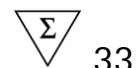


Håndbok for *ipsogen*[®] RT-sett



Versjon 1

IVD

In vitro-diagnostikk



REF

679923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3

MAT

1072504NO



QIAGEN prøve- og analyseteknologi

QIAGEN er den ledende leverandøren av innovativ prøve- og analyseteknologi som gjør det mulig å isolere og påvise innhold i enhver biologisk prøve. Våre avanserte høykvalitetsprodukter og -tjenester sikrer suksess fra prøve til resultat.

QIAGEN setter standarden når det gjelder:

- Rensing av DNA, RNA og proteiner
- Nukleinsyre- og proteinanalyser
- microRNA-forskning og RNAi
- Automatisering av prøve- og analyseteknologi

Vårt mål er å gjøre det mulig for deg å oppnå enestående suksess og gjennombrudd. Du finner mer informasjon på www.qiagen.com.

Innhold

Tiltenkt bruk	4
Sammendrag og forklaring	4
Prosedyreprinsipp	4
Materialer som medfølger	5
Settets innhold	5
Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger	6
Advarsler og forholdsregler	7
Generelle forholdsregler	7
Oppbevaring og håndtering av reagenser	8
Oppbevaring og håndtering av prøver	8
Prosedyre	9
Prøveklargjøring av RNA	9
Protokoll	
■ Revers transkriptase	9
Feilsøking	11
Kvalitetskontroll	11
Begrensninger	11
Ytelseskarakteristikker	11
Referanser	11
Symboler	12
Kontaktinformasjon	12
Bestillingsinformasjon	13

Tiltenkt bruk

ipsogen RT-settet muliggjør revers transkriptase av totalt RNA i molekylær diagnostisk testing.

Merk: Ytelseskarakteristikker for *ipsogen* RT-settet er kun blitt etablert med BCR-ABL Mbc- og ABL-transkriptaser. Brukeren er ansvarlig for å etablere aktuelle ytelseskarakteristikker for andre mål-transkriptaser.

Sammendrag og forklaring

Revers transkriptase av RNA er nødvendig når RNA skal kvantifiseres (f.eks. med RT-PCR eller RT-PCR i sanntid), eller en sekvens av RNA skal klones. Revers transkriptase brukes in vitro til syntese av første-tråd cDNA med RNA som utgangstemplat. Reaksjonens effektivitet er svært avhengig av kvaliteten og kvantiteten til RNA-utgangstemplatet. Det er viktig å ha intakt RNA som utgangstemplat. Selv spormengder av kontaminert RNase i RNA-prøven kan forårsake RNA-spaltning, noe som resulterer i forkortede cDNA-produkter. Kjemiske urenheter, for eksempel protein, poly-anioner (f.eks. heparin), salter, EDTA, etanol, fenol og andre løsemidler, kan påvirke aktiviteten og prosessiviteten til den reverse transkriptasen.

For å sikre reproduserbar og effektiv revers transkriptase er det viktig å bestemme kvaliteten og kvantiteten til RNA-utgangsmaterialet. For å få best mulig resultat anbefaler vi å begynne med RNA som er rensset ved hjelp av silica-gel-membran-teknologi. For eksempel kan QIAGEN® RNeasy® Mini-sett (kat. nr. 74104), eller RNeasy Midi-sett (kat. nr. 75144) brukes til å isolere RNA fra en rekke utgangsmaterialer og gi høykvalitets RNA som er svært egnet for bruk i revers transkriptase og RT-PCR-applikasjoner.

Prosedyreprinsipp

Revers transkriptase er et multifunksjonelt enzym med 3 distinkte enzymatiske aktiviteter: en RNA-avhengig DNA-polymerase, en hybridavhengig eksoribonuklease (RNase H) og en DNA-avhengig DNA-polymerase. In vivo vil kombinasjonen av disse 3 aktivitetene muliggjøre transkriptase av enkelttrådet RNA-genom til dobbelttrådet DNA for retroviral infeksjon. Den RNA-avhengige DNA-polymeraseaktiviteten (revers transkriptase) transkriberer cDNA fra et RNA-templat. Denne aktiviteten muliggjør cDNA-syntese for kloning, PCR og RNA-sekvensering.

Materialer som medfølger

Settets innhold

<i>ipsogen</i> RT Kit	(33)
Katalognr.	679923
Antall reaksjoner	33
Reverse Transcriptase (Revers transkriptase)	36 μ l
5x RT Buffer for reverse transcription (RT-buffer for revers transkriptase)	180 μ l
dNTP Mix* (dNTP-blanding)	72 μ l
Random Primer [†] (vilkårlig primer)	190 μ l
RNase Inhibitor (RNase-hemmer)	18 μ l
DTT [‡]	45 μ l
<i>ipsogen RT Kit Handbook</i> (engelsk)	1

* Deoksynukleotider 10 mM hver.

