



Per impiego diagnostico in vitro



Kit RT-Dx

Per la prima sintesi di cDNA del primo filamento dall'RNA totale per l'impiego come templatato PCR

Rif: RT-01-CE

Test: 33 reazioni

Conservare ad una temperatura compresa tra **-25°C e -15°C**

Istruzioni per l'uso

Versione 01, Giugno 2009



**Kit RT-Dx**

Per la prima sintesi di cDNA del primo filamento dall'RNA totale per l'impiego come template PCR

Istruzioni per l'uso

Rif: RT-01-CE

1.	Istruzioni per l'uso.....	3
1.1.	Uso previsto	3
2.	Materiali e metodiche.....	3
2.1.	Reagenti forniti in dotazione	3
2.2.	Materiali necessari	3
2.3.	Avvertenze e precauzioni	3
2.3.1.	Consigli specifici per la manipolazione	3
2.3.2.	Indicazioni di sicurezza	4
2.3.3.	Manipolazione e conservazione	4
2.3.4.	Stabilità del kit	4
2.3.5.	Indicazioni di instabilità	4
2.3.6.	Controllo di qualità.....	4
2.3.7.	Indicazioni.....	4
3.	Istruzioni per l'uso.....	5
3.1.	Raccolta dei campioni e preparazione per l'analisi	5
3.1.1.	Controllo di qualità.....	5
3.1.1.1.	Quantificazione	5
3.1.1.2.	Qualifica:.....	5
3.2.	Trascrizione inversa	6
4.	Caratteristiche prestazionali	6
5.	Glossario, simboli ed abbreviazioni	7
6.	Informazioni sui contatti.....	8
7.	Nota per l'acquirente.....	8

1. Istruzioni per l'uso

1.1. Uso previsto

Il kit RT-Dx consente la trascrizione inversa dell'RNA totale impiegato nel test diagnostico molecolare.

Indicazioni: le caratteristiche prestazionali per il kit RT-Dx sono state stabilite solo con i trascritti Mbcr BCR-ABL e ABL. L'utente è responsabile della definizione delle caratteristiche prestazionali appropriate del kit RT-Dx per gli altri trascritti target.

2. Materiali e metodiche

2.1. Reagenti forniti in dotazione

Fiala num.	Colore tappino	Nome	Contenuto	Volume	Numero parti
1	Bianco	Tampone RT	Tampone per la trascrizione inversa 5X	180 µl	IP-PF-000509
2	Bianco	dNTP	Miscela deossinucleotidica 10mM cad.	90 µl	IP-PF-000506
3	Bianco	Primer casuale	Oligonucleotide nonamero casuale	190 µl	IP-PF-000507
4	Bianco	Inibitore RNasi	Inibitore RNasi	18 µl	IP-PF-000510
5	Viola	Trascrittasi inversa	AMV RT	18 µl	IP-PF-000511
6	Blu	Acqua	Grado PCR H2O	130 µl	IP-PF-000508

Tabella 1: composizione dei reagenti del kit di trascrizione inversa

2.2. Materiali necessari

- Ciclatore termico o bagno in acqua (passaggio di trascrizione inversa)
- Attrezzatura generica da laboratorio:
 - Provette della PCR prive di RNasi e DNasi da 0,5 ml o 0,2 ml
 - Puntali per pipette dedicate alla PCR sterili resistenti alla contaminazione da aerosol privi di nucleasi con filtri idrofobici
 - Microcentrifuga attrezzata per provette da 0,2 ml / 0,5 ml. Velocità max.: 13 000 / 14 000 giri/min
 - Pipette dedicate alla PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)
 - Ghiaccio

2.3. Avvertenze e precauzioni

2.3.1. Consigli specifici per la manipolazione

Il presente kit è destinato ad un impiego diagnostico in vitro. I reagenti e le istruzioni forniti nel kit sono stati approvati per garantire prestazioni ottimali. Un'ulteriore diluizione dei reagenti o l'alterazione dei tempi e delle temperature di incubazione potrebbe provocare dati errati o discordanti. Tutti i reagenti sono formulati in modo specifico per l'impiego con questo test. Si sconsiglia di effettuare eventuali sostituzioni per garantire le prestazioni ottimali del test.

