

Desember 2020

# Buku Pegangan PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit

Versi 2



50 (no. katalog 762174)

R4 **MAT** 1122120ID



762174



PreAnalytiX GmbH  
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon  
Diproduksi oleh QIAGEN GmbH untuk PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

Merek Dagang: PAXgene®, PreAnalytiX® (PreAnalytiX GmbH); QIAGEN®, QIAcube® (QIAGEN Group); BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Safety-Lok™ (Becton, Dickinson and Company); Eppendorf® (Eppendorf AG).

PAXgene Blood RNA Kit tidak tersedia di semua negara; silakan tanyakan.

#### **Perjanjian Lisensi Terbatas**

Penggunaan produk ini menyatakan perjanjian pembeli atau pengguna PAXgene Blood RNA Kit dengan ketentuan berikut:

1. PAXgene Blood RNA Kit hanya dapat digunakan sehubungan dengan *Buku Pegangan PAXgene Blood RNA Kit* dan untuk digunakan dengan komponen yang termasuk dalam Kit saja. PreAnalytiX tidak memberikan lisensi apa pun berdasarkan kekayaan intelektualnya untuk menggunakan atau menggabungkan komponen yang tersedia dengan Kit ini dengan komponen apa pun yang tidak termasuk dalam Kit ini kecuali sebagaimana dijelaskan dalam *Buku Pegangan PAXgene Blood RNA Kit* dan protokol tambahan yang tersedia di [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).
2. Selain lisensi yang dinyatakan secara tegas, PreAnalytiX tidak menjamin bahwa Kit ini dan/atau penggunaannya tidak melanggar hak-hak pihak ketiga.
3. Kit ini serta komponennya dilisensikan untuk penggunaan satu kali dan tidak boleh digunakan kembali, diperbarui, atau dijual kembali.
4. PreAnalytiX secara khusus menyangkal segala lisensi lain, yang dinyatakan secara tegas maupun tersirat selain yang dinyatakan secara tegas di atas.
5. Pembeli dan pengguna Kit setuju untuk tidak mengambil atau mengizinkan orang lain mengambil langkah apa pun yang dapat menyebabkan atau mendukung tindakan apa pun yang dilarang di atas.
6. PreAnalytiX dapat memberlakukan larangan Perjanjian Lisensi Terbatas ini di Pengadilan mana pun, dan akan memulihkan semua biaya investigasi dan Pengadilannya, termasuk biaya pengacara, dalam tindakan apa pun untuk menegakkan Perjanjian Lisensi Terbatas ini atau hak kekayaan intelektualnya yang terkait dengan Kit dan/atau komponennya.

Untuk ketentuan lisensi yang diperbarui, lihat [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

#### **Penjualan Bersyarat**

Produk saat ini disertai lisensi berdasarkan klaim tertentu dari US-7.270.953, dan US-7.682.790, serta EP-1820793 B1, dan klaim paten asing yang setara untuk menggunakan produk untuk memproses asam nukleat kompleks yang terbentuk dalam kumpulan sampel dalam PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, hak cipta dilindungi undang-undang.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Swiss

[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

#### **Distributor PreAnalytiX**

Produk PreAnalytiX diproduksi dan didistribusikan oleh QIAGEN atau BD untuk PreAnalytiX.  
Produk tidak dapat dipesan di PreAnalytiX GmbH.

Silakan lihat halaman terakhir untuk informasi kontak distributor PreAnalytiX setempat Anda.

# Isi

Isi Kit.....	5
Simbol.....	6
Kondisi Penyimpanan.....	7
Penggunaan yang Ditujukan .....	8
Batasan Penggunaan Produk.....	8
Kontrol Kualitas .....	9
Bantuan Teknis .....	9
Informasi Keselamatan .....	10
Pendahuluan .....	13
Prinsip dan prosedur.....	13
Stabilisasi dan pengumpulan sampel .....	14
Konsentrasi dan pemurnian RNA .....	19
Pemurnian RNA manual .....	19
Pemurnian RNA otomatis.....	29
Peralatan dan Reagen yang perlu Disediakan Pengguna.....	38
Catatan Penting.....	41
Menggunakan instrumen QIAcube .....	41
Memasang protokol pada instrumen QIAcube .....	44
Memuat instrumen QIAcube .....	45
Protokol: Pemurnian Manual Total RNA dari Darah Utuh Manusia yang Ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT).....	55

Protokol: Pemurnian Otomatis Total RNA dari Darah Utuh Manusia yang Ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT).....	62
Panduan Pemecahan Masalah .....	69
Lampiran A: Catatan Umum tentang Penanganan RNA.....	71
Lampiran B: Kuantifikasi dan Penentuan Kualitas Total RNA .....	72
Lampiran C: Penanganan PAXgene Blood RNA Tube (BRT).....	74
Informasi Pemesanan .....	75
Riwayat Revisi Buku Pegangan .....	77

# Isi Kit

<b>PAXgene Blood RNA Kit</b>			<b>(50)</b>
<b>No. katalog</b>			<b>762174</b>
<b>Jumlah penyajian</b>			<b>50</b>
BR1	Resuspension Buffer (Dapar Suspensi Ulang)	<b>RES BUF</b>	20 ml
BR2	Binding Buffer (Dapar Pengikat)*	<b>BIND BUF</b>	18 ml
BR3	Wash Buffer (Dapar Pencucian) 1*	<b>WASH BUF 1</b>	45 ml
BR4	Wash Buffer (Dapar Pencucian) 2 (konsentrat)†	<b>WASH BUF 2 CONC</b>	11 ml
BR5	Elution Buffer (Dapar Elusi)	<b>ELU BUF</b>	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (Air Bebas RNase) (botol)	<b>PEL WASH</b>	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (penutup hijau)	<b>PROTK</b>	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (Kolom Putar PAXgene RNA) (merah)	<b>PAXgene RNA COL</b>	5 × 10
PT	Processing Tubes (Tabung Pemrosesan) (2 ml)	<b>PROC TUBE</b>	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Penutup BD Hemogard™ Sekunder)	<b>SEC CLOS</b>	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Tabung Mikrosentrifugasi) (1,5 ml)	<b>MIC TUBE</b>	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNase I, bebas-RNase) (diliofilisasi)	<b>DNA REM</b>	1500 satuan Kunitz‡
RDD	DNA Digestion Buffer (Dapar Cerna DNA) (tutup putih)	<b>DNA DIG BUF</b>	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (Dapar Suspensi Ulang DNase) (tabung, tutup berwarna lila)	<b>DNase RES BUF</b>	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (Kolom Putar PAXgene Shredder) (berwarna lila)	<b>PAXgene SHRED COL</b>	5 × 10
Buku Pegangan	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (Buku Pegangan PAXgene Blood RNA Kit) (Versi 2)		1

\*Tidak kompatibel dengan reagen disinfeksi yang mengandung pemutih. Mengandung garam guanidina. Lihat halaman 10 untuk informasi keselamatan.

† Dapar Pencucian 2 (BR4) diberikan sebagai konsentrat. Sebelum menggunakan untuk pertama kali, tambahkan 4 volume etanol (p.a tingkat kemurnian 96–100%) seperti yang tertera pada botol untuk memperoleh larutan kerja.

‡ Satuan Kunitz adalah satuan yang paling sering digunakan untuk mengukur DNase I, ditetapkan sebagai jumlah DNase I yang menyebabkan peningkatan dalam  $A_{260}$  dari 0,001 per menit per mililiter pada 25°C, pH 5,0, dengan DNA terpolimerisasi tinggi sebagai substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349, dan 363).

# Simbol



Berisi reagen yang cukup untuk uji <N>



Baca petunjuk penggunaan



Gunakan sebelum



Perangkat medis diagnostik in vitro



Nomor katalog



Nomor lot



Nomor materi



Komponen



Nomor



Metode sterilisasi menggunakan iradiasi



Satuan Kunitz



Menambahkan



Mengandung



Disusun ulang



Deoksiribonukleat I



Etanol

**GITC**

Guanidina isotiosianat

**RNase-Free DNase Set**

Set DNase Bebas-RNase

**GTIN**

Nomor Item Perdagangan Global



Jangan gunakan kembali



Batas suhu



Batas atas suhu



Produsen



Catatan penting

## Kondisi Penyimpanan

Kolom putar PAXgene RNA(PRC), kolom putar PAXgene Shredder (PSC), proteinase K (PK), dan dapar (BR1, BR2, BR3, BR4, dan BR5) harus disimpan kering dalam suhu yang tercantum pada label kit.

Set DNase Bebas-RNase, yang mengandung DNase I (RNFD), Dapar cerna DNA (RDD), dan dapar suspensi ulang DNase (DRB), dikirimkan dalam suhu sekitar. Simpan semua komponen Set DNase Bebas-RNase segera setelah diterima pada suhu yang tercantum pada label. Jika disimpan dengan benar, kit akan stabil hingga tanggal kedaluwarsa pada kotak kit.

# Penggunaan yang Ditujukan

PAXgene Blood RNA System terdiri dari tabung penampung darah (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) dan kit pemurnian asam nukleat (PAXgene Blood RNA Kit). Sistem ini ditujukan untuk penampungan, penyimpanan, dan pengangkutan darah dan stabilisasi RNA intraseluler dalam tabung tertutup serta pemurnian dan isolasi selanjutnya RNA inang dari darah utuh untuk RT-PCR yang digunakan dalam pengujian diagnostik molekuler.

**Karakteristik kinerja untuk PAXgene Blood RNA System hanya telah dibentuk dengan transkrip gen FOS dan IL1B. Pengguna bertanggung jawab untuk membentuk karakteristik kinerja PAXgene Blood RNA System yang sesuai untuk transkrip target lainnya.**

## Indikasi penggunaan

PAXgene Blood RNA Kit ditujukan untuk pemurnian RNA intraseluler dari darah utuh yang ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Saat kit digunakan sehubungan dengan PAXgene Blood RNA Tube (BRT), sistem menyediakan RNA intraseluler yang dimurnikan dari utuh lengkap untuk RT-PCR yang digunakan dalam pengujian diagnostik molekuler.

## Batasan Penggunaan Produk

PAXgene Blood RNA Kit ditujukan untuk pemurnian RNA intraseluler dari darah utuh manusia ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leukosit/ml) untuk aplikasi diagnostik in vitro. Kit ini tidak ditujukan untuk pemurnian DNA genomik untuk asam nukleat virus dari darah utuh manusia. Karena jumlah terbatas transkrip yang tervalidasi untuk spesifikasi stabilisasi (transkrip gen FOS dan IL1B), karakteristik kinerja belum terbentuk untuk semua transkrip. Pengguna harus meninjau data produsen dan datanya sendiri untuk menentukan apakah validasi diperlukan untuk transkrip lainnya.

Produk ini ditujukan untuk digunakan oleh pengguna profesional, misalnya teknisi dan dokter yang terlatih dalam prosedur diagnostik in vitro.

Lihat *Buku Pegangan PAXgene Blood RNA Tube* untuk informasi tentang penggunaan PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

## Kontrol Kualitas

Sesuai dengan Sistem Manajemen Mutu QIAGEN yang bersertifikat ISO, setiap lot PAXgene Blood RNA Kit diuji terhadap spesifikasi yang telah ditentukan untuk memastikan kualitas produk yang konsisten.

## Bantuan Teknis

Di QIAGEN, kami bangga dengan kualitas dan ketersediaan dukungan teknis kami. Departemen Layanan Teknis kami dikelola oleh ilmuwan berpengalaman dengan keahlian praktis dan teoretis yang luas dalam biologi molekuler dan penggunaan produk PreAnalytiX. Jika Anda memiliki pertanyaan terkait PAXgene Blood RNA Kit, silakan hubungi kami.

Untuk bantuan teknis dan informasi lain silakan hubungi Layanan Teknis QIAGEN.

# Informasi Keselamatan

UE - Pengguna harus melaporkan setiap insiden serius yang berkaitan dengan perangkat kepada produsen dan National Competent Authority. Di Luar UE - Hubungi perwakilan QIAGEN setempat Anda untuk setiap insiden atau pertanyaan terkait perangkat.

Saat bekerja dengan bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung.

Untuk menghindari risiko infeksi (misal, dari virus HIV atau hepatitis B) atau cedera saat bekerja dengan bahan kimia atau biologis, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi lebih lanjut, silakan lihat lembar data keselamatan yang sesuai (LDK). Panduan tersedia online dalam format PDF yang mudah dan praktis di [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com). Di sana Anda dapat menemukan, melihat, dan mencetak LDK untuk kit ini.

## PERHATIAN



JANGAN menambahkan pemutih atau larutan asam secara langsung ke limbah penyiapan sampel.

Dapar pengikat (BR2) dan dapar pencucian 1 (BR3) mengandung guanidina tiosianat yang dapat membentuk senyawa yang sangat reaktif jika digabungkan dengan pemutih. Jika dapar pengikat (BR2) atau dapar pencucian 1 (BR3) tumpah, bersihkan dengan air dan detergen laboratorium yang sesuai. Jika cairan yang mengandung agen yang berpotensi menyebabkan infeksi tumpah, bersihkan area yang terkena terlebih dahulu dengan detergen laboratorium dan air, kemudian dengan 1% (v/v) natrium hipoklorit (pemutih).

Larutan penstabil RNA dan campuran darah dari PAXgene Blood RNA Tube (BRT) dapat didisinfeksi menggunakan 1 volume larutan pemutih komersial (5% natrium hipoklorit) per 9 volume larutan penstabil RNA dan campuran darah.

Limbah penyiapan sampel, seperti supernatan dari tahap sentrifugasi dalam prosedur pemurnian RNA, harus dianggap berpotensi menyebabkan infeksi. Sebelum dibuang, limbah harus diautoklaf atau dibakar untuk memusnahkan setiap bahan penyebab infeksi. Pembuangan harus dilakukan sesuai dengan peraturan resmi.

Pernyataan bahaya dan pencegahan berikut ini berlaku untuk komponen-komponen PAXgene Blood RNA Kit. Lihat *Buku Pegangan PAXgene Blood RNA Tube* untuk informasi keselamatan tentang PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

### Dapar BR2



Mengandung: guanidina tiosianat. Bahaya! Berbahaya jika tertelan. Dapat berbahaya jika terkena kulit atau jika terhirup. Menyebabkan kerusakan mata serius. Berbahaya bagi kehidupan air dengan efek jangka panjang. Kontak dengan asam dapat membebaskan gas yang sangat beracun. Kenakan sarung tangan pelindung/pakaian pelindung/pelindung mata/pelindung wajah. JIKA TERKENA MATA: Bilas secara hati-hati dengan air selama beberapa menit. Lepaskan lensa kontak, jika ada dan mudah dilakukan. Lanjutkan membilas. Segera hubungi PUSAT BANTUAN KERACUNAN atau dokter/medis.

### Dapar BR3



Mengandung: etanol; guanidina tiosianat. Bahaya! Cairan dan uap yang mudah terbakar. Menyebabkan kerusakan mata serius. Kontak dengan asam dapat membebaskan gas yang sangat beracun. Jauhkan dari panas/percikan api/nyala api terbuka/permukaan panas. Dilarang Merokok. Kenakan sarung tangan pelindung/pakaian pelindung/pelindung mata/pelindung wajah. JIKA TERKENA MATA: Bilas secara hati-hati dengan air selama beberapa menit. Lepaskan lensa kontak, jika ada dan mudah dilakukan. Lanjutkan membilas. Segera hubungi PUSAT BANTUAN KERACUNAN atau dokter/medis.

### **DNase I**



Mengandung: DNase. Bahaya! Dapat menyebabkan reaksi alergi terhadap kulit. Dapat menyebabkan gejala alergi atau asma maupun kesulitan bernapas jika terhirup. Hindari menghirup debu/asap/gas/kabut/uap/semprotan. Kenakan sarung tangan pelindung/pakaian pelindung/pelindung mata/pelindung wajah. Kenakan perlindungan pernapasan. JIKA terpapar atau khawatir: Hubungi PUSAT BANTUAN KERACUNAN atau dokter/medis. Bawa korban ke udara terbuka dan posisikan tubuh sehingga nyaman untuk bernapas.

### **Proteinase K**



Mengandung: proteinase K. Bahaya! Menyebabkan iritasi kulit ringan. Dapat menyebabkan gejala alergi atau asma maupun kesulitan bernapas jika terhirup. Hindari menghirup debu/asap/gas/kabut/uap/semprotan. Kenakan sarung tangan pelindung/pakaian pelindung/pelindung mata/pelindung wajah. Kenakan perlindungan pernapasan. JIKA terpapar atau khawatir: Hubungi PUSAT BANTUAN KERACUNAN atau dokter/medis. Bawa korban ke udara terbuka dan posisikan tubuh sehingga nyaman untuk bernapas.

# Pendahuluan

Penampungan darah utuh adalah langkah pertama di berbagai uji kadar molekuler yang digunakan untuk mempelajari RNA seluler. Akan tetapi, kesalahan utama dalam eksperimen tersebut adalah ketidakstabilan profil RNA seluler *in vitro*. Penelitian pada PreAnalytiX menunjukkan bahwa jumlah salinan spesies mRNA individu dalam darah utuh dapat berubah lebih dari 1000 kali lipat selama penyimpanan atau transpor pada suhu ruang.\* Hal ini disebabkan oleh degradasi RNA yang cepat dan oleh ekspresi yang gen tertentu yang diinduksi setelah darah diambil. Perubahan dalam profil ekspresi RNA tersebut membuat penelitian yang andal mengenai ekspresi gen tampak mustahil. Metode yang menjaga profil ekspresi RNA selama dan setelah flebotomi sangat penting demi analisis ekspresi gen yang akurat dalam darah utuh manusia.

## Prinsip dan prosedur

PreAnalytiX telah mengembangkan sistem yang memungkinkan penampungan, stabilisasi, penyimpanan dan transportasi spesimen darah utuh manusia, bersama dengan protokol yang cepat dan efisien untuk pemurnian RNA intraseluler. Sistem ini memerlukan penggunaan PAXgene Blood RNA Tube (BRT; Paten AS 6.602.718 dan 6.617.170) untuk penampungan darah dan stabilisasi RNA, diikuti oleh pemurnian RNA manual atau otomatis menggunakan PAXgene Blood RNA Kit. Protokol manual maupun otomatis memberikan kinerja yang secara substansial setara sehubungan dengan kualitas dan hasil RNA. Data kinerja untuk protokol manual (halaman 22–29) dan protokol otomatis (halaman 31–35) disertakan dalam buku pegangan ini.



QIAGEN QIAcube Connect MDx tidak tersedia di semua negara. Untuk detail selengkapnya silakan hubungi Layanan Teknis QIAGEN.

