

Prosinac 2020.

Priručnik za PAXgene[®] Blood RNA Kit

Inačica 2



50 (kataloški br. 762174)

R4 **MAT** 1122120HR

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Proizvodi QIAGEN GmbH za PreAnalytiX



A QIAGEN / BD Company

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

Proizvodi PAXgene Blood RNA Kit nisu dostupni u svim državama; raspitajte se za njihovu dostupnost.

Ugovor o ograničenoj licenciji

Uporabom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda PAXgene Blood RNA Kit pristaje na sljedeće uvjete:

1. PAXgene Blood RNA Kit smije se upotrebljavati isključivo u skladu s *Priručnikom za PAXgene Blood RNA Kit* i upotrebljavati samo s komponentama uključanima u komplet. Društvo PreAnalytiX ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili ugrađivanje komponenata ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom kompletu, osim kako je opisano u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Kit* i drugim protokolima dostupnima na web-mjestu www.preanalytix.com.
2. Osim izričito navedenih licencija, društvo PreAnalytiX ne jamči da ovaj komplet i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj komplet i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, prerađivati niti preprodavati.
4. Društvo PreAnalytiX odriče se svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta potvrđuju da neće dati ili dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje.
6. Društvo PreAnalytiX može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s kompletom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na web-mjestu www.preanalytix.com.

Uvjetna prodaja

Navedeni proizvod dolazi s licencijom pod određenim patentnim zahtjevima US-7,270,953 i US-7,682,790, kao i EP-1820793 B1 te stranim ekvivalentima ovim patentnim zahtjevima za uporabu proizvoda za obradu kompleksa nukleinske kiseline koji se stvara tijekom prikupljanja uzoraka u epruveti PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, sva prava pridržana.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Švicarska

www.preanalytix.com

Distributeri proizvoda društva PreAnalytiX

Proizvode društva PreAnalytiX za PreAnalytiX proizvodi i distribuira QIAGEN ili BD.

Proizvodi se ne mogu naručiti od društva PreAnalytiX GmbH.


Podatke za kontakt lokalnog distributera proizvoda društva PreAnalytiX potražite na posljednjoj stranici.

Sadržaj

Sadržaj kompleta.....	5
Simboli.....	6
Uvjeti pohrane	8
Namjena	8
Ograničenja uporabe proizvoda	9
Kontrola kvalitete	10
Tehnička podrška	10
Sigurnosne informacije	10
Uvod	14
Načelo i postupak.....	14
Prikupljanje i stabilizacija uzoraka	15
Koncentracija i pročišćavanje RNK	20
Ručno pročišćavanje RNK	20
Automatizirano pročišćavanje RNK.....	30
Oprema i reagensi koje isporučuje korisnik	39
Važne napomene	42
Upotreba instrumenata QIAcube	42
Instaliranje protokola na instrumente QIAcube.....	45
Punjenje instrumenata QIAcube.....	46
Protokol: ručno pročišćavanje ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	57

Protokol: automatizirano pročišćavanje ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	65
Vodič za rješavanje problema	72
Dodatak A: Opće napomene o postupanju s RNK	75
Dodatak B: Kvantifikacija i određivanje kvalitete ukupne RNK	76
Dodatak C: Rukovanje epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	78
Informacije za naručivanje.....	79
Povijest revizija priručnika	81

Sadržaj kompleta

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Kataloški br.			762174
Broj preparata			50
BR1	Resuspension Buffer (Pufer za resuspendiranje)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Vezivni pufer)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Pufer za ispiranje 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Pufer za ispiranje 2 (koncentrat))†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Pufer za eluiranje)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (Voda bez ribonukleaze (RNaze) (bočica))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinaza K (zeleni poklopac))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (Spin kolone PAXgene RNA (crvene))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 ml) (Epruvete za obradu (2 ml))	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Sekundarni poklopci BD Hemogard™)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1,5 ml) (Epruvete za mikrocentrifugu (1,5 ml))	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNaza I, bez RNaze (liofilizirana))	DNA REM	1500 Kunitz jedinica‡
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (Pufer za razgradnju DNK (bijeli poklopac))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Pufer za resuspendiranje DNaze (epruveta, ljubičasti poklopac))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Spin kolone PAXgene Shredder (ljubičaste))	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Priručnik	Priručnik za PAXgene Blood RNA Kit (inačica 2)		1

Simboli



Sadržava reagensa dovoljno za <N> testova



Prije uporabe pročitajte upute



Upotrijebiti do



In vitro dijagnostički medicinski proizvod



Kataloški broj



Broj serije



Broj materijala



Komponente



Broj



Metoda sterilizacije zračenjem



Kunitz jedinice



Dodavanje



Sadržava

* Nije kompatibilan s reagensima za dezinfekciju koji sadržavaju izbjeljivač. Sadržava sol gvanidina. Sigurnosne informacije potražite na stranici 10.

† Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodajte 4 volumena etanola (96 – 100-postotni, razred čistoće p.a.), kako je naznačeno na bočici, za dobivanje radne otopine.

‡ Kunitz jedinice upotrebljavaju se za mjerenje DNaze I te se definiraju kao količina DNaze I koja uzrokuje povećanje u A_{260} od 0,001 po minuti po mililitru pri 25 °C, pH 5,0, s visoko polimeriziranom DNK kao supstratom (Kunitz, M. (1950.) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

RCNS

Rekonstituirano

DNase

Deoksiribonukleaza I

EtOH

Etanol

GITC

Gvanidin izotiocijanat

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Globalni broj trgovačke jedinice



Za jednokratnu uporabu



Ograničenje temperature



Gornja granica temperature



Proizvođač



Važna napomena

Uvjeti pohrane

Spin kolone PAXgene RNA (PRC), spin kolone PAXgene Shredder (PSC), proteinaza K (PK) te puferi (BR1, BR2, BR3, BR4 i BR5) trebaju se pohraniti na suhom na temperaturi naznačenoj na naljepnici kompleta.

RNase-Free DNase Set, koji sadržava DNazu I (RNFD), pufer za razgradnju DNK (RDD) te pufer za resuspendiranje DNaze (DRB), isporučuje se pri sobnoj temperaturi. Pohranite sve komponente RNase-Free DNase Set odmah nakon primitka pri temperaturi naznačenoj na naljepnici. U slučaju propisne pohrane komplet je stabilan do datuma isteka valjanosti na kutiji kompleta.

Namjena

PAXgene Blood RNA System sastoji se od epruveta za uzimanje krvi (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) i kompleta za pročišćavanje nukleinske kiseline (PAXgene Blood RNA Kit). Namijenjen je za uzimanje, pohranu i prijenos krvi i stabilizaciju unutarstanične RNK u zatvorenoj epruveti te naknadnu izolaciju i pročišćavanje RNK domaćina iz pune krvi za RT-PCR koji se upotrebljava u molekularnom dijagnostičkom testiranju.

Značajke radnog učinka sustava PAXgene Blood RNA System utvrđene su samo s genskim transkriptima FOS i IL1B. Korisnik je odgovoran za utvrđivanje odgovarajućih značajki radnog učinka sustava PAXgene Blood RNA System za druge ciljne transkripte.

Indikacije za upotrebu

Komplet PAXgene Blood RNA Kit služi za pročišćavanje unutarstanične RNK iz pune krvi prikupljene u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Kada se komplet upotrebljava u kombinaciji s epruvetom PAXgene Blood RNA Tube (BRT), sustav pruža pročišćenu unutarstaničnu RNK iz pune krvi za reakciju RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja) koja se upotrebljava u molekularnom dijagnostičkom testiranju.

Ograničenja uporabe proizvoda

Komplet PAXgene Blood RNA Kit namijenjen je za pročišćavanje unutarstanične RNK iz ljudske pune krvi ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocita/ml) za in vitro dijagnostičke primjene. Nije za pročišćavanje genomske DNK ili nukleinskih kiselina virusa iz ljudske pune krvi. Zbog ograničenog broja transkripata potvrđenih za specifikacije stabilizacije (genski transkripti FOS i IL1B), značajke radnog učinka nisu utvrđene za sve transkripte. Korisnici trebaju pregledati podatke proizvođača i svoje vlastite podatke kako bi odredili je li potrebno potvrđivanje za druge transkripte.

Ovaj proizvod namijenjen je uporabi za profesionalne korisnike, primjerice tehničare i liječnike, koji su obučeni u in vitro dijagnostičkim postupcima.

Informacije o uporabi epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*.

Kontrola kvalitete

U skladu sa sustavom za upravljanje kvalitetom društva QIAGEN certificiranim u skladu s normom ISO, svaka serija kompleta PAXgene Blood RNA Kit ispituje se prema unaprijed određenim specifikacijama kako bi se osigurala dosljedna kvaliteta proizvoda.

Tehnička podrška

Mi u društvu QIAGEN ponosni smo na kvalitetu i dostupnost svoje tehničke podrške. U našim odjelima tehničke službe rade iskusni znanstvenici s bogatim praktičnim i teorijskim znanjem iz područja molekularne biologije i uporabe proizvoda društva PreAnalytiX. Ako imate kakva pitanja u vezi kompleta PAXgene Blood RNA Kit, slobodno nas kontaktirajte.

Za tehničku podršku i više informacija nazovite tehničku službu društva QIAGEN.

Sigurnosne informacije

Korisnici u EU-u sve ozbiljne incidente povezane s uređajem trebaju prijaviti proizvođaču i nacionalnom nadležnom tijelu. Izvan EU-a za sve se incidente ili upite povezane s uređajem obratite lokalnom predstavniku društva QIAGEN.

Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale.

Kako biste izbjegli rizik od infekcija (primjerice, virusom HIV-a ili virusima hepatitisa B) ili ozljeda prilikom rada s biološkim i kemijskim materijalima, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL). Oni su dostupni na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-mjestu www.preanalytix.com. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehničke listove (STL-ove) za ovaj komplet.

OPREZ



NEMOJTE dodavati izbjeljivač ili kisele otopine izravno u otpad nastao pripremom uzoraka.

Vezični pufer (BR2) i pufer za ispiranje 1 (BR3) sadržavaju gvanidin tiocijanat, koji u kombinaciji s izbjeljivačem može stvoriti visoko reaktivne spojeve. Ako se vezični pufer (BR2) ili pufer za ispiranje 1 (BR3) proliju, očistite odgovarajućim laboratorijskim deterdžentom i vodom. Ako se tekućina koja sadržava potencijalno infektivne agense prolije, očistite zahvaćeno područje najprije laboratorijskim deterdžentom i vodom, a zatim 1-postotnim (v/v) natrijevim hipokloritom (izbjeljivač).

Mješavina otopine za stabilizaciju RNK i krvi iz epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) može se dezinficirati uporabom 1 volumena komercijalno dostupne otopine izbjeljivača (5-postotni natrijev hipoklorit) na 9 volumena mješavine otopine za stabilizaciju RNK i krvi.

Otpad nastao pripremom uzoraka, kao što su supernatanti iz koraka centrifugiranja u postupku pročišćavanja RNK, smatra se potencijalno infektivnim. Prije zbrinjavanja otpad se mora sterilizirati u autoklavu ili zapaliti kako bi se uništio infektivni materijal. Zbrinjavanje se mora obaviti prema službenim propisima.

Sljedeće izjave o opasnosti i mjerama opreza odnose se na komponente kompleta PAXgene Blood RNA Kit. Sigurnosne informacije o epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*.

Pufer BR2



Sadržava: gvanidin tiocijanat. Opasnost! Štetno ako se proguta. Može biti štetno u dodiru s kožom ili ako se udiše. Uzrokuje ozbiljno oštećenje očiju. Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. U dodiru s kiselinama oslobađa vrlo otrovni plin. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. Odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika.

Pufer BR3



Sadržava: etanol; gvanidin tiocijanat. Opasnost! Zapaljiva tekućina i para. Uzrokuje ozbiljno oštećenje očiju. U dodiru s kiselinama oslobađa vrlo otrovni plin. Čuvati odvojeno od topline/iskre/otvorenog plamena/vrućih površina. Ne pušiti. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. Odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika.

DNase I



Sadržava: DNazu. Opasnost! Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Ako se udiše može izazvati simptome alergije ili astme ili poteškoće s disanjem. Izbjegavati udisanje prašine/dima/plina/magle/pare/aerosola. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. Nositi sredstva za zaštitu dišnog sustava. U SLUČAJU izloženosti ili sumnje na izloženost: nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika. Premjestiti unesrećenog na svjež zrak, umiriti ga i postaviti u položaj koji olakšava disanje.

Proteinaza K



Sadržava: proteinazu K. Opasnost! Uzrokuje blago nadraživanje kože. Ako se udiše može izazvati simptome alergije ili astme ili poteškoće s disanjem. Izbjegavati udisanje prašine/dima/plina/magle/pare/aerosola. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. Nositi sredstva za zaštitu dišnog sustava. U SLUČAJU izloženosti ili sumnje na izloženost: nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika. Premjestiti unesrećenog na svjež zrak, umiriti ga i postaviti u položaj koji olakšava disanje.

Uvod

Prikupljanje pune krvi prvi je korak u mnogim molekularnim ispitivanjima kojima se proučava stanična RNK. Međutim, veliki problem u takvim eksperimentima predstavlja nestabilnost profila stanične RNK in vitro. Istraživanja društva PreAnalytiX pokazala su da se broj kopija pojedinačnih vrsta mRNK u punoj krvi može promijeniti za više od 1000 puta tijekom pohrane ili transporta pri sobnoj temperaturi.* Te su promjene uzrokovane brзом degradacijom RNK i induciranom ekspresijom određenih gena nakon prikupljanja uzorka krvi. Takve promjene u profilu ekspresije RNK onemogućuju pouzdana ispitivanja ekspresije gena. Stoga je metoda kojom bi se očuvao profil ekspresije RNK tijekom i nakon flebotomije ključna za točnu analizu ekspresije gena u ljudskoj punoj krvi.

Načelo i postupak

Društvo PreAnalytiX razvilo je sustav koji omogućava prikupljanje, stabilizaciju, pohranu i transport uzoraka ljudske pune krvi, uz brz i učinkovit protokol za pročišćavanje unutarstanične RNK. Za sustav je potrebna uporaba epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; američki patenti 6,602,718 i 6,617,170) za prikupljanje krvi i stabilizaciju RNK, nakon čega slijedi ručno ili automatizirano pročišćavanje RNK s pomoću kompleta PAXgene Blood RNA Kit. Ručni i automatizirani protokoli pružaju u suštini jednak radni učinak s obzirom na kvalitetu i prinos RNK. Podaci o radnom učinku za ručni protokol (stranice 23–30) i automatizirani protokol (stranice 32–36) uključeni su u ovaj priručnik.



QIAGEN QIAcube Connect MDx nije dostupan u svim zemljama. Za dodatne pojedinosti obratite se tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

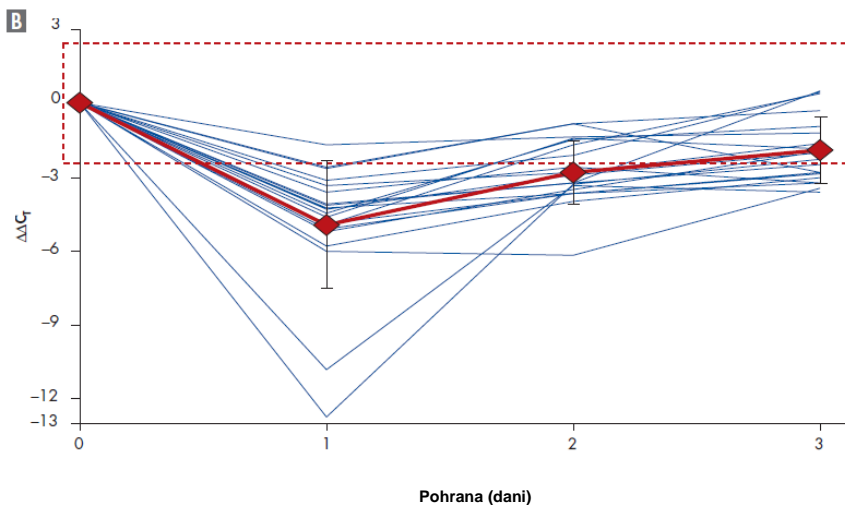
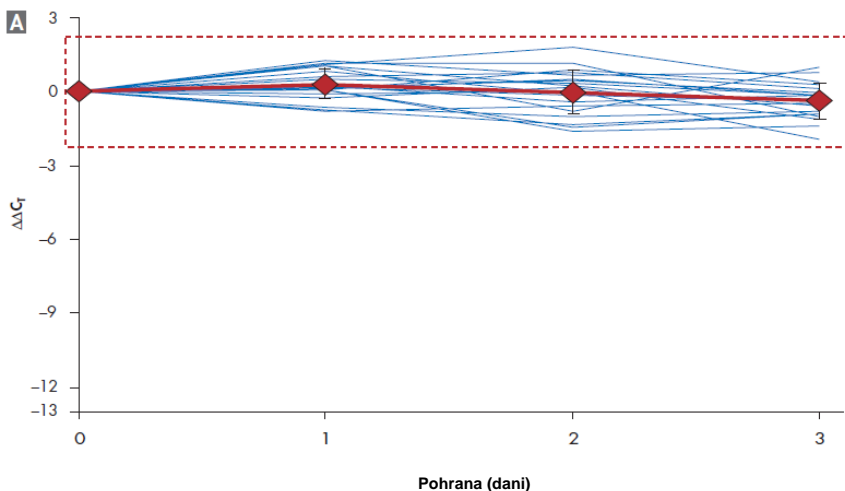
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin. Chem.* **48**, 1883.

