

December 2020

PAXgene[®] Blood RNA Kit-håndbog

Version 2



50 (katalognr. 762174)

R4 **MAT** 1122120DK

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Fremstillet af QIAGEN GmbH for PreAnalytiX



A QIAGEN / BD Company

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

PAXgene Blood RNA Kit kan ikke fås i alle lande; indhent venligst oplysninger.

Aftale om begrænset licens

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af PAXgene Blood RNA Kit accepterer følgende vilkår:

1. PAXgene Blood RNA Kit må kun bruges i overensstemmelse med *PAXgene Blood RNA Kit-håndbogen*, og kun med de komponenter, der er i kittet. PreAnalytiX giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i kittet med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i *PAXgene Blood RNA Kit-håndbogen* og yderligere protokoller, som fås på www.preanalytix.com.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver PreAnalytiX ingen garanti om at dette kit, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, gendannes eller videresælges.
4. PreAnalytiX afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage eller lade andre tage skridt, der kunne føre til eller fremme handlinger, der forbydes ovenfor.
6. PreAnalytiX kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale i enhver ret, og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

Opdaterede licensvilkår findes på www.preanalytix.com.

Betinget salg

Nærværende produkt leveres med en licens i henhold til visse krav i US-7,270,953 og US-7,682,790 samt EP-1820793 B1 og udenlandske tilsvarende patentkrav på brugen af produktet til behandling de nukleinsyrekomplekser, der dannes under prøveopsamling i en PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005-2020 PreAnalytiX GmbH, alle rettigheder forbeholdes.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Schweiz

www.preanalytix.com

PreAnalytiX distributører

PreAnalytiX-produkter fremstilles og distribueres af QIAGEN eller BD for PreAnalytiX. Produkterne kan ikke bestilles hos PreAnalytiX GmbH.


Adressen på den lokale PreAnalytiX-distributør findes på sidste side.

Indhold

Kit-indhold	5
Symboler	6
Opbevaringsforhold	7
Tilsluttet anvendelse	8
Særlige anvisninger til brug af produktet	8
Kvalitetskontrol	9
Teknisk service	9
Sikkerhedsinformation	9
Indledning	13
Princip og procedure	13
Prøvetagning og stabilisering	14
RNA-koncentration og oprensning	19
Manuel RNA-oprensning	19
Automatisk RNA-oprensning	29
Udstyr og reagenser, der skal leveres af brugeren	38
Vigtige bemærkninger	41
Brug af QIAcube-instrumenter	41
Installation af protokoller på QIAcube-instrumenter	44
Opfyldning af QIAcube-instrumenter	45
Protokol: Manuel oprensning af RNA i alt fra humant helblod indsamlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	55

Protokol: Automatisk oprensning af RNA i alt fra humant helblod indsamlet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT).....	62
Fejlsøgningsvejledning	69
Bilag A: Generelle bemærkninger om håndtering af RNA	72
Bilag B: Kvantificering og kvalitetsbestemmelse for RNA i alt	73
Appendiks C: Håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	75
Bestillingsinformation.....	76
Revisionshistorik for håndbogen	78

Kit-indhold

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalognr.			762174
Antal forberedelser			50
BR1	Resuspension Buffer (resuspensionsbuffer)	RES BUF	20 mL
BR2	Binding Buffer (bindingsbuffer) *	BIND BUF	18 mL
BR3	Wash Buffer (vaskebuffer) 1 *	WASH BUF 1	45 mL
BR4	Wash Buffer 2 (vaskebuffer) (concentrat) *	WASH BUF 2 CONC	11 mL
BR5	Elution Buffer (elueringsbuffer)	ELU BUF	6 mL
RNFW	RNase-frit vand (i flaske)	PEL WASH	2 × 125 mL
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinase K) (grønt låg)	PROTK	2 × 1,4 mL
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA-spin-kolonner) (røde)	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (forarbejdningsrør) (2 mL)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Sekundær BD Hemogard™-lukning	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (mikrocentrifugerør) (1,5 mL)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-frit (DNase I, RNase-frit) (lyofiliseret)	DNA REM	1500 Kunitz- enheder [†]
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA-digestionsbuffer) (hvidt låg)	DNA DIG BUF	2 × 2 mL
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (DNase-resuspensionsbuffer) (rør, lilla låg)	DNase RES BUF	2 mL
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (PAXgene Shredder-spin-kolonner) (lilla)	PAXgene SHRED CC	5 × 10
Håndbog	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (Version 2) PAXgene Blood RNA Kit-håndbog (version 2)		1

*Må ikke bringes i kontakt med desinfektionsmidler, som indeholder blegemiddel. Indeholder et guanidinsalt. Se sikkerhedsinformation på side 10.

Symboler



Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> test



Læs brugsanvisningen



Holdbarhedsdato



Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik



Katalognummer



Lotnummer



Materialenummer



Komponenter



Antal



Sterilisering gennem UV-stråling



Kunitz-enheder



Tilsætter



Indeholder



Rekonstitueret

* Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. For at fremstille en brugsklar opløsning skal der inden første brug tilsættes fire dele ethanol (96–100 %, renhedsgrad p.a.), som angivet på flaskeetiketten.

† Kunitz-enheden er den almindeligt anvendte enhed til opmåling af DNase I, defineret som den mængde DNase I, som forårsager en stigning i A_{260} på 0,001 pr. minut pr. milliliter ved 25 °C, pH 5,0, hvor der anvendes høj-polymeriseret DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 og 363).

DNase

Deoxyribonuclease I

EtOH

Ethanol

GITC

Guanidin-isothiocyanat

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Globalt handelsvarenummer



Må ikke genbruges



Temperaturbegrænsning



Øvre temperaturgrænse



Producent



Vigtig bemærkning

Opbevaringsforhold

PAXgene RNA-spin-kolonner (PRC), PAXgene Shredder-spin-kolonner (PSC), proteinase K (PK) og alle bufferne (BR 1, BR2, BR3, BR4 og BR5) skal opbevares et tørt sted ved den temperatur, der er angivet på kitetiketten.

RNase-Free DNase Set, som indeholder DNase I (RNFD), DNA digestionsbuffer (RDD) og DNase resuspensionsbuffer (DRB), sendes ved omgivelsestemperatur. Alle komponenter i det RNase-Free DNase Set skal umiddelbart efter levering opbevares ved den temperatur, som er angivet på etiketten. Ved korrekt opbevaring er kittet stabilt indtil den udløbsdato, der er angivet på kit-æskens.

Tilsigtet anvendelse

PAXgene Blood RNA System indeholder et rør til blodprøvetagning (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) og et kit (PAXgene Blood RNA Kit) til oprensning af nukleinsyrer. Systemet er beregnet til tapning, opbevaring og transport af blodprøver og til stabilisering af intracellulær RNA i lukkede prøverør, samt den efterfølgende isolering og oprensning af værts-RNA fra helblod til RT-PCR anvendt i molekylær diagnostisk testning.

Ydelseskarakteristika for PAXgene Blood RNA System er kun etableret med FOS- og IL1B-gentranskriptioner. Brugeren er ansvarlig for at etablere egnede ydelseskarakteristika for PAXgene Blood RNA System for andre mål-transkriptioner.

Indikationer for brug

PAXgene Blood RNA Kit bruges til oprensning af intracellulært RNA fra helblod, som blev opsamlet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Når kittet anvendes sammen med PAXgene Blood RNA Tube (BRT), leverer systemet oprenset intracellulært RNA fra helblod til RT-PCR anvendt i molekylærdiagnostisk testning.

Særlige anvisninger til brug af produktet

PAXgene Blood RNA Kit er beregnet til oprensning af intracellulært RNA fra humant helblod ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytter/mL) til in vitro-diagnostisk anvendelse. Det er ikke beregnet til oprensning af genomisk DNA eller virale nukleinsyrer fra humant helblod. Grundet det begrænsede antal transkriptioner, der er valideret til stabiliserings-specifikationer (FOS- og IL1B-gentranskriptioner), kan der ikke angives ydelseskarakteristika for alle transkriptioner. Brugerne skal gennemgå både deres egne og producentens data for at afgøre, om det er nødvendigt at validere andre transkriptioner.

Produktet er beregnet til brug af professionelle brugere, f. eks. laboratorietechnikere og læger, der er uddannet i in vitro-diagnostiske procedurer.

Anvisninger vedrørende anvendelsen af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) findes i *PAXgene Blood RNA Tube-håndbogen*.

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af PAXgene Blood RNA Kit efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

Teknisk service

QIAGEN Teknisk Service leverer høj kvalitet og er altid til rådighed. De tekniske serviceafdelinger er bemandede med erfarne videnskabelige medarbejdere med vidtrækkende praktisk og teoretisk erfaring i molekylærbiologi og brugen af PreAnalytiX-produkterne. Kontakt os, hvis der er spørgsmål vedrørende PAXgene Blood RNA Kit.

Ring til QIAGEN Teknisk Service for at få teknisk assistance og yderligere oplysninger.

Sikkerhedsinformation

EU – brugerne skal rapportere alle alvorlige hændelser med relation til udstyret til producenten og den ansvarlige nationale myndighed. Uden for EU – kontakt din lokale QIAGEN-repræsentant ved alle hændelser, eller hvis du har spørgsmål vedrørende udstyret.

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer.

Ved arbejde med biologiske og kemiske midler skal der altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller for at reducere risikoen for infektion (f.eks. med HIV eller hepatitis B-virus) og skader. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er). De findes online i bekvemt og kompakt PDF-format på www.preanalytix.com, hvor sikkerhedsdatabladene for dette kit kan læses eller udskrives.

FORSIGTIG



Der må IKKE tilsættes blegemiddel eller syreholdige opløsninger direkte i affaldet fra prøveklargøringen.

Bindingsbuffer (BR2) og vaskebuffer 1 (BR3) indeholder guanidin-thiocyanat, som kan reagere stærkt ved kontakt med klorblegemiddel. Hvis der spildes bindingsbuffer (BR2) eller vaskebuffer 1 (BR3), skal der gøres rent med et egnet laboratorierengøringsmiddel og vand. Hvis den spildte væske indeholder potentielt smittefarlige reagenser, renses fladen først med rengøringsmiddel og vand og derefter med 1 % (v/v) natriumhypochlorit (blegemiddel).

RNA-stabiliseringsopløsningen og blodvæsken fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan desinficeres med 1 del klorblegemiddelopløsning (5 % natriumhypochlorit) til 9 dele RNA-stabiliseringsopløsning og blodvæske.

Affaldet fra klargøring af prøve, såsom supernatanter fra centrifugeringstrinnene i RNA-oprensningsproceduren, skal altid betragtes som potentielt smittefarligt. Affald skal derfor autoklaveres eller forbrændes før bortskaffelse for at ødelægge eventuelt smittefarligt materiale. De officielle regler for bortskaffelse skal overholdes.

Følgende fare- og sikkerhedssætninger gælder komponenter i PAXgene Blood RNA Kit. Se sikkerhedsoplysningerne om PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) i *PAXgene Blood RNA Tube-håndbog*.

Buffer BR2



Indeholder: guanidin-thiocyanat. Fare! Farlig ved indtagelse. Kan være farlig ved hudkontakt eller ved indånding. Forårsager alvorlig øjenskade. Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger. Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis det kan gøres let. Fortsæt med at skylle. Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge.

Buffer BR3



Indeholder: ethanol; guanidin-thiocyanat. Fare! Brandfarlig væske og damp. Forårsager alvorlig øjenskade. Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre. Holdes væk fra varme/gnister/åben ild/varme overflader. Rygning forbudt. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis det kan gøres let. Fortsæt med at skylle. Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge.

DNase I



Indeholder: DNase. Fare! Kan forårsage allergisk hudreaktion. Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding. Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. Bær beskyttelseshandsker/ beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. Anvend åndedrætsværn. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ring til en GIFTINFORMATION eller en læge. Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vedkommende hviler i en stilling, som letter vejtrækningen.

Proteinase K



Indeholder: proteinase K. Fare! Forårsager let hudirritation. Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding. Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. Bær beskyttelseshandsker/ beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. Anvend åndedrætsværn. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ring til en GIFTINFORMATION eller en læge. Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vedkommende hviler i en stilling, som letter vejtrækningen.

Indledning

Det første skridt ved mange molekylærbiologiske analyser af cellulært RNA er indsamling af helblod. Ustabiliteten af den cellulære RNA-profil in vitro udgør imidlertid et væsentligt problem. Undersøgelser hos PreAnalytiX har vist, at antallet af kopier for enkelte mRNA-species i helblod kan forandre sig mere end tusind gange under transport eller opbevaring ved stuetemperatur.* Årsagerne til dette er den hurtige nedbrydning af RNA og den inducerede ekspression af bestemte gener efter blodtapningen. Sådanne forandringer af RNA-ekspressionens profil forhindrer pålidelige resultater i genekspressionsundersøgelser. Det er derfor afgørende at finde en metode, som bevarer RNA-ekspressionsprofilen under og efter flebotomi, for at opnå en nøjagtig analyse af genekspression i humant helblod.

Princip og procedure

PreAnalytiX har udviklet et system, som gør det muligt at tappe, stabilisere, opbevare og transportere humane helblodsprøver og som leverer en hurtig og effektiv protokol for oprensning af intracellulært RNA. Systemet kræver, at der bruges PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; US-patenter 6,602,718 og 6,617,170) til blodindsamling og RNA-stabilisering, efterfulgt af manuel eller automatisk RNA-oprensning med PAXgene Blood RNA Kit. Den manuelle og automatisk protokol giver i alt væsentligt den samme præstation med hensyn til RNA-kvalitet og -udbytte. Der er inkluderet præstationsdata for den manuelle protokol (side 22 – 29) og den automatiske protokol (side 31 – 35) i denne håndbog.



QIAGEN QIAcube Connect MDx er ikke tilgængelig i alle lande. Kontakt QIAGEN Teknisk Service for at få flere oplysninger.

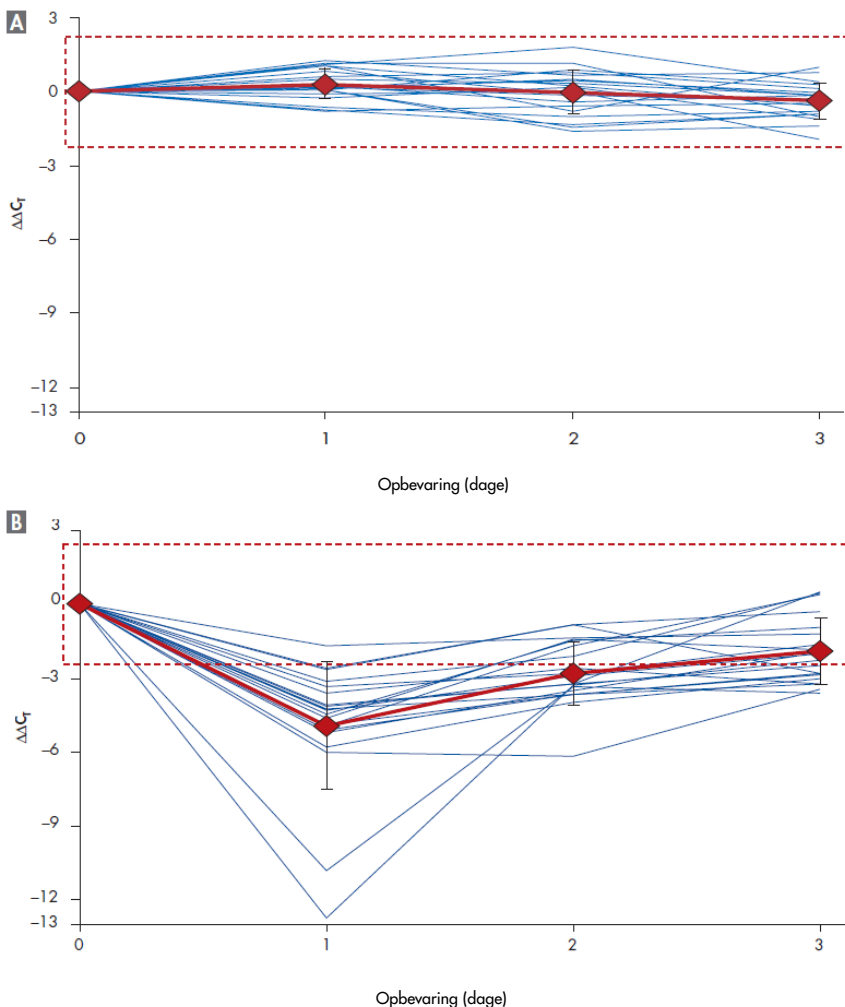
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Prøvetagning og stabilisering