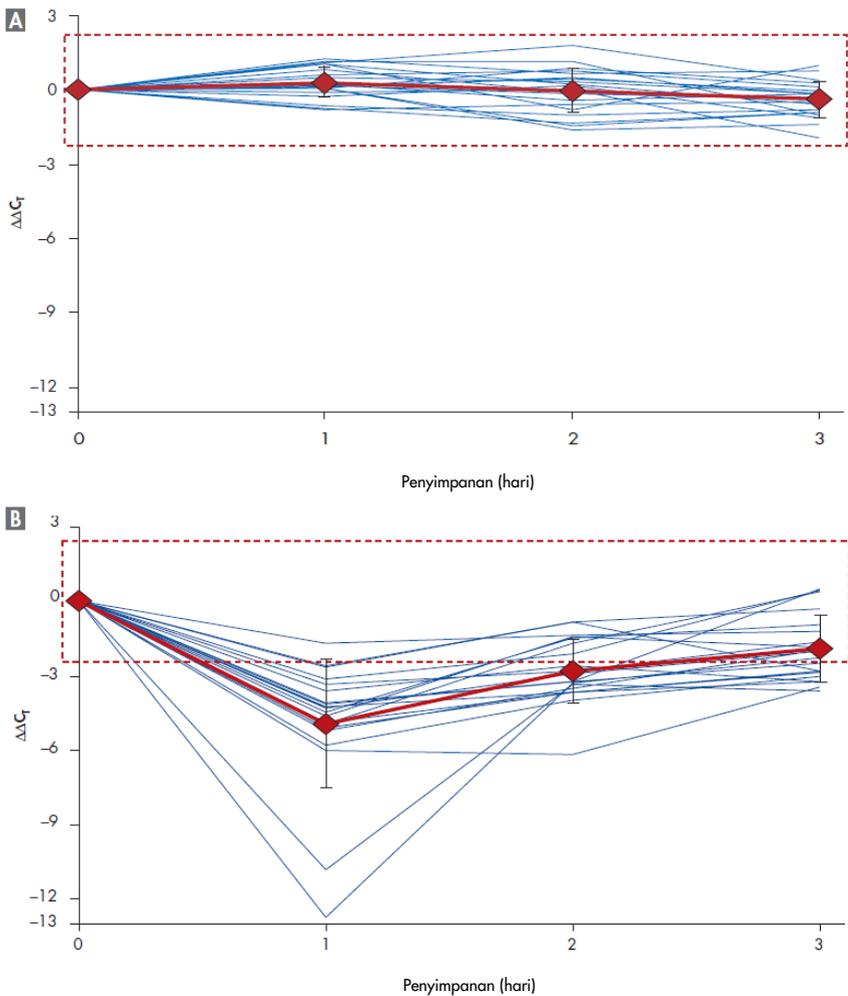
\* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin. Chem.* **48**, 1883.

## Stabilisasi dan pengumpulan sampel

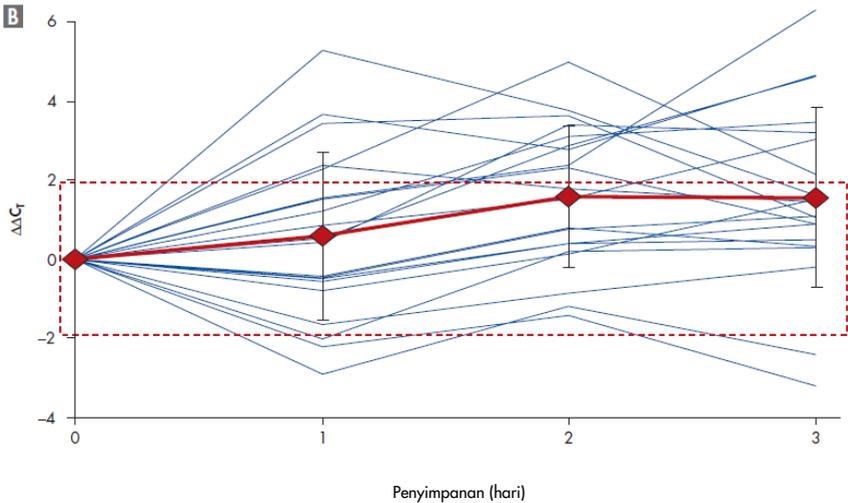
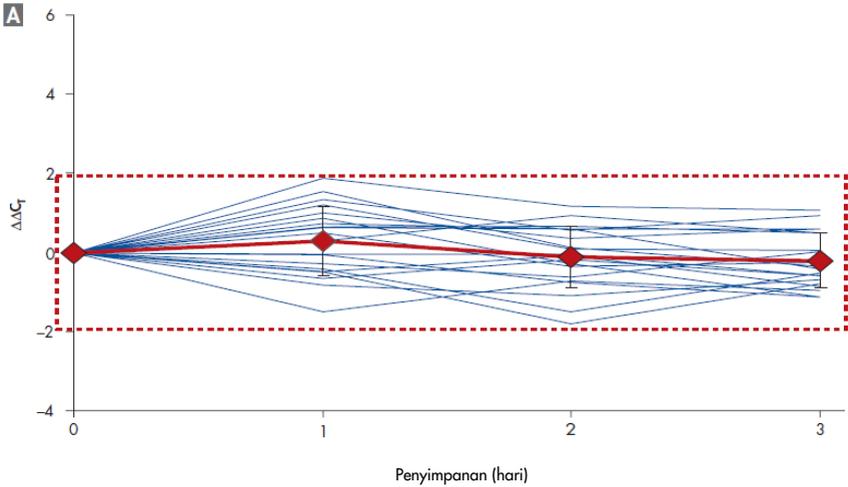
PAXgene Blood RNA Tube (BRT) berisi komposisi reagen paten berdasarkan teknologi stabilisasi RNA yang dipatenkan. Komposisi reagen ini melindungi molekul RNA dari degradasi oleh RNase dan meminimalkan perubahan *ex vivo* dalam ekspresi gen. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ditujukan untuk penampungan darah utuh manusia dan stabilisasi RNA seluler hingga 3 hari pada suhu 18–25°C (Gambar 1 dan 2, halaman 15 dan 16) atau hingga 5 hari pada suhu 2–8°C (Gambar 3 dan 4, halaman 17 dan 18). Data yang tersedia saat ini menunjukkan stabilisasi RNA seluler selama setidaknya 11 tahun pada suhu –20°C atau –70°C\*. Untuk informasi selengkapnya dari penelitian yang sedang dilakukan yang mengevaluasi stabilitas untuk periode waktu yang lebih lama, silakan hubungi Layanan Teknis QIAGEN.

Durasi aktual stabilisasi RNA dapat beragam tergantung pada spesies RNA seluler dan aplikasi hilir yang digunakan. Karena jumlah terbatas transkrip yang tervalidasi untuk spesifikasi stabilisasi (transkrip gen FOS dan IL1B), karakteristik kinerja belum terbentuk untuk semua transkrip. Pengguna harus meninjau data produsen dan datanya sendiri untuk menentukan apakah validasi diperlukan untuk transkrip lainnya.

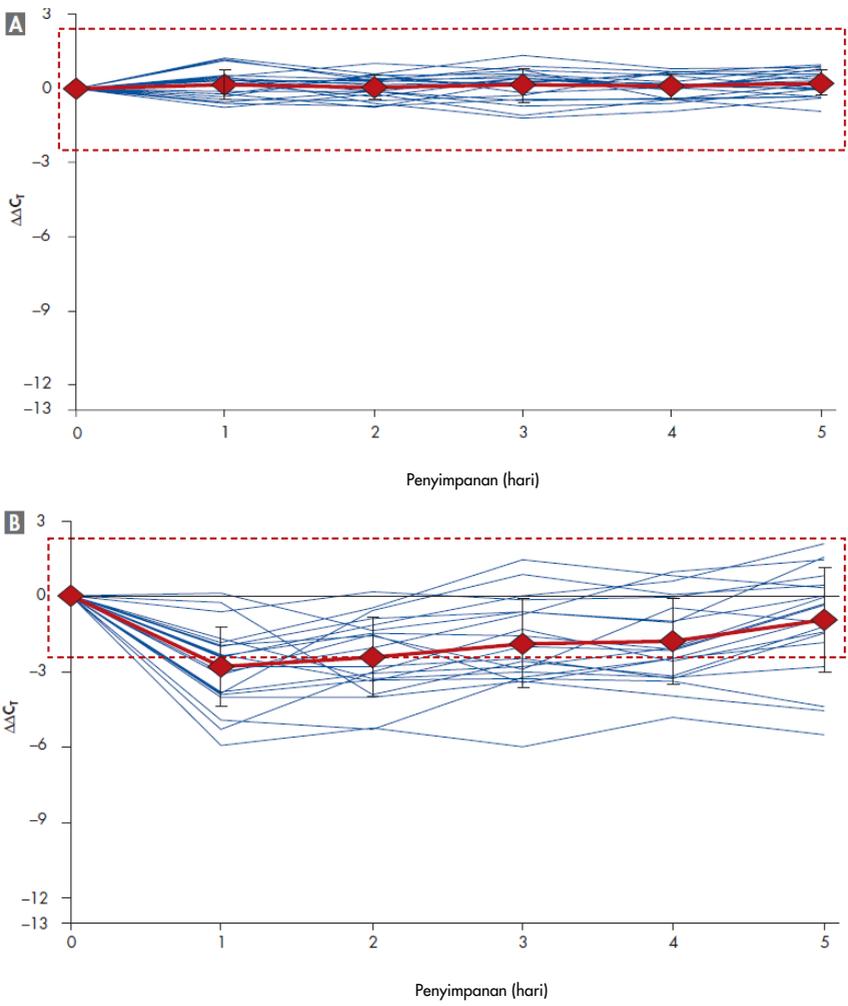
\* Penelitian jangka panjang mengenai penyimpanan darah dalam PAXgene Blood RNA Tube sedang dilakukan.



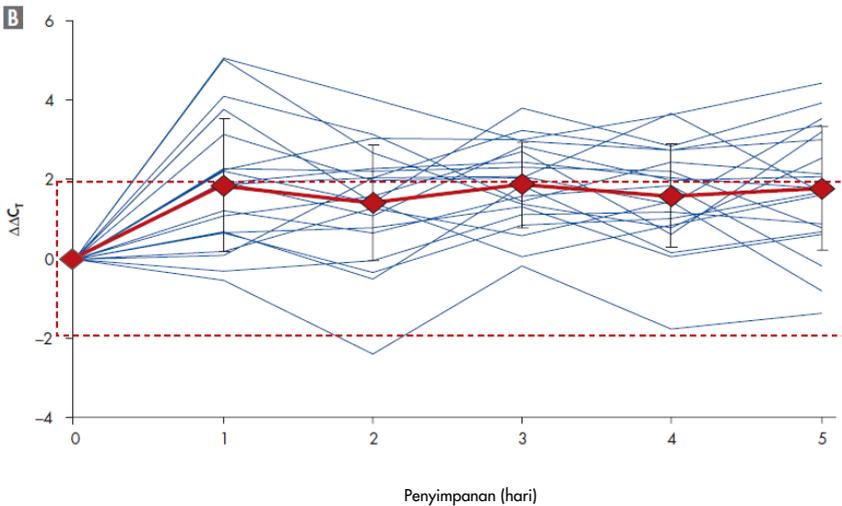
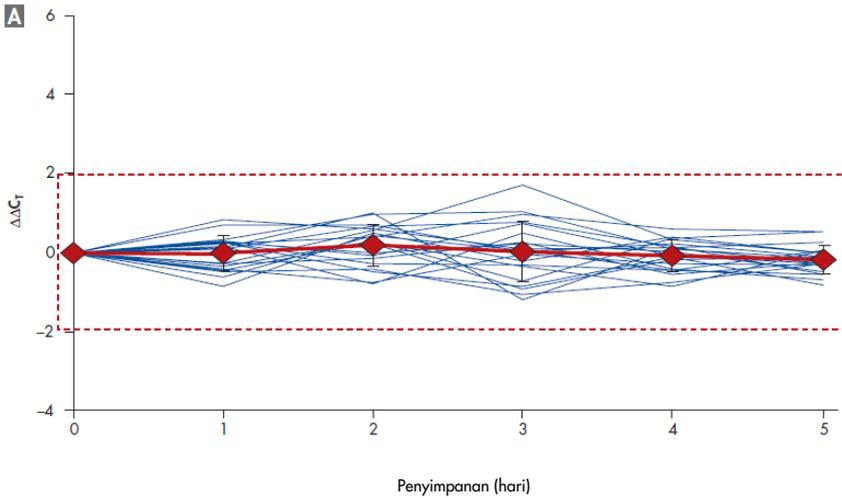
**Gambar 1. Stabilitas RNA dalam sampel darah pada suhu 18–25°C: FOS.** Darah diambil dari 10 donor, dengan sampel duplikat dan disimpan pada suhu 18–25°C untuk jumlah hari yang ditunjukkan, diikuti dengan total pemurnian RNA. **[A]** Darah ditampung dan disimpan dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT), dan total RNA dimurnikan menggunakan PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Darah ditampung dan disimpan dalam tabung penampung darah standar dengan EDTA sebagai antikoagulan, dan total RNA dimurnikan menggunakan metode ekstraksi-organik standar dengan pembersihan RNA berbasis membran silika. Level transkrip relatif FOS ditentukan oleh real-time RT-PCR dupleks, menggunakan 18S rRNA sebagai standar internal. Nilai semua sampel diplotkan, dengan rata-rata dan simpangan baku semua sampel yang ditampilkan. Garis putus-putus menunjukkan  $\pm 3x$  total presisi uji kadar ( $2,34 C_t$ ).



**Gambar 2. Stabilitas RNA dalam sampel darah pada suhu 18–25°C: IL1B.** Darah diambil dan total RNA dimurnikan, setelah penyimpanan pada suhu 18–25°C, seperti yang dijelaskan dalam Gambar 1. Level transkrip relatif IL1B ditentukan oleh real-time RT-PCR dupleks, menggunakan 18S rRNA sebagai standar internal. Nilai semua sampel diplotkan, dengan rata-rata dan simpangan baku semua sampel yang ditampilkan. Garis putus-putus menunjukkan  $\pm 3 \times$  total presisi uji kadar ( $1,93 C_t$ ).



**Gambar 3. Stabilitas RNA dalam sampel darah pada suhu 2–8°C: FOS.** Darah diambil dari 10 donor, dengan sampel duplikat dan disimpan pada suhu 2–8°C untuk jumlah hari yang ditunjukkan, diikuti dengan total pemurnian RNA. **[A]** Darah ditampung dan disimpan dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT), dan total RNA dimurnikan menggunakan PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Darah ditampung dan disimpan dalam tabung penampung darah standar dengan EDTA sebagai antikoagulan, dan total RNA dimurnikan menggunakan metode ekstraksi-organik standar dengan pembersihan RNA berbasis-membran silika. Level transkrip relatif FOS ditentukan oleh real-time RT-PCR dupleks, menggunakan 18S rRNA sebagai standar internal. Nilai semua sampel diplotkan, dengan rata-rata dan simpangan baku semua sampel yang ditampilkan. Garis putus-putus menunjukkan  $\pm 3x$  total presisi uji kadar ( $2,34 C_t$ ).



**Gambar 4. Stabilitas RNA dalam sampel darah pada suhu 2–8°C: IL1B.** Darah diambil dan total RNA dimurnikan, setelah penyimpanan pada suhu 2–8°C, seperti yang dijelaskan dalam Gambar 3. Level transkrip relatif IL1B ditentukan oleh real-time RT-PCR dupleks, menggunakan 18S rRNA sebagai standar internal. Nilai semua sampel diplotkan, dengan rata-rata dan simpangan baku semua sampel yang ditampilkan. Garis putus-putus menunjukkan  $\pm 3 \times$  total presisi uji kadar (1,93 Ct).

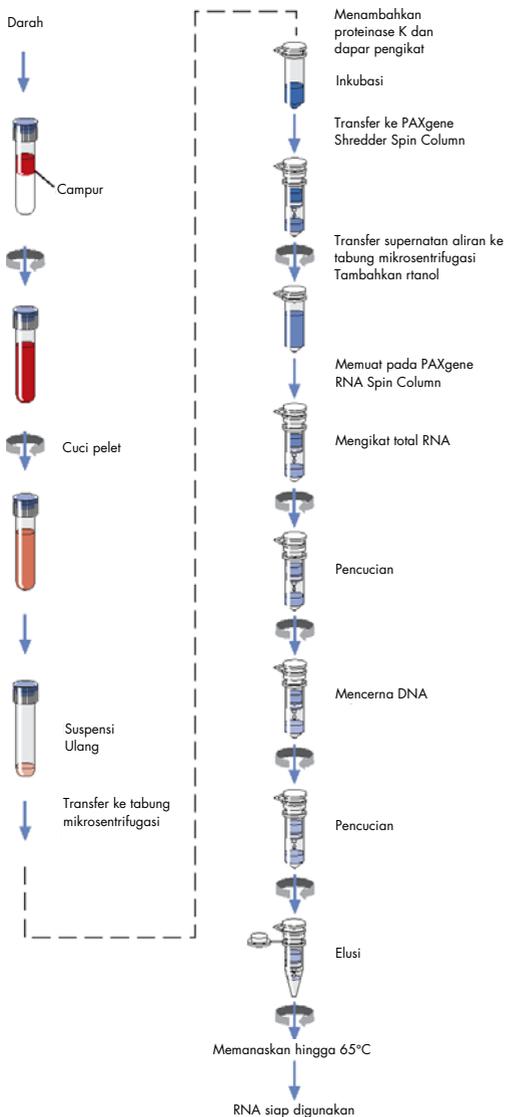
## Konsentrasi dan pemurnian RNA

PAXgene Blood RNA Kit ditujukan untuk pemurnian total RNA dari darah utuh manusia sebanyak 2,5 ml yang ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Prosedurnya sederhana dan dapat dilakukan menggunakan prosedur manual atau otomatis (lihat Gambar 5 dan 10, halaman 20 dan 30). Di kedua protokol, pemurnian dimulai dengan tahap sentrifugasi pada asam nukleat pelet dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pelet dicuci dan disuspensi ulang, diikuti oleh pemurnian RNA manual atau otomatis. Prinsipnya, kedua protokol mengikuti tahap protokol yang sama dengan komponen kit yang sama.

### Pemurnian RNA manual

Secara detail, pelet yang disuspensi ulang diinkubasi dalam dapar optimasi bersama dengan proteinase K (PK) untuk menimbulkan pencernaan protein. Sentrifugasi tambahan melalui kolom putar PAXgene Shredder (PSC) dilakukan untuk menghomogenkan lisat sel dan menghilangkan serpihan residu sel, dan supernatan fraksi aliran ditransfer ke tabung mikrosentrifugasi baru. Etanol ditambahkan untuk menyesuaikan kondisi pengikatan, dan lisat diterapkan pada kolom putar PAXgene RNA (PRC). Selama proses sentrifugasi singkat, RNA secara selektif terikat pada membran silika PAXgene sebagai kontaminan yang berlalu. Kontaminan yang tersisa dibersihkan dalam beberapa tahap pencucian yang efisien. Antara tahap pencucian pertama dan kedua, membran diperlakukan dengan DNase I (RNFD) untuk membersihkan sejumlah jejak DNA yang terikat. Setelah tahap pencucian, RNA dielusi dalam dapar elusi (BR5) dan denaturasi-panas.

Total RNA yang diisolasi menggunakan PAXgene Blood RNA System bersifat murni. Dengan protokol manual, nilai  $A_{260}/A_{280}$  adalah antara 1,8 dan 2,2, dan  $\leq 1\%$  (w/w) DNA genomik ada dalam  $\geq 95\%$  dari semua sampel, sebagaimana yang diukur oleh real-time PCR kuantitatif dari urutan gen beta-aktin. Minimal 95% sampel menunjukkan tidak adanya inhibisi dalam RT-PCR, saat menggunakan hingga 30% elusi.