La determinazione del livello dei trascritti con RQ-PCR richiede sia la trascrizione inversa dell'mRNA e l'amplificazione del cDNA generato dalla PCR. Per questo motivo è necessario eseguire tutta la procedura di saggio in condizioni di assenza di RNasi. Si consiglia di attenersi a "Clinical and Laboratory Standards Institute Guideline" : Saggi di amplificazione dell'acido nucleico per ematopatologia; linea guida approvata. Documento NCCLS MM5-A.

Prestare la massima attenzione per evitare:

- contaminazioni di RNasi/DNasi che potrebbero provocare la degradazione del template mRNA e del cDNA generato.
- mRNA o contaminazione da carry-over della PCR portando ad un'indicazione di falso positivo.

Si consiglia quindi di adottare i seguenti accorgimenti:

- Impiegare materiale da laboratorio privo di nucleasi (ad esempio pipette, puntali per pipette, fiale per reazioni) ed indossare i guanti per l'esecuzione del saggio.
- Impiegare puntali nuovi per pipette resistenti all'aerosol per tutti i passaggi della pipettatura per evitare la contaminazione incrociata dei campioni e dei reagenti.
- Preparare la miscela master Pre PCR con materiale apposito (pipette, puntali...) in un'area dedicata dove non vengono introdotte matrici di DNA (cDNA, DNA, plasmide). Aggiungere il template in una zona a parte (preferibilmente in una stanza separata) con materiali specifici (pipette, puntali...).

2.3.2. Indicazioni di sicurezza

- Indossare attrezzature di protezione personali per evitare il contatto con occhi e pelle. Consultare la scheda tecnica di sicurezza dei materiali (MSDS) per maggiori informazioni.
- I tessuti umani devono essere considerati come se fossero in grado di trasmettere infezioni smaltendoli con l'adozione delle precauzioni adeguate ed in conformità alle linee guida OSHA e / o CAP (o equivalenti per la UE).

2.3.3. Manipolazione e conservazione

- Conservare ad una temperatura compresa tra -25°C e -15°C in freezer a temperatura costante.
- Miscelare delicatamente e centrifugare le provette prima dell'apertura.
- Conservare tutti i componenti del kit nei contenitori originali.

Queste condizioni di conservazione si applicano ai componenti aperti e a quelli non ancora aperti. I componenti conservati in condizioni diverse da quelle specificate nell'etichetta potrebbero non fornire prestazioni corrette interessando negativamente i risultati dei saggi.

2.3.4. Stabilità del kit

Le date di scadenza per ogni reagente sono riportate sulle singole etichette dei componenti. Il kit conserva inalterate le prestazioni fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta in condizioni di conservazione corrette.

2.3.5. Indicazioni di instabilità

Non è presente nessun segno evidente che indichi l'instabilità del prodotto. Tuttavia, si consiglia di effettuare i controlli di positività e negatività allo stesso tempo con campioni non noti.

2.3.6. Controllo di qualità

Il kit è prodotto in conformità allo standard ISO 13485:2003 e secondo cGMP (CFR titolo 21 capitolo 820). I certificati delle analisi sono disponibili su richiesta a: support@ipsogen.com.

2.3.7. Indicazioni

Gli utenti sono tenuti a disporre di un'adeguata formazione ed aver acquisito dimestichezza con questa tecnologia prima dell'impiego del dispositivo.

Eseguire il test secondo "Clinical and Laboratory Standards Institute Guideline" [linea guida dell'istituto competente in materia di standard clinici e di laboratorio]: "Nucleic Acid Amplification Assays for Molecular Hematopathology; Approved Guideline" [saggi di amplificazione dell'acido nucleico per ematopatologia; linea guida approvata]. Documento NCCLS MM5-A. Si consiglia di impiegare il kit attenendosi alle istruzioni fornite nel presente manuale, in combinazione ad uno strumento approvato precedentemente specificato (materiali necessari 2.2).

Qualsiasi impiego non previsto del prodotto e/o l'alterazione dei componenti annullerà la responsabilità di IPSOGEN.

3. Istruzioni per l'uso

Preparativi prima dell'impiego: si consiglia agli utenti di leggere le presenti istruzioni con attenzione acquisendo dimestichezza con tutti i componenti prima dell'impiego.

3.1. Raccolta dei campioni e preparazione per l'analisi

Si consiglia di sottoporre i campioni di sangue interi ad un trattamento anticoagulante con potassio EDTA e conservarli ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C per un periodo non superiore a 5 giorni prima dell'estrazione dell'RNA. È necessario eseguire l'estrazione dell'RNA con una procedura approvata (Qiagen RNeasy, CE rif. 74104 o 75144; o Trizol, Invitrogen, CE rif. 15596-026 o 15596-018).