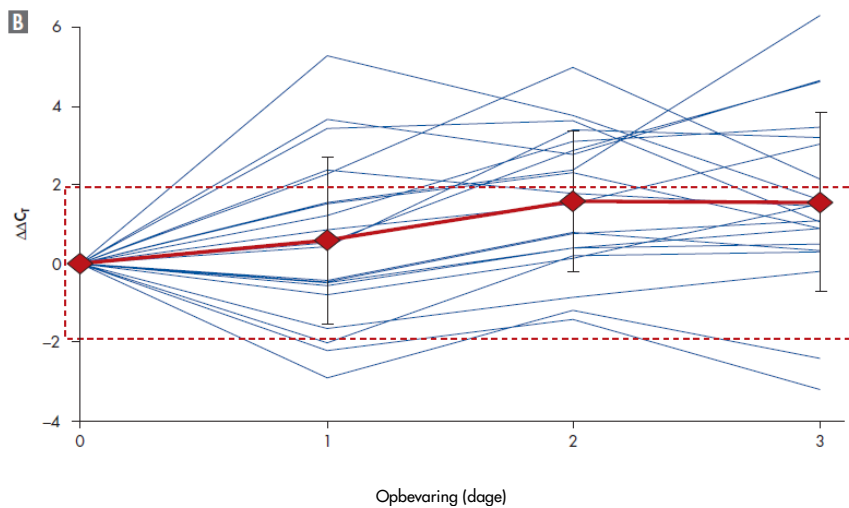
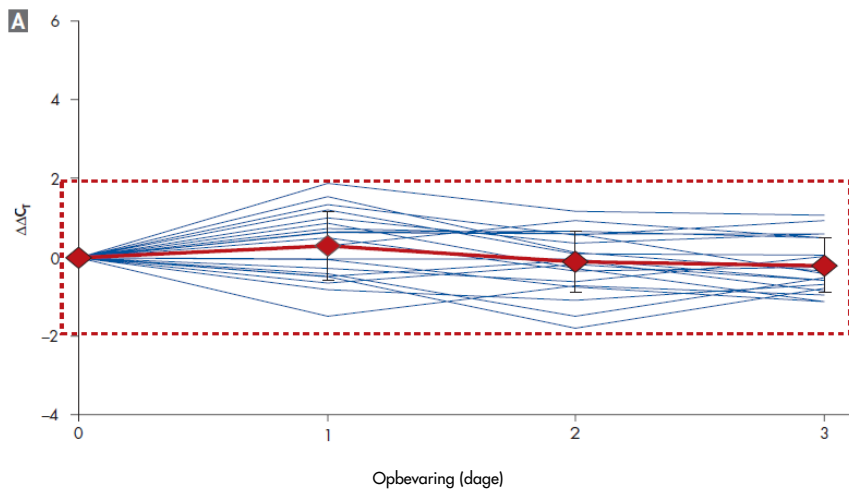
PAXgene Blood RNA Tubes(BRT) indeholder et reagens, som er baseret på en patenteret RNA-stabiliseringsmetode. Dette reagens beskytter RNA-molekyler mod nedbrydning gennem RNaser og minimerer ex vivo-forandringer af genekspressionen. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) er beregnet til indsamling af humant helblod og stabilisering af cellulært RNA i op til 3 dage ved 18-25 °C (se fig. 1 og 2, side 15 og 16) eller i op til 5 dage ved 2-8 °C (se fig 3 og 4, side 17 og 18). Aktuelt disponible data viser, at den cellulære RNA er stabil i mindst 11 år ved -20 °C eller -70 °C*. Kontakt QIAGEN Teknisk Service for at få flere oplysninger om igangværende undersøgelser af endnu længere stabiliseringstider.

Den faktiske varighed af RNA-stabiliseringen kan variere alt efter RNA-specien og den anvendte downstream-applikation. Grundet det begrænsede antal transkriptioner, der er valideret til stabiliseringsspecifikationer (FOS- og IL1B-gentranskriptioner), kan der ikke angives ydelseskarakteristika for alle transkriptioner. Brugerne skal gennemgå både deres egne og producentens data for at afgøre, om det er nødvendigt at validere andre transkriptioner.

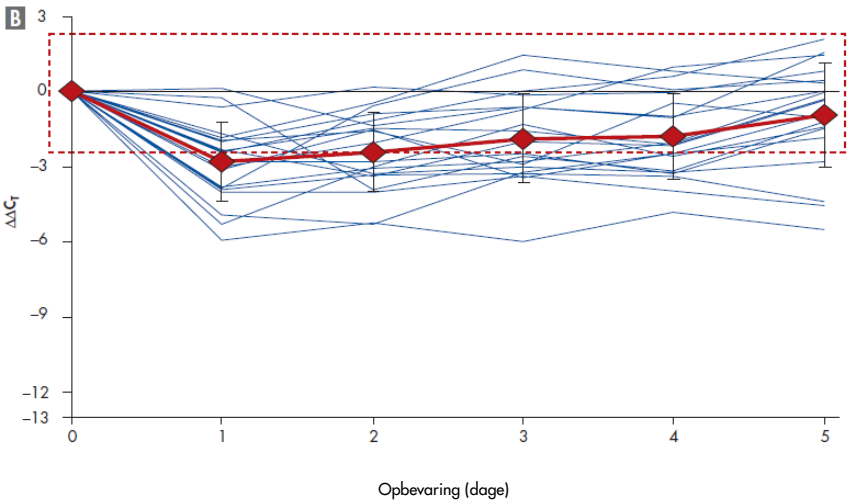
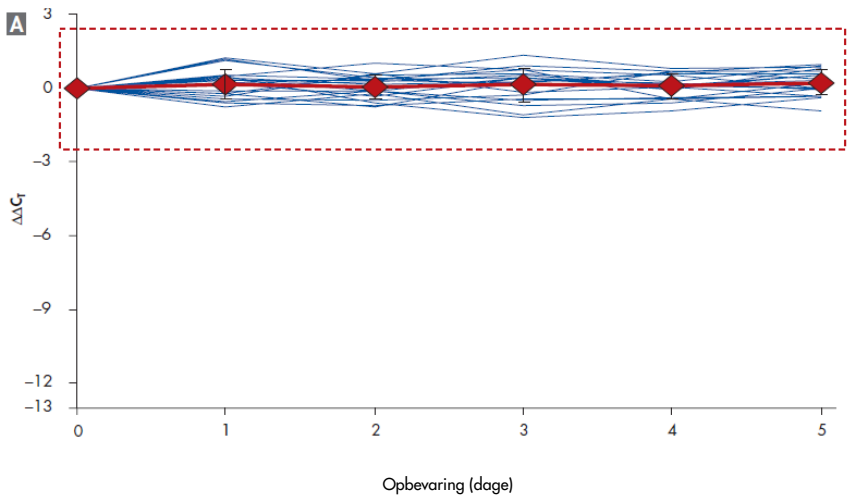
* En langtidsundersøgelse af opbevaring af blod i PAXgene Blood RNA Tubes er under udførelse.



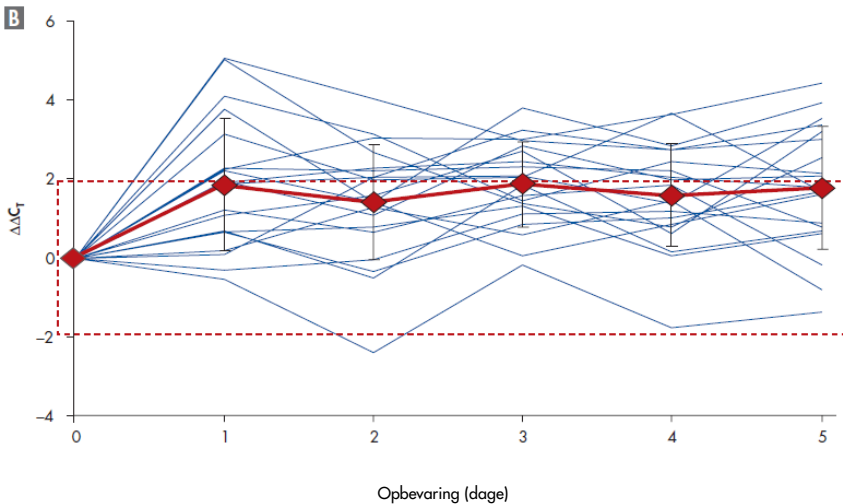
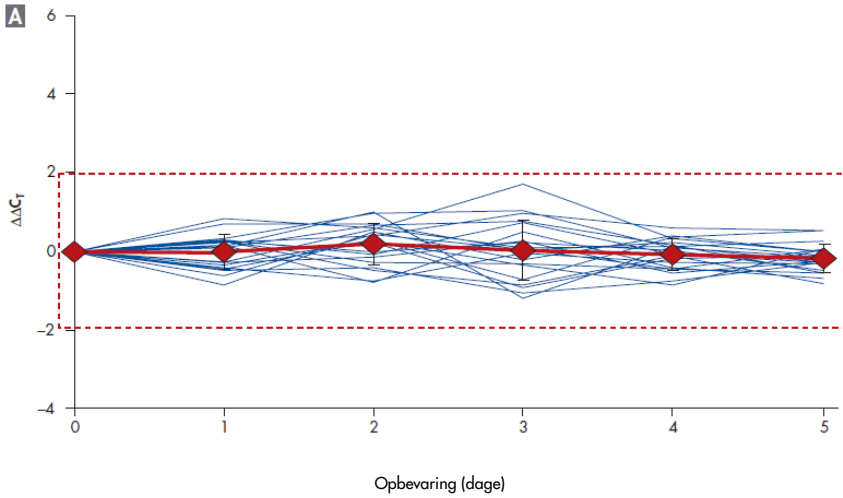
Figur 1. RNA-stabilitet i blodprøver ved 18-25°C: FOS. Der blev taget blodprøver i duplikat fra 10 donorer, og prøverne blev opbevaret ved 18-25°C i det angivne antal dage, efterfulgt af RNA i alt-oprensning. **[A]** Blodet blev indsamlet og opbevaret i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), og RNA i alt blev oprenset med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blodet blev indsamlet og opbevaret i standardblodprøvetagningsrør med EDTA som antikoagulan, og RNA i alt blev oprenset med en standardekstraktionsmetode med organiske opløsningsmidler og RNA-rensning med silica-baseret membran. De relative FOS-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdierne for alle prøver er opført med middelværdi og standardafvigelse for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed $\pm 3 \times$ analysen (2,34 C_t).



Figur 2. RNA-stabilitet i blodprøver ved 18-25°C: IL1B. Der blev udtaget blod, og RNA i alt blev oprenset efter opbevaring ved 18-25 °C som beskrevet i figur 1. De relative IL1B-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdierne for alle prøver er opført med middelværdi og standardafvigelse for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed $\pm 3 \times$ analysen (1,93 C_t).



Figur 3. RNA-stabilitet i blodprøver ved 2-8°C: FOS. Der blev taget blodprøver i duplikat fra 10 donorer, og prøverne blev opbevaret ved 2-8°C i det angivne antal dage, efterfulgt af RNA i alt-oprensning. **[A]** Blodet blev indsamlet og opbevaret i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), og RNA i alt blev oprenset med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blodet blev indsamlet og opbevaret i standardblodprøvetagningsrør med EDTA som antikoagulant, og RNA i alt blev oprenset med en standardekstraktionsmetode med organiske opløsningsmidler og RNA-rensning med silica-baseret membran. De relative FOS-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdierne for alle prøver er opført med middelværdi og standardafvigelse for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed $\pm 3 \times$ analysen (2,34 C_t).



Figur 4. RNA-stabilitet i blodprøver ved 2-8°C: IL1B. Der blev udtaget blod, og RNA i alt blev oprenset efter opbevaring ved 2-8°C som beskrevet i figur 3. De relative IL1B-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdierne for alle prøver er opført med middelværdi og standardafvigelse for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed $\pm 3 \times$ analysen ($1,93 C_T$).

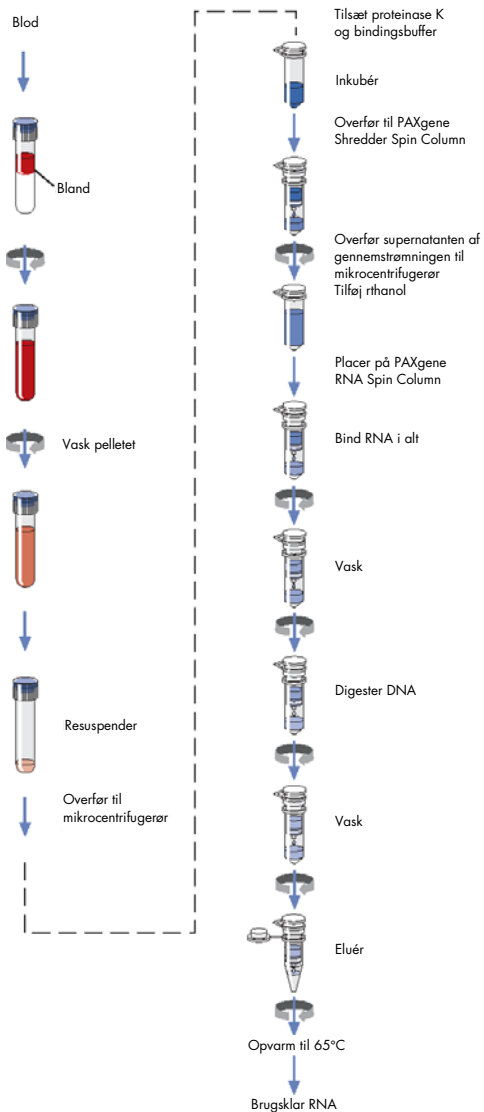
RNA-koncentration og oprensning

PAXgene Blood RNA Kit bruges til oprensning af RNA i alt fra 2,5 mL humant helblod, som blev indsamlet i et PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Proceduren er enkel og kan udføres manuelt eller automatisk (se figur 5 og 10, side 20 og 30). I begge protokoller begynder oprensningen med et centrifugeringstrin for at samle nukleinsyrer i pellets i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pelletet vaskes og resuspenderes, efterfulgt af manuel eller automatisk RNA-oprensning. Begge protokoller følger i princippet de samme protokoltrin, med de samme kit-komponenter.

Manuel RNA-oprensning

Det resuspenderede pellet inkuberes i optimeringsbuffer og proteinase K (PK) for at digestere proteiner. En yderligere centrifugering med en PAXgene Shredder-spin-kolonne (PSC) udføres for at homogenisere cellelysatet og fjerne tiloversblevne cellerester. Supernatanten af gennemstrømningen overføres til et frisk mikrocentrifugerør. Derefter tilsættes ethanol for at justere bindingsbetingelserne, og lysatet overføres på PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC). Ved den efterfølgende korte centrifugering binder RNA selektivt til PAXgene silicagel-membranen, mens kontaminanter passerer igennem den. Tiloversblevne kontaminanter fjernes ved hjælp af flere effektive vasketrin. Mellem det første og det andet vasketrin bliver membranen behandlet med DNase I (RNFD) for at fjerne eventuelle bundne rester af DNA. Efter vasketrinnene bliver RNA elueret i elueringsbuffer (BR5) og varmedenatureret.

RNA i alt oprenset ved hjælp af PAXgene Blood RNA System er rent. Anvendes den manuelle protokol, er værdierne A_{260}/A_{280} mellem 1,8 og 2,2 og ≤ 1 % (w/w) genomisk DNA til stede i ≥ 95 % af alle prøver, som målt af kvantitativ real time-PCR af en sekvens af beta-actin-genet. Mindst 95 % af prøverne viser ingen hindring i RT-PCR, ved brug af op til 30 % af eluatet.

