

Manual *ipsogen*[®] RT Kit



Versiunea 1

IVD

Diagnosticare in vitro



REF 679923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R3 **MAT** 1072504RO



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN este furnizor de top de tehnologii inovatoare pentru probe și teste, permițând izolarea și detecția conținutului oricărei probe biologice. Produsele și serviciile noastre avansate, de înaltă calitate, asigură succesul, de la prelevarea probei până la rezultat.

QIAGEN stabilește standarde în următoarele domenii:

- Purificarea ADN, ARN și a proteinelor
- Teste efectuate pe acizi nucleici și proteine
- Cercetare microARN și ARN de interferență
- Automatizarea tehnologiilor pentru probe și teste

Misiunea noastră este aceea de a vă permite să obțineți un succes excepțional și realizări ieșite din comun. Pentru mai multe informații, vizitați www.qiagen.com.

Cuprins

Domeniul de utilizare	4
Rezumatul și explicarea produsului	4
Principiul procedurii	4
Materiale furnizate	5
Conținutul kitului	5
Materiale necesare, dar nefurnizate	6
Avertismente și precauții	7
Precauții generale	7
Depozitarea și manipularea reactivilor	8
Manipularea și depozitarea probelor	8
Procedură	9
Prepararea ARN-ului pentru probă	9
Protocol: Transcriere inversă	9
Depanarea	11
Controlul calității	11
Limitări	11
Caracteristici de performanță	11
Referințe	11
Simboluri	12
Date de contact	12
Informații pentru comandă	13

Domeniul de utilizare

ipsogen RT Kit permite transcrierea inversă a ARN-ului total, care va fi utilizat în testarea pentru diagnosticare moleculară.

Notă: Caracteristicile de performanță pentru *ipsogen* RT Kit au fost stabilite numai cu transcriptiile BCR-ABL MbcR și ABL. Utilizatorul este responsabil pentru stabilirea caracteristicilor de performanță adecvate pentru alte transcriptii țintă.

Rezumatul și explicarea produsului

Transcrierea inversă a ARN-ului este necesară la cuantificarea ARN-ului (de exemplu, prin RT-PCR sau real-time RT-PCR) sau la clonarea unei secvențe de ARN. Revers-transcriptazele sunt utilizate in vitro pentru sinteza ADN-ului complementar pe prima catenă cu ARN ca șablon de pornire. Eficiența reacției depinde în mare măsură de calitatea și cantitatea șablonului de ARN de pornire. Este important să aveți ARN intact ca șablon de pornire. Chiar și cantitățile infime de RNaze contaminante în proba de ARN pot provoca scindarea ARN, rezultând produși scurtați de ADN complementar. Impuritățile chimice, cum ar fi proteine, poli-anioni (de exemplu, heparină), săruri, EDTA, etanol, fenol și alți solvenți, pot afecta activitatea și capacitatea de procesare a revers-transcriptazei.

Pentru a asigura o transcriere inversă reproductibilă și eficientă, este important să se determine calitatea și cantitatea ARN-ului de pornire. Pentru cele mai bune rezultate, vă recomandăm să începeți cu ARN purificat folosind tehnologia cu membrană de silicagel. De exemplu, QIAGEN® RNeasy® Mini Kit (nr. cat. 74104) sau RNeasy Midi Kit (nr. cat. 75144) poate fi utilizat pentru a izola ARN dintr-o varietate de materiale de pornire și pentru a oferi ARN de înaltă calitate foarte potrivit pentru utilizarea în aplicații de transcriere inversă și RT-PCR.

Principiul procedurii

Revers-transcriptaza este o enzimă multifuncțională cu 3 activități enzimatic distincte: o ADN polimerază dependentă de ARN, o exoribonuclează dependentă de hibrid (RNază H) și o ADN polimerază dependentă de ADN. In vivo, combinația acestor 3 activități permite transcrierea genomului ARN monocatenar în ADN dublu catenar pentru infecția retrovirală. Activitatea ADN-polimerazei dependentă de ARN (transcriere inversă) transcrie ADN complementar dintr-un șablon de ARN. Această activitate permite sinteza ADN-ului complementar pentru clonare, PCR și secvențierea ARN.

