

Manuale del kit *ipsogen*[®] RT



Versione 1

IVD

Diagnostica in vitro



REF

679923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R3

MAT

1072504IT



Tecnologie per campioni e analisi QIAGEN

QIAGEN è il leader mondiale nelle tecnologie per campioni e analisi destinate all'estrazione e alla purificazione di acidi nucleici a partire da qualsiasi campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi di alta qualità sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

QIAGEN pone nuovi standard:

- nella purificazione di DNA, RNA e proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca su microRNA e RNAi
- nelle tecnologie automatizzate per campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per maggiori informazioni, visitate il sito www.qiagen.com.

Contenuto

Uso previsto	4
Riassunto e spiegazione	4
Principio della procedura	4
Materiale fornito	5
Contenuto del kit	5
Materiale necessario ma non fornito	6
Avvertenze e precauzioni	7
Precauzioni generali	7
Conservazione e gestione dei reagenti	8
Conservazione e manipolazione dei campioni	8
Procedura	9
Preparazione dell'RNA campione	9
Protocollo: trascrizione inversa	9
Risoluzione dei problemi	11
Controllo di qualità	11
Limitazioni	11
Caratteristiche prestazionali	11
Riferimenti bibliografici	12
Simboli	12
Indirizzi utili	13
Informazioni per gli ordini	14

Uso previsto

Il kit *ipsogen* RT consente la trascrizione inversa dell'RNA totale da utilizzare per le analisi diagnostiche molecolari.

Nota: le caratteristiche prestazionali per il kit *ipsogen* RT sono state definite soltanto con i trascritti di BCR-ABL Mbcf e ABL. L'utente è responsabile della definizione di caratteristiche prestazionali appropriate per altri trascritti target.

Riassunto e spiegazione

La trascrizione inversa dell'RNA serve per la quantificazione dell'RNA (ad esempio, tramite RT-PCR o Real-time RT-PCR) e per la clonazione di una sequenza di RNA. Le trascrittasi inverse sono utilizzate in vitro per la sintesi della prima elica di DNA complementare (cDNA) come templatato di partenza. L'efficienza della reazione è fortemente influenzata dalla qualità e dalla quantità del templatato di RNA iniziale. È importante avere come templatato iniziale un RNA intatto. Tracce anche minime di RNasi contaminanti nel campione di RNA possono infatti causare la scissione dell'RNA e generare prodotti di cDNA più corti. Impurità chimiche come proteine, polianioni (ad esempio, l'eparina), sali, EDTA, etanoli, fenoli e altri solventi possono interferire con l'attività e la processività della trascrittasi inversa.

Per garantire una trascrittasi inversa efficiente e riproducibile, è importante determinare la qualità e la quantità dell'RNA iniziale. Per conseguire risultati ottimali, si consiglia di iniziare con RNA purificato utilizzando la tecnologia basata su una membrana di gel di silice. È ad esempio possibile utilizzare QIAGEN® RNeasy® Mini Kit (n° cat. 74104) o RNeasy Midi Kit (n° cat. 75144) per isolare l'RNA da svariati materiali e ottenere RNA di alta qualità, particolarmente idoneo all'uso nella trascrizione inversa e nelle metodiche RT-PCR.

Principio della procedura

La trascrittasi inversa è un enzima multifunzionale con 3 distinte attività enzimatiche: una DNA polimerasi RNA-dipendente, una esoribonucleasi ibrido-dipendente (RNasi H) e una DNA polimerasi DNA-dipendente. In vivo, la combinazione di queste 3 attività consente la trascrizione del genoma di RNA a singolo filamento nel DNA a doppio filamento per infezione retrovirale. L'attività di DNA-polimerasi RNA-dipendente (trascrizione inversa) trascrive il cDNA da un templatato di RNA. Questa attività consente la sintesi del cDNA a scopo di clonazione, PCR e sequenziamento dell'RNA.

Materiale fornito

Contenuto del kit

<i>ipsogen</i> RT Kit	(33)
N° di catalogo	679923
N° di reazioni	33
Reverse Transcriptase (Trascrittasi inversa)	36 μ l
5x RT Buffer for reverse transcription (5x Tampone RT per trascrizione inversa)	180 μ l
dNTP Mix* (Miscela dNTP)	72 μ l
Random Primer [†] (Primer Random)	190 μ l
RNase Inhibitor (Inibitore RNasi)	18 μ l
DTT [‡]	45 μ l
<i>ipsogen RT Kit Handbook</i> (inglese)	1

* Deossinucleotidi 10 mM cad.

[†] Oligonucleotide nonamero Random.

[‡] Ditiotreitolo.

Materiale necessario ma non fornito

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza sul prodotto (SDS) disponibili presso il fornitore.

