

Dezember 2020

PAXgene[®] Blood RNA Kit Handbuch

Version 2



50 (Katalog-Nr. 762174)

R4 **MAT** 1122120DE

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Von QIAGEN GmbH für PreAnalytiX hergestellt



A QIAGEN / BD Company

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

Die PAXgene Blood RNA Kits sind nicht in allen Ländern erhältlich; fragen Sie bitte nach.

Eingeschränkter Lizenzvertrag

Mit Gebrauch dieses Produkts erkennt der Käufer oder Anwender des PAXgene Blood RNA Kits die folgenden Vertragsbedingungen an:

1. Das PAXgene Blood RNA Kit darf nur gemäß den Angaben im *PAXgene Blood RNA Kit Handbuch* und mit den im Kit enthaltenen Komponenten verwendet werden. PreAnalytiX erteilt keinerlei Lizenz, die durch gewerbliche Eigentumsrechte geschützten Komponenten in diesem Kit in Kombination mit anderen Komponenten, die nicht Bestandteil des Kits sind, zu verwenden, mit Ausnahme der Anwendungen, die im *PAXgene Blood RNA Kit Handbuch* und in weiteren Protokollen, die unter www.preanalytix.com erhältlich sind, beschrieben sind.
2. Mit Ausnahme der ausdrücklich genannten Lizenzen übernimmt PreAnalytiX keine Garantie, dass dieses Kit und/oder seine Verwendung(en) keine Rechte Dritter verletzen.
3. Dieses Kit und seine Komponenten sind für den einmaligen Gebrauch lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, aufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. Mit Ausnahme der ausdrücklich angegebenen Lizenzen erkennt PreAnalytiX keine anderen genannten oder implizierten Lizenzen an.
5. Käufer und Nutzer des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten.
6. PreAnalytiX kann die in diesem eingeschränkten Lizenzvertrag genannten Verbote vor jedem Gericht durchsetzen und wird für sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, die ihr bei der Durchsetzung dieses eingeschränkten Lizenzvertrags oder ihrer geistigen Eigentumsrechte in Bezug auf dieses Kit und/oder seine Komponenten entstehen, Schadenersatz fordern.

Aktualisierte Lizenzbedingungen finden Sie unter www.preanalytix.com.

Verkauf unter Vorbehalt

Das vorliegende Produkt wird mit einer Lizenz unter bestimmten Ansprüchen der Patente US 7,270,953 und US 7,682,790 sowie EP 1820793 B1 und Äquivalente dieser Patentansprüche anderer Länder ausgeliefert, das Produkt zum Verarbeiten des Nukleinsäure-Komplex zu verwenden, der bei der Probennahme in einem PAXgene Blood RNA Tube ausgebildet wird.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, alle Rechte vorbehalten.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Schweiz

www.preanalytix.com

PreAnalytiX Händler

Die PreAnalytiX Produkte werden von QIAGEN oder BD für PreAnalytiX hergestellt und vertrieben. Die Produkte können nicht bei PreAnalytiX GmbH bestellt werden.


Die Kontaktdaten Ihres lokalen PreAnalytiX Händlers finden Sie auf der letzten Seite.

Inhalt

Kit-Inhalt	5
Symbole	6
Lagerungsbedingungen	8
Verwendungszweck	8
Anwendungseinschränkungen	9
Qualitätskontrolle.....	10
Technischer Service.....	10
Sicherheitshinweise.....	10
Einleitung.....	14
Prinzip und Anwendung	14
Probennahme und Stabilisierung	15
RNA-Konzentration und Aufreinigung	20
Manuelle RNA-Aufreinigung	20
Automatische RNA-Aufreinigung	30
Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien	39
Wichtige Hinweise	42
Verwendung von QIAcube Geräten.....	42
Installation von Protokollen auf den QIAcube Geräten	45
Beladen des QIAcube Geräts.....	46
Protokoll: Manuelle Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde	57

Protokoll: Automatische Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde	65
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	73
Anhang A: Allgemeine Hinweise zur Handhabung von RNA	76
Anhang B: Quantifizierung und Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA	77
Anhang C: Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	79
Bestellinformationen	80
Revisionsverlauf des Handbuchs	82

Kit-Inhalt

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalog-Nr.			762174
Anzahl Präparationen			50
BR1	Resuspension Buffer (Resuspendierungspuffer)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Bindungspuffer) *	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Waschpuffer 1) *	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (Waschpuffer 2, Konzentrat) †	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Elutionspuffer)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (RNase-freies Wasser, Flasche)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (grüner Deckel)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (PAXgene RNA Spinsäulen, rot)	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 ml) (Reaktionsröhrchen, 2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (sekundäre BD Hemogard™-Deckel)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNase I, RNase-frei, lyophilisiert)	DNA REM	1.500 Kunitz- Einheiten †
RDD	DNA Digestion Buffer (DNA- Verdaupuffer, weißer Deckel)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (DNase- Resuspendierungspuffer, Röhrchen, lila Deckel)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (PAXgene Shredder Spinsäulen, lila)	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Handbuch	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (PAXgene Blood RNA Kit Handbuch, Version 2)		1

Symbole



Kit enthält Reagenzien für <N> Tests.



Gebrauchsanweisung beachten



Verfallsdatum



In-vitro-Diagnostikum



Katalognummer



Chargennummer



Materialnummer



Komponenten



Anzahl



Sterilisierung durch UV-Bestrahlung



Kunitz-Einheiten



Hinzugeben



Enthält

*Nicht mit Desinfektionsmitteln in Kontakt bringen, die Bleiche enthalten. Enthält ein Guanidinsalz. Auf Seite 10 finden Sie weitere Sicherheitshinweise.

† Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Vor der ersten Verwendung geben Sie, wie auf der Flasche angegeben, das 4-fache Volumen Ethanol (96–100 %, Reinheitsgrad p.a.) hinzu, um eine gebrauchsfertige Arbeitslösung herzustellen.

‡ Die Kunitz-Einheit ist die gebräuchliche Maßeinheit zur Bestimmung der DNase-I-Aktivität, die definiert ist als die Menge DNase I, die bei Verwendung einer hochpolymerisierten DNA als Substrat zu einer Zunahme der Absorption bei 260 nm (A_{260}) von 0,001 pro Minute und Milliliter bei 25 °C und pH 5,0 führt (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 und 363).

RCNS

Rekonstituiert

DNase

Desoxyribonuklease I

EtOH

Ethanol

GITC

Guanidinisothiocyanat

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Global Trade Item Number (GTIN)



Nicht wiederverwenden



Zulässiger Temperaturbereich



Obere Temperaturgrenze



Hersteller



Wichtiger Hinweis

Lagerungsbedingungen

Die PAXgene RNA Spin Columns (PRC) und PAXgene Shredder Spin Columns (PSC) sowie die Proteinase K (PK) und alle Puffer (BR1, BR2, BR3, BR4 und BR5) müssen trocken und bei der auf dem Kit-Etikett angegebenen Temperatur gelagert werden.

Das RNase-Free DNase Set, welches DNase I (RNFD), DNA-Verdaufluffer (RDD) und DNase-Resuspendierungspuffer (DRB) enthält, wird bei Raumtemperatur versandt. Lagern Sie alle Komponenten des RNase-Free DNase Sets sofort nach Lieferung bei der auf dem Etikett angegebenen Temperatur. Bei ordnungsgemäßer Lagerung unter diesen Bedingungen sind die Kits bis zum Haltbarkeitsdatum, das auf der Kit-Verpackung angegeben ist, haltbar.

Verwendungszweck

Das PAXgene Blood RNA System besteht aus einem Blutentnahmeröhrchen (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) und einem Kit zur Nukleinsäureaufreinigung (PAXgene Blood RNA Kit). Es ist für die Entnahme, die Aufbewahrung und den Transport von Blut und zur Stabilisierung der intrazellulären RNA in einem geschlossenen Röhrchen und die anschließende Isolierung und Aufreinigung der Wirts-RNA aus Vollblut zur Verwendung in der in der Molekulardiagnostik angewandten RT-PCR vorgesehen.

Die in diesem Handbuch angegebenen Leistungsmerkmale des PAXgene Blood RNA Systems gelten nur für Transkripte der FOS- und IL1B-Gene. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, entsprechende Leistungsmerkmale des PAXgene Blood RNA Systems für andere Zieltranskripte zu erstellen.

Anwendungsgebiete

Das PAXgene Blood RNA Kit dient der Aufreinigung intrazellulärer RNA aus Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde. Mit dem System, bestehend aus Kit und PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), erhalten Sie aus Vollblut aufgereinigte intrazelluläre RNA zur RT-PCR bei molekular diagnostischen Tests.

Anwendungseinschränkungen

Das PAXgene Blood RNA Kit ist zur Aufreinigung von intrazellulärer RNA aus humanem Vollblut ($4,8 \times 10^6$ bis $1,1 \times 10^7$ Leukozyten/ml) für Anwendungen im Rahmen der In-vitro-Diagnostik vorgesehen. Er dient nicht für die Aufreinigung genomischer DNA oder viraler Nukleinsäuren aus humanem Vollblut. Da nur eine begrenzte Anzahl Transkripte für die Stabilisierungsspezifikationen validiert wurde (FOS- und IL1B-Gentranskripte), können nicht für alle Transkripte Leistungsmerkmale angegeben werden. Die Anwender müssen die Angaben des Herstellers und eigene Daten prüfen, um zu bestimmen, ob eine Validierung für andere Transkripte notwendig ist.

Das Produkt darf nur von sachkundigen Personen, z. B. technischen Angestellten und Ärzten, die in der In-vitro-Diagnostik geschult sind, verwendet werden.

Gebrauchsanweisungen für die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) finden Sie im *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch*.

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des PAXgene Blood RNA Kits nach festgelegten Spezifikationen getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Technischer Service

Der Technische Service von QIAGEN garantiert dank seiner hohen Qualität und Verfügbarkeit eine einzigartige Unterstützung unserer Kunden. Hier stehen Ihnen erfahrene Wissenschaftler für Ihre Fragen zu PreAnalytiX Produkten gerne zur Verfügung. Bitte wenden Sie sich an uns, wenn Sie Fragen zum PAXgene Blood RNA Kit haben.

Für technische Hinweise und weitere Informationen wenden Sie sich bitte an den Technischen Service von QIAGEN.

Sicherheitshinweise

EU – Anwender müssen alle schwerwiegenden Vorfälle im Zusammenhang mit dem Produkt dem Hersteller und der nationalen zuständigen Behörde melden. Außerhalb der EU – Wenden Sie sich bei Vorfällen oder Fragen in Bezug auf das Produkt an Ihren QIAGEN Vertreter.

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille.

Tragen Sie beim Umgang mit biologischen und chemischen Materialien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille, um das Risiko einer Infektion (z. B. mit HIV- oder Hepatitis-B-Viren) oder einer Verletzung zu minimieren. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). Diese sind im praktischen und kompakten PDF-Format online verfügbar unter www.preanalytix.com, wo Sie die SDS zu diesem Kit finden, einsehen und ausdrucken können.

VORSICHT



GEBEN SIE KEINE Chlorbleiche oder sauren Lösungen direkt in den Probenvorbereitungsabfall.

Bindungspuffer (BR2) und Waschpuffer 1 (BR3) enthalten Guanidinisothiocyanat, das bei Kontakt mit Chlorbleiche hochreaktive Verbindungen ausbilden kann. Wenn Bindungspuffer (BR2) oder Waschpuffer 1 (BR3) verschüttet werden, reinigen Sie mit einem geeigneten Laborreinigungsdetergens und Wasser. Wenn Flüssigkeit mit potenziell infektiösen Agenzien verschüttet wird, reinigen Sie die betroffene Fläche zuerst mit Laborreinigungsdetergens und Wasser und danach mit 1 % (v/v) Natriumhypochlorit (Bleichmittel).

Die RNA-Stabilisierungslösung und die Blufflüssigkeit aus dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) können durch Zugabe von 1 Volumenteil Industriebleichlösung (5 % Natriumhypochlorit) pro 9 Volumenteile RNA-Stabilisierungslösung bzw. Blufflüssigkeit desinfiziert werden.

Probenvorbereitungsabfall, beispielsweise Überstände nach Zentrifugationsschritten während der RNA-Aufreinigung, müssen stets als potenziell infektiös angesehen werden. Abfälle müssen daher vor der Entsorgung autoklaviert oder verbrannt werden, um infektiöses Material zu zerstören. Beachten Sie bei der Entsorgung die gültigen Vorschriften und Richtlinien.

Die folgenden Gefahren- und Sicherheitssätze gelten für die Komponenten des PAXgene Blood RNA Kits. Sicherheitshinweise zu den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) finden Sie im *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch*.

Buffer BR2



Enthält: Guanidinisothiocyanat. Gefahr! Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen. Verursacht schwere Augenschäden. Schädlich für Wasserorganismen mit langfristigen Auswirkungen. Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

Buffer BR3



Enthält: Ethanol; Guanidinisothiocyanat. Gefahr! Flüssigkeit und Dampf entflammbar. Verursacht schwere Augenschäden. Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. Von Hitze/Funken/offenen Flammen/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

DNase I



Enthält: DNase. Gefahr! Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dämpfen/Aerosol vermeiden. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Atemschutz tragen. Bei Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Die betroffene Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.

Proteinase K



Enthält: Proteinase K. Gefahr! Verursacht leichte Hautreizungen. Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dämpfen/Aerosol vermeiden. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Atemschutz tragen. Bei Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Die betroffene Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.

Einleitung

Der erste Schritt bei vielen molekularbiologischen Assays zellulärer RNA ist die Entnahme von Vollblut. Ein Hauptproblem bei solchen Experimenten ist jedoch die Instabilität des zellulären RNA-Profiles *in vitro*. Untersuchungen bei PreAnalytiX haben gezeigt, dass sich die Kopienzahl für einzelne mRNA-Spezies in Vollblut bei Lagerung oder Transport bei Raumtemperatur um mehr als das 1.000-Fache verändern kann.* Ursache dafür ist zum einen der rasche Abbau der RNA und zum anderen die induzierte Expression bestimmter Gene, nachdem das Blut entnommen wurde. Durch solche Veränderungen im RNA-Expressionsprofil werden zuverlässige Ergebnisse bei Genexpressionsstudien unmöglich. Eine Methode zur Erhaltung des RNA-Expressionsprofils während und nach der Blutentnahme ist daher essenziell für genaue Analysen der Genexpression in humanem Vollblut.

Prinzip und Anwendung

PreAnalytiX hat ein System entwickelt, das Entnahme, Stabilisierung, Lagerung und Transport menschlicher Vollblutproben ermöglicht und zugleich ein schnelles und effizientes Protokoll zur Aufreinigung intrazellulärer RNA bereitstellt. Das System besteht aus den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; US-Patente 6,602,718 und 6,617,170) zur Blutentnahme und gleichzeitigen RNA-Stabilisierung und dem PAXgene Blood RNA Kit, mit dem anschließend eine manuelle oder automatische RNA-Aufreinigung durchgeführt wird. Sowohl das manuelle als auch das automatische Protokoll stellen eine vergleichbare Leistung in Bezug auf RNA-Qualität und -Ausbeute bereit. Die Leistungsdaten für das manuelle Protokoll (siehe Seite 23–30) und für das automatische Protokoll (siehe Seite 32–36) sind in diesem Handbuch enthalten.



Der QIAGEN QIAcube Connect MDx ist nicht in allen Ländern erhältlich. Wenden Sie sich für weitere Informationen bitte an den Technischen Service von QIAGEN.

* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin. Chem.* **48**, 1883. † Eine Langzeitstudie zur Blutlagerung in PAXgene Blood RNA Tubes dauert an.

Probennahme und Stabilisierung

Die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) enthalten eine proprietäre Reagenzzusammensetzung basierend auf einer patentierten RNA-Stabilisierungstechnik. Diese Reagenzzusammensetzung schützt RNA-Moleküle vor Abbau durch RNasen und minimiert Ex-vivo-Veränderungen der Genexpression. Die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sind für die Entnahme von humanem Vollblut und die Stabilisierung zellulärer RNA für bis zu 3 Tage bei 18–25 °C (Abbildung 1 und 2, Seite 16 und 17) oder für bis zu 5 Tage bei 2–8 °C vorgesehen (Abbildung 3 und 4, Seite 18 und 19). Die zurzeit verfügbaren Daten zeigen, dass bei –20 °C oder –70 °C die Stabilisierung zellulärer RNA für mindestens 11 Jahre möglich ist.* Weitere Informationen über laufende Studien zur Evaluierung noch längerer Stabilisierungszeiten erhalten Sie beim Technischen Service von QIAGEN.

Die tatsächliche Dauer der RNA-Stabilisierung kann je nach zellulärer RNA-Spezies und verwendeter Folge-Applikation variieren. Da nur eine begrenzte Anzahl Transkripte für die Stabilisierungsspezifikationen validiert wurde (FOS- und IL1B-Gentranskripte), können nicht für alle Transkripte Leistungsmerkmale angegeben werden. Die Anwender müssen die Angaben des Herstellers und eigene Daten prüfen, um zu bestimmen, ob eine Validierung für andere Transkripte notwendig ist.

* Eine Langzeitstudie zur Blutlagerung in PAXgene Blood RNA Tubes dauert an.

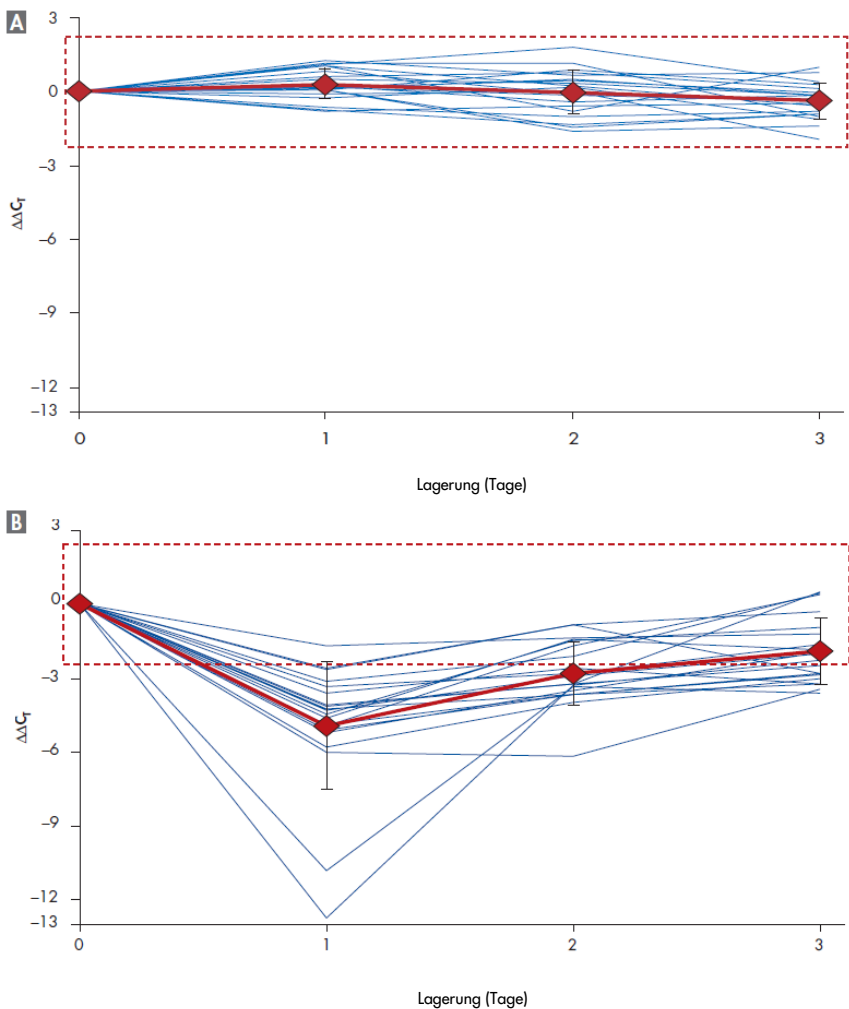


Abbildung 1. RNA-Stabilität in Blutproben bei 18–25 °C: FOS. 10 Spendern wurden jeweils zwei Blutproben entnommen, die bei 18–25 °C für die angegebene Anzahl von Tagen gelagert wurden, bevor die Gesamt-RNA aufgereinigt wurde. **[A]** Blutentnahme und Lagerung erfolgten in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), und die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blutentnahme und Lagerung erfolgten in Standard-Blutentnahmeröhrchen mit EDTA als Antikoagulans, und die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit einem organischen Standard-Extraktionsverfahren mit Silikamembran-basierter RNA-Aufreinigung. Die relativen FOS-Transkriptkonzentrationen wurden mittels Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Die Werte für alle Proben sind aufgetragen, wobei Mittelwerte und Standardabweichungen aller Proben gezeigt werden. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3\times$ -Bereich der Gesamtpräzision des Assays (2,34 C_t) an.

