

**Tabla 1: Dilución seriada de la solución madre de control de poli-A**

Cantidad inicial de ARN total	Dilución seriada				Volumen a adicionar al ARN total
	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	
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

En la tabla 1 se presenta la pauta para utilizar 100, 200, 500 ó 1000 ng de ARN total como producto de partida. Si la cantidad inicial de muestra es diferente de las indicadas aquí, deben calcularse las diluciones apropiadas que produzcan la misma concentración final de controles a los que se le ha adicionado poli-A.

**SUGERENCIA:** Para mantener la precisión y uniformidad al preparar las diluciones, evite pipetear soluciones cuyos volúmenes sean inferiores a 2 ml.

- Utilice la cuarta dilución (para 100 y 200 ng de ARN total) para preparar la solución descrita a continuación en el Procedimiento 3: Preparación de la reacción de síntesis de la 1.ª cadena de ADNc.

### Procedimiento 3: Preparación de la reacción de síntesis de la 1.ª cadena de ADNc

Para este procedimiento se emplean los kits A y B de síntesis y marcado de transcrito Affymetrix® (n.º de ref. 901293 y 901298, respectivamente).

**Tabla 2: Ajustes del termociclador para la síntesis de la 1.ª cadena de ADNc**

Paso / método	Programa de incubación	Programa de incubación	Programa de conservación	Volumen de reacción
Síntesis de la 1.ª cadena de ADNc	42 °C durante 2 horas	4 °C durante 10 minutos	Conservación a 4 °C	10 µl

**Tabla 3: Preparación de la mezcla maestra de la 1.ª cadena**

Componente	Volumen de mezcla maestra de trabajo suficiente para 1 reacción (V)	Volumen de mezcla maestra de trabajo suficiente para 1 reacción x 1,15 (V x 1,15)	Número deseado de reacciones (R)	Volumen total necesario (V x 1,15) x R
Tampón de síntesis de la 1.ª cadena (1 <sup>st</sup> -Strand Synthesis Buffer)	4 µl	4,6 µl		
Mezcla enzimática para síntesis de la 1.ª cadena (1 <sup>st</sup> -Strand Synthesis Enzyme Mix)	1 µl	1,15 µl		
Control de poli-A diluido (del procedimiento 2)	1 µl	1,15 µl		
<b>Volumen total</b>	<b>6 µl</b>	<b>6,9 µl</b>		

**SUGERENCIA:** Saque un reactivo a la vez y devuélvalo a su lugar apropiado de almacenamiento cuando termine de utilizarlo. Transporte las enzimas en una nevera portátil de laboratorio. Agite suavemente en un vórtice y centrifugue brevemente cada reactivo (incluida la enzima) a baja velocidad antes de añadirlo a la mezcla maestra.

1. Encienda el termociclador como mínimo 15 minutos antes de utilizarlo.
2. Prepare la mezcla maestra de la 1.ª cadena a temperatura ambiente según la tabla 3.
3. Transfiera el volumen apropiado de control de poli-A diluido (del procedimiento 2) a la mezcla maestra de la 1.ª cadena según la tabla 3.
4. Agite la mezcla maestra de la 1.ª cadena suavemente en un vórtice. Centrifugue el tubo brevemente a baja velocidad.
5. Añada 6 µL de mezcla maestra de la 1.ª cadena al fondo de los pocillos de una placa de 96 pocillos.
6. Añada 4 µL de muestras de ARN total a los pocillos correspondientes. Emplee un total de 100 a 1000 ng por reacción; si el volumen de la muestra de ARN total es menor de 4 µL, añada agua libre de nucleasas hasta obtener 4 µL. Aspire el líquido y expúlselo suavemente con la pipeta varias veces para mezclar su contenido.
7. Cubra la placa con papel de aluminio adhesivo, centrifúguela a 370 x g durante 10 segundos a temperatura ambiente e incúbela con el programa de síntesis de la 1.ª cadena de ADNc (*1<sup>st</sup>-Strand cDNA Synthesis*). Emplee una almohadilla de compresión y una tapa calentada.
8. Extraiga la placa en un plazo de 10 minutos de la conservación a 4 °C al final del programa y prosiga inmediatamente al *Procedimiento 4: Preparación de la reacción de síntesis de la 2.ª cadena de ADNc*.

## Procedimiento 4: Preparación de la reacción de síntesis de la 2.ª cadena de ADNc

Para este procedimiento se emplean los kits A y B de síntesis y marcado de transcrito Affymetrix® (n.º de ref. 901293 y 901298, respectivamente).

