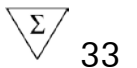


# Manualul de utilizare al *Ipsogen*<sup>®</sup> RT



Pentru reverstranscriptaza ARN RNA

Exclusiv in scopuri de cercetare. A nu se utiliza in  
proceduri de diagnosticare.

**REF**

679913



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA



## **Tehnologiile QIAGEN de testare si prelevare de probe**

QIAGEN este principalul furnizor de tehnologii inovatoare pentru testare si prelevare de probe, permitand izolarea si detectarea continuturilor oricarei probe biologice. Produsele si serviciile noastre avansate, de inalta calitate, asigura succesul de la prelevarea probei pana la obtinerea rezultatului .

### **QIAGEN stabileste standardele in:**

- Purificarea ADN-ului si ARN-ului si a proteinelor
- Prelevarea de probe de acid nucleic si proteine
- Cercetare microARN si iARN
- Automatizarea tehnologiilor de prelevare de mostre si probe

Misiunea noastra este de a va permite obtinerea unor succese si progrese remarcabile. Pentru mai multe informatii, vizitati site-ul [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).



# Cuprins

<b>Domeniul de utilizare</b>	<b>4</b>
<b>Rezumat si explicatii</b>	<b>4</b>
<b>Principiul procedurii</b>	<b>4</b>
<b>Materialele furnizate</b>	<b>5</b>
<b>Continutul Kit-ului</b>	<b>5</b>
<b>Materiale necesare dar nefurnizate</b>	<b>6</b>
<b>Avertismente si Precautii</b>	<b>7</b>
<b>Precautii generale</b>	<b>7</b>
<b>Depozitarea si manevrarea reactivilor</b>	<b>8</b>
<b>Depozitarea si manevrarea specimenelor</b>	<b>8</b>
<b>Procedura</b>	<b>9</b>
<b>Pregatirea probei de ARN</b>	<b>9</b>
<b>Protocol: Reverstranscriptaza</b>	<b>9</b>
<b>Depanare</b>	<b>11</b>
<b>Controlul calitatii</b>	<b>11</b>
<b>Referinte</b>	<b>11</b>
<b>Simboluri</b>	<b>11</b>
<b>Informatii de contact</b>	<b>12</b>
<b>Informatii privind comanda</b>	<b>13</b>

## Domeniul de utilizare

Kit-ul *ipsogen* RT este menit a fi utilizat exclusiv in scopuri de cercetare. El nu trebuie utilizat in procedurile de diagnosticare. Nicio declaratie sau afirmatie din prezentul manual nu este menita a furniza informatii legate de diagnosticarea, prevenirea sau tratarea unei afectiuni.

Produsele trebuie manevrate cu deosebita atentie. Recomandam utilizatorilor produselor QIAGEN® sa adere la liniile directoare NIH care au fost dezvoltate pentru experimentele ADN recombinant sau la alte linii directoare aplicabile.

## Rezumat si explicatii

Reverstrascriptaza ARN este necesara in cuantificarea ARN (de exemplu prin RT-PCR sau RT-PCR in timp real) sau clonarea unei secvente de ARN. Transcriptazele inverse sunt utilizate in vitro pentru sinteza primei catene de ADN complementar cu ARN-ul ca matrita initiala. Eficienta reactiei depinde intr-o mare masura de calitatea si cantitatea matritei ARN initiala. Este important ca matrita initiala sa fie un ARN intact. Chiar si cantitati mici de RNA-aze in proba de ARN pot cauza clivajul ARN, ducand la obtinerea de produsi ADNc scurtati. Impuritatile chimice, cum ar fi proteinele, polianionii (ex. heparina), sarurile, EDTA, etanolul, fenolul si alti solventi, pot afecta activitatea si procesivitatea reverstrascriptazei.

Pentru a se asigura o reverstrascriptaza reproductibila si eficienta, este important sa determinati calitatea si cantitatea ARN initial. Pentru cele mai bune rezultate, recomandam sa incepeti cu un ARN purificat prin tehnologia cu membrana de silica. De exemplu, Mini kit-ul QIAGEN RNeasy® (cat. no. 74104), sau Kit-ul Mediu RNeasy (cat. no. 75144) poate fi utilizat pentru izolarea ARN de o varietate de materiale initiale si pentru obtinerea unui ARN de inalta calitate, extrem de potrivite pentru utilizare in reverstrascriptaza si aplicatii RT-PCR.