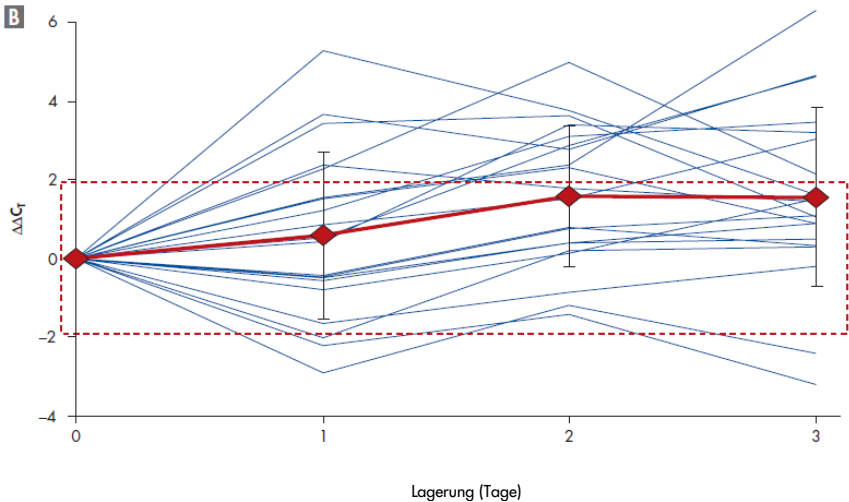
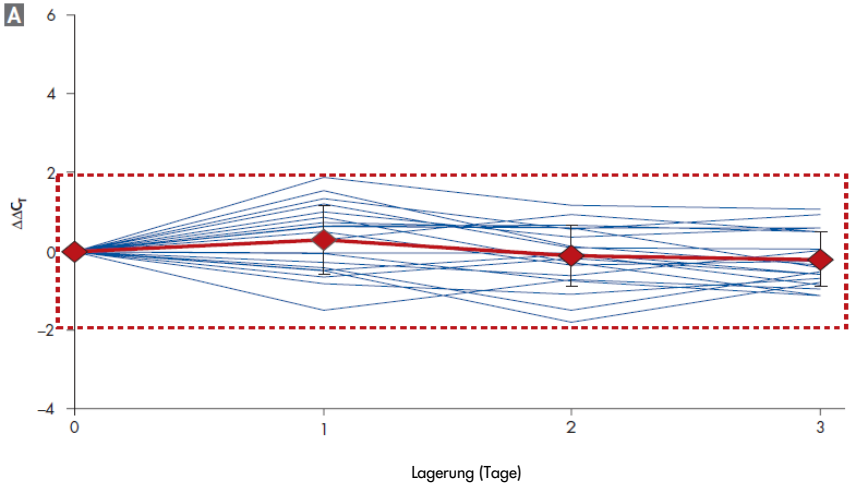


Abbildung 2. RNA-Stabilität in Blutproben bei 18–25 °C: IL1B. Die Blutentnahme und Aufreinigung der Gesamt-RNA nach Lagerung bei 18–25 °C erfolgten wie in Abbildung 1 beschrieben. Die relativen IL1B-Transkriptkonzentrationen wurden mittels Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Die Werte für alle Proben sind aufgetragen, wobei Mittelwerte und Standardabweichungen aller Proben gezeigt werden. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3 \times$ Bereich der Gesamtpräzision des Assays ($1,93 C_t$) an.

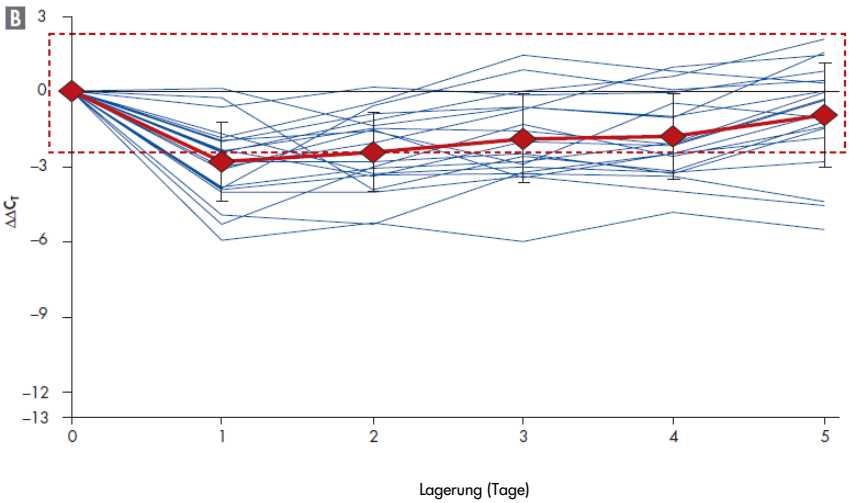
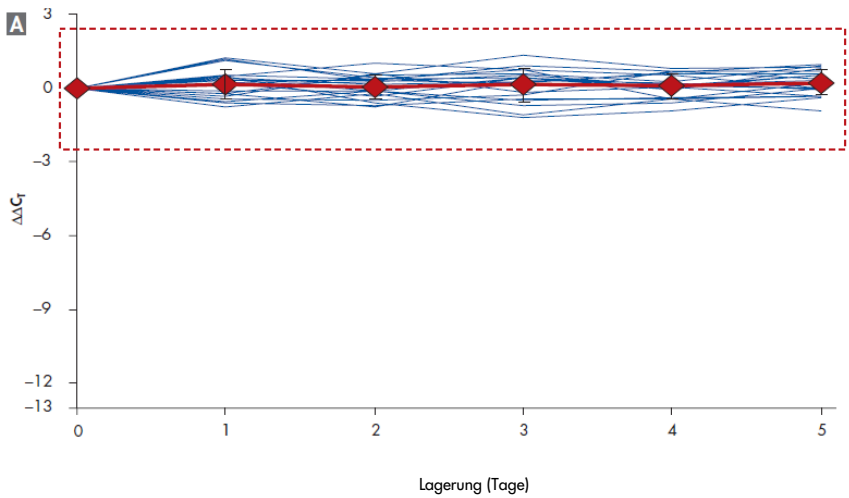


Abbildung 3. RNA-Stabilität in Blutproben bei 2–8 °C: FOS. 10 Spendern wurden jeweils zwei Blutproben entnommen, die bei 2–8 °C für die angegebene Anzahl von Tagen gelagert wurden, bevor die Gesamt-RNA aufgereinigt wurde. **[A]** Blutentnahme und Lagerung erfolgten in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), und die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blutentnahme und Lagerung erfolgten in Standard-Blutentnahmeröhrchen mit EDTA als Antikoagulans, und die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit einem organischen Standard-Extraktionsverfahren mit Silikamembran-basierter RNA-Aufreinigung. Die relativen FOS-Transkriptkonzentrationen wurden mittels Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Die Werte für alle Proben sind aufgetragen, wobei Mittelwerte und Standardabweichungen aller Proben gezeigt werden. Die unterbrochenen Linien geben den ± 3 x-Bereich der Gesamtpräzision des Assays ($2,34 C_t$) an.

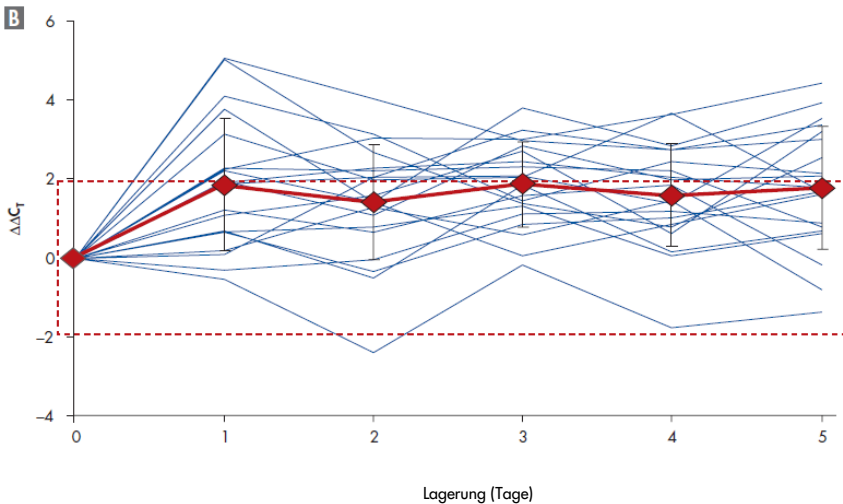
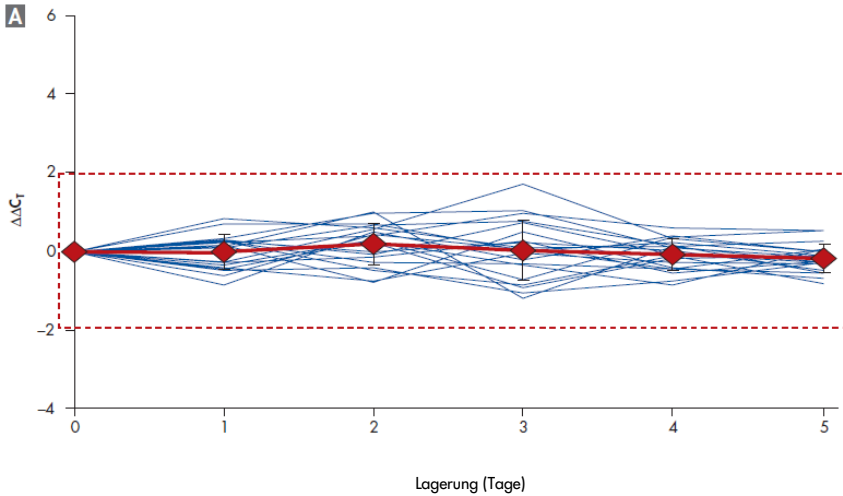


Abbildung 4. RNA-Stabilität in Blutproben bei 2–8 °C: IL1B. Die Blutentnahme und Aufreinigung der Gesamt-RNA nach Lagerung bei 2-8°C erfolgten wie in Abbildung 3 beschrieben. Die relativen IL1B-Transkriptkonzentrationen wurden mittels Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Die Werte für alle Proben sind aufgetragen, wobei Mittelwerte und Standardabweichungen aller Proben gezeigt werden. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3 \times$ -Bereich der Gesamtpräzision des Assays ($1,93 C_T$) an.

RNA-Konzentration und Aufreinigung

Das PAXgene Blood RNA Kit ist für die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus 2,5 ml humanem Vollblut vorgesehen, das in einem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) entnommen wurde. Das Verfahren ist einfach und kann mit dem manuellen oder dem automatischen Protokoll durchgeführt werden (siehe Abbildung 5 und 10, Seite 21 und 31). Bei beiden Protokollen beginnt die Aufreinigung mit einem Zentrifugationsschritt, um die Nukleinsäuren in dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) zu pelletieren. Das Pellet wird dann gewaschen und resuspendiert, anschließend erfolgt die manuelle oder automatische RNA-Aufreinigung. Im Prinzip folgen beide Protokollen denselben Protokollschritten mit denselben Kit-Komponenten.

Manuelle RNA-Aufreinigung

Im Einzelnen wird das resuspendierte Pellet zunächst in optimierten Puffern mit Proteinase K (PK) inkubiert, um Proteine zu verdauen. Eine weitere Zentrifugation durch eine PAXgene Shredder Spin Column (PSC) dient dem Homogenisieren des Zellysats und dem Entfernen restlicher Zelltrümmer. Der Überstand der Durchflussfraktion wird in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Mit dem dann zugegebenen Ethanol werden optimale Bindungsbedingungen eingestellt, und das Lysat wird auf eine PAXgene RNA Spin Column (PRC) gegeben. Während einer kurzen Zentrifugation bindet RNA selektiv an die PAXgene Silikamembran, während Kontaminationen passieren. Restliche Kontaminationen werden in mehreren effizienten Waschschritten entfernt. Zwischen dem ersten und dem zweiten Waschschrift wird die Membran mit DNase I (RNFD) behandelt, um Spuren gebundener DNA zu entfernen. Nach den Waschschritten wird die RNA in Elutionspuffer (BR5) eluiert und durch Hitze denaturiert.

Die mit dem PAXgene Blood RNA System isolierte Gesamt-RNA ist rein. Bei Anwendung des manuellen Protokolls liegen die A_{260}/A_{280} -Werte zwischen 1,8 und 2,2 und in ≥ 95 % aller Proben ist genomische DNA in einem Anteil ≤ 1 % (w/w) vorhanden, wie durch quantitative Real-time-PCR einer Sequenz des Beta-Actin-Gens gemessen wurde. Bei Verwendung von bis zu 30 % des Eluats zeigten mindestens 95 % der Proben keine Inhibition bei der RT-PCR.

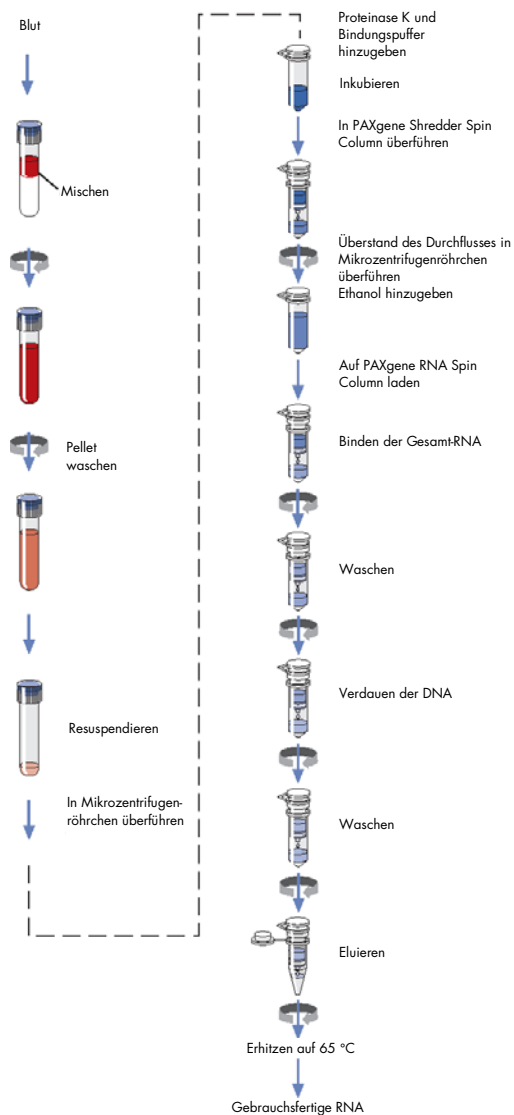


Abbildung 5. Das manuelle PAXgene Blood RNA Verfahren.

Bei dem manuellen Protokoll beträgt die durchschnittliche Probenvorbereitungszeit (auf der Basis der Daten von 12 Probenverarbeitungsdurchgängen) etwa 90 Minuten*, wobei die reine Handhabungszeit nur 40 Minuten beträgt. Bei $\geq 95\%$ der verarbeiteten Proben wird eine RNA-Ausbeute von $\geq 3 \mu\text{g}$ aus 2,5 ml Vollblut gesunder Probanden erzielt. Da die Ausbeuten stark vom Probanden abhängen, kann die individuelle Ausbeute variieren. Für individuelle Probanden liefert das PAXgene Blood RNA System hochreproduzierbare und -wiederholbare Ausbeuten (Abbildung 6 und 7, Seite 23 und 24) sowie eine reproduzierbare und wiederholbare RT-PCR (Abbildung 8 und 9, Seite 28 und 29), was es für klinische Diagnosetests hochrobust macht.

Abbildung 6 (Seite 23) zeigt die Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit des PAXgene Blood RNA Systems. Weitere Studien wurden durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Chargen des PAXgene Blood RNA Kits und verschiedener Laboranten auf die Reproduzierbarkeit der RNA-Ausbeute und der Leistung der Real-time-RT-PCR zu zeigen. Da für diese Studien gepoolte Blutproben und keine individuellen PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) verwendet wurden, spiegeln die Ergebnisse nicht die Systemwiederholbarkeit wider, die auch Variationen zwischen individuellen Blutentnahmen umfasst, sondern lediglich die Wiederholbarkeit der Probenvorbereitung (siehe Abbildung 7, Seite 24).

* Gesamtdauer der Ausführung des Protokolls, einschließlich Vorabhandhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (Zentrifugationen, Pellet-Waschschritte und Pellet-Resuspendierung).