Prikupljanje i stabilizacija uzoraka

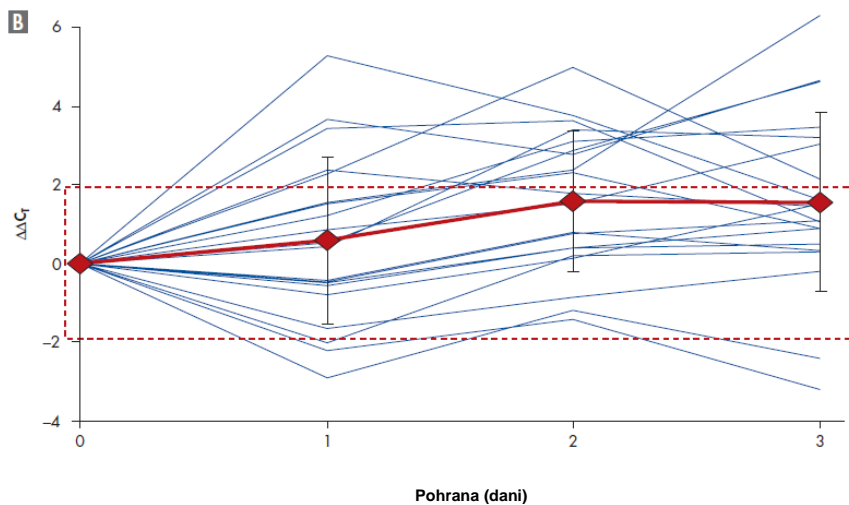
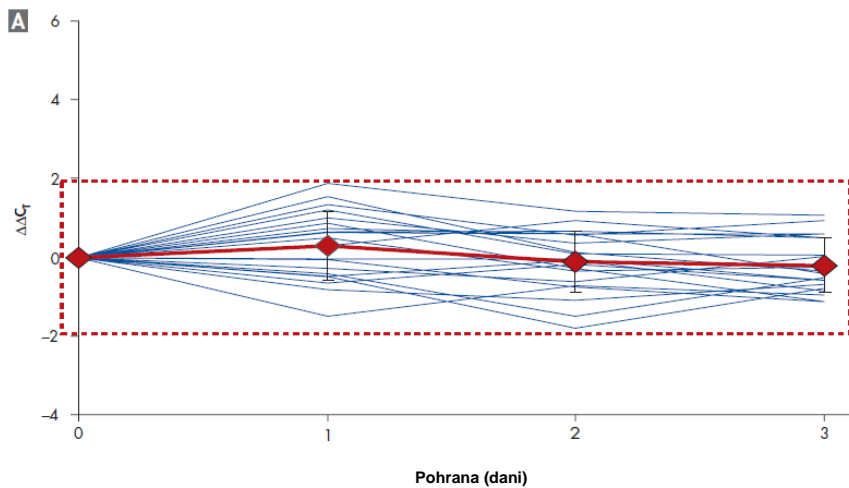
Epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sadržavaju patentirani sastav reagensa temeljen na patentiranoj tehnologiji stabilizacije RNK. Sastav reagensa štiti molekule RNK od degradacije RNazama i umanjuje ex vivo promjene u ekspresiji gena. Epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) namijenjene su za prikupljanje ljudske pune krvi i stabilizaciju stanične RNK do 3 dana pri 18 – 25 °C (slike 1 i 2, stranice 16 i 17) ili do 5 dana pri 2 – 8 °C (slike 3 i 4, stranice 18 i 19). Trenutačno dostupni podaci pokazuju stabilizaciju stanične RNK tijekom najmanje 11 godina pri -20 °C ili -70 °C*. Za više informacija iz aktualnih ispitivanja koja procjenjuju stabilnost tijekom dužih razdoblja, kontaktirajte tehničku službu društva QIAGEN.

Stvarno trajanje stabilizacije RNK može varirati ovisno o vrsti stanične RNK i upotrijebljenom postupku daljnje obrade. Zbog ograničenog broja transkripata potvrđenih za specifikacije stabilizacije (genski transkripti FOS i IL1B), značajke radnog učinka nisu utvrđene za sve transkripte. Korisnici trebaju pregledati podatke proizvođača i svoje vlastite podatke kako bi odredili je li potrebno potvrđivanje za druge transkripte.

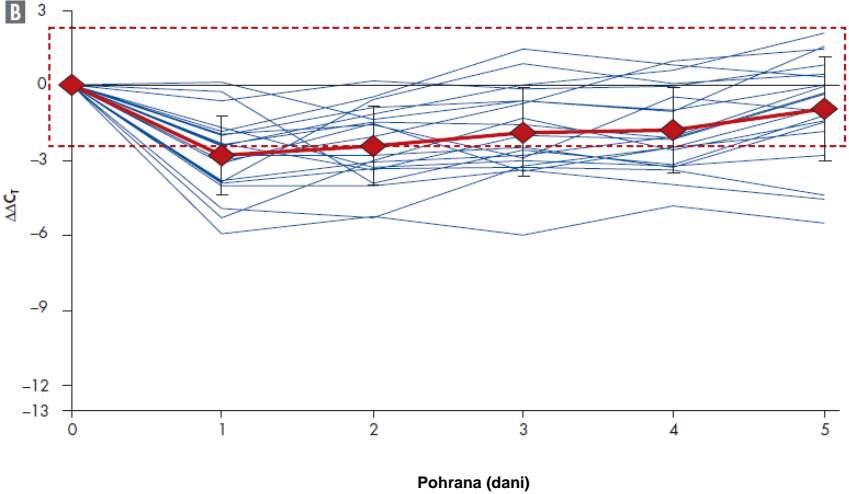
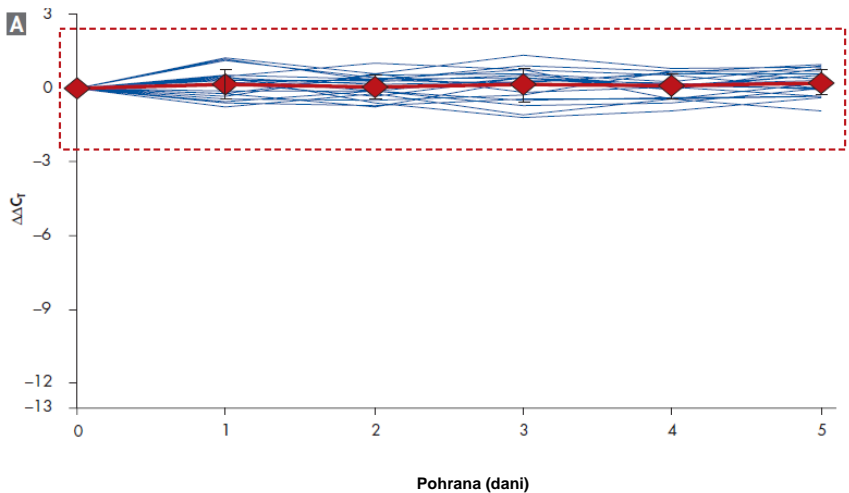
* U tijeku je dugotrajno ispitivanje pohrane krvi u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes.



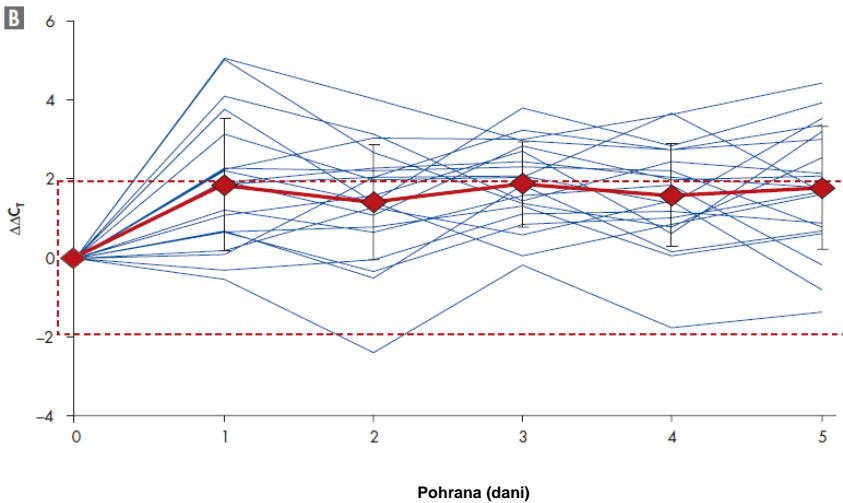
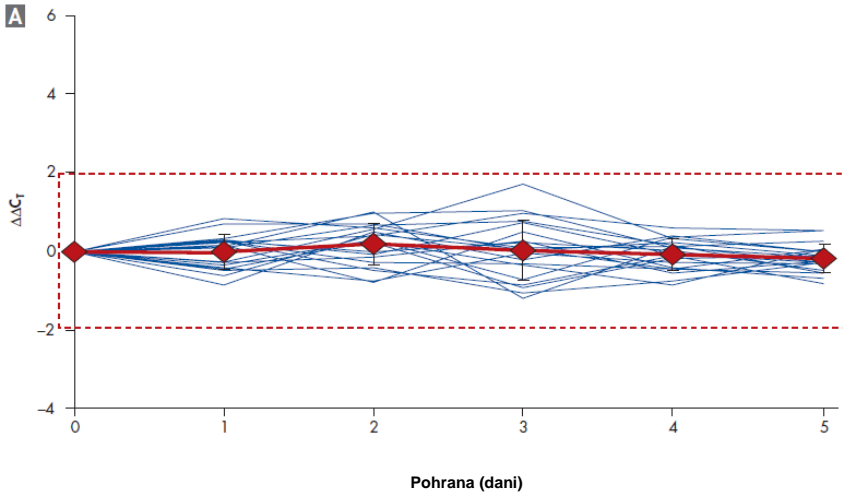
Slika 1. Stabilnost RNK u uzorcima krvi pri 18 – 25 °C: FOS. Krv je prikupljena od 10 davatelja, uz duplikate uzoraka, te pohranjena na 18 – 25 °C tijekom navedenog broja dana, nakon čega je slijedilo pročišćavanje ukupne RNK. **[A]** Krv je prikupljena i pohranjena u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a ukupna RNK pročišćena je s pomoću kompleta PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krv je prikupljena i pohranjena u standardne epruvete za prikupljanje krvi s etilendiamintetraocetnom kiselinom (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) kao antikoagulansom, a ukupna je RNK pročišćena s pomoću standardne metode organske ekstrakcije s čišćenjem RNK na bazi membrane od silika-gela. Relativne razine transkripta gena FOS određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Urtane su vrijednosti svih uzoraka, s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama svih uzoraka. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times (2,34 C_T)$.



Slika 2. Stabilnost RNK u uzorcima krvi pri 18 – 25 °C: IL1B. Krv je prikupljena i ukupna RNK pročišćena, nakon pohrane pri 18 – 25 °C, kako je opisano na slici 1. Relativne razine transkripta gena IL1B određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. U crtane su vrijednosti svih uzoraka, s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama svih uzoraka. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times (1,93 C_T)$.



Slika 3. Stabilnost RNK u uzorcima krvi pri 2 – 8 °C: FOS. Krv je prikupljena od 10 davatelja, uz duplikate uzoraka, te pohranjena na 2 – 8 °C tijekom navedenog broja dana, nakon čega je slijedilo pročišćavanje ukupne RNK. **[A]** Krv je prikupljena i pohranjena u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a ukupna RNK pročišćena je s pomoću kompleta PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krv je prikupljena i pohranjena u standardne epruvete za prikupljanje krvi s etilendiamintetraoetnom kiselinom (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) kao antikoagulansom, a ukupna je RNK pročišćena s pomoću standardne metode organske ekstrakcije s čišćenjem RNK na bazi membrane od silika-gela. Relativne razine transkripta gena FOS određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. U crtane su vrijednosti svih uzoraka, s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama svih uzoraka. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times (2,34 C_T)$.



Slika 4. Stabilnost RNK u uzorcima krvi pri 2 – 8 °C: IL1B. Krv je prikupljena i ukupna RNK pročišćena, nakon pohrane pri 2 – 8 °C, kako je opisano na slici 3. Relativne razine transkripta gena IL1B određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Ucrtane su vrijednosti svih uzoraka, s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama svih uzoraka. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times (1,93 C_T)$.

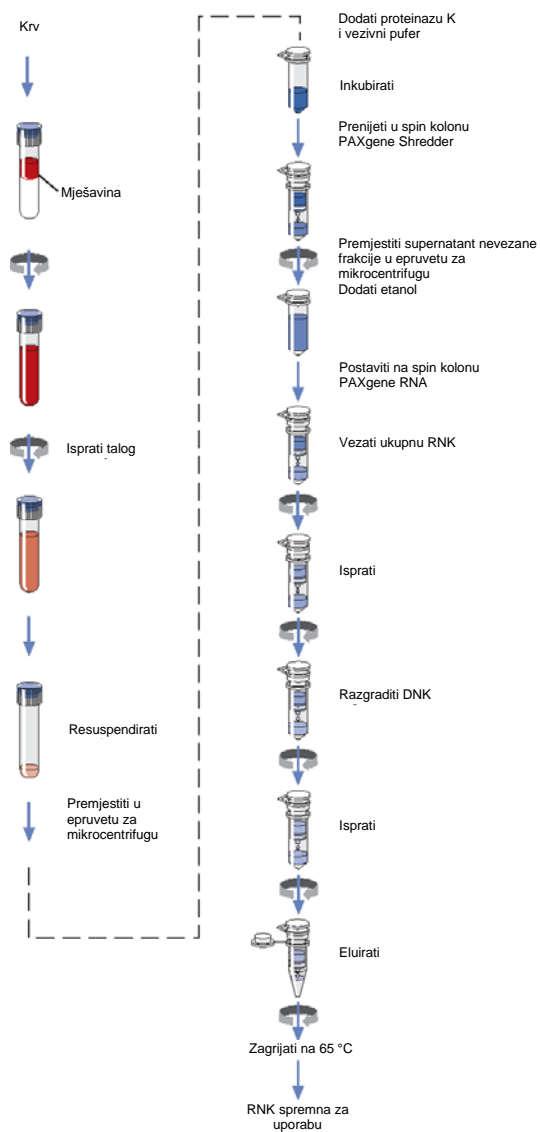
Koncentracija i pročišćavanje RNK

Komplet PAXgene Blood RNA Kit služi za pročišćavanje ukupne RNK iz 2,5 ml ljudske pune krvi prikupljene s pomoću epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Postupak je jednostavan i može se provesti s pomoću ručnih ili automatiziranih protokola (pogledajte slike 5 i 10, stranice 21 i 31). U oba protokola pročišćavanje počinje s korakom centrifugiranja za stvaranje taloga nukleinskih kiselina u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Talog se ispire i resuspendira, nakon čega slijedi ručno ili automatizirano pročišćavanje RNK. U načelu, oba protokola slijede jednake korake protokola koji uključuju jednake komponente kompleta.

Ručno pročišćavanje RNK

Resuspendirani talog inkubira se u optimiziranim puferima zajedno s proteinazom K (PK) kako bi došlo do razgradnje proteina. Provodi se dodatno centrifugiranje s pomoću spin kolone PAXgene Shredder (PSC) kako bi se homogenizirao lizat stanica te uklonio preostali stanični ostatak, a supernatant nevezane frakcije (eng. flow-through fraction) prenosi se u novu epruvetu za mikrocentrifugu. Dodaje se etanol kako bi se prilagodili uvjeti vezanja te se lizat postavlja u spin kolonu PAXgene RNA (PRC). Tijekom kratkog centrifugiranja RNK se selektivno veže na membranu od silika-gela PAXgene, dok kontaminanti prolaze kroz membranu. Preostali kontaminanti se uklanjaju u nekoliko učinkovitih koraka ispiranja. Između prvog i drugog koraka ispiranja membrana se tretira DNazom I (RNFD) kako bi se uklonile količine vezane DNK u tragovima. Nakon koraka ispiranja RNK se eluira u puferu za eluiranje (BR5) i toplinski se denaturira.

Ukupna RNK izolirana sustavom PAXgene Blood RNA System je čista. Prilikom uporabe ručnog protokola vrijednosti A_{260}/A_{280} su između 1,8 i 2,2, a $\leq 1\%$ (w/w) genomske DNK prisutno je u $\geq 95\%$ svih uzoraka, što je izmjereno kvantitativnom real-time PCR reakcijom (polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom) sekvence gena beta-aktin. Barem 95 % uzoraka ne pokazuje inhibiciju u reakciji RT-PCR uz iskorištenje do 30 % eluata.

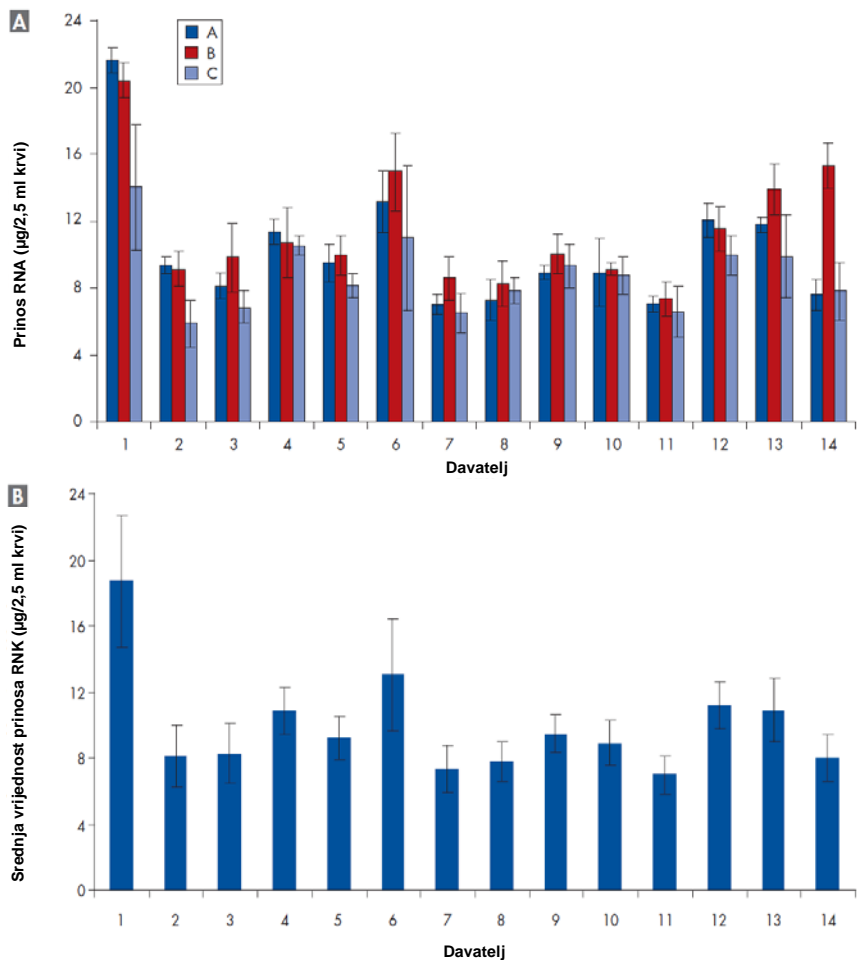


Slika 5. Ručni postupak s pomoću sustava PAXgene Blood RNA.

