

# Manuel du kit *ipsogen*<sup>®</sup> RT



Version 1

**IVD**

Diagnostic in vitro



**REF**

679923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

**R3**

**MAT**

1072504FR



# Technologies d'échantillonnage et de dosage QIAGEN

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillonnage et de dosage permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services avancés de haute qualité garantissent le succès, de l'échantillon jusqu'au résultat.

## **QIAGEN fixe les normes en matière de :**

- Purification d'ADN, d'ARN et de protéines
- Dosages d'acides nucléiques et de protéines
- Recherche micro-ARN et ARNi
- Automatisation des technologies d'échantillonnage et de dosage

Notre mission consiste à permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Contenu

<b>Utilisation prévue</b>	<b>4</b>
<b>Résumé et explication</b>	<b>4</b>
<b>Principe de la procédure</b>	<b>4</b>
<b>Matériel fourni</b>	<b>5</b>
Contenu du kit	5
<b>Matériel nécessaire mais non fourni</b>	<b>6</b>
<b>Avertissements et précautions</b>	<b>7</b>
Précautions générales	7
<b>Stockage et manipulation des réactifs</b>	<b>8</b>
<b>Stockage et manipulation des prélèvements</b>	<b>8</b>
<b>Procédure</b>	<b>9</b>
Préparation des échantillons ARN	9
Protocole	
■ Transcription inverse	9
<b>Guide de dépannage</b>	<b>11</b>
<b>Contrôle qualité</b>	<b>11</b>
<b>Limitations</b>	<b>11</b>
<b>Caractéristiques des performances</b>	<b>11</b>
<b>Références</b>	<b>11</b>
<b>Symboles</b>	<b>12</b>
<b>Coordonnées</b>	<b>12</b>
<b>Pour commander</b>	<b>13</b>

## Utilisation prévue

Le kit *ipsogen* RT permet la transcription inverse de l'ARN total à utiliser dans les tests diagnostics moléculaires.

**Remarque** : les caractéristiques de performances du kit *ipsogen* RT ont été établies uniquement avec les transcrits BCR-ABL MbcR et ABL. L'utilisateur est responsable de l'établissement des caractéristiques de performances appropriées pour les autres transcrits cibles.

## Résumé et explication

La transcription inverse de l'ARN est requise pour la quantification de l'ARN (par exemple par RT-PCR ou RT-PCR en temps réel) ou pour le clonage d'une séquence d'ARN. Les transcriptases inverses sont utilisées *in vitro* pour la synthèse du premier brin d'ADNc avec l'ARN comme matrice de départ. L'efficacité de la réaction dépend largement de la qualité et de la quantité de la matrice d'ARN de départ. Il est essentiel d'avoir de l'ARN intact comme matrice de départ. Des quantités même infimes de RNases contaminantes dans l'échantillon d'ARN peuvent entraîner la division d'ARN, ce qui donnera des produits ADNc réduits. Les impuretés chimiques comme les protéines, les polyanions (par exemple l'héparine), les sels, l'EDTA, l'éthanol, le phénol et d'autres solvants peuvent affecter l'activité et le processus de la transcriptase inverse.

Pour garantir une transcription inverse reproductible et efficace, il est important de déterminer la qualité et la quantité d'ARN de départ. Pour de meilleurs résultats, nous recommandons de commencer avec de l'ARN purifié à l'aide d'une technologie de membrane en gel de silicone. Par exemple, le kit QIAGEN® RNeasy® Mini (n° réf. 74104) ou le kit RNeasy Midi (n° réf. 75144) peuvent être utilisés pour isoler l'ARN à partir d'une variété de matériaux de départ et pour produire de l'ARN de qualité adapté à une utilisation pour les applications de transcription inverse et de RT-PCR.

## Principe de la procédure

La transcriptase inverse est une enzyme multifonctionnelle comportant 3 activités enzymatiques distinctes : une polymérase d'ADN ARN-dépendante, une exoribonucléase hybride-dépendante (RNase H) et une polymérase ADN ADN-dépendante. *In vivo*, la combinaison de ces trois activités permet la transcription du génome d'ARN simple brin en ADN double brin pour les infections rétrovirales. L'activité de polymérase ADN ARN-dépendante (transcription inverse) transcrit l'ADNc à partir d'une matrice d'ARN. Cette activité permet la synthèse de l'ADNc à des fins de clonage, de PCR et de séquençage de l'ARN.