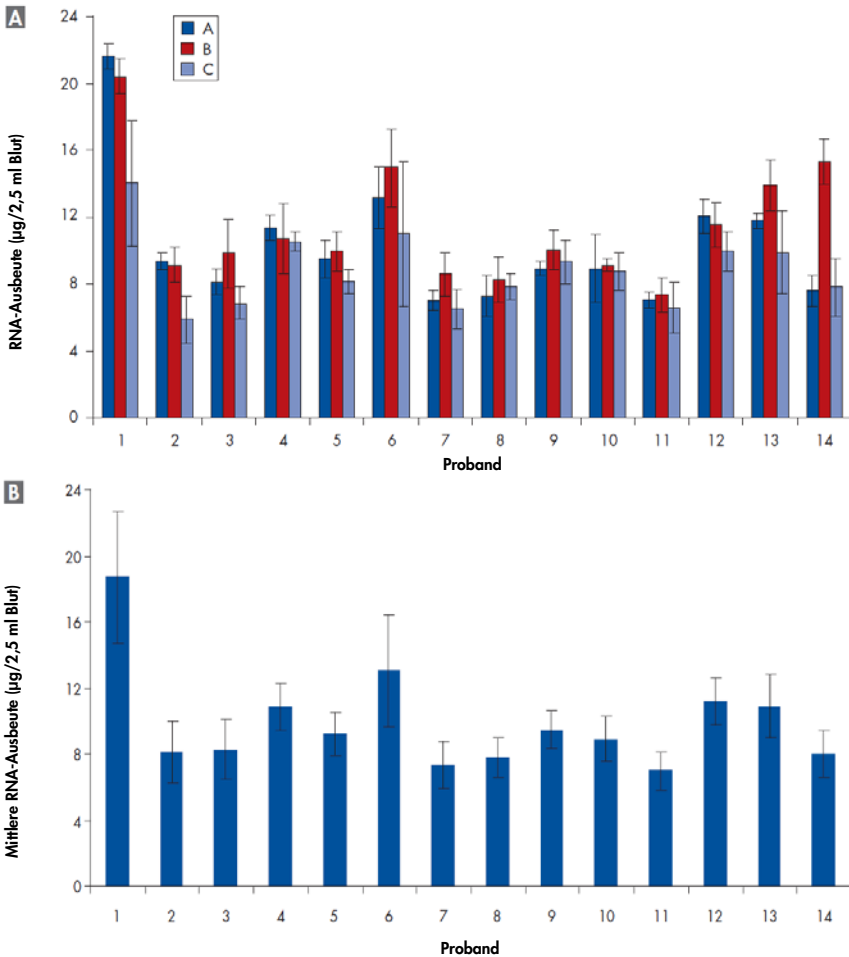


Abbildung 6. Reproduzierbare und wiederholbare RNA-Aufreinigung. Vierfachbestimmungen der Blutproben von 14 Probanden wurden jeweils von 3 Laboranten (A, B, C) manuell durchgeführt. Dabei wurden drei verschiedene Gerätesätze verwendet, wobei alle Proben von einem einzelnen Laboranten mit demselben Gerätesatz vorbereitet wurden. **[A]** Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der RNA-Ausbeute der Replikatproben von denselben Probanden und verschiedenen Laboranten. **[B]** Zwölf Replikatblutproben von jedem der 14 Probanden wurden von den 3 Laboranten verarbeitet. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der RNA-Ausbeute der Proben von denselben Probanden und allen Laboranten. Bei allen RNA-Proben lagen die A_{260}/A_{280} -Verhältnisse im Bereich von 1,8 bis 2,2.

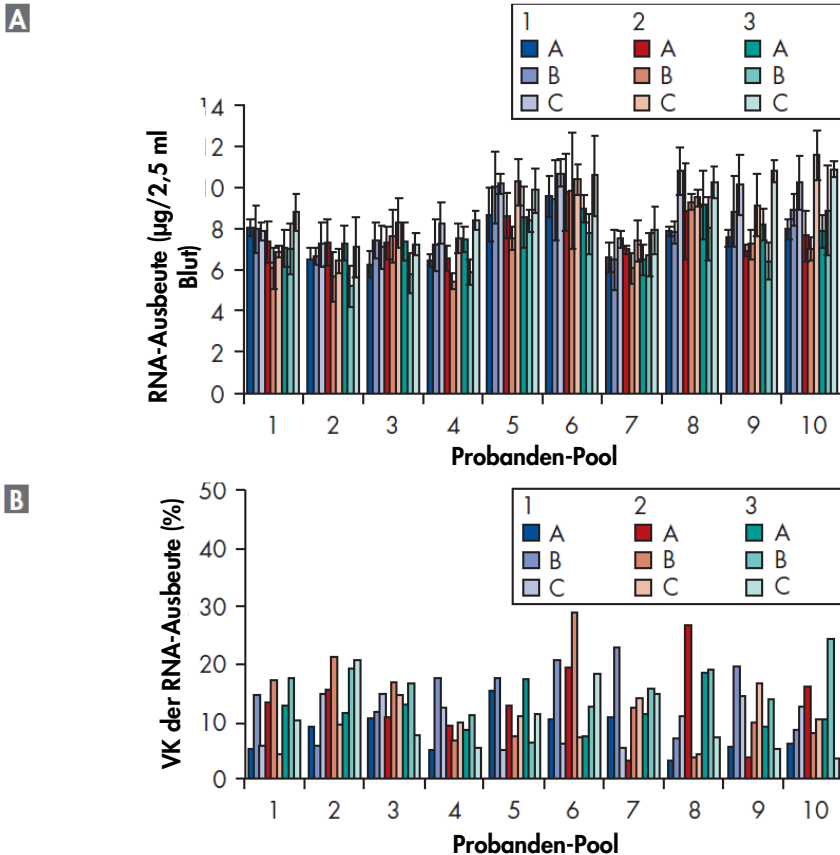


Abbildung 7. Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit der RNA-Ausbeute bei verschiedenen Laboranten und verschiedenen Chargen des PAXgene Blood RNA Kits unter Verwendung gepoolter Blutproben. Blutproben von 30 Probanden wurden in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen (12 Röhrchen pro Proband, d. h. insgesamt 360 Röhrchen). Die Inhalte aller Röhrchen von jeweils 3 Probanden wurden gepoolt und anschließend wieder auf 36 Proben aliquotiert. Diese 36 Proben pro 3-Probanden-Pool wurden von 3 verschiedenen Laboranten manuell verarbeitet. Jeder Laborant verwendete PAXgene Blood RNA Kits aus 3 verschiedenen Chargen für die Aufreinigung und verarbeitete vier Replikatproben aus jedem der 10 Probanden-Pools. **[A]** RNA-Ausbeute und Standardabweichung für alle Kombinationen aus Laborant und Charge. Vier Replikatblutproben aus 10 Probanden-Pools wurden von 3 Laboranten (A, B und C) mit jeder von 3 Chargen des Kits (1, 2 und 3) verarbeitet. Die mittleren Ausbeuten (Säulen) und Standardabweichungen (Fehlerbalken) jeder der vier Replikatproben aus demselben Probanden-Pool für verschiedene Laboranten und Chargen des Kits sind dargestellt. **[B]** Variationskoeffizient (VK) der RNA-Ausbeute pro Probanden-Pool für alle Kombinationen aus Laborant und Charge (A, B und C; 1, 2 und 3), wie berechnet aus den in Abbildung 7A gezeigten mittleren Ausbeuten und Standardabweichungen.

Tabelle 1A. Reproduzierbarkeit innerhalb jeder Charge und für jeden Laboranten für ausgewählte Probanden-Pools (1, 6, 9 und 10)

Datenkombinationen	Probanden-Pool 1 5,1 x 10 ⁶ Zellen/ml			Probanden-Pool 6 6,5 x 10 ⁶ Zellen/ml		
	Mittlere			Mittlere Ausbeute		
	Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)	(µg)	SD (µg)	VK (%)
Charge 1, Laborant A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Charge 1, Laborant B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Charge 1, Laborant C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Charge 2, Laborant A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Charge 2, Laborant B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Charge 2, Laborant C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Charge 3, Laborant A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Charge 3, Laborant B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Charge 3, Laborant C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Datenkombinationen	Probanden-Pool 9 8,4 x 10 ⁶ Zellen/ml			Probanden-Pool 10 10,2 x 10 ⁶ Zellen/ml		
	Mittlere			Mittlere Ausbeute		
	Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)	(µg)	SD (µg)	VK (%)
Charge 1, Laborant A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Charge 1, Laborant B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Charge 1, Laborant C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Charge 2, Laborant A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Charge 2, Laborant B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Charge 2, Laborant C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Charge 3, Laborant A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Charge 3, Laborant B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Charge 3, Laborant C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Tabelle 1B. Reproduzierbarkeit für jeden Laboranten und zwischen allen Chargen für ausgewählte Probanden-Pools (1, 6, 9 und 10)

Datenkombinationen	Probanden-Pool 1 5,1 x 10 ⁶ Zellen/ml			Probanden-Pool 6 6,5 x 10 ⁶ Zellen/ml		
	Mittlere Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)
Laborant A, alle Chargen	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Laborant B, alle Chargen	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Laborant C, alle Chargen	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Datenkombinationen	Probanden-Pool 9 8,4 x 10 ⁶ Zellen/ml			Probanden-Pool 10 10,2 x 10 ⁶ Zellen/ml		
	Mittlere Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)
Laborant A, alle Chargen	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Laborant B, alle Chargen	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Laborant C, alle Chargen	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tabelle 1C. Reproduzierbarkeit innerhalb jeder Charge und zwischen allen Laboranten für ausgewählte Probanden-Pools (1, 6, 9 und 10)

Datenkombinationen	Probanden-Pool 1 5,1 x 10 ⁶ Zellen/ml			Probanden-Pool 6 6,5 x 10 ⁶ Zellen/ml		
	Mittlere Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)
Charge 1, alle Laboranten	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Charge 2, alle Laboranten	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Charge 3, alle Laboranten	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Datenkombinationen	Probanden-Pool 9 8,4 x 10 ⁶ Zellen/ml			Probanden-Pool 10 10,2 x 10 ⁶ Zellen/ml		
	Mittlere Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)
Charge 1, alle Laboranten	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Charge 2, alle Laboranten	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Charge 3, alle Laboranten	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabelle 1D. Reproduzierbarkeit zwischen allen Chargen und allen Laboranten für ausgewählte Probanden-Pools (1, 6, 9 und 10)

Datenkombinationen	Probanden-Pool 1 5,1 x 10⁶ Zellen/ml			Probanden-Pool 6 6,5 x 10⁶ Zellen/ml		
	Mittlere Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)
Charge 1, alle Laboranten	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

Datenkombinationen	Probanden-Pool 9 8,4 x 10⁶ Zellen/ml			Probanden-Pool 10 10,2 x 10⁶ Zellen/ml		
	Mittlere Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (µg)	SD (µg)	VK (%)
Charge 1, alle Laboranten	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detaillierte Analyse von 4 repräsentativen Probanden-Pools. Die Pools wurden nach Zellenzahl der Leukozyten ausgewählt und spiegeln die oberen, mittleren und unteren Werte des Normalbereichs der Leukozytenzahlen wider ($4,8 \times 10^6$ bis $1,1 \times 10^7$ Leukozyten/ml). Die Leukozytenzahl ist der Mittelwert von 3 Leukozytenzahlen der 3 Probanden jedes Probanden-Pools.

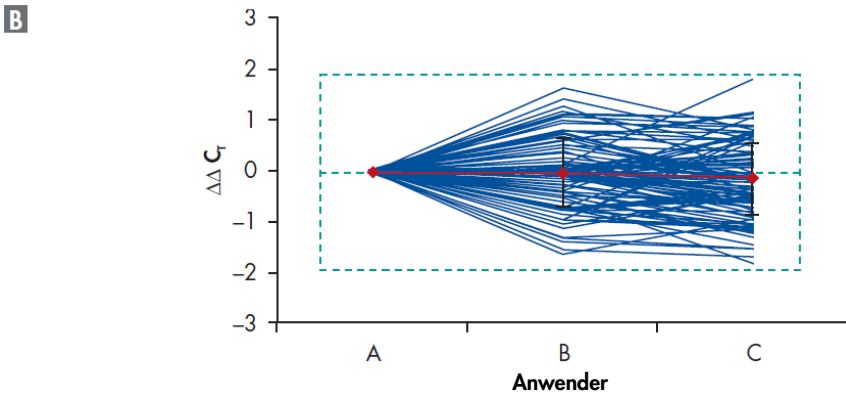
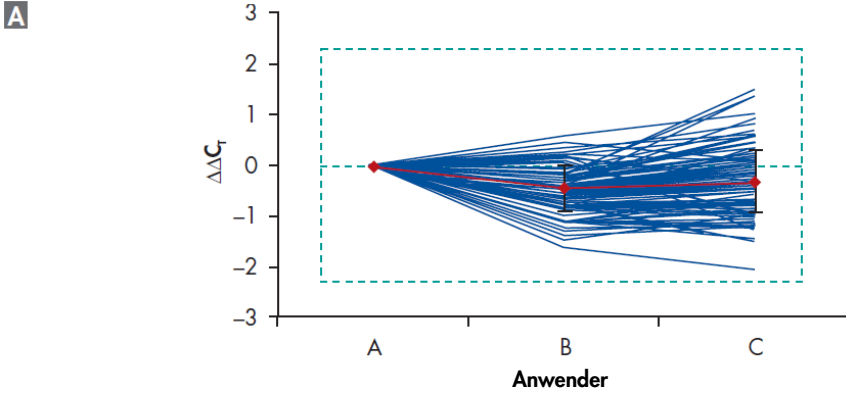


Abbildung 8. Reproduzierbarkeit der RT-PCR – zwischen Anwendern. Die bei dem in Abbildung 7 beschriebenen Experiment wurde aufgereinigte RNA für die Real-time-RT-PCR verwendet. Die relativen Transkriptkonzentrationen von **[A]** FOS und **[B]** IL1B wurden durch Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Aufgetragen sind die Werte aller Proben relativ zu den Werten für Laborant A (10 Probanden-Pools x 3 Kit-Chargen x 4 Replikate = 120 Datensätze für jedes Gen) mit Mittelwerten (rote Linien) und Standardabweichungen (schwarze Balken) für alle Proben. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3\sigma$ -Bereich der Gesamtpräzision der Assays an (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

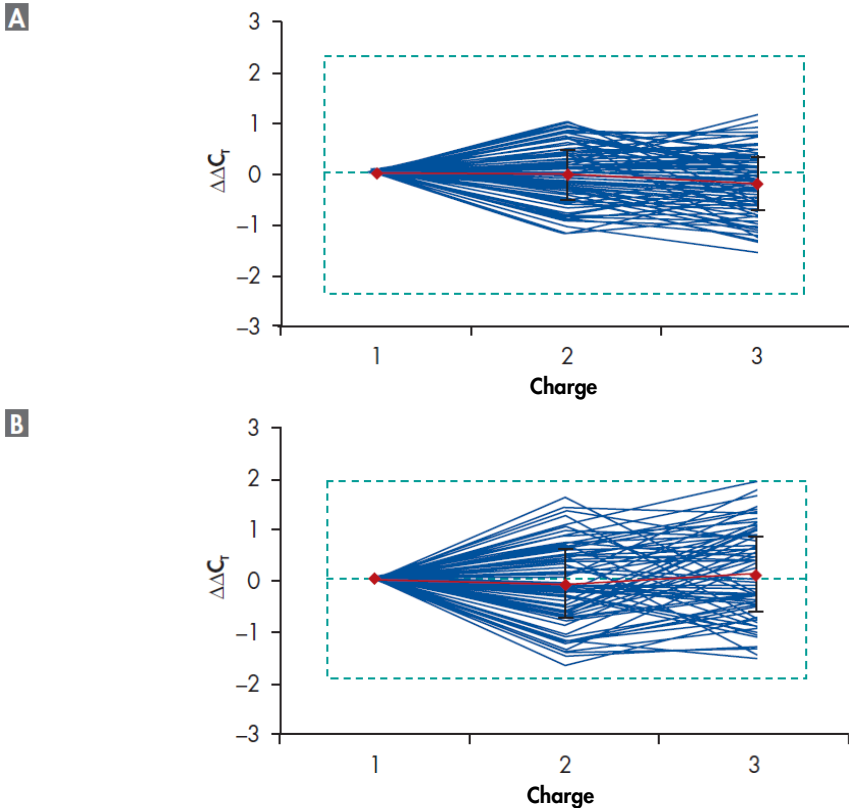


Abbildung 9. Reproduzierbarkeit der RT-PCR – zwischen Kit-Chargen. Die bei dem in Abbildung 7 beschriebenen Experiment wurde aufgereinigte RNA für die Real-time-RT-PCR verwendet. Die relativen Transkriptkonzentrationen von **[A]** FOS und **[B]** IL1B wurden durch Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Aufgetragen sind die Werte aller Proben relativ zu den Werten für Kit-Charge 1 (10 Probanden-Pools x 3 Laboranten x 4 Replikate = 120 Datensätze für jedes Gen) mit Mittelwerten (rote Linien) und Standardabweichungen (schwarze Balken) für alle Proben. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3x$ -Bereich der Gesamtpräzision der Assays an (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Tabelle 2. Zusammenfassung der RT-PCR-Daten aus Abbildung 8 und 9

Testsystem	FOS/18S-rRNA-Assay		IL1B/18S-rRNA-Assay	
	Mittelwert ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Mittelwert ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reproduzierbarkeit für alle Chargen zwischen jedem Laboranten				
Alle Laboranten, Charge 1 – Charge 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle Laboranten, Charge 1 – Charge 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Alle Laboranten, Charge 1 – Charge 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproduzierbarkeit für alle Chargen zwischen jedem Laboranten				
Alle Chargen, Laborant A – Laborant A	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle Chargen, Laborant A – Laborant B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Alle Chargen, Laborant A – Laborant C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Anwender: Techniker(in), der(die) die Studie durchführte.

Charge: Chargennummer des für diese verwendeten Kits.

SD: Standardabweichung.

Gezeigt sind die mittleren $\Delta\Delta C_T$ -Werte (N = 120) und die Standardabweichungen für die in der Abbildung 8 und 9 dargestellten Daten.

Automatische RNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von RNA aus Blut ist auf dem QIAcube Connect MDx oder dem klassischen QIAGEN QIAcube (im Folgenden als QIAcube bezeichnet) automatisiert. Die innovativen QIAcube Geräte nutzen eine fortgeschrittene Technologie zur Verarbeitung von QIAGEN Spin-Säulen und ermöglichen so die nahtlose Integration einer automatischen Probenvorbereitung mit geringem Durchsatz in den Arbeitsablauf Ihres Labors. Die Probenvorbereitung auf dem QIAcube Gerät folgt denselben Schritten wie das manuelle Verfahren (d. h. Lysieren, Binden, Waschen und Eluieren); Sie können also weiterhin das PAXgene Blood RNA Kit zur Aufreinigung qualitativ hochwertiger RNA verwenden.



Abbildung 10. QIAcube Connect MDx.

Das automatische RNA-Aufreinigungsprotokoll besteht aus 2 Teilen (oder Protokollen), dem „PAXgene Blood RNA Part A“ und dem „PAXgene Blood RNA Part B“, mit einem kurzen manuellen Arbeitsschritt zwischen den beiden Teilen (siehe Abbildung 11, Seite 32).

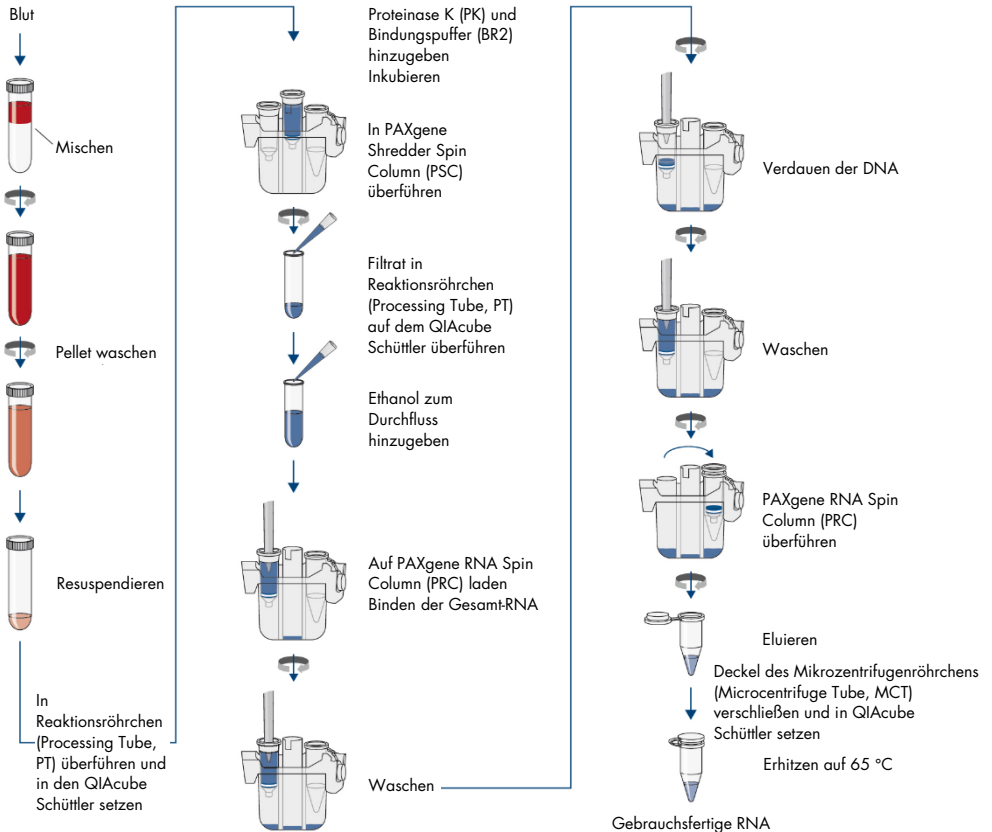


Abbildung 11. Das PAXgene Blood RNA Protokoll (automatisches Verfahren).