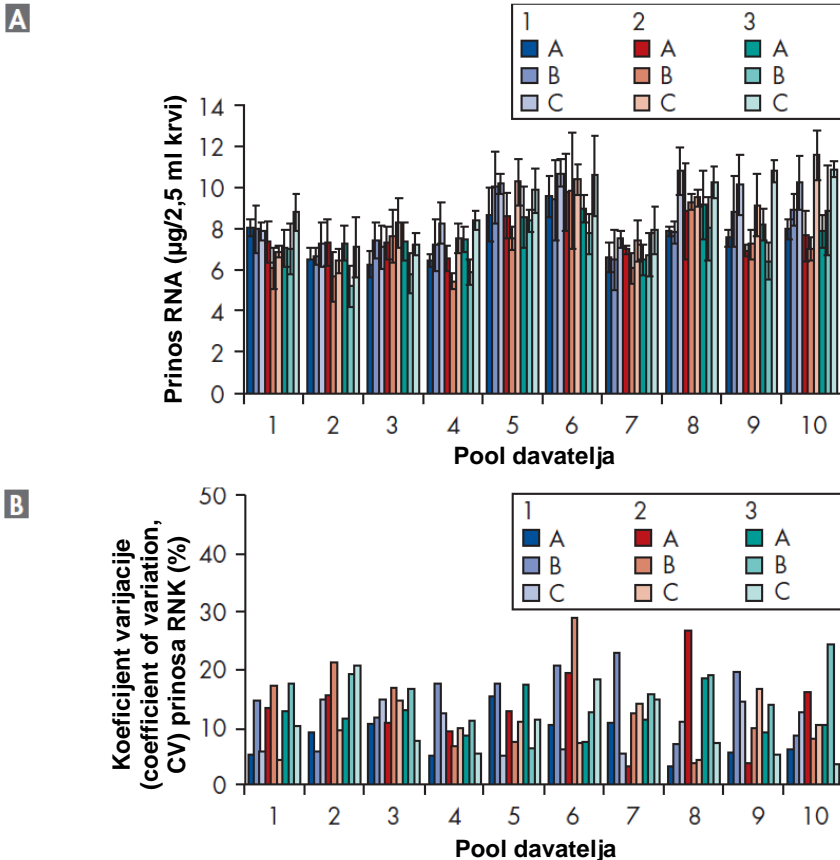
Za uporabu ručnog protokola prosječno je vrijeme pripreme uzoraka (na temelju podataka iz 12 procesa pripreme uzoraka) otprilike 90 minuta*, sa samo 40 minuta vremena rada rukama. Prinosi RNK iz 2,5 ml zdrave ljudske pune krvi su $\geq 3 \mu\text{g}$ za $\geq 95\%$ obrađenih uzoraka. Budući da prinosi u velikoj mjeri ovise o davatelju, individualni prinosi mogu varirati. Za pojedinačne davatelje sustav PAXgene Blood RNA System pruža visoko ponovljive prinose (slike 6 i 7, stranice 23 i 24) te ponovljivu reakciju RT-PCR (slike 8 i 9, stranice 28 i 29), što ga čini vrlo učinkovitim za klinička dijagnostička ispitivanja.

Slika 6 (stranica 23) označava sveukupnu ponovljivost i obnovljivost rezultata sustava PAXgene Blood RNA System. Provedena su dodatna ispitivanja kako bi se prikazao utjecaj različitih serija kompleta PAXgene Blood RNA Kit i različitih rukovatelja na obnovljivost prinosa RNK i radnog učinka reakcije RT-PCR u stvarnom vremenu. Budući da su za ta ispitivanja upotrebljavani uzorci krvi iz poola umjesto pojedinačnih uzoraka iz epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rezultati ne odražavaju ponovljivost sustava, uključujući promjene između pojedinačnih prikupljanja krvi, nego samo ponovljivost pripreme uzoraka (pogledajte sliku 7, stranica 24).

* Ukupno vrijeme trajanja protokola, uključujući unaprijed obavljeno rukovanje epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugiranja, ispiranje taloga i resuspendiranje taloga).



Slika 6. Ponovljivo pročišćavanje RNK. Učeterostručene uzorke krvi od 14 davatelja ručno je obradio svaki od 3 tehničara pojedinačno (A, B, C). Upotrijebljena su tri kompleta opreme te su svi uzorci koje je pripremio jedan tehničar obrađeni s pomoću iste opreme. **[A]** Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije prinosa RNK po replikatima uzoraka istih davatelja, koje su obradili različiti tehničari. **[B]** 3 različita tehničara obradila su dvanaest replikata uzoraka krvi od svakoga od 14 davatelja. Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije prinosa RNK po uzorcima od istih davatelja, koje su obradili svi tehničari. Za sve RNK uzorke, omjeri A_{260}/A_{280} imali su raspon od 1,8 do 2,2.



Slika 7. Ponovljivost i obnovljivost prinosa RNK za različite rukovatelje i serije kompleta PAXgene Blood RNA Kit uz uporabu uzoraka krvi iz poola. Uzorci krvi od 30 različitih davatelja prikupljeni su u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 epruveta po davatelju, ukupno 360 epruveta). Sadržaj epruveta od 3 davatelja uključen je u pool i potom ponovno alikvotiran u 36 uzorka. Tih 36 uzoraka po poolu od 3 davatelja ručno su obradila 3 različita rukovatelja. Svaki je rukovatelj upotrijebio 3 različite serije kompleta PAXgene Blood RNA Kit za ekstrakciju i obradio učeterostručene uzorke iz svakog od 10 poolova davatelja. **[A]** Prinos RNK i standardna devijacija za svaku kombinaciju rukovatelj – serija. Učeterostručene uzorke krvi iz 10 poolova davatelja obradila su 3 različita rukovatelja (A, B, C) koristeći svaku od 3 serija kompleta (1, 2, 3). Prikazane su srednje vrijednosti (stupci) i standardne devijacije (trake s pogreškama) po učeterostručenom uzorku od istog davatelja za različite rukovatelje i različite serije kompleta. **[B]** CV prinosa RNK po poolu davatelja za sve kombinacije rukovatelj – serija (A, B, C; 1, 2, 3), izračunat iz srednje vrijednosti prinosa i standardne devijacije prinosa prikazan je na slici 7A.

Tablica 1A. Obnovljivost unutar svake serije i svakog korisnika za odabrane poolove davatelja (1, 6, 9, 10)

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

Tablica 1B. Obnovljivost unutar svakog korisnika i između svih serija za odabrane poolove davatelja (1, 6, 9, 10)

Kombinacija podataka	Pool davatelja 1 5,1 x 10 ⁶ stanica/ml			Pool davatelja 6 6,5 x 10 ⁶ stanica/ml		
	Srednji prinos (µg)	SD (µg)	CV (%)	Srednji prinos (µg)	SD (µg)	CV (%)
Korisnik A, sve serije	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Korisnik B, sve serije	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Korisnik C, sve serije	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombinacija podataka	Pool davatelja 9 8,4 x 10 ⁶ stanica/ml			Pool davatelja 10 10,2 x 10 ⁶ stanica/ml		
	Srednji prinos (µg)	SD (µg)	CV (%)	Srednji prinos (µg)	SD (µg)	CV (%)
Korisnik A, sve serije	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Korisnik B, sve serije	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Korisnik C, sve serije	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tablica 1C. Obnovljivost unutar svake serije i između svih korisnika za odabrane poolove davatelja (1, 6, 9, 10)

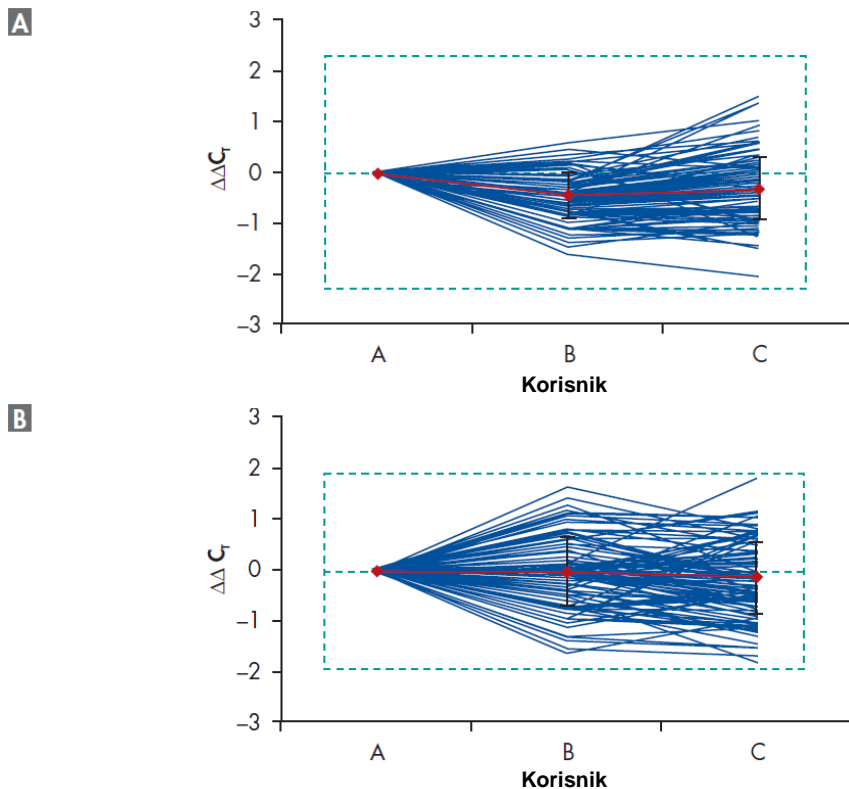
Kombinacija podataka	Pool davatelja 1 5,1 x 10 ⁶ stanica/ml			Pool davatelja 6 6,5 x 10 ⁶ stanica/ml		
	Srednji prinos (µg)	SD (µg)	CV (%)	Srednji prinos (µg)	SD (µg)	CV (%)
Serija 1, svi korisnici	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Serija 2, svi korisnici	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Serija 3, svi korisnici	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombinacija podataka	Pool davatelja 9 8,4 x 10 ⁶ stanica/ml			Pool davatelja 10 10,2 x 10 ⁶ stanica/ml		
	Srednji prinos (µg)	SD (µg)	CV (%)	Srednji prinos (µg)	SD (µg)	CV (%)
Serija 1, svi korisnici	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Serija 2, svi korisnici	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Serija 3, svi korisnici	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tablica 1D. Obnovljivost između svih serija i svih korisnika za odabrane poolove davatelja (1, 6, 9, 10)

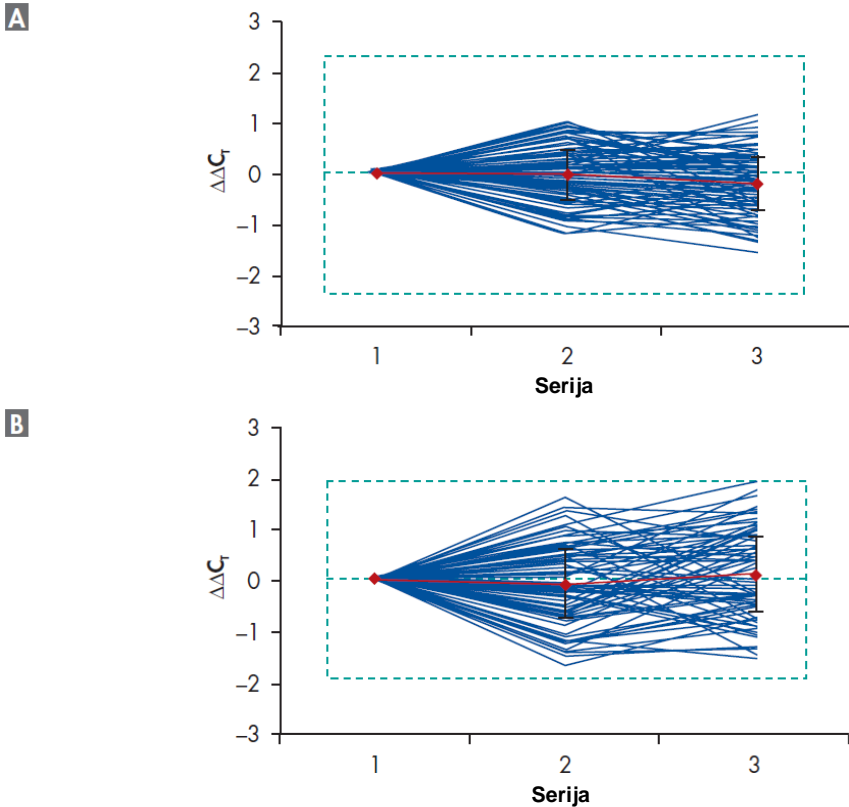
Kombinacija podataka	Pool davatelja 1 5,1 x 10 ⁶ stanica/ml			Pool davatelja 6 6,5 x 10 ⁶ stanica/ml		
	Srednji prinos (µg)	SD (µg)	CV (%)	Srednji prinos (µg)	SD (µg)	CV (%)
Serija 1, svi korisnici	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

Kombinacija podataka	Pool davatelja 9 8,4 x 10 ⁶ stanica/ml			Pool davatelja 10 10,2 x 10 ⁶ stanica/ml		
	Srednji prinos (µg)	SD (µg)	CV (%)	Srednji prinos (µg)	SD (µg)	CV (%)
Serija 1, svi korisnici	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detaljna analiza 4 reprezentativna poola davatelja. Poolovi su odabrani prema broju bijelih krvnih stanica i odražavaju visoke, srednje i niske vrijednosti normalnog raspona broja bijelih krvnih stanica ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocita/ml). Broj bijelih krvnih stanica predstavlja srednju vrijednost od 3 broja bijelih krvnih stanica od 3 davatelja po poolu davatelja.



Slika 8. Obnovljivost reakcije RT-PCR: između korisnika. Za real-time RT-PCR reakciju upotrijebljena je RNK pročišćena u eksperimentu opisanom na slici 7. Relativne razine transkripta gena **[A] FOS** i **[B] IL1B** određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Ucrtane su vrijednosti za sve uzorke, u odnosu na vrijednosti za korisnika A (10 poolova davatelja x 3 serije kompleta x 4 replikata uzoraka = 120 skupova podataka za svaki gen), sa srednjim vrijednostima (crvene linije) i standardnim devijacijama (crne trake) za sve prikazane uzorke. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times$ (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Slika 9. Obnovljivost reakcije RT-PCR: između serija kompleta. Za real-time RT-PCR reakciju upotrijebljena je RNK pročišćena u eksperimentu opisanom na slici 7. Relativne razine transkripta gena **[A] FOS** i **[B] IL1B** određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Ucrtane su vrijednosti za sve uzorke, u odnosu na vrijednosti za seriju kompleta 1 (10 poolova davatelja x 3 korisnika x 4 replikata uzoraka = 120 skupova podataka za svaki gen), sa srednjim vrijednostima (crvene linije) i standardnim devijacijama (crne trake) za sve prikazane uzorke. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times$ (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Tablica 2. Sažetak podataka o reakciji RT-PCR iz slika 8 i 9

Sustav testa	Ispitivanje FOS/18S rRNK		Ispitivanje IL1B/18S rRNK	
	Srednja vrijednost ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Srednja vrijednost ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Obnovljivost unutar svakog korisnika i između svih serija				
Svi korisnici, serija 1 – serija 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Svi korisnici, serija 1 – serija 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Svi korisnici, serija 1 – serija 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Obnovljivost unutar svakog korisnika i između svih serija				
Sve serije, korisnik A – korisnik A	0,00	0,00	0,00	0,00
Sve serije, korisnik A – korisnik B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Sve serije, korisnik A – korisnik C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Korisnik: tehničar koji je proveo ispitivanje.

Serija: broj serije kompleta koji se koristi u ovom ispitivanju.

SD: standardna devijacija.

Srednje vrijednosti $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) i standardne devijacije prikazane su za podatke prikazane na slikama 8 i 9.