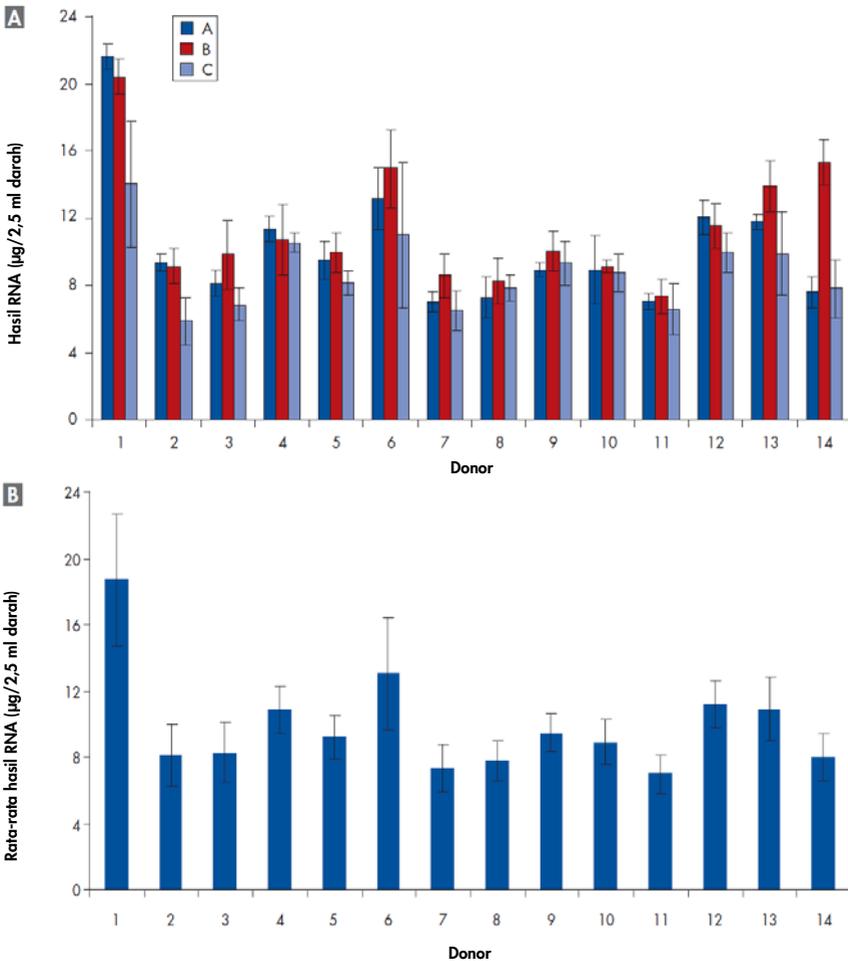


**Gambar 5. Prosedur PAXgene Blood RNA manual.**

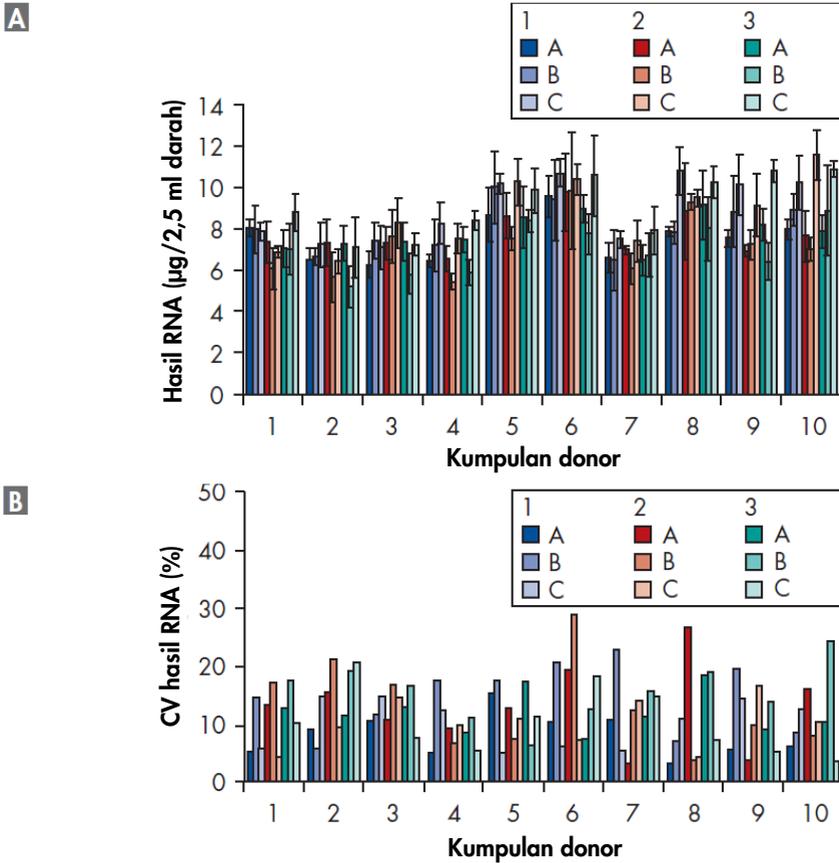
Dengan protokol manual, rata-rata waktu penyiapan sampel (berdasarkan data dari 12 pengoperasian penyiapan sampel) sekitar 90 menit\*, hanya dengan 40 menit waktu praktik. RNA yang dihasilkan dari 2,5 ml darah utuh manusia sehat adalah  $\geq 3 \mu\text{g}$  untuk  $\geq 95\%$  sampel yang diproses. Karena hasil sangat bergantung pada donor, hasil individu dapat beragam. Untuk donor individu, PAXgene Blood RNA system memberikan hasil yang sangat dapat direproduksi dan diulang (Gambar 6 dan 7, halaman 22 dan 23) serta RT-PCR yang dapat direproduksi dan diulang (Gambar 8 dan 9, halaman 27 dan 28), yang membuatnya sangat kuat untuk uji diagnostik klinis.

Gambar 6 (halaman 22) menunjukkan keseluruhan keberulangan dan reproduksibilitas PAXgene Blood RNA System. Penelitian tambahan dilakukan untuk menunjukkan pengaruh lot PAXgene Blood RNA Kit yang berbeda dan operator yang berbeda terhadap reproduksibilitas hasil RNA dan kinerja real-time RT-PCR. Karena sampel darah yang dikumpulkan, sebagai ganti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) individu digunakan untuk penelitian ini, hasil tidak menunjukkan keberulangan sistem, termasuk fluktuasi antara pengambilan darah individu, tetapi hanya keberulangan penyiapan sampel (lihat Gambar 7, halaman 23).

\* Total runtime protokol, termasuk penanganan PAXgene Blood RNA Tube di depan (sentrifugasi, pencucian pelet dan suspensi ulang pelet).



**Gambar 6. Pemurnian RNA yang dapat direproduksi dan diulang.** Rangkap empat sampel darah dari 14 donor secara manual diproses oleh masing-masing 3 teknisi (A, B, C). Tiga set peralatan digunakan, dan semua sampel yang disiapkan oleh satu teknisi diproses menggunakan peralatan yang sama. **[A]** Rata-rata dan simpangan baku hasil RNA per sampel replikasi dari donor yang sama dan teknisi yang berbeda ditampilkan. **[B]** Dua belas sampel darah replikasi dari tiap 14 donor diproses oleh 3 teknisi yang berbeda. Rata-rata dan simpangan baku hasil RNA per sampel dari donor yang sama dan semua teknisi disajikan. Untuk semua sampel RNA, rasio  $A_{260}/A_{280}$  memiliki rentang antara 1,8 hingga 2,2.



**Gambar 7. Keberulangan dan reproduksibilitas hasil RNA untuk operator yang berbeda dan lot PAXgene Blood RNA Kit menggunakan sampel darah yang dikumpulkan.** Sampel darah dari 30 donor yang berbeda ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT; 12 tabung per donor, total 360 tabung). Isi tabung dari 3 donor dikumpulkan, kemudian direalokasikan menjadi 36 sampel. Ke-36 sampel per 3-kumpulan-donor ini secara manual diproses oleh 3 operator yang berbeda. Masing-masing operator menggunakan 3 lot PAXgene Blood RNA Kit yang berbeda untuk ekstraksi dan memproses sampel rangkap empat dari tiap 10 kumpulan donor. [A] Hasil dan simpangan baku RNA untuk setiap kombinasi operator-lot. Sampel darah rangkap empat dari 10 kumpulan donor diproses oleh 3 operator yang berbeda (A, B, C) dengan masing-masing 3 lot kit (1, 2, 3). Rata-rata hasil (kolom) dan simpangan baku (bilah kesalahan) per rangkap empat sampel dari kumpulan donor yang sama untuk operator yang berbeda dan lot kit yang berbeda disajikan. [B] CV hasil RNA per kumpulan donor untuk semua kombinasi operator-lot (A, B, C; 1, 2, 3) seperti yang dihitung dari hasil rata-rata dan simpangan baku hasil ditampilkan dalam Gambar 7A.

Tabel 1A. Reproduksi dalam tiap lot dan dalam tiap pengguna untuk kumpulan donor terpilih (1, 6, 9, 10)

Kombinasi data	Kumpulan donor 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> sel/ml			Kumpulan donor 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> sel/ml		
	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)
Lot 1, pengguna A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Lot 1, pengguna B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Lot 1, pengguna C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Lot 2, pengguna A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Lot 2, pengguna B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Lot 2, pengguna C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Lot 3, pengguna A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Lot 3, pengguna B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Lot 3, pengguna C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Kombinasi data	Kumpulan donor 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> sel/ml			Kumpulan donor 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> sel/ml		
	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)
Lot 1, pengguna A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Lot 1, pengguna B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lot 1, pengguna C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lot 2, pengguna A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lot 2, pengguna B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lot 2, pengguna C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lot 3, pengguna A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lot 3, pengguna B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lot 3, pengguna C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Tabel 1B. Reprodusibilitas dalam tiap pengguna dan antara semua lot untuk kumpulan donor terpilih (1, 6, 9, 10)

Kombinasi data	Kumpulan donor 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> sel/ml			Kumpulan donor 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> sel/ml		
	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)
Pengguna A, semua lot	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Pengguna B, semua lot	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Pengguna C, semua lot	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombinasi data	Kumpulan donor 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> sel/ml			Kumpulan donor 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> sel/ml		
	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)
Pengguna A, semua lot	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Pengguna B, semua lot	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Pengguna C, semua lot	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

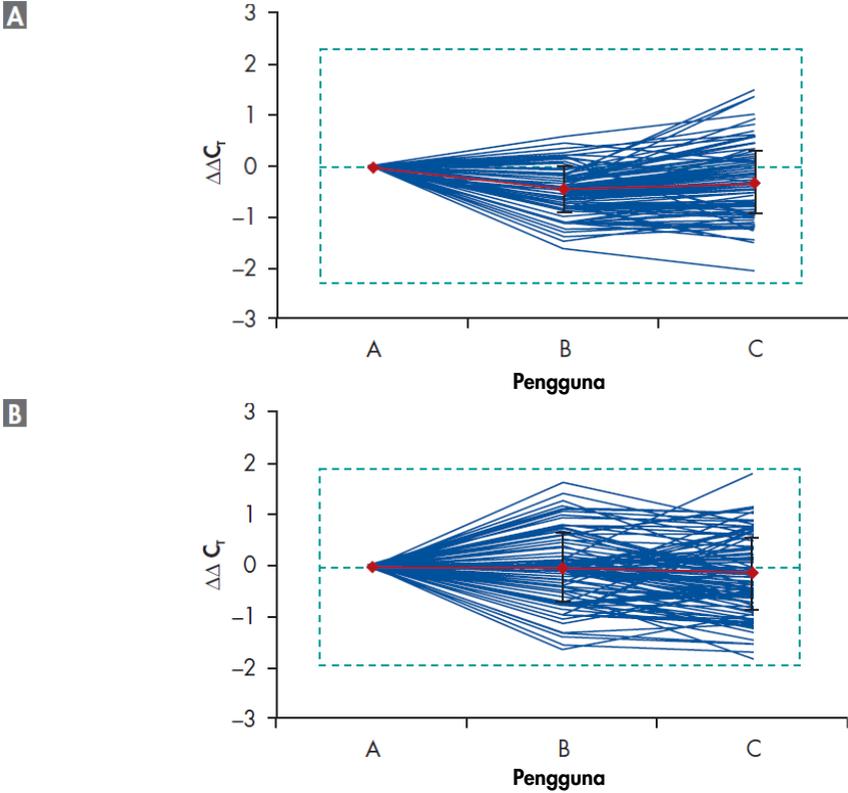
Tabel 1C. Reprodusibilitas dalam tiap lot dan antara semua pengguna untuk kumpulan donor terpilih (1, 6, 9, 10)

Kombinasi data	Kumpulan donor 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> sel/ml			Kumpulan donor 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> sel/ml		
	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)
Lot 1, semua pengguna	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lot 2, semua pengguna	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lot 3, semua pengguna	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombinasi data	Kumpulan donor 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> sel/ml			Kumpulan donor 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> sel/ml		
	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)
Lot 1, semua pengguna	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lot 2, semua pengguna	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lot 3, semua pengguna	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

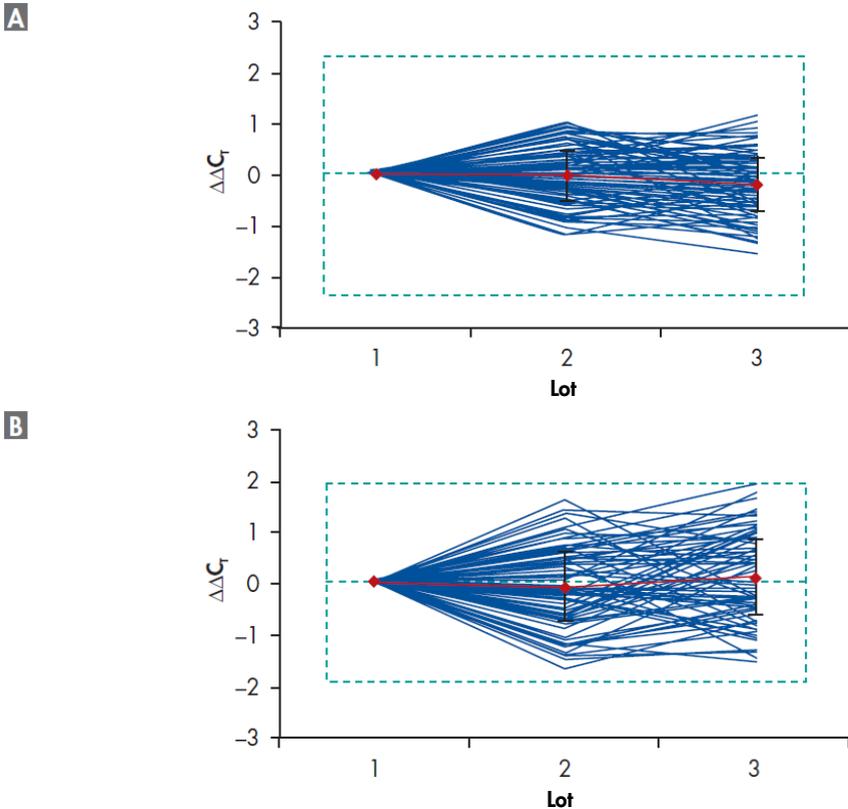
Tabel 1D. Reproduksi antara semua lot dan semua pengguna untuk kumpulan donor terpilih (1, 6, 9, 10)

Kombinasi data	Kumpulan donor 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> sel/ml			Kumpulan donor 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> sel/ml		
	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)
Lot 1, semua pengguna	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Kombinasi data	Kumpulan donor 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> sel/ml			Kumpulan donor 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> sel/ml		
	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)	Rata-rata hasil (µg)	SB (µg)	CV (%)
Lot 1, semua pengguna	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Analisis detail dari 4 kumpulan donor perwakilan. Kumpulan dipilih berdasarkan kadar sel darah putih dan mencerminkan nilai atas, tengah dan bawah dari rentang normal kadar sel darah putih ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leukosit/ml). Jumlah sel darah putih menunjukkan nilai rata-rata 3 kadar sel darah putih dari 3 donor per kumpulan donor.



**Gambar 8. Reproduksi RT-PCR — antara pengguna.** RNA yang dimurnikan dalam eksperimen yang dijelaskan dalam Gambar 7 digunakan untuk real-time RT-PCR. Level transkrip relatif **[A]** FOS dan **[B]** IL1B ditentukan oleh real-time RT-PCR dupleks menggunakan 18S rRNA sebagai standar internal. Nilai untuk semua sampel diplotkan, relatif terhadap nilai untuk pengguna A (10 kumpulan donor x 3 lot kit x 4 replikasi = 120 set data untuk tiap gen), dengan rata-rata (garis merah) dan simpangan baku (bilah hitam) untuk semua sampel yang ditampilkan. Garis putus-putus menunjukkan  $\pm 3x$  total presisi uji kadar (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).



**Gambar 9. Reproduksi RT-PCR — antara lot kit.** RNA yang dimurnikan dalam eksperimen yang dijelaskan dalam Gambar 7 digunakan untuk real-time RT-PCR. Level transkrip relatif **[A]** FOS dan **[B]** IL1B ditentukan oleh real-time RT-PCR dupleks menggunakan 18S rRNA sebagai standar internal. Nilai untuk semua sampel diplotkan, relatif terhadap nilai untuk lot kit 1 (10 kumpulan donor x 3 pengguna x 4 replikasi = 120 set data untuk tiap gen), dengan rata-rata (garis merah) dan simpangan baku (bilah hitam) untuk semua sampel yang ditampilkan. Garis putus-putus menunjukkan  $\pm 3x$  total presisi uji kadar (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).

**Tabel 2. Ringkasan data RT-PCR dari Gambar 8 dan 9**

Sistem pengujian	Uji kadar FOS/18S rRNA		Uji kadar IL1B/18S rRNA	
	Rata-rata ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SB ( $\Delta\Delta C_T$ )	Rata-rata ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SB ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>Reproduksibilitas dalam tiap pengguna dan antara semua lot</b>				
Semua pengguna, lot 1–lot 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Semua pengguna, lot 1–lot 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Semua pengguna, lot 1–lot 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
<b>Reproduksibilitas dalam tiap pengguna dan antara semua lot</b>				
Semua lot, pengguna A–pengguna A	0,00	0,00	0,00	0,00
Semua lot, pengguna A–pengguna B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Semua lot, pengguna A–pengguna C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Pengguna: Teknisi, yang melakukan penelitian.

Lot: Jumlah lot kit yang digunakan dalam penelitian ini.

SB: Simpangan baku.

Nilai rata-rata  $\Delta\Delta C_T$  (N = 120) dan simpangan baku ditunjukkan untuk data yang disajikan dalam Gambar 8 dan 9.

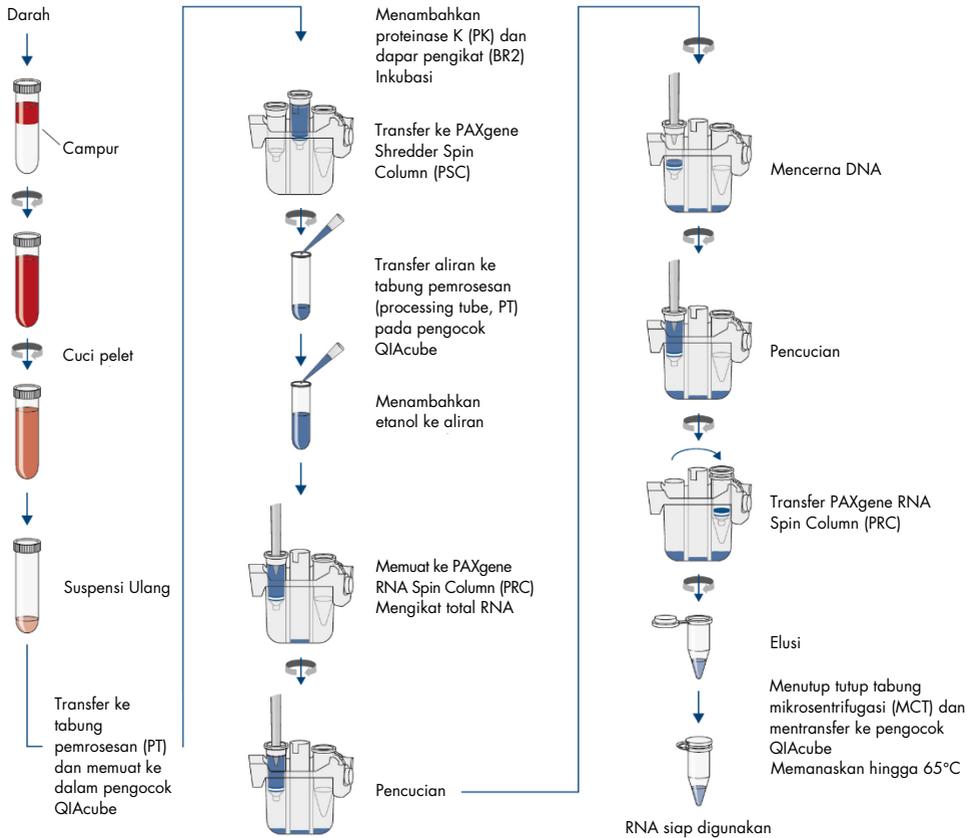
## Pemurnian RNA otomatis

Pemurnian RNA darah dilakukan secara otomatis pada QIAGEN QIAcube Connect MDx atau QIAGEN QIAcube klasik (dalam dokumen ini disebut QIAcube). Instrumen QIAcube yang inovatif menggunakan teknologi canggih untuk memproses kolom putar QIAGEN, sehingga memungkinkan integrasi yang mulus pada penyiapan sampel otomatis dengan hasil rendah dalam alur kerja laboratorium Anda. Penyiapan sampel menggunakan instrumen QIAcube mengikuti tahap yang sama seperti pada prosedur manual (yakni lisis, pengikatan, pencucian dan elusi), sehingga memungkinkan Anda untuk terus menggunakan PAXgene Blood RNA Kit untuk pemurnian RNA berkualitas tinggi.



