

Manual de instruções do Kit *ipsogen*[®] RT



Versão 1

IVD

Diagnóstico *in vitro*



REF

679923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R3

MAT

1072504PT



Tecnologias de amostras e testes da QIAGEN

A QIAGEN é o principal fornecedor de tecnologias inovadoras de amostras e testes, permitindo isolar e detectar o conteúdo de qualquer amostra biológica. Os avançados produtos e serviços de alta qualidade da nossa empresa garantem o sucesso, desde a amostra até ao resultado.

A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:

- Purificação de ADN, ARN e proteínas
- Testes de ácidos nucleicos e proteínas
- Investigação em microRNA e RNAi
- Automatização de tecnologias de amostras e testes

A nossa missão permitir-lhe-á alcançar o sucesso, bem como resultados notáveis. Para mais informações, visite-nos em www.qiagen.com.

Índice

Utilização prevista	4
Resumo e explicação	4
Princípio do procedimento	4
Materiais fornecidos	5
Conteúdo do Kit	5
Materiais necessários mas não fornecidos	6
Advertências e precauções	7
Precauções gerais	7
Armazenamento e manuseamento de reagentes	8
Armazenamento e manuseamento de amostras	8
Procedimento	9
Preparação de amostras de ARN	9
Protocolo	
■ Transcrição reversa	9
Resolução de problemas	11
Controlo de qualidade	11
Limitações	11
Características de desempenho	11
Bibliografia	12
Símbolos	12
Informações de contacto	13
Informações para encomendar	14

Utilização prevista

O Kit *ipsogen* RT permite que seja utilizada transcrição reversa do ARN total em testes de diagnóstico molecular.

Nota: As características de desempenho do Kit *ipsogen* RT apenas foram estabelecidas com as transcrições BCR-ABL Mbcr e ABL. O utilizador é responsável pelo estabelecimento das características de desempenho apropriadas relativamente a outras transcrições alvo.

Resumo e explicação

É necessária a transcrição reversa do ARN ao quantificar ARN (por ex., por RT-PCR ou por RT-PCR em tempo real) ou na clonagem de uma sequência de ARN. São utilizadas transcriptases reversas *in vitro* para a síntese da primeira cadeia de cDNA (ADN complementar) com ARN como o modelo inicial. A eficácia da reacção é altamente dependente da qualidade e quantidade do modelo de ARN inicial. É importante que o ARN esteja intacto como modelo inicial. Mesmo quantidades residuais de RNases contaminantes na amostra de ARN poderá causar a clivagem do ARN, fazendo com que os produtos cDNA sejam encurtados. Impurezas químicas, tais como proteínas, polianiões (por ex., a heparina), sais, EDTA, etanol, fenol e outros solventes, podem afectar a actividade e processividade da transcriptase reversa.

Para assegurar uma transcrição reversa reprodutível e eficaz, é importante determinar a qualidade e quantidade do ARN inicial. Para se obter os melhores resultados, recomendamos que se comece com ARN purificado, utilizando a tecnologia de membrana de sílica-gel. Por exemplo, o Kit QIAGEN® RNeasy® Mini (ref.ª 74104) ou o Kit RNeasy Midi (ref.ª 75144) pode ser utilizado para isolar ARN de uma variedade de materiais iniciais e fornecer ARN de alta qualidade, altamente adequado para ser utilizado em transcrições reversas e aplicações RT-PCR.

Princípio do procedimento

A transcriptase reversa é uma enzima multifuncional com 3 actividades enzimáticas distintas: uma polimerase do ADN dependente do ARN, uma exoribonuclease híbrido dependente (RNase H) e uma polimerase do ADN dependente do ADN. Ao vivo, a combinação destas 3 actividades permite a transcrição do genoma do ARN de cadeia simples para ADN de cadeia dupla para infecção retroviral. A actividade de polimerase do ADN dependente do ARN (transcrição reversa) transcreve o cDNA de um modelo de ARN. Esta actividade permite a síntese do cDNA para clonagem, PCR e sequenciação do ARN.

Materiais fornecidos

Conteúdo do Kit

<i>ipsogen</i> RT Kit	(33)
Ref.^o	679923
Número de reacções	33
Reverse Transcriptase (Transcriptase reversa)	36 µl
5x RT Buffer for reverse transcription (5x Tampão de TR para transcrição reversa)	180 µl
dNTP Mix* (Mistura dNTP)	72 µl
Random Primer [†] (Iniciador aleatório)	190 µl
RNase Inhibitor (Inibidor de RNase)	18 µl
DTT [‡]	45 µl
<i>ipsogen RT Kit Handbook</i> (inglês)	1

* Desoxinucleósidos 10 mM cada.