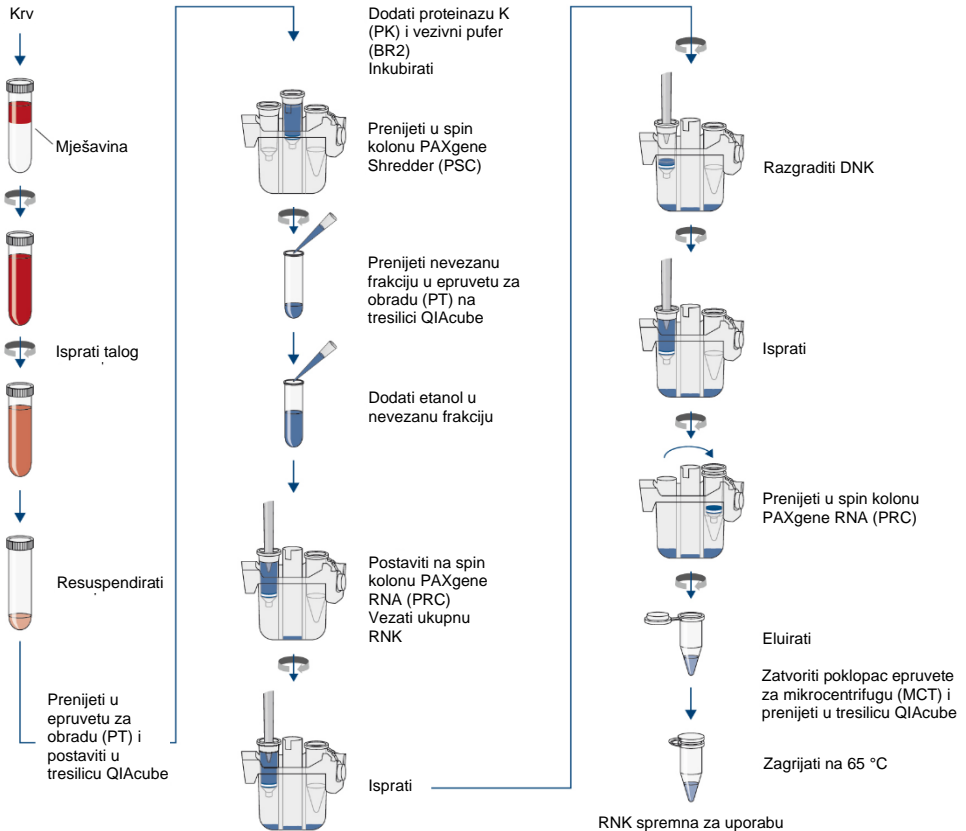
Automatizirano pročišćavanje RNK

Pročišćavanje RNK iz krvi automatizirano je na instrumentu QIAGEN QIAcube Connect MDx ili klasičnom instrumentu QIAGEN QIAcube (koji se u daljnjem tekstu naziva QIAcube). Inovativni instrumenti QIAcube koriste naprednu tehnologiju za obradu QIAGEN spin kolona, što omogućuje laku integraciju automatizirane pripreme uzoraka s niskom brzinom protoka u vaš laboratorijski tijek rada. Za pripremu uzoraka s pomoću instrumenata QIAcube koriste se isti koraci kao i u ručnom postupku (tj. liza, vezanje, ispiranje i eluiranje), što vam omogućuje nastavak korištenja kompleta PAXgene Blood RNA Kit za pročišćavanje visokokvalitetnog RNK.



Slika 10. QIAcube Connect MDx.

Protokol automatiziranog pročišćavanja RNK sastoji se od 2 dijela (ili protokola), „PAXgene Blood RNA Part A” i „PAXgene Blood RNA Part B” , uz kratku ručnu intervenciju između 2 dijela (pogledajte sliku 11, stranica 32).



Slika 11. Automatizirani postupak s pomoću sustava PAXgene Blood RNA.

Centrifugirani, isprani i resuspendirani talog nukleinske kiseline (pogledajte odjeljak „Koncentracija i pročišćavanje RNK”, stranica 20) prenosi se iz epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) u epruvete za obradu (PT), koje se postavljaju u jedinicu termotresilice na radnoj površini instrumenata QIAcube. Rukovatelj odabire i pokreće protokol „PAXgene Blood RNA Part A” iz izbornika. Instrumenti QIAcube izvode korake protokola do eluiranja RNK u puferu za eluiranje (BR5). Rukovatelj prenosi epruvete za mikrocentrifugu (MCT) koje sadržavaju pročišćenu RNK u jedinicu termotresilice instrumenata QIAcube. Rukovatelj odabire i pokreće protokol „PAXgene Blood RNA Part B” iz izbornika, a instrumenti QIAcube provode denaturaciju toplinom.

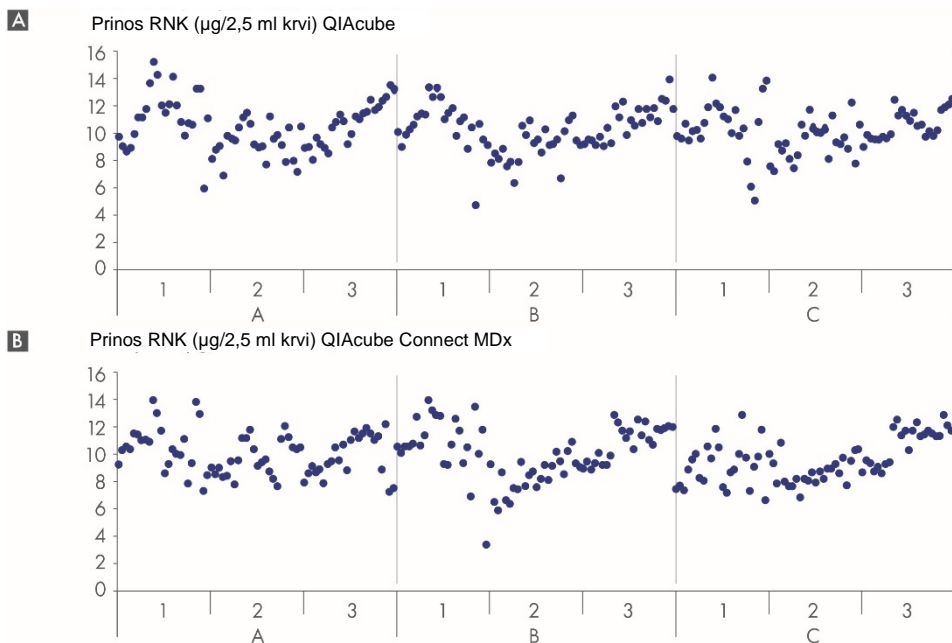
Prosječno vrijeme pripreme uzoraka (na temelju podataka iz 12 procesa pripreme uzoraka) je 151 minuta*, sa značajno manje vremena rada rukama u usporedbi s ručnim protokolom.

Prinosi RNK iz 2,5 ml zdrave ljudske pune krvi su $\geq 3 \mu\text{g}$ za $\geq 95 \%$ obrađenih uzoraka. Slika 12 (stranica 34) prikazuje prinose RNK iz ukupno 216 uzoraka pripremljenih s pomoću automatiziranog protokola s 3 serije kompleta koje su obradila 3 rukovatelja. Budući da su za ta ispitivanja upotrebljavani uzorci krvi iz poola umjesto pojedinačnih uzoraka iz epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rezultati ne odražavaju prinos RNK očekivan iz uzoraka dobivenih jednostrukim pojedinačnim prikupljanjem krvi. Budući da prinosi u velikoj mjeri ovise o davatelju, pojedinačni prinosi mogu varirati (slika 12, stranica 34).

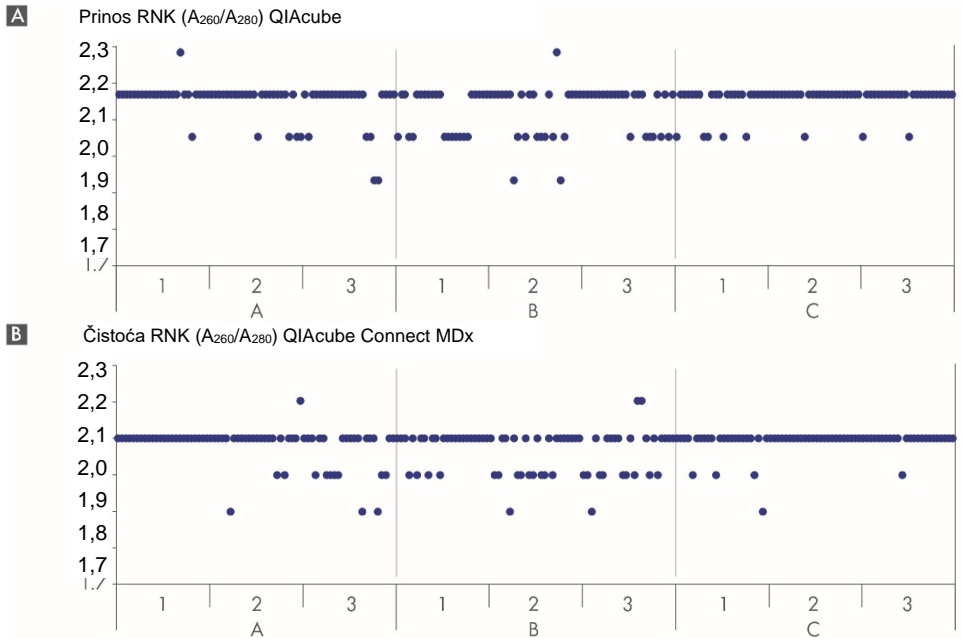
Barem 95 % uzoraka ne pokazuje inhibiciju u reakciji RT-PCR uz iskorištenje do 30 % eluata. Prilikom uporabe automatiziranog protokola križna kontaminacija između uzoraka ne može se detektirati, što je izmjereno kvantitativnom real-time RT-PCR reakcijom sekvenci transkriptata gena ABL1 i FOS u uzorcima negativnima na RNK (voda) u usporedbi s uzorcima pozitivnima na RNK (ljudska puna krv) u istom procesu.

RNK izolirana sustavom PAXgene Blood RNA System i automatiziranim protokolom je čista, što je dokazano nedostatkom inhibicije reakcije RT-PCR i vrijednostima A_{260}/A_{280} između 1,8 i 2,2. Genomska DNK je prisutna u količini od $\leq 1 \%$ (w/w) u $\geq 95 \%$ svih uzoraka, što je izmjereno kvantitativnom real-time PCR reakcijom sekvence gena beta-aktin. Slike 13 i 14 (stranice 35 i 36) pokazuju vrijednosti A_{260}/A_{280} i relativnu genomsku DNK iz ukupno 216 uzoraka pripremljenih s pomoću automatiziranog protokola s 3 serije kompleta koje su obradila 3 rukovatelja.

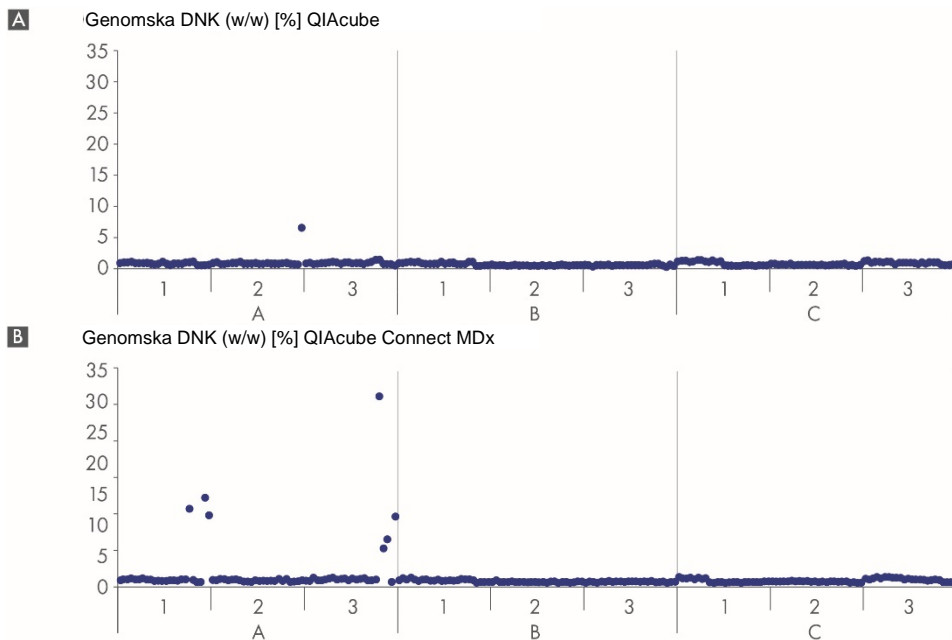
* Ukupno vrijeme trajanja protokola, uključujući unaprijed obavljeno rukovanje epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugiranje, ispiranje taloga i resuspendiranje taloga).



Slika 12. Prinos RNK — automatizirana obrada A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Krvni uzorci pojedinačnih davatelja prikupljeni su u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Sadržaj epruveta uključen je u 6 poolova davatelja i naknadno ponovno alikvotiran. Ukupno 216 epruveta (odnosno 36 po poolu) obradila su 3 različita rukovatelja (A, B, C). Svaki je rukovatelj upotrijebio 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit za automatiziranu ekstrakciju na više instrumenata QIAcube i QIAcube Connect MDx i obradio učeterostručene uzorke iz svakog od 6 poolova davatelja. Za svaku kombinaciju rukovatelj – serija prikazani su prinosi RNK svih individualnih uzoraka.

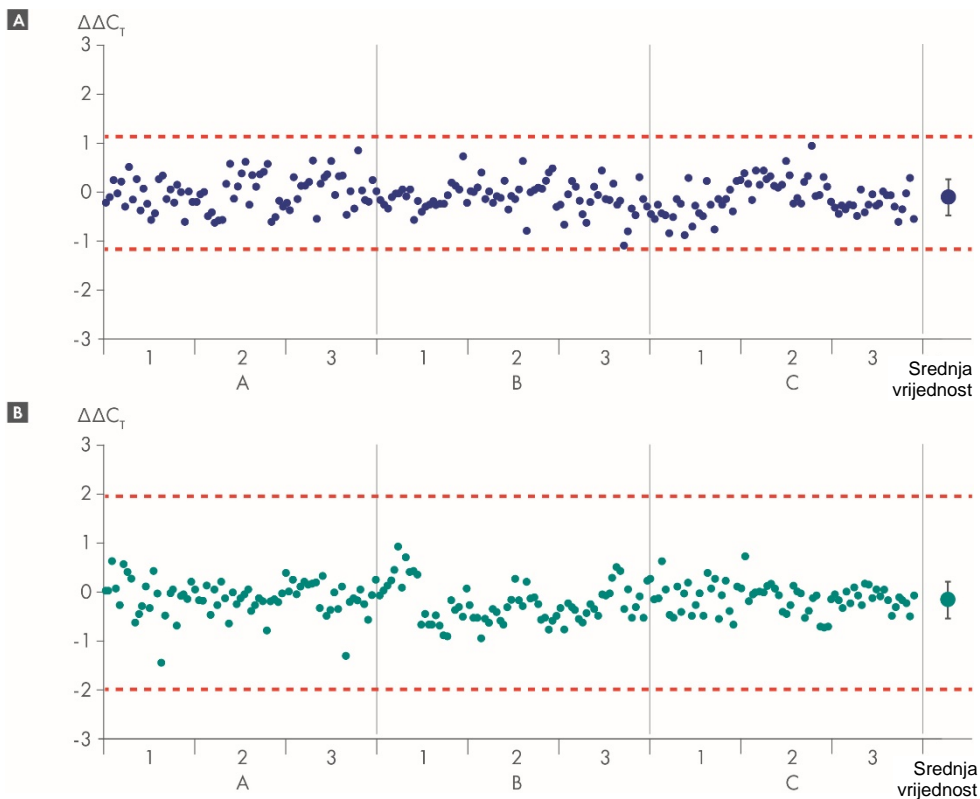


Slika 13. Čistoća RNK (vrijednosti A_{260}/A_{280}): automatizirana obrada. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx
 RNK su pročistila 3 različita rukovatelja (A, B, C) koristeći 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit na više instrumenata QIAcube i QIAcube Connect MDx u eksperimentu opisanom na slici 12. Za svaku kombinaciju rukovatelj – serija prikazane su vrijednosti A_{260}/A_{280} za sve pojedinačne uzorke.

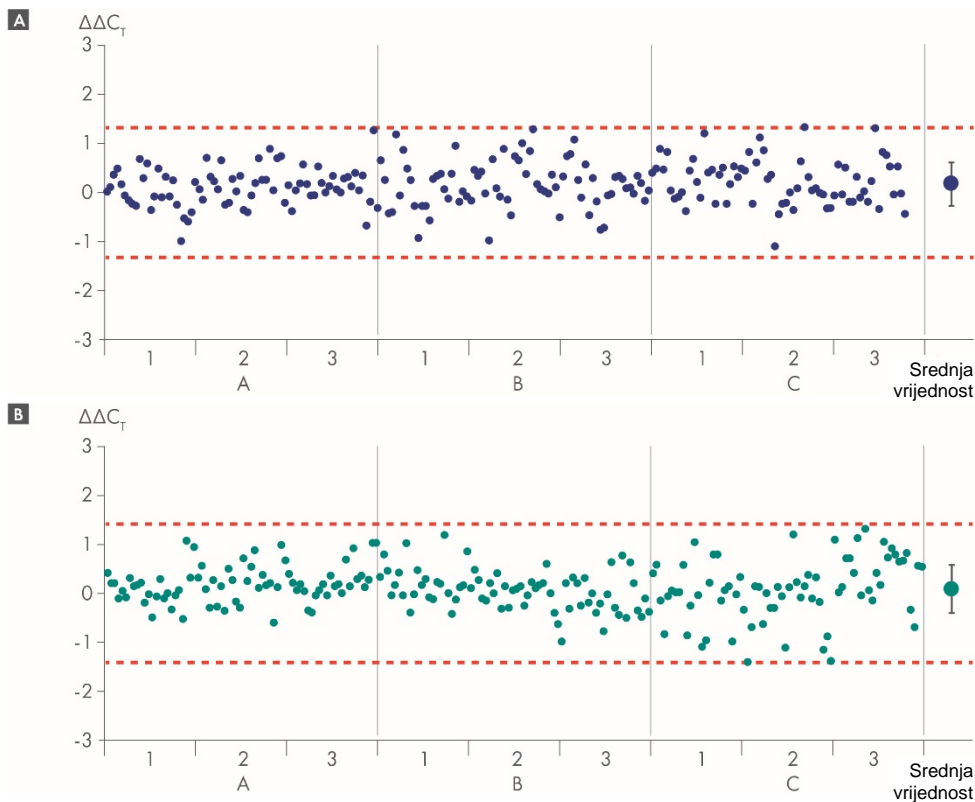


Slika 14. Čistoća RNK (% kontaminacije genomskom DNK) — automatizirana obrada, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. RNK su pročištila 3 različita rukovatelja (A, B, C) koristeći 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit na više instrumenata QIAcube i QIAcube Connect MDx u eksperimentu opisanom na slici 12. Za svaku kombinaciju rukovatelj – serija prikazane su količine genomske DNK (w/w) u svim pojedinačnim uzorcima.