**Gambar 10. QIAcube Connect MDx.**

Protokol pemurnian RNA otomatis terdiri dari 2 bagian (atau protokol), "PAXgene Blood RNA Part A" dan "PAXgene Blood RNA Part B", dengan intervensi manual singkat antara 2 bagian (lihat Gambar 11, halaman 31).



**Gambar 11. Prosedur PAXgene Blood RNA otomatis.**

Pelet asam nukleat: yang tersentrifugasi, dicuci, dan disuspensi ulang (lihat “Konsentrasi dan pemurnian RNA”, halaman 19) ditransfer dari PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ke dalam tabung pemrosesan (PT), yang diletakkan dalam unit thermoshaker pada meja kerja instrumen QIAcube. Operator memilih dan memulai protokol “PAXgene Blood RNA Part A” dari menu. Instrumen QIAcube menjalankan tahap protokol hingga elusi RNA dalam dapar elusi (BR5). Operator

mentransfer tabung mikrosentrifugasi (MCT) yang berisi RNA yang dimurnikan ke dalam unit thermoshaker instrumen QIAcube. Operator memilih dan memulai protokol "PAXgene Blood RNA Part B" dari menu dan denaturasi panas dilakukan oleh instrumen QIAcube.

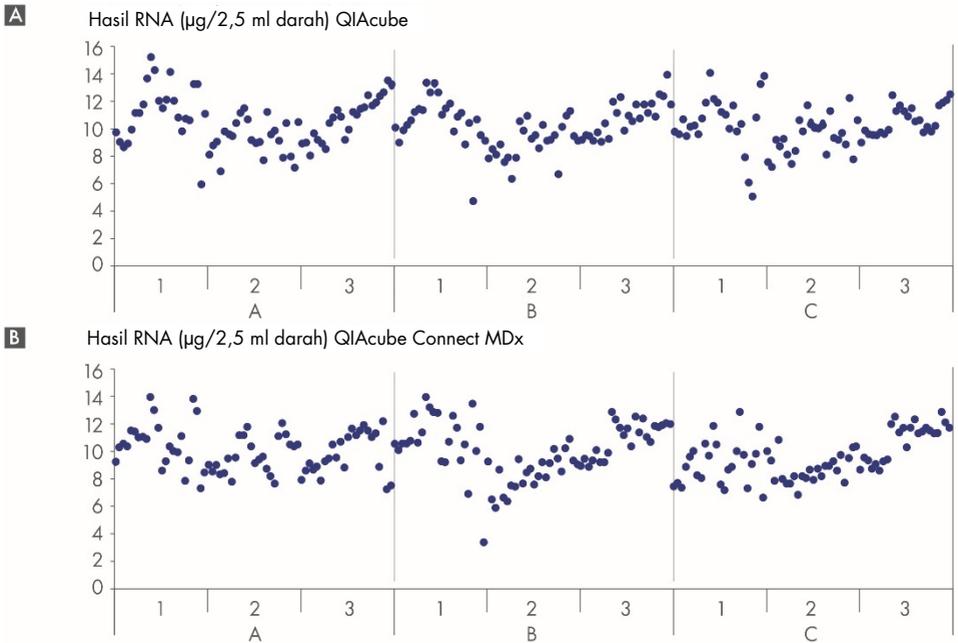
Rata-rata waktu penyiapan sampel (berdasarkan data dari 12 operasi penyiapan sampel) adalah 151 menit\*, dengan waktu praktik yang jauh lebih singkat dibandingkan dengan protokol manual.

RNA yang dihasilkan dari 2,5 ml darah utuh manusia sehat adalah  $\geq 3$   $\mu\text{g}$  untuk  $\geq 95\%$  sampel yang diproses. Gambar 12 (halaman 33) menunjukkan hasil RNA dari total 216 sampel yang disiapkan menggunakan protokol otomatis dengan 3 lot kit oleh 3 operator. Karena sampel darah yang dikumpulkan sebagai ganti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) individu digunakan untuk penelitian ini, hasilnya tidak mencerminkan hasil RNA yang diharapkan dari sampel tunggal ambilan darah individu. Karena hasilnya sangat bergantung pada donor, hasil individu dapat beragam (Gambar 12, halaman 33).

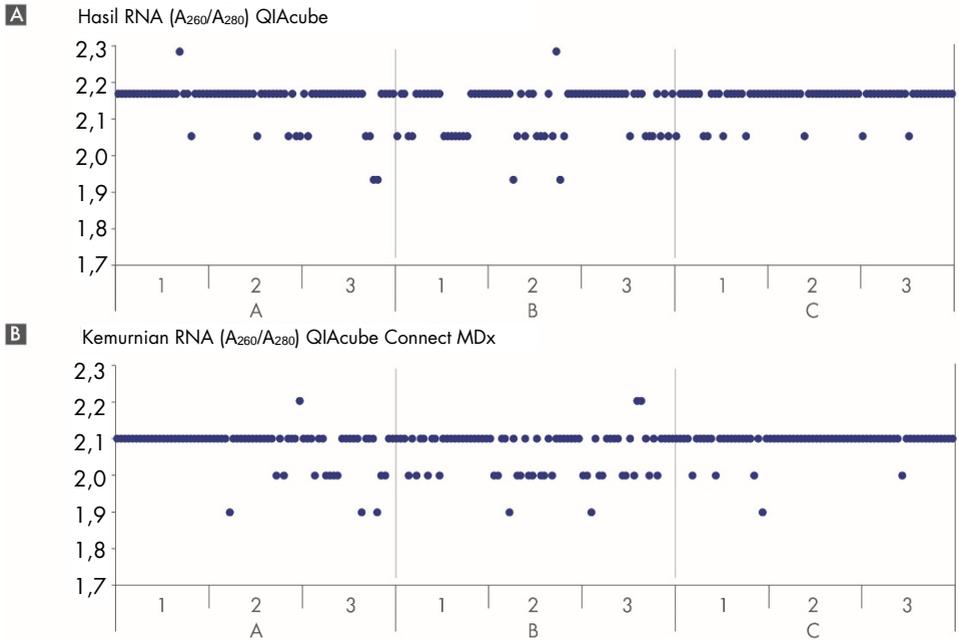
Minimal 95% sampel menunjukkan tidak adanya inhibisi dalam RT-PCR, saat menggunakan hingga 30% eluasi. Dengan protokol otomatis, kontaminasi silang antara sampel tidak dapat terdeteksi, sebagaimana yang diukur oleh real-time RT-PCR kuantitatif dari urutan transkrip ABL1 dan FOS dalam sampel RNA-negatif (air) yang dipasangkan dengan sampel RNA-positif (darah utuh manusia) dalam operasi yang sama.

RNA yang diisolasi dengan PAXgene Blood RNA System dan protokol otomatis bersifat murni, seperti yang ditunjukkan oleh kurangnya inhibisi RT-PCR dan nilai  $A_{260}/A_{280}$  antara 1,8 dan 2,2. DNA genomik muncul dengan nilai  $\leq 1\%$  (w/w) dalam  $\geq 95\%$  dari semua sampel, sebagaimana diukur oleh real-time PCR kuantitatif dari urutan gen beta-aktin. Gambar 13 dan 14 (halaman 34 dan 35) menunjukkan nilai  $A_{260}/A_{280}$  dan DNA genomik relatif dari total 216 sampel yang disiapkan menggunakan protokol otomatis dengan 3 lot kit oleh 3 operator.

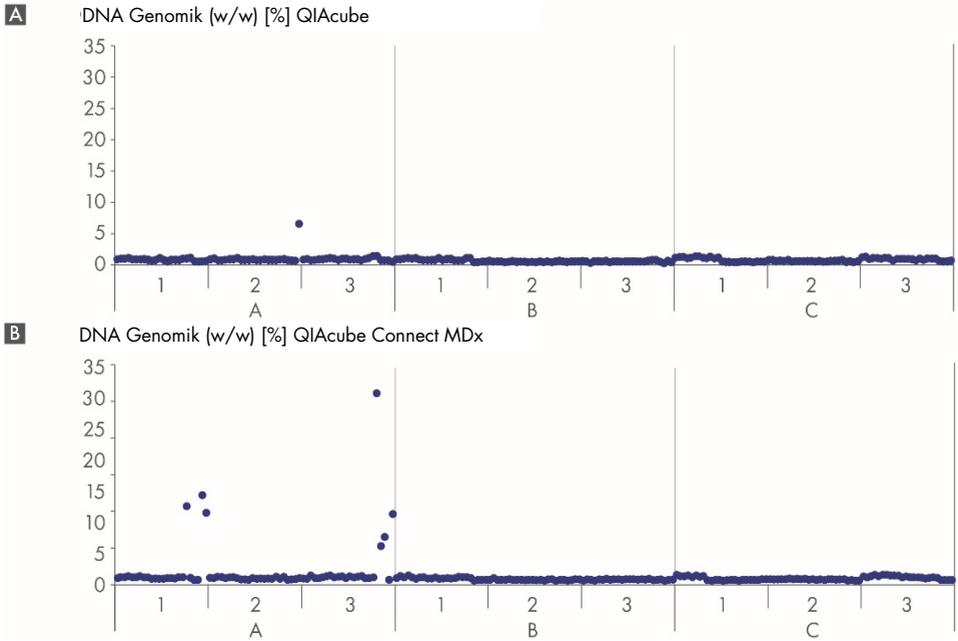
\* Total runtime protokol, termasuk penanganan PAXgene Blood RNA Tube di depan (sentrifugasi, pencucian pelet dan suspensi ulang pelet).



**Gambar 12. Hasil RNA — pemrosesan otomatis A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx.** Sampel darah dari donor individu ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Isi tabung dikumpulkan ke dalam 6 kumpulan donor kemudian direalikuot. Total 216 tabung (yakni 36 per kumpulan) diproses oleh 3 operator yang berbeda (A, B, C). Tiap operator menggunakan 3 lot yang berbeda (1, 2, 3) dari PAXgene Blood RNA Kit untuk ekstraksi otomatis dengan beberapa instrumen QIAcube dan QIAcube Connect MDx dan sampel rangkap empat yang diproses dari masing-masing 6 kumpulan donor. Hasil RNA untuk semua sampel individu ditampilkan untuk setiap kombinasi operator-lot.

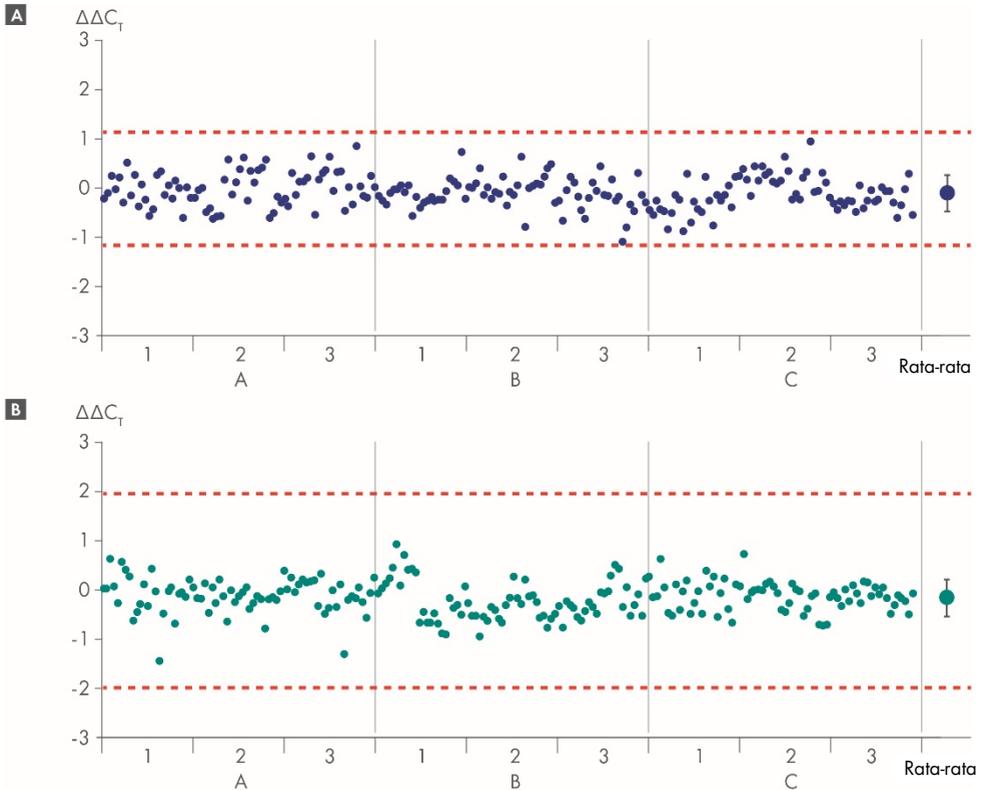


**Gambar 13. Kemurnian RNA (Nilai  $A_{260}/A_{280}$ ) — pemrosesan otomatis. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx** RNA dimurnikan oleh 3 operator yang berbeda (A, B, C) menggunakan 3 lot yang berbeda (1, 2, 3) dari PAXgene Blood RNA Kit dengan beberapa instrumen QIAcube dan QIAcube Connect MDx dalam eksperimen yang dijelaskan dalam Gambar 12. Nilai  $A_{260}/A_{280}$  dari semua sampel individu ditampilkan untuk setiap kombinasi operator-lot.

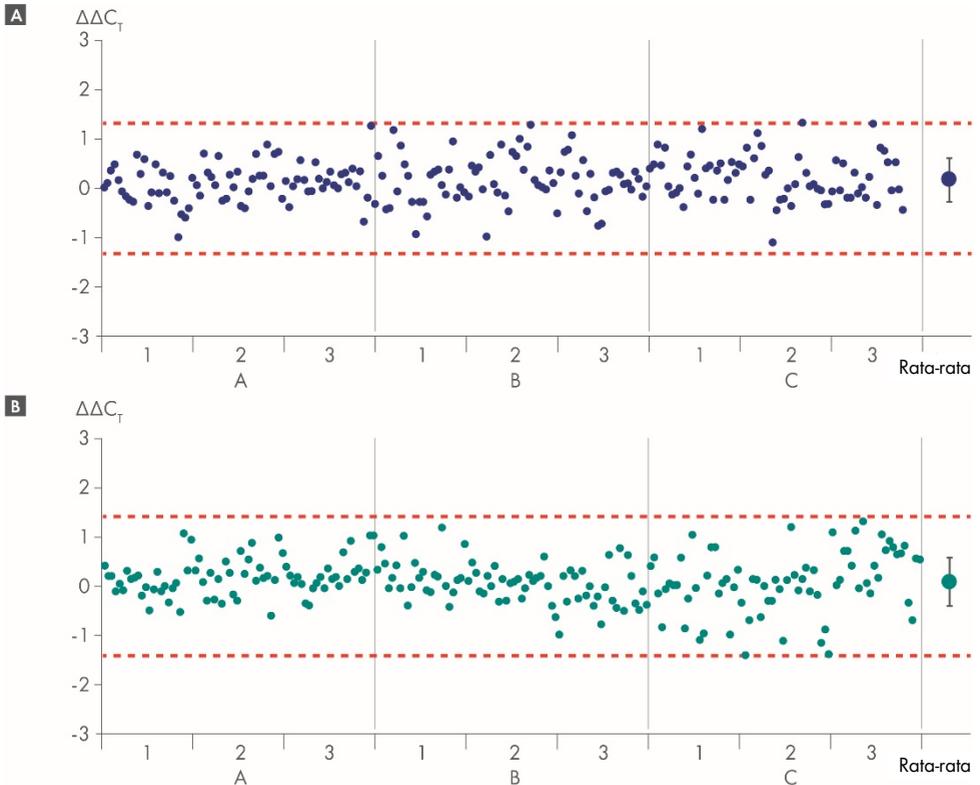


**Gambar 14. Kemurnian RNA (% kontaminasi DNA genomik) — pemrosesan otomatis, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx.** RNA dimurnikan oleh 3 operator yang berbeda (A, B, C) menggunakan 3 lot yang berbeda (1, 2, 3) dari PAXgene Blood RNA Kit dengan beberapa instrumen QIAcube dan QIAcube Connect MDx dalam eksperimen yang dijelaskan dalam Gambar 12. Jumlah DNA genomik (w/w) dalam semua sampel individu ditampilkan untuk setiap kombinasi operator–lot.

Protokol pemurnian RNA otomatis menggunakan PAXgene Blood RNA System memberikan hasil RT-PCR yang sangat dapat direproduksi dan diulang, sebagaimana yang ditunjukkan dalam Gambar 15 dan Gambar 16 (halaman 36 dan 37), sehingga membuatnya sangat kuat untuk uji diagnostik klinis.



**Gambar 15. Reproduksi RT-PCR — antara protokol otomatis (QIAcube) dan manual.** RNA dimurnikan oleh 3 operator yang berbeda (A, B, C) menggunakan 3 lot yang berbeda (1, 2, 3) dari PAXgene Blood RNA Kit dengan beberapa instrumen QIAcube dan QIAcube Connect MDx menggunakan protokol otomatis dalam eksperimen yang dijelaskan dalam Gambar 12. Secara paralel, RNA dimurnikan dari tabung replikasi terkait menggunakan protokol manual. Level transkrip relatif **[A]** FOS dan **[B]** IL1B ditentukan oleh real-time RT-PCR dupleks menggunakan 18S rRNA sebagai standar internal. Kemungkinan perbedaan level transkrip antara RNA yang disiapkan dari sampel darah yang dipasangkan menggunakan kedua protokol ekstraksi (protokol otomatis dan manual) dihitung menggunakan metode  $\Delta\Delta C_T$ . Nilai  $\Delta\Delta C_T$  individu untuk semua pasangan sampel (4 replikasi x 6 kumpulan donor x 3 lot kit x 3 operator = 216 pasang untuk tiap gen) diplotkan sebagai titik tunggal dengan rata-rata (titik besar) dan simpangan baku (bilah hitam) untuk semua sampel yang ditampilkan. Garis putus-putus menunjukkan  $\pm 3x$  total presisi uji kadar (FOS: 1,16  $C_T$ ; IL1B: 1,98  $C_T$ ; presisi uji kadar yang berbeda seperti yang dibandingkan dengan Gambar 1–4, 8, dan 9 karena versi uji kadar yang berbeda).



**Gambar 16. Reproduksi RT-PCR — antara QIAcube dan QIAcube Connect MDx menggunakan protokol otomatis.** RNA dimurnikan oleh 3 operator yang berbeda (A, B, C) menggunakan 3 lot yang berbeda (1, 2, 3) dari PAXgene Blood RNA Kit dengan protokol otomatis pada beberapa instrumen QIAcube dan QIAcube Connect MDx dalam eksperimen yang dijelaskan dalam Gambar 12. Level transkrip relatif **[A]** FOS dan **[B]** IL1B ditentukan oleh real-time RT-PCR dupleks menggunakan 18S rRNA sebagai standar internal. Kemungkinan perbedaan level transkrip antara RNA yang disiapkan dari sampel darah yang dipasangkan menggunakan kedua instrumen dihitung menggunakan metode  $\Delta\Delta C_T$ . Nilai  $\Delta\Delta C_T$  individu untuk semua pasangan sampel (4 replikasi x 6 kumpulan donor x 3 lot kit x 3 operator = 216 pasang untuk tiap gen) diplotkan sebagai titik tunggal dengan rata-rata (titik besar) dan simpangan baku (bilah hitam) untuk semua sampel yang ditampilkan. Garis putus-putus menunjukkan  $\pm 3x$  total presisi uji kadar (FOS: 1,30  $C_T$ ; IL1B: 1,42  $C_T$ ; presisi uji kadar yang berbeda seperti yang dibandingkan dengan Gambar 1–4, 8, 9, dan 15 karena versi uji kadar yang berbeda).