Materiali di consumo

- Puntali per pipette per PCR sterili, resistenti alla contaminazione da aerosol, privi di nucleasi, con filtri idrofobici
- Provette per PCR da 0,5 ml o 0,2 ml prive di RNasi e DNasi
- Ghiaccio

Reagenti

- Acqua priva di nucleasi di grado PCR
- Reagenti per elettroforesi su gel di agarosio/formaldeide 1,2%

Attrezzatura

- Pipette a microlitri* dedicate per PCR (1-10 μ l; 10-100 μ l; 100-1000 μ l)
- Centrifuga da tavolo* con rotore per provette di reazione da 0,2 ml/0,5 ml (velocità fino a 10.000 rpm)
- Spettrofotometro* o Agilent® BioAnalyzer®,* per la quantificazione di RNA
- Apparecchiatura* per elettroforesi su gel in campo pulsato
- Termociclatore* o bagnomaria* (passaggio di trascrizione inversa)

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati controllati e calibrati nel rispetto delle istruzioni del produttore.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza sul prodotto (SDS). Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e di ogni componente del kit QIAGEN.

Smaltire campioni e materiali di scarto nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.

Precauzioni generali

Per effettuare i test qPCR, compresa la manutenzione dell'apparecchiatura, è necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio che sono specifiche per la biologia molecolare e sono conformi alle leggi e agli standard pertinenti.

Questo kit è destinato all'uso nella diagnostica in vitro. Le istruzioni e i reagenti forniti nel kit sono stati verificati e approvati per garantire prestazioni ottimali. L'ulteriore diluizione dei reagenti o la modifica dei tempi di incubazione e delle temperature potrebbe determinare dati errati o discordanti. Tutti i reagenti sono stati formulati specificamente per l'uso con questo kit. Per garantire prestazioni ottimali della procedura, evitare qualsiasi sostituzione.

La determinazione dei livelli di trascritti mediante qPCR comporta sia la trascrizione inversa dell'mRNA, sia l'amplificazione del cDNA generato dalla PCR. Di conseguenza l'intera procedura di analisi deve avvenire in totale assenza di RNasi/DNasi.

Prestare estrema attenzione al fine di evitare:

- Contaminazione da RNasi/DNasi, che potrebbe causare la degradazione dell'mRNA templato e del cDNA generato.
- Contaminazione da carryover di mRNA o PCR, che potrebbe determinare un segnale falso positivo.

Si consiglia quindi quanto segue:

- Utilizzare materiale di laboratorio privo di nucleasi (ad esempio pipette, puntali per pipette, fiale di reazione) e indossare i guanti durante l'esecuzione del test.
- Utilizzare puntali per pipette nuovi, resistenti alla contaminazione da aerosol, durante tutti i passaggi del pipettamento per evitare la contaminazione crociata di campioni e reagenti.
- Preparare la master mix pre-PCR con materiale (pipette, puntali e così via) usato solo per questo scopo in un'area usata solo per questo scopo, dove

non vengano introdotte matrici di DNA (DNA, plasmide). Aggiungere il template in un'area separata (preferibilmente in un'altra stanza) con materiale specifico (pipette, puntali e così via).

Conservazione e gestione dei reagenti

Il kit viene spedito in ghiaccio secco e, alla ricezione, deve essere conservato a una temperatura compresa tra -30°C e -15°C .

- Miscelare delicatamente e centrifugare le provette prima di aprirle.
- Conservare tutti i componenti del kit nei contenitori originali.

Le condizioni di conservazione indicate valgono sia per i componenti aperti, sia per quelli integri. I componenti conservati in condizioni diverse da quelle indicate sulle etichette potrebbero fornire prestazioni di qualità inferiore e compromettere i risultati del saggio.

Le date di scadenza dei reagenti sono indicate sull'etichetta dei singoli componenti. Se il prodotto viene conservato correttamente, mantiene inalterate le proprie prestazioni fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Conservazione e manipolazione dei campioni

I campioni di sangue intero devono essere conservati con anti-coagulante potassio EDTA a $2-8^{\circ}\text{C}$ per non più di 5 giorni prima dell'estrazione dell'RNA.

Procedura

Preparazione dell'RNA campione

L'estrazione dell'RNA deve essere eseguita con una procedura approvata (QIAGEN RNeasy Mini Kit, n° cat. 74104 o RNeasy Midi Kit, n° cat. 75144; o Life Technologies TRIzol[®], n° cat. 15596-026 e 15596-018).

