



Para diagnóstico in vitro



## Kit RT-Dx

Para la síntesis de la primera cadena de ADNc a partir de ARN total, para su uso como molde de la PCR.

**Ref: RT-01-CE**

Pruebas: 33 reacciones

Conservar a entre **-25°C y -15°C**

*Instrucciones de uso*  
Versión 01, Diciembre de 2009



**Kit RT-Dx**

Para la síntesis de la primera cadena de ADNc a partir de ARN total, para su uso como molde de la PCR.

**Instrucciones de uso**

Ref: RT-01-CE

<b>1.</b>	<b>Indicaciones y uso</b> .....	<b>3</b>
1.1.	Usado previsto .....	3
<b>2.</b>	<b>Material y métodos</b> .....	<b>3</b>
2.1.	Reactivos suministrados.....	3
2.2.	Material necesario.....	3
2.3.	Advertencias y precauciones.....	3
2.3.1.	Recomendaciones especiales de manejo .....	3
2.3.2.	Cuestiones de seguridad.....	4
2.3.3.	Manipulación y almacenamiento.....	4
2.3.4.	Estabilidad del kit.....	4
2.3.5.	Indicios de inestabilidad.....	4
2.3.6.	Control de calidad .....	4
2.3.7.	Advertencias.....	5
<b>3.</b>	<b>Instrucciones de uso</b> .....	<b>5</b>
3.1.	Recogida y preparación de los especímenes para el análisis.....	5
3.1.1.	Control de calidad .....	5
3.1.1.1.	Cuantificación:.....	5
3.1.1.2.	Cualificación:.....	5
3.2.	Transcripción inversa.....	6
<b>4.</b>	<b>Características de rendimiento</b> .....	<b>6</b>
<b>5.</b>	<b>Glosario, símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>7</b>
<b>6.</b>	<b>Información de contacto</b> .....	<b>8</b>
<b>7.</b>	<b>Nota al comprador</b> .....	<b>8</b>

## 1. Indicaciones y uso

### 1.1. Uso previsto

El kit RT-DX permite la transcripción inversa del ARN total utilizado en las pruebas de diagnóstico molecular.

**Advertencias:** Las características del rendimiento del kit RT-DX sólo se han establecido con los transcritos BCR-ABL Mbc y ABL. Es responsabilidad del usuario establecer las características de rendimiento del kit RT-DX para otros transcritos diana.

## 2. Material y métodos

### 2.1. Reactivos suministrados

Vial nº	Color de tapón	Nombre	Contenido	Volumen	Nº de artículo
1	Blanco	Tampón RT	5X tampón para transcripción inversa	180 µl	IP-PF-000509
2	Blanco	dNTP	Mezcla deoxinucleótida 10 mM cada uno	90 µl	IP-PF-000506
3	Blanco	Cebador aleatorio	Nonúmero oligonucleótido aleatorio	190 µl	IP-PF-000507
4	Blanco	Inhibidor RNasa	Inhibidor RNasa	18 µl	IP-PF-000510
5	Púrpura	Transcriptasa inversa	AMV RT	18 µl	IP-PF-000511
6	Azul	Agua	H <sub>2</sub> O apta para PCR	130 µl	IP-PF-000508

**Tabla 1:** Composición del kit de reactivos para transcripción inversa

### 2.2. Material necesario

- Termociclador o baño de agua (paso de transcripción inversa)
- Equipo general de laboratorio:
  - Tubos para PCR de 0,5 ml o 0,2 ml sin RNasa ni DNasa
  - Puntas de pipeta para PCR estériles, libres de nucleasa y resistentes a aerosoles, con filtros hidrófobos
  - Microcentrífuga equipada para tubos de 0,2 ml/0,5 ml. Velocidad máxima: 13 000 / 14 000 r.p.m.
  - Pipetas graduadas especiales para PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)
  - Hielo

### 2.3. Advertencias y precauciones

#### 2.3.1. Recomendaciones especiales de manejo

Este kit está concebido para uso en diagnóstico in vitro. Los reactivos y las instrucciones suministrados con este kit han sido validados para un rendimiento óptimo. La dilución adicional de los reactivos o un cambio en los tiempos y las temperaturas de incubación pueden causar resultados erróneos o discordantes. Todos los reactivos están formulados especialmente para el uso en este análisis. No debe realizarse ninguna sustitución si se desea que el análisis logre un resultado óptimo.