Automatizirani protokol pročišćavanja RNK s pomoću sustava PAXgene Blood RNA System pruža visoko ponovljive rezultate reakcije RT-PCR, kako je prikazano na slici 15 i slici 16 (stranica 37 i 38), što ga čini vrlo učinkovitim za klinička dijagnostička ispitivanja.



Slika 15. Obnovljivost reakcije RT-PCR: između automatiziranih (QIAcube) i ručnih protokola. RNK su pročištila 3 različita rukovatelja (A, B, C) koristeći 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit na više instrumenata QIAcube i QIAcube Connect MDx s pomoću automatiziranog protokola u eksperimentu opisanom na slici 12. Usporedno s time, RNK je pročišćena iz odgovarajućih epruveta s replikatima uzoraka s pomoću ručnog protokola. Relativne razine transkripta gena **[A] FOS** i **[B] IL1B** određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Moguće razlike u razinama transkripata između RNK pripremljene iz uparenih uzoraka krvi uz uporabu oba protokola ekstrakcije (automatiziranog i ručnog protokola) izračunate su metodom $\Delta\Delta C_T$. Pojedinačne vrijednosti $\Delta\Delta C_T$ za sve parove uzoraka (4 replikata uzoraka x 6 poolova davatelja x 3 serije kompleta x 3 rukovatelja = 216 parova za svaki gen) ucrtane su kao jednostruke točke sa srednjim vrijednostima (veće točke) i standardnim devijacijama (crne trake) za sve prikazane uzorke. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times$ (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; različite preciznosti ispitivanja u usporedbi sa slikama 1 – 4, 8 i 9 zbog različitih verzija ispitivanja).



Slika 16. Obnovljivost reakcije RT-PCR: između instrumenta QIAcube i QIAcube Connect MDx s pomoću automatiziranog protokola. RNK su pročištila 3 različita rukovatelja (A, B, C) koristeći 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit s pomoću automatiziranog protokola na više instrumenata QIAcube i QIAcube Connect MDx u eksperimentu opisanom na slici 12. Relativne razine transkripta gena **[A]** FOS i **[B]** IL1B određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Moguće razlike u razinama transkripta između RNK pripremljene iz uparenih uzoraka krvi uz uporabu oba instrumenta izračunate su metodom $\Delta\Delta C_T$. Pojedinačne vrijednosti $\Delta\Delta C_T$ za sve parove uzoraka (4 replikata uzoraka x 6 poolova davatelja x 3 serije kompleta x 3 rukovatelja = 216 parova za svaki gen) ucrtane su kao jednostruke točke sa srednjim vrijednostima (veće točke) i standardnim devijacijama (crne trake) za sve prikazane uzorke. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times$ (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; različite preciznosti ispitivanja u usporedbi sa slikama 1 – 4, 8, 9 i 15 zbog različitih verzija ispitivanja).

Oprema i reagensi koje isporučuje korisnik

Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Za sve protokole

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; kat. br. 762165)
- Etanol (96 – 100-postotni, razred čistoće p.a.)
- Pipete* (10 µl – 4 ml)
- Sterilni vrhovi pipeta, s barijerom protiv aerosola, bez RNaze[†]
- Menzura[‡]
- Centrifuga* sposobna doseći 3000 – 5000 x g te opremljena rotorom s njišućim vjedrima za postavljanje epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Vorteks miješalica*
- Zdrobljeni led
- Trajni marker za označavanje

Za ručni protokol

- Mikrocentrifuga s varijabilnom brzinom sposobna doseći raspon od najmanje 1000 – 8000 x g, iako su primjenjive i niže i više gravitacijske sile (pogledajte korake protokola za više informacija) te opremljena rotorom za epruvete za mikrocentrifugu od 2 ml

* Provjerite jesu li uređaji i instrumenti redovito pregledavani, održavani i kalibrirani prema preporuci proizvođača.

[†] Provjerite jeste li upoznati sa smjernicama o rukovanju RNK (Dodatak A, stranica 75).

[‡] Za dodavanje etanola u koncentrat pufera BR4.

- Tresilica-inkubator* sposobna za inkubaciju pri 55 °C i 65 °C i trešnju pri ≥ 400 o/min, ne prelazeći 1400 o/min (primjerice, termomiješalica Compact, Eppendorf® ili slična)

Za automatizirani protokol (s pomoću instrumenta QIAcube ili QIAcube Connect MDx)

- Škare

Potrošni materijal za instrumente QIAcube:

- Filter-Tips, 1000 μ l (1024) (QIAGEN, kat. br. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, kat. br. 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, kat. br. 990394)†

Dodatna oprema za instrumente QIAcube:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, kat. br. 990392)†

Za automatizirani protokol s pomoću instrumenta QIAcube Connect MDx

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

Servisni kompleti za QIAcube Connect MDx:

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

* Provjerite jesu li uređaji i instrumenti redovito pregledavani, održavani i kalibrirani prema preporuci proizvođača.

† Uključen i u Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. br. 990395).

Za automatizirani protokol s pomočjo instrumenta QIAcube

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

* Provjerite jesu li uređaji i instrumenti redovito pregledavani, održavani i kalibrirani prema preporuci proizvođača.

Važne napomene

Upotreba instrumenata QIAcube

Provjerite jeste li upoznati s radom instrumenta QIAcube. Pročitajte odgovarajući Korisnički priručnik za instrument QIAcube i sve dodatne informacije isporučene s instrumentom QIAcube, obrađujući posebnu pozornost na sigurnosne informacije, prije početka uporabe automatiziranih protokola s pomoću PAXgene Blood RNA.

Upute u tom odjeljku odnose se na QIAcube Connect MDx i QIAcube ako nisu navedeni zasebno.

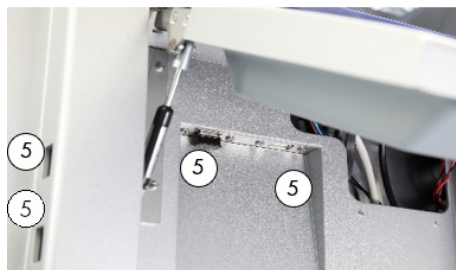
Pokretanje instrumenata QIAcube

Zatvorite poklopac instrumenta QIAcube i uključite instrument QIAcube sklopkom za napajanje (QIAcube Connect MDx: pogledajte sliku 17, stranica 43; QIAcube: slika 18, stranica 44).

Oglašava se zvučni signal i pojavljuje se zaslon pokretanja. Instrument automatski izvodi početna testiranja.



Prednji prikaz instrumenta QIAcube Connect MDx



Izvučeni dodirni zaslon



Pogled straga na instrument QIAcube Connect MDx



Pogled straga na instrument QIAcube Connect MDx

Slika 17. Vanjske značajke instrumenta QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|--|
| <p>1 Dodirni zaslon</p> <p>2 Poklopac</p> <p>3 Ladica za otpad</p> <p>4 Sklopka za napajanje</p> | <p>5 2 USB priključka s lijeve strane dodirnog zaslona; 2 USB priključka iza dodirnog zaslona (Wi-Fi modul ukopčan je u 1 USB priključak)</p> <p>6 Ethernet priključak RJ-45</p> <p>7 Utičnica za kabel napajanje</p> <p>8 Otvori za izlaz zraka za hlađenje</p> |
|--|--|



Slika 18. Prednji prikaz instrumenta QIAcube.

- | | | | |
|---|--|---|-----------------------------------|
| 1 | Dodirni zaslon | 4 | USB priključak iza zaštitne ploče |
| 2 | Poklopac | 5 | Sklopka za napajanje |
| 3 | Serijski priključak RS232 iza zaštitne ploče (smiju ga upotrebljavati samo stručnjaci za servis instrumenata društva QIAGEN) | 6 | Ladica za otpad |

Dodirni zaslon

Instrumentima QIAcube upravljaju se pomoću dodirnog zaslona. Dodirni zaslon korisniku omogućuje rukovanje instrumentom i vodi ga kroz postavljanje radne površine. Tijekom obrade uzorka na dodirnom zaslonu prikazuje se status protokola i preostalo vrijeme.



Slika 19. Izvučeni dodirni zaslon instrumenta QIAcube Connect MDx

Instaliranje protokola na instrumente QIAcube

Prvotno instaliranje protokola može biti potrebno prije nego što se može izvesti prvi proces pripreme RNK na instrumentima QIAcube. Instalirajte oba protokola „PAXgene Blood RNA Part A” i „PAXgene Blood RNA Part B”.

Protokolima za instrument QIAcube Connect MDx moguće je pristupiti na **www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources** (www.qiagen.com/MyQIAcube za QIAcube) i moraju se preuzeti na USB štapić isporučen uz instrumente QIAcube. Ti se protokoli prenose na instrument putem USB priključka.

USB priključak (QIAcube Connect MDx: s bočne strane dodirnog zaslona, pogledajte sliku 17, stranica 43; QIAcube: iza zaštitne ploče, pogledajte sliku 18, stranica 44) omogućava priključivanje instrumenata QIAcube na USB štapić isporučen s instrumentima QIAcube. Podatkovne datoteke, primjerice datoteke zapisa ili datoteke izvješća, također se mogu prenositi s instrumenata QIAcube na USB štapić putem USB priključka.



USB priključak namijenjen je samo za uporabu uz USB štapić koji isporučuje društvo QIAGEN. Ne priključujte druge uređaje na ovaj priključak.



Ne uklanjajte USB štapić dok je u tijeku preuzimanje protokola ili prijenos podatkovnih datoteka ili tijekom izvođenja protokola.




Dodatne podatke o postupku prijenosa protokola na instrumente QIAcube potražite u povezanim priručnicima za korišteni instrument.

Punjenje instrumenata QIAcube

Radi uštede vremena punjenje se može izvesti tijekom jednog ili oba koraka centrifuge u trajanju od 10 minuta (koraci 3 i 5) u „Protokol: automatizirano pročišćavanje ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)”, stranica 65.

Bočice za reagense

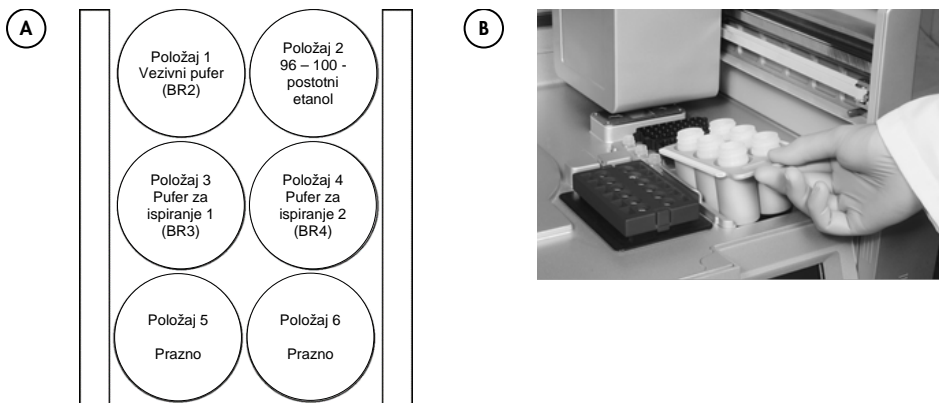
Prije svakog procesa na instrumentu QIAcube pažljivo napunite 4 bočice za reagense reagensima navedenima u tablici 3 (stranica 47) do maksimalne razine indikatora ili, ako to nije moguće, do razine koju dopuštaju volumeni pufera isporučeni u kompletu PAXgene Blood RNA Kit. Jasno označite bočice i poklopce nazivima pufera i postavite napunjene bočice za reagense u odgovarajuće položaje na nosaču za bočice za reagense. Postavite nosač na radnu površinu instrumenta QIAcube kako je prikazano (slike 20 – 22, stranice 48 – 50).

-  Isporučeni volumen pufera BR2 neće napuniti bočicu za reagense do razine indikatora. Puferi BR3 i BR4 možda neće napuniti bočicu do razine indikatora nakon obrade više uzoraka u prethodnim procesima.
-  Pobrinite se da ste uklonili poklopce s bočica prije postavljanja na radnu površinu.
-  Volumeni pufera isporučeni u kompletu PAXgene Blood RNA Kit (50) dovoljni su za najviše 7 procesa pripreme RNK na instrumentu QIAcube, s 2 do 12 uzoraka po procesu. Proces s nižim brojem uzoraka općenito se trebaju izbjegavati kako bi se moglo obraditi ukupno 50 uzoraka po kompletu uz najviše 7 procesa pripreme RNK. Više od 7 procesa pripreme RNK može dovesti do nedovoljnih volumena pufera za obradu posljednjih uzoraka.

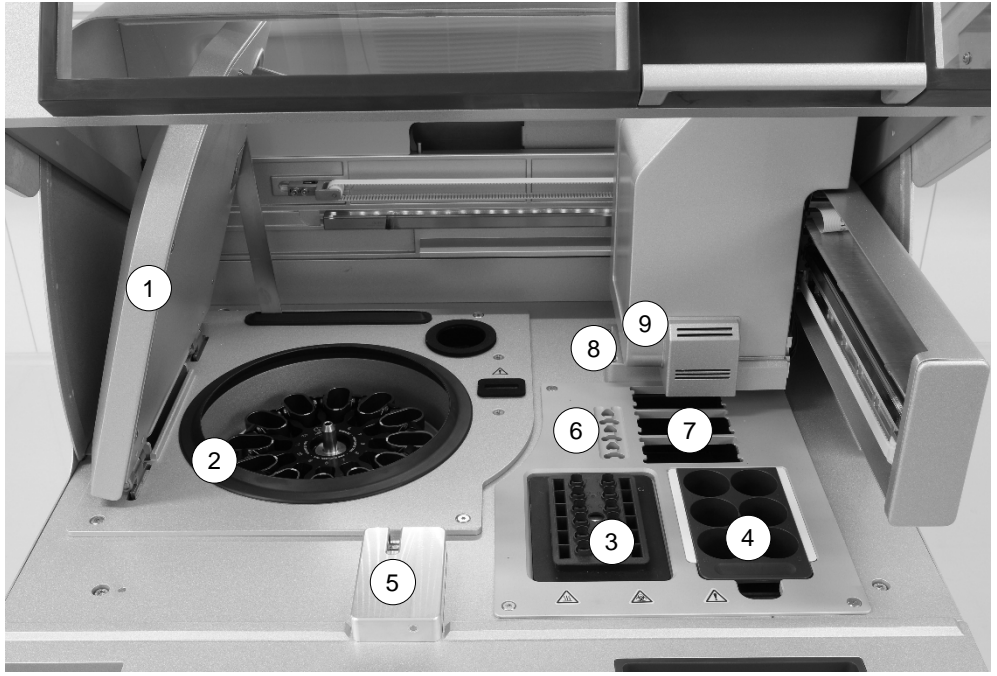
Tablica 3. Položaji na nosaču za bočice za reagense

Položaj	Reagens
1	Veživni pufer (BR2)
2	96 – 100-postotni etanol
3	Pufer za ispiranje 1 (BR3)
4	Pufer za ispiranje 2 (BR4)*
5	– (ostaviti prazno)
6	– (ostaviti prazno)

* Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodajte 4 volumena etanola (96 – 100-postotni, razred čistoće p.a.), kako je naznačeno na bočici, za dobivanje radne otopine.

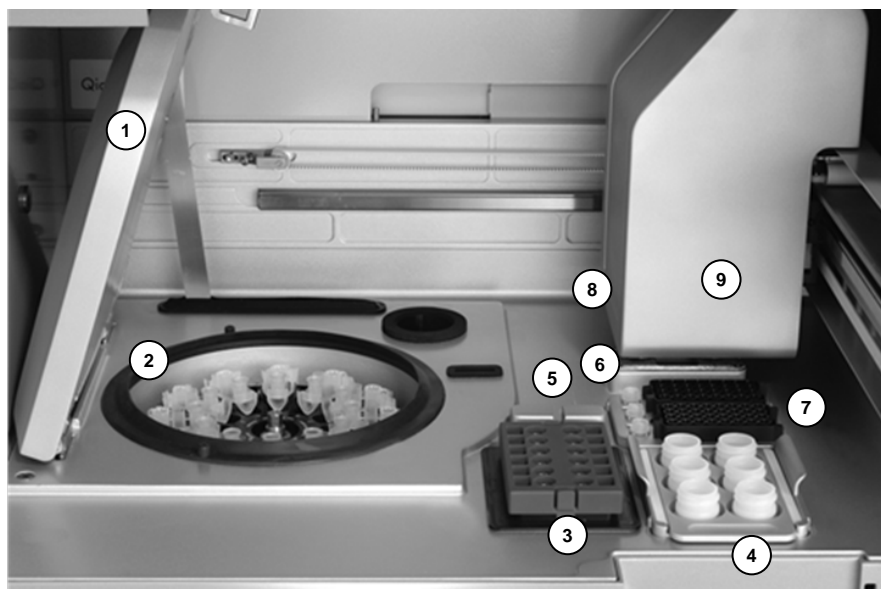


Slika 20. Punjenje nosača za bočice za reagense. [A] Shema položaja i sadržaja bočica u nosaču za bočice za reagense. [B] Postavljanje nosača u instrument QIAcube (kao primjer prikazan je QIAcube).



Slika 21. Unutarnji prikaz instrumenta QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|---|
| <p>1 Poklopac centrifuge</p> <p>2 Centrifuga</p> <p>3 Tresilica</p> <p>4 Nosač za bočice za reagense</p> <p>5 Senzor za vrhove i brava poklopca</p> | <p>6 Utori za epruvete za mikrocentrifugu</p> <p>7 3 utora za nosače vrhova</p> <p>8 Utori za zbrinjavanje za vrhove i kolone</p> <p>9 Robotska ruka (uključuje 1-kanalnu pipetu, hvataljku, ultrazvučni i optički senzor i UV LED)</p> |
|---|---|



Slika 22. Unutarnji prikaz instrumenta QIAcube.