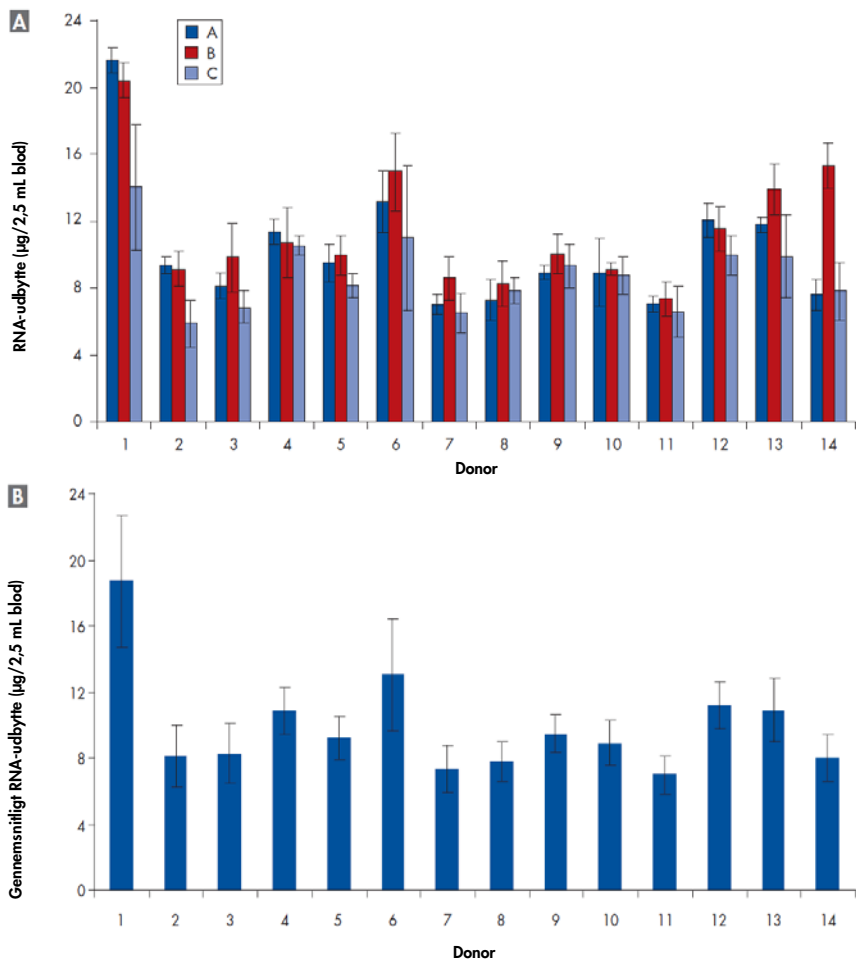


Figur 5. Den manuelle PAXgene Blood RNA-procedure.

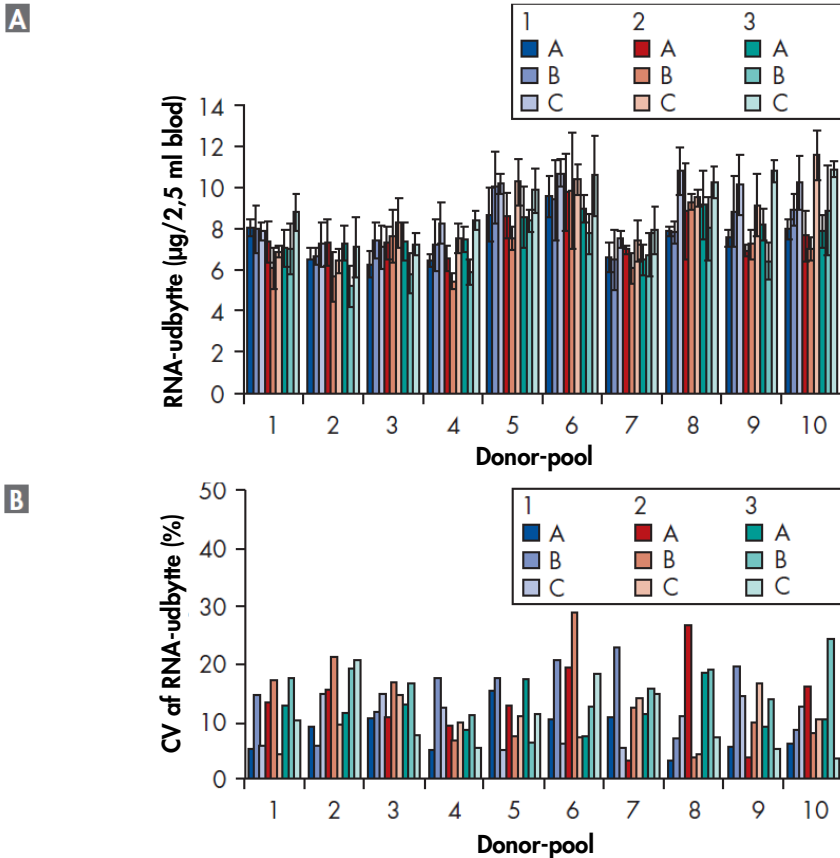
Når den manuelle protokol følges, er gennemsnitstiden for klargøring af prøve (baseret på data fra 12 prøveklargøringer) ca. 90 minutter*, hvoraf den rene håndteringstid udgør ca. 40 minutter. RNA-udbyttet fra 2,5 mL sundt humant helblod er $\geq 3 \mu\text{g}$ for $\geq 95 \%$ af de forarbejdede prøver. Da udbyttet afhænger stærkt af donorerne, kan de enkelte udbytter variere. For individuelle donorer leverer PAXgene Blood RNA System yderst reproducerbare og gentagelige udbytter (se figur 6 og 7 på side 22 og 23), såvel som reproducerbare og gentagelige RT-PCR-resultater (se figur 8 og 9 på side 27 og 28), hvilket gør det velegnet til klinisk-diagnostiske undersøgelser.

Figur 6 (side 22) viser den generelle reproducerbarhed og gentagelighed for PAXgene Blood RNA System. Der blev foretaget yderligere undersøgelser for at påvise, hvilken indflydelse forskellige lots af PAXgene Blood RNA-kits og forskellige laboranter havde på reproducerbarheden af RNA-udbyttet og realtids-RT-PCR-resultaterne. Eftersom der blev anvendt poolede blodprøver i stedet for individuelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), gengiver forsøgsresultaterne ikke systemets gentagelsespræcision, herunder fluktuationer mellem de enkelte blodindsamlinger, men kun gentagelsespræcisionen for klargøringen af prøven (se figur 7, side 23).

* Den samlede kørselstid for protokollen, inklusive den første håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugeringer, vask og resuspension af pelletet).



Figur 6. Reproducerbar og gentagelig RNA-oprensning. Firedobbelte blodprøver fra 14 donorer blev alle manuelt behandlet af tre forskellige laboranter (A, B og C). Der blev benyttet tre forskellige sæt udstyr, og alle prøver, der var blevet klargjort af en enkelt laborant, blev behandlet med det samme udstyr. **[A]** Middelværdier og standardafvigelser for RNA-udbyttet pr. gentaget prøve fra samme donorer og forskellige laboranter vises. **[B]** Tolv gentagne blodprøver fra hver af de 14 donorer blev forarbejdet af de 3 forskellige laboranter. Middelværdier og standardafvigelser for RNA-udbyttet pr. prøve fra samme donor og alle laboranter vises. Ved alle RNA-prøver var A_{260}/A_{280} -forholdet i området fra 1,8 til 2,2.



Figur 7. Gentagelighed og reproducerbarhed af RNA-udbyttet for forskellige laboranter og forskellige lots af PAXgene Blood RNA Kits ved anvendelse af poolede blodprøver. Der blev indsamlet blodprøver fra 30 donorer i PAXgene Blood RNA Tube (BRT; 12 rør pr. donor, dvs. i alt 360 rør). Indholdet af rørene fra 3 donorer blev poollet og derefter delt i aliquoter på 36 prøver. Disse 36 prøver pr. 3-donor-pool blev behandlet manuelt af tre forskellige laboranter. Hver laborant anvendte 3 forskellige lots af PAXgene Blood RNA Kit til ekstraktionen og forarbejdede firdobbelte prøver fra hver af de ti donor-pools. **[A]** RNA-udbytte og standardafvigelse for hver kombination af laborant og lot. Firdobbelte blodprøver fra 10 donor-pools blev forarbejdet af 3 forskellige laboranter (A, B og C) med hver af tre kit-lots (1, 2 og 3). Der vises middelværdier af udbyttet (søjler) og standardafvigelser (fejlbjælker) pr. firdobbelte prøver fra den samme donor-pool for forskellige laboranter og kit-lots. **[B]** Variationskoefficienten (CV) af RNA-udbytte pr. donor-pool for alle kombinationer af laborant og lot (A, B, C; 1, 2, 3), udregnet fra middelværdi og standardafvigelse for udbyttet, som er vist i figur 7A.

Table 1A. Reproducibility for each lot and user for selected donor-pools (1, 6, 9, 10)

Kombination af data	Donor-pool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/mL			Donor-pool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/mL		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Lot 1, bruger A	8,03	0,42	5	9,55	0,99
Lot 1, bruger B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Lot 1, bruger C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Lot 2, bruger A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Lot 2, bruger B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Lot 2, bruger C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Lot 3, bruger A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Lot 3, bruger B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Lot 3, bruger C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Kombination af data	Donor-pool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/mL			Donor-pool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/mL		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Lot 1, bruger A	7,52	0,41	6	7,96	0,49
Lot 1, bruger B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lot 1, bruger C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lot 2, bruger A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lot 2, bruger B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lot 2, bruger C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lot 3, bruger A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lot 3, bruger B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lot 3, bruger C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Table 1B. Reproducibility for each user and between all lots for selected donor-pools (1, 6, 9, 10)

Kombination af data	Donor-pool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/mL			Donor-pool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/mL		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Bruger A, alle lots	7,46	0,85	11	9,43	1,22
Bruger B, alle lots	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Bruger C, alle lots	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombination af data	Donor-pool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/mL			Donor-pool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/mL		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Bruger A, alle lots	7,54	0,72	10	7,81	0,82
Bruger B, alle lots	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Bruger C, alle lots	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Table 1C. Reproducibility for each user and between all users for selected donor-pools (1, 6, 9, 10)

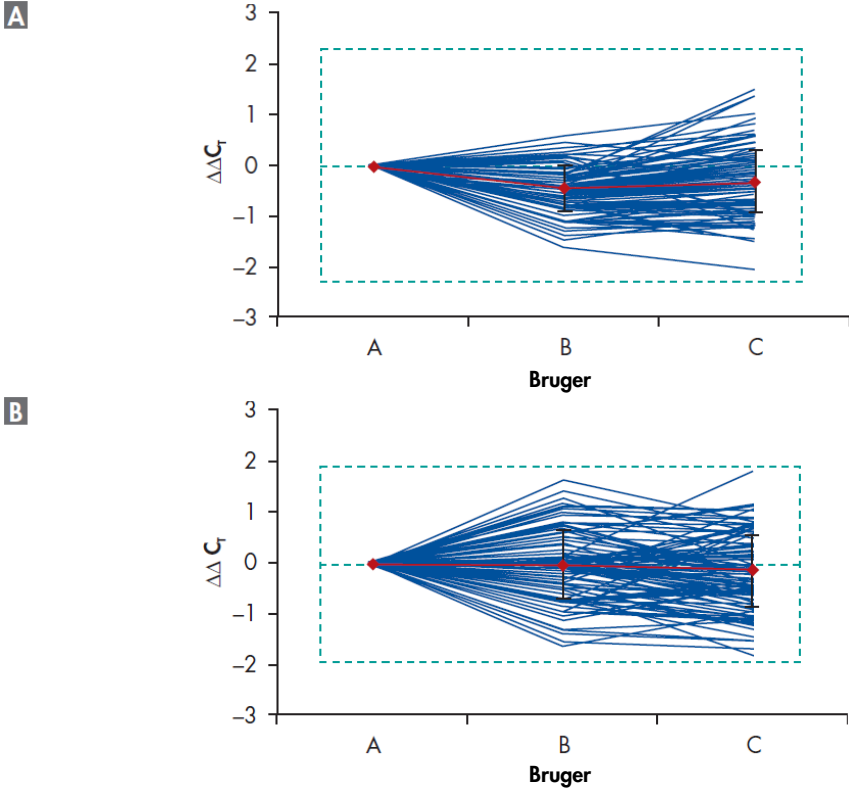
Kombination af data	Donor-pool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/mL			Donor-pool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/mL		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Lot 1, alle brugere	7,96	0,69	9	9,88	1,34
Lot 2, alle brugere	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lot 3, alle brugere	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombination af data	Donor-pool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/mL			Donor-pool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/mL		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Lot 1, alle brugere	8,83	1,63	19	9,02	1,27
Lot 2, alle brugere	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lot 3, alle brugere	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabel 1D. Reproducerbarhed mellem alle lots og alle brugere til valgte donor-pools (1, 6, 9, 10)

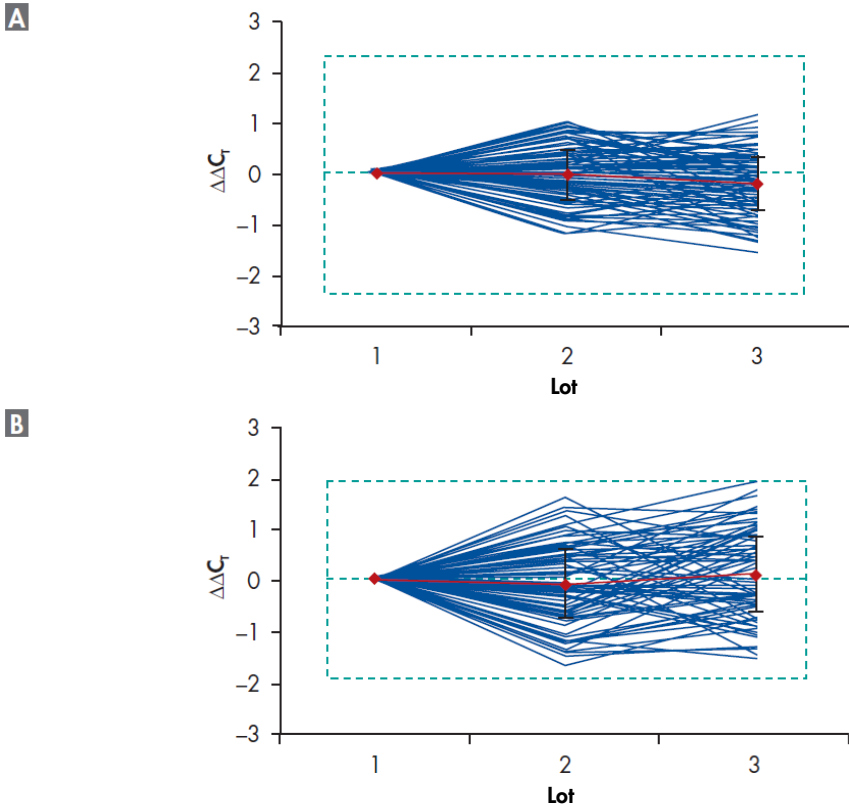
Kombination af data	Donor-pool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/mL			Donor-pool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/mL		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alle brugere	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

Kombination af data	Donor-pool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/mL			Donor-pool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/mL		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alle brugere	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detaljeret analyse af 4 repræsentative donor-pools. Pools blev valgt i henhold til antallet af hvide blodlegemer og viser høje, mellem og lave værdier i det normale område for antallet af hvide blodlegemer ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytter/mL). Antallet af hvide blodlegemer repræsenterer gennemsnitsværdien af de 3 tællinger af hvide blodlegemer fra de 3 donorer pr. donor-pool.



Figur 8. Reproducerbarhed for RT-PCR – mellem brugere. RNA, som blev oprenset i det eksperiment, der er beskrevet i figur 7, blev benyttet til real-time RT-PCR. De relative **[A]** FOS og **[B]** IL1B-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdier for alle prøver vises relativt til værdierne af bruger A (10 donor-pools x 3 kit-lots x 4 gentagelser = 120 datasæt for hvert gen) med middelværdi (rød linje) og standardafvigelse (sort, lodret bjælke) for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed $\pm 3 \times$ analysen (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).



Figur 9. Reproducerbarhed af RT-PCR – mellem kit-lots. RNA, som blev oprenset i det eksperiment, der er beskrevet i figur 7, blev benyttet til real-time RT-PCR. De relative **[A]** FOS og **[B]** IL1B-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdier for alle prøver vises relativt til værdierne for kitlot 1 (10 donor-pools x 3 brugere x 4 gentagelser = 120 datasæt for hvert gen) med middelværdi (rød linje) og standardafvigelse (sort, lodret bjælke) for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed $\pm 3 \times$ analysen (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Table 2. Sammenfatning af RT-PCR-data fra figur 8 og 9

Testsystem	FOS/18S rRNA-analyse		IL1B/18S rRNA-analyse	
	Middelværdi ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Middelværdi ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reproducerbarhed inden for hver bruger og mellem alle lots				
Alle brugere, lot 1 – lot 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle brugere, lot 1 – lot 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Alle brugere, lot 1 – lot 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproducerbarhed inden for hver bruger og mellem alle lots				
Alle lots, bruger A – bruger A	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle lots, bruger A – bruger B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Alle lots, bruger A – bruger C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Bruger: Laborant, udførte undersøgelsen.

Lot: Lotnummer for det anvendte kit.

SD: Standardafvigelse.

Middelværdi $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) og standardafvigelse er vist for de data, som præsenteres i figur 8 og 9.