Le prestazioni di un saggio dipendono dalla concentrazione e dalla qualità dell'RNA iniziale. Si consiglia pertanto di svolgere un'analisi qualitativa dell'RNA purificato, prima dell'analisi downstream, mediante elettroforesi su gel di agarosio*, Agilent BioAnalyzer o spettrofotometria.†

Protocollo: trascrizione inversa

Prima di iniziare

- Scongela tutti i componenti necessari e collocarli sul ghiaccio.
- Miscelare con cura il contenuto delle provette (non agitare in vortex) e agitare brevemente (10 secondi a 10.000 rpm) per raccogliere il liquido sul fondo della provetta.
- Regolare i campioni di RNA fino a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con acqua priva di nucleasi.

Nota: un controllo NTC che viene generato durante la trascrizione inversa utilizzando come template acqua priva di nucleasi potrà essere utilizzato per controllare la qualità della trascrizione inversa.

Procedura

1. **Incubare 1 μg di ogni campione di RNA da analizzare (10 μl) per 5 minuti a 65°C.**
2. **Raffreddare immediatamente su ghiaccio per 5 minuti.**
3. **Centrifugare brevemente (10 secondi a 10.000 rpm) per raccogliere il liquido sul fondo della provetta. Lasciare in ghiaccio.**
4. **Preparare la pre-miscela di trascrizione inversa in ghiaccio e lasciarla in ghiaccio (vedere la Tabella 1).**

* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi.

† Densità ottica (OD) misurata a 260 e 280 nm: una OD di 1,0 a 260 nm equivale a circa 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di RNA a filamento singolo. Un rapporto A_{260}/A_{280} tra 1,8 e 2,1 è indicativo di un RNA altamente purificato.

Tabella 1. Preparazione della pre-miscela di trascrizione inversa

Componente pre-miscela	Volume per campione (μl)	Concentrazione finale
5x Tampone Trascrittasi inversa	5,0	1x
dNTP (10 mM cad.)	2,0	0,8 mM
Nonamero Random (100 μ M)	5,25	21 μ M
Inibitore della RNasi (40 U/ μ l)	0,5	0,8 U/ μ l
Trascrittasi inversa (200 U/ μ l)	1,0	8 U/ μ l
DTT	1,25	–
Volume pre-miscela RT per campione	15	

* Preparare n + 1, dove n è il numero di campioni di RNA

5. **Miscelare con cura (non agitare in vortex), centrifugare brevemente e aggiungere 15 μ l di pre-miscela in ogni campione di RNA (per 40 ng/ μ l) e in ogni controllo di acqua (NTC).**
6. **Miscelare con cura ogni provetta (non agitare in vortex) e centrifugare brevemente.**
7. **Eseguire il programma di trascrizione inversa (vedere la Tabella 2) su un termociclatore.**

Tabella 2. Impostazioni del termociclatore per la trascrizione inversa

Trascrizione inversa 1	25 gradi per 10 minuti
Trascrizione inversa 2	50 gradi per 60 minuti
Inattivazione	85 gradi per 5 minuti
Raffreddamento	4 gradi per 5 minuti

8. **Centrifugare brevemente (10 secondi a 10.000 rpm) per raccogliere il cDNA sul fondo della provetta.**
9. **Lasciare in ghiaccio o conservare a -20°C , finché non viene eseguita la qPCR.**

Risoluzione dei problemi

Per informazioni sulla risoluzione di eventuali problemi con questo kit, consultare la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti del supporto tecnico QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante le informazioni e il protocollo descritto in questo manuale o le tecnologie relative a campioni e analisi (per le informazioni sui contatti, vedere “

Indirizzi utili”, pagina 13).

Controllo di qualità

Questo kit è prodotto in conformità allo standard ISO 13485. I certificati di analisi sono disponibili a richiesta sul sito www.qiagen.com/support/.

Limitazioni

Gli utenti del kit devono ricevere un’adeguata formazione e avere dimestichezza con questa tecnologia prima di iniziare ad utilizzare il dispositivo. Il kit deve essere utilizzato seguendo le istruzioni fornite nel presente manuale e in combinazione con uno strumento approvato (vedere elenco nella sezione “Materiale necessario ma non fornito”, pagina 6).

Tutti i risultati diagnostici che verranno generati dovranno essere interpretati unitamente ad altre rilevazioni cliniche o di laboratorio. È responsabilità dell’utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno studio di valutazione delle prestazioni da parte di QIAGEN.

Prestare attenzione alle date di scadenza stampate sulle confezioni e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti scaduti.

Caratteristiche prestazionali

Le caratteristiche prestazionali per il kit *ipsogen* RT sono state definite soltanto con i trascritti di BCR-ABL Mbc e ABL. L’utente è responsabile della definizione di caratteristiche prestazionali appropriate per altri trascritti target.

Per ulteriori informazioni sulle caratteristiche prestazionali del kit *ipsogen* RT, consultare il manuale *ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR DX Kit Handbook*, disponibile sul sito www.qiagen.com.