- | | |
|--|---|
| <p>1 Poklopac centrifuge</p> <p>2 Centrifuga</p> <p>3 Tresilica</p> <p>4 Nosač za bočice za reagense</p> <p>5 Senzor za vrhove</p> | <p>6 Utori za epruvete za mikrocentrifugu</p> <p>7 Nosači vrhova</p> <p>8 Utori za zbrinjavanje za vrhove i kolone</p> <p>9 Robotska ruka</p> |
|--|---|

Spin kolone (PRC, PSC), epruvete za mikrocentrifugu (MCT) i plastični pribor za instrumente QIAcube

Postavite 2 nosača vrhova ispunjena vrhovima s filtrom od 1000 µl na instrument QIAcube (pogledajte slike 21 i 22, stranice 49 i 50). Ponovno napunite nosače vrhovima kada je to potrebno.



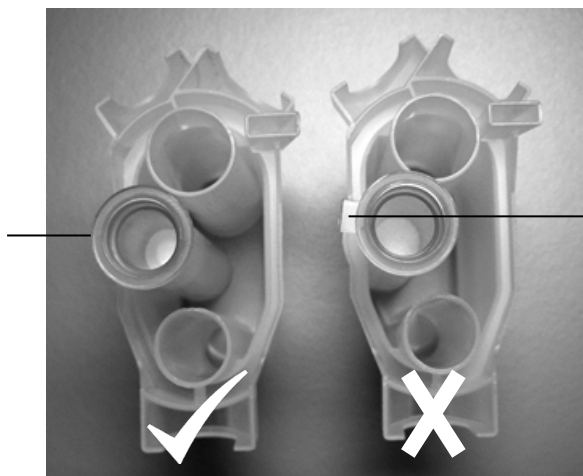
Upotrebjavajte samo vrhove s filtrom od 1000 µl koji su namijenjeni uporabi s instrumentima QIAcube.

Označite adaptere rotora i epruvete za mikrocentrifugu (MCT) za svaki uzorak s pomoću trajnog markera. Otvorite spin kolone PAXgene Shredder (PSC) za uporabu te potpuno odrežite poklopce škarama (pogledajte sliku 23, stranica 51).



Kako biste omogućili propisan rad robotske hvataljke instrumenata QIAcube, potpuno odstranite (odrežite) poklopce i sve plastične dijelove koji povezuju poklopac sa spin kolonama PAXgene Shredder (PSC; pogledajte sliku 23). U suprotnom, robotska hvataljka ne može propisno uhvatiti spin kolone (PSC, PRC).

Poklopac kolone ispravno uklonjen



Poklopac kolone neispravno uklonjen; dio poklopca i dalje pričvršćen

Slika 23. Postavljanje spin kolone PAXgene Shredder (PSC). Spin kolona PAXgene Shredder (PSC) postavljena je u srednji položaj adaptera rotora. Odrežite poklopac prije postavljanja kolone.

Postavite spin kolonu PAXgene RNA (PRC), spin kolonu PAXgene Shredder (PSC, bez poklopca, pogledajte sliku 23, stranica 51) i označenu epruvetu za mikrocentrifugu u odgovarajuće položaje u svakom označenom adapteru rotora, kako je prikazano u tablici 4 i na slici 24.

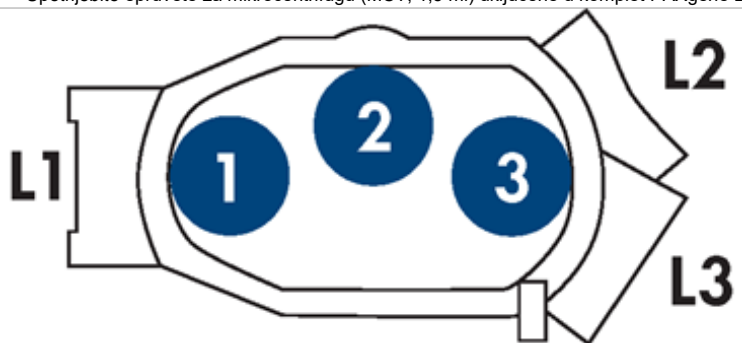


Pobrinite se da su poklopci spin kolone (PRC) i epruvete za mikrocentrifugu (MCT) pogurnuti sve do dna utora na rubu adaptera rotora jer će u se u suprotnom poklopci odlomiti tijekom centrifugiranja.

Tablica 4. Laboratorijski proizvodi u adapteru rotora

Položaj	Reagens	Položaj poklopca
1	Spin kolona PAXgene RNA (crvena, PRC)	L1
2	Spin kolona PAXgene Shredder (ljubičasta, PSC) (odrežite poklopac prije postavljanja u adapter rotora)	–
3	Epruveta za mikrocentrifugu (MCT)*	L3

* Upotrijebite epruvete za mikrocentrifugu (MCT; 1,5 ml) uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit.



Slika 24. Položaji na adapteru rotora. Adapter rotora ima tri položaja za epruvete (1 – 3) i tri položaja za poklopce (L1 – L3).

Punjenje centrifuge

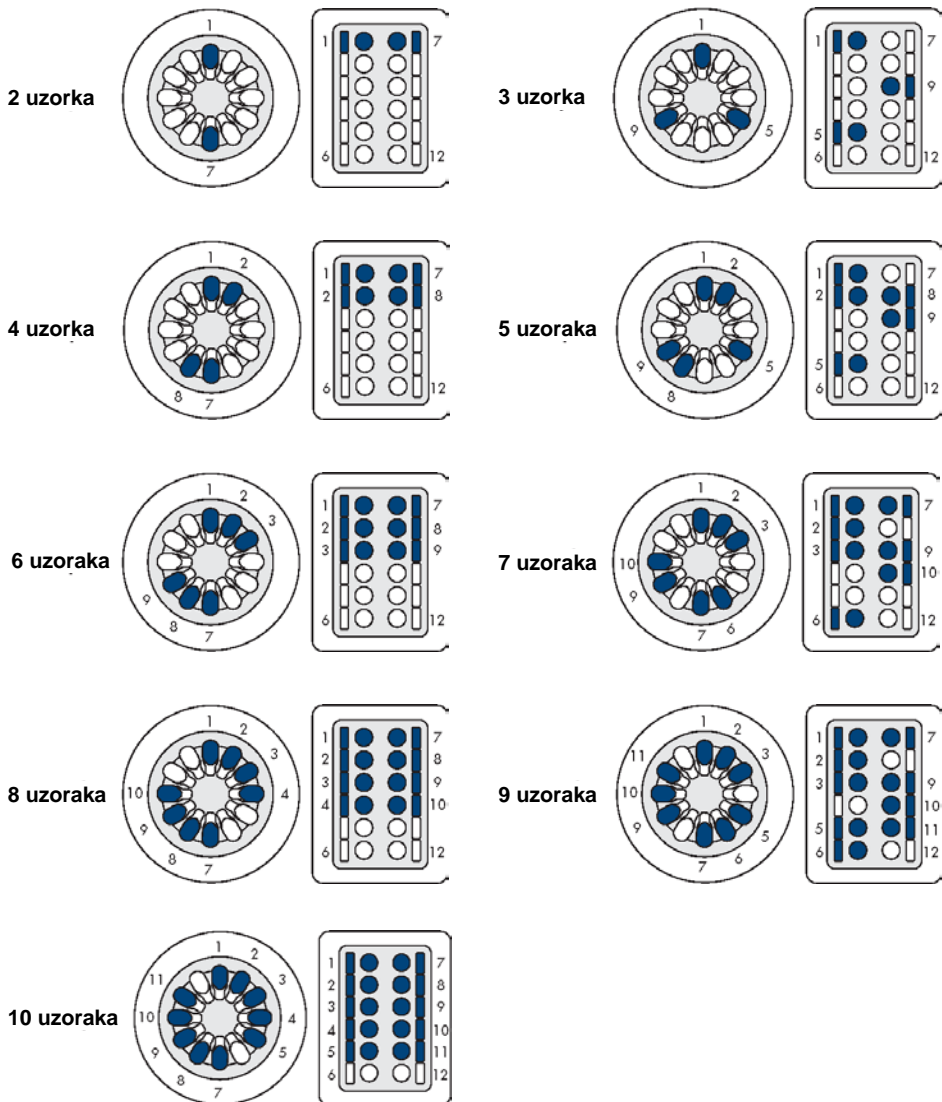
Postavite sastavljene adaptore rotora u vjedra centrifuge kako je prikazano na slici 25 u nastavku.



Ako obrađujete manje od 12 uzoraka, pobrinite se da rasporedite uzorke kako bi rotor centrifuge bio ravnomjerno opterećen radijalno (pogledajte sliku 26, stranica 54). Sva vjedra centrifuge moraju biti montirana prije pokretanja procesa protokola, čak i u slučaju kada se obrađuje manje od 12 uzoraka. Jedan ili 11 uzoraka ne mogu se obrađivati.



Slika 25. Punjenje centrifuge na instrumentima QIAcube. Postavite sastavljene adaptore rotora u vjedra centrifuge (kao primjer prikazan je QIAcube Connect MDx).



Slika 26. Punjenje centrifuge i tresilice. Prikazani su položaji centrifuge i tresilice za obradu od dva (2) do deset (10) uzoraka. Jedan (1) ili 11 uzoraka ne mogu se obrađivati. U slučaju obrade 12 uzoraka svi su položaji centrifuge i tresilice popunjeni (slika nije prikazana).

Epruvete za obradu (PT)

Uklonite epruvete za obradu (PT) preostale u utorima za epruvete za mikrocentrifugu iz prethodnih procesa (QIAcube Connect MDx: pogledajte sliku 21, stranica 49, QIAcube: pogledajte sliku 22, page 50). Napunite 3 epruvete za obradu (PT) količinom reagensa navedenom u tablici 5 prema broju uzoraka u procesu.

Za mješavinu za inkubaciju DNaze I, pipetirajte naznačeni volumen pufera za razgradnju DNK (RDD) u epruvetu za obradu (PT) i dodajte naznačeni volumen temeljne standardne otopine DNaze I (RNFD). Miješajte nježno pipetirajući cijelu mješavinu gore i dolje 3 puta uz uporabu vrha pipete od 1000 µl.

Upotrijebite epruvete za obradu (PT) od 2 ml uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit. Jasno označite epruvete nazivima reagensa i postavite ih u odgovarajući položaj na utorima za epruvete za mikrocentrifugu, kako je naznačeno u tablici 6 (stranica 56).



DNaza I (RNFD) je posebno osjetljiva na fizičku denaturaciju. Miješajte samo pipetiranjem, s pomoću širokih vrhova pipete, kako bi se smanjila fragmentacija. Ne miješajte vorteks miješalicom.



Pipetirajte samo potreban volumen, kako je naznačeno u tablici 5 u nastavku.

Tablica 5. Volumen reagensa potreban u epruvetama za obradu za utore epruveta za mikrocentrifugu.

Broj uzoraka	Volumen reagensa za naznačeni broj uzoraka (µl)		
	Proteinaza K (PK)	Mješavina za inkubaciju DNaze I	Pufer za eluiranje (BR5)
2	126	187 (23 DNaze I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNaze I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNaze I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNaze I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNaze I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNaze I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNaze I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNaze I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNaze I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNaze I + 806 Buffer RDD)	1177

Tablica 6. Utori za epruvete za mikrocentrifugu

	Položaj		
	A	B	C
Područje	Proteinaza K	Mješavina za inkubaciju DNaze I	Pufer za eluiranje (BR5)
Posuda	Epruveta za obradu (PT)*	Epruveta za obradu (PT)*	Epruveta za obradu (PT)*

* Upotrijebite epruvete za obradu od 2 ml uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit.

Protokol: ručno pročišćavanje ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Važne točke prije započinjanja

- Provjerite je li kutija kompleta netaknuta i neoštećena te potvrdite da puferi nisu iscurili. Ne upotrebljavajte oštećeni komplet.
- Prilikom uporabe pipete provjerite je li pipeta postavljena na točan volumen te je li tekućina pažljivo i potpuno aspirirana i dispenzirana.
- Kako biste izbjegli prenošenje uzoraka u pogrešnu epruветu ili spin kolonu, pobrinite se da su sve epruветe i spin kolone propisno označene s pomoću trajnog markera. Označite poklopac i tijelo svake epruветe (PT, MCT). Za spin kolone, označite tijelo epruветe za obradu (PT). Zatvorite svaku epruветu ili spin kolonu nakon što se u njih prenese tekućina.
- Prolijevanja uzoraka i pufera tijekom postupka mogu smanjiti prinos i čistoću RNK.
- Osim ako je drugačije naznačeno, svi koraci u ovom protokolu, uključujući korake centrifugiranja, trebaju se provesti pri sobnoj temperaturi (15 – 25 °C).

Zbog osjetljivosti tehnologija amplifikacije nukleinske kiseline, potrebno je poduzeti sljedeće mjere opreza prilikom rukovanja uzorcima kako bi se izbjegla križna kontaminacija:

- Pažljivo pipetirajte uzorak u spin kolonu (PRC, PSC) bez navlaživanja ruba kolone.
- Uvijek promijenite vrhove pipeta između dva prijenosa tekućina. Upotrijebite vrhove pipeta s barijerom protiv aerosola.
- Izbjegnite dodirivanje membrane spin kolone (PRC, PSC) vrhom pipete.

- Nakon miješanja vorteks miješalicom ili zagrijavanja epruvete za mikrocentrifugu (MCT) kratko je centrifugirajte kako biste uklonili kapljice s unutrašnje strane poklopca.
- Tijekom cijelog postupka nosite rukavice. U slučaju dodira između rukavica i uzorka, odmah promijenite rukavice.
- Zatvorite spin kolonu (PRC, PSC) prije nego što je postavite u mikrocentrifugu. Centrifugirajte prema opisanom u postupku.
- Otvorite samo jednu po jednu spin kolonu (PRC, PSC) i izbjegavajte stvaranje aerosola.
- Za učinkovitu paralelnu obradu više uzoraka, napunite nosač epruvetama za obradu (PT) u koje se spin kolone (PRC, PSC) mogu prenijeti nakon centrifugiranja. Zbrinite iskorištene epruvete za obradu (PT) koje sadržavaju nevezanu frakciju te postavite nove epruvete za obradu (PT) koje sadržavaju spin kolone (PRC, PSC) izravno u mikrocentrifugu.

Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Krv se mora prikupiti u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) prema uputama u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*. Ako je potrebno, pogledajte Dodatak C (stranica 78) za preporuke o rukovanju epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Pobrinite se da su epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubirane najmanje 2 sata pri sobnoj temperaturi nakon prikupljanja krvi kako bi se osigurala potpuna liza krvnih stanica. Inkubacija epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) preko noći može povećati prinose. Ako je epruveta PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pohranjena na temperaturama od 2 – 8 °C, -20 °C ili -70 °C nakon prikupljanja krvi, prvo joj prilagodite temperaturu sobnoj temperaturi i potom je pohranite na sobnoj temperaturi 2 sata prije početka postupka.
- Pročitajte sigurnosne informacije na stranici 10.
- Pročitajte smjernice o rukovanju s RNK (Dodatak A, stranica 75).
- Pobrinite se da su instrumenti, poput pipeta i tresilice-inkubatora, redovito pregledavani i kalibrirani u skladu s preporukama proizvođača.

- Tresilica-inkubator potreban je u koracima 5 i 20. Postavite temperaturu tresilice-inkubatora na 55 °C.
- Vezivni pufer (BR2) može u pohrani stvoriti precipitat. Ako je potrebno, zagrijte ga na 37 °C kako bi se precipitat razgradio.
- Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodajte 4 volumena etanola (96 – 100-postotni, razred čistoće p.a.), kako je naznačeno na bočici, za dobivanje radne otopine.
- Ako prvi puta upotrebljavate RNase-Free DNase Set, pripremite temeljnu standardnu otopinu DNaze I. Otopite krutu DNazu I (RNFD; 1500 Kunitz jedinica)* u 550 µl pufera za resuspendiranje DNaze (DRB) koji je isporučen s kompletom. Obratite pažnju na to da se nijedan dio DNaze (RNFD) ne izgubi prilikom otvaranja bočice. Rekonstituiranu DNazu I (RNFD) nemojte miješati vorteks miješalicom. DNaza I je posebno osjetljiva na fizičku denaturaciju. Miješanje se mora obavljati samo nježnim preokretanjem bočice.
- Prema trenutačno poznatim podacima rekonstituirana DNaza I (RNFD) može se pohraniti pri 2 – 8 °C do 6 tjedana. Za dugotrajnu pohranu DNaze I (RNFD) uklonite temeljnu standardnu otopinu iz staklene bočice, podijelite je u jednokratne alikvote (upotrijebite epruvete za mikrocentrifugu [MCT] od 1,5 ml isporučene s kompletom; dovoljno ih je za 5 alikvota) i pohranite ih pri -20 °C do 9 mjeseci. Odmrznuti alikvoti mogu se pohraniti pri 2 – 8 °C do 6 tjedana. Nakon odmrzavanja nemojte ponovno zamrzavati alikvote.
- Prilikom rekonstituiranja i alikvotiranja DNaze I (RNFD) pobrinite se da slijedite smjernice za rukovanje s RNK (Dodatak A, stranica 75).

* Kunitz jedinice upotrebljavaju se za mjerenje DNaze I te se definiraju kao količina DNaze I koja uzrokuje povećanje u A_{260} od 0,001 po minuti po mililitru pri 25 °C, pH 5,0, s visoko polimeriziranom DNK kao supstratom (Kunitz, M. (1950.) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

Postupak

1. Centrifugirajte epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom 10 minuta pri 3000 – 5000 x g s pomoću rotora s njišućim vjedrima.



Pobrinite se da je uzorak krvi inkubiran u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom najmanje 2 sata pri sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) kako bi se postigla potpuna liza krvnih stanica.