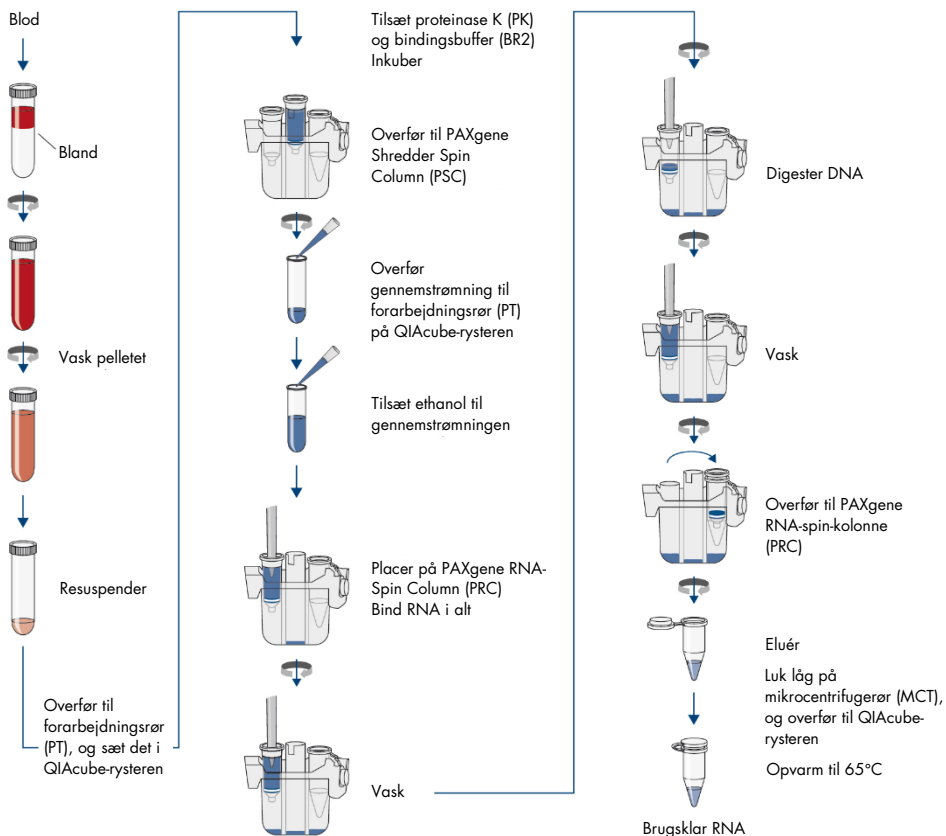
Automatisk RNA-oprensning

Oprensning af blod-RNA er automatiseret på QIAGEN QIAcube Connect MDx eller den klassiske QIAGEN QIAcube (herefter kaldet for QIAcube). De innovative QIAcube-instrumenter anvender avanceret teknologi til behandling af QIAGEN-spin-kolonner, hvilket gør det muligt problemfrit at integrere en automatiseret prøvebehandling i laboratoriets arbejdsgang, selv ved små prøvemængder. Klargøring af prøver vha. QIAcube-instrumenterne følger de samme trin som den manuelle procedure (dvs. lysning, binding, vask og eluering), hvilket gør det muligt at anvende PAXgene Blood RNA Kit til oprensning af RNA af høj kvalitet.



Figur 10. QIAcube Connect MDx.

Den automatiske RNA-oprensningsprotokol består af 2 dele (eller protokoller), "PAXgene Blood RNA Part A" og "PAXgene Blood RNA Part B", med en kort manuel indgriben mellem de 2 dele (se figur 11 på side 31).



Figur 11. Den automatiske PAXgene Blood RNA-procedure.

Den centrifugerede, vaskede og resuspenderede nukleinsyre-pellet (se "RNA-koncentration og oprensning" på side 19) overføres fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT) til forarbejdningsrørene (PT), som placeres i termoshakerenheden på QIACube-instrumenternes arbejdsbord. Operatøren vælger og starter protokollen "PAXgene Blood RNA Part A" fra menuen. QIACube-instrumenterne udfører trinnene i protokollen frem til eluering af RNA i elueringsbuffer (BR5). Operatøren overfører mikrocentrifugerørene (MCT), som indeholder den oprensede RNA, til termoshakerenheden på QIACube-instrumenterne. Operatøren vælger og starter protokollen "PAXgene Blood RNA Part B" fra menuen, og varmedenaturering udføres af QIACube-instrumenterne.

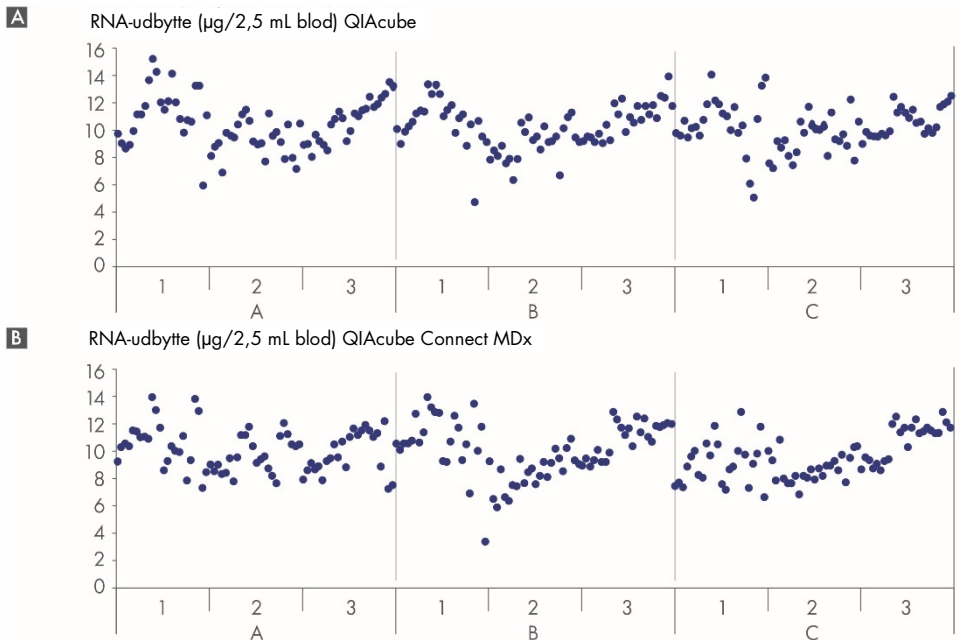
Gennemsnitstiden for klargøring af prøve (baseret på data fra 12 kørsler af klargøring af prøve) er 151 minutter* med betydeligt mindre ren håndteringstid sammenlignet med den manuelle protokol.

RNA-udbyttet fra 2,5 ml sundt humant helblod er ≥ 3 μg for ≥ 95 % af de forarbejdede prøver. Figur 12 (side 33) viser RNA-udbyttet fra 216 prøver der blev forberedt med den automatiske protokol, med 3 kitlots af 3 operatører. Eftersom der blev brugt poolede blodprøver i stedet for individuelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) til disse undersøgelser, viser resultaterne ikke det forventede RNA-udbyttet fra enkelte prøver i individuelle blodindsamlinger. Da udbyttet afhænger stærkt af donorerne, kan de enkelte udbytter variere (figur 12, side 33).

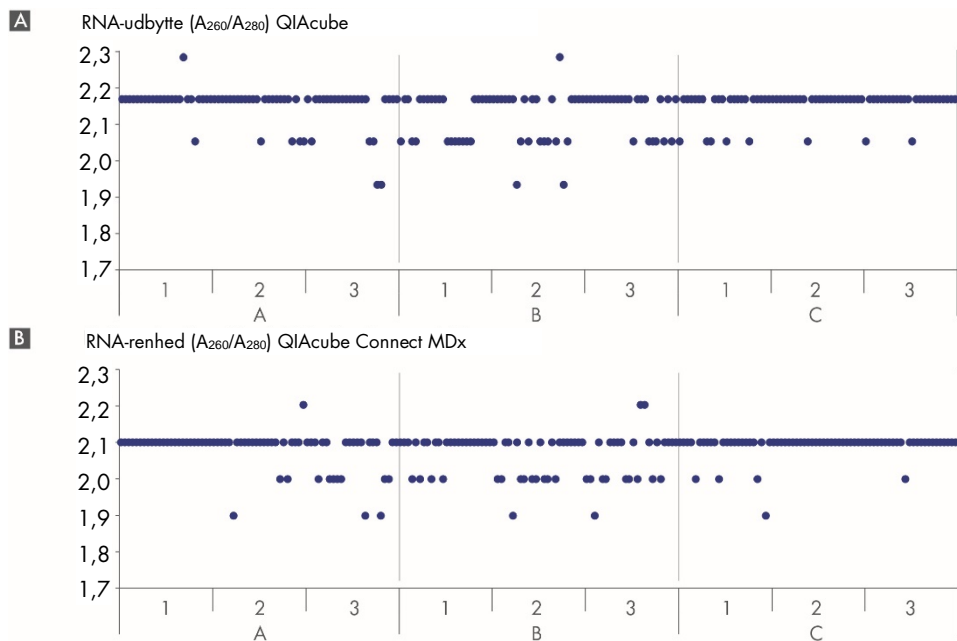
Mindst 95 % af prøverne viser ingen hindring i RT-PCR, ved brug af op til 30 % af eluatet. Hvis den automatiske protokol bruges, kan krydskontaminering mellem prøver ikke detekteres, som målt i kvantitativ, realtids RT-PCR af sekvenser af ABL1- og FOS-transkriptioner i RNA-negative prøver (vand) mod RNA-positive prøver (humant helblod) i samme kørsel.

RNA, der er isoleret med PAXgene Blood RNA System og den automatiske protokol, er ren, som det fremgår af manglen på RT-PCR-hindring og A_{260}/A_{280} -værdier mellem 1,8 og 2,2. Genomisk DNA er til stede ved ≤ 1 % (w/w) i ≥ 95 % af alle prøver, som målt i kvantitativ, real time-PCR af en sekvens af beta-actin-genet. Figur 13 og 14 (side 34 og 35) viser A_{260}/A_{280} -værdierne og relativt genomisk DNA af de i alt 216 prøver, der er klargjort med den automatiske protokol med 3 kitlots af 3 operatører.

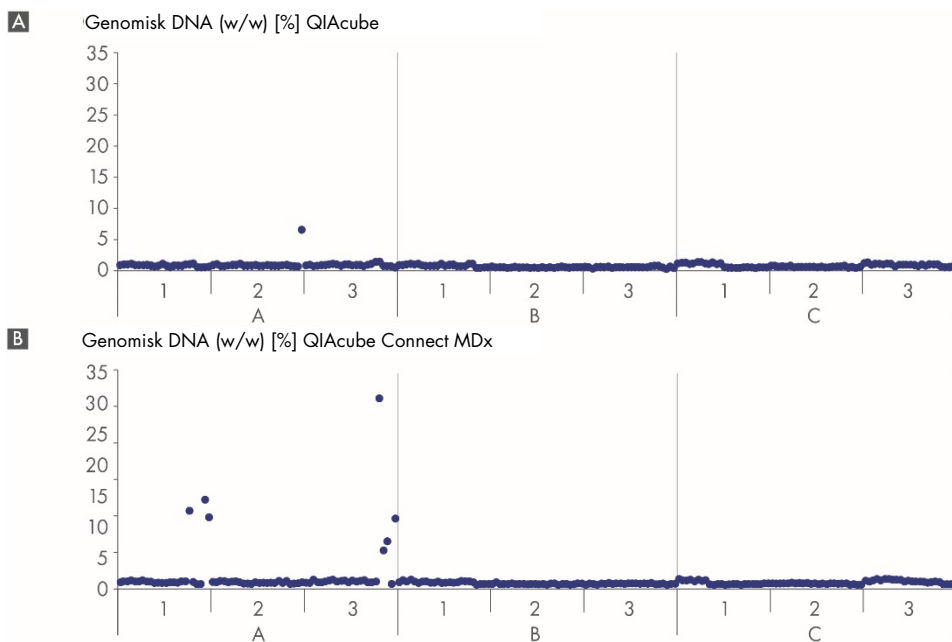
* Den samlede kørselstid for protokollen, inklusive den første håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugeringer, vask og resuspension af pelletet).



Figur 12. RNA-udbytte – automatisk forarbejdning A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Blodprøver fra individuelle donorer blev indsamlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Rørenes indhold blev poollet i 6 donor-pools og derefter delt i alikvoter. Der blev behandlet i alt 216 rør (36 rør pr. pool) af 3 forskellige operatører (A, B, C). Hver operatør anvendte PAXgene Blood RNA Kit fra 3 forskellige lots (1, 2, 3) til automatisk udtrækning med flere QIAcube- og QIAcube Connect MDx-instrumenter og forarbejdede firdobbelte prøver fra hver af de 6 donor-pools. RNA-udbytte for alle individuelle prøver er vist for hver operatør-/lot-kombination.

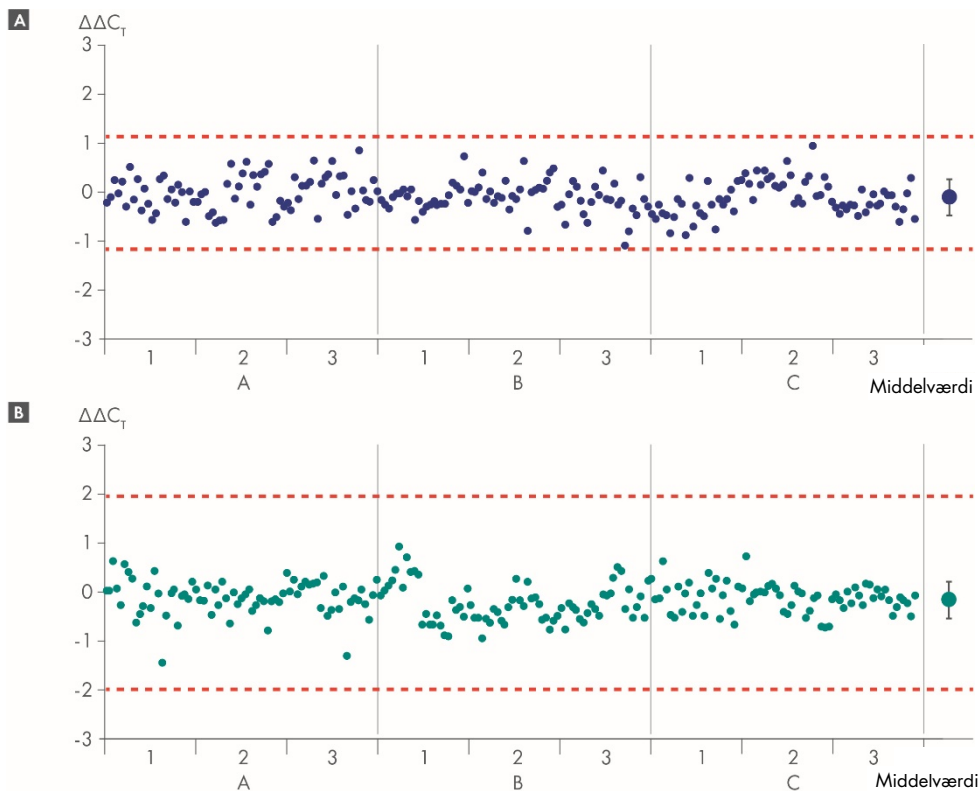


Figur 13. RNA-renhed (A_{260}/A_{280} -værdier) – automatisk forarbejdning. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx RNA blev oprenset af 3 forskellige operatører (A, B, C) med 3 forskellige lots (1, 2, 3) af PAXgene Blood RNA Kit med flere QIAcube- og QIAcube Connect MDx-instrumenter i det eksperiment, der er beskrevet i figur 12. A_{260}/A_{280} -værdier for alle individuelle prøver er vist for hver operatør/lot-kombination.

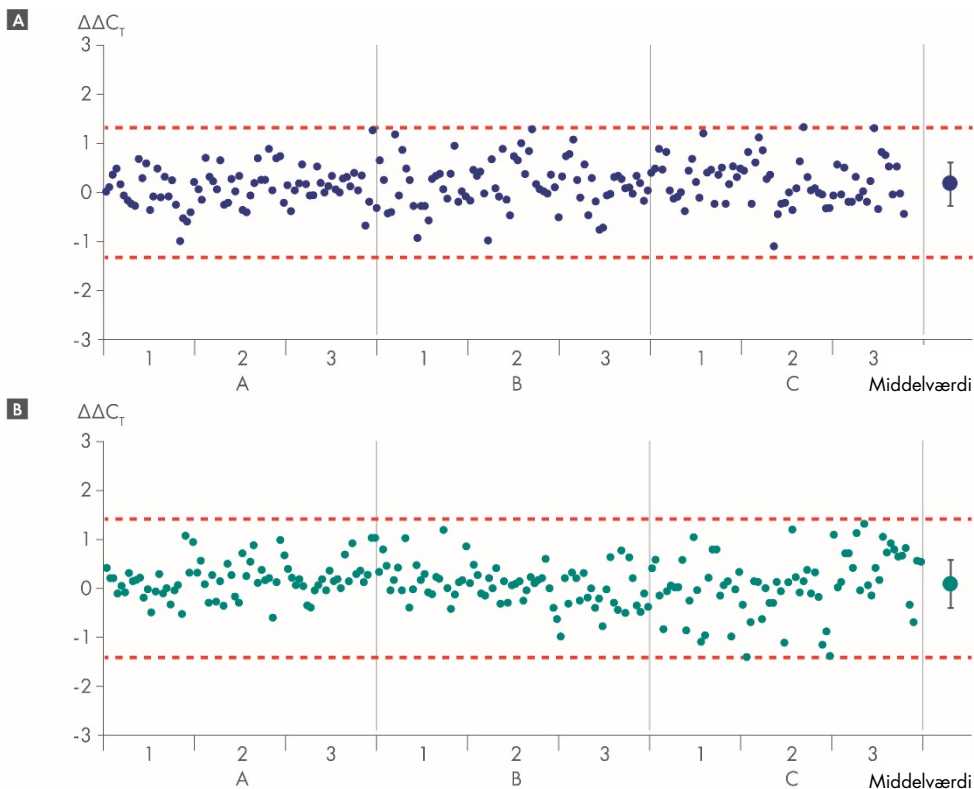


Figur 14. RNA-renhed (% genomisk DNA-forurening) – automatisk forarbejdning, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. RNA blev oprenset af 3 forskellige operatører (A, B, C) med 3 forskellige lots (1, 2, 3) af PAXgene Blood RNA Kit med flere QIAcube- og QIAcube Connect MDx-instrumenter i det eksperiment, der er beskrevet i figur 12. Genomske DNA-mængder (w/w) for alle individuelle prøver er vist for hver operatør/lot-kombination.