[†] Vilkårlig nonamer oligonukleotid.

[‡] Ditiotritol.

Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

Forbruksartikler

- Nukleasefrie, aerosol-resistente og sterile PCR-pipettespisser med vannavstøtende filtre
- 0,5 ml eller 0,2 ml RNase- og DNase-frie PCR-rør
- Is

Reagenser

- Nukleasefritt PCR-gradert vann
- Reagenser for 1,2 % formaldehyd agarosegel elektroforese

Utstyr

- Mikroliter pipetter* dedikert for PCR (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Bordsentrifuge* med rotor for 0,2 ml/0,5 ml reaksjonsrør (som kan oppnå 10 000 rpm)
- Spektralfotometer,* eller Agilent® BioAnalyzer®,* for RNA-kvantifisering
- Utstyr* for pulsfelt gelelektroforese
- Termosykler* eller vannbad* (revers transkriptase-trinn)

* Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

Advarsler og forholdsregler

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

Kast prøve- og analyseavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

Generelle forholdsregler

qPCR-tester krever god laboratoriepraksis, inkludert vedlikehold av utstyr som er dedikert til molekylærbiologi og i samsvar med gjeldende regelverk og relevante standarder.

Dette settet er beregnet til bruk i in vitro-diagnostikk. Reagenser og instruksjoner i dette settet er godkjent for optimal ytelse. Videre fortykning av reagensene eller endring av inkubasjonstider og -temperaturer kan føre til feilaktige eller diskordante data. Alle reagenser er satt sammen spesifikt for bruk med dette settet. Utstyret må ikke erstattes med andre produkter dersom optimal ytelse skal opprettholdes i prosedyren.

Å bestemme transkriptasenivåer ved hjelp av qPCR krever både revers transkriptase av mRNA og amplifikasjon av cDNA som ble generert av PCR. Derfor må hele analyseprosedyren utføres under RNase-/DNase-frie forhold.

Vær svært forsiktig med tanke på å forhindre:

- RNase-/DNase-kontaminering, som kan føre til degradering av mRNA-templatet og den genererte cDNA
- mRNA- eller PCR-overføringskontaminering som fører til falske positive signaler

Vi anbefaler derfor følgende:

- Bruk nukleasefritt laboratorieutstyr (f.eks. pipetter, pipettespisser, reaksjonsflasker) og hansker når du utfører analysen.
- Bruk nye aerosol-resistente pipettespisser for alle pipetteringstrinn for å unngå krysskontaminering av prøver og reagenser.
- Forbered pre-PCR Master Mix med dedikert materiale (pipetter, spisser osv.) i et dedikert område hvor ingen DNA-matriser (cDNA, DNA, plasmid) er innført. Legg templatet i en separat sone (fortrinnsvis i et separat rom) med spesifikt materiale (pipetter, spisser osv.).

Oppbevaring og håndtering av reagenser

Settet sendes på tørris og må lagres ved -30 °C til -15 °C etter mottak.

- Bland og sentrifuger rørene forsiktig før åpning.
- Oppbevar alle settkomponenter i originalemballasjen.

Disse oppbevaringsbetingelsene gjelder både åpne og uåpne komponenter. Komponenter som er lagret under andre betingelser enn de som er angitt på etikettene, fungerer ikke nødvendigvis som de skal, og kan påvirke analyse-resultatene i negativ retning.

Utløpsdatoer for hver reagens er angitt på de enkelte komponentenes etiketter. Under riktige oppbevaringsbetingelser vil produktet opprettholde ytelsen frem til utløpsdatoen som står på etiketten.

Oppbevaring og håndtering av prøver

Fullblodsprøver bør være antikoagulert med kalium-EDTA og lagret ved $2-8\text{ °C}$ i ikke mer enn 5 dager før RNA-ekstraksjon.

Prosedyre

Prøveklargjøring av RNA

RNA-ekstraksjon må utføres med en godkjent prosedyre (QIAGEN RNeasy Mini-sett, kat. nr. 74104 eller RNeasy Midi-sett, kat. nr. 75144; eller Life Technologies TRIzol[®], kat. nr. 15596-026 og 15596-018).

Utførelsen av en analyse er avhengig av konsentrasjonen og kvaliteten av input-RNA. Vi anbefaler derfor å kvalifisere det rensede RNA, før nedstrømsanalyser, ved hjelp av agarose*gel elektroforese, Agilent BioAnalyzer eller spektrofotometri.[†]

Protokoll: Revers transkriptase

Dette må du gjøre før du starter:

- Tin alle nødvendige komponenter og plasser dem på is.
- Bland innholdet i rørene godt (ikke vorteks) og sentrifuger kort (10 sekunder ved 10 000 rpm) for samle opp væsken på bunnen av rørene.
- Juster RNA-prøver til 0,1 µg/µl med nukleasefritt vann.