Materiale furnizate

Conținutul kitului

<i>ipsogen</i> RT Kit	(33)
Nr. de catalog	679923
Număr de reacții	33
Reverse Transcriptase (Revers-transcriptază)	36 µl
5x RT Buffer (tampon) pentru transcriere inversă	180 µl
dNTP Mix*	72 µl
Random Primer (Soluție de amorsare aleatorie) [†]	190 µl
RNase Inhibitor (Inhibitor de Rnază)	18 µl
DTT [‡]	45 µl
Manual <i>ipsogen RT Kit</i> (limba engleză)	1

* Deoxinucleotide câte 10 mM.

[†] Oligonucleotidă nonamer aleatorie.

[‡] Ditiotritol.

Materiale necesare, dar nefurnizate

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de siguranță (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

Consumabile

- Vârfuri de pipetă PCR sterile, fără nuclează, rezistente la aerosoli, cu filtre hidrofobe
- Tuburi PCR fără RNază și DNază de 0,5 sau 0,2 ml
- Gheață

Reactivi

- Apă de calitate PCR fără nuclează
- Reactivi pentru electroforeza în gel de agaroză și formaldehidă 1,2 %.

Echipamente

- Micropipete* dedicate pentru PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)
- Centrifugă de banc* cu rotor pentru eprubete de reacție de 0,2 ml/0,5 ml (capabile să atingă 10.000 rot/min)
- Spectrofotometru* sau Agilent® BioAnalyzer®* pentru cuantificarea ARN
- Echipament* pentru electroforeză în gel cu câmp pulsat
- Thermomixer, incubator orbital încălzit, bloc de încălzire sau baie de apă* (etapa de transcriere inversă)

* Asigurați-vă că instrumentele au fost verificate și calibrate în conformitate cu recomandările producătorului.

Avertismente și precauții

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online într-un format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa www.qiagen.com/safety, unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) a fiecărui kit și componente a kitului QIAGEN.

Aruncați deșeurile de probe și de test în conformitate cu reglementările locale de siguranță.

Precauții generale

Testările qPCR necesită bune practici de laborator, inclusiv întreținerea echipamentelor, care sunt dedicate biologiei moleculare și conforme cu reglementările aplicabile și standardele relevante.

Acest kit este destinat diagnosticării in vitro. Reactivii și instrucțiunile furnizate în acest kit au fost validate pentru performanțe optime. Diluarea ulterioară a reactivilor sau modificarea timpilor și temperaturilor de incubare poate genera date eronate sau discordante. Toți reactivii sunt formulați în mod special pentru utilizare cu acest kit. Pentru o performanță optimă a procedurii, nu trebuie făcute înlocuiri.

Determinarea nivelurilor de transcripții folosind qPCR necesită atât transcrierea inversă a ARNm, cât și amplificarea ADN-ului complementar generat prin PCR. Prin urmare, întreaga procedură a testului trebuie efectuată în condiții fără RNază/DNază.

Acordați o atenție extremă, pentru a preveni următoarele situații:

- Contaminarea cu RNază/DNază, care ar putea provoca degradarea ARNm-ului șablon și a ADN-ului complementar generat
- Contaminarea prin transfer de ARNm sau PCR, care are ca rezultat un semnal fals pozitiv

Prin urmare, recomandăm următoarele:

- Folosiți aparatură de laborator fără nuclează (de exemplu, pipete, vârfuri de pipetă, flacoane de reacție) și purtați mănuși când efectuați testul.
- Utilizați vârfuri de pipetă noi, rezistente la aerosoli, pentru toate etapele de pipetare pentru a evita contaminarea încrucișată a probelor și a reactivilor.
- Pregătiți amestecul Master Mix pre-PCR cu material dedicat (pipete, vârfuri etc.) într-o zonă dedicată, în care nu sunt introduse matrice ADN (ADN complementar, ADN, plasmidă). Adăugați șablonul într-o zonă separată (de preferință, într-o cameră separată) cu material specific (pipete, vârfuri etc.).