Rotor mora sadržavati adaptere za epruvete sa zaobljenim dnom. Ako se upotrebljavaju druge vrste adaptera za epruvete, epruvete mogu puknuti tijekom centrifugiranja.

2. Uklonite supernatant pretakanjem ili pipetiranjem. Dodajte 4 ml vode bez RNaze (RNFW) u talog i zatvorite epruvetu novim sekundarnim poklopcem BD Hemogard (isporučen s kompletom).

Ako je supernatant pretočen, pazite da ne poremetite talog te osušite rub epruvete čistim papirnatim ručnikom.

3. Miješajte vorteks miješalicom dok se talog vidljivo ne razgradi te centrifugirajte 10 minuta pri 3000 – 5000 x g s pomoću rotora s njišućim vjedrima. Uklonite i zbrinite cijeli supernatant.

Mali ostaci materijala preostali u supernatantu nakon miješanja vorteks miješalicom, no prije centrifugiranja, neće utjecati na postupak.



Nepotpuno uklanjanje supernatanta inhibirat će lizu i razrijediti lizat te stoga utjecati na uvjete za vezanje RNK na membranu PAXgene.

4. Dodajte 350 µl pufera za resuspendiranje (BR1) i miješajte vorteks miješalicom dok se talog vidljivo ne razgradi.
5. Pipetirajte uzorak u epruvetu za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml. Dodajte 300 µl vezivnog pufera (BR2) i 40 µl proteinaze K (PK). Miješajte vorteks miješalicom 5 sekundi i inkubirajte 10 minuta pri 55 °C koristeći tresilicu-inkubator pri 400 – 1400 o/min. Nakon inkubacije postavite temperaturu tresilice-inkubatora na 65 °C (za korak 20).



Ne miješajte vezivni pufer (BR2) i proteinazu K (PK) prije dodavanja u uzorak.

- Pipetirajte lizat izravno u spin kolonu PAXgene Shredder (PSC; ljubičasta) postavljenu u epruvetu za obradu (PT) od 2 ml i centrifugirajte 3 minute pri najvećoj brzini (ne prelazeći 20.000 x g).



Pažljivo pipetirajte lizat u spin kolonu (PSC) i vizualno pregledajte je li lizat potpuno prenesen u spin kolonu (PSC).

Kako biste spriječili oštećenja kolona (PSC) i epruveta (PT), ne premašujte 20.000 x g.



Neki uzorci mogu proći kroz spin kolonu PAXgene Shredder (PSC) bez centrifugiranja. To se događa zbog niske viskoznosti nekih uzoraka i ne smije se smatrati znakom kvara proizvoda.

- Pažljivo prenesite cijeli supernatant nevezane frakcije u novu epruvetu za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml, a da pritom ne poremetite talog u epruveti za obradu.
- Dodajte 350 µl etanola (96 – 100-postotnog, razred čistoće p. a.). Miješajte vorteks miješalicom i kratko centrifugirajte (1 – 2 sekunde pri 500 – 1000 x g) kako bi se uklonile kapljice s unutrašnje strane poklopca.



Centrifugiranje ne smije biti duže od 1 – 2 sekunde jer bi to moglo dovesti do taloženja nukleinskih kiselina i smanjenih prinosa ukupne RNK.

- Pipetirajte 700 µl uzorka u spin kolonu PAXgene RNA (PRC, crvena) postavljenu u epruvetu za obradu od 2 ml (PT) i centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x g. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu (PT) od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju.
- Pipetirajte preostali uzorak u spin kolonu PAXgene RNA (PRC) i centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x g. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu (PT) od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju.



Pažljivo pipetirajte uzorak u spin kolonu (PRC) i vizualno pregledajte je li uzorak potpuno prenesen u spin kolonu (PRC).

11. Pipetirajte 350 µl pufera za ispiranje 1 (BR3) u spin kolonu PAXgene RNA (PRC). Centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x g. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu (PT) od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju.
12. Dodajte 10 µl temeljne standardne otopine DNaze I (RNFD) u 70 µl pufera za razgradnju DNK (RDD) u epruveti za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml. Miješajte laganim, kratkim udarcem epruvete te kratko centrifugirajte kako biste prikupili preostalu tekućinu sa strana epruvete.

Ako obrađujete, primjerice, 10 uzoraka, dodajte 100 µl temeljne standardne otopine DNaze I (RNFD) u 700 µl pufera za razgradnju DNK (RDD). Upotrijebite epruvete za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml koje su isporučene s kompletom.



DNaza I je posebno osjetljiva na fizičku denaturaciju. Miješanje se mora obavljati samo laganim, kratkim udarcem epruvete. Ne miješajte vorteks miješalicom.

13. Pipetirajte mješavinu za inkubaciju DNaze I (RNFD) (80 µl) izravno na membranu spin kolone PAXgene RNA (PRC) i postavite na radnu površinu (20 – 30 °C) na 15 minuta.



Pobrinite se da je mješavina za inkubaciju DNaze I (RNFD) postavljena izravno na membranu. Razgradnja DNaze bit će nepotpuna ako se dio mješavine nanese i ostane na stijenkama ili O-prstenu spin kolone (PRC).

14. Pipetirajte 350 µl pufera za ispiranje 1 (BR3) u spin kolonu PAXgene RNA (PRC) i centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x g. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu (PT) od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju.
15. Pipetirajte 500 µl pufera za ispiranje 2 (BR4) u spin kolonu PAXgene RNA (PRC) i centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x g. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu (PT) od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju.



Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Pobrinite se da je etanol dodan u pufer za ispiranje 2 (BR4) prije uporabe (pogledajte „Postupci koje treba napraviti prije započinjanja”, stranica 58).

16. Dodajte još 500 µl pufera za ispiranje 2 (BR4) u spin kolonu PAXgene RNA (PRC). Centrifugirajte 3 minute pri 8000 – 20.000 x *g*.
17. Zbrinite epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju i postavite spin kolonu PAXgene RNA (PRC) u novu epruvetu za obradu od 2 ml (PT). Centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x *g*.
18. Zbrinite epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju. Postavite spin kolonu PAXgene RNA (PRC) u epruvetu za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml i pipetirajte 40 µl pufera za eluiranje (BR5) izravno na membranu spin kolone PAXgene RNA (PRC). Centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x *g* kako biste eluirali RNK. Važno je namočiti cijelu membranu puferom za eluiranje (BR5) kako bi se postigla maksimalna učinkovitost eluiranja.
19. Ponovite korak eluiranja (korak 18) kako je opisano, upotrebljavajući 40 µl pufera za eluiranje (BR5) i istu epruvetu za mikrocentrifugu (MCT).
20. Inkubirajte eluat 5 minuta pri 65 °C u tresilici-inkubatoru (iz koraka 5) bez trešnje. Nakon inkubacije odmah ohladite na ledu.

Inkubacija pri 65 °C denaturira RNK za postupke daljnje obrade. Ne premašujte vrijeme ni temperaturu inkubacije.
21. Ako se uzorci RNK neće odmah upotrebljavati, pohranite ih na -20 °C ili -70 °C.

Budući da RNK ostaje denaturirana nakon ponovljenog zamrzavanja i odmrzavanja, nije potrebno ponoviti inkubaciju pri 65 °C. Ako upotrebljavate uzorke RNK za dijagnostičko ispitivanje, slijedite upute proizvođača.

Za točnu kvantifikaciju RNK mjerenje apsorbacije pri 260 nm preporučujemo razrjeđivanje uzoraka s 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Razrjeđivanje uzoraka u vodi bez RNaze može dovesti do netočno niskih vrijednosti.

Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluiranje (BR5) i pufera Tris-HCl kao u uzorcima koji će se obraditi. Pufer za eluiranje (BR5) ima visoku apsorbaciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorbacije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost.



Za kvantifikaciju u puferu Tris-HCl koristite odnos $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$.
Pogledajte Dodatak B, stranica 76.

* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Protokol: automatizirano pročišćavanje ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Važne točke prije započinjanja

- Provjerite je li kutija kompleta netaknuta i neoštećena te potvrdite da puferi nisu iscurili. Ne upotrebljavajte oštećeni komplet.
- Prilikom uporabe pipete provjerite je li pipeta postavljena na točan volumen te je li tekućina pažljivo i potpuno aspirirana i dispenzirana.
- Kako biste izbjegli prenošenje uzoraka u pogrešne epruvete i plastične potrošne materijale, pobrinite se da su sve epruvete za obradu (PT), epruvete za mikrocentrifugu (MCT) i adapteri rotora propisno označeni trajnim markerom. Označite poklopac i tijelo svake epruvete za mikrocentrifugu (MCT), tijelo svake epruvete za obradu (PT) i vanjsku stijenku svakog adaptera rotora.
- Prolijevanja uzoraka i pufera tijekom postupka mogu smanjiti prinos i čistoću RNK.
- Osim ako je drugačije naznačeno, svi koraci u ovom protokolu, uključujući korake centrifugiranja, trebaju se provesti pri sobnoj temperaturi (15 – 25 °C).

Zbog osjetljivosti tehnologija amplifikacije nukleinske kiseline, potrebno je poduzeti sljedeće mjere opreza prilikom rukovanja uzorcima kako bi se izbjegla križna kontaminacija:

- Pažljivo pipetirajte uzorak u epruvetu za obradu (PT), na dno epruvete bez navlaživanja ruba epruvete.
- Uvijek promijenite vrhove pipeta između dva prijenosa tekućina. Upotrijebite vrhove pipeta s barijerom protiv aerosola.
- Izbjegnite dodirivanje membrane spin kolone (PRC, PSC) vrhom pipete.

- Nakon miješanja vorteks miješalicom ili zagrijavanja epruvete za mikrocentrifugu (MCT) kratko je centrifugirajte kako biste uklonili kapljice s unutrašnje strane poklopca.
- Tijekom cijelog postupka nosite rukavice. U slučaju dodira između rukavica i uzorka, odmah promijenite rukavice.

Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Krv se mora prikupiti u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) prema uputama u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*. Ako je potrebno, pogledajte Dodatak C (stranica 78) za preporuke o rukovanju epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Pobrinite se da su epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubirane najmanje 2 sata pri sobnoj temperaturi nakon prikupljanja krvi kako bi se osigurala potpuna liza krvnih stanica. Inkubacija epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) preko noći može povećati prinose. Ako je epruveta PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pohranjena na temperaturama od 2 – 8 °C, -20 °C ili -70 °C nakon prikupljanja krvi, prvo joj prilagodite temperaturu sobnoj temperaturi i potom je pohranite na sobnoj temperaturi 2 sata prije početka postupka.
- Pročitajte sigurnosne informacije na stranici 10.
- Pročitajte „Važne napomene”, stranica 42.
- Pročitajte smjernice o rukovanju s RNK (Dodatak A, stranica 75).
- Pročitajte odgovarajući Korisnički priručnik za instrument QIAcube i sve dodatne informacije isporučene s instrumentom QIAcube, obrađujući posebnu pozornost na sigurnosne informacije.
- Pobrinite se da su uređaji i instrumenti, poput pipeta i instrumenta QIAcube, redovito pregledavani i kalibrirani u skladu s preporukama proizvođača.
- Vezivni pufer (BR2) može u pohrani stvoriti precipitat. Ako je potrebno, zagrijte ga na 37 °C kako bi se precipitat razgradio.
- Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodajte odgovarajući volumen etanola (96 – 100-postotni, razred čistoće p.a.), kako je naznačeno na bočici, za dobivanje radne otopine.



- Ako prvi puta upotrebljavate RNase-Free DNase Set, pripremite temeljnu standardnu otopinu DNaze I. Otopite krutu DNazu I (RNFD; 1500 Kunitz jedinica)* u 550 µl pufera za resuspendiranje DNaze (DRB) koji je isporučen s kompletom. Obratite pažnju na to da se nijedan dio DNaze (RNFD) ne izgubi prilikom otvaranja bočice. Rekonstituiranu DNazu I (RNFD) nemojte miješati vorteks miješalicom. DNaza I je posebno osjetljiva na fizičku denaturaciju. Miješanje se mora obavljati samo nježnim preokretanjem bočice.
- Prema trenutačno poznatim podacima rekonstituirana DNaza I (RNFD) može se pohraniti pri 2 – 8 °C do 6 tjedana. Za dugotrajnu pohranu DNaze I (RNFD) uklonite temeljnu standardnu otopinu iz staklene bočice, podijelite je u jednokratne alikvote (upotrijebite epruvete za mikrocentrifugu [MCT] od 1,5 ml isporučene s kompletom; dovoljno ih je za 5 alikvota) i pohranite ih pri -20 °C do 9 mjeseci. Odmrznuti alikvoti mogu se pohraniti pri 2 – 8 °C do 6 tjedana. Nakon odmrzavanja nemojte ponovno zamrzavati alikvote.
- Prilikom rekonstituiranja i alikvotiranja DNaze I (RNFD) pobrinite se da slijedite smjernice za rukovanje s RNK (Dodatak A, stranica 75).
- Instalirajte ispravni adapter tresilice (uključen uz instrumente QIAcube; upotrebljavajte adapter za epruvete sa sigurnosnim poklopcem od 2 ml, označene s „2”), te postavite nosač tresilice na gornju stranu adaptera.
- Provjerite ladicu za otpad i ispraznite je ako je potrebno.
- Instalirajte sve povezane protokole ako to već niste učinili za prethodne procese. Za QIAcube Connect MDx potrebno je preuzeti sve protokole koji se nalaze u povezanoj zip datoteci. Za klasičan QIAcube instalirajte oba protokola „PAXgene Blood RNA Part A” i „PAXgene Blood RNA Part B”. Pogledajte „Instaliranje protokola na instrumente QIAcube”, stranica 45.

* Kunitz jedinice upotrebljavaju se za mjerenje DNaze I te se definiraju kao količina DNaze I koja uzrokuje povećanje u A_{260} od 0,001 po minuti po mililitru pri 25 °C, pH 5,0, s visoko polimeriziranom DNK kao supstratom (Kunitz, M. (1950.) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

Postupak

1. Zatvorite poklopac instrumenta QIAcube i uključite instrument QIAcube sklopkom za napajanje (QIAcube Connect MDx: pogledajte sliku 17, stranica 43; QIAcube: pogledajte sliku 18, stranica 44).

Oglašava se zvučni signal i pojavljuje se zaslon pokretanja. Instrumenti automatski izvode početna testiranja.
2. Otvorite vratašca instrumenta QIAcube i postavite potrebne reagense i plastični pribor u instrument QIAcube. Pogledajte „Punjenje instrumenata QIAcube”, stranica 46.

Radi uštede vremena punjenje se može izvesti tijekom jednog ili oba koraka centrifuge u trajanju od 10 minuta (koraci 3 i 5).
3. Centrifugirajte epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom 10 minuta pri 3000 – 5000 x *g* s pomoću rotora s njišućim vjedrima.
 -  Pobrinite se da je uzorak krvi inkubiran u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom najmanje 2 sata pri sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) kako bi se postigla potpuna liza krvnih stanica.
 -  Rotor mora sadržavati adaptere za epruvete sa zaobljenim dnom. Ako se upotrebljavaju druge vrste adaptera za epruvete, epruvete mogu puknuti tijekom centrifugiranja.
4. Uklonite supernatant pretakanjem ili pipetiranjem. Dodajte 4 ml vode bez RNaze (RNFV) u talog i zatvorite epruvetu novim sekundarnim poklopcem BD Hemogard (isporučen s kompletom).

Ako je supernatant pretočen, pazite da ne poremetite talog te osušite rub epruvete čistim papirnatim ručnikom.
5. Miješajte vorteks miješalicom dok se talog vidljivo ne razgradi te centrifugirajte 10 minuta pri 3000 – 5000 x *g* s pomoću rotora s njišućim vjedrima. Uklonite i zbrinite cijeli supernatant.

Mali ostaci materijala preostali u supernatantu nakon miješanja vorteks miješalicom, no prije centrifugiranja, neće utjecati na postupak.



Nepotpuno uklanjanje supernatanta inhibirat će lizu i razrijediti lizat te stoga utjecati na uvjete za vezanje RNK na membranu PAXgene.

6. Dodajte 350 µl pufera za resuspendiranje (BR1) i miješajte vorteks miješalicom dok se talog vidljivo ne razgradi.

7. Pipetirajte uzorak u epruvetu za obradu (PT) od 2 ml.



Upotrijebite epruvete za obradu (PT) od 2 ml uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit.

8. Postavite otvorene epruvete za obradu (PT) s uzorkom u tresilicu instrumenta QIAcube (QIAcube Connect MDx: pogledajte sliku 21, stranica 49; QIAcube: pogledajte sliku 22, stranica 50). Položaji uzoraka označeni su brojevima radi lakšeg postavljanja. Umetnite čepove nosača tresilice (uključeni uz instrumente QIAcube) u utore na rubu nosača tresilice uz svaku epruvetu za obradu. To omogućava detekciju uzoraka tijekom provjere postavljanja.



Pobrinite se da je instaliran ispravan adapter tresilice (adapter tresilice, 2 ml, epruvete sa sigurnosnim poklopcem, označene s „2”, uključene uz instrumente QIAcube).



Ako obrađujete manje od 12 uzoraka, pobrinite se da postavite nosač tresilice kako je prikazano na slici 26, stranica 54. Jedan (1) ili 11 uzoraka ne mogu se obrađivati. Brojevi položaja na nosaču tresilice odgovaraju brojevima položaja u centrifugi.

9. Zatvorite poklopac instrumenta QIAcube (QIAcube Connect MDx: pogledajte sliku 17, stranica 43; QIAcube: pogledajte sliku 18, stranica 44).

10. Odaberite protokol „PAXgene Blood RNA Part A” i započnite protokol.

Slijedite upute navedene na dodirnom zaslonu instrumenta QIAcube.



Pobrinite se da su oba dijela programa (dio A i dio B) instalirani na instrumentu QIAcube (pogledajte „Instaliranje protokola na instrumente QIAcube”, stranica 45).