Le prestazioni del saggio dipendono dalla concentrazione e dalla qualità dell'RNA inserito. Si consiglia quindi di classificare l'RNA purificato con elettroforesi su gel di agarosio o con l'impiego di Agilent BioAnalyzer® prima dell'analisi a valle.

3.1.1. Controllo di qualità

3.1.1.1. Quantificazione

- ✓ **Colorante fluorescente (RiboGreen®):** RiboGreen (sonda molecolare) è un colorante di acido nucleico che può essere impiegato per quantificare l'RNA in soluzione. La fluorescenza dei campioni che contengono RiboGreen viene misurata in un fluorometro e viene comparata alle curve standard. Questa metodica risulta più sensibile rispetto alla spettrofotometria, ma è meno sensibile sia alle proteine sia all'interferenza dei nucleotidi liberi. Tuttavia è necessario un fluorometro e la contaminazione del DNA può provocare una quantificazione imprecisa.
- ✓ **Spettrofotometro:** la spettrofotometria (A260) rappresenta la metodica tradizionale per la quantificazione dell'RNA. È un metodo ampiamente impiegato e semplice che richiede attrezzature comuni. Tuttavia, questa metodica risulta notevolmente meno sensibile rispetto ad altri metodi mentre il DNA, le proteine e i nucleotidi liberi provocano eventuali interferenze. L'assorbanza di un campione di RNA diluito viene rilevata a 260 e 280 nm. La concentrazione dell'acido nucleico viene calcolata impiegando la legge di Beer-Lambert che prevede una variazione lineare dell'assorbanza in relazione alla concentrazione. Impiegando questa equazione, una lettura di A260 pari a 1.0 corrisponde a ~40 µg/ml di RNA a filamento singolo.
- ✓ **Bioanalyzer® Agilent 2100:** impiega l'elettroforesi microfluidica/capillare per analizzare gli acidi nucleici (RNA Nano LabChip®). La quantificazione viene ottenuta con il confronto della fluorescenza dei campioni agli standard (RNA 6000 Ladder). Richiede una piccola quantità di RNA e valuta l'integrità dell'RNA, ma questo strumento non è disponibile in numerosi laboratori.

3.1.1.2. Qualifica

Prendendo in considerazione le dimensioni ridotte dell'amplicon, la RQ-PCR è tollerante nei confronti dell'RNA parzialmente degradato, ma la valutazione dell'integrità dei campioni di RNA rappresenta un aspetto importante dell'analisi dell'espressione genetica. Quando si confrontano i campioni potrebbe essere importante il fatto che l'RNA mostri un'integrità simile. La variazione dei livelli di degradazione potrebbe portare ad incongruenze nei risultati a valle.

- ✓ **Elettroforesi su gel denaturante:** un rapporto 2:1 di 28S (5,0 Kb) rispetto a 18S (1,9 Kb) su gel denaturante indica un RNA intatto (questo controllo richiede almeno 100 ng di RNA totale). Le bande

macchiate di rRNA 28S e 18S segnalano la degradazione (rapporto di 28S/18S significativamente inferiore a 2)

- ✓ **Spettroscopia UV**: un rapporto A260/A280 di 1.8-2.1 è indice di RNA estremamente purificato.
- ✓ **Bioanalyzer® Agilent**: sono necessari almeno 25 ng. La degradazione viene segnalata dal picco meno pronunciato di rRNA 28S e 18S. Il rapporto è significativamente inferiore a 2.

3.2. Trascrizione inversa

- Scongellare tutti i componenti necessari e disporli sul ghiaccio.
- Miscelare bene (senza sottoporre ad agitazione a vortice) e centrifugare rapidamente (~ 10 sec., 10.000 giri/min. per raccogliere il liquido sul fondo della provetta).
- Incubare **1 µg di campioni di RNA** da sottoporre a test (da 1 a 8 µl) ed 1 fiala di ogni RNA di controllo per **5 min a 65°C e raffreddare immediatamente su ghiaccio per 5 min.**
- Centrifugare rapidamente (~ 10 sec., 10.000 giri/min. per raccogliere il liquido sul fondo della provetta) e tenere su ghiaccio.