Das zentrifugierte, gewaschene und resuspendierte Nukleinsäure-Pellet (siehe „RNA-Konzentration und Aufreinigung“, Seite 20) wird aus dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) in Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT) überführt, die dann in den Theroschüttler auf die Arbeitsplattform des QIAcube Geräts gestellt werden. Der Anwender wählt das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part A“ aus dem Menü aus und startet es. Die QIAcube Geräte führen dann alle Protokollschritte bis zur Elution der RNA in Elutionspuffer (BR5) durch. Der Anwender überführt die Mikrozentrifugenröhrchen (Microcentrifuge Tube, MCT) mit der aufgereinigten RNA in den Theroschüttler des QIAcube Geräts. Der Anwender wählt das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part B“ aus dem Menü aus und startet es, und das QIAcube Gerät führt eine Hitzedenaturierung durch.

Die durchschnittliche Probenvorbereitungszeit (auf der Basis von 12 Probenvorbereitungen) beträgt 151 Minuten*, wobei die Handhabungszeit im Vergleich zum manuellen Protokoll erheblich geringer ist.

Bei ≥ 95 % der verarbeiteten Proben wird eine RNA-Ausbeute von ≥ 3 μg aus 2,5 ml Vollblut gesunder Probanden erzielt. Abbildung 12 (Seite 34) zeigt die RNA-Ausbeuten aus insgesamt 216 Proben, die mit dem automatischen Protokoll mit 3 Kit-Chargen von 3 Laboranten vorbereitet wurden. Da für diese Studien gepoolte Blutproben und keine individuellen PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) verwendet wurden, spiegeln die Ergebnisse nicht die RNA-Ausbeute wider, die bei einer individuellen Blutprobe eines einzelnen Probanden erwartet werden kann. Da die Ausbeuten stark vom untersuchten Probanden abhängen, können die einzelnen RNA-Ausbeuten variieren (Abbildung 12, Seite 34).

Bei Verwendung von bis zu 30 % des Eluats zeigten mindestens 95 % der Proben keine Inhibition bei der RT-PCR. Bei Verwendung des automatischen Protokolls konnte keine Kreuzkontamination zwischen Proben nachgewiesen werden. Dies wurde mittels quantitativer Real-time-RT-PCR von Sequenzen der ABL1- und FOS-Transkripte in RNA-negativen Proben (Wasser) gemessen, die mit RNA-positiven Proben (humanes Vollblut) im gleichen Lauf gepaart waren.

RNA, die mit dem PAXgene Blood RNA System und dem automatischen Protokoll isoliert wurde, ist rein, was die fehlende Inhibition der RT-PCR und die A_{260}/A_{280} -Werte zwischen 1,8 und 2,2 zeigen. In ≥ 95 % aller Proben ist genomische DNA in einem Anteil ≤ 1 % (w/w) vorhanden, wie durch quantitative Real-time-PCR einer Sequenz des Beta-Actin-Gens gemessen wurde. Die Abbildungen 13 und 14 (Seite 35 und 36) zeigen die A_{260}/A_{280} -Werte sowie den relativen Anteil genomischer DNA von insgesamt 216 Proben, die mit dem automatischen Protokoll mit 3 Kit-Chargen von 3 Laboranten vorbereitet wurden.

* Gesamtdauer der Ausführung des Protokolls, einschließlich Vorabhandhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (Zentrifugationen, Pellet-Waschschritte und Pellet-Resuspendierung).

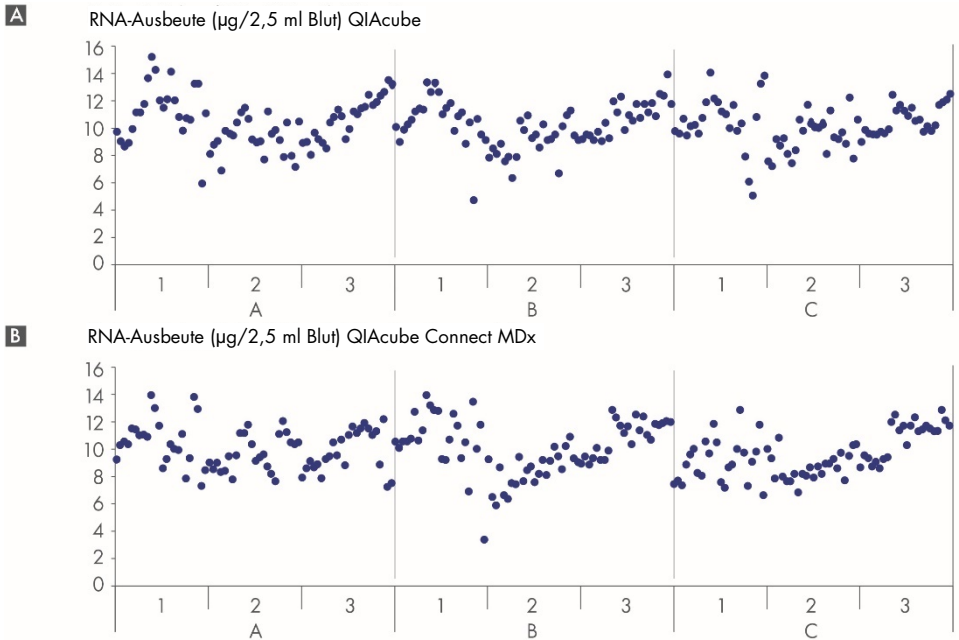


Abbildung 12. RNA-Ausbeute – automatische Probenverarbeitung A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Blutproben von einzelnen Probanden wurden in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen. Die Inhalte der Röhrcchen wurden in 6 Probanden-Pools gepoolt und anschließend wieder aliquotiert. Insgesamt 216 Röhrcchen (d. h. 36 pro Pool) wurden von 3 verschiedenen Laboranten (A, B und C) verarbeitet. Jeder Laborant verwendete PAXgene Blood RNA Kits aus 3 unterschiedlichen Chargen (1, 2 und 3) für die automatische Aufreinigung mit verschiedenen QIAcube und QIAcube Connect MDx Geräten und verarbeitete für jeweils eine Probe der 6 Probanden-Pools vier Replikate. Die RNA-Ausbeuten aller individuellen Proben sind für jede Kombination aus Laborant und Charge dargestellt.

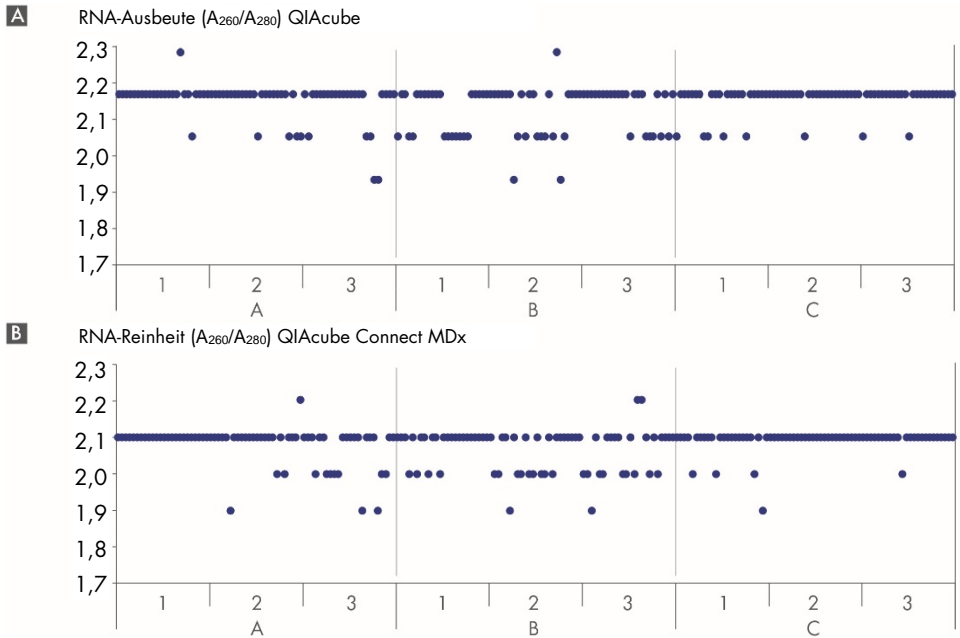


Abbildung 13. RNA-Reinheit (A_{260}/A_{280} -Werte) – automatische Verarbeitung. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx Von 3 Laboranten (A, B und C) wurde unter Verwendung von PAXgene Blood RNA Kits aus 3 unterschiedlichen Chargen (1, 2 und 3) mit verschiedenen QIAcube und QIAcube Connect MDx Geräten in dem in Abbildung 12 beschriebenen Experiment RNA aufgereinigt. Es sind die A_{260}/A_{280} -Werte aller individuellen Proben jeder Kombination aus Laborant und Charge dargestellt.

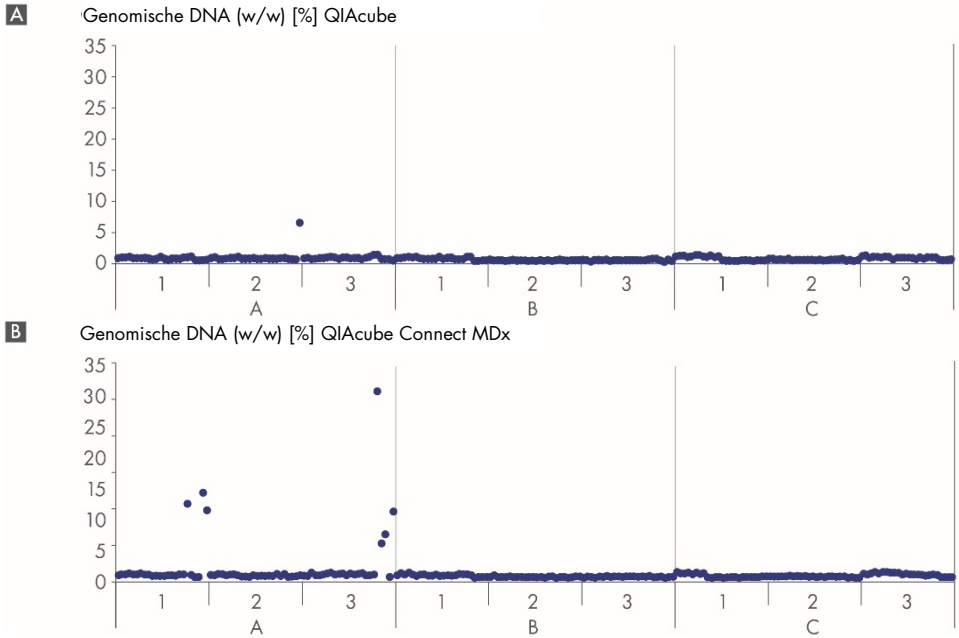


Abbildung 14. RNA-Reinheit (% Kontamination mit genomischer DNA) – automatische Verarbeitung, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Von 3 Laboranten (A, B und C) wurde unter Verwendung von PAXgene Blood RNA Kits aus 3 unterschiedlichen Chargen (1, 2 und 3) mit verschiedenen QIAcube und QIAcube Connect MDx Geräten in dem in Abbildung 12 beschriebenen Experiment RNA aufgereinigt. Es sind die Mengen genomischer DNA (w/w) in allen individuellen Proben jeder Kombination aus Laborant und Charge dargestellt.

Das automatische Protokoll zur RNA-Aufreinigung mit dem PAXgene Blood RNA System liefert hochreproduzierbare und -wiederholbare RT-PCR-Ergebnisse, wie in Abbildung 15 und Abbildung 16 (Seite 37 und 38) gezeigt ist, was dieses Protokoll für klinische diagnostische Tests hochrobust macht.

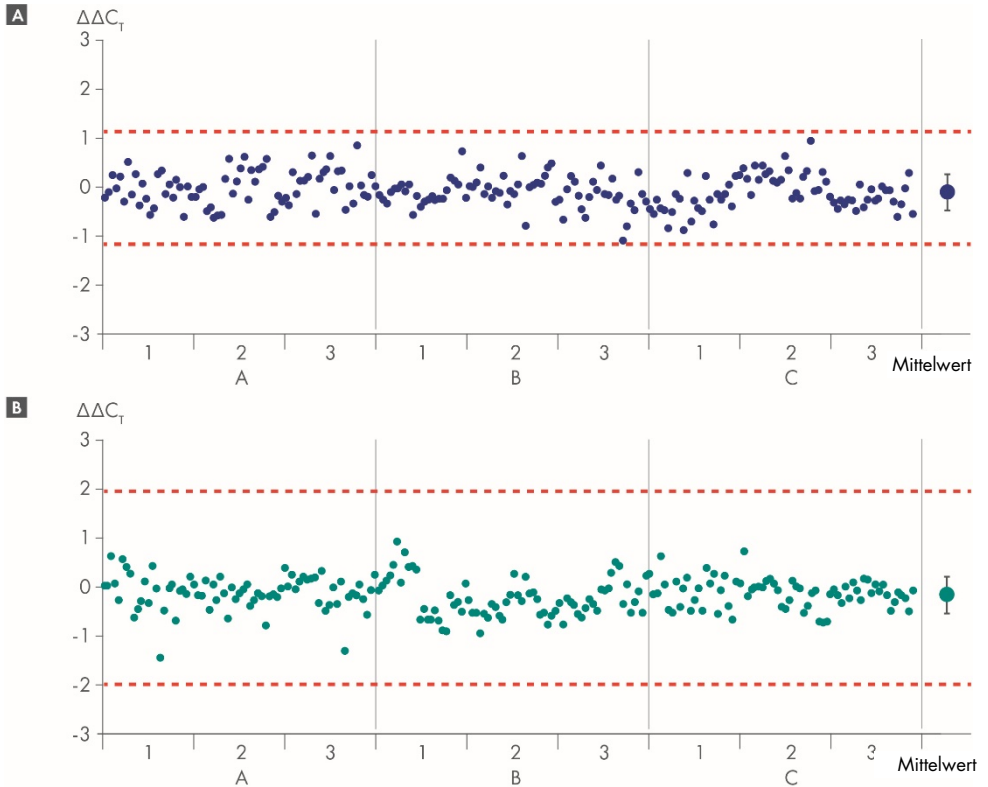


Abbildung 15. Reproduzierbarkeit der RT-PCR – zwischen automatischem (QIAcube) und manuellem Protokoll. Von 3 Laboranten (A, B und C) wurde unter Verwendung von PAXgene Blood RNA Kits aus 3 unterschiedlichen Chargen (1, 2 und 3) mit verschiedenen QIAcube und QIAcube Connect MDx Geräten in dem in Abbildung 12 beschriebenen Experiment unter Verwendung des automatischen Protokolls RNA aufgereinigt. Parallel dazu wurde unter Verwendung des manuellen Protokolls RNA aus den entsprechenden Replikatröhrchen aufgereinigt. Die relativen Transkriptkonzentrationen von **[A] FOS** und **[B] IL1B** wurden durch Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Mögliche Unterschiede der Transkriptkonzentrationen zwischen der RNA, die aus gepaarten Blutproben unter Verwendung der beiden Aufreinigungsprotokolle (automatisches und manuelles Protokoll) vorbereitet wurde, wurden nach dem $\Delta\Delta C_T$ -Verfahren berechnet. Die individuellen $\Delta\Delta C_T$ -Werte für alle Probenpaare (4 Replikate \times 6 Probanden-Pools \times 3 Kit-Chargen \times 3 Laboranten = 216 Paare für jedes Gen) sind als Einzelpunkte mit Mittelwerten (größere Punkte) und Standardabweichungen (schwarze Balken) für alle gezeigten Proben aufgetragen. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3x$ -Bereich der Gesamtprecision der Assays an (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; verschiedene Assaypräzisionen im Vergleich zu den Abbildungen 1–4, 8 und 9 aufgrund verschiedener Assayversionen).

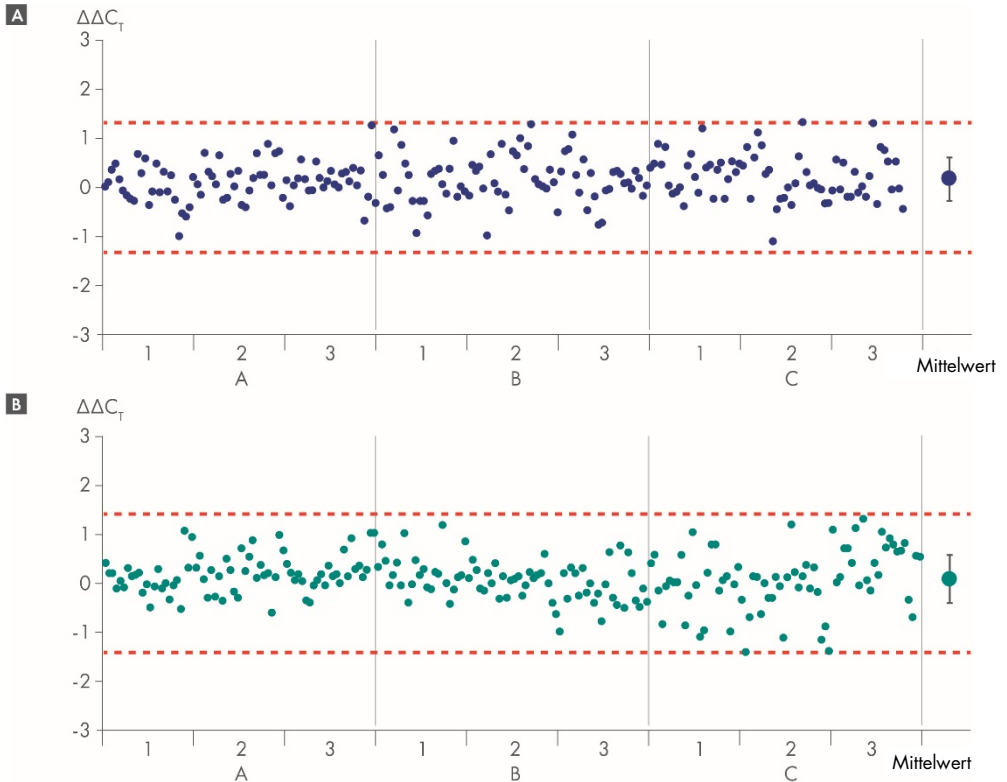


Abbildung 16. Reproduzierbarkeit der RT-PCR – zwischen QIAcube und QIAcube Connect MDx mit dem automatischen Protokoll. Von 3 Laboranten (A, B und C) wurde unter Verwendung von PAXgene Blood RNA Kits aus 3 unterschiedlichen Chargen (1, 2 und 3) auf verschiedenen QIAcube und QIAcube Connect MDx Geräten in dem in Abbildung 12 beschriebenen Experiment unter Verwendung des automatischen Protokolls RNA aufgereinigt. Die relativen Transkriptkonzentrationen von **[A]** FOS und **[B]** IL1B wurden durch Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Mögliche Unterschiede der Transkriptkonzentrationen zwischen der RNA, die aus gepaarten Blutproben unter Verwendung beider Geräte vorbereitet wurde, wurden nach dem $\Delta\Delta C_T$ -Verfahren berechnet. Die individuellen $\Delta\Delta C_T$ -Werte für alle Probenpaare (4 Replikate x 6 Probanden-Pools x 3 Kit-Chargen x 3 Laboranten = 216 Paare für jedes Gen) sind als Einzelpunkte mit Mittelwerten (größere Punkte) und Standardabweichungen (schwarze Balken) für alle gezeigten Proben aufgetragen. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3x$ -Bereich der Gesamtpräzision der Assays an (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; verschiedene Assaypräzisionen im Vergleich zu den Abbildungen 1–4, 8, 9 und 15 aufgrund verschiedener Assayversionen).

Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Für alle Protokolle

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; PreAnalytiX; Kat.-Nr. 762165)
- Ethanol (96–100 %, Reinheitsgrad p. a.)
- Pipetten* (10 µl bis 4 ml)
- Sterile, RNase-freie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere†
- Messzylinder‡
- Zentrifuge*, die 3.000–5.000 x g erreichen kann und mit Ausschwingrotor und passenden Halterungen für die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ausgestattet ist
- Vortexer*
- Zerstoßenes Eis
- Stift für dauerhafte, wasserfeste Beschriftung

* Stellen Sie sicher, dass die Vorrichtungen und Geräte regelmäßig und gemäß den Herstellerempfehlungen überprüft, gewartet und kalibriert werden.

† Stellen Sie sicher, dass Sie mit den Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A, 76) vertraut sind.

‡ Für die Zugabe von Ethanol zum Pufferkonzentrat BR4.

Für das manuelle Protokoll

- Mikrozentrifuge* mit variabler Geschwindigkeit, die mindestens 1.000–8.000 x g erreichen kann, obwohl niedrigere und höhere g-Kräfte erforderlich sein können (siehe Details im Protokoll), und mit einem Rotor für 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen ausgestattet ist
- Schüttelinkubator* für Inkubationen bei 55 °C und 65 °C und Schütteln bei ≥ 400 U/min, aber nicht schneller als 1.400 U/min (z. B. Eppendorf® Thermomixer Compact o. Ä.)

Für das automatische Protokoll (mit dem QIAcube oder QIAcube Connect MDx)

- Schere

Verbrauchsmaterialien für das QIAcube Gerät:

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, Kat.-Nr. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, Kat.-Nr. 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, Kat.-Nr. 990394)†

Zubehör für das QIAcube Gerät:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, Kat.-Nr. 990392)†

Für das automatische Protokoll mit dem QIAcube Connect MDx

- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, Kat.-Nr. 9003070)

* Stellen Sie sicher, dass die Vorrichtungen und Geräte regelmäßig und gemäß den Herstellerempfehlungen überprüft, gewartet und kalibriert werden.

† Auch enthalten im Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, Kat.-Nr. 990395).

QIAcube Connect MDx Servicepakete:

- QIAcube Connect MDx System FUL-2 (QIAGEN, Kat.-Nr. 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3 (QIAGEN, Kat.-Nr. 9003072)
- QIAcube Connect MDx System PRV-1 (QIAGEN, Kat.-Nr. 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1 (QIAGEN, Kat.-Nr. 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1 (QIAGEN, Kat.-Nr. 9003075)

Für das automatische Protokoll mit dem QIAcube

- QIAcube * (QIAGEN, Kat.-Nr. 9001882 [110 V])

* Stellen Sie sicher, dass die Vorrichtungen und Geräte regelmäßig und gemäß den Herstellerempfehlungen überprüft, gewartet und kalibriert werden.

Wichtige Hinweise

Verwendung von QIAcube Geräten

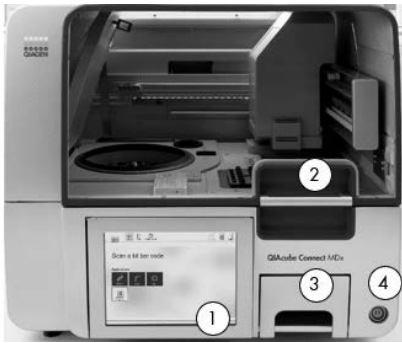
Stellen Sie sicher, dass Sie mit der Bedienung des QIAcube Geräts vertraut sind. Lesen Sie bitte das entsprechende Benutzerhandbuch zum QIAcube Gerät und alle weiteren mit dem QIAcube Gerät gelieferten Informationen, wobei Sie insbesondere die Sicherheitshinweise beachten sollten, bevor Sie mit den automatischen PAXgene Blood RNA Protokollen beginnen.

Die Anweisungen in diesem Abschnitt beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, sowohl auf den QIAcube Connect MDx als auch auf den QIAcube.

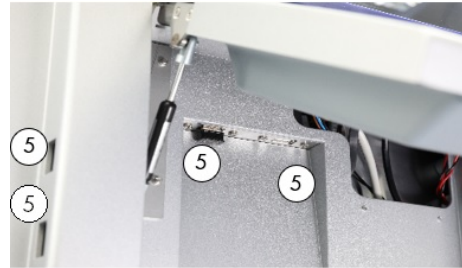
Einschalten des QIAcube Geräts

Schließen Sie die Haube des QIAcube Geräts und schalten Sie das QIAcube Gerät mit dem Netzschalter ein (QIAcube Connect MDx: siehe Abbildung 17, Seite 43; QIAcube: Abbildung 18, Seite 44).

Nach einem Signalton wird der Startbildschirm angezeigt. Das Gerät führt automatisch Initialisierungstests durch.



Frontansicht des QIAcube Connect MDx



Herausgezogener Touchscreen



Rückansicht des QIAcube Connect MDx



Rückansicht des QIAcube Connect MDx

Abbildung 17. Externe Komponenten des QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|---|
| <p>① Touchscreen</p> <p>② Haube</p> <p>③ Abfallschublade</p> <p>④ Netzschalter</p> | <p>⑤ 2 USB-Anschlüsse links vom Touchscreen, 2 USB-Anschlüsse hinter dem Touchscreen (an 1 USB-Anschluss ist ein WLAN-Modul angeschlossen)</p> <p>⑥ RJ-45 Ethernet-Port</p> <p>⑦ Netzkabelbuchse</p> <p>⑧ Kühlluftauslass</p> |
|--|---|



Abbildung 18. Frontansicht des QIAcube.

- | | |
|--|--|
| <p>① Touchscreen</p> <p>② Haube</p> <p>③ Serielle RS232-Schnittstelle hinter Schutzabdeckung (nur zur Verwendung durch die Instrument Service Spezialisten von QIAGEN)</p> | <p>④ USB-Port hinter Schutzdeckel</p> <p>⑤ Netzschalter</p> <p>⑥ Abfallschublade</p> |
|--|--|

Touchscreen

Die QIAcube Geräte werden über einen Touchscreen gesteuert. Der Touchscreen erlaubt dem Anwender die Bedienung des Geräts und führt ihn durch die Einrichtung der Arbeitsplattform. Während der Probenverarbeitung zeigt der Touchscreen den Protokollstatus und die verbleibende Zeit an.



Abbildung 19. Herausgezogener Touchscreen des QIAcube Connect MDx

Installation von Protokollen auf den QIAcube Geräten

Bevor Sie den ersten RNA-Vorbereitungslauf auf einem QIAcube Gerät durchführen können, ist ggf. erst eine Protokollinstallation erforderlich. Installieren Sie die beiden Protokolle „PAXgene Blood RNA Part A“ und „PAXgene Blood RNA Part B“.

Protokolle für den QIAcube Connect MDx können Sie unter www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources (www.qiagen.com/MyQIAcube für QIAcube) herunterladen. Diese müssen auf den im Lieferumfang des QIAcube Geräts enthaltenen USB-Stick heruntergeladen werden. Diese Protokolle werden über den USB-Anschluss auf das Gerät übertragen.

Der USB-Anschluss (QIAcube Connect MDx: neben dem Touchscreen, siehe Abbildung 17, Seite 43; QIAcube: hinter der Schutzabdeckung, siehe Abbildung 18, Seite 44) ermöglicht die Verbindung des im Lieferumfang des QIAcube Geräts enthaltenen USB-Sticks mit dem QIAcube Gerät. Über den USB-Anschluss können auch Dateien, z. B. Protokoll- oder Berichtdateien, vom QIAcube Gerät auf den USB-Stick übertragen werden.



Der USB-Anschluss kann nur mit dem von QIAGEN bereitgestellten USB-Stick verwendet werden. Schließen Sie keine anderen Geräte an diesen Anschluss an.



Entfernen Sie den USB-Stick nicht, während Protokolle heruntergeladen oder Datendateien übertragen werden oder ein Protokoll ausgeführt wird.

Weitere Details zum Prozess des Hochladens von Protokollen auf QIAcube Geräte finden Sie im entsprechenden Handbuch zum verwendeten Gerät.

Beladen des QIAcube Geräts

Um Zeit zu sparen, kann die QIAcube Arbeitsplattform auch während einer oder beider der 10-minütigen Zentrifugationsschritte (Schritt 3 und 5) in „Protokoll: Automatische Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde“, Seite 65, beladen werden.

Reagenzflaschen

Füllen Sie vor jedem Lauf auf dem QIAcube Gerät die 4 Reagenzflaschen mit den in Tabelle 3 (Seite 47) aufgeführten Reagenzien sorgfältig bis zur Maximalmarkierung oder, falls dies unmöglich ist, bis zu dem Niveau, das die mit dem PAXgene Blood RNA Kit gelieferten Puffervolumen erlauben. Beschriften Sie die Flaschen und Deckel mit den Puffernamen und setzen Sie die gefüllten Reagenzflaschen in die richtigen Positionen des Reagenzflaschengestells. Stellen Sie das Gestell auf die Arbeitsplattform des QIAcube Geräts (wie in Abbildung 20–22, Seite 48–50 gezeigt).



Das mitgelieferte Volumen des Puffers BR2 füllt eine Reagenzflasche nicht bis zur Markierung. Die Puffer BR3 und BR4 reichen ggf. nicht aus, um die Flasche bis zur Markierung zu füllen, nachdem mehrere Proben in vergangenen Läufen verarbeitet wurden.



Vergewissern Sie sich, dass die Deckel der Flaschen entfernt wurden, bevor Sie diese auf die Arbeitsplattform stellen.



Die Puffervolumen im PAXgene Blood RNA Kit (50) reichen für maximal 7 RNA-Vorbereitungsläufe mit 2 bis 12 Proben pro Lauf auf dem QIAcube Gerät aus. Generell gilt, dass Läufe mit niedrigeren Probenzahlen vermieden werden sollten, um insgesamt 50 Proben pro Kit in maximal 7 RNA-Vorbereitungsläufen zu verarbeiten. Mehr als 7 RNA-Vorbereitungsläufe könnten dazu führen, dass für die Verarbeitung der letzten Proben keine ausreichenden Puffermengen mehr zur Verfügung stehen.

Tabelle 3. Positionen im Reagenzflaschengestell

Position	Reagenz
1	Bindungspuffer (BR2)
2	96–100 % Ethanol
3	Waschpuffer 1 (BR3)
4	Waschpuffer 2 (BR4)*
5	– (bleibt leer)
6	– (bleibt leer)

* Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Vor der ersten Verwendung geben Sie, wie auf der Flasche angegeben, das 4-fache Volumen Ethanol (96–100 %, Reinheitsgrad p.a.) hinzu, um eine gebrauchsfertige Arbeitslösung herzustellen.

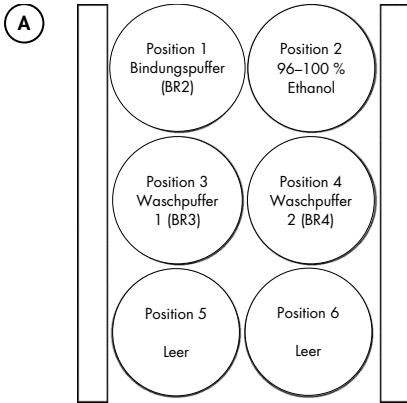


Abbildung 20. Beladen des Reagenzflaschengestells. [A] Schematische Darstellung der Positionen und Inhalte der Flaschen im Reagenzflaschengestell. [B] Laden des Gestells auf das QIAcube Gerät (QIAcube als Beispiel gezeigt).

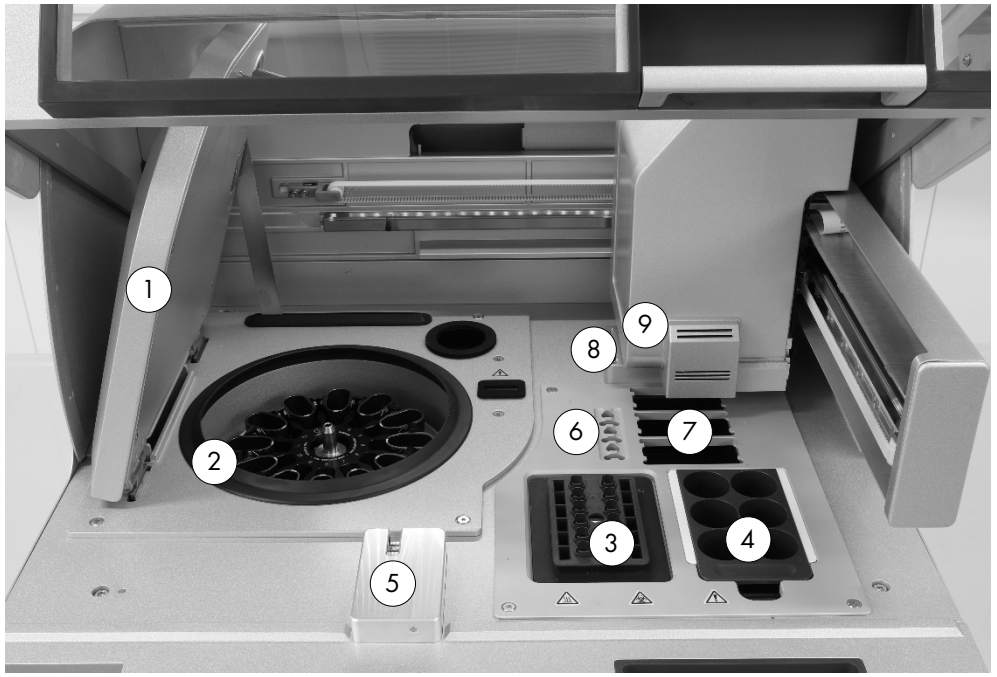


Abbildung 21. Innenansicht des QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|--|
| <p>① Zentrifugendeckel</p> <p>② Zentrifuge</p> <p>③ Schüttler</p> <p>④ Reagenzflaschengestell</p> <p>⑤ Pipettenspitzensensor und Haubenverriegelung</p> | <p>⑥ Stellplätze für Mikrozentrifugenröhrchen</p> <p>⑦ 3 Stellplätze für Pipettenspitzenegestelle</p> <p>⑧ Entsorgungskanäle für Pipettenspitzen und Spin-Säulen</p> <p>⑨ Roboterarm (einschließlich Einkanalpipettierer, Greifer, Ultraschall- und optischem Sensor und UV-LED)</p> |
|---|--|

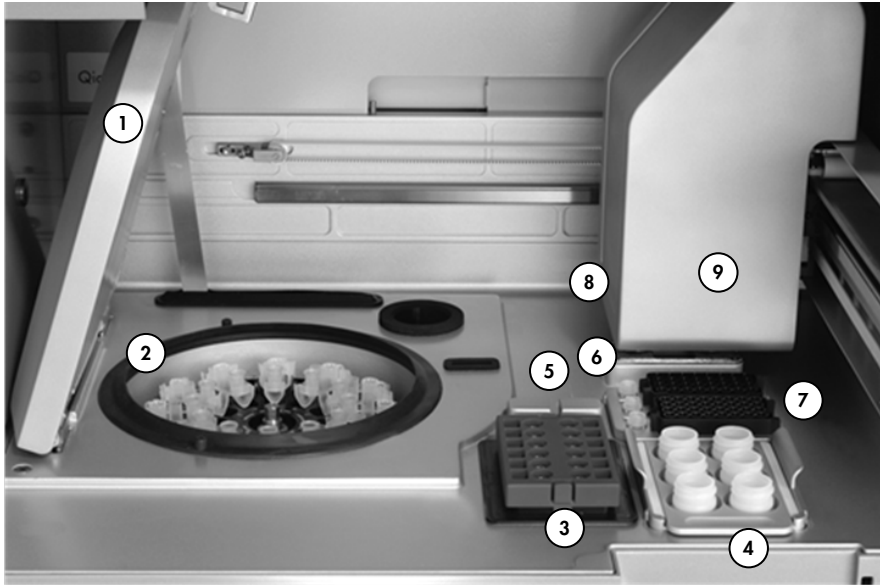


Abbildung 22. Innenansicht des QIAcube.

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ① Zentrifugendeckel ② Zentrifuge ③ Schüttler ④ Reagenzflaschengestell ⑤ Pipettenspitzensensor | <ul style="list-style-type: none"> ⑥ Stellplätze für Mikrozentrifugenröhrchen ⑦ Pipettenspitzenegestelle ⑧ Entsorgungskanäle für Pipettenspitzen und Spin-Säulen ⑨ Roboterarm |
|---|---|

Spin-Säulen (PRC, PSC), Mikrozentrifugenröhrchen (Microcentrifuge Tube, MCT) und andere Kunststoffartikel für das QIAcube Gerät

Setzen Sie 2 Pipettenspitzen mit 1.000- μ l-Filterspitzen in die Arbeitsplattform des QIAcube Geräts (siehe Abbildung 21 und 22, Seite 49 und 50). Füllen Sie die Gestelle mit Spitzen auf, wenn erforderlich.



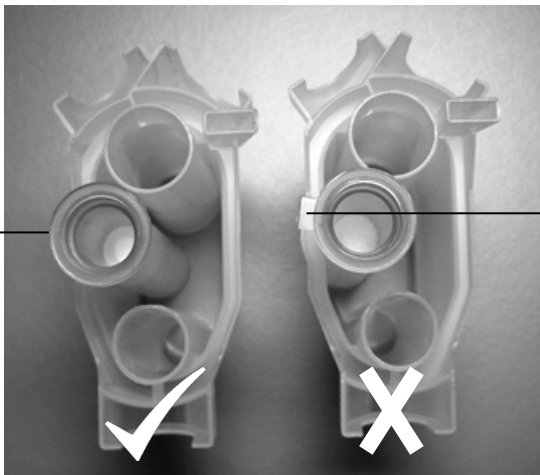
Verwenden Sie nur die 1.000- μ l-Pipettenfilterspitzen, die zur Verwendung mit dem QIAcube Gerät vorgesehen sind.

Beschriften Sie die Rotoradapter und Mikrozentrifugenröhrchen (Microcentrifuge Tube, MCT) für jede Probe mit einem geeigneten wasserfesten Stift. Öffnen Sie die benötigten PAXgene Shredder Spin Columns (PSC) und schneiden Sie mit einer Schere die Deckel vollständig ab (siehe Abbildung 23, Seite 51).