# Peralatan dan Reagen yang perlu Disediakan Pengguna

Saat bekerja dengan bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi selengkapnya, baca lembar data keselamatan (LDK) yang sesuai, tersedia dari pemasok produk.

## Untuk semua protokol

- PAXgene Blood RNA Tube (BRT, PreAnalytiX; no. kat. 762165)
- Etanol (96–100%, p.a. tingkat kemurnian)
- Pipet\* (10  $\mu$ l – 4 ml)
- Ujung pipet bebas-RNase, pelindung aerosol yang steril†
- Gelas ukur‡
- Alat sentrifugasi\* yang dapat mencapai 3000–5000  $\times$  g, dan dilengkapi dengan ember dan rotor berayun untuk menahan PAXgene Blood RNA Tube (BRT)
- Vortex mixer\*
- Es yang dihancurkan
- Pena permanen untuk memberi label

## Untuk protokol manual

- Alat mikrosentrifugasi\* dengan kecepatan variabel yang dapat mencapai rentang minimal 1000–8000  $\times$  g, meski berlaku gaya g yang lebih rendah dan lebih tinggi (lihat tahap protokol untuk detailnya), serta dilengkapi dengan rotor untuk tabung mikrosentrifugasi 2 ml

\* Pastikan perangkat dan instrumen telah diperiksa, dipelihara, dan dikalibrasi secara rutin sesuai dengan rekomendasi produsen.

† Pastikan Anda memahami panduan penanganan RNA (Lampiran A, halaman 71).

‡ Untuk tambahan etanol pada konsentrat Dapar BR4.

- Inkubator–pengocok\* yang dapat melakukan inkubasi pada suhu 55°C dan 65°C serta mengocok dengan kecepatan  $\geq 400$  rpm, tidak melebihi 1400 rpm (misal, Eppendorf® Thermomixer Compact, atau yang setara)

### **Untuk protokol otomatis (menggunakan QIAcube atau QIAcube Connect MDx)**

- Gunting

Komponen habis pakai instrumen QIAcube:

- Filter-Tips, 1000  $\mu$ l (1024) (QIAGEN, no. kat. 990352)<sup>†</sup>
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, no. kat. 990393)<sup>†</sup>
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, no. kat. 990394)<sup>†</sup>

Aksesori instrumen QIAcube:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, no. kat. 990392)<sup>†</sup>

### **Untuk protokol otomatis menggunakan QIAcube Connect MDx**

- QIAcube Connect MDx\* (QIAGEN, no. kat. 9003070)

Paket layanan QIAcube Connect MDx:

- QIAcube Connect MDx System FUL-2 (QIAGEN, no. kat. 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3 (QIAGEN, no. kat. 9003072)
- QIAcube Connect MDx System PRV-1 (QIAGEN, no. kat. 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1 (QIAGEN, no. kat. 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1 (QIAGEN, no. kat. 9003075)

\* Pastikan perangkat dan instrumen telah diperiksa, dipelihara, dan dikalibrasi secara rutin sesuai dengan rekomendasi produsen.

<sup>†</sup> Disertakan juga dalam Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, no. kat. 990395).

## **Untuk protokol otomatis menggunakan QIAcube**

- QIAcube\* (QIAGEN, no. kat. 9001882 [110 V])

\* Pastikan perangkat dan instrumen telah diperiksa, dipelihara, dan dikalibrasi secara rutin sesuai dengan rekomendasi produsen.

# Catatan Penting

## Menggunakan instrumen QIAcube

Pastikan Anda terbiasa mengoperasikan instrumen QIAcube. Harap baca Panduan Pengguna Instrumen QIAcube dan setiap informasi tambahan yang sesuai yang disertakan dengan instrumen QIAcube, dan perhatikan dengan cermat informasi keselamatan, sebelum memulai protokol PAXgene Blood RNA otomatis.

Petunjuk dalam bab ini berlaku untuk QIAcube Connect MDx serta QIAcube yang tidak ditetapkan secara terpisah.

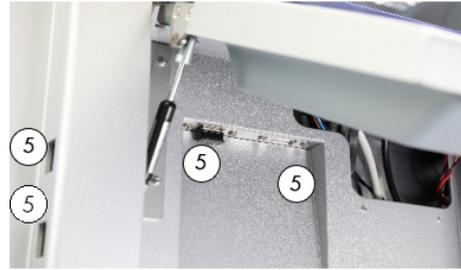
### Memulai instrumen QIAcube

Tutup kap instrumen QIAcube, dan nyalakan instrumen QIAcube dengan sakelar daya (QIAcube Connect MDx: lihat Gambar 17, halaman 42; QIAcube: Gambar 18, halaman 43).

Terdengar bunyi bip dan layar mulai ditampilkan. Instrumen secara otomatis melakukan uji inisialisasi.



Tampilan depan QIAcube Connect MDx



Layar sentuh tarik



Tampilan belakang QIAcube Connect MDx



Tampilan belakang QIAcube Connect MDx

Gambar 17. Fitur eksternal QIAcube Connect MDx.

- |  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>① Layar sentuh</li> <li>② Kap</li> <li>③ Laci limbah</li> <li>④ Sakelar daya</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>⑤ 2 port USB di sebelah kiri layar sentuh; 2 port USB di belakang layar sentuh (modul Wi-Fi tersambung ke 1 port USB)</li> <li>⑥ Port Ethernet RJ-45</li> <li>⑦ Soket kabel daya</li> <li>⑧ Outlet udara pendingin</li> </ul> |
|--|--|



**Gambar 18. Tampilan depan QIAcube.**

- |   |   |   |                                      |
|---|---|---|--------------------------------------|
| ① | Layar sentuh  | ④ | Port USB di belakang panel pelindung |
| ② | Kap   | ⑤ | Sakelar daya                         |
| ③ | Port serial RS232 di belakang panel pelindung<br>(hanya untuk digunakan oleh Spesialis Layanan<br>Instrumen QIAGEN) | ⑥ | Laci limbah                          |

## Layar sentuh

Instrumen QIAcube dikontrol dengan layar sentuh. Layar sentuh memungkinkan pengguna untuk mengoperasikan instrumen dan memandu pengguna melalui pengaturan meja kerja. Selama pemrosesan sampel, layar sentuh menampilkan status protokol dan sisa waktu.



Gambar 19. Layar sentuh tarik QIAcube Connect MDx

## Memasang protokol pada instrumen QIAcube

Pemasangan protokol awal mungkin diperlukan sebelum operasi penyiapan RNA pertama pada instrumen QIAcube dapat dilakukan. Pasang protokol "PAXgene Blood RNA Part A" dan "PAXgene Blood RNA Part B".

Protokol untuk QIAcube Connect MDx tersedia di [www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources](http://www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources) ([www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube) untuk QIAcube) dan perlu diunduh ke stik USB yang disediakan dengan instrumen QIAcube. Protokol ini akan ditransfer ke instrumen melalui port USB.

Port USB (QIAcube Connect MDx: berada di samping layar sentuh, lihat Gambar 17, halaman 42; QIAcube: di belakang panel pelindung, lihat Gambar 18, halaman 43) memungkinkan koneksi instrumen QIAcube ke stik USB yang disediakan dengan instrumen

QIAcube. File data, seperti file log atau file laporan juga dapat ditransfer melalui port USB dari instrumen QIAcube ke stik USB.



Port USB hanya untuk digunakan dengan stik USB yang disediakan dengan QIAGEN. Jangan menghubungkan perangkat lain ke port ini.



Jangan melepaskan stik USB saat mengunduh protokol atau mentransfer file data atau selama operasi protokol.

Untuk detail selengkapnya tentang proses mengunggah protokol ke instrumen QIAcube, silakan lihat buku pegangan terkait untuk instrumen yang digunakan.

## Memuat instrumen QIAcube

Untuk menghemat waktu, pemuatan dapat dilakukan saat satu atau kedua tahap sentrifugasi 10-menit (tahap 3 dan 5) dalam “Protokol: Pemurnian Otomatis Total RNA dari Darah Utuh Manusia yang Ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT)”, halaman 62.

### Botol reagen

Sebelum setiap pengoperasian pada instrumen QIAcube, isi dengan hati-hati 4 botol reagen dengan reagen yang tercantum dalam Tabel 3 (halaman 46) hingga level indikator maksimal atau, jika tidak memungkinkan, hingga level yang diizinkan oleh volume dapar yang diberikan dalam PAXgene Blood RNA Kit. Beri label pada botol dan penutup dengan jelas berisi nama dapar dan letakkan botol reagen yang terisi ke posisi yang sesuai pada rak botol reagen. Muat rak ke atas meja kerja instrumen QIAcube seperti yang ditampilkan (Gambar 20 - 22, halaman 46 - 48).



Volume Dapar BR2 yang diberikan tidak akan mengisi botol reagen hingga level indikator. Dapar BR3 dan BR4 mungkin tidak mengisi botol hingga level indikator setelah memproses beberapa sampel dalam pengoperasian sebelumnya.



Pastikan telah melepas penutup dari botol sebelum meletakkannya ke meja kerja.



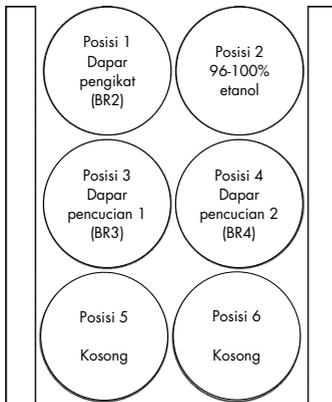
Volume dapar yang diberikan dalam PAXgene Blood RNA Kit (50) cukup untuk maksimal 7 operasi penyiapan RNA pada instrumen QIAcube dengan jumlah sampel 2 hingga 12 per operasi. Secara umum, operasi dengan jumlah sampel yang lebih rendah harus dihindari untuk memproses total 50 sampel per kit dengan maksimal 7 operasi penyiapan RNA. Lebih dari 7 operasi penyiapan RNA dapat menyebabkan volume dapar tidak mencukupi untuk memproses sampel terakhir.

**Tabel 3. Posisi dalam rak botol reagen**

Posisi	Reagen
1	Dapar pengikat (BR2)
2	96-100% etanol
3	Dapar pencucian 1 (BR3)
4	Dapar pencucian 2 (BR4)*
5	– (biarkan kosong)
6	– (biarkan kosong)

\* Dapar pencucian 2 (BR4) diberikan sebagai konsentrat. Sebelum menggunakan untuk pertama kali, tambahkan 4 volume etanol (p.a tingkat kemurnian 96–100%) seperti yang tertera pada botol untuk memperoleh larutan kerja.

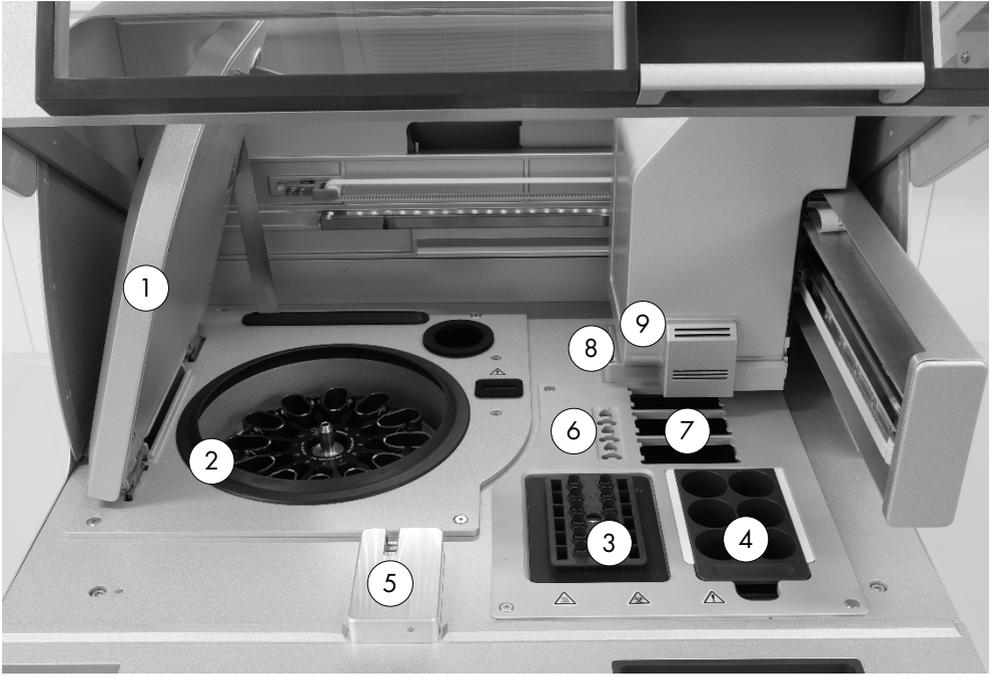
**A**



**B**

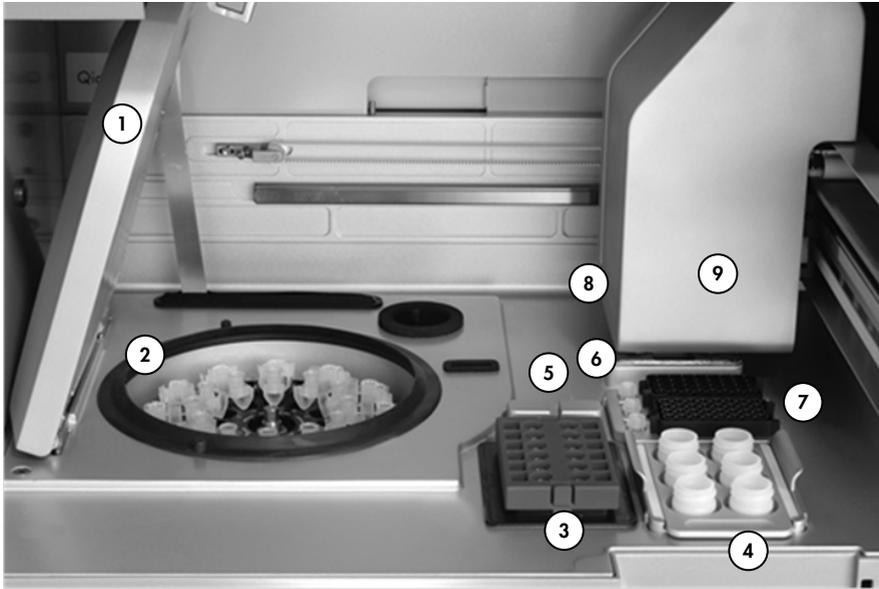


**Gambar 20. Memuat rak botol reagen. [A]** Skema posisi dan isi botol dalam rak botol reagen. **[B]** Memuat rak pada instrumen QIAcube (QIAcube ditampilkan seperti contoh).



**Gambar 21. Tampilan internal QIAcube Connect MDx.**

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>① Penutup alat sentrifugasi</li> <li>② Alat sentrifugasi</li> <li>③ Pengocok</li> <li>④ Rak botol reagen</li> <li>⑤ Sensor ujung dan kunci kap</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>⑥ Slot tabung mikrosentrifugasi</li> <li>⑦ 3 slot untuk rak ujung</li> <li>⑧ Slot pembuang untuk ujung dan kolom</li> <li>⑨ Lengan robotik (termasuk 1 pipet saluran, grip, sensor ultrasonik dan optik serta UV LED)</li> </ul> |
|--|---|



**Gambar 22. Tampilan internal QIAcube.**

- |   |                           |   |                                     |
|---|---------------------------|---|-------------------------------------|
| 1 | Penutup alat sentrifugasi | 6 | Slot tabung mikrosentrifugasi       |
| 2 | Alat sentrifugasi         | 7 | Rak ujung                           |
| 3 | Pengocok                  | 8 | Slot pembuang untuk ujung dan kolom |
| 4 | Rak botol reagen          | 9 | Lengan robotik                      |
| 5 | Sensor ujung              |   |                                     |

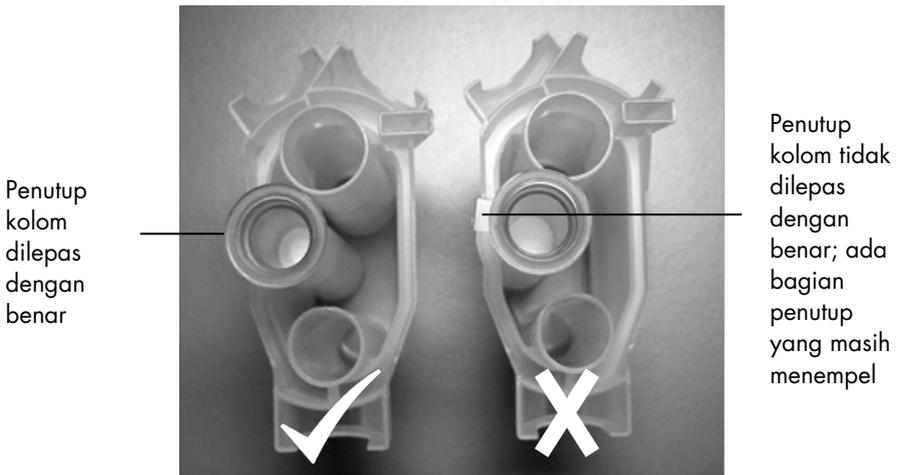
Kolom putar (PRC, PSC), tabung mikrosentrifugasi (MCT), dan peralatan plastik instrumen QIAcube

Letakkan 2 rak ujung yang terisi dengan Filter-Tips 1000 µl pada instrumen QIAcube (lihat Gambar 21 dan 22, halaman 47 dan 48). Isi ulang rak dengan ujung bila perlu.

**i** Hanya gunakan ujung-filter 1000 µl yang dirancang untuk digunakan dengan instrumen QIAcube.

Beri label adaptor rotor dan tabung mikrosentrifugasi (MCT) untuk tiap sampel menggunakan pena permanen. Buka kolom putar PAXgene Shredder (PSC) yang akan digunakan, kemudian potong penutup menggunakan gunting (lihat Gambar 23, halaman 49).

**i** Untuk pengoperasian gripper robotik instrumen QIAcube dengan benar, lepaskan (potong) penutup dan semua bagian plastik yang menghubungkan penutup ke kolom putar PAXgene Shredder (PSC; lihat Gambar 23). Jika tidak, gripper robotik tidak dapat mencengkeram kolom putar (PSC, PRC) dengan benar.



**Gambar 23. Memuat kolom putar PAXgene Shredder (PSC).** Kolom putar PAXgene Shredder (PSC) dimuat ke dalam posisi tengah adaptor rotor. Potong penutup sebelum memuat kolom.

Muat kolom putar PAXgene RNA (PRC), kolom putar PAXgene Shredder (PSC; tanpa penutup, lihat Gambar 23, halaman 49), dan tabung mikrosentrifugasi berlabel ke dalam posisi yang sesuai dalam tiap adaptor rotor berlabel seperti yang ditampilkan dalam Tabel 4 dan Gambar 24.