La determinación de niveles de transcritos utilizando la RQ-PCR necesita la transcripción inversa del ARNm y además la amplificación del ADNc generado mediante la PCR. Por lo tanto, el ensayo completo debe realizarse en ausencia de RNasa/DNasa. Recomendamos las siguientes directrices del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio: Nucleic Acid Amplification Assays for Molecular Hematopathology; Approved Guideline. Documento MM5-A del NCCLS

Tenga la máxima precaución para evitar:

- Las contaminaciones RNasa/DNasa, que pueden causar la degradación del molde de ARNm y del ADNc obtenido.
- La contaminación por arrastre del ARNm o de la PCR, que podrían producir señales positivas falsas.

Por lo tanto recomendamos lo siguiente:

- Utilice material de laboratorio (como pipetas, puntas de pipeta, tubos de reacción) sin nucleasa y use guantes cuando realice el ensayo.
- Use puntas de pipeta nuevas resistentes a los aerosoles en todos los pasos del pipeteado para evitar la contaminación cruzada entre las muestras y los reactivos.
- Prepare la premezcla maestra (master mix) para PCR con el material especializado (pipetas, puntas, etc.) en una zona especializada donde no se introduzcan matrices de ADN (ADNc, ADN, plásmidos). Añada el molde en una zona aislada (preferiblemente una sala independiente) con material especializado (pipetas, puntas, etc.).

### **2.3.2. Cuestiones de seguridad**

- Lleve puesto equipamiento personal protector adecuado para evitar el contacto con los ojos o la piel. Consulte la Ficha de Datos de Seguridad (FDS) si desea más información.
- Los tejidos humanos deben ser tratados como si fueran capaces de transmitir infecciones, y deberán ser destruidos tomando las precauciones adecuadas de acuerdo a las directrices de la OSHA y/o CAP (u otro equivalente de la UE).

### **2.3.3. Manipulación y almacenamiento**

- Almacene a una temperatura de entre  $-15^{\circ}\text{C}$  y  $-25^{\circ}\text{C}$  en un congelador que mantenga una temperatura constante.
- Mezcle suavemente y centrifugue los tubos antes de abrirlos.
- Almacene todos los componentes del kit en los envases originales.

Estas condiciones de almacenamiento son de aplicación tanto para componentes abiertos como para no abiertos. Si no se cumplen las condiciones de almacenamiento de los componentes indicadas en las etiquetas, pueden verse afectados negativamente los resultados del ensayo.

### **2.3.4. Estabilidad del kit**

La fecha de caducidad de cada reactivo figura en las etiquetas individuales de composición. El producto conservará sus propiedades hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta si se respetan las condiciones de almacenamiento adecuadas.

### **2.3.5. Indicios de inestabilidad**

No hay señales obvias que indiquen inestabilidad de este producto. No obstante, deberían analizarse simultáneamente controles positivos y negativos con especímenes desconocidos.

### **2.3.6. Control de calidad**

Este kit se ha fabricado cumpliendo con la norma ISO 13485:2003 y con las BPF actuales (Título 21 Párrafo 820 del código CFR). Los certificados de los análisis pueden solicitarse a: [support@ipsogen.com](mailto:support@ipsogen.com).

### 2.3.7. Advertencias

Los usuarios tienen que haber recibido formación y estar familiarizados con esta tecnología antes de utilizar este dispositivo.

Realice el análisis cumpliendo con las directrices del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio: Nucleic Acid Amplification Assays for Molecular Hematopathology; Approved Guideline. Documento MM5-A del NCCLS. Este kit debe utilizarse siguiendo las instrucciones que se dan en este manual, combinado con un instrumento validado mencionado anteriormente (2.2 Material necesario).