## Principiul procedurii

Reverstrascriptaza este o enzima multifunctionala cu 3 activitati enzimice distincte: ADN polimeraza ARN dependenta, o exo-ribonucleaza (RNase H), cu dependenta hibrida si ADN polimeraza ADN dependenta. In vitro, combinatia dintre aceste trei activitati permite transcriptaza genomului de ARN monocatenar in ADN bicatenar pentru infectia retrovirala. Activitatea de ADN polimeraza ARN dependenta (reverstrascriptaza) transcrie ADNc de la o matrita ARN. Aceasta activitate permite sinteza ADNc pentru clonare, PCR sau secventiere ARN.

## Materialele furnizate

### Continutul Kit-ului

<b>Kit-ul <i>ipsogen</i> RT</b>	(33)
<b>Catalog nr.</b>	679913
<b>Numar de reactii</b>	33
Reverse Transcriptase (Reverstranscriptaza )	36 $\mu$ l
5x RT Buffer for reverse transcription (5x Buffer RT pentru reverstranscriptaza)	180 $\mu$ l
dNTP Mix* (dNTP Mix*)	72 $\mu$ l
Random Primer (Primer aleator <sup>†</sup> )	190 $\mu$ l
RNase Inhibitor (Inhibitor de RNaza)	18 $\mu$ l
DTT <sup>‡</sup>	45 $\mu$ l

\* Deoxinucleotide 10 mM fiecare.

<sup>†</sup> Oligonucleotide nonamer aleatorii.

<sup>‡</sup> Ditiotreitol.

## Materiale necesare dar nefurnizate

În lucrul cu substanțele chimice, trebuie să purtați întotdeauna un halat de laborator adecvat, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție. Pentru mai multe informații, consultați fișele de date de siguranță ale furnizorului produselor.

### Consumabile

- Vârful de pipetă fără nuclează, rezistent la aerosoli cu filtre hidrofobe
- Eprubete 0.5 ml or 0.2 ml PCR fără RNaza- și DNaza
- Gheață

### Reactivi

- Apa fără nuclează, PCR-grade
- Reactivi pentru electroforeză în gel de agaroză formaldehid 1.2%

### Echipamente

- Pipete microlitri \* pentru PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Centrifugă pentru bancul de lucru\* cu rotor pentru tuburi de reacție de 0.2 ml/0.5 ml (capabilă să atingă 10,000 rpm)
- Spectrofotometru,\* or Agilent® BioAnalyzer®,\* pentru cuantificarea ARN
- Echipament\* pentru electroforeză în câmp electric pulsat cu gel
- Termomixer, incubator orbital încălzit, bloc de încălzire sau baie de apă\* (etapa de reverstranscriptază).

\*Înainte de utilizare, asigurați-vă că instrumentele au fost verificate și calibrate în conformitate cu recomandările producătorului.

## Avertismente si Precautii

In lucrul cu substantele chimice, trebuie sa purtati un halat de laborator adecvat, manusi de unica folosinta si ochelari de protectie. Pentru mai multe informatii, consultati fisele de date de siguranta aferente. Acestea sunt disponibile online in format PDF la [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), unde puteti gasi, vizualiza si lista fisele de siguranta ale fiecarui kit QIAGEN si componenta a kitului. Eliminati reziduurile rezultate din testare si proba, conform reglementarilor de securitate locale in vigoare.

### Precautii generale

Testele qPCR necesita implementarea bunelor practici de laborator, inclusiv intretinerea echipamentelor, dedicate biologiei moleculare si conforme cu reglementarile si standardele aplicabile .

Acest kit este conceput exclusiv pentru cercetare. Reactivii si instructiunile furnizate in acest kit au fost testate pentru a se atinge nivelul optim de performanta. Diluarea suplimentara a reactivilor sau modificarea timpilor de incubare si a temperaturilor pot genera date eronate sau discordante. Toti reactivii sunt formulati in mod specific pentru utilizarea cu acest kit. Pentru performante optime ale procedurii, evitati inlocuirile.

Determinarea nivelurilor de transcriere utilizand qPCR necesita atat reverstranscriptaza mARN si amplificarea ADNc generat prin PCR. Prin urmare, intreaga procedura de prelevare trebuie realizata in conditii lipsite de RNaza-/DNaza.