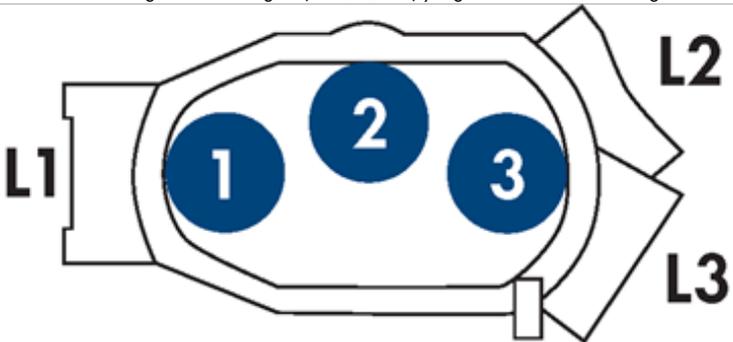


Pastikan bahwa penutup tabung mikrosentrifugasi (MCT) dan kolom putar (PRC) terdorong seluruhnya ke dasar slot di bagian ujung adaptor rotor. Jika tidak, penutup akan rusak selama proses sentrifugasi.

**Tabel 4. Perangkat lab dalam adaptor rotor**

Posisi	Reagen	Posisi penutup
1	Kolom putar PAXgene RNA (merah, PRC)	L1
2	Kolom putar PAXgene Shredder (warna lila, PSC) (potong penutup sebelum diletakkan dalam adaptor rotor)	-
3	Tabung mikrosentrifugasi (MCT)*	L3

\* Gunakan tabung mikrosentrifugasi (MCT; 1,5 ml) yang disertakan dalam PAXgene Blood RNA Kit.



**Gambar 24. Posisi dalam adaptor rotor.** Adaptor rotor memiliki tiga posisi tabung (1–3) dan tiga posisi penutup (L1–L3).

## Memuat alat sentrifugasi

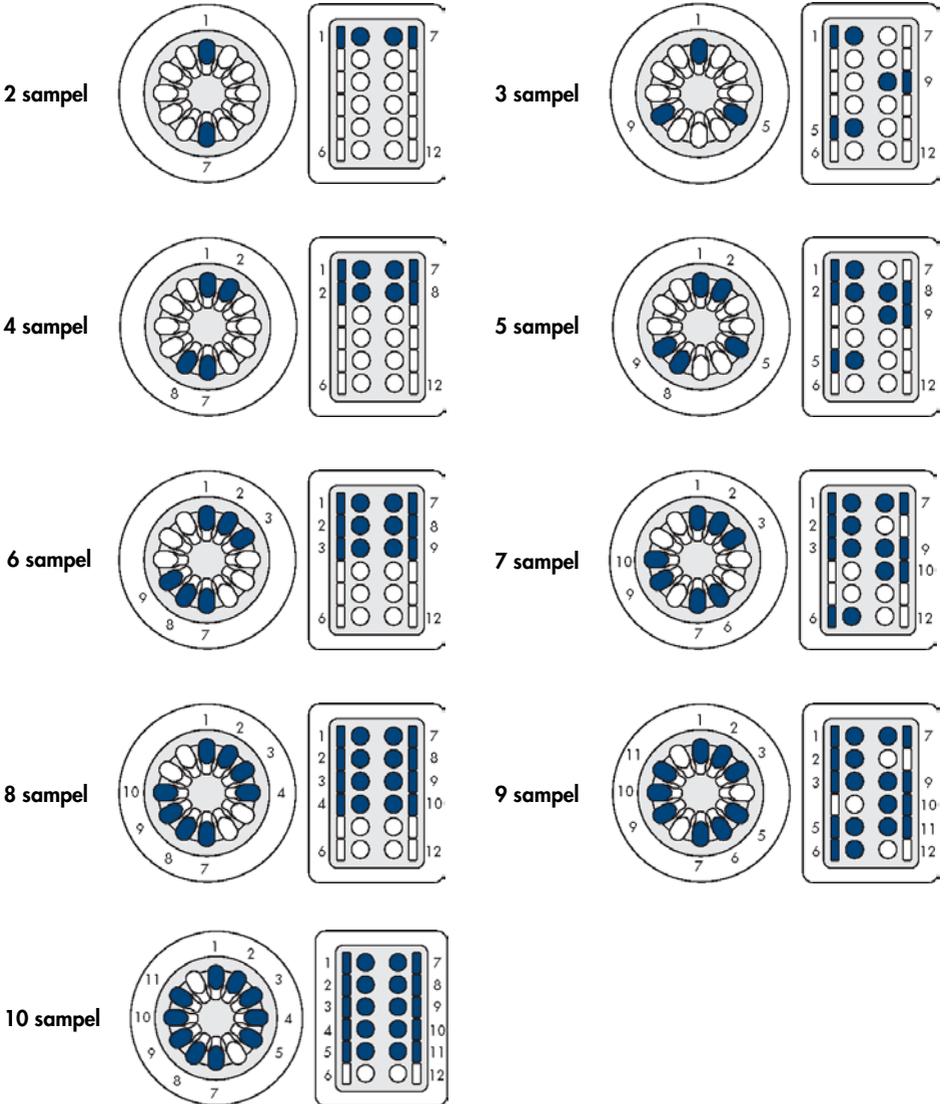
Muat adaptor rotor rakitan ke dalam ember sentrifugasi seperti yang ditampilkan dalam Gambar 25 di bawah.



Jika memproses kurang dari 12 sampel, pastikan telah memuat rotor sentrifugasi seimbang secara radial (lihat Gambar 26, halaman 52). Semua ember sentrifugasi harus terpasang sebelum memulai operasi protokol, bahkan jika kurang dari 12 sampel yang akan diproses. Sampel tunggal (satu) atau 11 sampel tidak dapat diproses.



**Gambar 25. Memuat alat sentrifugasi pada instrumen QIAcube.** Muat adaptor rotor rakitan ke dalam ember sentrifugasi (QIAcube Connect MDx ditampilkan sebagai contoh).



**Gambar 26. Memuat alat sentrifugasi dan pengocok.** Posisi alat sentrifugasi dan pengocok ditampilkan untuk memproses mulai dua (2) hingga sepuluh (10) sampel. Satu (1) atau 11 sampel tidak dapat diproses. Untuk memproses 12 sampel, semua posisi alat sentrifugasi dan pengocok dimuat (gambar tidak ditampilkan).

## Tabung pemrosesan (PT)

Lepaskan setiap tabung pemrosesan (PT) yang ada pada slot tabung mikrosentrifugasi dari operasi sebelumnya (QIAcube Connect MDx: lihat Gambar 21, halaman 47, QIAcube: lihat Gambar 22, halaman 48). Isi 3 tabung pemrosesan (PT) dengan jumlah reagen yang tertera dalam Tabel 5 sesuai dengan jumlah sampel yang sedang dalam pengoperasian.

Untuk campuran inkubasi DNase I, teteskan dengan pipet volume dapar cerna DNA (RDD) yang diindikasikan ke dalam tabung pemrosesan (PT) dan tambahkan volume larutan stok DNase I (RNFD) yang diindikasikan. Campurkan dengan meneteskan dengan pipet secara perlahan campuran lengkap naik dan turun 3 kali menggunakan ujung pipet 1000 µl.

Gunakan tabung pemrosesan (PT) 2 ml yang disertakan dalam PAXgene Blood RNA Kit. Beri label pada tabung dengan jelas bertuliskan nama reagen dan letakkan pada posisi yang benar dalam slot tabung mikrosentrifugasi, seperti yang tercantum dalam Tabel 6 (dalam 54).



DNase I (RNFD) sangat sensitif terhadap denaturasi fisik. Campurkan hanya menggunakan pipet, dengan ujung pipet berlubang lebar untuk mengurangi geseran. Jangan melakukan proses vorteks.



Pastikan hanya memasukkan dengan pipet sejumlah volume yang diperlukan seperti yang tertera dalam Tabel 5 di bawah.

**Tabel 5. Volume reagen yang diperlukan dalam tabung pemrosesan untuk slot tabung mikrosentrifugasi.**

Jumlah sampel	Volume reagen untuk jumlah sampel yang terindikasi (µl)		
	Proteinase K (PK)	Campuran inkubasi DNase I	Dapar elusi (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1177

**Tabel 6. Slot tabung mikrosentrifugasi**

	Posisi		
	A	B	C
<b>Isi</b>	Proteinase K	Campuran inkubasi DNase I	Dapar elusi (BR5)
<b>Pembuluh</b>	Tabung pemrosesan (PT)*	Tabung pemrosesan (PT)*	Tabung pemrosesan (PT)*

\* Gunakan tabung pemrosesan 2 ml yang disertakan dalam PAXgene Blood RNA Kit.

# Protokol: Pemurnian Manual Total RNA dari Darah Utuh Manusia yang Ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT)

Poin penting sebelum memulai

- Pastikan bahwa kotak kit utuh dan tidak rusak, serta dapar tidak bocor. Jangan gunakan kit yang sudah rusak.
- Saat menggunakan pipet, pastikan bahwa pipet telah diatur pada volume yang tepat dan cairan dapat tersalurkan dan teraspirasi dengan akurat dan benar.
- Untuk menghindari transfer sampel ke kolom putar atau tabung yang salah, pastikan bahwa semua tabung dan kolom putar telah diberi label dengan benar menggunakan pena permanen. Beri label pada penutup dan bodi tiap tabung (PT, MCT). Untuk kolom putar, beri label pada bodi tabung pemrosesannya (PT). Tutup tiap tabung atau kolom putar setelah cairan ditransfer ke dalamnya.
- Tumpahan sampel dan dapar selama prosedur dapat menurunkan hasil dan kemurnian RNA.
- Kecuali jika diindikasikan lain, semua tahap dalam protokol ini, termasuk tahap sentrifugasi, harus dilakukan dalam suhu ruang (15–25°C).

Karena sensitivitas teknologi amplifikasi asam nukleat, tindakan pencegahan berikut diperlukan saat menangani sampel untuk menghindari kontaminasi silang:

- Berhati-hatilah dalam memasukkan sampel ke dalam kolom putar (PRC, PSC) menggunakan pipet agar tidak melembapkan pelek kolom.
- Selalu ganti ujung pipet di antara transfer cairan. Gunakan ujung pipet pelindung aerosol.
- Hindari menyentuh membran kolom putar (PRC, PSC) dengan ujung pipet.

- Setelah melakukan proses vorteks atau memanaskan tabung mikrosentrifugasi (MCT), lakukan sentrifugasi singkat untuk menghilangkan tetesan dari dalam penutup.
- Kenakan sarung tangan sepanjang prosedur. Jika terjadi kontak antara sarung tangan dan sampel, segera ganti sarung tangan.
- Tutup kolom putar (PRC, PSC) sebelum meletakkannya dalam alat mikrosentrifugasi. Alat sentrifugasi sebagaimana yang dijelaskan dalam prosedur.
- Hanya buka satu kolom putar (PRC, PSC) dalam satu waktu dan berhati-hatilah agar tidak menghasilkan aerosol.
- Agar pemrosesan paralel beberapa sampel efisien, isi rak dengan tabung pemrosesan (PT) di mana kolom putar (PRC, PSC) dapat ditransfer setelah proses sentrifugasi. Buang tabung pemrosesan (PT) yang berisi aliran, lalu letakkan tabung pemrosesan (PT) baru yang berisi kolom putar (PRC, PSC) secara langsung dalam alat mikrosentrifugasi.

#### Hal yang harus dilakukan sebelum memulai

- Darah harus ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sesuai dengan petunjuk dalam *Buku Pegangan PAXgene Blood RNA Tube*. Bila perlu, lihat Lampiran C (halaman 74) untuk rekomendasi tentang penanganan PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
- Pastikan bahwa PAXgene Blood RNA Tube (BRT) diinkubasi selama minimal 2 jam pada suhu ruang setelah penampungan darah guna memastikan lisis sel darah telah selesai. Inkubasi PAXgene Blood RNA Tube (BRT) selama semalam dapat meningkatkan hasil. Jika PAXgene Blood RNA Tube (BRT) disimpan pada suhu 2–8°C, –20°C atau –70°C setelah penampungan darah, pertama-tama ekuilibirasi hingga suhu ruang kemudian simpan pada suhu ruang selama 2 jam sebelum memulai prosedur.
- Baca informasi keselamatan di halaman 10.
- Baca panduan tentang penanganan RNA (Lampiran A, halaman 71).
- Pastikan bahwa instrumen, seperti pipet dan inkubator–pengocok, telah diperiksa dan dikalibrasi secara rutin sesuai dengan rekomendasi produsen.
- Inkubator–pengocok diperlukan dalam tahap 5 dan 20. Atur suhu inkubator–pengocok menjadi 55°C.

- Dapar pengikat (BR2) dapat membentuk endapan karena penyimpanan. Bila perlu, hangatkan hingga 37°C untuk melarutkan.
- Dapar pencucian 2 (BR4) diberikan sebagai konsentrat. Sebelum menggunakan untuk pertama kali, tambahkan 4 volume etanol (p.a tingkat kemurnian 96–100%) seperti yang tertera pada botol untuk memperoleh larutan kerja.
- Jika menggunakan Set RNase-Free DNase untuk pertama kali, siapkan larutan stok DNase I. Larutkan DNase I padat (RNFD; 1500 satuan Kunitz)\* dalam 550 µl dapar suspensi ulang DNase (DRB) yang disediakan dengan set. Berhati-hatilah agar tidak ada DNase I (RNFD) yang hilang saat membuka vial. Jangan melakukan proses vorteks pada DNase I yang disusun ulang (RNFD). DNase I sangat sensitif terhadap denaturasi fisik. Pencampuran hanya dapat dilakukan dengan membalikkan vial secara perlahan.
- Data terkini menunjukkan bahwa DNase I yang disusun ulang (RNFD) dapat disimpan pada suhu 2–8°C hingga 6 minggu. Untuk penyimpanan DNase I (RNFD) dalam jangka waktu lama, bersihkan larutan stok dari vial kaca, pisahkan ke dalam alikuot sekali pakai (gunakan tabung mikrosentrifugasi [MCT] 1,5 ml yang disediakan dengan kit; tersedia cukup untuk 5 alikuot) dan simpan pada suhu –20°C hingga 9 bulan. Alikuot yang dicairkan dapat disimpan pada suhu 2–8°C hingga 6 minggu. Jangan bekukan kembali alikuot setelah dicairkan.
- Saat menyusun ulang dan mengalikuot DNase I (RNFD), pastikan Anda mengikuti panduan untuk penanganan RNA (Lampiran A, halaman 71).

\* Satuan Kunitz adalah satuan yang paling sering digunakan untuk mengukur DNase I, ditetapkan sebagai jumlah DNase I yang menyebabkan peningkatan dalam  $A_{260}$  dari 0,001 per menit per mililiter pada 25°C, pH 5,0, dengan DNA terpolimerisasi tinggi sebagai substrat (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* **33**, 349, dan 363).

## Prosedur

1. Sentrifugasi PAXgene Blood RNA Tube (BRT) selama 10 menit pada 3000–5000 x g menggunakan rotor berayun.
  -  Pastikan sampel darah telah diinkubasi dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT) selama minimal 2 jam pada suhu ruang (15–25°C) agar lisis sel darah selesai.
  -  Rotor harus berisi adaptor tabung untuk tabung berdasar bulat. Jika menggunakan adaptor tabung tipe lain, tabung dapat pecah selama sentrifugasi.
2. Bersihkan supernatan dengan dekantasi atau menggunakan pipet. Tambahkan 4 ml Air Bebas-RNase (RNase-Free Water, RNF<sub>W</sub>) pada pelet lalu tutup tabung menggunakan penutup BD Hemogard sekunder baru (tersedia dengan kit).

Jika supernatan didekantasi, berhati-hatilah agar tidak mengganggu pelet dan keringkan pelek tabung dengan kertas tisu bersih.
3. Lakukan proses vorteks hingga pelet tampak larut dan sentrifugasi selama 10 menit pada 3000–5000 x g menggunakan rotor berayun. Bersihkan dan buang seluruh supernatan. Serpihan kecil yang tersisa dalam supernatan setelah proses vorteks, namun sebelum sentrifugasi, tidak akan memengaruhi prosedur.
  -  Pembersihan supernatan yang tidak tuntas akan menghalangi lisis dan mengencerkan lisat, sehingga memengaruhi kondisi pengikatan RNA pada membran PAXgene.
4. Tambahkan 350 µl dapar suspensi ulang (BR1) dan vorteks hingga pelet tampak larut.
5. Masukkan sampel menggunakan pipet ke dalam tabung mikrosentrifugasi (MCT) 1,5 ml. Tambahkan 300 µl dapar pengikat (BR2) dan 40 µl proteinase K (PK). Campurkan melalui proses vorteks selama 5 detik dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 55°C menggunakan inkubator–pengocok pada kecepatan 400–1400 rpm. Setelah inkubasi, atur suhu inkubator–pengocok menjadi 65°C (untuk tahap 20).
  -  Jangan mencampurkan dapar pengikat (BR2) dan proteinase K (PK) sebelum menambahnya ke sampel.

6. Masukkan lisat dengan pipet secara langsung ke dalam kolom putar PAXgene Shredder (PSC; warna lila) yang diletakkan dalam tabung pemrosesan (PT) 2 ml dan sentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan maksimal (tetapi tidak melebihi 20.000 x g).



Masukkan lisat menggunakan pipet dengan hati-hati ke dalam kolom putar (PSC) dan periksa bahwa lisat tertransfer sepenuhnya ke kolom putar (PSC).

Untuk mencegah kerusakan pada kolom (PSC) dan tabung (PT), jangan melampaui 20.000 x g.



Beberapa sampel dapat mengalir melalui kolom putar PAXgene Shredder (PSC) tanpa sentrifugasi. Hal ini terjadi karena viskositas rendah pada beberapa sampel dan sebaiknya tidak dianggap sebagai indikasi kegagalan produk.

7. Transfer seluruh supernatan fraksi aliran dengan hati-hati ke tabung mikrosentrifugasi (MCT) 1,5 ml baru tanpa mengganggu pelet dalam tabung pemrosesan.

8. Tambahkan 350 µl etanol (96–100%, p.a. tingkat kemurnian). Campurkan melalui proses vorteks dan sentrifugasi sebentar (1–2 detik pada 500–1000 x g) untuk menghilangkan tetesan dari dalam penutup tabung.



Durasi sentrifugasi tidak boleh melebihi 1–2 detik, karena hal ini dapat menyebabkan pembentukan pelet dari asam nukleat: dan mengurangi hasil total RNA.

9. Masukkan 700 µl sampel menggunakan pipet ke dalam kolom putar PAXgene RNA (PRC; merah) letakkan dalam tabung pemrosesan (PT) 2 ml dan sentrifugasi selama 1 menit pada 8000–20.000 x g. Letakkan kolom putar (PRC) dalam tabung pemrosesan (PT) 2 ml baru dan buang tabung pemrosesan (PT) lama yang mengandung aliran.

10. Masukkan dengan pipet sampel yang tersisa ke dalam kolom putar PAXgene RNA (PRC) menggunakan pipet dan sentrifugasi selama 1 menit 8000–20.000 x g. Letakkan kolom putar (PRC) dalam tabung pemrosesan (PT) 2 ml baru dan buang tabung pemrosesan (PT) lama yang mengandung aliran.



Masukkan sampel ke dalam kolom putar (PRC) menggunakan pipet dengan hati-hati dan periksa bahwa sampel seluruhnya tertransfer ke kolom putar (PRC).

11. Masukkan 350 µl dapar pencucian 1 (BR3) menggunakan pipet ke dalam kolom putar PAXgene RNA (PRC). Sentrifugasi selama 1 menit pada 8000–20.000 x g. Letakkan kolom putar (PRC) dalam tabung pemrosesan (PT) 2 ml baru dan buang tabung pemrosesan (PT) lama yang mengandung aliran.

12. Tambahkan 10 µl larutan stok DNase I (RNFD) ke dalam 70 µl dapar cerna DNA (RDD) dalam tabung mikrosentrifugasi (MCT) 1,5 ml. Campurkan dengan menjentik tabung perlahan dan sentrifugasi sebentar untuk menampung cairan residu dari sisi-sisi tabung. Jika memproses, misalnya, 10 sampel, tambahkan 100 µl larutan stok DNase I (RNFD) ke dalam 700 µl dapar cerna DNA (RDD). Gunakan tabung mikrosentrifugasi (MCT) 1,5 ml yang tersedia dengan kit.