Cualquier uso no autorizado de este producto y/o modificación de los componentes anulará la responsabilidad de IPSOGEN.

## 3. Instrucciones de uso

**Antes de comenzar: el usuario debe leer estas instrucciones minuciosamente y familiarizarse con todos los componentes antes de usarlos.**

### 3.1. Recogida y preparación de los especímenes para el análisis

Las muestras de sangre completa coagularse con potasio EDTA y conservarse a una temperatura de entre 2°C y 8°C durante un máximo de 5 días hasta la extracción del ARN. La extracción de ARN debe realizarse mediante un procedimiento validado (Qiagen RNeasy, EC ref 74104 o 75144; o Trizol , Invitrogen, EC ref 15596-026 o 15596-018).

Los resultados del ensayo dependen de la concentración y de la calidad del ARN que se utiliza. Por ello, aconsejamos analizar ARN purificado por electroforesis en gel de agarosa o con un Bioanalyzer® de Agilent antes del análisis.

#### 3.1.1. Control de calidad

##### 3.1.1.1. Cuantificación:

- ✓ **Fluorocromo (RiboGreen®):** RiboGreen (sonda molecular) es un colorante de ácido nucleico que puede utilizarse para cuantificar el ARN en solución. La fluorescencia de una muestra que contiene RiboGreen se mide en un fluorómetro y se compara con una curva patrón. Este método es más sensible que la espectrometría y menos sensible a la interferencia de proteínas y nucleótidos libres. No obstante, requiere un fluorómetro y si se contamina el ADN puede provocarse una cuantificación inexacta.
- ✓ **Espectrofotómetro:** La espectrofotometría (A260) es el método tradicional para cuantificar el ARN. Su uso está ampliamente extendido, es sencillo y necesita un equipo corriente. Sin embargo, este método es considerablemente menos sensible que otros e interferirán el ADN, las proteínas y los nucleótidos libres. La absorbencia de una muestra de ARN diluido se mide a 260 y 280 nm. La concentración de ácido nucleico se calcula utilizando la ley de Beer-Lambert, que predice un cambio lineal de la absorbencia en relación con la concentración. Utilizando esta ecuación, una lectura A260 de 1,0 equivale a aprox. 40 µg/ml de ARN de una sola cadena.
- ✓ **Bioanализador Agilent 2100:** Utiliza la electroforesis microfluídica/capilar para analizar los ácidos nucleicos (ARN Nano LabChip®). La cuantificación se realiza comparando la fluorescencia de la muestra con un patrón (RNA 6000 Ladder). Requiere una pequeña cantidad de ARN y evalúa la integridad del ARN, pero muchos laboratorios no disponen de este instrumento.

##### 3.1.1.2. Cualificación:

Teniendo en cuenta el reducido tamaño del amplicón, RQ-PCR tolera el ARN parcialmente degradado pero evaluar la integridad de la muestra de ARN es una parte importante del análisis de expresión genética. Cuando se comparan muestras podría ser importante que el ARN tenga una integridad similar. Niveles variados de degradación podrían introducir inconsistencias en los resultados posteriormente.

- ✓ **Electroforesis en gel desnaturizador:** Una relación 2:1 de 28S (5,0 Kb) respecto a 18S (1,9 Kb) en un gel desnaturizador indica un ARN intacto (este control requiere como mínimo 100 ng de ARN total). Las bandas manchadas de ARNr 28S y 18S indican degradación (relación 28S/18S significativamente por debajo de 2)

- ✓ **Espectroscopía UV:** Una relación A260/A280 de 1,8--2,1 indica un ARN altamente purificado.
- ✓ **Bioanalizador Agilent:** Requiere como mínimo 25 ng. La degradación viene indicada por un pico menos pronunciado para ARNr 28S y 18S. La relación está significativamente por debajo de 2.