Atentie maxima trebuie acordata pentru a se preveni:

- Contaminarea RNaza-/DNaza, ceea ce ar putea cauza degradarea matritei mARN si ADNc generat
- Contaminarea prin antrenare mRNA sau PCR, generand semnale fals pozitive

Astfel, va recomandam urmatoarele:

- Utilizati echipamente de laborator fara nucleaza (ex. pipete, varfuri de pipete, fiole de pipetare) si purtati manusi atunci cand prelevati probele
- Utilizati varfuri de pipeta curate, rezistente la aerosoli pentru toate etapele de pipetare pentru a evita contaminarea incrucisata a probelor si reactivilor.
- Preparati master mix-ul pre-PCR cu materialele adecvate pentru aceasta procedura (pipete, varfuri etc.) intr-o zona dedicata fara nicio matrice ADN (ADNc, ADN, plasmida). Adaugati matrita intr-o zona separata (de preferat intr-o camera separata) cu materialele specifice (pipete, varfuri etc.)



## **Depozitarea si manevrarea reactivilor**

Kitul este transportat pe gheata uscata si la primire trebuie depozitat la temperaturi de  $-30^{\circ}\text{C}$  pana la  $-15^{\circ}\text{C}$

- Amestecati usor si centrifugati eprubetele inainte de deschidere
- Depozitati toate componentele kitului in recipientele lor originale

Aceste conditii de depozitare sunt valabile atat pentru componentele deschise cat si pentru cele nedeschise. Componentele depozitate in alte conditii decat cele indicate pe etichete ar putea sa nu functioneze corespunzator si ar putea afecta negativ rezultatele testelor.

Datele de expirare pentru fiecare reactiv sunt indicate pe eticheta fiecarei componente. Daca se respecta conditiile de depozitare, produsul va functiona corespunzator pana la data de expirare specificata pe eticheta.

## **Depozitarea si manevrarea specimenelor**

Probele complete de sange trebuie anticoagulate cu EDTA de potasiu si depozitate la temperaturi de  $2-8^{\circ}\text{C}$  pentru cel mult 5 zile inainte de extractia ARN.

## Procedura

### Pregatirea probei de ARN

Extractia ARN trebuie realizata conform procedurii recomandate (QIAGEN RNeasy Mini Kit, cat. nr. 74104 sau RNeasy Midi Kit, cat. nr. 75144; sau Life Technologies TRIzol<sup>®</sup>, cat. nr. 15596-026 si 15596-018).

Performanta testului depinde de concentratia si calitatea ARN introdus. Astfel, recomandam sa cuantificati ARN purificat inainte de analiza ulterioara, prin electroforeza in gel de agaroză\*, Agilent BioAnalyzer, sau spectrofotometrie.†

### Protocol: Reverstranscriptaza

#### Inainte de a incepe, trebuie sa:

- Dezghetati toate componentele necesare si sa le asezati pe gheata
- Amestecati continuturile eprubetelor (nu turbionati) si centrifugati scurt (10 s la 10,000 rpm) pentru a strange lichidul pe fundul eprubetei.
- Ajustati probele ARN la 0.1 µg/µl cu apa fara nucleaza

Nota: Un control fara proba (NTC) generat pe durata reverstranscriptazei utilizandu-se apa fara nucleaza ca matrita poate fi utilizat pentru a se verifica calitatea reverstranscriptazei.

#### Procedura

1. Incubati 1 µg din fiecare proba de ARN ce urmeaza a fi testata (10 µl) timp de 5 min la 65°C.
2. Raciti imediat pe gheata timp de 5 minute.
3. Centrifugati rapid (10 s la 10,000 rpm) pentru a strange lichidul pe fundul eprubetei. Mentineti pe gheata.
4. Preparati premixul de reverstranscriptaza pe gheata si mentineti pe gheata (a se vedea Tabelul 1).

\* In timpul manevrării de substante chimice, purtati intotdeauna un halat de laborator adecvat, manusi de unica folosinta si ochelari de protectie.

† Densitatea optica masurata la 260 si 280 nm: DO de 1.0 la 260 nm este echivalentul a aproximativ 40 µg/ml ARN monocatenar. Un raport  $A_{260}/A_{280}$  intre 1.8 si 2.1 indica un ARN extrem de purificat.