Für einen sachgemäßen Betrieb des Roboterarms im QIAcube Gerät müssen die Deckel und alle Verbindungsstege zu den PAXgene Shredder Spin Columns (PSC) vollständig entfernt (abgeschnitten) werden (siehe Abbildung 23). Andernfalls kann der Roboterarm die Spin-Säulen (PSC, PRC) nicht richtig greifen.

Deckel der Spin-Säule korrekt entfernt



Deckel der Spin-Säule nicht korrekt entfernt; ein Teil des Deckels ist noch befestigt

Abbildung 23. Einsetzen der PAXgene Shredder Spin Column (PSC). Die PAXgene Shredder Spin Column (PSC) wird in die mittlere Position des Rotoradapters eingesetzt. Schneiden Sie den Deckel ab, bevor Sie die Spin-Säule einsetzen.

Setzen Sie die PAXgene RNA Spin Column (PRC), die PAXgene Shredder Spin Column (PSC, ohne Deckel, siehe Abbildung 23, Seite 51) und ein beschriftetes Mikrozentrifugenröhrchen in die vorgesehenen Positionen jedes zuvor beschrifteten Rotoradapters, wie in Tabelle 4 und Abbildung 24 gezeigt.

i Vergewissern Sie sich, dass die Deckel der Spin-Säulen (PRC) und Mikrozentrifugenröhrchen (Microcentrifuge Tube, MCT) bis ganz nach unten in die Schlitz an den Rändern des Rotoradapters hineingeschoben sind, andernfalls können die Deckel bei der Zentrifugation abbrechen.

Tabelle 4. Verbrauchsmaterialien im Rotoradapter

Position	Reagenz	Deckelposition
1	PAXgene RNA Spin Column (rot, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder Spin Column (lila, PSC) (Deckel vor Einsetzen in Rotoradapter abschneiden)	–
3	Mikrozentrifugenröhrchen (Microcentrifuge Tube, MCT)*	L3

* Verwenden Sie die Mikrozentrifugenröhrchen (MCT; 1,5 ml), die im PAXgene Blood RNA Kit enthalten sind.

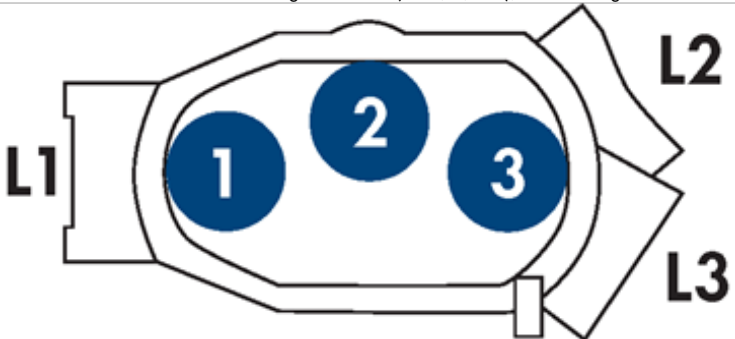


Abbildung 24. Positionen im Rotoradapter. Der Rotoradapter weist drei Röhrchenpositionen (1–3) und drei Deckelpositionen (L1–L3) auf.

Beladen der Zentrifuge

Setzen Sie die bestückten Rotoradapter in die Zentrifugenbecher, wie in Abbildung 25 unten gezeigt.



Wenn Sie weniger als 12 Proben verarbeiten, stellen Sie sicher, dass der Zentrifugenrotor radial unwuchtfrei beladen wird (siehe Abbildung 26, Seite 54). Vor dem Start eines Protokolllaufs müssen auch dann alle Zentrifugenbecher eingesetzt werden, wenn weniger als 12 Proben verarbeitet werden sollen. Eine einzige (eine) Probe oder 11 Proben können nicht verarbeitet werden.



Abbildung 25. Beladen der Zentrifuge bei QIAcube Geräten. Setzen Sie die bestückten Rotoradapter in die Zentrifugenbecher (QIAcube Connect MDx als Beispiel gezeigt).

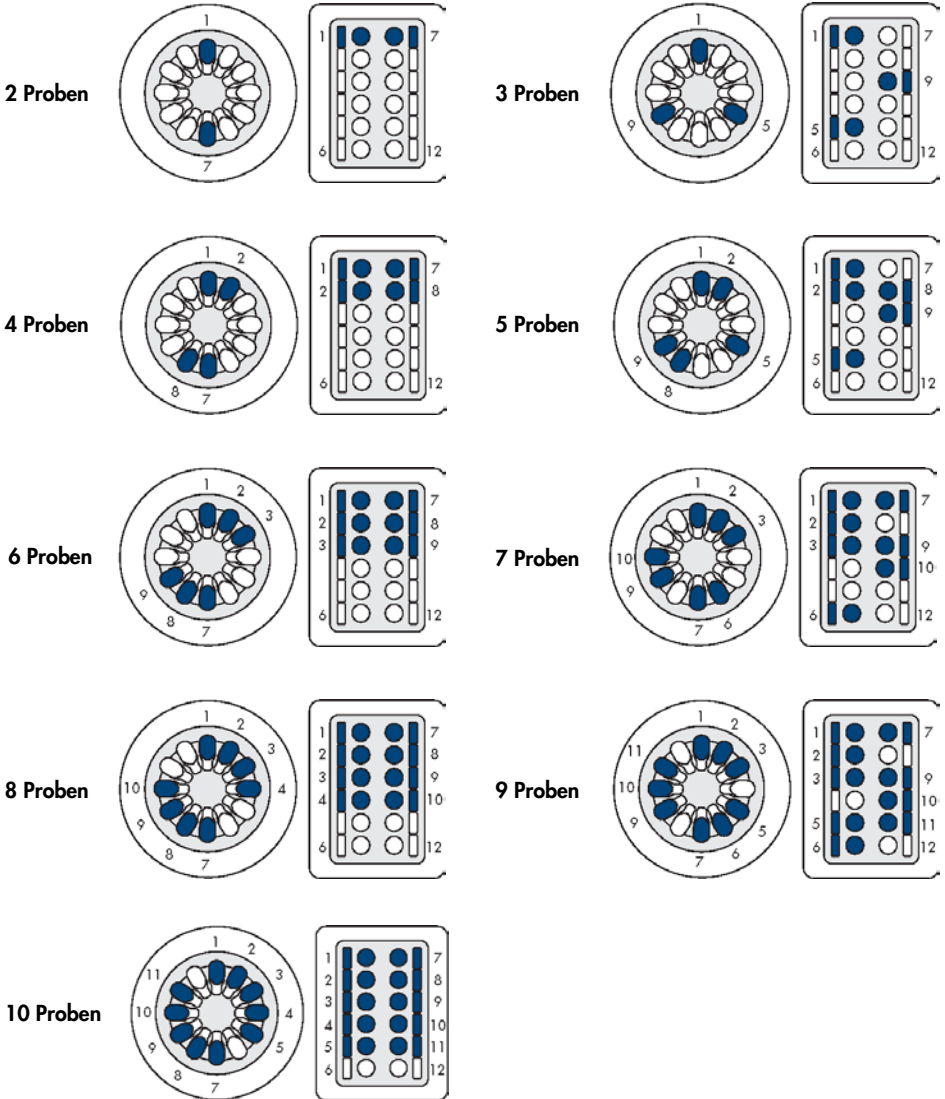


Abbildung 26. Beladen von Zentrifuge und Schüttler. Dargestellt sind die Positionen in Zentrifuge und Schüttler zum Verarbeiten von zwei (2) bis zehn (10) Proben. Nicht verarbeitet werden können eine (1) oder 11 Proben. Zur Verarbeitung von 12 Proben werden alle Positionen in Zentrifuge und Schüttler beladen (nicht abgebildet).

Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT)

Entfernen Sie alle noch von vergangenen Läufen in den Stellplätzen für Mikrozentrifugenröhrchen vorhandenen Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT) (QIAcube Connect MDx: siehe Abbildung 21, Seite 49, QIAcube: siehe Abbildung 22, Seite 50). Füllen Sie 3 Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT) mit den in Tabelle 5 aufgeführten Reagenzmengen entsprechend der Probenzahl in diesem Lauf.

Pipettieren Sie für die DNase-I-Inkubationsmischung das angegebene Volumen DNA-Verdaupuffer (RDD) in ein Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT) und geben Sie das angegebene Volumen DNase-I-Stammlösung (RNFD) hinzu. Mischen Sie vorsichtig, indem Sie die ganze Mischung mit einer 1.000- μ l-Pipettenspitze dreimal auf und ab pipettieren.

Verwenden Sie die 2-ml-Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT), die im PAXgene Blood RNA Kit enthalten sind. Beschriften Sie die Röhrchen gut lesbar mit den Reagenznamen und setzen Sie diese in die vorgesehenen Stellplätze für Mikrozentrifugenröhrchen, wie in Tabelle 6 (Seite 56) angegeben.



DNase I (RNFD) ist besonders anfällig für physikalische Denaturierung. Mischen Sie nur durch Pipettieren mit Pipettenspitzen mit weiter Öffnung, um Scheren zu reduzieren. Verwenden Sie keinen Vortexer.



Stellen Sie sicher, dass nur das benötigte, in Tabelle 5 unten angegebene Volumen pipettiert wird.

Tabelle 5. Benötigte Reagenzvolumen in den Reaktionsröhrchen für die Stellplätze für Mikrozentrifugenröhrchen.

Anzahl Proben	Reagenzvolumen für die angegebene Anzahl Proben (µl)		
	Proteinase K (PK)	DNase-I-Inkubationsmischung	Elutionspuffer (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

Tabelle 6. Stellplätze für Mikrozentrifugenröhrchen

	Position		
	A	B	C
Inhalt	Proteinase K	DNase-I-Inkubationsmischung	Elutionspuffer (BR5)
Gefäß	Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT)*	Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT)*	Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT)*

* Verwenden Sie die 2-ml-Reaktionsröhrchen, die im PAXgene Blood RNA Kit enthalten sind.

Protokoll: Manuelle Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Vergewissern Sie sich, dass die Verpackung des Kits intakt und unbeschädigt ist und die Puffer nicht ausgelaufen sind. Verwenden Sie kein beschädigtes Kit.
- Überprüfen Sie bei den verwendeten Pipetten, ob das korrekte Volumen eingestellt ist und die Flüssigkeit vorsichtig und vollständig angesaugt und abgegeben wird.
- Um zu vermeiden, dass Proben in ein falsches Röhrchen oder eine falsche Spin-Säule überführt werden, stellen Sie sicher, dass alle Röhrchen und Spin-Säulen sachgerecht mit einem geeigneten wasserfesten Stift beschriftet sind. Beschriften Sie jeweils den Deckel und das Röhrchen (Processing Tube, PT; Microcentrifuge Tube, MCT). Beschriften Sie auch das Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT) für die jeweilige Spin-Säule. Verschließen Sie jedes Röhrchen oder jede Spin-Säule, nachdem Sie die Flüssigkeit hineingegeben haben.
- Während der Verarbeitung verschüttete Proben und Puffer können die Ausbeute und die Reinheit der RNA beeinträchtigen.
- Wenn nicht anders angegeben, müssen alle Protokollschritte einschließlich der Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt werden.

Wegen der Sensitivität der Nukleinsäure-Amplifikationstechnik, sind die folgenden Vorsichtsmaßnahmen bei der Probenhandhabung nötig, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden:

- Pipettieren Sie die Probe vorsichtig in die Spin-Säule (PRC, PSC), ohne den oberen Rand der Säule zu benetzen.
- Wechseln Sie zwischen den verschiedenen Pipettierschritten stets die Pipettenspitzen. Verwenden Sie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere.
- Berühren Sie mit der Pipettenspitze nicht die Membran in der Spin-Säule (PRC, PSC).
- Zentrifugieren Sie die Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) nach dem Mischen auf dem Vortexer oder Erhitzen ganz kurz, um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen.
- Tragen Sie während der gesamten Verarbeitung Laborhandschuhe. Sollten Sie die Proben mit den Handschuhen berühren, müssen die Handschuhe sofort gewechselt werden.
- Verschließen Sie die Spin-Säulen (PRC, PSC), bevor Sie sie in die Mikrozentrifuge einsetzen. Zentrifugieren Sie wie im Protokoll beschrieben.
- Öffnen Sie stets nur eine Spin-Säule (PRC, PSC) und vermeiden Sie Aerosolbildung.
- Für eine effiziente Parallelverarbeitung vieler Proben füllen Sie ein Gestell mit Reaktionsröhrchen (PT), in welche die Spin-Säulen (PRC, PSC) nach der Zentrifugation überführt werden können. Entsorgen Sie benutzte Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Filtrat und stellen Sie die neuen Reaktionsröhrchen (PT) mit den Spin-Säulen (PRC, PSC) direkt in die Mikrozentrifuge.

Vorbereitende Schritte

- Das Blut muss in die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) gemäß den Anweisungen im *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch* entnommen werden. In Anhang C (Seite 79) finden Sie Empfehlungen zur Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

- Inkubieren Sie die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) nach der Blutentnahme mindestens 2 Stunden lang bei Raumtemperatur, um eine vollständige Lyse der Blutzellen sicherzustellen. Eine Inkubation der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) über Nacht kann die Ausbeute erhöhen. Wenn ein PAXgene Blood RNA Tube (BRT) nach der Blutentnahme bei 2–8 °C, –20 °C oder –70 °C gelagert worden ist, äquilibrieren Sie das Röhrchen erst auf Raumtemperatur und lagern Sie es für 2 Stunden bei Raumtemperatur, bevor Sie mit der Verarbeitung beginnen.
- Lesen Sie die Sicherheitshinweise auf Seite 10.
- Lesen Sie die Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A, Seite 76).
- Stellen Sie sicher, dass alle Geräte, wie z. B. Pipetten und Schüttelinkubator, regelmäßig nach den Empfehlungen des Herstellers überprüft und kalibriert werden.
- Ein Schüttelinkubator wird für die Protokollschritte 5 und 20 benötigt. Stellen Sie die Temperatur des Schüttelinkubators auf 55 °C ein.
- Im Bindungspuffer (BR2) kann sich beim Lagern ein Niederschlag bilden. Falls nötig, lösen Sie diesen durch Erwärmen auf 37 °C auf.
- Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Vor der ersten Verwendung geben Sie, wie auf der Flasche angegeben, das 4-fache Volumen Ethanol (96–100 %, Reinheitsgrad p.a.) hinzu, um eine gebrauchsfertige Arbeitslösung herzustellen.
- Bereiten Sie vor der erstmaligen Verwendung des RNase-Free DNase Sets eine DNase-I-Stammlösung vor. Lösen Sie die feste DNase I (RNFD; 1.500 Kunitz-Einheiten)* in 550 µl DNase-Resuspendierungspuffer (DRB) auf, der im dem Satz bereitgestellt ist. Achten Sie darauf, dass beim Öffnen des Gefäßes keine DNase I (RNFD) verloren geht. Die rekonstituierte DNase I (RNFD) darf nicht auf einem Vortexer gemischt werden. DNase I ist besonders anfällig für physikalische Denaturierung. Mischen Sie nur durch vorsichtiges Schwenken und Umdrehen des Fläschchens.

* Die Kunitz-Einheit ist die gebräuchliche Maßeinheit zur Bestimmung der DNase-I-Aktivität, die definiert ist als die Menge DNase I, die bei Verwendung einer hochpolymerisierten DNA als Substrat zu einer Zunahme der Absorption bei 260 nm (A_{260}) von 0,001 pro Minute und Milliliter bei 25 °C und pH 5,0 führt (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 und 363).

- Gegenwärtig vorliegende Daten zeigen, dass rekonstituierte DNase I (RNFD) bis zu 6 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden kann. Für eine längerfristige Lagerung der DNase I (RNFD) entnehmen Sie die Stammlösung aus dem Glasgefäß, teilen Sie diese in Aliquote für einmaligen Gebrauch auf (verwenden Sie dafür die mit dem Kit gelieferten 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen [MCT], die für 5 Aliquote reichen) und lagern Sie diese bei –20 °C für bis zu 9 Monate. Aufgetaute Aliquote können bis zu 6 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden. Nach dem Auftauen dürfen die Aliquote nicht wieder eingefroren werden.
- Beachten Sie beim Rekonstituieren und Aliquotieren der DNase I (RNFD) die Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A, Seite 76).

Verfahren

1. Zentrifugieren Sie die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 10 Minuten lang bei 3.000–5.000 x g in einem Ausschwingrotor.



Stellen Sie sicher, dass die Blutproben in den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zuvor mindestens 2 Stunden lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) inkubiert wurden, um eine vollständige Lyse der Blutzellen zu erreichen.



Der Rotor muss Adapter für Rundbodenröhrchen enthalten. Bei Verwendung anderer Röhrchenadaptertypen können die Röhrchen während der Zentrifugation brechen.

2. Entfernen Sie den Überstand durch Dekantieren oder Pipettieren. Geben Sie 4 ml RNase-freies Wasser (RNFW) zum Pellet und verschließen Sie das Röhrchen mit einem neuen sekundären BD Hemogard-Deckel (im Kit mitgeliefert).

Wenn Sie den Überstand dekantieren, achten Sie darauf, dass das Pellet intakt bleibt, und trocknen Sie den Rand des Röhrchens mit einem sauberen Papiertuch ab.

3. Mischen Sie auf dem Vortexer, bis sich das Pellet sichtbar aufgelöst hat, und zentrifugieren Sie 10 Minuten lang bei 3.000–5.000 x g in einem Ausschwingrotor. Entfernen und entsorgen Sie den ganzen Überstand.

Kleinere Zelltrümmer, die sich nach dem Vortexen, aber vor der Zentrifugation im Überstand befinden, stören die weitere Verarbeitung nicht.



Unvollständiges Entfernen des Überstands inhibiert die Lyse und verdünnt das Lysat und beeinträchtigt so die Bedingungen zum Binden der RNA an die PAXgene Membran.

4. Geben Sie 350 µl Resuspendierungspuffer (BR1) hinzu und mischen Sie auf dem Vortexer, bis sich das Pellet sichtbar aufgelöst hat.
5. Pipettieren Sie die Probe in ein 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (Microcentrifuge Tube, MCT). Geben Sie 300 µl Bindungspuffer (BR2) und 40 µl Proteinase K (PK) hinzu. Mischen Sie ca. 5 Sekunden lang auf dem Vortexer und inkubieren Sie 10 Minuten lang bei 55 °C in einem Schüttelinkubator bei 400–1.400 U/min. Stellen Sie nach der Inkubation die Temperatur des Schüttelinkubators auf 65 °C ein (für Schritt 20).



Mischen Sie Bindungspuffer (BR2) und Proteinase K (PK) nicht, bevor Sie diese zur Probe hinzugeben.

6. Pipettieren Sie das Lysat direkt in eine PAXgene Shredder Spin Column (PSC, lila), die sich in einem 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT) befindet, und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang bei maximaler Drehzahl (aber nicht mehr als 20.000 x g).



Pipettieren Sie das Lysat vorsichtig in die Spin-Säule (PSC) und prüfen Sie, dass das Lysat sichtbar vollständig in die Spin-Säule (PSC) überführt wurde.

Zentrifugieren Sie nicht bei mehr als 20.000 x g, um eine Beschädigung der Säulen (PSC) und Röhrchen (Processing Tube, PT) zu vermeiden.