## Matériel fourni

### Contenu du kit

<b><i>ipsogen</i> RT Kit</b>	<b>(33)</b>
<b>N° de référence</b>	<b>679923</b>
<b>Nombre de réactions</b>	<b>33</b>
Reverse Transcriptase (transcriptase inverse)	36 µL
5x RT Buffer for reverse transcription (5 x tampons RT pour la transcription inverse)	180 µL
dNTP Mix* (mélange dNTP)	72 µL
Random Primer† (amorce aléatoire)	190 µL
RNase Inhibitor (inhibiteur de RNase)	18 µL
DTT‡	45 µL
<i>ipsogen RT Kit Handbook</i> (en anglais)	1

\* Désoxynucléotides de 10 mM chacun.

† Oligonucléotide nonamère aléatoire.

‡ Dithiothréitol.

## Matériel nécessaire mais non fourni

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

### Consommables

- Cônes de pipette pour PCR avec filtre hydrophobe, stériles, exempts de nucléase et aérosol-résistants
- Tubes de PCR sans RNase et DNase de 0,5 ou 0,2 mL
- Glace

### Réactifs

- Eau exempte de nucléase pour PCR
- Réactifs pour électrophorèse sur gel contenant 1,2 % d'aragose formaldéhyde

### Équipement

- Micropipettes\* conçues pour la PCR (1–10  $\mu$ L ; 10–100  $\mu$ L ; 100–1 000  $\mu$ L)
- Centrifugeuse de paillasse\* avec rotor pour tubes de réaction de 0,2 mL/0,5 mL (capable d'atteindre 10 000 tr/min)
- Spectrophotomètre\* ou BioAnalyzer® Agilent®\* pour la quantification de l'ARN
- Équipement pour l'électrophorèse par gel en champ pulsé
- Thermocycleur\* ou bain-marie (pour l'étape de transcription inverse)

\* S'assurer que les instruments ont été vérifiés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

# Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

Jeter les échantillons et les tests usagés conformément aux réglementations de sécurité locales.

## Précautions générales

Les tests de qPCR nécessitent de bonnes pratiques de laboratoire, incluant la maintenance de l'équipement, spécifiques à la biologie moléculaire et en accord avec les réglementations applicables et les normes pertinentes.

L'utilisation de ce kit est destinée au diagnostic in vitro. Les réactifs et les instructions fournis dans ce kit ont été validés pour obtenir des performances optimales. Des dilutions supplémentaires des réactifs ou une modification des temps d'incubation et des températures peuvent engendrer des données aberrantes ou erronées. Tous les réactifs sont formulés spécifiquement pour être utilisés dans le cadre de ce kit. Aucune substitution ne doit être faite pour garantir les performances optimales de la procédure.

La détermination des niveaux de transcripts à l'aide de la qPCR demande à la fois la transcription inverse de l'ARNm et l'amplification de l'ADNc généré par PCR. De ce fait, toute la procédure du test doit être réalisée dans des conditions sans RNase/DNase.

Prendre des précautions afin de prévenir :

- Les contaminations par RNase/DNase, qui peuvent entraîner une dégradation de la matrice d'ARNm et de l'ADNc généré.
- Les contaminations par ARNm ou les contaminations croisées par les produits de PCR, qui peuvent générer des signaux faux positifs.

Nous recommandons par conséquent :

- D'utiliser des consommables exempts de nucléase (par ex. pipettes, cônes, tubes) et de porter des gants lors de l'expérience.
- D'utiliser de nouveaux cônes aérosol-résistants à toutes les étapes de pipetage pour éviter les contaminations croisées des échantillons et des réactifs.
- De préparer le pré-mélange pour PCR avec du matériel dédié (pipettes, cônes...) dans une zone où aucune matrice d'ADN (ADNc, ADN,

plasmides) n'est introduite. D'ajouter les échantillons dans une zone séparée (de préférence dans une autre pièce) avec du matériel spécifique (pipettes, cônes, etc.).

## **Stockage et manipulation des réactifs**

Les kits sont expédiés sur un lit de carboglace et doivent être stockés entre -30 °C et -15 °C à réception.

- Mélanger doucement et centrifuger les tubes avant leur ouverture.
- Stocker tous les composants du kit dans leur contenant original.

Ces conditions de stockage s'appliquent aux composants ouverts ou non. Tous les composants stockés dans des conditions autres que celles mentionnées sur l'étiquetage peuvent ne pas fonctionner correctement et affecter les résultats des tests.

Les dates de péremption de chaque réactif sont mentionnées sur les étiquettes individuelles de chaque composant. Dans des conditions de stockage adéquates, le produit conservera ses performances jusqu'à la date imprimée sur l'étiquetage.

## **Stockage et manipulation des prélèvements**

Les échantillons de sang entier doivent être anti-coagulés avec du potassium EDTA et conservés entre 2 et 8 °C pendant moins de 5 jours avant l'extraction de l'ARN.