**Tabla 4: Ajustes del termociclador para la síntesis de la 2.ª cadena de ADNc**

Paso / método	Programa de incubación	Programa de incubación	Programa de conservación	Volumen de reacción
Síntesis de la 2.ª cadena de ADNc	16 °C durante 1 hora	4 °C durante 10 minutos	Conservación a 4 °C	30 µl

**Tabla 5: Preparación de la mezcla maestra de la 2.ª cadena**

Componente	Volumen de mezcla maestra de trabajo suficiente para 1 reacción (V)	Volumen de mezcla maestra de trabajo suficiente para 1 reacción x 1,10 (V x 1,10)	Número deseado de reacciones (R)	Volumen total necesario (V x 1,10) x R
Tampón de síntesis de la 2.ª cadena (2 <sup>nd</sup> -Strand Synthesis Buffer)	18 µl	19,8 µl		
Mezcla enzimática para síntesis de la 2.ª cadena (2 <sup>nd</sup> -Strand Synthesis Enzyme Mix)	2 µl	2,2 µl		
<b>Volumen total</b>	<b>20 µl</b>	<b>22,0 µl</b>		

**SUGERENCIA:** Saque un reactivo a la vez y devuélvalo a su lugar apropiado de almacenamiento cuando termine de utilizarlo. Transporte las enzimas en una nevera portátil de laboratorio. Agite suavemente en un vórtice y centrifugue brevemente cada reactivo (incluida la enzima) a baja velocidad antes de añadirlo a la mezcla maestra.

1. Prepare la mezcla maestra de la 2.ª cadena a temperatura ambiente según la tabla 5. Agite con suavidad en un vórtice y centrifugue el tubo brevemente a baja velocidad.
2. Transfiera 20 µL de mezcla maestra de la 2.ª cadena a la pared lateral los pocillos correspondientes.
3. Cubra la placa con papel de aluminio adhesivo nuevo, centrifúguela a 370 x g durante 10 segundos a temperatura ambiente e incúbela con el programa de síntesis de la 2.ª cadena de ADNc (*2<sup>nd</sup>-Strand cDNA Synthesis*).

**IMPORTANTE:** No utilice una tapa calentada para esta incubación.

4. Retire la placa en un plazo de 10 minutos de la conservación a 4 °C al final del programa.
5. Prosiga inmediatamente al *Procedimiento 5: Preparación de la reacción de transcripción in vitro (TIV)*.

## Procedimiento 5: Preparación de la reacción de transcripción in vitro (TIV)

Para este procedimiento se emplean los kits A y B de síntesis y marcado de transcrito Affymetrix® (n.º de ref. 901293 y 901298, respectivamente).

**Tabla 6: Ajustes del termociclador para la reacción de TIV**

Paso / método	Programa de incubación	Programa de incubación	Programa de conservación	Volumen de reacción
Reacción TIV	40 °C durante 16 horas*		Conservación a 4 °C	60 µl

\* El tiempo de incubación es específico para 100 ng de ARN total. El intervalo deberá ajustarse en función de la cantidad inicial de ARN total empleado en estos procedimientos.

**Tabla 7: Tiempos de incubación recomendados**

Cantidad de ARN total	Tiempo de incubación recomendado
100 ng	16 horas
500 ng	4 a 8 horas
1.000 ng	2 a 4 horas

**Tabla 8: Preparación de la mezcla maestra de TIV**

Componente	Volúmenes de mezcla maestra de trabajo suficientes para:		Número deseado de reacciones (R)	Volumen total necesario (V x 1,10) x R
	1 reacción (V)	1 reacción x 1,10 (V x 1,10)		
Tampón de transcripción in vitro (In Vitro Transcription Buffer)	22 µl	24,2 µl		
Marcador de ARN (RNA Label)	2 µl	2,2 µl		
Mezcla enzimática para transcripción in vitro (In Vitro Transcription Enzyme Mix)	6 µl	6,6 µl		
<b>Volumen total</b>	<b>30 µl</b>	<b>33 µl</b>		

**SUGERENCIA:** Extraiga el tubo de marcador de ARN y deje que su contenido se descongele a temperatura ambiente.

1. Prepare la mezcla maestra de TIV a temperatura ambiente según la tabla 8. Agite con suavidad en un vórtice y centrifugue el tubo brevemente a baja velocidad.
2. Transfiera 30 µl de mezcla maestra de TIV a la pared lateral de cada pocillo que contiene los 30 µl de la reacción de la 2.ª cadena.
3. Incube la reacción de TIV según las tablas 6 y 7. Emplee una almohadilla de compresión y una tapa calentada.
4. Después de la incubación, prosiga al *Procedimiento 6: Purificación del ARNc procedente de la reacción de TIV*.