Manche Proben können bereits ohne Zentrifugation durch die PAXgene Shredder Spin Column (PSC) fließen. Dies liegt an niedriger Viskosität mancher Probe und darf nicht als Hinweis auf einen Produktfehler verstanden werden.

7. Überführen Sie den gesamten Überstand der Durchflussfraktion vorsichtig und ohne das Pellet in dem Reaktionsröhrchen aufzuwirbeln in ein neues 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (MCT).
8. Geben Sie 350 µl Ethanol (96–100 %, Reinheitsgrad p.a.) hinzu. Mischen Sie auf dem Vortexer und zentrifugieren Sie kurz (1 bis 2 Sekunden bei 500–1.000 x g), um Tropfen von der Deckelinnenseite des Röhrchens zu entfernen.



Länger als 1–2 Sekunden darf nicht zentrifugiert werden, da dies zum Pelletieren von Nukleinsäuren und damit reduzierten Ausbeuten an Gesamt-RNA führen kann.

9. Pipettieren Sie 700 µl Probe in die PAXgene RNA Spin Column (PRC, rot), die sich in einem 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT) befindet, und zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 8.000–20.000 x g. Überführen Sie die Spin-Säule (PRC) in ein neues 2-ml-Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT) und entsorgen Sie das benutzte Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT) mit dem Durchfluss.
10. Pipettieren Sie die verbliebene Probe in die PAXgene RNA Spin Column (PRC) und zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 8.000–20.000 x g. Überführen Sie die Spin-Säule (PRC) in ein neues 2-ml-Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT) und entsorgen Sie das benutzte Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT) mit dem Durchfluss.



Pipettieren Sie die Probe vorsichtig in die Spin-Säule (PRC) und prüfen Sie, dass die Probe sichtbar vollständig in die Spin-Säule (PRC) überführt wurde.

11. Pipettieren Sie 350 µl Waschpuffer 1 (BR3) in die PAXgene RNA Spin Column (PRC). Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 8.000–20.000 x g. Überführen Sie die Spin-Säule (PRC) in ein neues 2-ml-Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT) und entsorgen Sie das benutzte Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Durchfluss.
12. Geben Sie 10 µl DNase-I-Stammlösung (RNFD) zu 70 µl DNA-Verdaupuffer (RDD) in einem 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (MCT). Mischen Sie durch leichtes Ansnippen des Röhrchens und zentrifugieren Sie kurz, um Flüssigkeitsreste von den Gefäßwänden zu sammeln.

Für die Verarbeitung von beispielsweise 10 Proben geben Sie 100 µl DNase-I-Stammlösung (RNFD) zu 700 µl DNA-Verdaupuffer (RDD). Verwenden Sie die im Kit mitgelieferten 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (MCT).



DNase I ist besonders anfällig für physikalische Denaturierung. Mischen Sie nur durch vorsichtiges Ansnippen des Röhrchens. Verwenden Sie keinen Vortexer.

13. Pipettieren Sie die DNase-I-Inkubationsmischung (80 µl) direkt auf die Membran in der PAXgene RNA Spin Column (PRC) und inkubieren Sie 15 Minuten lang bei 20–30 °C.



Achten Sie darauf, dass die DNase-I-Inkubationsmischung (RNFD) direkt auf die Membran gelangt. Der DNase-Verdau ist unvollständig, wenn ein Teil der Mischung an die Wände oder auf den O-Ring der Spin-Säule (PRC) gelangt und dort haften bleibt.

14. Pipettieren Sie 350 µl Waschpuffer 1 (BR3) in die PAXgene RNA Spin Column (PRC) und zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 8.000–20.000 x g. Überführen Sie die Spin-Säule (PRC) in ein neues 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT) und entsorgen Sie das benutzte Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Durchfluss.

15. Pipettieren Sie 500 µl Waschpuffer 2 (BR4) in die PAXgene RNA Spin Column (PRC) und zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 8.000–20.000 x g. Überführen Sie die Spin-Säule (PRC) in ein neues 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT) und entsorgen Sie das benutzte Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Durchfluss.



Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Stellen Sie sicher, dass vor der Verwendung Ethanol zum Waschpuffer 2 (BR4) gegeben wurde (siehe „Vorbereitende Schritte“, Seite 58).

16. Geben Sie weitere 500 µl Waschpuffer 2 (BR4) in die PAXgene RNA Spin Column (PRC). Zentrifugieren Sie 3 Minuten lang bei 8.000–20.000 x g.

17. Entsorgen Sie das Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Durchfluss und überführen Sie die PAXgene RNA Spin Column (PRC) in ein neues 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT). Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 8.000–20.000 x g.

18. Entsorgen Sie das Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT) mit dem Durchfluss. Überführen Sie die PAXgene RNA Spin Column (PRC) in ein 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) und pipettieren Sie 40 µl Elutionspuffer (BR5) direkt auf die Membran der PAXgene RNA Spin Column (PRC). Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 8.000–20.000 x g, um die RNA zu eluieren.

Um maximale Elutionseffizienz zu erreichen, ist es wichtig, die gesamte Membranfläche mit Elutionspuffer (BR5) zu benetzen.

19. Wiederholen Sie den Elutionsschritt (Schritt 18) wie beschrieben mit 40 µl Elutionspuffer (BR5) und demselben Mikrozentrifugenröhrchen (Microcentrifuge Tube, MCT).

20. Inkubieren Sie das Eluat 5 Minuten lang bei 65 °C im Schüttelinkubator (siehe Schritt 5), ohne zu schütteln. Kühlen Sie nach der Inkubation sofort auf Eis.

Durch diese Inkubation bei 65 °C wird die RNA für nachfolgende Applikationen denaturiert. Überschreiten Sie weder Inkubationsdauer noch -temperatur.

21. Wenn die RNA-Proben nicht sofort verwendet werden, lagern Sie sie bei -20 °C oder -70 °C.

Da die RNA auch nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen denaturiert bleibt, ist es nicht nötig, die Inkubation bei 65 °C zu wiederholen. Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers, wenn Sie die RNA-Proben für einen diagnostischen Assay verwenden.

Für eine genaue RNA-Quantifizierung durch Messung der Absorption bei 260 nm wird empfohlen, die Probe mit 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5 zu verdünnen. * Verdünnen der Probe mit RNase-freiem Wasser kann zu unrichtig niedrigen Werten führen.

Stellen Sie den Nullpunkt des Spektralphotometers mit einer Leerprobe ein, welche die gleichen Anteile Elutionspuffer (BR5) und Tris-HCl-Puffer enthält wie die zu messenden Proben. Der Elutionspuffer (BR5) absorbiert stark bei 220 nm, was zu hohen Hintergrundabsorptionswerten führen kann, wenn der Nullpunkt des Spektralphotometers nicht sachgemäß eingestellt wurde.



Zur Quantifizierung in Tris-HCl-Puffer verwenden Sie folgende Gleichung
 $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Siehe Anhang B, Seite 77.

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Protokoll: Automatische Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Vergewissern Sie sich, dass die Verpackung des Kits intakt und unbeschädigt ist und die Puffer nicht ausgelaufen sind. Verwenden Sie kein beschädigtes Kit.
- Überprüfen Sie bei den verwendeten Pipetten, ob das korrekte Volumen eingestellt ist und die Flüssigkeit vorsichtig und vollständig angesaugt und abgegeben wird.
- Um ein Überführen von Proben in falsche Röhrchen und andere Kunststoff-Verbrauchsmaterialien zu vermeiden, stellen Sie sicher, dass alle Reaktionsröhrchen (PT), Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) und Rotoradapter mit einem geeigneten wasserfesten Stift richtig beschriftet sind. Beschriften Sie jedes Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) sowohl auf dem Deckel als auch dem Röhrchen, jedes Reaktionsröhrchen (PT) sowie jeden Rotoradapter auf der Außenwand.
- Während der Verarbeitung verschüttete Proben und Puffer können die Ausbeute und die Reinheit der RNA beeinträchtigen.
- Wenn nicht anders angegeben, müssen alle Protokollschritte einschließlich der Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt werden.

Wegen der Sensitivität der Nukleinsäure-Amplifikationstechnik, sind die folgenden Vorsichtsmaßnahmen bei der Probenhandhabung nötig, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden:

- Pipettieren Sie die Probe vorsichtig auf den Boden des Reaktionsröhrchens (PT), ohne den oberen Rand des Röhrchens zu benetzen.

- Wechseln Sie zwischen den verschiedenen Pipettierschritten stets die Pipettenspitzen. Verwenden Sie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere.
- Berühren Sie mit der Pipettenspitze nicht die Membran in der Spin-Säule (PRC, PSC).
- Zentrifugieren Sie die Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) nach dem Mischen auf dem Vortexer oder Erhitzen ganz kurz, um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen.
- Tragen Sie während der gesamten Verarbeitung Laborhandschuhe. Sollten Sie die Proben mit den Handschuhen berühren, müssen die Handschuhe sofort gewechselt werden.

Vorbereitende Schritte

- Das Blut muss in die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) gemäß den Anweisungen im *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch* entnommen werden. In Anhang C (Seite 79) finden Sie Empfehlungen zur Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Inkubieren Sie die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) nach der Blutentnahme mindestens 2 Stunden lang bei Raumtemperatur, um eine vollständige Lyse der Blutzellen sicherzustellen. Eine Inkubation der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) über Nacht kann die Ausbeute erhöhen. Wenn ein PAXgene Blood RNA Tube (BRT) nach der Blutentnahme bei 2–8 °C, –20 °C oder –70 °C gelagert worden ist, äquilibrieren Sie das Röhrchen erst auf Raumtemperatur und lagern Sie es für 2 Stunden bei Raumtemperatur, bevor Sie mit der Verarbeitung beginnen.
- Lesen Sie die Sicherheitshinweise auf Seite 10.
- Lesen Sie „Wichtige Hinweise“, Seite 42.
- Lesen Sie die Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A, Seite 76).
- Lesen Sie das entsprechende Benutzerhandbuch zum QIAcube Gerät und alle weiteren mit dem QIAcube Gerät gelieferten Informationen, insbesondere die Sicherheitshinweise.
- Stellen Sie sicher, dass alle Vorrichtungen und Geräte, wie z. B. Pipetten und das QIAcube Gerät, regelmäßig nach den Empfehlungen des Herstellers überprüft und kalibriert werden.

- Im Bindungspuffer (BR2) kann sich beim Lagern ein Niederschlag bilden. Falls nötig, lösen Sie diesen durch Erwärmen auf 37 °C auf.
- Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Geben Sie vor der ersten Verwendung wie auf der Flasche angegeben das korrekte Volumen Ethanol (96–100 %, Reinheitsgrad p.a.) hinzu, um eine gebrauchsfertige Arbeitslösung herzustellen.
- Bereiten Sie vor der erstmaligen Verwendung des RNase-Free DNase Sets eine DNase-I-Stammlösung vor. Lösen Sie die feste DNase I (RNFD; 1.500 Kunitz-Einheiten)* in 550 µl DNase-Resuspendierungspuffer (DRB) auf, der im dem Satz bereitgestellt ist. Achten Sie darauf, dass beim Öffnen des Gefäßes keine DNase I (RNFD) verloren geht. Die rekonstituierte DNase I (RNFD) darf nicht auf einem Vortexer gemischt werden. DNase I ist besonders anfällig für physikalische Denaturierung. Mischen Sie nur durch vorsichtiges Schwenken und Umdrehen des Fläschchens.
- Gegenwärtig vorliegende Daten zeigen, dass rekonstituierte DNase I (RNFD) bis zu 6 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden kann. Für eine längerfristige Lagerung der DNase I (RNFD) entnehmen Sie die Stammlösung aus dem Glasgefäß, teilen Sie diese in Aliquote für einmaligen Gebrauch auf (verwenden Sie dafür die mit dem Kit gelieferten 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen [MCT], die für 5 Aliquote reichen) und lagern Sie diese bei –20 °C für bis zu 9 Monate. Aufgetaute Aliquote können bis zu 6 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden. Nach dem Auftauen dürfen die Aliquote nicht wieder eingefroren werden.
- Beachten Sie beim Rekonstituieren und Aliquotieren der DNase I (RNFD) die Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A, Seite 76).
- Installieren Sie den richtigen Schüttleradapter (im Lieferumfang des QIAcube Geräts enthalten; verwenden Sie den mit der Ziffer „2“ markierten Adapter für 2-ml-Safe-Lock-Reaktionsröhrchen) und setzen Sie das Schüttlergestell auf den Adapter.
- Prüfen Sie die Abfallschublade und leeren Sie diese, falls erforderlich.

* Die Kunitz-Einheit ist die gebräuchliche Maßeinheit zur Bestimmung der DNase-I-Aktivität, die definiert ist als die Menge DNase I, die bei Verwendung einer hochpolymerisierten DNA als Substrat zu einer Zunahme der Absorption bei 260 nm (A_{260}) von 0,001 pro Minute und Milliliter bei 25 °C und pH 5,0 führt (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 und 363).

- Installieren Sie alle zugehörigen Protokolle, wenn dies für vorherigen Läufe noch nicht geschehen ist. Für den QIAcube Connect MDx ist es erforderlich, alle in der zugehörigen ZIP-Datei enthaltenen Protokolle herunterzuladen. Für den klassischen QIAcube genügt die Installation der beiden Protokolle „PAXgene Blood RNA Part A“ und „PAXgene Blood RNA Part B“. Siehe „Installation von Protokollen auf den QIAcube Geräten“, Seite 45.

Verfahren

1. Schließen Sie die Haube des QIAcube Geräts und schalten Sie das QIAcube Gerät über den Netzschalter ein (QIAcube Connect MDx: siehe Abbildung 17, Seite 43; QIAcube: siehe Abbildung 18, Seite 44).

Nach einem Signalton wird der Startbildschirm angezeigt. Das Gerät führt automatisch Initialisierungstests durch.

2. Öffnen Sie die Haube des QIAcube Geräts und stellen Sie die erforderlichen Reagenzien und Kunststoff-Verbrauchsmaterialien auf die Arbeitsplattform des QIAcube Geräts. Siehe „Beladen des QIAcube Geräts“, Seite 46.

Um Zeit zu sparen, kann die Arbeitsplattform auch während einer oder beider der 10-minütigen Zentrifugationsschritte (Schritt 3 und 5) beladen werden.

3. Zentrifugieren Sie die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 10 Minuten lang bei 3.000–5.000 x g in einem Ausschwingrotor.



Stellen Sie sicher, dass die Blutproben in den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zuvor mindestens 2 Stunden lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) inkubiert wurden, um eine vollständige Lyse der Blutzellen zu erreichen.



Der Rotor muss Adapter für Rundbodenröhrchen enthalten. Bei Verwendung anderer Röhrchenadaptertypen können die Röhrchen während der Zentrifugation brechen.

4. Entfernen Sie den Überstand durch Dekantieren oder Pipettieren. Geben Sie 4 ml RNase-freies Wasser (RNFW) zum Pellet und verschließen Sie das Röhrchen mit einem neuen sekundären BD Hemogard-Deckel (im Kit mitgeliefert).

Wenn Sie den Überstand dekantieren, achten Sie darauf, dass das Pellet intakt bleibt, und trocknen Sie den Rand des Röhrchens mit einem sauberen Papiertuch ab.

5. Mischen Sie auf dem Vortexer, bis sich das Pellet sichtbar aufgelöst hat, und zentrifugieren Sie 10 Minuten lang bei 3.000–5.000 x g in einem Ausschwingrotor. Entfernen und entsorgen Sie den ganzen Überstand.

Kleinere Zellrümpfer, die sich nach dem Vortexen, aber vor der Zentrifugation im Überstand befinden, stören die weitere Verarbeitung nicht.



Unvollständiges Entfernen des Überstands inhibiert die Lyse und verdünnt das Lysat und beeinträchtigt so die Bedingungen zum Binden der RNA an die PAXgene Membran.

6. Geben Sie 350 µl Resuspendierungspuffer (BR1) hinzu und mischen Sie auf dem Vortexer, bis sich das Pellet sichtbar aufgelöst hat.
7. Pipettieren Sie die Probe in ein 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT).



Verwenden Sie die 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT), die im PAXgene Blood RNA Kit enthalten sind.

8. Laden Sie die offenen Reaktionsröhrchen (PT) mit den Proben in den Schüttler des QIAcube Geräts (QIAcube Connect MDx: siehe Abbildung 21, Seite 49; QIAcube: siehe Abbildung 22, Seite 50). Die Probenpositionen sind nummeriert, um das Beladen zu erleichtern. Stecken Sie die Schüttlergestellstopfen (im Lieferumfang des QIAcube Geräts enthalten) in die seitlichen Schlitze des Schüttlergestells neben dem jeweiligen Reaktionsröhrchen. Dies ermöglicht die Probendetektion während der Beladungsprüfung.



Vergewissern Sie sich, dass der richtige Schüttleradapter installiert ist (Shaker Adapter; 2 ml, safe-lock tubes, markiert mit der Ziffer „2“; im Lieferumfang des QIAcube Geräts enthalten).



Wenn Sie weniger als 12 Proben verarbeiten, stellen Sie sicher, dass das Schüttlergestell korrekt beladen wird, wie in Abbildung 26, Seite 54, gezeigt. Nicht verarbeitet werden können eine (1) oder 11 Proben. Die Positionsnummern im Schüttlergestell entsprechen den Positionsnummern in der Zentrifuge.

9. Schließen Sie die Haube des QIAcube Geräts (QIAcube Connect MDx: siehe Abbildung 17, Seite 43; QIAcube: siehe Abbildung 18, Seite 44).

10. Wählen Sie das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part A“ aus und starten Sie das Protokoll.

Befolgen Sie die Anweisungen, die auf dem Touchscreen des QIAcube Geräts angezeigt werden.



Vergewissern Sie sich, dass beide Protokollteile (Teil A und Teil B) auf dem QIAcube installiert sind (siehe „Installation von Protokollen auf den QIAcube Geräten“, Seite 45).



Das QIAcube Gerät führt Beladungsprüfungen für Proben, Pipettenspitzen, Rotoradapter und Reagenzflaschen durch.

11. Wenn das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part A“ beendet ist, öffnen Sie die Haube des QIAcube Geräts (QIAcube Connect MDx: siehe Abbildung 17, Seite 43; QIAcube: siehe Abbildung 18, Seite 44). Entnehmen und entsorgen Sie die PAXgene RNA Spin Columns (PRC) aus den Rotoradapters und die leeren Reaktionsröhrchen (PT) aus dem Schüttler.



Während des Laufs werden die Spin-Säulen innerhalb des Rotoradapters vom Roboterarm von Position 1 (Deckelposition L1) nach Position 3 (Deckelposition L2) umgesetzt (siehe Abbildung 24, Seite 52).

12. Schließen Sie die Deckel aller 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (Microcentrifuge Tube, MCT) mit der aufgereinigten RNA in den Rotoradapters (Position 3, Deckelposition L3; siehe Abbildung 24, Seite 52). Überführen Sie die 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) auf den Schüttleradapter des QIAcube Geräts (QIAcube Connect MDx: siehe Abbildung 21, Seite 49; QIAcube: siehe Abbildung 22, Seite 50).

13. Schließen Sie die Haube des QIAcube Geräts (QIAcube Connect MDx: siehe Abbildung 17, Seite 43; QIAcube: siehe Abbildung 18, Seite 44).

14. Wählen Sie das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part B“ aus und starten Sie das Protokoll.

Befolgen Sie die Anweisungen, die auf dem Touchscreen des QIAcube Geräts angezeigt werden.