[†] Oligonucleótido nonâmero aleatório.

[‡] Ditioneitol.

Materiais necessários mas não fornecidos

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (MSDS) apropriadas, disponíveis no fornecedor do produto.

Consumíveis

- Pontas de pipetas de PCR, estéreis, isentas de nuclease e resistentes a aerossóis, com filtros hidrófobos
- Tubos de PCR de 0,5 ml ou 0,2 ml isentos de RNase e DNase
- Gelo

Reagentes

- Água de qualidade para PCR isenta de nuclease
- Reagentes para electroforese em gel de agarose com formaldeído a 1,2%

Equipamento

- Pipetas microlitro* exclusivas para PCR (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Centrífuga de bancada* com rotor de tubos de reacção de 0,2 ml/0,5 ml (capaz de atingir 10.000 rpm)
- Espectofotómetro* ou Agilent® BioAnalyzer®*, para quantificação do ARN
- Equipamento* para electroforese em gel de campo pulsado
- Termociclador* ou banho-maria* (passo de transcrição reversa)

* Certifique-se de que os equipamentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Advertências e precauções

Para utilização em diagnóstico *in vitro*

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (MSDS) apropriadas. Estas estão disponíveis online no formato compacto e prático PDF em www.qiagen.com/safety, onde pode procurar, visualizar e imprimir as MSDS de cada kit QIAGEN e componente do kit.

Elimine as amostras e os desperdícios dos ensaios de acordo com os regulamentos de segurança locais.

Precauções gerais

Os testes de qPCR exigem boas práticas laboratoriais que incluem a manutenção do equipamento, que são dedicadas a biologia molecular e que estão em conformidade com os regulamentos aplicáveis e as normas relevantes.

Este kit destina-se a ser utilizado em diagnóstico *in vitro*. Os reagentes e as instruções fornecidos neste kit foram validados para um desempenho ideal. A diluição adicional dos reagentes ou a alteração dos tempos e temperaturas de incubação podem dar origem a dados erróneos ou discordantes. Todos os reagentes são formulados especificamente para utilização com este kit. Para se obter o desempenho ideal do procedimento, não devem ser efectuadas quaisquer substituições.

Para determinar os níveis de transcrição utilizando qPCR é necessário a transcrição reversa do mRNA e a amplificação do cDNA gerado por PCR. Por conseguinte, todo o procedimento do ensaio deverá ser executado em condições de isenção de RNase e DNase.

Tenha um cuidado extremo para evitar:

- Contaminação com RNase/DNase, que poderia causar a degradação do mRNA do modelo e do cDNA gerado
- Contaminação por carryover de mRNA ou PCR que originaria um sinal falso positivo

Por conseguinte, recomendamos o seguinte.

- Utilizar material de laboratório (por ex., pipetas, pontas de pipetas, frascos-ampola de reacção) isento de nuclease e usar luvas durante a realização do ensaio.
- Utilizar pontas de pipetas novas e resistentes a aerossóis em todas as fases de pipetagem para evitar a contaminação cruzada das amostras e reagentes.

- Preparar a mistura principal de pré-PCR com material exclusivo (pipetas, pontas, etc.) numa área dedicada onde não sejam introduzidas matrizes de ADN (cDNA, ADN, plasmídeo). Adicionar o modelo numa zona separada (preferencialmente numa sala em separado) com material específico (pipetas, pontas, etc.).

Armazenamento e manuseamento de reagentes

O kit é expedido em gelo seco e têm de ser conservado entre -30 °C e -15 °C após a recepção.

- Misture e centrifugue os tubos cuidadosamente antes de os abrir.
- Conserve todos os componentes do kit nos recipientes originais.

Estas condições de conservação aplicam-se tanto a componentes abertos como não abertos. Os componentes conservados noutras condições que não as indicadas nas etiquetas poderão não ter um desempenho apropriado e afectar negativamente os resultados do ensaio.

Os prazos de validade de cada reagente estão indicados nas etiquetas dos componentes individuais. Em condições de conservação correctas, o produto manterá o seu desempenho até ao prazo de validade impresso na etiqueta.

Armazenamento e manuseamento de amostras

As amostras de sangue total deverão ser anticoaguladas com EDTA de potássio e conservadas entre 2 e 8 °C durante um máximo de 5 dias antes da extracção do ARN.

Procedimento

Preparação de amostras de ARN

A extracção do ARN deverá ser efectuada com um procedimento validado (Kit QIAGEN RNeasy Mini, ref.^o 74104 ou Kit RNeasy Midi, ref.^o 75144; ou Life Technologies TRIzol[®], ref.^o 15596-026 e 15596-018).