DNase I sangat sensitif terhadap denaturasi fisik. Pencampuran hanya dapat dilakukan dengan menjentik tabung perlahan. Jangan melakukan proses vorteks.

13. Masukkan campuran inkubasi DNase I (RNFD) (80 µl) secara langsung ke membran kolom putar PAXgene RNA (PRC) dan letakkan di atas meja (20–30°C) selama 15 menit.



Pastikan agar campuran inkubasi DNase I (RNFD) diletakkan secara langsung pada membran. Pencernaan DNase tidak akan tuntas jika bagian campuran diterapkan pada dan tersisa di dinding atau cincin-O kolom putar (PRC).

14. Masukkan 350 µl dapar pencucian 1 (BR3) ke dalam kolom putar PAXgene RNA (PRC) menggunakan pipet lalu lakukan sentrifugasi selama 1 menit pada 8000–20.000 x g. Letakkan kolom putar (PRC) dalam tabung pemrosesan (PT) 2 ml baru dan buang tabung pemrosesan (PT) lama yang mengandung aliran.

15. Masukkan 500 µl dapar pencucian 2 (BR4) ke dalam kolom putar PAXgene RNA (PRC) menggunakan pipet lalu lakukan sentrifugasi selama 1 menit pada 8000–20.000 x g. Letakkan kolom putar (PRC) dalam tabung pemrosesan (PT) 2 ml baru dan buang tabung pemrosesan (PT) lama yang mengandung aliran.



Dapar pencucian 2 (BR4) diberikan sebagai konsentrat. Pastikan etanol telah ditambahkan ke dapar pencucian 2 (BR4) sebelum digunakan (lihat “Hal yang harus dilakukan sebelum memulai”, halaman 56).

16. Tambahkan 500 µl dapar pencucian 2 (BR4) lain ke kolom putar PAXgene RNA (PRC). Lakukan proses sentrifugasi selama 3 menit pada 8000–20.000 x g.

17. Buang tabung pemrosesan (PT) yang mengandung aliran dan letakkan kolom putar PAXgene RNA (PRC) dalam tabung pemrosesan (PT) 2 ml baru. Lakukan proses sentrifugasi selama 1 menit pada 8000–20.000 x g.

18. Buang tabung pemrosesan (PT) yang mengandung aliran. Letakkan kolom putar PAXgene RNA (PRC) dalam tabung mikrosentrifugasi (MCT) 1,5 ml dan masukkan 40 µl dapar elusi (BR5) menggunakan pipet secara langsung pada membran kolom putar PAXgene RNA (PRC). Lakukan proses sentrifugasi selama 1 menit pada 8000–20.000 x g untuk mengelusi RNA.

Penting untuk membasahi seluruh membran dengan dapar elusi (BR5) untuk mencapai efisiensi elusi maksimal.

19. Ulangi tahap elusi (tahap 18) seperti yang dijelaskan, menggunakan 40 µl dapar elusi (BR5) dan tabung mikrosentrifugasi yang sama (MCT).

20. Inkubasi eluat selama 5 menit pada suhu 65°C dalam inkubator-pengocok (dari tahap 5) tanpa mengocok. Setelah inkubasi, segera dinginkan di es.

Inkubasi pada suhu 65°C ini akan mendenaturasi RNA untuk aplikasi hilir. Jangan melampaui suhu dan waktu inkubasi.

21. Jika sampel RNA tidak akan digunakan langsung, simpan pada suhu –20°C atau –70°C.

Karena RNA tetap terdenaturasi setelah pembekuan dan pencairan berulang, pengulangan inkubasi pada suhu 65°C tidak perlu dilakukan. Jika menggunakan sampel RNA dalam uji kadar diagnostik, ikuti petunjuk yang diberikan oleh produsen.

Untuk kuantifikasi RNA yang akurat dengan daya serap di 260 nm, kami merekomendasikan pengenceran sampel dengan 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. \* Pengenceran sampel dalam RNase-Free Water dapat menyebabkan nilai rendah yang tidak akurat.

Atur spektrofotometer ke nol menggunakan blangko yang terdiri dari dapar elusi dengan proporsi yang sama (BR5) dan dapar Tris-HCl seperti dalam sampel yang perlu diukur.

Dapar elusi (BR5) memiliki daya serap tinggi di 220 nm, yang dapat menyebabkan level daya serap latar belakang yang tinggi jika spektrofotometer tidak diatur ke nol dengan tepat.



Untuk kuantifikasi dalam dapar Tris HCl, gunakan hubungan  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44$  µg/ml. Lihat Lampiran B, halaman 72.

\* Saat bekerja dengan bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi selengkapnya, baca lembar data keselamatan (LDK) yang sesuai, tersedia dari pemasok produk.

# Protokol: Pemurnian Otomatis Total RNA dari Darah Utuh Manusia yang Ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT)

Poin penting sebelum memulai

- Pastikan bahwa kotak kit utuh dan tidak rusak, serta dapar tidak bocor. Jangan gunakan kit yang sudah rusak.
- Saat menggunakan pipet, pastikan bahwa pipet telah diatur pada volume yang tepat, dan cairan dapat tersalurkan dan teraspirasi dengan akurat dan benar.
- Agar sampel tidak tertransfer pada komponen habis pakai dari plastik dan tabung yang salah, pastikan bahwa semua tabung pemrosesan (PT), tabung mikrosentrifugasi (MCT) dan adaptor rotor diberi label dengan tepat menggunakan pena permanen. Beri label pada bodi tiap tabung mikrosentrifugasi (MCT), bodi tiap tabung pemrosesan (PT) dan dinding luar setiap adaptor rotor.
- Tumpahan sampel dan dapar selama prosedur dapat menurunkan hasil dan kemurnian RNA.
- Kecuali jika diindikasikan lain, semua tahap dalam protokol ini, termasuk tahap sentrifugasi, harus dilakukan dalam suhu ruang (15–25°C).

Karena sensitivitas teknologi amplifikasi asam nukleat, tindakan pencegahan berikut diperlukan saat menangani sampel untuk menghindari kontaminasi silang:

- Masukkan sampel secara hati-hati menggunakan pipet ke dalam tabung pemrosesan (PT), ke dalam dasar tabung tanpa melembapkan pelek tabung.
- Selalu ganti ujung pipet di antara transfer cairan. Gunakan ujung pipet pelindung aerosol.
- Hindari menyentuh membran kolom putar (PRC, PSC) dengan ujung pipet.

- Setelah melakukan proses vorteks atau memanaskan tabung mikrosentrifugasi (MCT), lakukan sentrifugasi singkat untuk menghilangkan tetesan dari dalam penutup.
- Kenakan sarung tangan sepanjang prosedur. Jika terjadi kontak antara sarung tangan dan sampel, segera ganti sarung tangan.

### Hal yang harus dilakukan sebelum memulai

- Darah harus ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sesuai dengan petunjuk dalam *Buku Pegangan PAXgene Blood RNA Tube*. Bila perlu, lihat Lampiran C (halaman 74) untuk rekomendasi tentang penanganan PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
- Pastikan bahwa PAXgene Blood RNA Tube (BRT) diinkubasi selama minimal 2 jam pada suhu ruang setelah penampungan darah guna memastikan lisis sel darah telah selesai. Inkubasi PAXgene Blood RNA Tube (BRT) selama semalam dapat meningkatkan hasil. Jika PAXgene Blood RNA Tube (BRT) disimpan pada suhu 2–8°C, –20°C atau –70°C setelah penampungan darah, pertama-tama ekuilibirasi hingga suhu ruang kemudian simpan pada suhu ruang selama 2 jam sebelum memulai prosedur.
- Baca informasi keselamatan di halaman 10.
- Baca “Catatan Penting”, halaman 41.
- Baca panduan tentang penanganan RNA (Lampiran A, halaman 71).
- Baca Panduan Pengguna instrumen QIAcube dan setiap informasi tambahan yang sesuai yang disertakan dengan instrumen QIAcube, dengan memberi perhatian cermat terhadap informasi keselamatan.
- Pastikan bahwa perangkat dan instrumen, seperti pipet dan instrumen QIAcube, telah diperiksa dan dikalibrasi secara rutin sesuai dengan rekomendasi produsen.
- Dapur pengikat (BR2) dapat membentuk endapan karena penyimpanan. Bila perlu, hangatkan hingga 37°C untuk melarutkan.
- Dapur pencucian 2 (BR4) diberikan sebagai konsentrat. Sebelum menggunakan untuk pertama kali, tambahkan volume etanol yang sesuai (96–100%, p.a. tingkat kemurnian) seperti yang tercantum pada botol untuk memperoleh larutan kerja.

- Jika menggunakan Set RNase-Free DNase untuk pertama kali, siapkan larutan stok DNase I. Larutkan DNase I padat (RNFD; 1500 satuan Kunitz)\* dalam 550 µl dapar suspensi ulang DNase (DRB) yang disediakan dengan set. Berhati-hatilah agar tidak ada DNase I (RNFD) yang hilang saat membuka vial. Jangan melakukan proses vorteks pada DNase I yang disusun ulang (RNFD). DNase I sangat sensitif terhadap denaturasi fisik. Pencampuran hanya dapat dilakukan dengan membalikkan vial secara perlahan.
- Data terkini menunjukkan bahwa DNase I yang disusun ulang (RNFD) dapat disimpan pada suhu 2–8°C hingga 6 minggu. Untuk penyimpanan DNase I (RNFD) dalam jangka waktu lama, bersihkan larutan stok dari vial kaca, pisahkan ke dalam alikuot sekali pakai (gunakan tabung mikrosentrifugasi [MCT] 1,5 ml yang disediakan dengan kit; tersedia cukup untuk 5 alikuot), dan simpan pada suhu –20°C hingga 9 bulan. Alikuot yang dicairkan dapat disimpan pada suhu 2–8°C hingga 6 minggu. Jangan bekukan kembali alikuot setelah dicairkan.
- Saat menyusun ulang dan mengalikuot DNase I (RNFD), pastikan Anda mengikuti panduan untuk penanganan RNA (Lampiran A, halaman 71).
- Pasang adaptor pengocok yang tepat (disertakan dengan instrumen QIAcube; gunakan adaptor untuk tabung safe-lock 2 ml, bertanda “2”), dan letakkan rak pengocok di bagian atas adaptor.
- Periksa laci limbah dan kosongkan bila perlu.
- Pasang setiap protokol terkait jika belum dilakukan untuk operasi sebelumnya. QIAcube Connect MDx memerlukan semua protokol yang ditemukan dalam file zip terkait untuk diunduh. Untuk QIAcube klasik, pasang protokol “PAXgene Blood RNA Part A” dan “PAXgene Blood RNA Part B”. Lihat “Memasang protokol pada instrumen QIAcube”, halaman 44.

\* Satuan Kunitz adalah satuan yang paling sering digunakan untuk mengukur DNase I, ditetapkan sebagai jumlah DNase I yang menyebabkan peningkatan dalam  $A_{260}$  dari 0,001 per menit per mililiter pada 25°C, pH 5,0, dengan DNA terpolimerisasi tinggi sebagai substrat (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* **33**, 349, dan 363).

## Prosedur

1. Tutup kap instrumen QIAcube, dan nyalakan instrumen QIAcube menggunakan sakelar daya (QIAcube Connect MDx: lihat Gambar 17, halaman 42; QIAcube: lihat Gambar 18, halaman 43).

Terdengar bunyi bip dan layar mulai ditampilkan. Instrumen akan secara otomatis melakukan uji inisialisasi.

2. Buka kap instrumen QIAcube, lalu muat reagen dan peralatan plastik ke dalam instrumen QIAcube. Lihat “Memuat instrumen QIAcube”, halaman 45.

Untuk menghemat waktu, pemuatan dapat dilakukan selama salah satu atau kedua tahap sentrifugasi 10-menit berikut (tahap 3 dan 5).

3. Sentrifugasi PAXgene Blood RNA Tube (BRT) selama 10 menit pada 3000–5000 x g menggunakan rotor berayun.



Pastikan sampel darah telah diinkubasi dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT) selama minimal 2 jam pada suhu ruang (15–25°C), agar lisis sel darah selesai.



Rotor harus berisi adaptor tabung untuk tabung berdasar bulat. Jika menggunakan adaptor tabung tipe lain, tabung dapat pecah selama sentrifugasi.

4. Bersihkan supernatan dengan dekantasi atau menggunakan pipet. Tambahkan 4 ml Air Bebas-RNase (RNase-Free Water, RNFWD) pada pelet lalu tutup tabung menggunakan penutup BD Hemogard sekunder baru (tersedia dengan kit).

Jika supernatan didekantasi, berhati-hatilah agar tidak mengganggu pelet dan keringkan pelek tabung dengan kertas tisu bersih.

5. Lakukan proses vorteks hingga pelet tampak larut dan sentrifugasi selama 10 menit pada 3000–5000 x g menggunakan rotor berayun. Bersihkan dan buang seluruh supernatan.

Serpihan kecil yang tersisa dalam supernatan setelah proses vorteks, namun sebelum sentrifugasi, tidak akan memengaruhi prosedur.



Pembersihan supernatan yang tidak tuntas akan menghalangi lisis dan mengencerkan lisat, sehingga memengaruhi kondisi pengikatan RNA pada membran PAXgene.

6. Tambahkan 350 µl dapar suspensi ulang (BR1) dan vorteks hingga pelet tampak larut.
7. Masukkan sampel dengan pipet ke dalam tabung pemrosesan (PT) 2 ml.
  -  Gunakan tabung pemrosesan (PT) 2 ml yang disertakan dalam PAXgene Blood RNA Kit.
8. Muat tabung pemrosesan (PT) yang terbuka yang berisi sampel ke dalam pengocok instrumen QIAcube (QIAcube Connect MDx: lihat Gambar 21, halaman 47; QIAcube: lihat Gambar 22, halaman 48 Gambar 15). Posisi sampel diberi nomor untuk memudahkan pemuatan. Sisipkan plug rak pengocok (disertakan dengan instrumen QIAcube) ke dalam slot di bagian tepi rak pengocok di samping masing-masing tabung pemrosesan. Hal ini memungkinkan deteksi sampel selama pemeriksaan muatan.
  -  Pastikan bahwa adaptor pengocok yang tepat (Adaptor Pengocok, 2 ml, tabung safe-lock, bertanda "2", disertakan dengan instrumen QIAcube) terpasang.
  -  Jika memproses kurang dari 12 sampel, pastikan untuk memuat rak pengocok seperti yang ditampilkan dalam Gambar 26, halaman 52. Satu (1) atau 11 sampel tidak dapat diproses. Nomor posisi dalam rak pengocok berkaitan dengan nomor posisi dalam alat sentrifugasi.
9. Tutup kap instrumen QIAcube (QIAcube Connect MDx: lihat Gambar 17, halaman 42; QIAcube: lihat Gambar 18, halaman 43).
10. Pilih protokol "PAXgene Blood RNA Part A" lalu mulai protokol.

Ikuti instruksi yang ditampilkan pada layar sentuh instrumen QIAcube.

  -  Pastikan bahwa kedua bagian program (bagian A dan bagian B) terpasang pada instrumen QIAcube (lihat "Memasang protokol pada instrumen QIAcube", halaman 44).
  -  Instrumen QIAcube akan melakukan pemeriksaan muatan untuk sampel, ujung, adaptor rotor, dan botol reagen.
11. Setelah protokol "PAXgene Blood RNA Part A" selesai, buka kap instrumen QIAcube (QIAcube Connect MDx: lihat Gambar 17, halaman 42; QIAcube: lihat Gambar 18, halaman 43). Lepaskan dan buang kolom putar PAXgene RNA (PRC) dari adaptor rotor dan kosongkan tabung pemrosesan (PT) dari pengocok.



Selama operasi, kolom putar ditransfer dari posisi adaptor rotor 1 (posisi penutup L1) ke posisi adaptor rotor 3 (posisi penutup L2) oleh instrumen (lihat Gambar 24, halaman 50).

12. Tutup penutup semua tabung mikrosentrifugasi (MCT) 1,5 ml yang berisi RNA yang dimurnikan dalam adaptor rotor (posisi 3, posisi penutup L3, lihat Gambar 24, halaman 50). Transfer tabung mikrosentrifugasi (MCT) 1,5 ml pada adaptor pengocok instrumen QIAcube (QIAcube Connect MDx: lihat Gambar 21, halaman 47; QIAcube: lihat Gambar 22, halaman 48).
13. Tutup kap instrumen QIAcube (QIAcube Connect MDx: lihat Gambar 17, halaman 42; QIAcube: lihat Gambar 18, halaman 43).
14. Pilih protokol "PAXgene Blood RNA Part B" dan mulai protokol.

Ikuti instrumen yang ditampilkan pada layar sentuh instrumen QIAcube.



Program ini menginkubasi sampel pada suhu 65°C dan mendenaturasi RNA untuk aplikasi hilir. Bahkan jika aplikasi hilir mencakup tahap denaturasi panas, jangan lewati tahap ini. Denaturasi RNA yang cukup sangat penting demi efisiensi maksimal dalam aplikasi hilir.

15. Setelah program "PAXgene Blood RNA Part B" selesai, buka kap instrumen QIAcube (QIAcube Connect MDx: lihat Gambar 17, halaman 42; QIAcube: lihat Gambar 18, halaman 43). Segera letakkan tabung mikrosentrifugasi (MCT) yang berisi RNA yang dimurnikan di es.



**PERINGATAN:** Permukaan panas. Pengocok dapat mencapai suhu hingga 70°C. Jangan sentuh saat panas.



Jangan biarkan RNA yang dimurnikan tersisa dalam instrumen QIAcube. Karena sampel tidak didinginkan, RNA yang dimurnikan dapat terdegradasi. Operasi penyiapan sampel semalaman tanpa pengawasan tidak direkomendasikan.

16. Jika sampel RNA tidak akan digunakan langsung, simpan pada suhu -20°C atau -70°C.

Karena RNA tetap terdenaturasi setelah pembekuan dan pencairan berulang, pengulangan protokol inkubasi panas tidak diperlukan ("PAXgene Blood RNA Part B"). Jika menggunakan sampel RNA dalam uji kadar diagnostik, ikuti petunjuk yang diberikan oleh produsen.

Untuk kuantifikasi RNA yang akurat dengan daya serap pada 260 nm, kami merekomendasikan pengenceran sampel dalam 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. \* Pengenceran sampel dalam RNase-Free Water dapat menyebabkan nilai rendah yang tidak akurat.

Atur spektrofotometer ke nol menggunakan blangko yang terdiri dari dapar elusi dengan proporsi yang sama (BR5) dan dapar Tris-HCl seperti dalam sampel yang perlu diukur. Dapar elusi (BR5) memiliki daya serap tinggi di 220 nm, yang dapat menyebabkan level daya serap latar belakang yang tinggi jika spektrofotometer tidak diatur ke nol dengan tepat.



Untuk kuantifikasi dalam dapar Tris-HCl, gunakan hubungan

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Lihat Lampiran B, halaman 72.

17. Pindahkan rak botol reagen dari meja kerja instrumen QIAcube (QIAcube Connect MDx: lihat Gambar 21, halaman 47; QIAcube: lihat Gambar 22, halaman 48), kemudian tutup semua botol dengan penutup berlabel yang sesuai. Dapar dalam botol dapat disimpan pada suhu ruang (15–25 °C) hingga 3 bulan. Buang dan bersihkan sisa reagen dalam tabung pemrosesan (PT) dalam slot tabung mikrosentrifugasi instrumen QIAcube. Lepaskan dan buang adaptor rotor dari alat sentrifugasi. Kosongkan laci limbah QIAcube Connect MDx (QIAcube Connect MDx: lihat Gambar 17, halaman 42; QIAcube: lihat Gambar 18, halaman 43). Tutup kap instrumen QIAcube dan matikan instrumen dengan sakelar daya.