Depozitarea și manipularea reactivilor

Kitul este expediat pe gheață carbonică și trebuie depozitat între -30 și -15 °C la primire.

- Amestecați ușor și centrifugați tuburile înainte de deschidere.
- Depozitați toate componentele kitului în recipientele originale.

Aceste condiții de depozitare se aplică atât componentelor desfăcute, cât și celor nedesfăcute. Componentele depozitate în alte condiții decât cele menționate pe etichete pot să nu funcționeze corespunzător și pot afecta negativ rezultatele testului.

Datele de expirare pentru fiecare reactiv sunt indicate pe etichetele componentelor individuale. În condiții de depozitare corecte, produsul își va menține performanța până la data de expirare imprimată pe etichetă.

Manipularea și depozitarea probelor

Probele de sânge integral trebuie anticoagulate cu EDTA potasiu și păstrate la 2-8 °C timp de cel mult 5 zile înainte de extracția ARN.

Procedură

Prepararea ARN-ului pentru probă

Extracția ARN trebuie efectuată cu o procedură validată (QIAGEN RNeasy Mini Kit, nr. cat. 74104 sau RNeasy Midi Kit, nr. cat. 75144 sau Life Technologies TRIzol[®], nr. cat. 15596-026 și 15596-018).

Performanța unui test depinde de concentrația și calitatea ARN-ului de intrare. Prin urmare, recomandăm calificarea ARN-ului purificat, înainte de analiza în aval, prin electroforeză în gel de* agaroză, Agilent BioAnalyzer sau spectrofotometrie.†

Protocol: Transcriere inversă

Operațiuni care trebuie executate înainte de începere

- Decongelați toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.
- Amestecați bine conținutul tuburilor (nu vortexați) și centrifugați pentru scurt timp (10 s la 10.000 rot/min) pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului.
- Ajustați probele de ARN la 0,1 μg/μl cu apă fără nuclează.

Notă: O substanță de control fără șablon (No Template Control, NTC) generată în timpul transcrierii inverse folosind apă fără nuclează ca șablon poate fi utilizată pentru verificarea calității transcrierii inverse.

Procedură

1. Incubați câte 1 μg din fiecare probă de ARN care urmează să fie testată (10 μl) timp de 5 minute la 65 °C.
2. Răciți imediat pe gheață timp de 5 min.
3. Centrifugați pentru scurt timp (10 s la 10.000 rot/min), pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului. Păstrați pe gheață.
4. Preparați amestecul preliminar pentru transcriere inversă pe gheață și păstrați-l pe gheață (consultați Tabelul 1).

* Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate.

† Densitatea optică măsurată la 260 și 280 nm: Densitatea optică de la 1,0 la 260 nm este echivalentă cu aproximativ 40 μg/ml ARN monocatenar. Un raport A_{260}/A_{280} cuprins între 1,8 și 2,1 indică ARN ultra purificat.

Tabelul 1. Prepararea amestecului preliminar pentru transcriere inversă

Componentă amestec preliminar	Volum per probă (μl)*	Concentrație finală
5x soluție tampon revers-transcriptază	5,0	1x
dNTP (câte 10 mM)	2,0	0,8 mM
Nonamer aleatoriu (100 μM)	5,25	21 μM
Inhibitor de RNază (40 U/μl)	0,5	0,8 U/μl
Revers-transcriptază (200 U/μl)	1,0	8 U/μl
DTT	1,25	–
Volum de amestec preliminar RT per probă	15	

* Preparați n + 1, unde n este numărul de probe de ARN

- Amestecați cu grijă (nu vortexați), centrifugați pentru scurt timp și adăugați 15 μl de amestec preliminar în fiecare probă de ARN (la 40 ng/μl) și în substanța de control cu apă (No Template Control, NTC).
- Amestecați cu grijă fiecare tub (nu vortexați) și centrifugați pentru scurt timp.
- Rulați programul de transcriere inversă (consultați Tabelul 2) folosind un thermomixer, un incubator orbital încălzit, un bloc de încălzire sau o baie de apă.

