

# Manual del kit *ipsogen*<sup>®</sup> RT



Versión 1

**IVD**

Diagnóstico in vitro



**REF**

679923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

**R3**

**MAT**

1072504ES



## **QIAGEN: tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular**

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular que permiten el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad garantizan el éxito, desde la muestra hasta el resultado.

### **QIAGEN define los estándares en los siguientes campos:**

- Purificación de ADN, ARN y proteínas
- Ensayos de ácidos nucleicos y proteínas
- Investigación con microARN y ARNi
- Automatización de tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para obtener más información, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Contenido

<b>Uso previsto</b>	<b>4</b>
<b>Resumen y explicación</b>	<b>4</b>
<b>Principio del procedimiento</b>	<b>4</b>
<b>Materiales suministrados</b>	<b>5</b>
Contenido del kit	5
<b>Materiales requeridos pero no suministrados</b>	<b>6</b>
<b>Advertencias y precauciones</b>	<b>7</b>
Precauciones generales	7
<b>Almacenamiento y manipulación de reactivos</b>	<b>8</b>
<b>Manipulación y almacenamiento de muestras</b>	<b>8</b>
<b>Procedimiento</b>	<b>9</b>
Preparación del ARN de la muestra	9
Protocolo: transcripción inversa	9
<b>Guía de resolución de problemas</b>	<b>11</b>
<b>Control de calidad</b>	<b>11</b>
<b>Limitaciones</b>	<b>11</b>
<b>Características de rendimiento</b>	<b>11</b>
<b>Referencias</b>	<b>11</b>
<b>Símbolos</b>	<b>12</b>
<b>Información de contacto</b>	<b>12</b>
<b>Información para pedidos</b>	<b>13</b>

## Uso previsto

El kit *ipsogen* RT lleva a cabo la transcripción inversa del ARN total que debe utilizarse en las pruebas de diagnóstico molecular.

**Nota:** las características de rendimiento del kit *ipsogen* RT se han establecido únicamente con los transcritos BCR-ABL Mbc y ABL. Es responsabilidad del usuario establecer las características de rendimiento apropiadas para otros transcritos.

## Resumen y explicación

La transcripción inversa del ARN es necesaria para realizar la cuantificación del ARN (p. ej., mediante RT-PCR o RT-PCR en tiempo real) o la clonación de una secuencia de ARN. Las transcriptasas inversas se utilizan *in vitro* para llevar a cabo la síntesis de la primera cadena de cDNA con ARN como molde de inicio. La eficacia de la reacción depende en gran medida de la calidad y la cantidad del molde de ARN inicial. Es importante que el ARN del molde de inicio esté intacto. Incluso volúmenes escasos de RNAsas contaminantes en la muestra de ARN pueden provocar la escisión del ARN, lo que da lugar a fragmentos cortos de ADNc. Las impurezas químicas, como proteínas, polianiones (p. ej., la heparina), sales, EDTA, etanol, fenol y otros disolventes, pueden afectar la actividad y procesividad de la transcriptasa inversa.

Para garantizar la reproducibilidad y eficiencia de la transcripción inversa es fundamental determinar la calidad y la cantidad del ARN inicial. Se recomienda utilizar ARN purificado mediante la tecnología de membranas de gel de sílice para conseguir unos resultados óptimos. Por ejemplo, puede utilizarse los kits QIAGEN® RNeasy Mini® (n.º de referencia 74104) y RNeasy Midi (n.º de referencia 75144) para aislar ARN de una gran variedad de materiales de inicio para conseguir un ARN de alta calidad apto para su uso con aplicaciones de transcripción inversa y RT-PCR.

## Principio del procedimiento

La transcriptasa inversa es una enzima multifuncional con 3 actividades enzimáticas diferenciadas: ADN polimerasa dependiente de ARN, exorribonucleasa dependiente de cadena híbrida (RNasa H) y ADN polimerasa dependiente de ADN. En vivo, la combinación de estas 3 actividades permite llevar a cabo la transcripción del genoma de ARN monocatenario en ADN bicatenario para la infección retroviral. La actividad de la ADN polimerasa dependiente de ARN (transcripción inversa) transcribe el cADN del molde de ARN. Esta actividad permite sintetizar el cADN para la clonación, la PCR y la secuenciación de ARN.