### Procedimiento 6: Purificación del ARNc procedente de la reacción de TIV

Para este procedimiento se emplea el kit A de síntesis y marcado de transcrito Affymetrix® (n.º de ref. 901293).

**SUGERENCIA:**

- **Transfiera una alícuota de 400 µl de agua libre de nucleasas a un tubo de 1,5 ml libre de nucleasas. Este volumen es suficiente para procesar 8 reacciones. Caliente el agua libre de nucleasas a 60 °C durante al menos 10 minutos sobre un bloque térmico.**
- **Añada 12,6 ml de etanol al 100% al frasco de tampón de lavado de perlas antes del primer uso, y mezcle por inversión.**

#### 1. Unión del ARNc

- A. Agite suavemente el frasco de perlas magnéticas para resuspender cualquier partícula magnética que se haya sedimentado. Transfiera 975 µl de perlas magnéticas al compartimiento pequeño de la depresión.
- B. Añada 108 µl de perlas magnéticas a cada muestra, mezcle y transfiera a un pocillo aparte de una placa con fondo en U.
- C. Agite durante 2 minutos a velocidad media sobre un agitador de placas.
- D. Transfiera la placa a un soporte magnético y capture las perlas magnéticas durante 5 a 10 minutos, hasta que se forme un aglomerado y la solución esté transparente.
- E. Una vez que la solución esté transparente, aspire el sobrenadante y deséchelo sin perturbar las perlas.

#### 2. Lavado de las perlas

- A. Transfiera 4 ml del tampón de lavado de perlas al compartimiento grande de la depresión.
- B. Tras colocar la placa en un soporte magnético, añada a cada muestra 200 µl de solución de lavado de perlas (sin perturbar las perlas). Incube durante 25 a 35 segundos a temperatura ambiente.
- C. Sin perturbar las perlas, retire el sobrenadante por aspiración y deséchelo.
- D. Repita los pasos 2A y 2B anteriores una vez más.
- E. Deje que la placa se seque al aire unos 5 a 7 minutos sobre el soporte magnético. No cubra la placa.
- F. Retire la placa del soporte magnético.

#### 3. Elución del ARNc

**IMPORTANTE:** Cuando utilice la pipeta repetidora, tenga en cuenta dos volúmenes adicionales de 30 µl: deseche los primeros 30 µl antes de la adición a las muestras y no utilice los últimos 30 µl de la solución de elución.

- A. Con una pipeta repetidora, añada 30 µl de agua libre de nucleasas precalentada (60 °C) a la pared lateral de cada pocillo sin perturbar el aglomerado.
- B. Cubra la placa con la tapa y transfírela al agitador. Agítela a alta velocidad durante un minuto sobre el agitador de placas.
- C. Compruebe que el aglomerado esté completamente dispersado. Traslade la placa al soporte magnético y deje que las perlas se sedimenten durante 3 ó 4 minutos. La solución debe estar transparente y todas las perlas deben haberse aglomerado contra el imán.
- D. Transfiera 30 µl del sobrenadante (que contiene el ARNc eluido) a un tubo de PCR libre de nucleasas.
- E. Prosiga al *Procedimiento 7: Cuantificación del ARNc*; o bien, almacénelo a -80 °C.

### Procedimiento 7: Cuantificación del ARNc

Consulte el capítulo 2 del documento *Affymetrix® Gene Profiling Reagents User Guide* (n.º de ref. 702749).

Utilice el rendimiento ajustado en el *Procedimiento 8: Preparación de la reacción de fragmentación del ARNc*.

### Procedimiento 8: Preparación de la reacción de fragmentación del ARNc

Para este procedimiento se emplea agua libre de nucleasas y el tampón de fragmentación 5X procedente del kit de detección de transcrito A (n.º de ref. 901307).

**Tabla 9: Ajuste del termociclador para la fragmentación**

Paso / método	Programa de incubación	Programa de incubación	Programa de conservación	Volumen de reacción
Fragmentación	94 °C durante 35 minutos	4 °C durante 10 minutos	Conservación a 4 °C	30 µl

**Tabla 10: Preparación de la reacción de fragmentación**

Componente	Cantidad o volumen
ARNc (cRNA)	15 µg
Tampón de fragmentación 5x (5X Fragmentation Buffer)	6 µl
Agua libre de nucleasas (Nuclease-free water)	Variable; hasta obtener un volumen final de 30 µl
<b>Volumen total</b>	<b>30 µl</b>

1. Prepare la reacción en un tubo de tira de 0,2 ml según la tabla 10; utilice el rendimiento ajustado de ARNc obtenido del procedimiento 7 a fin de calcular el volumen de ARNc necesario para añadir 15 µg a la reacción de fragmentación.
2. Mezcle el contenido agitando el tubo con suavidad en un vórtice; centrifúguelo brevemente a baja velocidad para depositar el contenido en el fondo.
3. Incube en el termociclador siguiendo el método de fragmentación. Cubra con la tapa calentada.