Merk: En ikke-templatkontroll (NTC) som genereres under revers transkriptase med nukleasefritt vann som template, kan brukes til å kontrollere kvaliteten på den reverse transkriptasen.

Prosedyre

1. Inkuber 1 µg av hver RNA-prøve som skal testes (10 µl) i 5 minutter ved 65 °C.
2. Kjøl umiddelbart på is i 5 minutter.
3. Sentrifuger kort (10 sekunder ved 10 000 rpm) for å samle væsken i bunnen av røret. Sett prøven på is.
4. Klargjør forblendingen til den reverse transkriptasen på is, og sett den på is (se tabell 1).

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier.

[†] Optisk tetthet målt ved 260 og 280 nm: OD av 1,0 ved 260 nm tilsvarer ca. 40 µg/ml enkelttrådet RNA. Et A_{260}/A_{280} forhold mellom 1,8 og 2,1 er et tegn på høyrenset RNA.

Tabell 1. Klargjøring av forblanding til revers transkriptase

Forblandingens komponenter	Volum per prøve (μl)*	Endelig konsentrasjon
5x buffer for revers transkriptase	5,0	1x
dNTP (10 mM hver)	2,0	0,8 mM
Vilkårlig nonamer (100 μ M)	5,25	21 μ M
RNase-hemmer (40 U/ μ l)	0,5	0,8 U/ μ l
Revers transkriptase (200 U/ μ l)	1,0	8 U/ μ l
DTT	1,25	–
Volum av RT-forblanding per prøve	15	

* Klargjør n + 1, der n er antall RNA-prøver

- 5. Bland forsiktig (ikke vorteks), sentrifuger kort og tilsett 15 μ l av forblendingen til hver RNA-prøve (for 40 ng/ μ l) og til vannkontrollen (NTC).**
- 6. Bland hvert rør forsiktig (ikke vorteks) og sentrifuger kort.**
- 7. Kjør programmet for revers transkriptase (se tabell 2) på en termosyklus.**

Tabell 2. Termosyklusens innstillinger for revers transkriptase

Revers transkriptase 1	25 grader i 10 min.
Revers transkriptase 2	50 grader i 60 min.
Inaktivering	85 grader i 5 min.
Kjøling	4 grader i 5 min.

- 8. Sentrifuger kort (10 sekunder ved 10 000 rpm) for å samle cDNA i bunnen av røret.**
- 9. Sett på is, eller oppbevar ved –20 °C, til qPCR er utført.**

Feilsøking

Hvis du ønsker informasjon om feilsøking for dette settet, se siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportcenter:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENs tekniske avdelinger er alltid klare til å svare på eventuelle spørsmål, enten det dreier seg om innholdet og protokollen i denne håndboken eller prøve- og analyse-teknologi (for kontaktinformasjon, se "Kontaktinformasjon", side 12).

Kvalitetskontroll

Dette settet er produsert i henhold til ISO 13485-standarden. Analysesertifikater er tilgjengelig på forespørsel på www.qiagen.com/support/.

Begrensninger

Brukerne må ha fått opplæring og være kjent med denne teknologien før denne enheten tas i bruk. Dette settet bør brukes i henhold til instruksjonene i denne håndboken, i kombinasjon med et godkjent instrument nevnt i "Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger", side 6.

Alle diagnostiske resultater som genereres, må tolkes i sammenheng med andre kliniske eller laboratoriske funn. Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse til andre prosedyrer som brukes i laboratoriet, som ikke dekkes av QIAGEN ytelsesevalueringsstudier.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene som er angitt på komponentenes esker og etiketter. Bruk ikke komponenter som er gått ut på dato.

Ytelseskarakteristikker

Ytelseskarakteristikker for *ipsogen* RT-settet er kun blitt etablert med BCR-ABL Mbc- og ABL-transkriptaser. Brukeren er ansvarlig for å etablere aktuelle ytelseskarakteristikker for andre mål-transkriptaser.

Hvis du ønsker mer informasjon om ytelseskarakteristikkene til *ipsogen* RT-settet, se Håndbok for *ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR DX-sett*, tilgjengelig på www.qiagen.com.

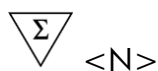
Referanser

QIAGEN opprettholder en stor, oppdatert elektronisk database med vitenskapelige publikasjoner som omhandler bruk av QIAGEN-produkter. Omfattende søkealternativer gjør at du kan finne de artiklene du har behov for, enten med et enkelt nøkkelordsøk eller ved å spesifisere applikasjonen, forskningsområdet, tittelen osv.