**Tabelul 1. Prepararea premixului de reverstranscriptaza**

<b>Componentele premixului</b>	<b>Volum per proba (µl)*</b>	<b>Concentratia finala</b>
5x buffer Reverstranscriptaza	5.0	1x
dNTP (10 mM fiecare)	2.0	0.8 mM
Random nonamer (100 µM)	5.25	21 µM
Inhibitor RNase (40 U/µl)	0.5	0.8 U/µl
Reverstranscriptaza (200 U/µl)	1.0	8 U/µl
DTT	1.25	–
<b>Volumul RT premix per proba</b>	<b>15</b>	

\* Preparati n + 1, unde n este numarul de probe ARN

- 5. Amestecati cu grija (nu turbionati), centrifugati scurt si adaugati 15 µl din premix in fiecare proba ARN (pentru 40 ng/µl) si in apa de control (NTC)**
- 6. Amestecati fiecare eprubeta cu grija (nu turbionati) si centrifugati scurt**
- 7. Porniti programul de reverstranscriptaza (a se vedea Tabelul 2) utilizand un termomixer, un incubator orbital incalzit, un bloc de incalzire si o baie de apa.**

**Tabel 2. Parametrii pentru reverstranscriptaza**

<b>Reverstranscriptaza 1</b>	25°C for 10 min
<b>Reverstranscriptaza 2</b>	50°C for 60 min
<b>Inactivare</b>	85°C for 5 min
<b>Racire</b>	4°C for 5 min

- 8. Centrifugati scurt (10 s la 10,000 rpm) pentru a colecta ADNc pe fundul eprubetei.**
- 9. Mentineti pe gheata sau depozitati la –20°C, pana la efectuarea qPCR.**

## Depanare

Pentru informatii cu privire la depanarea, consultati pagina cu Intrebarile Frecvente la Centrul nostru de Asistenta Tehnica: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Oamenii de stiinta din cadrul Departamentelor Tehnice QIAGEN vor raspunde la toate intrebarile dumneavoastra cu privire la informatiile si protocolul din acest manual sau la probele si tehnologiile de testare (pentru informatii de contact, a se vedea "Informatii de contact", page 12).

## Controlul calitatii

Acest kit este fabricat in conformitate cu standardul ISO 13485:2003. Certificatele de Analiza sunt disponibile la cerere la [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Referinte

QIAGEN mentine o baza de date online actualizata cuprinzand publicatiile stiintifice despre produsele QIAGEN. Optiunile complete de cautare va permit sa gasiti articolele de care aveti nevoie, fie utilizand un cuvant cheie, fie specificand aplicatia, domeniul de cautare, titlul etc.

Pentru o lista completa de referinte, accesati Baza de date online cu referintele QIAGEN la [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) sau contactati Departamentele Tehnice ale QIAGEN sau distribuitorul dumneavoastra local.

## Simboluri

Urmatoarele simboluri pot aparea pe ambalaj sau pe etichete:



<N>

Contine reactivi suficienti pentru <N> de reactii



A se utiliza de catre



Numar catalog



Numar lot



Numar material



Numarul global de articol comercial



Limita de temperatura



Producator



Consultati instructiunile de utilizare

## Informatii de contact

Pentru asistenta tehnica si informatii suplimentare, adresati-va accesati Centrul nostru de Suport Tehnic la [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), apelati 00800-22-44-6000 sau contactati unul din Departamentele Tehnice de Service QIAGEN sau distribuitorilor dvs. locali (vezi coperta sau accesati [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Informatii privind comanda

Produs	Continut	Cat. no.
<i>ipsogen</i> RT Kit (33)	Pentru 33 reactii: Reverstranscriptaza, 5x buffer RT, amestec dNTP, Primer Random, Inhibitor RNase, DTT	679913
<b>Rotor-Gene Q<sup>®</sup> — pentru performanta remarcabila a RT-PCR</b>		
Platforma Rotor-Gene Q 5plex HRM	Real-time PCR cycler si analizor High Resolution Melt cu 5 canale (verde, galben, oranj, rosu, purpuriu) plus canal HRM, laptop, software, accesorii, 1-an garantie pe piese si manopera, instalarea si instruirea nu sunt incluse	9001580
Sistemul Rotor-Gene Q 5plex HRM	Real-time PCR cycler si analizor High Resolution Melt cu 5 canale (verde, galben, oranj, rosu, purpuriu) plus canal HRM, laptop, software, accesorii, 1-an garantie pe piese si manopera, instalare si instruire	9001650

Pentru informatii actualizate privind acordarea de licente si limitarea raspunderii pentru fiecare produs in parte, a se vedea manualul kit-ului QIAGEN respectiv sau manualul de utilizare. Manualele kit-urilor QIAGEN si manualele de utilizare sunt disponibile la [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sau pot fi solicitate de la Departamentele Tehnice ale QIAGEN sau de la distribuitorul dumneavoastra local.