Riferimenti bibliografici

QIAGEN possiede un'ampia banca dati online che viene continuamente aggiornata con le pubblicazioni scientifiche riguardanti i prodotti QIAGEN. Opzioni di ricerca globali consentono di trovare gli articoli necessari sia per parole chiave, sia specificando l'applicazione, l'area di ricerca, il titolo e così via.

Per un elenco bibliografico completo, è possibile consultare online il QIAGEN Reference Database sul sito www.qiagen.com/RefDB/search.asp o contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:



Contenuto sufficiente per <N> reazioni



Utilizzare entro



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Numero di catalogo



Codice del lotto



Numero di materiale



Global Trade Item Number



Limiti di temperatura



Produttore



Fare riferimento alle informazioni fornite nel manuale

Indirizzi utili

Per l'assistenza tecnica e per ulteriori informazioni, è possibile visitare il sito del servizio di assistenza tecnica www.qiagen.com/Support, chiamare il numero 00800-22-44-6000 o contattare uno dei reparti del servizio tecnico QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o il sito www.qiagen.com).

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N° di catalogo
<i>ipsogen</i> RT Kit (33)	Per 33 reazioni: Trascrittasi inversa, 5x Tampone RT, miscela dNTP, primer Random, Inibitore di RNasi, DTT	679923
Rotor-Gene® Q MDx: per analisi PCR Real-time approvata per IVD in applicazioni cliniche		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclatore per PCR Real-time e analizzatore HRM (High Resolution Melt) con 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatile, software, accessori, garanzia di 1 anno sulle parti e su funzionalità, installazione e training non inclusi	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclatore per PCR Real-time e analizzatore HRM (High Resolution Melt) con 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatile, software, accessori, garanzia di 1 anno sulle parti e su funzionalità, installazione e training	9002033

Per le informazioni di licenza aggiornate e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico o il manuale utente. I manuali dei kit QIAGEN possono essere scaricati dal sito www.qiagen.com o richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al distributore locale.

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Questo prodotto è destinato all'uso diagnostico in vitro. I prodotti *ipsogen* non possono essere rivenduti, modificati per la rivendita o impiegati per la realizzazione di prodotti commerciali senza il consenso scritto di QIAGEN.

Le informazioni contenute in questo documento sono soggette a modifiche senza preavviso. QIAGEN declina qualsiasi responsabilità per eventuali errori contenuti in questo documento. Questo documento è considerato completo e accurato al momento della pubblicazione. In nessun caso QIAGEN potrà essere ritenuta responsabile di danni accidentali, particolari, multipli o secondari in relazione all'impiego di questo documento o derivanti da quest'ultimo.

I prodotti *ipsogen* sono garantiti conformi alle specifiche indicate. L'unico obbligo di QIAGEN - e l'unico rimedio a cui ha diritto il cliente - è la sostituzione gratuita dei prodotti in caso gli stessi non offrano le prestazioni richieste.

Questo prodotto contiene la Trascrittasi Inversa SuperScript® III, che è oggetto di uno o più brevetti USA o richieste di brevetto USA, nonché di omologhe richieste di brevetto al di fuori degli USA; è di proprietà di Life Technologies Corporation; e viene venduto nell'ambito di un contratto tra Life Technologies Corporation e Ipsogen. Il prezzo di acquisto del presente prodotto include diritti limitati, non trasferibili nell'ambito dei suddetti brevetti, all'uso del quantitativo di prodotto fornito per esercitare i diritti su suddetti brevetti esclusivamente con riferimento alle attività dell'acquirente relative alla misurazione dei trascritti di BCR-ABL p210. Non vengono concessi altri diritti, neppure il diritto all'uso di questo prodotto per applicazioni in medicina forense. Per ulteriori informazioni sull'acquisizione dei diritti nell'ambito dei brevetti di proprietà di Life Technologies Corporation, rivolgersi all'ufficio licenze: Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008 (USA). (760) 603-7200. E-mail: Outlicensing@lifetech.com.

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

Contratto di licenza limitata

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del kit *ipsogen RT* l'accettazione dei seguenti termini:

1. Il kit *ipsogen RT* può essere utilizzato esclusivamente in conformità al *Manuale del kit ipsogen RT* e solo con i componenti contenuti nel Kit stesso. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo Kit con qualsiasi componente non incluso in questo Kit, fatta eccezione per quanto dichiarato nel *Manuale del kit ipsogen RT* e per i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com.
2. Al di là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo Kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terze parti.
3. Questo Kit e i relativi componenti vengono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN nega espressamente qualsiasi altra licenza, esplicita o implicita, ad eccezione delle licenze espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del Kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere ad altri di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo Kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

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