## Materiales suministrados

### Contenido del kit

<b><i>ipsogen</i> RT Kit</b>	<b>(33)</b>
<b>N.º de referencia</b>	<b>679923</b>
<b>Número de reacciones</b>	<b>33</b>
Reverse Transcriptase (Transcriptasa inversa)	36 $\mu$ l
5x RT Buffer for reverse transcription (Tampón RT 5x para transcripción inversa)	180 $\mu$ l
dNTP Mix* (Mezcla dNTP)	72 $\mu$ l
Random Primer <sup>†</sup> (Primer aleatorio)	190 $\mu$ l
RNase Inhibitor (Inhibidor RNasa)	18 $\mu$ l
DTT <sup>‡</sup>	45 $\mu$ l
<i>ipsogen RT Kit Handbook</i> (inglés)	1

\* Deoxinucleótidos 10 mM cada uno.

<sup>†</sup> Oligonucleótido nonúmero aleatorio.

<sup>‡</sup> Ditioneitol.

## Materiales requeridos pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos correspondientes sobre seguridad (SDS), que puede solicitar al proveedor del producto.

### Consumibles

- Puntas de pipeta para PCR estériles, libres de nucleasas, resistentes a aerosoles y con filtros hidrófobos
- Tubos para PCR exentos de DNAsa y RNasa de 0,5 ml o 0,2 ml
- Hielo

### Reactivos

- Agua exenta de nucleasas de calidad PCR
- Reactivos para electroforesis en gel de agarosa con formaldehído al 1,2%

### Equipo

- Pipetas de microlito\* exclusivas para la PCR (1-10  $\mu$ l; 10-100  $\mu$ l; 100-1.000  $\mu$ l)
- Centrífuga de mesa\* con rotor para tubos de reacción de 0,2 ml/0,5 ml (capaz de alcanzar 10.000 rpm)
- Espectrofotómetro\* o equipo Agilent® BioAnalyzer®\* para la cuantificación de ARN
- Equipo\* para electroforesis en gel de campo pulsado
- Termociclador\* o baño de agua\* (para el paso de la transcripción inversa)

\* Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

# Advertencias y precauciones

Para uso de diagnóstico in vitro

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos correspondientes sobre seguridad (SDS). Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN.

Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los requisitos de seguridad local.

## Precauciones generales

Las pruebas de Q-PCR exigen la adopción de buenas prácticas de laboratorio que cumplan los reglamentos vigentes y las normas aplicables, específicas para laboratorios de biología molecular, entre ellas el buen mantenimiento del equipo.

Este kit está concebido para diagnóstico in vitro. Los reactivos y las instrucciones suministrados con este kit han sido validados para ofrecer un rendimiento óptimo. La dilución excesiva de los reactivos o un cambio en los tiempos y las temperaturas de incubación pueden causar resultados erróneos o dispares. Todos los reactivos están formulados de manera específica para su utilización con este kit. Se recomienda no sustituir ningún componente para garantizar un rendimiento óptimo.

La determinación de los niveles de transcrito mediante la técnica de qPCR implica la transcripción inversa de ARNm y la amplificación mediante PCR del cADN generado. Es por este motivo que todo el procedimiento del ensayo debe realizarse sin presencia de RNasas/DNasas.

Tenga la máxima precaución para evitar:

- Contaminación por RNasa/DNasa, que podría degradar el ARNm molde y, por consiguiente, el cADN generado.
- La contaminación por arrastre del ARNm o de los productos de la PCR, que podría producir señales positivas falsas.

Por lo tanto, se recomienda lo siguiente:

- Utilizar material de laboratorio (como pipetas, puntas de pipeta, tubos de reacción) libre de nucleasas y llevar guantes cuando se realice el ensayo.
- Utilizar puntas de pipeta resistentes a los aerosoles nuevas en todos los pasos del pipeteado para evitar la contaminación cruzada entre las muestras y los reactivos.

- Preparar la premezcla maestra (master mix) para PCR con el material específico (pipetas, puntas, etc.) en una zona delimitada donde no se introduzcan matrices de ADN (cADN, ADN, plásmidos). Añadir los moldes de ADN en una zona aislada (preferiblemente una sala independiente) con material específico (pipetas, puntas, etc.).

## **Almacenamiento y manipulación de reactivos**

El kit se envía en hielo seco, pero debe conservarse entre  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  tras su recepción.

- Mezcle suavemente los tubos y centrifúgelos antes de abrirlos.
- Guardar todos los componentes del kit en los envases originales.

Estas condiciones de almacenamiento se aplican a los componentes abiertos y a los no abiertos. El incumplimiento de las condiciones de almacenamiento de los componentes que aparecen indicadas en las etiquetas podría afectar negativamente a los resultados del ensayo.

La fecha de caducidad de cada reactivo figura en las etiquetas de cada componente. Si se almacena adecuadamente, el producto conserva las características de rendimiento hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

## **Manipulación y almacenamiento de muestras**

Las muestras de sangre total deben anticoagularse con EDTA de potasio y almacenarse a  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un máximo de 5 días antes de extraer el ARN.