Den automatiske protokol for RNA-oprensning med PAXgene Blood RNA System giver RT-PCR-resultater med høj reproducerbarhed og gentagelighed, som vist i figur 15 og figur 16 (side 36 og 37), hvilket gør den meget robust til klinisk-diagnostiske tests.



Figur 15. Reproducerbarhed for RT-PCR – mellem automatiserede (QIAcube) og manuelle protokoller. RNA blev oprenset af 3 forskellige operatører (A, B, C) med 3 forskellige lots (1, 2, 3) af PAXgene Blood RNA Kit med flere QIAcube- og QIAcube Connect MDx-instrumenter med den automatiske protokol i det eksperiment, der er beskrevet i figur 12. Parallelt hermed blev RNA oprenset fra de tilsvarende replikatører med den manuelle protokol. De relative [A] FOS og [B] IL1B-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Mulige forskelle i transkriptionsniveauer mellem RNA forberedt fra parrede blodprøver med begge udtrækningsprotokoller (automatisk og manuel protokol) blev udregnet med metoden $\Delta\Delta C_T$. Individuelle $\Delta\Delta C_T$ værdier for alle prøver (4 replikater x 6 donor-pools x 3 kit-lots x 3 operatører = 216 par for hvert gen) vises som enkelte prikker med gennemsnit (større prikker) og standardafvigelse (sorte bjælker) for alle de viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed $\pm 3 \times$ analysen (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; forskellig analysepræcision sammenlignet med figur 1–4, 8 og 9 pga. forskellige analyseversioner).



Figur 16. Reproducerbarhed af RT-PCR – mellem QIAcube og QIAcube Connect MDx med den automatiske protokol.

RNA blev oprenset af 3 forskellige operatører (A, B, C) med 3 forskellige lots (1, 2, 3) af PAXgene Blood RNA Kit med den automatiske protokol med flere QIAcube- og QIAcube Connect MDx-instrumenter i det eksperiment, der er beskrevet i figur 12. De relative **[A] FOS** og **[B] IL1B**-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Mulige forskelle i transkriptionsniveauer mellem RNA forberedt fra parrede blodprøver med begge instrumenter blev udregnet med metoden $\Delta\Delta C_T$. Individuelle $\Delta\Delta C_T$ -værdier for alle prøver (4 replikater x 6 donor-pools x 3 kit-lots x 3 operatører = 216 par for hvert gen) vises som enkelte prikker med gennemsnit (større prikker) og standardafvigelse (sorte bjælker) for alle de viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed $\pm 3 \times$ analysen (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; forskellig analysepræcision sammenlignet med figur 1–4, 8, 9 og 15 pga. forskellige analyseversioner).

Udstyr og reagenser, der skal leveres af brugeren

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

For alle protokoller

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; kat.-nr. 762165)
- Ethanol (96–100 %, renhedsgrad p. a.)
- Pipetter* (10 µL–4 mL)
- Sterile RNase-fri pipettespidser†, med aerosol-barriere.
- Målecylinder‡
- Centrifuge* med variable hastigheder fra 3.000–5.000 x g, udstyret med udsving rotor og centrifugebægre til PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Vortex-mixer*
- Knust is
- Vandfast tusch til etiketter

Til manuel protokol

- Mikrocentrifuge* med variabel hastighed mellem 1.000–8.000 x g, lavere eller højere g-kraft kan dog anvendes (se yderligere oplysninger i protokoltrinnene). Centrifugen skal være udstyret med en rotor til 2 mL-mikrocentrifugerør

* Sørg for, at udstyret og instrumenterne regelmæssigt kontrolleres, vedligeholdes og kalibreres efter producentens anvisninger.

† Brugeren skal gøre sig bekendt med retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 72).

‡ Til tilsætning af ethanol til buffer BR4-koncentrat.

- Shaker-inkubator* der kan inkubere ved 55 °C og 65 °C og ryste ved ≥ 400 omdr./min., ikke over 1.400 omdr./min. (f.eks. Eppendorf® Thermomixer Compact eller tilsvarende)

Til den automatiske protokol (med QIAcube eller QIAcube Connect MDx)

- Saks

Forbrugsvarer til QIAcube-instrumenter:

- Filter-Tips, 1000 μ L (1024) (QIAGEN, kat.-nr. 990352)[†]
- Reagent Bottles, 30 mL (6) (QIAGEN, kat.-nr. 990393)[†]
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, kat.-nr. 990394)[†]

Tilbehør til QIAcube-instrumenter:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, kat.-nr. 990392)[†]

Til den automatiske protokol med QIAcube Connect MDx

- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, kat.-nr. 9003070)

QIAcube Connect MDx-servicepakker:

- 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)

* Sørg for, at udstyret og instrumenterne regelmæssigt kontrolleres, vedligeholdes og kalibreres efter producentens anvisninger.

[†] Også inkluderet i Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat.-nr. 990395).

Til den automatiske protokol med QIAcube

- QIAcube* (QIAGEN, kat.-nr. 9001882 [110 V])

* Sørg for, at udstyret og instrumenterne regelmæssigt kontrolleres, vedligeholdes og kalibreres efter producentens anvisninger.

Vigtige bemærkninger

Brug af QIAcube-instrumenter

Brugeren skal være bekendt med betjeningen af QIAcube-instrumentet. Læs brugsanvisningen til QIAcube-instrumentet og al yderligere information, der følger med QIAcube, og vær ekstra opmærksom på sikkerhedsinformationen, før de automatiske PAXgene Blood RNA-protokoller påbegyndes.

Vejledningen i dette afsnit gælder både QIAcube Connect MDx og QIAcube, medmindre andet er angivet.

Start af QIAcube-instrumenterne

Luk lågen til QIAcube-instrumentet, og tænd for QIAcube-instrument på kontakten (QIAcube Connect MDx: Se figur 17, side 42; QIAcube: figur 18, side 43).

Der lyder et bip, og opstartsskærmen vises. Instrumentet udfører automatisk opstartstest.



QIAcube Connect MDx set forfra



Berøringskærm trukket ud



QIAcube Connect MDx set bagfra



QIAcube Connect MDx set bagfra

Figur 17. Eksterne funktioner på QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|--|
| <p>1 Berøringskærm</p> <p>2 Låge</p> <p>3 Affaldsskuffe</p> <p>4 Strømafbryder</p> | <p>5 2 USB-porte til venstre på berøringskærmen;
2 USB-porte bag på berøringskærmen
(Wi-Fi-modul sat i 1 USB-port)</p> <p>6 RJ-45-Ethernet-port</p> <p>7 Stik til elledningen</p> <p>8 Udgang til køleluft</p> |
|--|--|



Figur 18. QIAcube set forfra.

- | | | | |
|---|--|---|--------------------------------|
| 1 | Berøringskærm | 4 | USB-port bag beskyttelsespanel |
| 2 | Låge | 5 | Strømafbryder |
| 3 | RS232 serielport bag beskyttelsespanel (må kun benyttes af QIAGEN instrumentservicespecialister) | 6 | Affaldsskuffe |

Berøringsskærm

QIAcube-instrumenterne styres via en berøringsskærm. Berøringsskærmen giver brugeren mulighed for at betjene instrumentet og guide brugerne gennem configurationen af arbejdsbordet. Når der behandles prøver, viser berøringsskærmen protokolstatus og resterende tid.



Figur 19. Berøringsskærm trukket ud på QIAcube Connect MDx

Installation af protokoller på QIAcube-instrumenter

En indledende protokolinstallation kan være påkrævet, før den første RNA-klargøringskørsel kan udføres på QIAcube-instrumenter. Installer begge protokollerne "PAXgene Blood RNA Part A" og "PAXgene Blood RNA Part B".

Du kan finde protokollerne til QIAcube Connect MDx på www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources (www.qiagen.com/MyQIAcube for QIAcube), og de skal downloades på den USB-nøgle, som leveres sammen med QIAcube-instrumenterne. Disse protokoller overføres til instrumentet via USB-porten.

USB-porten (QIAcube Connect MDx: Sidder på siden af berøringsskærmen, se figur 17, side 42; QIAcube: Bag på beskyttelsespanelet, se figur 18, side 43) muliggør tilslutning af QIAcube-instrumenter til den USB-nøgle, der leveres sammen med QIAcube-instrumenterne. Datafiler, såsom log- eller rapportfiler, kan også overføres via USB-porten fra QIAcube-instrumenter til USB-nøglen.



USB-porten må kun bruges til den USB-nøgle, der leveres af QIAGEN. Slut ikke andre enheder til denne port.



Fjern ikke USB-nøglen, mens protokoller downloades eller datafiler overføres, eller under en protokolkørsel.

Du kan få flere oplysninger om processen til upload af protokoller til QIAcube-instrumenter i håndbogen til det instrument, der bruges.

Opfyldning af QIAcube-instrumenter

For at spare tid kan opfyldningen udføres under en eller begge de 10-minutters centrifugetrin (trin 3 og 5) i "Protokol: Automatisk oprensning af RNA i alt fra humant helblod indsamlet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT)", side 62.

Reagensflasker

Før hver kørsel på QIAcube-instrumentet fyldes de 4 reagensflasker forsigtigt med reagenserne fra tabel 3 (side 46) op til det maksimale niveau eller, hvis dette ikke er muligt, til det niveau, som er muligt med de buffermængder, der leveres i PAXgene Blood RNA Kit. Mærk tydeligt flasker og låg med buffernavne, og placer de fyldte reagensflasker korrekt i reagensflaskeholderen. Sæt holderen ind på QIAcube-instrumentarbejdsbordet som vist (figur 20-22, side 46-48).



Den leverede mængde af buffer BR2 vil ikke fylde en reagensflaske op til det viste niveau. Buffer BR3 og BR4 vil muligvis ikke fylde flasken op til det viste niveau efter forarbejdning af flere prøver i tidligere kørsler.



Sørg for at fjerne lågene fra flaskerne, før de placeres på arbejdsbordet.



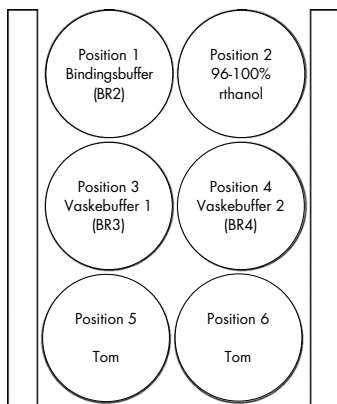
Der er tilstrækkelig buffer i PAXgene Blood RNA Kit (50) til maksimalt 7 RNA klargøringskørsler på QIACube-instrumentet, når antallet af prøver er 2 til 12 pr. kørsel. Generelt bør kørsler med et lavere antal prøver undgås, når der behandles i alt 50 prøver pr. kit med maksimalt 7 kørsler af RNA-klargøring. Mere end 7 kørsler af RNA-klargøring kan medføre, at der ikke er en tilstrækkelig buffervolumen til behandling af de sidste prøver.

Table 3. Placeringer i reagensflaskeholderen

Position	Reagens
1	Bindingsbuffer (BR2)
2	96-100% ethanol
3	Vaskebuffer 1 (BR3)
4	Vaskebuffer 2 (BR4) *
5	– (skal være tom)
6	– (skal være tom)

* Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. For at fremstille en brugsklar opløsning skal der inden første brug tilsættes fire dele ethanol (96–100 %, renhedsgrad p.a.), som angivet på flaskeetiketten.

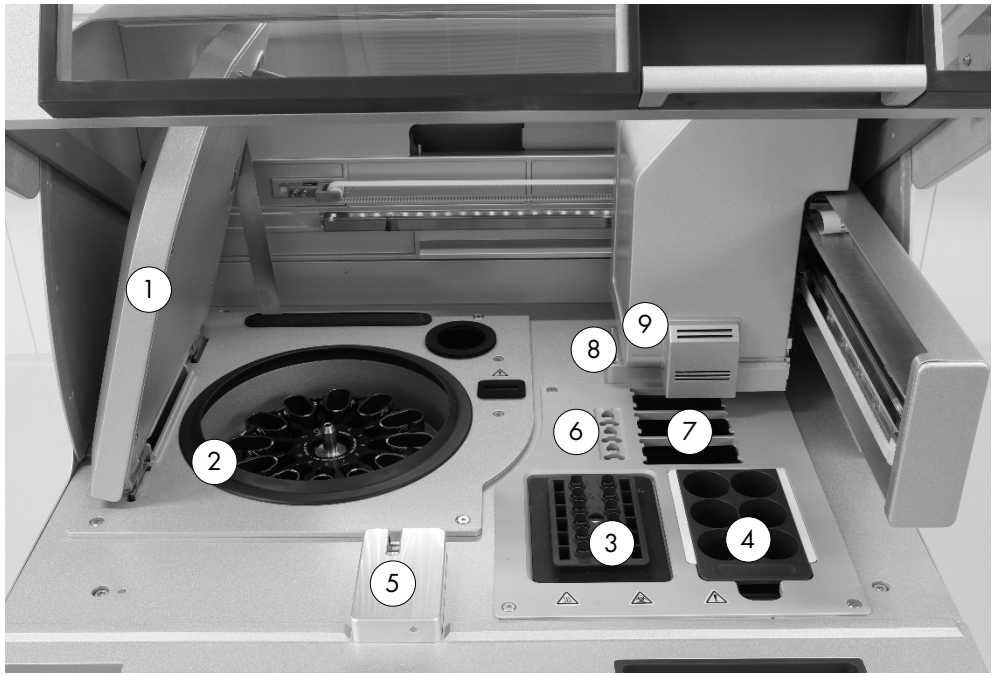
A



B

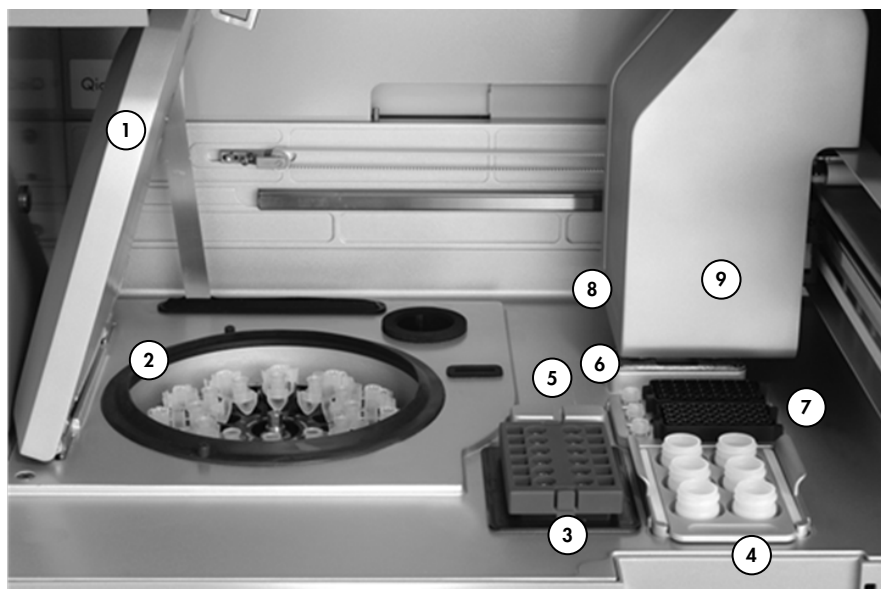


Figur 20. Opfyldning af reagensflaskeholderen. [A] Tegning over positioner og indhold af flaskerne i reagensflaskeholderen. **[B]** Påsætning af holderen på QIACube-instrumentet (QIACube vist som eksempel).