O desempenho de um ensaio depende da concentração e qualidade do ARN de entrada. Por conseguinte, recomendamos a qualificação do ARN purificado antes da análise a jusante, por electroforese em gel de agarose*, Agilent BioAnalyzer ou espectrofotometria.†

Protocolo: Transcrição reversa

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Descongele todos os componentes necessários e coloque-os em gelo.
- Misture bem o conteúdo dos tubos (não misture com agitação forte) e centrifugue brevemente (10 segundos a 10.000 rpm) para recolher o líquido no fundo do tubo.
- Ajuste a concentração das amostras de ARN para 0,1 µg/µl com água isenta de nuclease.

Nota: Um controlo sem modelo (NTC) gerado durante uma transcrição reversa utilizando água isenta de nuclease como modelo, pode ser utilizado para verificar a qualidade da transcrição reversa.

Procedimento

1. **Faça a incubação de 1 µg de cada amostra de ARN a testar (10 µl) durante 5 minutos a 65 °C.**
2. **Arrefeça imediatamente em gelo durante 5 minutos.**
3. **Centrifugue com brevidade (10 segundos a 10.000 rpm) para recolher o líquido no fundo do tubo. Mantenha no gelo.**
4. **Prepare a pré-mistura da transcrição reversa em gelo, e mantenha-a no gelo (consulte a Tabela 1).**

* Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção.

† Densidade óptica medida a 260 e 280 nm: A DO de 1,0 a 260 nm é equivalente a aproximadamente 40 µg/ml de ARN de cadeia simples. Um rácio de A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,1 é um indicador de ARN altamente purificado.

Tabela 1. Preparação da pré-mistura da transcrição reversa

Componente da pré-mistura	Volume por amostra (μl)*	Concentração final
5x Tampão para transcrição reversa	5,0	1x
dNTP (10 mM cada)	2,0	0,8 mM
Nonâmero aleatório (100 μ M)	5,25	21 μ M
Inibidor de RNase (40 U/ μ l)	0,5	0,8 U/ μ l
Transcriptase reversa (200 U/ μ l)	1,0	8 U/ μ l
DTT	1,25	–
Volume de pré-mistura de TR por amostra	15	

* Prepare n + 1, em que n é o número de amostras de ARN

- 5. Misture cuidadosamente (não misture com agitação forte), centrifugue com brevidade e adicione 15 μ l de pré-mistura a cada amostra de ARN (para 40 ng/ μ l) e ao controlo de água (NTC).**
- 6. Misture cuidadosamente cada tubo (não misture com agitação forte) e centrifugue com brevidade.**
- 7. Execute o programa de transcrição reversa (consulte a Tabela 2) num termociclador.**

Tabela 2. Definições do termociclador para transcrição reversa

Transcrição reversa 1	25 graus durante 10 min.
Transcrição reversa 2	50 graus durante 60 min.
Inactivação	85 graus durante 5 min.
Arrefecimento	4 graus durante 5 min.

- 8. Centrifugue com brevidade (10 segundos a 10.000 rpm) para recolher o cDNA no fundo do tubo.**
- 9. Mantenha em gelo, ou armazene a -20 °C, até a qPCR ser executada.**

Resolução de problemas

Para informações sobre a resolução de problemas deste kit, consulte a página de perguntas mais frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a esclarecer quaisquer dúvidas que possa ter sobre as informações e protocolos constantes deste manual de instruções ou sobre as tecnologias de amostras e testes (para informações de contacto, consulte “

Informações de contacto”, na página 13).

Controlo de qualidade

Este kit é fabricado de acordo com a norma ISO 13485. Certificados de análise estão disponíveis quando solicitado através de www.qiagen.com/support/.

Limitações

Os utilizadores devem ter tido formação e estar familiarizados com esta tecnologia antes de utilizarem este dispositivo. Este kit deve ser utilizado seguindo as instruções constantes deste manual, em combinação com um equipamento validado indicado em “Materiais necessários mas não fornecidos”, na página 6.

Todos os resultados de diagnóstico gerados têm de ser interpretados em conjunto com outros achados clínicos ou laboratoriais. O utilizador é responsável por validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos utilizados no seu laboratório que não estejam cobertos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

Devem ser observados os prazos de validade impressos na caixa e nas etiquetas de todos os componentes. Não utilizar componentes fora do prazo de validade.

Características de desempenho

As características de desempenho do Kit *ipsogen* RT apenas foram estabelecidas com as transcrições BCR-ABL Mbc e ABL. O utilizador é responsável pelo estabelecimento das características de desempenho apropriadas relativamente a outras transcrições alvo.