## Procedimiento 9: Preparación de la mezcla de hibridación deseada

Para este procedimiento se emplean los kits A y C de detección de transcrito Affymetrix® (n.º de ref. 901307 y 901312, respectivamente).

**Tabla 11: Preparación de la mezcla maestra de hibridación**

Componente	Volúmenes de mezcla maestra de trabajo suficientes para una micromatriz (V)	Volúmenes de mezcla maestra de trabajo suficientes para una micromatriz 1,10 (V x 1,10)	Número deseado de micromatrices (R)	Volumen total necesario (V x 1,10) x R	Dilución/ concentración final
Oligo B2 (3 nM)	4,2 µl	4,62 µl			50 pM
Control de hibridación 20X (20X Hybridization Control) (bioB, bioC, bioD, cre)	12,5 µl	13,75 µl			1,5, 5, 25 y 100 pM respectivamente
Mezcla de hibridación 2X (2X Hybridization Mix)	125 µl	137,5 µl			1X
DMSO	25 µl	27,5 µl			10%
Agua libre de nucleasas (Nuclease-free water)	58,3 µl	64,13 µl			
<b>Volumen total</b>	<b>225,0 µl</b>	<b>247,5 µl</b>			

### SUGERENCIA:

- ❑ Extraiga el Oligo B2 y el control de hibridación 20X del congelador y descongélelos a temperatura ambiente.
- ❑ El DMSO se solidifica a 4 °C; asegúrese de que el reactivo esté completamente descongelado antes de utilizarlo.
- ❑ Fije las temperaturas de los bloques térmicos en 45, 65 y 99 °C.

**IMPORTANTE:** Es indispensable calentar los patrones del control de hibridación 20X a 65 °C durante 5 minutos para resuspender totalmente el ARNc antes de tomar las alícuotas.

1. Prepare la mezcla maestra de hibridación a temperatura ambiente para una o más micromatrices según la tabla 11.
2. Tome una alícuota de 225 µl de la mezcla maestra de hibridación y colóquela dentro de un tubo de 1,5 ml libre de nucleasas.
3. Añada 25 µl de ARNc fragmentado del procedimiento 8 a fin de preparar la mezcla de hibridación para una micromatriz. La concentración final del ARNc en la mezcla de hibridación es de 0,05 µg/µl.
4. Equilibre la micromatriz a temperatura ambiente inmediatamente antes de utilizarla.
5. Caliente la mezcla de hibridación a 99 °C durante 5 minutos en un bloque térmico.
6. Mientras tanto, humedezca la micromatriz con 200 µl de mezcla de prehibridación introducida a través de uno de los tapones.
7. Incube la micromatriz llena de mezcla de prehibridación a 45 °C durante 10 minutos a 60 rpm.
8. Coloque la mezcla de hibridación precalentada en el paso 5 sobre un bloque térmico a 45 °C durante 5 minutos.
9. Centrifugue la mezcla de hibridación a la velocidad máxima de la microcentrifuga durante 5 minutos, para depositar el material insoluble procedente de la misma.
10. Extraiga la micromatriz del horno de hibridación y retire la mezcla de prehibridación. Vuelva a llenar la matriz con el volumen apropiado de mezcla de hibridación clarificada, evitando recoger el material insoluble acumulado en el fondo del tubo.
11. Coloque la micromatriz en el horno de hibridación a 45 °C y hágala girar a 60 rpm.
12. Deje que la hibridación continúe durante 17 ± 1 horas.

### Para diagnóstico in vitro.

N.º de ref. 703026 ES Rev. 1

© 2011 Affymetrix, Inc. Reservados todos los derechos. Affymetrix®, Axiom™, Command Console®, DMET™, GeneAtlas™, GeneChip®, GeneChip-compatible™, GeneTitan®, Genotyping Console™, myDesign™, NetAffx®, OncoScan™, Powered by Affymetrix™, Procarta®, y QuantiGene® son marcas comerciales o registradas de Affymetrix, Inc. Todas las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivas compañías.