Figur 21. QIAcube Connect MDx set indefra.

- | | |
|---|---|
| <p>① Centrifugelåg</p> <p>② Centrifuge</p> <p>③ Ryster</p> <p>④ Reagensflaskeholder</p> <p>⑤ Spidssensor og lågelås</p> | <p>⑥ Mikrocentrifugerørets åbninger</p> <p>⑦ 3 pladser til spidsracks</p> <p>⑧ Bortskaffelsesåbninger til spidser og søjler</p> <p>⑨ Robotarm (omfatter 1 kanalpipetteringsenhed, gribearm, ultralydssensor og optisk sensor og UV-LED)</p> |
|---|---|



Figur 22. QIAcube indeni.

- | | | | |
|---|---------------------|---|--|
| 1 | Centrifugelåg | 6 | Mikrocentrifugens røråbninger |
| 2 | Centrifuge | 7 | Spidsstativ |
| 3 | Ryster | 8 | Bortskaffelsesåbninger til spidser og søjler |
| 4 | Reagensflaskeholder | 9 | Robotarm |
| 5 | Spidssensor | | |

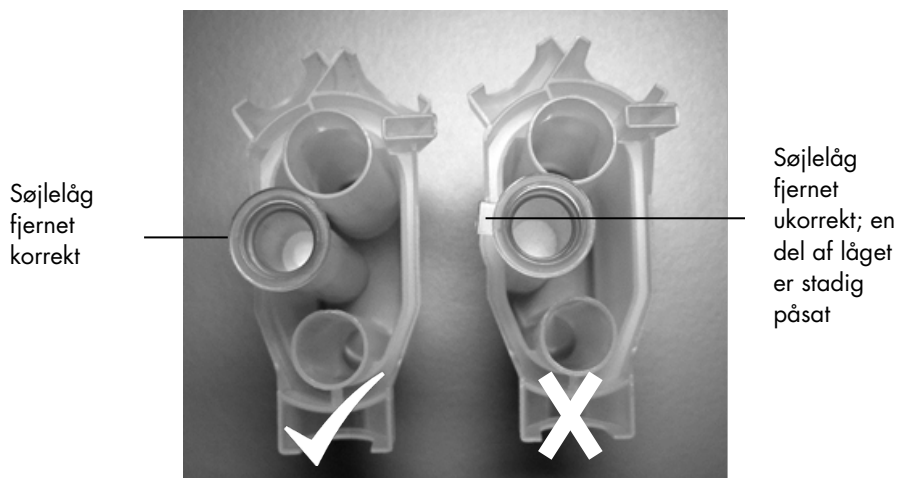
Spin-kolonner (PRC, PSC), mikrocentrifugerør (MCT) og QIAcube-instrumentplastictilbehør

Placer 2 spidsholdere med filterspidser på 1.000 µL på QIAcube-instrumentet (se figur 21 og 22, side 47 og 48). Genopfyld holderen med spidser, når det er nødvendigt.

i Brug kun 1.000 µL-filterspidser, der er designet til brug med QIAcube-instrumenter.

Mærk rotoradaptore og mikrocentrifugerør (MCT) for hver prøve med en vandfast tusch. Åbn de PAXgene Shredder-spin-kolonner (PSC), der skal bruges, og klip lågene helt af med en saks (se figur 23, side 49).

i For at QIAcube-instrumentets robotgribearm kan fungere korrekt, skal lågene og alle plastikdele, der forbinder låget til PAXgene Shredder-spin-kolonnerne (PSC), fjernes helt (klippes af; se figur 23). Ellers kan robotgribearmen ikke få ordentligt fat i spin-kolonnerne (PSC, PRC).



Figur 23. Opfyldning af PAXgene Shredder-spin-kolonne (PSC). PAXgene Shredder-spin-kolonnen (PSC) er placeret i midterpositionen af rotoradapteren. Klip låget af, før kolonnen placeres.

Placer PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC), PAXgene Shredder-spin-kolonnen (PSC, uden låg, se figur 23, side 49), og det markerede mikrocentrifugerør i de korrekte positioner i hver mærket rotoradapter, som vist i tabel 4 og figur 24.

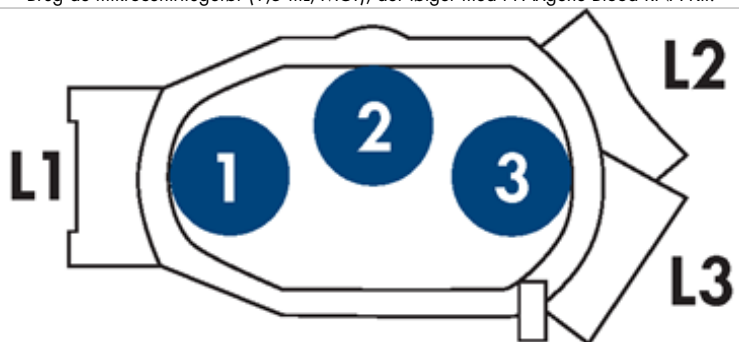


Sørg for, at spin-kolonnen (PRC) og mikrocentrifugerørets (MCT) låg er trykket helt ned til bunden af åbningerne ved kanten af rotoradapteren, ellers vil lågene gå af under centrifugering.

Tabel 4. Laboratorieartikler i rotoradapteren

Position	Reagens	Placering af låg
1	PAXgene RNA-spin-kolonne (rød, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder-spin-kolonne (lilla, PSC) (klip låget af inden anbringelse i rotoradapteren)	-
3	Mikrocentrifugerør (MCT)*	L3

* Brug de mikrocentrifugerør (1,5 mL, MCT), der følger med i PAXgene Blood RNA Kit.



Figur 24. Positioner i rotoradapteren. Rotoradapteren har tre røpositioner (1–3) og tre lågpositioner (L1–L3).

Opfyldning af centrifugen

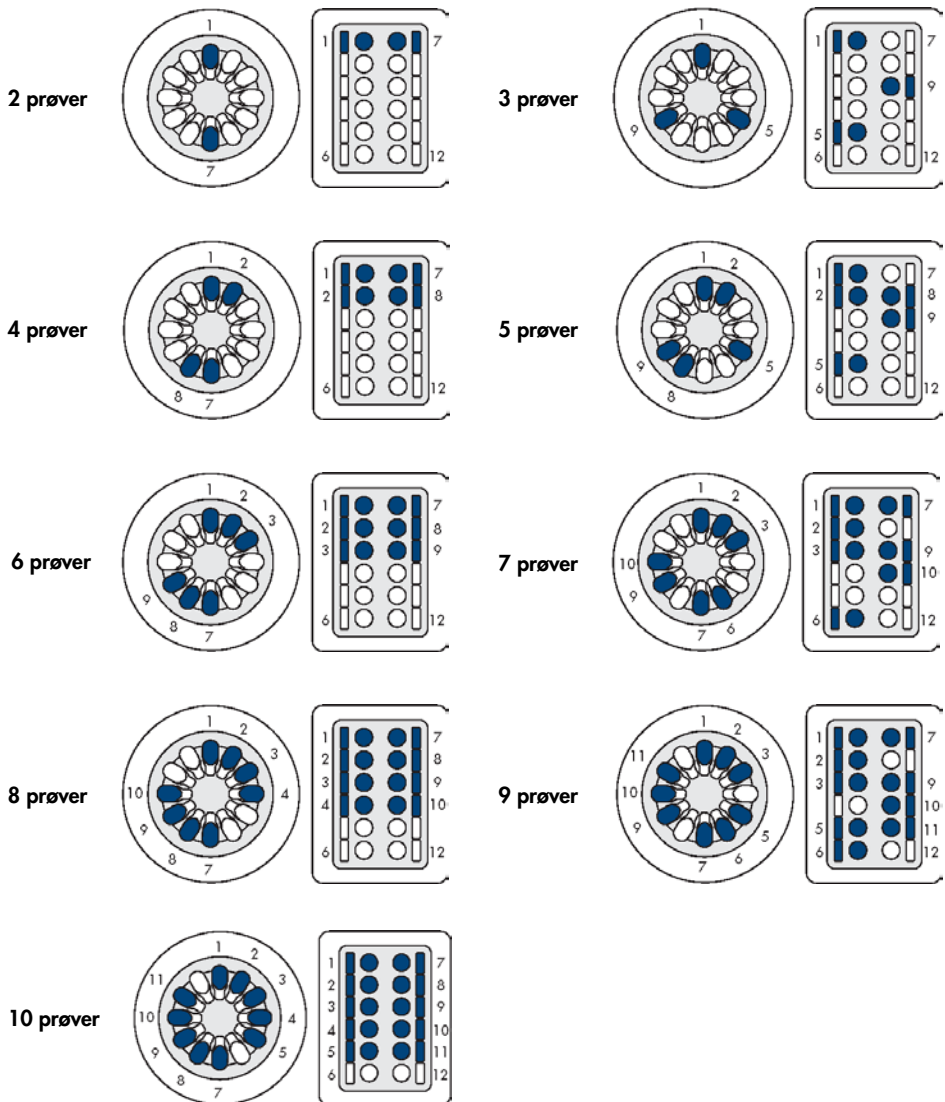
Sæt de samlede rotoradaptere i centrifugespandene som vist i figur 25 nedenfor.



Ved forarbejdning af færre end 12 prøver skal centrifugerotoren fyldes, så den er i radial balance (se figur 26, side 52). Alle centrifugespande skal være monteret, før en protokolkørsel påbegyndes, selv hvis der skal forarbejdes mindre end 12 prøver. Det er ikke muligt at forarbejde en enkelt (én) eller 11 prøver.



Figur 25. Placering af centrifugen på QIAcube-instrumenter. Placer de samlede rotoradaptere i centrifugespandene (QIAcube Connect MDx er vist som eksempel).



Figur 26. Opfyldning af centrifuge og ryster. Centrifuge- og rysterpositioner er vist for forarbejdning af to (2) til ti (10) prøver. Det er ikke muligt at forarbejde én (1) eller 11 prøver. Ved behandling af 12 prøver skal alle centrifuge- og rysterpositioner fyldes (ikke afbildet).

Forarbejdningsrør (PT)

Fjern alle forarbejdningsrør (PT), der stadig sidder i mikrocentrifugerørets åbninger fra tidligere kørsler (QIAcube Connect MDx: Se figur 21, side 47, QIAcube: Se figur 22, side 48). Fyld 3 forarbejdningsrør (PT) med den mængde reagens, der er angivet i tabel 5, i overensstemmelse med antallet af prøver i kørslen.

Til DNase I inkuberingsblanding pipetteres den angivne mængde DNA-digestionsbuffer (RDD) i et forarbejdningsrør (PT), og den angivne mængde DNase I (RNFD)-stamopløsning tilsættes. Bland forsigtigt ved at pipettere hele blandingen op og ned 3 gange med en 1.000 µL pipettespids.

Brug de forarbejdningsrør på 2 mL (PT), der leveres med PAXgene Blood RNA Kit. Mærk rørene tydeligt med reagensnavne, og placer dem i de korrekte positioner i mikrocentrifugerørets åbninger, som vist i tabel 6 (side 54).



DNase I (RNFD) er meget modtageligt for fysisk denaturering. Bland kun ved pipettering, hvor wide-bore-pipettespidser anvendes for at reducere forskydning. Undlad at vortexe.



Sørg for kun at pipettere den påkrævede mængde, som angivet i tabel 5 nedenfor.

Tabel 5. Den påkrævede mængde reagens i forarbejdningsrør til mikrocentrifugerørrets åbninger.

Antal prøver	Reagensmængde til det angivne antal prøver (µL)		Elueringsbuffer (BR5)
	Proteinase K (PK)	DNase I inkuberingsblanding	
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1177

Tabel 6. Mikrocentrifugerørrets åbninger

	Position		
	A	B	C
Indhold	Proteinase K	DNase I inkuberingsblanding	Elueringsbuffer (BR5)
Kar	Forarbejdningsrør (PT)*	Forarbejdningsrør (PT)*	Forarbejdningsrør (PT)*

* Brug de forarbejdningsrør på 2 mL, der leveres med PAXgene Blood RNA Kit.

Protokol: Manuel oprensning af RNA i alt fra humant helblod indsamlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Vigtige anvisninger før start

- Det skal kontrolleres, at kittets æske er ubeskadiget, og at ingen af buffer-beholderne er utætte. Beskadigede kits må ikke anvendes.
- Ved brug af pipette skal det kontrolleres, at volumenet er indstillet korrekt, og at væsken opsuges og dispenseres fuldstændigt.
- For at undgå at overføre prøver til det forkerte rør eller spin-kolonne, skal det sikres, at alle rør eller spin-kolonner er korrekt mærket med en vandfast tusch. Mærk låget og kroppen på hvert rør (PR, MCT). For spin-kolonner mærkes kroppen af forarbejdningsrøret (PT). Luk hvert rør eller spin-kolonne, når væske er blevet overført til den.
- Spild af prøve- og buffervæsker under klargøringen kan nedsætte RNAs udbytte og renhed.
- Alle protokoltrin (inklusive centrifugeringerne) skal gennemføres ved stuetemperatur (15-25 °C), medmindre andet er angivet.

På grund af nukleinsyre-amplifikationsmetodernes høje sensitivitet skal følgende forholdsregler overholdes for at undgå krydskontaminering:

- Prøver skal altid pipetteres i spin-kolonnerne (PRC, PSC) uden at fugte søjlens rand.
- Udskift altid pipettespidser mellem væskeoverførsler. Brug pipettespidser med aerosol-barriere.
- Undgå at røre ved membranen i spin-kolonnen (PRC, PSC) med pipettespidsen.

- Når et mikrocentrifugerør (MCT) er blandet eller opvarmet, skal det centrifugeres kortvarigt for at fjerne dråber fra lågets inderside.
- Brug handsker under hele proceduren. Skift handsker med det samme, hvis de kommer i berøring med prøven.
- Spin-kolonnerne (PRC, PSC) skal lukkes, før de sættes ind i mikrocentrifugen. Centrifugeringen skal foretages som angivet i protokollen.
- Åbn kun én spin-kolonne (PRC, PSC) ad gangen, og vær omhyggelig med at undgå aerosol-dannelse.
- For at opnå en effektiv parallel-forarbejdning af mange prøver anbefales det at fylde en holder med forarbejdningsrør (PT), hvortil spin-kolonnerne (PRC, PSC) kan overføres efter centrifugering. Bortskaf de brugte forarbejdningsrør (PT) med gennemstrømningen og placer de nye forarbejdningsrør (PT) med spin-kolonnerne (PRC, PSC) direkte i mikrocentrifugen.



Ting, der skal gøres før start

- Blod skal indsamles i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) efter anvisningerne i *PAXgene Blood RNA Tube-håndbogen*. I bilag C (på side 75) findes anbefalinger vedr. håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Efter blodprøvetagningen skal PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inkuberes i mindst 2 timer ved stuetemperatur for at sikre, at blodcellerne lyses fuldstændigt. Inkubation af PAXgene Blood RNA Tube (BRT) natten over kan føre til et øget udbytte. Hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) efter blodprøvetagningen blev opbevaret ved 2-8 °C, -20 °C eller -70 °C, skal røret først bringes op på stuetemperatur og derefter opbevares ved stuetemperatur i to timer, før protokollen startes.
- Læs sikkerhedsinformationerne på side 9.
- Læs retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 72).
- Sørg for, at instrumenter, såsom pipetter og rysteinkubator, regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens anvisninger.



- En ryster-inkubator er påkrævet i trin 5 og 20. Sæt temperaturen i rysterinkubatoren til 55 °C.
- Bindingsbufferen (BR2) kan efter længere opbevaring danne bundfald. Det kan om nødvendigt opløses ved at opvarme bufferen til 37 °C.
- Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. For at fremstille en brugsklar opløsning skal der inden første brug tilsættes fire dele ethanol (96–100 %, renhedsgrad p.a.), som angivet på flaskeetiketten.
- Før den første brug af RNase-Free DNase Set skal der tilberedes en DNase I-stamopløsning. Opløs DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-enheder)* i 550 µL DNase-resuspensionsbuffer (DRB), som leveres med kittet. Sørg for, at der ikke spildes DNase I (RNFD), når hætteglasset åbnes. Den rekonstituerede DNase I (RNFD) må ikke blandes på en vortex-mixer. DNase I er meget modtageligt for fysisk denaturering. Blandingen bør kun foregå ved at vende hætteglasset forsigtigt.
- Aktuelle data viser, at rekonstitueret DNase I (RNFD) kan opbevares ved 2-8°C i op til 6 uger. Ved længere tids opbevaring af DNase I (RNFD) skal stamopløsningen fjernes fra glasflasken, og den skal deles op i alikvoter til enkelt-brug (brug mikrocentrifugerørerne [MCT] på 1,5 mL, der blev leveret med kittet, der er nok til 5 alikvoter), og opbevares ved -20 °C i op til 9 måneder. Optøede alikvoter kan opbevares ved 2-8°C i op til 6 uger. De optøede alikvoter kan ikke nedfryses igen.
- Ved rekonstituering og opdeling af DNase I (RNFD) skal retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 72) følges.