Dieses Protokoll inkubiert die Proben bei 65 °C und denaturiert die RNA für nachfolgende Applikationen vorbereitet. Lassen Sie diesen Protokollschritt auch dann nicht aus, wenn bei der nachfolgenden Applikation ein Hitzedenaturierungsschritt vorgesehen ist. Eine ausreichende RNA-Denaturierung ist für eine maximale Effizienz bei nachfolgenden Applikationen sehr wichtig.

15. Wenn das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part B“ beendet ist, öffnen Sie die Haube des QIAcube Geräts (QIAcube Connect MDx: siehe Abbildung 17, Seite 43; QIAcube: siehe Abbildung 18, Seite 44). Stellen Sie die Mikrozentrifugenröhrchen (Microcentrifuge Tube, MCT) mit der aufgereinigten RNA sofort auf Eis.



WARNUNG: Heiße Oberfläche. Der Schüttler kann Temperaturen von bis zu 70 °C erreichen. Berühren Sie ihn nicht, wenn er aufgeheizt ist.



Lassen Sie die aufgereinigte RNA nicht im QIAcube Gerät stehen. Da die Proben im Gerät nicht gekühlt werden, kann die aufgereinigte RNA abgebaut werden. Unbeaufsichtigte Probenvorbereitungsläufe über Nacht sind deshalb nicht zu empfehlen.

16. Wenn die RNA-Proben nicht sofort verwendet werden, lagern Sie sie bei –20 °C oder –70 °C.

Da die RNA auch nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen denaturiert bleibt, ist es nicht erforderlich, das Protokoll zur Hitzeinkubation („PAXgene Blood RNA Part B“) zu wiederholen. Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers, wenn Sie die RNA-Proben für einen diagnostischen Assay verwenden.

Für eine genaue RNA-Quantifizierung durch Messung der Absorption bei 260 nm wird empfohlen, die Probe in 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5 zu verdünnen.* Verdünnen der Probe mit RNase-freiem Wasser kann zu unrichtig niedrigen Werten führen.

Stellen Sie den Nullpunkt des Spektralphotometers mit einer Leerprobe ein, welche die gleichen Anteile Elutionspuffer (BR5) und Tris-HCl-Puffer enthält wie die zu messenden Proben. Der Elutionspuffer (BR5) absorbiert stark bei 220 nm, was zu hohen Hintergrundabsorptionswerten führen kann, wenn der Nullpunkt des Spektralphotometers nicht sachgemäß eingestellt wurde.



Zur Quantifizierung in Tris-HCl-Puffer verwenden Sie folgende Gleichung

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Siehe Anhang B, Seite 77.

17. Entnehmen Sie das Reagenzflaschengestell aus der Arbeitsplattform des QIAcube Geräts (QIAcube Connect MDx: siehe Abbildung 21, Seite 49; QIAcube: siehe Abbildung 22, Seite 50) und verschließen Sie alle Flaschen mit den entsprechend beschrifteten Deckeln. In den Flaschen können die Puffer bei Raumtemperatur (15–25 °C) bis zu drei 3 Monate lang gelagert werden. Entnehmen Sie die Reaktionsröhrchen (PT) mitsamt Reagenzresten aus den Stellplätzen für Mikrozentrifugenröhrchen des QIAcube Geräts und entsorgen Sie diese. Entfernen Sie die Rotoradapter aus der Zentrifuge und entsorgen Sie diese. Leeren Sie die Abfallschublade des QIAcube Connect MDx (QIAcube Connect MDx: siehe Abbildung 17, Seite 43; QIAcube: siehe Abbildung 18, Seite 44). Schließen Sie die Haube des QIAcube Geräts und schalten Sie das Gerät mit dem Netzschalter aus.

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auf der Seite „Häufig gestellte Fragen“ (Frequently Asked Questions, FAQ) unseres Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Die Wissenschaftler des technischen Service von QIAGEN helfen Ihnen bei allen Fragen zum Protokoll oder zu anderen Angaben in diesem Handbuch bzw. zu Proben- und Assay-Technologien gerne weiter (Kontaktinformationen siehe letzte Seite oder unter www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

RNA ist abgebaut

RNase-Kontamination



Achten Sie sorgfältig darauf, dass Sie bei der Verarbeitung oder späteren Behandlung keine RNasen in die Reagenzien einschleppen (siehe Anhang A, Seite 76).

Zu niedrige RNA-Ausbeute

a) Weniger als 2,5 ml Blut in das PAXgene Blood RNA Tube (BRT) entnommen



Stellen Sie sicher, dass 2,5 ml Blut in die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wird (siehe *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch*).




b) RNA-Konzentration in Wasser gemessen




Die RNA muss in 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5* verdünnt werden, damit eine genaue Quantifizierung möglich ist (siehe Anhang B, Seite 77).

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Kommentare und Vorschläge

- c) Zelltrümmer wurden in die PAXgene RNA Spin Column (PRC) in den Schritten 9 und 10 des manuellen Protokolls überführt
- d) Überstand in Schritt 3 nicht vollständig entfernt
- e) Das Blut wurde nach Entnahme in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) weniger als 2 Stunden inkubiert
-  Vermeiden Sie beim Pipettieren des Überstands in Schritt 7 des manuellen Protokolls, größere Partikel zu überführen (Überführung kleiner Zelltrümmer beeinträchtigt die Verarbeitung nicht).
-  Stellen Sie sicher, dass der gesamte Überstand entfernt wird. Wenn der Überstand dekantiert wird, entfernen Sie am Rand des PAXgene Blood RNA Tube (BRT) anhaftende Tröpfchen durch Abtupfen auf einem Papiertuch. Führen Sie angemessene Vorsichtsmaßnahmen durch, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
-  Inkubieren Sie das Blut nach der Entnahme in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) für mindestens 2 Stunden.

Niedriger A_{260}/A_{280} -Wert

- a) Zum Verdünnen der RNA für die A_{260}/A_{280} -Messung wurde Wasser verwendet
-  Verwenden Sie 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5, um die RNA vor dem Messen der Reinheit zu verdünnen* (siehe Anhang B, Seite 77).

* 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.

Kommentare und Vorschläge

- b) Nullpunkt des Spektralphotometers nicht richtig eingestellt



Stellen Sie den Nullpunkt des Spektralphotometers mit einer Leerprobe ein, welche die gleichen Anteile Elutionspuffer (BR5) und 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5 enthält wie die zu messenden Proben. Der Elutionspuffer (BR5) absorbiert stark bei 220 nm, was zu hohen Hintergrundabsorptionswerten führen kann, wenn der Nullpunkt des Spektralphotometers nicht sachgemäß eingestellt wurde.

Gerätefehler

QIAcube Gerät arbeitet nicht ordnungsgemäß

Lesen Sie aufmerksam das entsprechende QIAcube Benutzerhandbuch und beachten Sie insbesondere den Abschnitt Fehlerbehebung. Stellen Sie sicher, dass das QIAcube Gerät ordnungsgemäß gewartet wird, wie im Benutzerhandbuch beschrieben.

Anhang A: Allgemeine Hinweise zur Handhabung von RNA

Handhabung von RNA



Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die üblicherweise keine Cofaktoren für ihre Funktion benötigen. Da RNasen schwer zu deaktivieren sind und schon winzige Mengen ausreichen, um RNA abzubauen, dürfen keine Artikel aus Glas oder Kunststoff verwendet werden, ohne vorher erst eine mögliche RNase-Kontamination zu eliminieren. Es sollte sorgfältig darauf geachtet werden, dass während und nach dem Aufreinigungsverfahren keine RNase unbeabsichtigt in die RNA-Probe eingeschleppt wird. Um ein RNase-freies Umfeld zu schaffen und zu erhalten, müssen beim Arbeiten mit RNA folgende Vorsichtsmaßnahmen bei der Vorbehandlung und bei der Verwendung von Einmal-Gefäßen und Mehrweg-Behältern und Lösungen eingehalten werden.

Allgemeine Handhabung



Beim Arbeiten mit RNA sollten immer angemessene mikrobiologische und aseptische Arbeitsweisen verwendet werden. An Händen und Staubpartikeln können Bakterien und Schimmelpilze haften. Sie sind die häufigste Ursache für eine RNase-Kontamination. Tragen Sie daher immer Latex- oder Vinylhandschuhe, wenn Sie mit Reagenzien oder RNA-Proben arbeiten, um eine RNase-Kontamination über die Hautoberfläche oder durch staubige Laborgeräte zu vermeiden. Wechseln Sie die Einmal-Handschuhe häufig und halten Sie Röhrchen möglichst immer verschlossen. Halten Sie die aufgereinigte RNA auf Eis, wenn Sie sie für nachfolgende Applikationen Aliquote pipettieren.

Protokolle zum Entfernen von Kontaminationen mit RNase von Glasartikeln und aus Lösungen finden Sie in allgemeinen molekularbiologischen Lehrbüchern, wie beispielsweise Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Anhang B: Quantifizierung und Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA

Quantifizierung der Gesamt-RNA

Die Konzentration von RNA kann durch Messen der Absorption bei 260 nm (A_{260}) in einem Spektralphotometer bestimmt werden. Um die Signifikanz der Messwerte zu gewährleisten, müssen sie im linearen Bereich des Spektralphotometers liegen. Eine Absorption von 1 Einheit bei 260 nm entspricht 44 µg RNA pro ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Diese Gleichung gilt nur für Messungen in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5*. Falls die RNA-Probe verdünnt werden muss, muss dies daher in 10 mM Tris-HCl erfolgen. Wie weiter unten beschrieben (siehe „Reinheit der RNA“, Seite 78), liefert das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und bei 280 nm eine Abschätzung der Reinheit der RNA. Stellen Sie beim Messen der RNA-Proben sicher, dass die Küvetten RNase-frei sind. Stellen Sie den Nullpunkt des Spektralphotometers mit einer Leerprobe ein, welche die gleichen Anteile Elutionspuffer (BR5) und Tris-HCl-Puffer enthält wie die zu messenden Proben. Der Elutionspuffer (BR5) absorbiert stark bei 220 nm, was zu hohen Hintergrundabsorptionswerten führen kann, wenn der Nullpunkt des Spektralphotometers nicht sachgemäß eingestellt wurde. Beispiel für die Berechnung der RNA-Quantifizierung.

Volumen der RNA-Probe = 80 µl
Verdünnung (1/15) = 10 µl RNA-Probe + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Absorptionsmessung der verdünnten Probe in einer RNase-freien Küvette.
 A_{260} = 0,3
Konzentration der-Probe = $44 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$
= $44 \times 0,3 \times 15$
= 198 µg/ml
Gesamt-Ausbeute = Konzentration x Probenvolumen in Milliliter
= $198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
= 15,8 µg RNA

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Reinheit der RNA

Das Verhältnis der Messwerte bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) stellt eine Abschätzung der Reinheit der RNA hinsichtlich von Verunreinigungen bereit, die im UV-Bereich absorbieren, wie z. B. Protein. Das A_{260}/A_{280} -Verhältnis ist jedoch stark vom pH-Wert abhängig. Ein niedriger pH-Wert führt zu einem geringeren A_{260}/A_{280} -Verhältnis und einer reduzierten Sensitivität für Proteinkontamination.* Wir empfehlen, die Absorption in 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5 zu messen, um genaue Werte zu erhalten. Reine RNA weist in 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5 ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,8 bis 2,2 auf. Stellen Sie den Nullpunkt des Spektralphotometers mit einer Leerprobe ein, welche die gleichen Anteile Elutionspuffer (BR5) und Tris-HCl-Puffer enthält wie die zu messenden Proben. Der Elutionspuffer (BR5) absorbiert stark bei 220 nm, was zu hohen Hintergrundabsorptionswerten führen kann, wenn der Nullpunkt des Spektralphotometers nicht sachgemäß eingestellt wurde.

* 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.

Anhang C: Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Die folgenden Empfehlungen von BD können für die Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) hilfreich sein. Weitere Informationen zu den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) finden Sie im *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch*.

Anweisungen zum Entfernen des BD Hemogard-Deckels

1. Greifen Sie die PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mit einer Hand, wobei Sie den Daumen unter den BD Hemogard-Deckel platzieren. (Weitere Stabilität erreichen Sie, wenn Sie Ihren Arm auf einer festen Unterlage abstützen.) Drehen Sie mit der anderen Hand den BD Hemogard-Deckel, während Sie gleichzeitig mit dem Daumen nach oben drücken, **NUR BIS SICH DER STOPFEN IM RÖHRCHEN LÖST.**
2. Nehmen Sie den Daumen weg, bevor Sie den Deckel abheben. Verwenden Sie **NICHT** den Daumen, um den Deckel vom PAXgene Blood RNA Tube (BRT) zu drücken. Vorsicht: Wenn Blut im PAXgene Blood RNA Tube (BRT) enthalten ist, besteht Expositionsgefahr. Um eine Verletzung beim Entfernen des Deckels zu vermeiden, ist es wichtig, dass der Daumen, mit dem der Verschluss nach oben gedrückt wird, keinen Kontakt mehr mit dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) hat, sobald der BD Hemogard-Deckel gelöst worden ist.
3. Heben Sie den Deckel vom PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ab. In dem unwahrscheinlichen Fall, dass sich die Kunststoff-Kappe vom Gummistopfen löst, **VERSUCHEN SIE NICHT, DEN VERSCHLUSS WIEDER ZUSAMMENZUSETZEN.** Entfernen Sie vorsichtig den Gummistopfen vom PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Anweisungen zum Einsetzen des sekundären BD Hemogard-Deckels

1. Bringen Sie den Deckel wieder auf dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) an.
2. Drehen Sie unter gleichzeitigem Drücken, bis der Stopfen wieder ganz sitzt. Ein vollständiges Wiedereinsetzen des Stopfens ist nötig, damit der Deckel beim Handhaben des PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sicher verschlossen bleibt.

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene RNA Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, Reaktionsröhrchen, RNase-freie DNase I, RNase-freie Reagenzien und Puffer. Zur Verwendung mit den PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 Blutentnahmeröhrchen	762165
Produkte, die bei QIAGEN bestellt werden können		
Starter Pack, QIAcube	Lieferumfang des Pakets: Reagenzflaschengestelle (3); Etikettenstreifen für Gestelle (8); 200- μ l-Filterspitzen (1.024); 1.000- μ l-Filterspitzen (1.024); 1.000- μ l-Filterspitzen mit weiter Öffnung (1.024); 30-ml-Reagenzflaschen (18); Rotoradapter (240); Rotoradapterhalter	990395
Filter-Tips, 1000 μ l (1024)	Sterile Einmal-Filterspitzen in Gestell	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagenzflaschen (30 ml) mit Deckel; 6er-Packung; zur Verwendung mit dem Reagenzflaschengestell des QIAcube Geräts	990393

Rotor Adapters (10 x 24)	Für 240 Präparationen: 240 Einweg-Rotoradapter; zur Verwendung mit QIAcube Geräten	990394
Reagent Bottle Rack	Gestell zur Aufnahme von 6 x 30-ml-Reagenzflaschen auf der Arbeitsplattform des QIAcube Geräts	990390
Rotor Adapter Holder	Halter für 12 Einmal-Rotoradapter; zur Verwendung mit QIAcube Geräten	990392
Produkte, die bei BD bestellt werden können*		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,75-Zoll-Kanüle (0,8 x 19 mm), 12-Zoll-Schlauch (305 mm) mit Luer-Adapter; 50 pro Box, 200 pro Verpackungseinheit	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Verpackungseinheit nur für Durchmesser von 13 mm und 16 mm; 1.000 pro Verpackungseinheit	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm, 4,0-ml-Sog, mit rotem BD Hemogard-Deckel und Papieretikett; 100 pro Box, 1.000 pro Verpackungseinheit	368975

* Dieses Blutentnahmezubehör sind typische Produkte, die mit PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) verwendet werden können. Weitere Informationen zu diesem Zubehör und zu seiner Bestellung finden Sie im Internet unter www.preanalytix.com.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie jeweils im PreAnalytiX oder QIAGEN Kit-Handbuch oder in den Gebrauchsanweisungen. Die PreAnalytiX und QIAGEN Kit-Handbücher und Benutzerhandbücher sind verfügbar auf www.preanalytix.com und www.qiagen.com oder können vom technischen Service von PreAnalytiX angefordert werden.

Revisionsverlauf des Handbuchs

Dokument und Bearbeitung	Änderungen	Datum
HB-0101-004, R2	Änderungen zur Einhaltung der GHS-Bestimmungen im gesamten Dokument	Juni 2015
HB-0101-005, R3	Neue Vorlage; Überarbeitungen von automatisierten Protokoll- und Leistungsdaten; Aktualisierung der Sicherheitshinweise zur Einhaltung der GHS-Vorschriften; Änderungen der Gerätedetails und der Erklärung zu den Produktbenutzungsbedingungen.	Februar 2019
HB-0101-006, R3	Korrektur des Kit-Namens in der Tabelle „Kit-Inhalt“ auf S. 5.	Januar 2020
HB-0101-007, R4	QIAcube Connect MDx zum automatischen Protokoll hinzugefügt; Sprache im gesamten Handbuch aktualisiert, um Referenzen zum QIAcube Connect MDx aufzunehmen; Tabellen-, Seiten- und Abbildungsnummern und -zahlen durchgängig aktualisiert.	Dezember 2020

PreAnalytiX Worldwide

PreAnalytiX Produkte werden von den QIAGEN und BD vertrieben

QIAGEN – Kundenservice

Bestellungen www.QIAGEN.com/contact | Technischer Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com

BD – Kundenservice

Argentina, Uruguay and Paraguay
Orders: 0800.444.5523
E-mail: crc_argentina@bd.com

Australia
Orders: 1.800.656.100
Fax: 1.800.656.110
E-mail: bd_anz@bd.com

Austria
Orders: 43.1.7063660
Fax: 43.1.706366011
E-mail: customercare.at@bd.com

Belgium
Orders: 32.53.720.556
Fax: 32.53.720.549
E-mail: orders.be@bd.com

Brazil
Orders: 0800.055.56.54
E-mail: 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

Central and Eastern Europe
Orders: 48.22.377.11.11
Fax: 48.22.377.11.02
Bulgaria orders: info_bulgaria@bd.com
Czech Republic orders: info_czech@bd.com
Croatia orders: info_croatia@bd.com
Hungary orders: info_hungary@bd.com
Poland orders: info_poland@bd.com
Romania orders: info_romania@bd.com
Southeast Europe orders: info_balkan@bd.com
Serbia orders: info_serbia@bd.com
Slovakia orders: info_slovakia@bd.com
Slovenia orders: info_slovenia@bd.com

Denmark
Orders: 45.43.43.45.66
Fax: 45.43.96.56.76
Orders: ordre.dk@bd.com
Technical support: bddenmark@bd.com

Finland
Orders: 358.9.88.70.780
Fax: 358.9.88.70.7816
Orders: tilauksef.fi@bd.com
E-mail: bdsuomi@bd.com

France
Orders: 33.476.68.36.36
Fax: 33.476.68.36.93
E-mail: serviceclientbdf@bd.com
Orders: commandesfr@bd.com
Technical support: vacutainerfr@bd.com

Germany
Orders: 49.6221.3050
Fax: 49.6221.305.216
E-mail: customercare.de@bd.com

India
Orders: 91.124.3949390
Orders: 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

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

Italy
Orders: 39.02.48240.500
Fax: 39.02.48240.775
Technical support: 39.3450655140
E-mail: 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



A QIAGEN / BD Company