# Procedimiento

## Preparación del ARN de la muestra

La extracción de ARN debe realizarse mediante un procedimiento validado (kits QIAGEN RNeasy Mini, n.º de referencia 74104, o RNeasy Midi, n.º de referencia 75144; o Life Technologies TRIzol<sup>®</sup>, n.º de referencia 15596-026 y 15596-018).

El rendimiento de un ensayo depende de la concentración y la calidad del ARN inicial. Por lo tanto, se recomienda cualificar el ARN purificado antes de iniciar el análisis mediante técnicas de electroforesis en gel de agarosa\* o espectrofotometría o con el equipo Agilent BioAnalyzer.<sup>†</sup>

## Protocolo: transcripción inversa

### Antes de comenzar

- Descongele todos los componentes necesarios y colóquelos en hielo.
- Mezcle el contenido de los tubos (no mediante vórtice) y centrifúguelos brevemente (10 segundos a 10.000 rpm) para depositar el líquido en el fondo del tubo.
- Prepare muestras de ARN de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con agua exenta de nucleasas.

**Nota:** puede utilizar como molde un control sin molde (NTC) generado durante la transcripción inversa con agua exenta de nucleasas para comprobar la calidad de la transcripción inversa.

### Procedimiento

1. **Incube 1  $\mu\text{g}$  de cada muestra de ARN que deba analizarse (10  $\mu\text{l}$ ) durante 5 minutos a 65 °C.**
2. **Enfríelas inmediatamente en hielo durante 5 minutos.**
3. **Centrifúguelas brevemente (10 segundos a 10.000 rpm) para depositar el líquido en el fondo del tubo. Consérvelas en hielo.**
4. **Prepare y conserve la premezcla de la transcripción inversa en hielo (véase la tabla 1).**

\* Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras.

<sup>†</sup> Densidad óptica (OD) medida a 260 y 280 nm: una OD de 1,0 a 260 nm es equivalente a aproximadamente 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ARN monocatenario. Un cociente  $A_{260}/A_{280}$  comprendido entre 1,8 y 2,1 indica un ARN de purificación de alta calidad.

**Tabla 1. Preparación de la premezcla de la transcripción inversa**

<b>Componente de la premezcla</b>	<b>Volumen por muestra (<math>\mu</math>l)*</b>	<b>Concentración final</b>
Tampón 5x para transcriptasa inversa	5,0	1x
dNTP (10 mM cada uno)	2,0	0,8 mM
Nonámero aleatorio (100 $\mu$ M)	5,25	21 $\mu$ M
Inhibidor de RNasa (40 U/ $\mu$ l)	0,5	0,8 U/ $\mu$ l
Transcriptasa inversa (200 U/ $\mu$ l)	1,0	8 U/ $\mu$ l
DTT	1,25	
<b>Volumen de premezcla de RT por muestra</b>	<b>15</b>	

\* Prepare  $n + 1$ , donde  $n$  es el número de muestras de ARN.

5. **Mezcle con cuidado (no mediante vórtice), centrifugue brevemente y añada 15  $\mu$ l de la premezcla a cada muestra de ARN (for 40 ng/ $\mu$ l) y al control de agua (NTC).**
6. **Mezcle cada tubo con cuidado (no mediante vórtice) y centrifúguelo brevemente.**
7. **Ejecute el programa de transcripción inversa (véase la tabla 2) en un termociclador.**

**Tabla 2. Configuración para la transcripción inversa**

<b>Transcripción inversa 1</b>	25° durante 10 min
<b>Transcripción inversa 2</b>	50° durante 60 min
<b>Inactivación</b>	85° durante 5 min
<b>Enfriamiento</b>	4° durante 5 min

8. **Centrifugue brevemente (10 segundos a 10.000 rpm) para depositar el cADN en el fondo del tubo.**
9. **Consérvelos en hielo o almacénelos a -20 °C hasta que se realice la qPCR.**

## Guía de resolución de problemas

Para obtener información sobre la resolución de problemas de este kit, consulte la página de Preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions) de nuestro Centro de Servicio Técnico (Technical Support Center): [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información y el protocolo de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en “Información de contacto”, en la página 12).

## Control de calidad

Este kit se ha fabricado con arreglo a la norma ISO 13485. Los certificados de los análisis pueden solicitarse desde [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Limitaciones

Antes de utilizar este dispositivo, los usuarios deben recibir la formación pertinente y estar familiarizados con esta tecnología. Este kit debe utilizarse de acuerdo con las instrucciones recogidas en este manual, junto con un equipo validado especificado en “Materiales requeridos pero no suministrados”, en la página 6.