## Procédure

### Préparation des échantillons ARN

L'extraction d'ARN doit être effectuée en suivant une procédure validée (kit QIAGEN RNeasy Mini, n° réf. 74104 ou kit RNeasy Midi, n° réf. 75144 ; ou Life Technologies TRIzol®, n° réf. 15596-026 et 15596-018).

Les performances d'un test dépendent de la concentration et de la qualité de l'ARN utilisé. Nous recommandons ainsi la qualification de l'ARN purifié avant l'analyse, par électrophorèse du gel d'aragose\*, BioAnalyzer Agilent ou spectrophotométrie.†

### Protocole : transcription inverse

#### À effectuer avant de commencer

- Décongeler tous les composants nécessaires et les placer sur de la glace.
- Mélanger le contenu des puits (sans l'agiter au vortex) et centrifuger brièvement (10 secondes à 10 000 tr/min) pour recueillir le liquide au fond du tube.
- Ajuster les échantillons d'ARN à 0,1 µg/µL avec de l'eau exempte de nucléase.

**Remarque** : un témoin négatif (NTC) généré au cours de la transcription inverse à l'aide d'eau exempte de nucléase comme matrice peut être utilisé pour vérifier la qualité de la transcription inverse.

#### Procédure

- 1. Incuber 1 µg de chaque échantillon d'ARN à tester (10 µL) pendant 5 minutes à 65 °C.**
- 2. Refroidir immédiatement sur de la glace pendant 5 minutes.**
- 3. Centrifuger brièvement (10 secondes à 10 000 tr/min) pour recueillir le liquide au fond du tube. Conserver sur la glace.**
- 4. Préparer le pré-mélange de transcription inverse sur la glace et conserver sur la glace (voir tableau 1).**

\* Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats.

† Densité optique mesurée à 260 et 280 nm : DO de 1,0 à 260 nm équivalente à environ 40 µg/mL d'ARN simple brin. Un ratio de  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,8 et 2,1 indique un ARN hautement purifié.

**Tableau 1. Préparation du pré-mélange de transcription inverse**

<b>Composant de pré-mélange</b>	<b>Volume par échantillon (<math>\mu\text{L}</math>)*</b>	<b>Concentration finale</b>
5x tampons de transcriptase inverse	5,0	1x
dNTP (10 mM chacun)	2,0	0,8 mM
Nonamère aléatoire (100 $\mu\text{M}$ )	5,25	21 $\mu\text{M}$
Inhibiteur de RNase (40 U/ $\mu\text{L}$ )	0,5	0,8 U/ $\mu\text{L}$
Transcriptase inverse (200 U/ $\mu\text{L}$ )	1,0	8 U/ $\mu\text{L}$
DTT	1,25	–
<b>Volume de pré-mélange RT par échantillon</b>	<b>15</b>	

\* Préparer  $n + 1$ , où  $n$  correspond au nombre d'échantillons ARN

- 5. Mélanger délicatement (ne pas agiter au vortex), centrifuger brièvement et ajouter 15  $\mu\text{L}$  du pré-mélange à chaque échantillon d'ARN (pour 40 ng/ $\mu\text{L}$ ) et au témoin eau (NTC).**
- 6. Mélanger délicatement chaque tube (ne pas agiter au vortex) et centrifuger brièvement.**
- 7. Effectuer le programme de transcription inverse (voir tableau 2) sur un thermocycleur.**

**Tableau 2. Paramètres du thermocycleur pour la transcription inverse**

<b>Transcription inverse 1</b>	25 degrés pendant 10 minutes
<b>Transcription inverse 2</b>	50 degrés pendant 60 minutes
<b>Inactivation</b>	85 degrés pendant 5 minutes
<b>Refroidissement</b>	4 degrés pendant 5 minutes

- 8. Centrifuger brièvement (10 secondes à 10 000 tr/min) pour recueillir l'ADNc au fond du tube.**
- 9. Conserver sur de la glace ou stocker à -20 °C jusqu'à ce que la qPCR soit effectuée.**

## Guide de dépannage

Pour plus d'informations sur le diagnostic des problèmes de fonctionnement de ce kit, consulter la page de foire aux questions dans notre Centre de support technique à l'adresse suivante : [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Les techniciens de QIAGEN sont toujours heureux de répondre aux questions concernant les informations et les protocoles contenus dans ce manuel ou à propos des technologies d'échantillonnage et de dosage (pour les coordonnées, voir « Coordonnées » page 12).

## Contrôle qualité

Ce kit a été fabriqué en accord avec la norme ISO 13485. Les certificats d'analyse sont disponibles sur demande à l'adresse suivante : [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/)

## Limitations

Les utilisateurs doivent être entraînés et familiarisés avec cette technologie avant d'utiliser ce dispositif. Ce kit doit être utilisé selon les instructions données dans ce manuel, en combinaison avec les instruments validés mentionnés sous « Matériel nécessaire mais non fourni », page 6.