### 3.2. Transcripción inversa

- Descongele todos los componentes necesarios y colóquelos en hielo.
- Mezcle bien (sin vórtex) y centrifugue brevemente (aprox. 10 seg. a 10.000 r.p.m., para recoger el líquido en el fondo del tubo).
- Incube **1 µg de las muestras de ARN** que se van a analizar (de 1 a 8 µl) durante **5 min. a 65°C y enfríe inmediatamente en hielo durante 5 min.**
- Centrifugue brevemente (aprox. 10 seg. a 10.000 r.p.m., para recoger el líquido en el fondo del tubo) y manténgalo en hielo.

Premezcla de RT	Vial nº	Vol. para 1 ARN	Conc. final
Tampón 5X Transcriptasa inversa	1	5,0 µl	1X
dNTP (10 mM cada)	2	2,5 µl	1 mM
Nonámero aleatorio (100µM)	3	5,25 µl	21 µM
Inhibidor de la RNasa (40 U/µl)	4	0,5 µl	20 U
Transcriptasa inversa (20U/µl)	5	0,5 µl	10 U
H <sub>2</sub> O	6	3,25 µl	
Volumen de premezcla de RT		17 µl	
ARN		8 µl	40 ng/µl
Ajuste a 25 µl con H <sub>2</sub> O si es necesario		De 0 a 7 µl	

**Tabla 2:** Preparación de la premezcla de transcripción inversa.

- Mezcle bien y centrifugue brevemente (aprox. 10 seg. a 10.000 r.p.m., para recoger el líquido en el fondo del tubo) y manténgalo en hielo hasta que esté listo para pasar a la etapa siguiente.

En un termociclador (o baño de agua), ejecute el programa siguiente:

- **42°C durante 60 min.** (transcripción inversa)
- **85°C durante 5 min.** (inactivación)
- **8°C** (tiempo ilimitado) (enfriamiento)
- Centrifugue brevemente (aprox. 10 seg. a 10.000 r.p.m., para recuperar el líquido en el fondo del tubo) el ADNc obtenido.
- Mantenga en hielo o conserve a -20°C hasta que se realice la Q-PCR



## 4. Características de rendimiento

**Advertencias:** Las características del rendimiento del kit RT-Dx sólo se han establecido con los transcritos BCR-ABL Mbcr y ABL. El usuario es responsable de definir las características adecuadas de rendimiento de RT-Dx para otros transcritos diana.

Si desea más información sobre con las características del kit RT-Dx, consulte las instrucciones de uso del kit BCR-ABL Mbcr Dx Fusion<sup>Quanti</sup>® que aparecen en el sitio web de Ipsogen: [www.ipsogen.com](http://www.ipsogen.com).

## 5. Glosario, símbolos y abreviaturas

En el etiquetado del kit se utilizan los símbolos siguientes:

Símbolo	Utilizado para
	Fabricante
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Utilizar antes de DD-MM-AAAA o MM-AAAA
	Limitación de temperatura

En este documento se utilizan los siguientes términos abreviados:

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**RT:** Transcripción inversa

## 6. Información de contacto

Producido por: **IPSOGEN**

### **IPSOGEN SA – Fábrica**

Luminy Biotech Entreprises

Case 923, 163 av. de Luminy

13288 MARSELLA cedex 9

Francia

Tel: +33 (0)4 91 29 30 90

Fax: +33 (0)4 91 29 30 99

Correo electrónico: [support@ipsogen.com](mailto:support@ipsogen.com).

[infos@ipsogen.com](mailto:infos@ipsogen.com)

Web: [www.ipsogen.com](http://www.ipsogen.com)

## 7. Nota al comprador

Este producto está concebido para uso en 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. IPSOGEN no asume ninguna responsabilidad por los errores que puedan encontrarse en este documento. Este documento se considera completo y exacto en el momento de su publicación. En ningún caso será IPSOGEN responsable por daños fortuitos, especiales, múltiples o derivados del uso de este documento.

FusionQuant® es una marca comercial de IPSOGEN.

© Copyright 2009, IPSOGEN.

**Kit RT-Dx**

**RT-01-CE**

***Instrucciones de uso***

Versión 01, Diciembre de 2009