La interpretación de los resultados de diagnóstico obtenidos debe realizarse en combinación con otros resultados clínicos o de laboratorio. Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema con los procedimientos utilizados en cada laboratorio que no estén contemplados en los estudios de rendimiento de QIAGEN.

Debe prestar especial atención a las fechas de caducidad impresas en las cajas y etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados.

## Características de rendimiento

Las características de rendimiento del kit *ipsogen* RT se han establecido únicamente con los transcritos BCR-ABL MbcR y ABL. Es responsabilidad del usuario establecer las características de rendimiento apropiadas para otros transcritos.

Para obtener más información sobre las características de rendimiento del kit *ipsogen* RT, consulte el manual de uso del kit *ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit Handbook*, disponible en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Referencias

QIAGEN mantiene una extensa base de datos en línea y actualizada de publicaciones científicas en las que se utilizan los productos de QIAGEN.

Sus exhaustivas opciones de búsqueda permiten al usuario encontrar los artículos que necesita, ya sea mediante la búsqueda sencilla con una palabra clave o especificando la aplicación, el área de investigación, el título, etc.

Para obtener una lista bibliográfica completa, visite la base de datos bibliográfica en línea de QIAGEN en [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) o póngase en contacto con los servicios técnicos de QIAGEN o con su distribuidor local.

## Símbolos

El embalaje y las etiquetas pueden incluir los siguientes símbolos:



Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones



Fecha de caducidad



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



N.º de referencia



Número de lote



Número de material



Número mundial de artículo comercial



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar las instrucciones de uso

## Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visite nuestro Centro de servicio técnico en el sitio [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), llame al 00800-22-44-6000, póngase en contacto con uno de los departamentos del servicio técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
<i>ipsogen</i> RT Kit (33)	Para 33 reacciones: Reverse transcriptase, 5x RT buffer, dNTP mix, Random primer, RNase Inhibitor, DTT	679923
<b>Rotor-Gene® Q MDx: para el análisis de PCR en tiempo real validado para IVD en aplicaciones clínicas</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM® Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de fusión de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí) más un canal HRM, equipo portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de fusión de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí) más un canal HRM, equipo portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de usuario o el manual de uso del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Este producto está destinado para el Diagnóstico in Vitro. Los productos *ipsogen* no deben ser revendidos, modificados para reventa ni utilizados para fabricar otros productos comerciales sin autorización por escrito de IPSOGEN.

La información del presente documento puede ser modificada sin previo aviso. QIAGEN no asume ninguna responsabilidad por los errores que puedan aparecer en este documento. Este documento se considera íntegro y exacto en el momento de su publicación. QIAGEN declina toda responsabilidad por daños fortuitos, especiales, múltiples o derivados del uso de este documento.

Se garantiza que los productos *ipsogen* cumplen las especificaciones indicadas. La única obligación de QIAGEN y la única compensación al cliente se limitan a la sustitución de los productos sin cargo en el caso de que estos no funcionen de acuerdo a la garantía.

Este producto contiene SuperScript® III Reverse Transcriptase, objeto de una o más patentes de los Estados Unidos o de aplicaciones pendientes de patente en los Estados Unidos, así como de sus equivalentes en el extranjero, propiedad de Life Technologies Corporation, y se comercializa por vigor de un acuerdo entre Life Technologies Corporation e Ipsogen. El precio de compra de este producto incluye derechos limitados no transferibles regidos por las patentes mencionadas anteriormente para utilizar este volumen de producto en las reclamaciones de dichas patentes únicamente para las actividades del comprador para medir los transcritos BCR-ABL p210. No se proporciona ningún otro derecho, como el de utilizar el producto para aplicaciones forenses. Puede obtener información sobre la adquisición de derechos derivados de las patentes propiedad de Life Technologies Corporation poniéndose en contacto con el departamento Licensing Department de Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. (760) 603-7200. Correo electrónico: [Outlicensing@lifetech.com](mailto:Outlicensing@lifetech.com).

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

### **Acuerdo de licencia limitada**

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del kit *ipsogen RT* la aceptación de los siguientes términos:

1. El kit *ipsogen RT* debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con el *Manual del kit ipsogen RT* y sólo para uso con los componentes que se incluyen en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en estos kits con componentes no incluidos en los mismos, excepto según se describe en el *Manual del kit ipsogen RT* y en protocolos adicionales disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits ni su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Estos kits y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de las costas judiciales, incluidos los honorarios de abogacía, por cualquier acción emprendida para garantizar el cumplimiento de este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual con relación a este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, reservados todos los derechos.

---

**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