Du finner en fullstendig liste over referanser i QIAGENs referansedatabase på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller ved å ta kontakt med QIAGENs tekniske avdelinger eller den lokale distributøren.

Symboler

Følgende symboler kan vises på emballasjen og merkingen:



Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> reaksjoner



Skal brukes innen



Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk



Katalognummer



Partinummer (lot)



Materialnummer



Globalt artikkelnummer



Temperaturbegrensninger



Produsent



Se informasjonen i håndboken

Kontaktinformasjon

Hvis du ønsker teknisk assistanse eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support eller ringe 00800-22-44-6000 eller en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller www.qiagen.com).

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Katalognr.
<i>ipsogen</i> RT Kit (33)	Til 33 reaksjoner: Revers transkriptase, 5x RT-buffer, dNTP-blanding, vilkårlig primer, RNase-hemmer, DTT	679923
Rotor-Gene Q[®] MDx – for IVD-godkjent PCR-analyser i sanntid i kliniske applikasjoner		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR-sentrifuge i sanntid og apparat for HRM-analyser med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, ett års garanti på deler og arbeid, installasjon og opplæring ikke inkludert.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR-sentrifuge i sanntid og apparat for HRM-analyser med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, ett års garanti på deler og arbeid, installasjon og opplæring.	9002033

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsavklaringer, kan du se i den aktuelle håndboken for QIAGEN-settet eller i bruksanvisningen. Håndbøker og bruksanvisninger for QIAGEN-settet er tilgjengelig på www.qiagen.com eller kan leveres fra QIAGENs tekniske tjenester eller den lokale distributøren.

Denne siden skal være tom

Dette settet er beregnet til bruk i in vitro-diagnostikk. *ipsogen*-produkter kan ikke selges videre, modifiseres for videresalg eller brukes til å produsere kommersielle produkter uten skriftlig godkjenning fra QIAGEN.

Informasjon i dette dokumentet kan bli endret uten varsel. QIAGEN påtar seg ikke ansvar for noen feil som kan forekomme i dette dokumentet. Dette dokumentet er antatt å være komplett og korrekt ved utgivelsen. QIAGEN er under ingen omstendigheter ansvarlig for tilfeldige, spesielle eller flere skader eller følgeskader i forbindelse med, eller som resultat av bruken av dette dokumentet.

ipsogen-produkter er garantert å oppfylle de spesifikasjoner som er angitt. QIAGEN eneste forpliktelse og kundens eneste botemiddel er begrenset til vederlagsfri erstatning av produkter i tilfelle produktene ikke oppfyller garantien.

Dette produktet inneholder SuperScript® III Reverse Transcriptase som er gjenstand for en eller flere patenter eller patentsøknader i USA og tilsvarende ikke-amerikanske ekvivalenter, eid av Life Technologies Corporation, og solgt under avtale mellom Life Technologies Corporation og Ipsogen. Innkjøpsprisen for dette produktet inkluderer begrensede, ikke-overførbare rettigheter i henhold til de ovennevnte patentene. Bruk av denne produktmengden i henhold til nevnte patenter er begrenset til kjøperens aktiviteter innenfor måling av BCR-ABL p210-transkriptaser. Ingen andre rettigheter er overført, inkludert retten til å bruke dette produktet i etterforskning. Mer informasjon om å skaffe rettigheter i henhold til patenter eid av Life Technologies Corporation kan fås ved å ta kontakt med Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. (760) 603-7200. E-post: Outlicensing@lifetech.com.

Varemerker: QIAGEN®, *ipsogen*®, RNeasy®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); SuperScript® (Life Technologies Corporation); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); TRIZOL® (Molecular Research Center, Inc.).

Begrenset lisensavtale

Bruk av dette produktet innebærer at en kjøper eller bruker av *ipsogen* RT-settet samtykker i følgende vilkår:

1. *ipsogen* RT-Dx-settet kan bare brukes i samsvar med Håndbok for *ipsogen* RT-sett og bare til bruk med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine åndsprodukter til å bruke eller innlemme vedlagte komponenter i dette settet med komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i Håndbok for *ipsogen* RT-sett og flere protokoller som nå finnes på www.qiagen.com.
2. QIAGEN gir ingen garantier for at dette settet og/eller bruksområdene ikke krenker rettighetene til tredjeparter bortsett fra tydelig uttrykte lisenser.
3. Dette settet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydning, bortsett fra det som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i ikke å la noen andre gjøre noe som kan føre til handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, i enhver handling for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller noen av sine immaterielle rettigheter i forhold til settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN. Med enerett.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