\* Saat bekerja dengan bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi selengkapnya, baca lembar data keselamatan (LDK) yang sesuai, tersedia dari pemasok produk.

# Panduan Pemecahan Masalah

Panduan pemecahan masalah ini dapat berfungsi untuk memecahkan masalah yang mungkin muncul. Untuk informasi selengkapnya, lihat halaman Pertanyaan Umum di Pusat Dukungan Teknis kami: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Ilmuwan di Layanan Teknis QIAGEN senantiasa dengan senang hati menjawab setiap pertanyaan yang mungkin Anda miliki tentang informasi dan protokol dalam buku pegangan ini maupun teknologi uji kadar dan sampel (untuk informasi kontak, lihat halaman terakhir atau kunjungi [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentar dan saran

---

### RNA terdegradasi

Kontaminasi RNase



Berhati-hatilah agar tidak melakukan kontak RNase mana pun dengan reagen selama prosedur atau penanganan setelahnya (lihat Lampiran A, halaman 71).

### Hasil RNA rendah

a) Kurang dari 2,5 ml darah yang ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Pastikan agar 2,5 ml darah ditampung dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT; lihat *Buku Pegangan PAXgene Blood RNA Tube*).

b) Konsentrasi RNA yang terukur dalam air



RNA harus diencerkan dalam 10 mM Tris-HCl, pH 7,5\* untuk kuantifikasi yang akurat (lihat Lampiran B, halaman 72).

c) Serpihan sel yang ditransfer ke kolom putar PAXgene RNA (PRC) di tahap 9 dan 10 protokol manual



Hindari mentransfer partikel besar saat memasukkan supernatan menggunakan pipet di tahap 7 protokol manual (transfer serpihan kecil tidak akan memengaruhi prosedur).

\* Saat bekerja dengan bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi selengkapnya, baca lembar data keselamatan (LDK) yang sesuai, tersedia dari pemasok produk.

## Komentar dan saran

- d) Supernatan tidak benar-benar dibersihkan di tahap 3  Pastikan seluruh supernatan telah dibersihkan. Jika supernatan terdekantasi, bersihkan tetesan dari pelek PAXgene Blood RNA Tube (BRT) dengan mengoleskannya ke kertas tisu. Lakukan tindakan pencegahan yang tepat untuk mencegah kontaminasi silang.
- e) Setelah penampungan ke dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT), darah diinkubasi selama kurang dari 2 jam  Inkubasi darah dalam PAXgene Blood RNA Tube (BRT) selama minimal 2 jam setelah penampungan.

### Nilai $A_{260}/A_{280}$ rendah

- a) Air yang digunakan untuk mengencerkan RNA untuk pengukuran  $A_{260}/A_{280}$   Gunakan 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 untuk mengencerkan RNA sebelum mengukur kemurnian\* (lihat Apendiks B, halaman 72).
- b) Spektrofotometer tidak diatur ke nol dengan benar  Atur spektrofotometer ke nol menggunakan blanko yang terdiri dari dapar elusi dengan proporsi yang sama (BR5) dan 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, seperti dalam sampel yang perlu diukur. Dapar elusi (BR5) memiliki daya serap tinggi di 220 nm, yang dapat menyebabkan level daya serap latar belakang yang tinggi jika spektrofotometer tidak diatur ke nol dengan tepat.

### Malfungsi instrumen

Instrumen QIAcube tidak beroperasi dengan benar

Baca panduan pengguna QIAcube yang sesuai, dengan perhatian cermat pada bab Pemecahan Masalah. Pastikan bahwa instrumen QIAcube dipelihara dengan tepat, seperti yang dijelaskan dalam panduan pengguna.

\* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

# Lampiran A: Catatan Umum tentang Penanganan RNA

## Penanganan RNA



Ribonukleat (RNase) sangat stabil dan merupakan enzim aktif yang secara umum tidak memerlukan kofaktor agar berfungsi. Karena RNase sulit dinonaktifkan dan bahkan jumlah yang sedikit cukup untuk mendegradasi RNA, jangan gunakan peralatan plastik atau peralatan kaca apa pun tanpa menghilangkan kontaminasi RNase yang mungkin terjadi terlebih dahulu. Perhatian penuh perlu dilakukan untuk menghindari kontak tidak sengaja antara RNase dengan sampel RNA selama atau setelah prosedur pemurnian. Guna menciptakan dan menjaga lingkungan bebas RNase, tindakan pencegahan perlu dilakukan selama praperlakuan serta gunakan larutan dan pembuluh sekali pakai dan yang dapat dipakai ulang saat bekerja dengan RNA.

## Penanganan umum



Teknik aseptik dan mikrobiologi yang tepat harus selalu digunakan saat bekerja dengan RNA. Tangan dan partikel debu membawa bakteri dan jamur dan merupakan sumber kontaminasi RNase yang paling umum. Selalu gunakan sarung tangan vinil atau lateks saat menangani reagen dan sampel RNA untuk mencegah kontaminasi RNase dari permukaan kulit atau dari peralatan laboratorium yang berdebu. Seringlah mengganti sarung tangan dan selalu tutup tabung jika memungkinkan. Simpan RNA yang dimurnikan di es saat alikuot dipipet untuk aplikasi hilir.

Protokol untuk menghilangkan kontaminasi RNase dari peralatan kaca dan larutan dapat ditemukan dalam panduan biologi molekuler umum, seperti Sambrook, J. dan Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# Lampiran B: Kuantifikasi dan Penentuan Kualitas Total RNA

## Kuantifikasi RNA

Konsentrasi RNA harus ditentukan dengan mengukur daya serap pada 260 nm ( $A_{260}$ ) dalam spektrofotometer. Untuk memastikan signifikansi, pembacaan harus dilakukan dalam rentang linier spektrofotometer. Daya serap 1 satuan pada 260 nm berkaitan dengan 44  $\mu\text{g}$  RNA per ml ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ ). Relasi ini hanya valid untuk pengukuran dalam 10 mM Tris-HCl, pH 7,5\*. Sehingga penting untuk mengencerkan sampel RNA dan hal ini harus dilakukan dalam 10 mM Tris-HCl. Seperti yang dibahas di bawah (lihat "Kemurnian RNA", halaman 73), rasio antara nilai daya serap pada 260 dan 280 nm menunjukkan perkiraan kemurnian RNA. Saat mengukur sampel RNA, pastikan bahwa kuvet bebas RNase. Atur spektrofotometer ke nol menggunakan blangko yang terdiri dari dapar elusi dengan proporsi yang sama (BR5) dan dapar Tris-HCl seperti dalam sampel yang perlu diukur. Dapar elusi (BR5) memiliki daya serap tinggi di 220 nm, yang dapat menyebabkan level daya serap latar belakang yang tinggi jika spektrofotometer tidak diatur ke nol dengan tepat. Contoh kalkulasi yang terlibat dalam kuantifikasi RNA ditampilkan di bawah ini.

$$\begin{aligned}\text{Volume sampel RNA} &= 80 \mu\text{l} \\ \text{Pengenceran (1/15)} &= 10 \mu\text{l sampel RNA} + 140 \mu\text{l 10 mM Tris-HCl, pH 7,5} \\ \text{Ukur daya serap sampel yang diencerkan dalam kuvet (bebas RNase).} & \\ A_{260} &= 0,3 \\ \text{Konsentrasi sampel} &= 44 \times A_{260} \times \text{faktor pengenceran} \\ &= 44 \times 0,3 \times 15 \\ &= 198 \mu\text{g/ml} \\ \text{Total hasil} &= \text{konsentrasi} \times \text{volume sampel dalam mililiter} \\ &= 198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml} \\ &= 15,8 \mu\text{g RNA}\end{aligned}$$

\* Saat bekerja dengan bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi selengkapnya, baca lembar data keselamatan (LDK) yang sesuai, tersedia dari pemasok produk.

## Kemurnian RNA

Rasio pembacaan pada 260 nm dan 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) menunjukkan perkiraan kemurnian RNA sehubungan dengan kontaminan yang menyerap UV, seperti protein. Akan tetapi, rasio  $A_{260}/A_{280}$  sangat dipengaruhi oleh pH. pH yang lebih rendah menyebabkan rasio  $A_{260}/A_{280}$  yang lebih rendah dan mengurangi sensitivitas terhadap kontaminasi protein.\* Untuk nilai yang akurat, kami merekomendasikan pengukuran daya serap dalam 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. RNA murni memiliki rasio  $A_{260}/A_{280}$  sebesar 1,8–2,2 dalam 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Atur spektrofotometer ke nol menggunakan blangko yang terdiri dari dapar elusi dengan proporsi yang sama (BR5) dan dapar Tris-HCl seperti dalam sampel yang perlu diukur. Dapar elusi (BR5) memiliki daya serap tinggi di 220 nm, yang dapat menyebabkan level daya serap latar belakang yang tinggi jika spektrofotometer tidak diatur ke nol dengan tepat.

\* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

# Lampiran C: Penanganan PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Rekomendasi dari BD berikut dapat membantu saat menangani PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Lihat *Buku Pegangan PAXgene Blood RNA Tube* untuk informasi selengkapnya tentang PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

## **Petunjuk untuk pelepasan Penutup BD Hemogard**

1. Genggam PAXgene Blood RNA Tube (BRT) dengan satu tangan, letakkan ibu jari di bawah penutup BD Hemogard. (Untuk stabilitas lebih baik, letakkan lengan pada permukaan yang padat.) Dengan tangan lain, putar penutup BD Hemogard dan tarik naik secara bersamaan dengan ibu jari tangan lain **HANYA SAMPAI SUMBAT TABUNG LONGGAR**.
2. Lepaskan ibu jari sebelum mengangkat penutup. **JANGAN** gunakan ibu jari untuk membuka penutup PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Perhatian: Jika PAXgene Blood RNA Tube (BRT) berisi darah, artinya terdapat bahaya paparan. Untuk membantu mencegah cedera selama pelepasan penutup, penting agar ibu jari yang digunakan menarik penutup dihindarkan dari kontak dengan PAXgene Blood RNA Tube (BRT) segera setelah penutup BD Hemogard longgar.
3. Angkat penutup PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Apabila pelindung plastik terpisah dari sumbat karet, **JANGAN MERAKIT ULANG PENUTUP**. Lepaskan sumbat karet dengan hati-hati dari PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

## **Petunjuk penyisipan Penutup BD Hemogard Sekunder**

1. Ganti penutup pada PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Putar dan tekan ke bawah dengan kuat hingga sumbat sepenuhnya terpasang kembali. Penyisipan sumbat secara sempurna diperlukan agar penutup terpasang rapat pada PAXgene Blood RNA Tube (BRT) selama penanganan.

# Informasi Pemesanan

<b>Produk</b>	<b>Isi</b>	<b>No. Kat.</b>
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 Kolom Putar PAXgene, 50 Kolom Putar Shredder, Tabung Pemrosesan, DNase I Bebas-RNase, Reagen Bebas-RNase, dan Dapar. Untuk digunakan sehubungan dengan PAXgene Blood RNA Tube	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 tabung penampung darah	762165
<b>Produk Terkait yang dapat dipesan dari QIAGEN</b>		
Starter Pack, QIAcube	Paket meliputi: Paket meliputi: rak botol reagen (3); setrip pelabelan rak (8); ujung filter 200 µl (1024); ujung filter 1000 µl (1024); ujung filter 1000 µl, lubang-lebar (1024); botol reagen 30 ml (18); adaptor rotor (240); dudukan adaptor rotor	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Ujung-Filter Sekali Pakai, steril, dengan rak	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Botol Reagen (30 ml) dengan penutup; paket isi 6; untuk digunakan dengan rak botol reagen instrumen QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Untuk 240 penyiapan: 240 Adaptor Rotor Sekali Pakai; untuk digunakan dengan instrumen QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Rak untuk mengakomodasi 6 x 30 ml botol reagen pada meja kerja instrumen QIAcube	990390

Rotor Adapter Holder	Dudukan untuk 12 adaptor rotor sekali pakai; untuk digunakan dengan instrumen QIAcube	990392
<b>Produk terkait yang dapat dipesan dari BD*</b>		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, jarum 0,75 inci (0,8 × 19 mm), tabung dengan adaptor luer 12 inci (305 mm); 50 per kotak, 200 per kemasan	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Kemasan hanya untuk diameter 13 mm dan 16 mm; 1000/kemasan	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Pengambilan 13 x 75 mm sebanyak 4,0 ml dengan label kertas dan penutup BD Hemogard; 100/kotak, 1000/kemasan	368975

\* Aksesori penampung darah ini menunjukkan produk umum yang dapat digunakan dengan PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Untuk mempelajari selengkapnya tentang aksesori ini, termasuk cara pemesanan, kunjungi [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

Untuk informasi pelisensian terbaru dan penafian spesifik produk, lihat buku pegangan atau panduan pengguna kit PreAnalytiX atau QIAGEN terkait. Panduan pengguna dan buku pegangan kit PreAnalytiX dan QIAGEN tersedia di [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) dan [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) atau dapat diminta dari Layanan Teknis PreAnalytiX.

# Riwayat Revisi Buku Pegangan

<b>Dokumen dan revisi</b>	<b>Perubahan</b>	<b>Tanggal</b>
HB-0101-004, R2	Perubahan mematuhi regulasi GHS di seluruh dokumen	Juni 2015
HB-0101-005, R3	Templat baru; revisi pada data kinerja dan protokol otomatis; pembaruan mengenai Informasi Keselamatan agar mematuhi regulasi GHS; perubahan pada detail instrumen dan pernyataan Batasan Penggunaan Produk.	Februari 2019
HB-0101-006, R3	Pembetulan nama kit dalam tabel isi kit hal. 5.	Januari 2020
HB-0101-007, R4	Penambahan QIAcube Connect MDx pada protokol otomatis; pembaruan bahasa di seluruh dokumen untuk menyertakan referensi pada QIAcube Connect MDx; pembaruan tabel, halaman, dan nomor gambar di seluruh dokumen.	Desember 2020

## PreAnalytiX di Seluruh Dunia

Produk PreAnalytiX didistribusikan oleh perusahaan BD dan QIAGEN

### QIAGEN – Layanan Pelanggan

Pemesanan [www.QIAGEN.com/shop](http://www.QIAGEN.com/shop) | Dukungan Teknis [support.qiagen.com](mailto:support.qiagen.com) | Situs Web [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

#### BD – Layanan Pelanggan

Argentina, Uruguay and Paraguay  
Orders: 0800.444.5523  
E-mail: [crc\\_argentina@bd.com](mailto:crc_argentina@bd.com)

Australia  
Orders: 1.800.656.100  
Fax: 1.800.656.110  
E-mail: [bd\\_anz@bd.com](mailto:bd_anz@bd.com)

Austria  
Orders: 43.1.7063660  
Fax: 43.1.706366011  
E-mail: [customercare.at@bd.com](mailto:customercare.at@bd.com)

Belgium  
Orders: 32.53.720.556  
Fax: 32.53.720.549  
E-mail: [orders.be@bd.com](mailto:orders.be@bd.com)

Brazil  
Orders: 0800.055.56.54  
E-mail: [consultoria\\_vacutainer@bd.com](mailto:consultoria_vacutainer@bd.com)

Canada  
Technical support: 1.800.631.0174  
Orders: 1.866.979.9408  
Fax: 1.800.565.0897  
E-mail: [customer.service.canada@bd.com](mailto:customer.service.canada@bd.com)

Central and Eastern Europe  
Orders: 48.22.377.11.11  
Fax: 48.22.377.11.02  
Bulgaria orders: [info\\_bulgaria@bd.com](mailto:info_bulgaria@bd.com)  
Czech Republic orders: [info\\_czech@bd.com](mailto:info_czech@bd.com)  
Croatia orders: [info\\_croatia@bd.com](mailto:info_croatia@bd.com)  
Hungary orders: [info\\_hungary@bd.com](mailto:info_hungary@bd.com)  
Poland orders: [info\\_poland@bd.com](mailto:info_poland@bd.com)  
Romania orders: [info\\_romania@bd.com](mailto:info_romania@bd.com)  
Southeast Europe orders: [info\\_balkan@bd.com](mailto:info_balkan@bd.com)  
Serbia orders: [info\\_serbia@bd.com](mailto:info_serbia@bd.com)  
Slovakia orders: [info\\_slovakia@bd.com](mailto:info_slovakia@bd.com)  
Slovenia orders: [info\\_slovenia@bd.com](mailto:info_slovenia@bd.com)

Denmark  
Orders: 45.43.43.45.66  
Fax: 45.43.96.56.76  
Orders: [ordre.dk@bd.com](mailto:ordre.dk@bd.com)  
Technical support: [bddenmark@bd.com](mailto:bddenmark@bd.com)

Finland  
Orders: 358.9.88.70.780  
Fax: 358.9.88.70.7816  
Orders: [tilaukset.fi@bd.com](mailto:tilaukset.fi@bd.com)  
E-mail: [bdsuomi@bd.com](mailto:bdsuomi@bd.com)

France  
Orders: 33.476.68.36.36  
Fax: 33.476.68.36.93  
E-mail: [serviceclientbdf@bd.com](mailto:serviceclientbdf@bd.com)  
Orders: [commandesfr@bd.com](mailto:commandesfr@bd.com)  
Technical support: [vacutainerfr@bd.com](mailto:vacutainerfr@bd.com)

Germany  
Orders: 49.6221.3050  
Fax: 49.6221.305.216  
E-mail: [customercare.de@bd.com](mailto:customercare.de@bd.com)

India  
Orders: 91.124.3949390  
Orders: [bd\\_india@bd.com](mailto:bd_india@bd.com)

Ireland (Aquilant Specialist Healthcare Services)  
Customer support: 353.1.404.8350  
Fax: 353.1.404.8352  
E-mail: [contactus@aquilantscientific.ie](mailto:contactus@aquilantscientific.ie)

Israel (Lapidot Medical)  
Customer Support: 972.700.70.90.22  
E-mail: [cs@lapidot.com](mailto:cs@lapidot.com)

Italy  
Orders: 39.02.48240.500  
Fax: 39.02.48240.775  
Technical support: 39.3450655140  
E-mail: [ordini.it@bd.com](mailto:ordini.it@bd.com)

Middle East & Africa  
Orders: 971.45.592.555  
Fax: 971.45.592.599  
E-mail: EMA\_PAS@bd.com

The Netherlands  
Orders: 31.20.582.94.20  
Fax: 31.20.582.94.21  
Orders: orders.nl@bd.com

New Zealand  
Orders: 0800.572.468  
Fax: 0800.572.469  
E-mail: nz\_customerservice@bd.com

Norway  
Customer Support: 64.00.99.00  
E-mail: bdnorge@bd.com  
Orders: ordre.no@bd.com

Southeast Asia  
E-mail: PAS.SEA@bd.com  
Indonesia orders: 622.1577.1920  
Malaysia orders: 603.2093.8788  
Philippines orders: 63.2478.8881  
Singapore orders: 65.6861.0633  
Thailand orders: 662.646.1800  
Vietnam orders: 848.3822.7409

South Korea  
Orders: 02.3404.3706  
Fax: 02.3404.3785  
Technical: 02.3404.3706  
Technical support: Korea\_PAS@bd.com

Spain, Portugal and Andorra  
Orders: 34.91.848.8174  
Customer support: 34.902.27.17.27  
Fax: 34.91.848.8115  
E-mail: info.spain@bd.com

Sweden  
Orders: 46.8.775.51.00  
Fax: 46.8.645.08.08  
Orders: order.se@bd.com  
Technical support: bds sweden@bd.com

Switzerland  
Orders: 41.61.485.22.24  
Fax: 41.61.485.22.00  
E-mail: infoch@bd.com

UK  
Orders: 0800.917.8776  
E-mail: bduk\_customerservice@bd.com

USA  
Customer support: 800.631.0174  
E-mail: productcomplaints@bd.com



HB-0101-007 1122120 BD-8945 12/2020  
Produkt Jerman