Para mais informações relativamente às características de desempenho do Kit *ipsogen* RT, consulte o *Manual de instruções do Kit BCR-ABL1 Mbc IS-MMR DX ipsogen*, disponível em www.qiagen.com.

Bibliografia

A QIAGEN mantém uma vasta base de dados online actualizada de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem-lhe localizar os artigos de que necessita, quer através da pesquisa por uma única palavra-chave, quer especificando a aplicação, área de investigação, título, etc.

Para obter uma lista completa da bibliografia, visite a base de dados de referências da QIAGEN online em www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou contacte a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN.

Símbolos

Os seguintes símbolos poderão aparecer na embalagem e nas etiquetas:



Contém reagentes suficientes para <N> reacções



Prazo de validade



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*



Ref.^o



Número de lote



Número do material



Número do item de comércio mundial



Limites de temperatura



Fabricante



Consulte as instruções de utilização

Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico em www.qiagen.com/Support, ligue para 00800-22-44-6000 ou contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Informações para encomendar

Produto	Conteúdo	Ref. ^ª
<i>ipsogen</i> RT Kit (33)	Para 33 reacções: Transcriptase reversa, 5x tampão de TR, mistura dNTP, Iniciador aleatório, Inibidor de RNase, DTT	679923
Rotor-Gene Q[®] MDx — para análise PCR em tempo real validada por IVD em aplicações clínicas		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de Fusão de Alta Resolução (HRM) com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia das peças e do serviço da assistência; instalação e formação não incluídos	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de Fusão de Alta Resolução (HRM) com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia das peças e do serviço da assistência; instalação e formação	9002033

Para informações actualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consulte o respectivo manual de instruções do kit QIAGEN ou o manual do utilizador. Os manuais de instruções do kit QIAGEN e os manuais do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Este produto destina-se à utilização em diagnóstico *in vitro*. Os produtos *ipsogen* não podem ser revendidos, modificados para revenda ou utilizados para o fabrico de produtos comerciais sem a aprovação por escrito da QIAGEN.

As informações contidas neste documento estão sujeitas a alterações sem aviso prévio. A QIAGEN não se responsabiliza por quaisquer erros que possam aparecer neste documento. Considera-se este documento como completo e rigoroso no momento da sua publicação. Em caso algum poderá a QIAGEN ser considerada como responsável por danos acidentais, especiais, múltiplos ou consequenciais relacionados com ou decorrentes da utilização deste documento.

Garantimos que os produtos *ipsogen* cumprem as especificações indicadas. Caso os produtos não apresentem o desempenho garantido, a única obrigação da QIAGEN e a única compensação do cliente limitam-se à substituição dos produtos de forma gratuita.

Este produto contém SuperScript® III Reverse Transcriptase que está sujeito a uma ou mais patentes concedidas nos EUA ou pedidos de patente pendentes nos EUA e as respectivas equivalentes fora dos EUA, de propriedade da Life Technologies Corporation, e é vendido nos termos de um acordo assinado entre a Life Technologies Corporation e a Ipsogen. O preço da aquisição deste produto inclui direitos limitados, não transferíveis, nos termos das patentes acima mencionadas, para utilizar esta quantidade do produto para a prática do reivindicado em tais patentes, exclusivamente para actividades do comprador na medição de transcrições BCR-ABL p210. Não são transmitidos quaisquer outros direitos, incluindo o direito de utilização do produto em aplicações de tecnologia forense. Poderá obter mais informações sobre os direitos nos termos das patentes da propriedade da Life Technologies Corporation, entrando em contacto com o Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. (760) 603-7200. E-mail: Outlicensing@lifetech.com.

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

Contrato de Licença Limitada

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do Kit *ipsogen* RT:

1. O Kit *ipsogen* RT pode ser utilizado unicamente de acordo com o Manual de instruções do Kit *ipsogen* RT, e apenas para utilização com os componentes contidos no Kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede qualquer licença para utilizar ou incorporar os componentes contidos neste Kit com quaisquer componentes não incluídos neste Kit, excepto conforme descrito no Manual de instruções do Kit *ipsogen* RT e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com.
2. Salvo em licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não presta qualquer garantia de que este Kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinja(m) os direitos de terceiros.
3. Este Kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados nem ser objecto de revenda.
4. A QIAGEN não se responsabiliza especificamente por quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, salvo as expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do Kit concordam em não tomar medidas nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir ou proporcionar quaisquer dos actos proibidos acima mencionados. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao Kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença actualizados, consulte www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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