Tabelul 2. Setări pentru transcriere inversă

Transcriere inversă 1	25 °C timp de 10 min
Transcriere inversă 2	50 °C timp de 60 min
Inactivare	85 °C timp de 5 min
Răcire	4 °C timp de 5 min

- Centrifugați pentru scurt timp (10 s la 10.000 rot/min), pentru a colecta ADN complementar în partea de jos a tubului.
- Păstrați pe gheață sau depozitați la –20 °C, până la efectuarea qPCR.

Depanarea

Pentru informații despre depanarea acestui kit, consultați pagina Întrebări frecvente din cadrul Centrului nostru pentru Asistență tehnică: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Cercetătorii din cadrul Serviciilor tehnice QIAGEN vă stau întotdeauna la dispoziție pentru a răspunde la orice întrebări pe care le aveți despre informațiile și protocolul din acest manual, precum și despre tehnologiile de prelevare și testare (pentru datele de contact, consultați „Date de contact”, pagina 12).

Controlul calității

Acest kit este fabricat conform standardului ISO 13485. Buletinele de analiză sunt disponibile la cerere, la adresa www.qiagen.com/support/.

Limitări

Utilizatorii trebuie să fie instruiți și familiarizați cu această tehnologie înainte de a utiliza acest dispozitiv. Acest kit trebuie utilizat cu respectarea instrucțiunilor din acest manual, împreună cu un instrument validat, menționat în „Materiale necesare, dar nefurnizate”, pagina 6.

Orice rezultate de diagnostic generate trebuie interpretate în coroborare cu alte rezultate clinice sau de laborator. Validarea performanței sistemului pentru orice proceduri utilizate în laborator care nu fac obiectul studiilor de performanță efectuate de QIAGEN constituie răspunderea utilizatorului.

Trebuie acordată atenție datelor de expirare tipărite pe cutia și pe etichetele tuturor componentelor. Nu utilizați componente expirate.

Caracteristici de performanță

Caracteristicile de performanță pentru *ipsogen* RT Kit au fost stabilite numai cu transcripțiile BCR-ABL Mbc și ABL. Utilizatorul este responsabil pentru stabilirea caracteristicilor de performanță adecvate pentru alte transcripții țintă.

Pentru informații suplimentare cu privire la caracteristicile de performanță ale *ipsogen* RT Kit, consultați Manualul *ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR DX Kit*, disponibil la www.qiagen.com.

Referințe

QIAGEN păstrează o bază de date online generoasă și actualizată, de publicații științifice privind utilizarea produselor QIAGEN. Opțiunile comprehensive de căutare vă permit să găsiți articolele necesare, fie prin intermediul unei căutări simple după cuvinte-cheie, fie prin specificarea aplicației, a domeniului de cercetare, a titlului etc.

Pentru o listă completă a referințelor, vizitați QIAGEN Reference Database online, la www.qiagen.com/RefDB/search.asp sau contactați Serviciile Tehnice QIAGEN sau distribuitorul local.

Simboluri

Pe ambalaj și pe etichete pot apărea următoarele simboluri:



Conține reactivi suficienți pentru <N> reacții



Data de expirare



Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro



Număr catalog



Număr de lot



Număr material



Număr de comercializare global articol



Limitări de temperatură



Producător



Consultați instrucțiunile de utilizare

Date de contact

Pentru asistență tehnică și informații suplimentare, consultați Centrul nostru pentru Asistență Tehnică la adresa www.qiagen.com/Support, apălați numărul de telefon 00800-22-44-6000 sau contactați Departamentele de Servicii Tehnice ale QIAGEN sau distribuitorii locali (a se vedea coperta a patra sau vizitați www.qiagen.com).