* Kunitz-enheden er den almindeligt anvendte enhed til opmåling af DNase I, defineret som den mængde DNase I, som forårsager en stigning i A_{260} på 0,001 pr. minut pr. milliliter ved 25 °C, pH 5,0, hvor der anvendes høj-polymeriseret DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 og 363).

Procedure

1. Centrifuger PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 minutter ved 3.000–5.000 x g i en udsvingsrotor.
 -  Sørg for, at blodprøverne i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) blev inkuberet i mindst 2 timer ved stuetemperatur (15–25 °C) for at opnå fuldstændig lysering af blodcellerne.
 -  Rotoren skal være udstyret med adaptere til rundbandede rør. Hvis der anvendes andre typer adaptere, kan rørene blive beskadigede under centrifugeringen.
2. Fjern supernatanten ved at dekantere eller pipettere. Tilsæt 4 mL RNase-frit vand (RNFV) til pelletet, og luk røret med en ny sekundær BD Hemogard-sikkerhedslukning (følger med kittet). Hvis supernatanten dekanteres, skal det sikres, at pelletet ikke forstyrres, og rørets kant skal tørres med en ren papirserviet.
3. Opløs pelletet med en vortex-mixer, og centrifuger i 10 minutter ved 3.000–5.000 x g med en udsvingsrotor. Fjern og bortskaf supernatanten fuldstændigt.

Små cellerester, som befinder sig i supernatanten efter vortex, men før centrifugeringen, berører ikke proceduren.

 -  Hvis supernatanten ikke fjernes fuldstændigt, bliver lyseringen hæmmet og lysatet fortyndet, hvilket har en negativ indvirkning på betingelserne for bindingen af RNA til PAXgene-membranen.
4. Tilsæt 350 µL resuspensionsbuffer (BR1), og bland på en vortex-mixer, indtil pelletet er fuldstændigt opløst.
5. Overfør prøven med en pipette til et 1,5 mL mikrocentrifugerør (MCT). Tilsæt 300 µL bindingsbuffer (BR2) og 40 µL proteinase K (PK). Bland i ca. 5 sekunder (vortex), og inkuber i 10 minutter ved 55 °C i en rysteinkubator ved en hastighed fra 400–1400 rpm. Efter inkubationen øges rysteinkubatorens temperatur til 65 °C (for trin 20).
 -  Bland ikke bindingsbuffer (BR2) og proteinase K (PK), før de tilsættes prøven.

6. Pipetter lysatet direkte ind i PAXgene Shredder-spin-kolonnen (PSC, lilla), som er anbragt i et 2 mL forarbejdningsrør (PT), og centrifuger i 3 minutter ved maksimalt omdrejningstal (maks. 20.000 x g).



Overfør forsigtigt lysatet til spin-kolonnen (PSC) med en pipette, og kontrollér visuelt, at lysatet er fuldstændigt overført til spin-kolonnen (PSC).

For at undgå en eventuel beskadigelse af spin-kolonnerne (PSC) og rørene (PT), må der ikke centrifugeres ved mere end 20.000 x g.



Visse prøver kan løbe gennem PAXgene Shredder-spin-kolonnen (PSC) uden centrifugering. Dette skyldes den lave viskositet i nogle prøver, og bør ikke opfattes som tegn på produktfejl.

7. Overfør forsigtigt hele supernatanten fra gennemstrømningsfraktionen til et nyt 1,5 mL mikrocentrifugerør (MCT) uden at forstyrre pelletet i forarbejdningsrøret.
8. Tilsæt 350 µL ethanol (96-100 %, renhedsgrad p. a.). Bland og centrifuger kort (1–2 sekunder ved 500–1.000 x g) for at fjerne dråber fra indersiden af rørenes låg.



Der må ikke centrifugeres længere end 1–2 sekunder, da dette eventuelt fører til pelletering af nukleinsyrer og dermed til et reduceret udbytte af RNA i alt.

9. Pipetter 700 µL af prøven ind i en PAXgene RNA-spin-kolonne (PRC, rød), som før blev puttet ind i et 2 mL behandlingsrør (PT), og centrifuger i 1 minut ved 8000–20.000 x g. Overfør spin-kolonnerne (PRC) i et nyt 2 mL behandlingsrør (PT) og forkast det benyttede behandlingsrør (PT) samt gennemstrømningen.
 10. Overfør resten af prøven til PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC), og centrifuger i 1 minut ved 8.000–20.000 x g. Placer spin-kolonnen (PRC) i et nyt 2 mL forarbejdningsrør (PT), og bortskaf det gamle forarbejdningsrør (PT) med gennemstrømning.
-
- Overfør forsigtigt prøven til spin-kolonnen (PRC), og kontrollér visuelt, at prøven er fuldstændigt overført til spin-kolonnen (PRC).

- 11. Tilsæt 350 µL vaskebuffer 1 (BR3) til PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC). Centrifuger i 1 minut ved 8.000–20.000 x g. Placer spin-kolonnen (PRC) i et nyt 2 mL forarbejdningsrør (PT), og bortskaf det gamle forarbejdningsrør (PT) med gennemstrømning.
- PAXgene Blood RNA Kit-håndbog 12/2020
- 59

12. Tilsæt 10 µL DNase I (RNFD) stamopløsning til 70 µL DNA digestionsbuffer (RDD) i et 1,5 mL mikrocentrifugerør (MCT). Bland ved forsigtigt at slå med fingrene på røret og centrifuger kort for at samle væskerester fra rørets væg.

For at forarbejde f.eks. 10 prøver tilsættes 100 µL DNase I (RNFD) stamopløsning til 700 µL DNA digestionsbuffer (RDD). Anvend de 1,5 mL mikrocentrifugerør (MCT), der følger med kittet.



DNase I er meget modtageligt for fysisk denaturering. Opløsningen må kun blandes ved at slå med fingrene på røret. Undlad at vortexe.

13. Pipetter DNase I (RNFD) inkubationsblandingen (80 µL) direkte på membranen i PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC), og lad den stå på bordet (20–30 °C) i 15 minutter.



Sørg for, at DNase I (RNFD) inkubationsblandingen kommer direkte på membranen. Hvis en del af blandingen hænger fast på væggen eller på O-ringen i spin-kolonnen (PRC), vil DNase-digestionen muligvis være ufuldstændig.

14. Pipetter 350 µL vaskebuffer 1 (BR3) ind i PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC) og centrifuger i 1 minut ved 8000–20.000 x g. Overfør spin-kolonnen (PRC) i et nyt 2 mL forarbejdningsrør (PT), og bortskaf det benyttede forarbejdningsrør (PT) samt gennemstrømningen.

15. Pipetter 500 µL vaskebuffer 2 (BR4) ind i PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC) og centrifuger i 1 minut ved 8000–20.000 x g. Overfør spin-kolonnen (PRC) i et nyt 2 mL forarbejdningsrør (PT), og bortskaf det benyttede forarbejdningsrør (PT) samt gennemstrømningen.



Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. Sørg for at der tilsættes ethanol til vaskebuffer 2 (BR4) før den første brug (se "Ting, der skal gøres før start", på side 56).

16. Tilsæt igen 500 µL vaskebuffer 2 (BR4) til PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC). Centrifuger i 3 minutter ved 8.000–20.000 x g.

17. Bortskaf det forarbejdningsrør (PT), der indeholder gennemstrømningen, og anbring PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC) i et nyt 2 mL forarbejdningsrør (PT). Centrifuger i 1 minut ved 8.000–20.000 x g.

18. Bortskaf det forarbejdningsrør (PT), der indeholder gennemstrømningen. Placer PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC) i et 1,5 mL mikrocentrifugerør (MCT), og pipetter 40 µL elueringsbuffer (BR5) direkte på membranen i PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC). Centrifuger i 1 minut ved 8.000–20.000 x g, for at eluere RNAen.

For at opnå en maksimal elueringseffektivitet er det vigtigt, at hele membranen fugtes med elueringsbuffer (BR5).

19. Gentag elueringstrinnet (trin 18) som beskrevet, med 40 µL elueringsbuffer (BR5) og det samme mikrocentrifugerør (MCT).

20. Inkuber eluatet i 5 minutter ved 65 °C i en rysteinkubator (se trin 5), dog uden at ryste. Derefter køles prøverne straks med is.

Denne inkubation ved 65 °C denaturerer RNAen til downstream-applikationer. Inkubationstiden eller –temperaturen må ikke overskrides.

21. Hvis RNA-prøverne ikke straks skal bruges, skal de opbevares ved –20 °C eller –70 °C.

Da RNAen forbliver denatureret, også efter flere ganges nedfrysning og optøning, er det ikke nødvendigt at gentage inkubationen ved 65 °C. Hvis RNA-prøverne skal bruges til en diagnostisk analyse, skal producentens angivelser overholdes.

For at få en nøjagtig RNA-kvantificering ved absorbering ved 260 nm, anbefaler vi, at prøven fortyndes med 10 mM Tris-Cl, pH 7,5. * En fortynding af prøven med RNase-frit vand kan føre til lave værdier og ringe præcision.

Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i de prøver, der skal måles.

Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet.



Ved kvantificering i Tris-HCl-buffer bruges forholdet $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$.
Se bilag B, side 73.

* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Protokol: Automatisk oprensning af RNA i alt fra humant helblod indsamlet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT)

Vigtige anvisninger før start

- Det skal kontrolleres, at kittets æske er ubeskadiget, og at ingen af buffer-beholderne er utætte. Beskadigede kits må ikke anvendes.
- Ved brug af pipette skal det kontrolleres, at volumenet er indstillet korrekt og at væsken opsuges og dispenseres fuldstændigt.
- For at undgå at overføre prøver til de forkerte rør og plastikforbrugsvarer skal det sikres, at alle forarbejdningsrør (PT), mikrocentrifugerør (MCT) og rotoradaptere er korrekt mærket med en vandfast tusch. Mærk låget og kroppen på hvert mikrocentrifugerør (MCT), kroppen på hvert forarbejdningsrør (PT) og den ydre væg på hver rotoradapter.
- Spild af prøve- og buffervæsker under klargøringen kan nedsætte RNAs udbytte og renhed.
- Alle protokoltrin (inklusive centrifugeringerne) skal gennemføres ved stuetemperatur (15-25 °C), medmindre andet er angivet.

På grund af nukleinsyre-amplifikationsmetodernes høje sensitivitet skal følgende forholdsregler overholdes for at undgå krydskontaminering:

- Pipetter forsigtigt prøven til forarbejdningsrøret (PT) på bunden af hvert rør uden at fugte kanten af røret.
- Udskift altid pipettespidser mellem væskeoverførsler. Brug pipettespidser med aerosolbarriere.
- Undgå at røre ved membranen i spin-kolonnen (PRC, PSC) med pipettespidsen.

- Når et mikrocentrifugerør (MCT) er blandet eller opvarmet, skal det centrifugeres kortvarigt for at fjerne dråber fra lågets inderside.
- Brug handsker under hele proceduren. Skift handsker med det samme, hvis de kommer i berøring med prøven.

Ting, der skal gøres før start

- Blod skal indsamles i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) efter anvisningerne i *PAXgene Blood RNA Tube-håndbogen*. I bilag C (på side 75) findes anbefalinger vedr. håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Efter blodprøvetagningen skal PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inkuberes i mindst 2 timer ved stuetemperatur for at sikre, at blodcellerne lyses fuldstændigt. Inkubation af PAXgene Blood RNA Tube (BRT) natten over kan føre til et øget udbytte. Hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) efter blodprøvetagningen blev opbevaret ved 2-8 °C, -20 °C eller -70 °C, skal røret først bringes op på stuetemperatur og derefter opbevares ved stuetemperatur i to timer, før protokollen startes.
- Læs sikkerhedsinformationerne på side 9.
- Læs "Vigtige bemærkninger", side 41.
- Læs retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 72).
- Læs brugsanvisningen til QIAcube og al yderligere information, der følger med QIAcube-instrumentet, og vær ekstra opmærksom på sikkerhedsinformationen.
- Sørg for, at udstyr og instrumenter, såsom pipetter og QIAcube-instrumentet, regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens anvisninger.
- Bindingsbufferen (BR2) kan efter længere opbevaring danne bundfald. Det kan om nødvendigt opløses ved at opvarme bufferen til 37 °C.
- Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. For at fremstille en brugsklar opløsning skal der inden første brug tilsættes den mængde ethanol (96–100 %, renhedsgrad p.a.), som er angivet på flaskeetiketten.

- Før den første brug af RNase-Free DNase Set skal der tilberedes en DNase I-stamopløsning. Opløs DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-enheder)* i 550 µL DNase-resuspensionsbuffer (DRB), som leveres med kittet. Sørg for, at der ikke spildes DNase I (RNFD), når hætteglasset åbnes. Den rekonstituerede DNase I (RNFD) må ikke blandes på en vortex-mixer. DNase I er meget modtageligt for fysisk denaturering. Blandingen bør kun foregå ved at vende hætteglasset forsigtigt.
- Aktuelle data viser, at rekonstitueret DNase I (RNFD) kan opbevares ved 2-8°C i op til 6 uger. Ved længere tids opbevaring af DNase I (RNFD) skal stamopløsningen fjernes fra glasflasken, og den skal deles op i alikvoter til enkelt-brug (brug mikrocentrifugerørerne [MC] på 1,5 mL, der blev leveret med kittet, der er nok til 5 alikvoter), og opbevares ved -20 °C i op til 9 måneder. Optøede alikvoter kan opbevares ved 2-8°C i op til 6 uger. De optøede alikvoter kan ikke nedfryses igen.
- Ved rekonstituering og opdeling af DNase I (RNFD) skal retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 72) følges.
- Monter den korrekte rysteadapter (følger med QIAcube-instrumenter; brug adapteren til 2 mL sikkerhedsrør, markeret med "2"), og placer rysteholderen oven på adapteren.
- Kontroller affaldsskuffen, og tøm den hvis det er nødvendigt.
- Installer eventuelle relaterede protokoller, hvis de ikke allerede er installeret ved tidligere kørsler. QIAcube Connect MDx kræver, at alle tilhørende protokoller i den tilhørende zip-fil downloades. Installer begge protokollerne "PAXgene Blood RNA Part A" og "PAXgene Blood RNA Part B" for den klassiske QIAcube. Se "Installation af protokoller på QIAcube-instrumenter", side 44.

* Kunitz-enheden er den almindeligt anvendte enhed til opmåling af DNase I, defineret som den mængde DNase I, som forårsager en stigning i A_{260} på 0,001 pr. minut pr. milliliter ved 25 °C, pH 5,0, hvor der anvendes høj-polymeriseret DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 og 363).

Procedure

1. Luk lågen til QIAcube-instrumentet, og tænd for QIAcube-instrument på kontakten (QIAcube Connect MDx: Se figur 17, side 42; QIAcube: Se figur 18, side 43).

Der lyder et bip, og opstartsskærmen vises. Instrumenterne udfører automatisk opstartstest.

2. Åbn lågen til QIAcube-instrumentet, og placer de nødvendige reagenser og det nødvendige plastictilbehør i QIAcube-instrumentet. Se "Opfyldning af QIAcube-instrumenter", side 45.

For at spare tid kan opfyldningen udføres under en eller begge de 10 minutters centrifugetrin (trin 3 og 5).

3. Centrifugér PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 minutter ved 3.000–5.000 x g i en udsvingsrotor.



Sørg for, at blodprøverne i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) blev inkuberet i mindst 2 timer ved stuetemperatur (15–25 °C) for at opnå fuldstændig lysning af blodcellerne.



Rotoren skal være udstyret med adaptore til rundbandede rør. Hvis der anvendes andre typer adaptore, kan rørene blive beskadigede under centrifugeringen.

4. Fjern supernatanten ved at dekantere eller pipettere. Tilsæt 4 mL RNase-frit vand (RNFW) til pelletet, og luk røret med en ny sekundær BD Hemogard-sikkerhedslukning (følger med kittet).

Hvis supernatanten dekanteres, skal det sikres, at pelletet ikke forstyrres, og rørets kant skal tørres med en ren papirserviet.

5. Opløs pelletet med en vortex-mixer, og centrifugér i 10 minutter ved 3.000–5.000 x g med en udsvingsrotor. Fjern og bortskaf supernatanten fuldstændigt.

Små cellerester, som befinder sig i supernatanten efter vortex, men før centrifugeringen, berører ikke proceduren.