Note



Acest produs este conceput exclusiv pentru cercetare, produsele *ipsogen* nu pot fi revandute, modificate pentru revanzare sau utilizate pentru fabricarea de produse comerciale fara acordul scris al QIAGEN.

Informatiile din acest document pot fi modificate fara notificare prealabila. QIAGEN nu isi asuma raspunderea pentru nicio eroare ce ar putea aparea in acest document. Acest document este considerat a fi complet si precis la momentul publicarii sale. QIAGEN nu va fi raspunzator pentru daunele accidentale, speciale, multiple sau indirecte in legatura cu sau derivate din utilizarea acestui document.

Produsele *ipsogen* sunt garantate sa intrineasca specificatiile lor prevazute. Singura obligatie a QIAGEN si singurul remediu al clientului sunt limitate la inlocuirea produselor in mod gratuit in cazul in care produsele nu functioneaza conform prevederilor din garantie.

Produsul contine Reverstrascriptaza SuperScript<sup>®</sup> III care se supune unuia sau mai multor brevete US emise sau cereri de brevetare US in curs si a echivalentelor non-US aplicabile detinute de Life Technologies Corporation si este comercializat conform unui acord incheiat intre Life Technologies Corporation si *ipsogen*. Pretul de achizitie al acestui produs include drepturile limitate, netransferabile conform brevetelor mentionate mai sus pentru utilizarea acestei cantitati din produs in ceea ce priveste formularea de pretentii legate de brevetele susmentionate, exclusiv pentru activitatile comparatorului de masurare a transcriptelor BCR-ABL p210. Nici un alt drept nu este transmis, inclusiv dreptul de a utiliza acest produs pentru aplicatii de medicina legala. Mai multe informatii despre dobandirea drepturilor aferente brevetelor detinute de Life Technologies Corporation pot fi obtinute contactand Departamentul de Acordare a Licentelor, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. (760) 603-7200. E-mail: [Outlicensing@lifetech.com](mailto:Outlicensing@lifetech.com).

Marci comerciale: QIAGEN<sup>®</sup>, *ipsogen*<sup>®</sup>, RNeasy<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup> (QIAGEN Group); SuperScript<sup>®</sup> (Life Technologies); Agilent<sup>®</sup>, Bioanalyzer<sup>®</sup> (Agilent Technologies, Inc.); TRIZOL<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Inc.).

#### **Acord de licenta limitata pentru Kit-ul *ipsogen* RT**

Utilizarea acestui produs insemna acordul cumparatorului sau al utilizatorului produsului de a respecta urmatoorii termeni:

1. Produsul poate fi utilizat numai in conformitate cu protocoalele furnizate cu produsul si cu acest manual si va fi utilizat exclusiv cu componentele incluse in acest kit. QIAGEN nu acorda nicio licenta conform niciuneia din drepturile sale de proprietate intelectuala pentru utilizarea sau integrarea componentelor incluse in acest kit cu alte componente neincluse in acest kit, cu exceptia celor descrise in protocoalele furnizate cu produsul, acest manual si protocoalele suplimentare disponibile la [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Unele din aceste protocoale suplimentare au fost furnizate de utilizatorii QIAGEN pentru utilizatorii QIAGEN. Aceste protocoale nu au fost testate in mod amanuntit sau optimizate de QIAGEN. QIAGEN nu garanteaza aceste protocoale si nici faptul ca ele nu incalca drepturile tertilor.
2. Pentru alte licente decat cele declarate in mod expres, QIAGEN nu da nici o garantie a faptului ca acest kit si/sau utilizarea sa nu incalca drepturile tertilor.
3. Acest kit si componentele sale sunt licentiate pentru o singura utilizare si nu pot fi refolosite, renovate sau revandute.
4. QIAGEN isi declina in mod specific orice licente, exprese si implicite alte decat cele declarate in mod expres.
5. Furnizorii si utilizatorii kitului sunt de acord sa nu implementeze sau sa permita altcuiva sa implementeze nicio masura care ar putea conduce la sau facilita acte interzise mai sus. QIAGEN poate impune interdictiile din acest Acord de Licenta Limitat, in orice instanta si va recupera cheltuielile pentru investigatiile sale si cheltuielile de judecata, inclusiv onorariile avocatilor, din orice actiune de punere in executare a acestui Acord de Licenta Limitata sau oricare din drepturile sale de proprietate intelectuala legate de acest kit si/sau componentele sale.

Pentru termeni actualizati privind licenta, a se vedea [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN,, toate drepturile rezervate



---

**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