Premiscela RT	Fiala num.	Vol. per 1 RNA	Conc. finale
Tampone trascrittasi inversa 5X	1	5,0 µl	1X
dNTP (10 mM cad.)	2	2,5 µl	1 mM
Nonamero casuale (100 µM)	3	5,25 µl	21 µM
Inibitore della RNasi (40 U/µl)	4	0,5 µl	20 U
Trascrittasi inversa (20 U/µl)	5	0,5 µl	10 U
H ₂ O	6	3,25 µl	
Volume della premiscela RT		17 µl	
RNA		8 µl	40 ng/µl
Regolare vol a 25 µl con H ₂ O in caso di necessità		da 0 a 7 µl	

Tabella 4: preparazione della premiscela di trascrizione inversa.

- Miscelare bene e centrifugare rapidamente (~ 10 sec., 10.000 giri/min. per raccogliere il liquido sul fondo della provetta) e tenere su ghiaccio fino a quando non si è pronti a passare al passaggio successivo.

Nel ciclatore termico eseguire il seguente programma:

- **42°C per 60 min** (trascrizione inversa)
- **85°C per 5 min** (disattivazione)
- **8° C** (tempo non definito) (raffreddamento)
- Centrifugare rapidamente (~ 10 sec., 10.000 giri/min. per raccogliere il liquido sul fondo della provetta) il cDNA ottenuto.
- Mantenere su ghiaccio o conservare ad -20°C fino all'esecuzione di Q-PCR.





4. Caratteristiche prestazionali

Indicazioni: le caratteristiche prestazionali per il kit RT-Dx sono state stabilite solo con i trascritti Mbc BCR-ABL e ABL. L'utente è responsabile della definizione delle caratteristiche prestazionali appropriate del kit RT-Dx per gli altri trascritti target.

Per maggiori informazioni in merito alle caratteristiche prestazionali del kit RT-Dx Kit consultare le istruzioni per l'uso di BCR-ABL Mbc Dx FusionQuant® disponibili sul sito internet di Ipsogen all'indirizzo www.ipsogen.com.

5. Glossario, simboli ed abbreviazioni

I simboli riportati di seguito sono impiegati per le etichette del kit.

Simbolo	Impiegato per
	Produttore
	Dispositivo medico diagnostico in vitro
	Da impiegare entro AAAA-MM-GG o AAAA-MM
	Limite termico

Le seguenti abbreviazioni sono impiegate nella documentazione:

PCR: reazione a catena della polimerasi

RT: trascrizione inversa

6. Informazioni sui contatti

Realizzazione a cura di: **IPSOGEN**

IPSOGEN SA – Sede produttiva

Luminy Biotech Entreprises
Case 923, 163 av. de Luminy
13288 Marseille/Marsiglia Cedex 9
France/Francia
Tel: +33 (0)4 91 29 30 90
Fax: +33 (0)4 91 29 30 99
E-mail: support@ipsogen.com
infos@ipsogen.com
Web: www.ipsogen.com

7. Nota per l'acquirente

Il presente prodotto è destinato ad un impiego diagnostico in vitro. Non è consentito rivendere i prodotti IPSOGEN, modificati per la rivendita o l'impiego per la realizzazione di prodotti commerciali senza il consenso scritto rilasciato da IPSOGEN.

Le informazioni contenute nel presente documento sono soggette a modifiche senza preavviso. IPSOGEN non si assume nessuna responsabilità degli errori che si possono eventualmente trovare nel presente documento. Il presente documento è considerato completo ed accurato all'atto della pubblicazione. In nessun caso IPSOGEN deve essere considerata responsabile di danni accidentali, speciali, multipli o secondari in relazione all'impiego del presente documento o derivante da quest'ultimo.

FusionQuant® è un marchio di fabbrica di IPSOGEN

FAM e TAMRA sono marchi di fabbrica di Perkin Elmer, LightCycler® è un marchio di fabbrica di Roche Diagnostics, TaqMan® è un marchio di fabbrica di Roche Molecular Systems, ABI PRISM® e Applied Biosystems® sono marchi di fabbrica di Applied Biosystems Corporation, RotorGene™ è un marchio di fabbrica di Corbett Research, Superscript™ è un marchio di fabbrica di Invitrogen Corp.

Kit RT-Dx

© Copyright 2009, IPSOGEN.

Istruzioni per l'uso

Versione 01, Giugno 2009