Instrumenti QIAcube izvršit će provjeru postavljanja za uzorke, vrhove, adaptere rotora i bočice za reagense.

11. Nakon što završi protokol „PAXgene Blood RNA Part A”, otvorite poklopac instrumenta QIAcube (QIAcube Connect MDx: pogledajte sliku 17, stranica 43; QIAcube: pogledajte sliku 18, stranica 44). Uklonite i zbrinite spin kolone PAXgene RNA (PRC) iz adaptera rotora i prazne epruvete za obradu (PT) iz tresilice.



Tijekom procesa instrument premješta spin kolone iz položaja 1 na adapteru rotora (položaj poklopca L1) u položaj 3 na adapteru rotora (položaj poklopca L2) (pogledajte sliku 24, stranica 52).

12. Zatvorite poklopce svih epruveta za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml koje sadržavaju pročišćenu RNK u adapterima rotora (položaj 3, položaj poklopca L3, pogledajte sliku 24, stranica 52). Premjestite epruvete za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml na adapter tresilice instrumenta QIAcube (QIAcube Connect MDx: pogledajte sliku 21, stranica 49; QIAcube: pogledajte sliku 22, stranica 50).
13. Zatvorite poklopac instrumenta QIAcube (QIAcube Connect MDx: pogledajte sliku 17, stranica 43; QIAcube: pogledajte sliku 18, stranica 44).
14. Odaberite protokol „PAXgene Blood RNA Part B” i započnite protokol.

Slijedite upute navedene na dodirnom zaslonu instrumenta QIAcube.



Ovaj program inkubira uzorke pri 65 °C i denaturira RNK za postupke daljnje obrade. Čak i ako postupak daljnje obrade uključuje korak s denaturacijom toplinom, ne izostavljajte taj korak. Dovoljna denaturacija RNK ključna je za maksimalnu učinkovitost postupaka daljnje obrade.

15. Nakon što završi program „PAXgene Blood RNA Part B”, otvorite poklopac instrumenta QIAcube (QIAcube Connect MDx: pogledajte sliku 17, stranica 43; QIAcube: pogledajte sliku 18, stranica 44). Odmah postavite epruvete za mikrocentrifugu (MCT) s pročišćenom RNK na led.



UPOZORENJE: vruća površina. Tresilica može dosegnuti temperaturu do 70 °C. Nemojte je dodirivati dok je vruća.



Nemojte ostavljati pročišćenu RNK u instrumentu QIAcube. Budući da uzorci nisu ohlađeni, može doći do degradacije pročišćene RNK. Stoga se ne preporučuje izvođenje procesa pripreme uzoraka preko noći i bez nadzora.

16. Ako se uzorci RNK neće odmah upotrebljavati, pohranite ih na -20 °C ili -70 °C.

Budući da RNK ostaje denaturirana nakon ponovljenog zamrzavanja i odmrzavanja, nije potrebno ponoviti protokol inkubacije toplinom („PAXgene Blood RNA Part B”). Ako upotrebljavate uzorke za dijagnostičko ispitivanje, slijedite upute proizvođača.

Za točnu kvantifikaciju RNK apsorbacijom pri 260 nm preporučujemo razrjeđivanje uzoraka u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. * Razrjeđivanje uzoraka u vodi bez RNaze može dovesti do netočno niskih vrijednosti.

Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluiranje (BR5) i pufera Tris-HCl kao u uzorcima koji će se obraditi. Pufer za eluiranje (BR5) ima visoku apsorbaciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorbacije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost.



Za kvantifikaciju u puferu Tris-HCl koristite odnos

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Pogledajte Dodatak B, stranica 76.

17. Uklonite nosač za bočice za reagense s radne površine instrumenta QIAcube (QIAcube Connect MDx: pogledajte sliku 21, stranica 49; QIAcube: pogledajte sliku 22, stranica 50) te zatvorite sve bočice propisno označenim poklopcima. Pufer u bočicama može se čuvati na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) do 3 mjeseca. Uklonite i zbrinite preostale reagense u epruvetama za obradu (PT) u utorima za epruvete za mikrocentrifugu instrumenta QIAcube. Uklonite i zbrinite adaptere rotora iz centrifuge. Ispraznite ladicu za otpad instrumenta QIAcube Connect MDx (QIAcube Connect MDx: pogledajte sliku 17, stranica 43; QIAcube: pogledajte sliku 18, stranica 44). Zatvorite poklopac instrumenta QIAcube te isključite instrument sklopkom za napajanje.

* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte stranicu s najčešćim pitanjima u našem centru za tehničku podršku: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Znanstvenici u tehničkoj službi društva QIAGEN uvijek će rado odgovoriti na sva pitanja koja možda imate vezano uz informacije i protokole u ovom priručniku ili tehnologije uzorkovanja i ispitivanja (informacije za kontakt potražite na posljednjoj stranici ili posjetite www.qiagen.com).

Komentari i prijedlozi

Degradirana RNK

Kontaminacija RNazom



Pazite da ne unesete RNaze u reagense tijekom postupka ili kasnijeg rukovanja (pogledajte Dodatak A, stranica 75).

Niski prinos RNK

a) Manje od 2,5 ml krvi prikupljeno u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Pobrinite se da je 2,5 ml krvi prikupljeno u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT; pogledajte *Priručnik za PAXgene Blood RNA Tube*).




b) Koncentracija RNK mjerena u vodi



RNK mora biti razrijeđena u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* za točnu kvantifikaciju (pogledajte Dodatak B, stranica 76).

* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Komentari i prijedlozi

- c) Ostatak stanica prenesen u spin kolonu PAXgene RNA (PRC) u koracima 9 i 10 ručnog protokola  Izbjegnite prenošenje velikih čestica prilikom pipetiranja supernatanta u koraku 7 ručnog protokola (prijenos malih ostataka neće utjecati na postupak).
- d) Supernatant nije potpuno uklonjen u koraku 3  Pobrinite se da je cijeli supernatant uklonjen. Ako je supernatant pretočen, uklonite kapljice s ruba epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) papirnatim ručnikom. Poduzmite odgovarajuće mjere opreza kako biste spriječili križnu kontaminaciju.
- e) Nakon prikupljanja u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT), krv se inkubira manje od 2 sata  Inkubirajte krv u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) najmanje 2 sata nakon prikupljanja.

Niska vrijednost A_{260}/A_{280}

- a) Voda upotrijebljena za razrjeđivanje RNK za mjerenje vrijednosti A_{260}/A_{280}  Upotrijebite 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 za razrjeđivanje RNK prije mjerenja čistoće* (pogledajte Dodatak B, stranica 76).

* 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.

Komentari i prijedlozi

- b) Nulta vrijednost spektrofotometra nije propisno postavljena



Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluiranje (BR5) i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, kao u uzorcima koji će se obraditi. Puffer za eluiranje (BR5) ima visoku apsorpciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorpcije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost.

Kvar instrumenta

Instrumentima QIAcube ne rukuje se propisno

Pročitajte odgovarajući korisnički priručnik za QIAcube i obratite posebnu pažnju na odjeljak Rješavanje problema. Pobrinite se da je instrument QIAcube propisno održavan, kako je opisano u korisničkom priručniku.

Dodatak A: Opće napomene o postupanju s RNK

Postupanje s RNK



Ribonukleaze (RNaze) su vrlo stabilni i aktivni enzimi koji uglavnom ne trebaju kofaktore za funkcioniranje. Budući da se RNaze teško inaktiviraju, a za degradaciju RNK su dovoljne su i minute, ne upotrebljavajte plastični ili stakleni pribor, a da pritom niste eliminirali moguću kontaminaciju RNazama. Posebnu pažnju treba obratiti na izbjegavanje nenamjernog uvođenja RNaza u uzorak RNK tijekom ili nakon postupka pročišćavanja. Kako bi se stvorila i održala okolina bez RNaza, moraju se poduzeti određene mjere opreza tijekom predobrade te uporabe jednokratnih i višekratnih posuda i otopina tijekom rada s RNK.

Općenito rukovanje



Prilikom rada s RNK potrebno je uvijek upotrebljavati propisnu mikrobiološku i aseptičku tehniku. Ruke i čestice prašine prenose bakterije i plijesni te su najčešći izvori kontaminacije RNazom. Uvijek nosite rukavice od lateksa ili vinila prilikom rukovanja reagensima i uzorcima RNK kako biste spriječili kontaminaciju RNazom s površine kože ili s prašnjave laboratorijske opreme. Često mijenjajte rukavice i održavajte epruvete zatvorenima kad god je to moguće. Držite pročišćenu RNK na ledu za vrijeme pipetiranja alikvota za postupke daljnje obrade.

Protokoli za uklanjanje kontaminacije RNazom iz staklenog pribora i otopina mogu se pronaći u općim vodičima za molekularnu biologiju, kao što je Sambrook, J. i Russell, D. W. (2001.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Dodatak B: Kvantifikacija i određivanje kvalitete ukupne RNK

Kvantifikacija RNK

Koncentracija RNK treba se odrediti mjerenjem apsorpcije pri 260 nm (A_{260}) u spektrofotometru. Kako bi se osigurala valjanost rezultata, očitavanja trebaju biti unutar linearnog raspona spektrofotometra. Apsorpcija 1 jedinice pri 260 nm odgovara 44 μg RNK po ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Ovaj je odnos valjan samo za mjerenja u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5*. Stoga je potrebno razrijediti uzorak RNK, a to se mora obaviti u 10 mM Tris-HCl. Kako je obrađeno u nastavku (pogledajte „Čistoća RNK“, stranica 77), omjer između vrijednosti apsorpcije pri 260 i 280 nm daje procjenu čistoće RNK. Prilikom mjerenja uzoraka RNK osigurajte da su kivete bez RNaze. Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluiranje (BR5) i pufera Tris-HCl kao u uzorcima koji će se obraditi. Pufer za eluiranje (BR5) ima visoku apsorpciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorpcije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost. U nastavku je prikazan primjer izračuna uključenog u kvantifikaciju RNK.

Volumen uzorka RNK	=	80 μl
Razrjeđivanje (1/15)	=	10 μl uzorka RNK + 140 μl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Mjerite apsorpciju razrijeđenog uzorka u kiveti (bez RNaze).		
A_{260}	=	0,3
Koncentracija uzorka	=	44 x A_{260} x faktor razrjeđivanja
	=	44 x 0,3 x 15
	=	198 $\mu\text{g/ml}$
Ukupni prinos	=	koncentracija x volumen uzorka u mililitrima
	=	198 $\mu\text{g/ml}$ x 0,08 ml
	=	15,8 μg RNK

* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Čistoća RNK

Na temelju omjera očitavanja pri 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}) procjenjuje se čistoća RNK u pogledu kontaminanata koji se apsorbiraju u UV spektru, kao što su proteini. Međutim, na omjer vrijednosti A_{260}/A_{280} znatno utječe pH. Niži pH dovodi do nižeg omjera A_{260}/A_{280} i smanjene osjetljivosti na kontaminaciju proteinima.* Za dobivanje točnih vrijednosti preporučujemo mjerenje apsorpcije u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Čista RNK ima omjer vrijednosti A_{260}/A_{280} od 1,8 – 2,2 u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluiranje (BR5) i pufera Tris-HCl kao u uzorcima koji će se obraditi. Pufer za eluiranje (BR5) ima visoku apsorpciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorpcije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost.

* 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.

Dodatak C: Rukovanje epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Sljedeće preporuke društva BD mogu biti korisne prilikom rukovanja epruветama PAXgene Blood RNA Tubes. Više informacija o epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*.

Upute za uklanjanje poklopca BD Hemogard

1. Uхватite epruветu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) jednom rukom, postavljajući palac ispod poklopca BD Hemogard. (Za dodatnu stabilnost postavite ruku na čvrstu površinu.) Drugom rukom okrenite poklopac BD Hemogard dok ga istovremeno gurate palcem prve ruke prema gore **SAMO DOK SE ČEP NE OLABAVI**.
2. Odmaknite palac prije podizanja poklopca. **NE** upotrebljavajte palac kako biste odgurnuli poklopac s epruвете PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Oprez: ako epruвета PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sadržava krv, postoji rizik od izlaganja. Kako bi se pomogla spriječiti ozljeda prilikom uklanjanja poklopca, važno je da se palac kojim se poklopac gura prema gore odmakne od epruвете PAXgene Blood RNA Tube (BRT) čim se poklopac BD Hemogard olabavi.
3. Podignite poklopac s epruвете PAXgene Blood RNA Tube (BRT). U malo vjerojatnom slučaju da se plastična zaštita odvoji od gumenog čepa, **NE SASTAVLJAJTE PONOVO POKLOPAC**. Pažljivo uklonite gumeni čep s epruвете PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Upute za umetanje sekundarnog poklopca BD Hemogard

1. Ponovno postavite poklopac na epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Okrenite i pogurajte čvrsto prema dolje dok čep potpuno ne sjedne na mjesto. Potpuno ponovno umetanje čepa nužno je kako bi poklopac ostao sigurno postavljen na epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom rukovanja epruvetom.

Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, epruvete za obradu, DNaza I bez RNaze, reagensi i puferi bez RNaze. Za uporabu uz epruvete PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 epruveta za prikupljanje krvi	762165
Povezani proizvodi koji se mogu naručiti od društva QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Paket uključuje: nosače za bočice za reagense (3); trake za označavanje nosača (8); vrhove s filtrom od 200 µl (1024); vrhove s filtrom od 1000 µl (1024); vrhove s filtrom od 1000 µl, široke (1024); bočice za reagensa od 30 ml (18); adaptere rotora (240); nosač adaptera rotora	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Sterilni, jednokratni vrhovi s filtrom, u nosaču	990352

Reagent Bottles, 30 ml (6)	Bočice za reagense (30 ml) s poklopcima; paket od 6; za uporabu s nosačem za bočice za reagense na instrumentu QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Za 240 pripremanja: 240 jednokratnih adaptera rotora; za uporabu s instrumentima QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Nosač za bočice za reagense 6 x 30 ml na radnoj površini instrumenta QIAcube	990390
Rotor Adapter Holder	Držać za 12 jednokratnih adaptera rotora; za uporabu s instrumentima QIAcube	990392

Povezani proizvodi koji se mogu naručiti od društva BD*

Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: igla od 21 G, 0,75 inča (0,8 x 19 mm), epruveta od 12 inča (305 mm) s luer adapterom; 50 po pakiranju, 200 po kutiji	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Kutija samo za epruvete promjera 13 mm i 16 mm; 1000/kutija	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Epruvete od 4,0 ml i 13 x 75 mm s crvenim BD Hemogard poklopcem i papirnatom oznakom; 100/pakiranje, 1000/kutija	368975

* Ova dodatna oprema za prikupljanje krvi predstavlja tipične proizvode koji se mogu upotrebljavati s epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Kako biste saznali više o ovoj dodatnoj opremi, uključujući kako je naručiti, posjetite www.preanalytix.com.

Ažurirane informacije o licenciranju i izjave specifične za proizvod pogledajte u odgovarajućem priručniku za komplet tvrtke PreAnalytiX ili QIAGEN ili priručniku za korisnika. Priručnici za komplet tvrtke PreAnalytiX i QIAGEN te priručnici za korisnike dostupni su na www.preanalytix.com i www.qiagen.com ili se mogu zatražiti od tehničke službe društva PreAnalytiX.

Povijest revizija priručnika

Dokument i izmjene	Izmjene	Datum
HB-0101-004, R2	Promjene radi usklađivanja s propisima GHS-a u dokumentu	lipanj 2015.
HB-0101-005, R3	Novi predložak; izmjene u automatiziranom protokolu i podacima o radnom učinku; ažuriranje Sigurnosnih informacija kako bi bile u skladu s propisima GHS-a; izmjene u podacima o instrumentu i izjavi o Ograničenjima uporabe proizvoda.	Veljača 2019.
HB-0101-006, R3	Ispravak naziva kompleta u tablici sa sadržajem kompleta, str. 5.	Siječanj 2020.
HB-0101-007, R4	Dodavanje instrumenta QIAcube Connect MDx u automatizirani protokol; ažuriranje cjelokupnog teksta radi dodavanja upućivanja na QIAcube Connect MDx; ažuriranje brojeva tablica, stranica i slika u cijelom dokumentu.	Prosinac 2020.

PreAnalytiX u svijetu

Proizvode PreAnalytiX distribuiraju društva QIAGEN i BD

QIAGEN – Služba za korisnike

Narudžbe www.QIAGEN.com/shop | Tehnička podrška support.qiagen.com | Web-mjesto www.qiagen.com

BD – Služba za korisnike

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: customer care.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: bd denmark@bd.com

Finland

Orders: 358.9.88.70.780
Fax: 358.9.88.70.7816
Orders: tilaukset.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: customer care.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: bdhorge@bd.com

Orders: ordre.no@bd.com

Southeast Asia

E-mail: PAS.SEA@bd.com

Indonesia orders: 622.1577.1920

Malaysia orders: 603.2093.8788

Philippines orders: 63.2478.8881

Singapore orders: 65.6861.0633

Thailand orders: 662.646.1800

Vietnam orders: 848.3822.7409

South Korea

Orders: 02.3404.3706

Fax: 02.3404.3785

Technical: 02.3404.3706

Technical support: Korea_PAS@bd.com

Spain, Portugal and Andorra

Orders: 34.91.848.8174

Customer support: 34.902.27.17.27

Fax: 34.91.848.8115

E-mail: info.spain@bd.com

Sweden

Orders: 46.8.775.51.00

Fax: 46.8.645.08.08

Orders: order.se@bd.com

Technical support: bds sweden@bd.com

Switzerland

Orders: 41.61.485.22.24

Fax: 41.61.485.22.00

E-mail: infoch@bd.com

UK

Orders: 0800.917.8776

E-mail: bduk_customerservice@bd.com

USA

Customer support: 800.631.0174

E-mail: productcomplaints@bd.com



HB-0101-007 1122120EN BD-8945 12/2020
Proizvedeno u Njemačkoj