Tous les résultats de diagnostic générés doivent être interprétés en tenant compte d'autres résultats cliniques ou de laboratoire. L'utilisateur est responsable de la validation des performances du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire qui ne sont pas couvertes par les études de performances de QIAGEN.

Il est important de respecter les dates de péremption imprimées sur les boîtes et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants périmés.

## Caractéristiques des performances

Les caractéristiques de performances du kit *ipsogen* RT ont été établies uniquement avec les transcrits BCR-ABL MbcR et ABL. L'utilisateur est responsable de l'établissement des caractéristiques de performances appropriées pour les autres transcrits cibles.

Pour plus d'informations sur les caractéristiques de performances du kit *ipsogen* RT, voir le manuel *ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit Handbook*, disponible sur [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Références

QIAGEN tient à jour une grande base de données en ligne de publications scientifiques utilisant les produits QIAGEN. Des critères de sélection de

recherche vous aident à trouver les articles dont vous avez besoin à l'aide d'un simple mot-clé ou en spécifiant l'application, le domaine de recherche, le titre, etc.

Pour une liste complète des références, visitez notre base de données en ligne « QIAGEN Reference Database » à l'adresse [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) ou bien contactez les services techniques de QIAGEN ou votre distributeur local.

## Symboles

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l'emballage et l'étiquetage :



Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Numéro de référence



Numéro de lot



Numéro de matériel



Code article international (GTIN)



Limite de température



Fabricant



Consulter les instructions d'utilisation

## Coordonnées

Pour obtenir une assistance technique et plus d'informations, prière de consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), de téléphoner au 00800-22-44-6000 ou de contacter l'un des services techniques de QIAGEN ou l'un des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
<i>ipsogen</i> RT Kit (33)	Pour 33 réactions : transcriptase inverse, 5x tampons RT, mélange dNTP, amorce aléatoire, inhibiteur de RNase, DTT	679923
<b>Rotor-Gene® Q MDx , pour une analyse PCR en temps réel validée par le diagnostic in vitro dans les applications cliniques</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Instrument de PCR en temps réel et analyseur de fusion haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation non comprises	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Instrument de PCR en temps réel et analyseur de fusion haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation	9002033

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Ce kit est destiné au diagnostic in vitro. Les produits *ipsogen* ne peuvent être revendus, modifiés pour la revente ou utilisés pour fabriquer d'autres produits commerciaux sans l'autorisation écrite de QIAGEN.

Les informations contenues dans ce document peuvent être modifiées sans préavis. QIAGEN décline toute responsabilité pour toute éventuelle erreur apparaissant dans ce document. Ce document est considéré comme complet et exact au moment de sa publication. QIAGEN ne pourra en aucun cas être tenu responsable de dommages accessoires, particuliers, multiples ou consécutifs en relation avec, ou découlant de, l'utilisation de ce document.

Les spécifications présentées par les produits *ipsogen* sont garanties. La seule obligation de QIAGEN ainsi que le seul recours de tout client sont limités au remplacement sans frais des produits dans le cas où ces derniers ne correspondent pas aux performances garanties.

Ce produit contient de la transcriptase inverse SuperScript® III, relevant d'un ou de plusieurs brevets américains délivrés ou demandes de brevets américains en instance, et correspondant à des équivalents non américains, détenus par Life Technologies Corporation et vendus sous accord entre Life Technologies Corporation et *ipsogen*. Le prix d'achat de ce produit inclut des droits limités et non transférables sous les brevets susmentionnés d'utiliser cette quantité de produit pour pratiquer les revendications desdits brevets uniquement dans le cadre des activités de l'acheteur de mesure des transcrits BCR-ABL p210. Aucun autre droit n'est conféré, y compris le droit à utiliser ce produit pour des applications en médecine légale. Pour plus d'informations sur l'acquisition des droits dans le cadre de brevets détenus par Life Technologies Corporation, contactez le service Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, États-Unis. (760) 603-7200. E-mail : [Outlicensing@lifetech.com](mailto:Outlicensing@lifetech.com).

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

### **Accord de licence limitée**

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du kit *ipsogen* RT accepte les conditions suivantes :

1. Le kit *ipsogen* RT ne doit être utilisé que conformément au *Manuel du kit ipsogen RT* et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans le *Manuel du kit ipsogen RT* et autres protocoles disponibles sur le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son(s) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont octroyés sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les termes précédents. QIAGEN est susceptible de faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais d'investigation et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application du présent Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, tous droits réservés.

---

**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