Informații pentru comandă

Produs	Cuprins	Nr. cat.
<i>ipsogen</i> RT Kit (33)	Pentru 33 de reacții: Revers-transcriptază, 5x RT buffer, amestec dNTP, Soluție de amorsare aleatorie, Inhibitor de RNază, DTT	679923
Rotor-Gene® Q MDx – pentru analiza real-time PCR validată de IVD în aplicații clinice		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclator pentru real-time PCR și analizor de topire la înaltă rezoluție cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalarea și instruirea nu sunt incluse	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclator pentru real-time PCR și analizor de topire la înaltă rezoluție cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalare și instruire	9002033

Pentru informații actualizate privind licențele și clauzele de declinare a răspunderii specifice produselor, consultați ghidul sau manualul de utilizare al kitului QIAGEN respectiv. Ghidurile și manualele de utilizare pentru kiturile QIAGEN sunt disponibile pe www.qiagen.com sau pot fi solicitate de la Serviciile tehnice QIAGEN sau distribuitorul dumneavoastră local.

Această pagină a fost lăsată necompletată în mod intenționat

Acest produs este destinat utilizării pentru diagnosticarea in vitro. Produsele *ipsogen* nu pot fi revândute, modificate pentru revânzare sau utilizate pentru fabricarea de produse comerciale fără aprobarea scrisă a companiei QIAGEN.

Informațiile din acest document fac obiectul modificării fără preaviz. QIAGEN nu își asumă nicio responsabilitate pentru eventualele erori care pot apărea în acest document. Se consideră că acest document este complet și exact în momentul publicării. În niciun caz, compania QIAGEN nu va fi răspunzătoare pentru niciun fel de daune incidente, speciale, multiple sau consecință în legătură cu sau care decurg din utilizarea acestui document.

Se garantează că produsele *ipsogen* întrunesc specificațiile declarate. Singura obligație a companiei QIAGEN și despăgubirea exclusivă a clientului se limitează la înlocuirea gratuită a produselor în cazul în care acestea nu funcționează conform garanției.

Acest produs conține SuperScript® III Reverse Transcriptase, care face obiectul unuia sau mai multor brevete SUA emise sau cereri de brevet SUA și echivalente corespunzătoare din afara SUA, deținute de Life Technologies Corporation și este vândut în baza unui acord între Life Technologies Corporation și Ipsogen. Prețul de achiziție al acestui produs include drepturi limitate, netransferabile, conform brevetelor de mai sus, de a utiliza această cantitate de produs pentru a practica revendicările din brevetele menționate exclusiv pentru activitățile cumpărătorului, de măsurare a transcripțiilor BCR-ABL p210. Nu sunt transmise alte drepturi, nici dreptul de a utiliza acest produs pentru aplicații de medicină legală. Mai multe informații despre achiziționarea drepturilor în baza brevetelor deținute de Life Technologies Corporation pot fi obținute contactând Departamentul de licențiere, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. (760) 603-7200. E-mail: Outlicensing@lifetech.com.

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

Acord de licență limitată

Utilizarea acestui produs implică acceptarea următoarelor clauze de către oricare cumpărător sau utilizator al *ipsogen* RT Kit:

1. *ipsogen* RT-Dx Kit poate fi utilizat numai în conformitate cu manualul *ipsogen RT Kit* și numai împreună cu componentele conținute în kit. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în acest kit cu orice componentă care nu este inclusă în acest kit, cu excepția celor descrise în manualul *ipsogen RT Kit* și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa www.qiagen.com.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că acest kit și/sau utilizarea (utilizările) acestuia nu încalcă drepturile terților.
3. Acest kit și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul kitului acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre acțiunile interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de kit și/sau componentele acestuia.

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgia ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazilia ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Danemarca ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finlanda ■ techservice-nordic@qiagen.com

Franța ■ techservice-fr@qiagen.com

Germania ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Irlanda ■ techservice-uk@qiagen.com

Italia ■ techservice-it@qiagen.com

Japonia ■ techservice-jp@qiagen.com

Coreea (de Sud) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxemburg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexic ■ techservice-mx@qiagen.com

Țările de Jos ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norvegia ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Suedia ■ techservice-nordic@qiagen.com

Elveția ■ techservice-ch@qiagen.com

Regatul Unit ■ techservice-uk@qiagen.com

SUA ■ techservice-us@qiagen.com