Hvis supernatanten ikke fjernes fuldstændigt, bliver lyseringen hæmmet og lysatet fortyndet, hvilket har en negativ indvirkning på betingelserne for bindingen af RNA til PAXgene-membranen.

6. Tilsæt 350 µL resuspensionsbuffer (BR1), og bland på en vortex-mixer, indtil pelletet er fuldstændigt opløst.

7. Overfør prøven med en pipette til et 2 mL forarbejdningsrør (PT).



Brug de forarbejdningsrør på 2 mL (PT), der leveres med PAXgene Blood RNA Kit.

8. Læg de åbne forarbejdningsrør (PT) med prøvemateriale i QIAcube-instrumentrysteren (QIAcube Connect MDx: Se figur 21, side 47; QIAcube: Se figur 22, side 48). Prøvepositionerne har numre, så de er nemmere at fylde. Sæt rysterholderpropper (følger med QIAcube-instrumenter) i pladserne ved kanten af rysterholderen, ved siden af hvert forarbejdningsrør. Dette tillader detektion af prøver under opfyldningskontrol.



Sørg for, at den korrekte rysteradapter (rysteradapter, 2 mL, sikkerhedsrør, markeret med "2", følger med QIAcube-instrumenterne) er installeret.



Ved forarbejdning af færre end 12 prøver skal rysterholderen fyldes som vist i figur 26, side 52. Det er ikke muligt at forarbejde én (1) eller 11 prøver. Positionsnumrene i rysterholderen svarer til positionsnumrene i centrifugen.

9. Luk lågen til QIAcube-instrumentet (QIAcube Connect MDx: Se figur 17, side 42; QIAcube: Se figur 18, side 43).

10. Vælg protokollen "PAXgene Blood RNA Part A", og start den.

Følg instruktionerne på QIAcube-instrumentets berøringskærm.



Sørg for, at begge programdele (del A og del B) er installeret på QIAcube-instrumentet (se "Installation af protokoller på QIAcube-instrumenter", side 44).



QIAcube-instrumenterne vil udføre opfyldningskontrol for prøver, spidser, rotoradaptere og reagensflasker.

11. Når "PAXgene Blood RNA Part A"-protokollen er afsluttet, skal du åbne lågen til QIAcube-instrumentet (QIAcube Connect MDx: Se figur 17, side 42; QIAcube: Se figur 18, side 43). Fjern og bortskaf PAXgene RNA-spin-kolonnerne (PRC) fra rotoradapterne, og de tomme forarbejdningsrør (PT) fra rysteren.



Under kørslen overføres spin-kolonnerne fra rotoradapterposition 1 (lågposition L1) til rotoradapterposition 3 (lågposition L2) af instrumentet (se figur 24, side 50).

12. Luk lågene på alle 1,5 mL-mikrocentrifugerør (MCT), der indeholder den oprensede RNA i rotoradapterne (position 3, lågposition L3, se figur 24, side 50). Overfør mikrocentrifugerørene på 1,5 mL (MCT) til QIAcube-instrumentrysteradapteren (QIAcube Connect MDx: Se figur 21, side 47; QIAcube: Se figur 22, side 48).

13. Luk lågen til QIAcube-instrumentet (QIAcube Connect MDx: Se figur 17, side 42; QIAcube: Se figur 18, side 43).

14. Vælg protokollen "PAXgene Blood RNA Part B", og start den.

Følg instruktionerne på QIAcube-instrumentets berøringsskærm.



Dette program inkuberer prøverne ved 65 °C og denaturerer RNA'en til downstream-applikationer. Dette trin må ikke udelades, selv hvis downstream-applikationen inkluderer et varmedenatureringstrin. Tilstrækkelig RNA-denaturering er yderst vigtig for maksimal effektivitet ved downstream-applikationer.

15. Når "PAXgene Blood RNA Part B"-programmet er afsluttet, skal du åbne lågen til QIAcube-instrumentet (QIAcube Connect MDx: Se figur 17, side 42; QIAcube: Se figur 18, side 43). Placer straks mikrocentrifugerørene (MCT) med den oprensede RNA på is.



ADVARSEL: Varm overflade. Rysterens temperatur kan nå op på 70 °C. Undgå berøring, når den er varm.



Efterlad ikke den oprensede RNA i QIAcube-instrumentet. Da prøverne ikke er afkølede, kan den oprensede RNA nedbrydes. Ubemandede kørsler natten over kan derfor ikke anbefales.

16. Hvis RNA-prøverne ikke straks skal bruges, skal de opbevares ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eller $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Da RNA'en forbliver denatureret efter gentagen frysning og optøning, er det ikke nødvendigt at gentage varmeinkuberingsprotokollen ("PAXgene Blood RNA Part B"). Hvis RNA-prøverne skal bruges til en diagnostisk analyse, skal producentens angivelser overholdes.

For at få en nøjagtig RNA-quantificering ved absorbering ved 260 nm, anbefaler vi, at prøven fortyndes i 10 mM Tris-Cl, pH 7,5. * En fortynding af prøven med RNase-frit vand kan føre til lave værdier og ringe præcision.

Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i de prøver, der skal måles.

Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet.



Ved kvantificering i Tris-HCl-buffer bruges forholdet

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/mL}$. Se bilag B, side 73.

17. Fjern reagensflaskeholderen fra QIAcube-instrumentets arbejdsbord (QIAcube Connect MDx: Se figur 21, side 47; QIAcube: Se figur 22, side 48), og luk alle flasker med de korrekt mærkede låg. Buffer i flasker kan opbevares ved stuetemperatur ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) i op til 3 måneder. Fjern og bortskaf resterende reagenser i forarbejdningsrørene (PT) i QIAcube-instrumentets mikrocentrifugerørpladser. Fjern og bortskaf rotoradaptere fra centrifugen. Tøm QIAcube Connect MDx-affaldsbeholderen (QIAcube Connect MDx: Se figur 17, side 42; QIAcube: Se figur 18, side 43). Luk QIAcube-instrumentets låge, og sluk for instrumentet på kontakten.

* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Fejlsøgningsvejledning

Denne fejlsøgningsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises til siden med hyppigt stillede spørgsmål (Frequently Asked Questions, FAQ) hos vores tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGEN Teknisk Service gerne på spørgsmål vedrørende informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se sidste side, eller besøg www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

RNA er nedbrudt

RNase-kontaminering



Vær forsigtig med ikke at tilføre RNaser til reagenserne under proceduren eller ved senere håndtering (se bilag A, side 72).

Lavt RNA-udbytte

a) Mindre end 2,5 mL blod, der er indsamlet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Sørg for, at der indsamles 2,5 mL i PAXgene Blood RNA Tube (BRT; se *PAXgene Blood RNA Tube-håndbog*).




b) RNA-koncentrationen målt i vand




RNA skal fortyndes i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* for at få en nøjagtig kvantifikation (se bilag B, side 73).

* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Kommentarer og forslag

- c) Der blev overført cellerester til PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC) i trin 9 og 10 af den manuelle protokol  Undgå at overføre større partikler, når supernatanten pipetteres efter trin 7 i den manuelle protokol (små cellerester indskrænker dog ikke præparationen).
- d) Supernatanten blev ikke fuldstændigt fjernet i trin 3  Sørg for, at supernatanten fjernes fuldstændigt. Hvis supernatanten dekanteres, skal dråber på randen af PAXgene Blood RNA Tube (BRT) fjernes ved hjælp af en papirserviet. Overhold rimelige forholdsregler for at undgå krydskontaminering.
- e) Efter indsamlingen i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inkuberes blodet i mindre end 2 timer  Efter indsamling skal blodet inkuberes i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i mindst 2 timer.

Lav A_{260}/A_{280} -værdi

- a) Vand, der bruges til at fortynde RNA til måling af A_{260}/A_{280}  Brug 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 til at fortynde RNA, før renheden måles* (se bilag B, side 73).

* 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.

Kommentarer og forslag

- b) Spektrofotometeret er ikke korrekt nulstillet



Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og 10 mMTris-HCl, pH 7,5, som i de prøver, der skal måles. Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet.

Fejlfunktion i instrumentet

QIAcube-instrumenterne fungerer ikke korrekt

Læs brugsanvisningen til QIAcube, og vær især opmærksom på afsnittet om fejlfinding. Sørg for, at QIAcube-instrumentet vedligeholdes korrekt, som beskrevet i brugsanvisningen.

Bilag A: Generelle bemærkninger om håndtering af RNA

Håndtering af RNA



Ribonukleaser (RNase) er meget stabile og aktive enzymer, som normalt ikke kræver kofaktorer, for at være aktive. RNaser er svære at deaktivere og selv små mængder er nok til at nedbryde RNA. Derfor må der ikke anvendes laboriematerialer af glas eller plastik uden først at eliminere en eventuel RNase-kontaminering. Vær meget forsigtig med ikke utilsigtet at introducere RNaser til RNA-prøven under eller efter oprensingsproceduren. For at skabe og bevare et RNase-fri miljø, når der arbejdes med RNA, skal visse forholdsregler overholdes under forbehandling og brug af engangs- og flegangsbeholdere og opløsninger.

Generel håndtering



Arbejdet med RNA skal altid følge principperne for korrekt mikrobiologisk og aseptisk arbejdsteknik. Hænder og støvpartikler kan bære bakterier og skimmelsvampe og leverer dermed den hyppigste årsag til RNase-kontaminering. Derfor skal der altid bæres latex- eller vinylhandsker, når der arbejdes med reagenser eller RNA-prøver, for at undgå RNase-kontaminering via huden eller fra støvet laborieudstyr. Skift laboriehandskerne hyppigt, og hold rørene lukket, når det er muligt. Lad den oprensede RNA forblive på is, når den opdeles til efterfølgende anvendelser.

Protokoller til fjernelse af RNase-kontaminering fra glasmaterialer og opløsninger findes i almene molekylærbiologiske metodebøger såsom Sambrook, J. og Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bilag B: Kvantificering og kvalitetsbestemmelse for RNA i alt

Kvantificering af RNA

Koncentrationen af RNA kan bestemmes ved at måle absorptionen ved 260 nm (A_{260}) i et spektrofotometer. For at sikre signifikans bør aflæsninger være i det lineære område på spektrofotometeret. Absorption af 1 enhed ved 260 nm svarer til 44 μg RNA pr. mL ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$). Denne relation er kun gyldig for målinger i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, *. Det er derfor nødvendigt at fortynde RNA-prøven, hvilket skal gøres i 10 mM Tris-Cl. Som oplyst længere nede (se "Renhed af RNA", side 74) er forholdet af absorptionsværdierne ved 260 nm og 280 nm en måleenhed for renheden af RNA. Sørg for, at kuvetterne, som bruges til måling af RNA-prøverne, er RNase-frie. Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i de prøver, der skal måles. Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet. Nedenfor vises et eksempel på beregning af RNA-quantificering.

Volumen af RNA-prøven	=	80 μL
Fortynding (1/15)	=	10 μL RNA-prøve + 140 μL 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Absorptionsmåling af den fortyndede prøve i en kuvette (RNase-fri).		
A_{260}	=	0,3
Koncentration af prøve	=	$44 \times A_{260} \times \text{fortyndingsfaktoren}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 $\mu\text{g/mL}$
Samlet udbytte	=	koncentration x prøvolumen i milliliter
	=	$198 \mu\text{g/mL} \times 0,08 \text{ mL}$
	=	15,8 μg RNA

* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Renhed af RNA

Forholdet mellem læsninger ved 260 nm og 280 nm (A_{260}/A_{280}) anslår renheden af RNA i forhold til urenheder, der absorberes i UV, såsom proteiner. A_{260}/A_{280} -forholdet påvirkes dog meget af pH. Ved relativt lave pH-værdier er A_{260}/A_{280} -forholdet og sensitiviteten reduceret over for proteinkontamination.* Det anbefales at måle absorptionsforholdet i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, når der er behov for nøjagtige værdier. Ren RNA har et A_{260}/A_{280} -forhold på 1,8–2,2 i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i de prøver, der skal måles. Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet.

* 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.

Appendiks C: Håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Følgende anbefalinger fra BD kan hjælpe ved håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Se *PAXgene Blood RNA Tube-håndbog* for at læse yderligere oplysninger om PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Instruktioner til fjernelse af BD Hemogard-sikkerhedslukningen

1. Tag PAXgene Blood RNA Tube (BRT) med den ene hånd, og anbring tommelfingeren direkte under BD Hemogard-lukningen. (Der kan opnås mere stabilitet, hvis underarmen placeres på en fast overflade). Med den anden hånd drejes BD Hemogard-lukningen, mens der samtidigt trykkes opad med tommelfingeren, men **KUN INDTIL PROPPEN I RØRET LØSNER SIG**.
2. Fjern tommelfingeren, før lukningen fjernes. Tryk **IKKE** lukningen af PAXgene Blood RNA Tube (BRT) med tommelfingeren. Forsigtig: Hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) indeholder blod, kan der være en potentiel infektionsfare. For at undgå skader under fjernelse af lukningen er det vigtigt at fjerne tommelfingeren, som lukningen trykkes op med, fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT), så snart BD Hemogard-lukningen har løsnet sig.
3. Løft lukningen af PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Det er usandsynligt, at plastikkappen kan løsne sig fra gummiproppen, men **PRØV IKKE AT SAMLE LUKNINGEN IGEN**, hvis det skulle ske. Fjern gummiproppen forsigtigt fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Anvisninger for indføring af den sekundære BD Hemogard-sikkerhedslukning

1. Udskift lukningen af PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Drej og tryk nedad, indtil proppen er på plads igen. Proppen skal trykkes helt ind, for at PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan håndteres sikkert.

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, forarbejdningsrør, RNase-fri DNase I, RNase-fri reagenser og buffere. Til anvendelse sammen med PAXgene Blood RNA Tube	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 prøvetagningsrør	762165
Relaterede produkter, der kan bestilles fra QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Pakningen indeholder: reagensflaskeholdere (3); mærkningsstrips til holder (8); 200 µL filterspidser (1024); 1.000 µL filterspidser (1024); 1.000 µL filterspidser, wide-bore (1024); 30 mL reagensflasker (18); rotoradaptere (240); rotoradapterholder	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Sterile engangsfilterspidser i holder	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagensflasker (30 mL) med låg; pakke med 6; til brug med QIAcube- instrumentets reagensflaskeholder	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Til 240 præparater: 240 engangsrotoradaptere; til brug sammen med QIAcube-instrumenter	990394

Reagent Bottle Rack	Holder med plads til 6 x 30 mL reagensflasker på QIAcube-instrumentets arbejdsbord	990390
Rotor Adapter Holder	Holder til 12 engangsrotoradaptere; til brug sammen med QIAcube-instrumenter	990392

Relaterede produkter, der kan bestilles fra BD*

Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,75" (0,8 x 19 mm) nål, 12" (305 mm) slange med luer-adapter; 50 pr. æske, 200 pr. kasse	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Kasse, kun til 13 mm og 16 mm diameter; 1.000/kasse	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4,0 mL træk med rød BD Hemogard-lukning og papiretiket; 100/æske, 1.000/kasse	368975

* Disse produkter er typiske tilbehørsartikler for blodtapning, som kan anvendes sammen med PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Der findes mere information om dette tilbehør, inklusiv om hvordan man bestiller, på www.preanalytix.com.

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle PreAnalytiX eller QIAGEN kit-håndbog eller -brugervejledning. PreAnalytiX- og QIAGEN-kit-håndbøger og -brugermanualer kan fås via www.PreAnalytiX.com og www.qiagen.com eller kan rekvireres fra PreAnalytiX's tekniske service.

Revisionshistorik for håndbogen

Dokument og revision	Ændringer	Dato
HB-0101-004, R2	Ændringer, som følger ændringer i GHS-regler, udført i hele dokumentet.	Juni 2015
HB-0101-005, R3	Ny skabelon, opdateringer af data i automatisk protokol og i præstationsdata; opdatering af sikkerhedsoplysninger, som følger ændringer i GHS-regler, ændringer i instrumentoplysninger og i erklæring om begrænsninger i produktets anvendelse.	Februar 2019
HB-0101-006, R3	Rettelse af kitnavn på side i kitindholdstabellen side 5.	Januar 2020
HB-0101-007, R4	QIAcube Connect MDx er blevet føjet til automatisk protokol; teksten er blevet opdateret, så den omfatter referencer til QIAcube Connect MDx; tabel-, side- og figurnumre er blevet opdateret.	December 2020

PreAnalytiX verden over

PreAnalytiX-produkter forhandles af QIAGEN- og BD-virksomheder

QIAGEN – kundeservice

Bestilling www.QIAGEN.com/shop | Teknisk service support teknisk.service@qiagen.com | Website www.qiagen.com

BD – kundeservice

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: bdsweden@bd.com

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

UK
Orders: 0800.917.8776
E-mail: bduk_customerservice@bd.com

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



HB-0101-007 1122120DA BD-8945 12/2020
Fremstillet i Tyskland