

Grudzień 2020 r.

PAXgene[®] Blood RNA Kit — Instrukcja obsługi

Wersja 2



50 (nr katalogowy 762174)

R4 **MAT** 1122120PL



762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Zestaw wyprodukowany przez QIAGEN GmbH dla PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

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

Zestawy PAXgene Blood RNA Kit nie są dostępne we wszystkich krajach; prosimy o przesłanie zapytania.

Umowa ograniczonej licencji

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody nabywcy lub użytkownika zestawu PAXgene Blood RNA Kit na następujące warunki:

1. Zestawu PAXgene Blood RNA Kit można używać wyłącznie zgodnie z dokumentem *PAXgene Blood RNA Kit — Instrukcja obsługi* i tylko razem ze składnikami zawartymi w zestawie. Firma PreAnalytiX nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania lub łączenia składników tego zestawu ze składnikami nienależącymi do tego zestawu, z wyjątkiem przypadków opisanych w dokumencie *PAXgene Blood RNA Kit — Instrukcja obsługi* oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.preanalytix.com.
2. Z wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma PreAnalytiX nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego użytkowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Zestaw oraz jego składniki są przeznaczone do jednorazowego użytku, nie można ich ponownie używać, regenerować ani odsprzedawać.
4. Firma PreAnalytiX nie udziela innych licencji, wyrażonych lub dorozumianych, poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej.
6. Firma PreAnalytiX może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu i ma prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencji są dostępne na stronie www.preanalytix.com.

Sprzedaż warunkowa

Opisywany w niniejszym dokumencie produkt jest objęty licencją na podstawie określonych zastrzeżeń o numerach US-7,270,953 i US-7,682,790, jak również EP-1820793 B1 oraz zagranicznych odpowiedników tych zastrzeżeń patentowych obejmujących stosowanie tego produktu w celu przetwarzania kompleksu kwasów nukleinowych utworzonego podczas pobierania próbki do probówki PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, wszelkie prawa zastrzeżone.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Szwajcaria

www.preanalytix.com

Dystrybutorzy firmy PreAnalytiX

Produkty PreAnalytiX są wytwarzane i dystrybuowane przez firmę QIAGEN lub BD dla firmy PreAnalytiX. Produktów nie można zamówić w firmie PreAnalytiX GmbH.


Informacje kontaktowe lokalnego dystrybutora firmy PreAnalytiX znajdują się na ostatniej stronie.

Spis treści

Zawartość zestawu.....	5
Symbole	6
Warunki przechowywania.....	7
Przeznaczenie.....	8
Ograniczenia w zakresie stosowania produktu.....	8
Kontrola jakości	9
Pomoc techniczna	9
Informacje dotyczące bezpieczeństwa	9
Wstęp	13
Zasada działania i procedura	13
Pobieranie i stabilizacja próbek.....	14
Zatężanie i oczyszczanie RNA.....	19
Ręczne oczyszczanie RNA	19
Zautomatyzowane oczyszczanie RNA	29
Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika	38
Ważne informacje.....	41
Korzystanie z aparatów QIAcube	41
Instalowanie protokołów w aparatach QIAcube.....	44
Ładowanie aparatu QIAcube.....	45
Protokół: ręczne oczyszczanie całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	55

Protokół: zautomatyzowane oczyszczanie całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	63
Rozwiązywanie problemów	71
Załącznik A: Ogólne uwagi dotyczące postępowania z RNA.....	74
Załącznik B: Oznaczenie ilościowe i określenie jakości całkowitego RNA	75
Załącznik C: Postępowanie z próbkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	77
Informacje dotyczące zamawiania.....	78
Historia zmian w instrukcji obsługi	80

Zawartość zestawu

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Nr katalogowy			762174
Liczba przygotowań			50
BR1	Resuspension Buffer (Bufor do przygotowywania zawiesiny)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Bufor do wiązania)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Bufor płuczący 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Bufor płuczący 2 (koncentrat)) [†]	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Bufor do elucji)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (bottle) (Woda wolna od RNaz (butelka))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinaza K (zielone wieczko))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (Kolumny wirówkowe PAXgene RNA (czerwone))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Probówki do przetwarzania) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Dodatkowe zamknięcia BD Hemogard™)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Probówki mikrowirówkowe) (1,5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNaza I, wolna od RNaz (liofilizowana))	DNA REM	1500 jednostek Kunitza [‡]
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (Bufor do trawienia DNA (białe wieczko))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Bufor do przygotowywania zawiesiny DNazy (probówka, liliowe wieczko))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Kolumny wirówkowe PAXgene Shredder (liliowe))	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Instrukcja obsługi	PAXgene Blood RNA Kit — Instrukcja obsługi (wersja 2)		1

* Produkt nie jest zgodny z odczynnikami dezynfekującymi, które zawierają wybielacz. Zawiera sól guanidyny. Informacje dotyczące bezpieczeństwa znajdują się na stronie 10.

[†] Bufor płuczący 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać 4 objętości etanolu (96–100%, stopień czystości cz.d.a.), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.

[‡] Jednostki Kunitza to jednostki powszechnie stosowane do pomiaru DNazy I, definiowane jako ilość DNazy I, która powoduje wzrost wartości absorbancji A_{260} o 0,001 na minutę na mililitr w temperaturze 25°C, pH 5,0, przy stosowaniu wysoko spolimeryzowanego DNA jako substratu (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

Symbole



Zawiera odczynniki wystarczające do przeprowadzenia <N> testów



Zapoznać się z instrukcją użycia



Data ważności



Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro



Numer katalogowy



Numer serii



Numer materiału



Składniki



Numer



Metoda sterylizacji — sterylizacja promieniowaniem



Jednostki Kunitza



Dodawanie



Zawiera











Zrekonstytuowany



Deoksyrybonukleaza I



Etanol

	Izotocyjanian guanidyny
	RNase-Free DNase Set
	Globalny numer jednostki handlowej
	Nie używać ponownie
	Zakres temperatury
	Górny limit temperatury
	Producent
	Ważna informacja

Warunki przechowywania

Kolumny wirówkowe PAXgene RNA (PRC), kolumny wirówkowe PAXgene Shredder (PSC), proteinazę K (PK) i bufor (BR1, BR2, BR3, BR4 i BR5) należy przechowywać w suchym miejscu w temperaturze określonej na etykiecie zestawu.

Zestaw RNase-Free DNase Set, który zawiera DNazę I (RNFD), bufor do trawienia DNA (RDD) i bufor do przygotowania zawiesiny DNazy (DRB), jest transportowany w temperaturze otoczenia. Niezwłocznie po otrzymaniu zestawu DNazy wolnej od RNazy należy go umieścić w temperaturze określonej na etykiecie. Zestaw zachowuje stabilność do daty ważności określonej na opakowaniu zestawu, jeśli jest przechowywany w odpowiednich warunkach.

Przeznaczenie

System PAXgene Blood RNA System składa się z probówki do pobierania krwi (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) oraz zestawu do oczyszczania kwasów nukleinowych (PAXgene Blood RNA Kit). Jego przewidzianym zastosowaniem jest pobieranie, przechowywanie i transportowanie krwi oraz stabilizacja RNA wewnątrzkomórkowego w zamkniętej probówce, a następnie izolacja i oczyszczanie RNA pacjenta z krwi pełnej na potrzeby molekularnych testów diagnostycznych RT-PCR.

Parametry skuteczności dla systemu PAXgene Blood RNA System ustalono wyłącznie za pomocą transkryptów genów FOS i IL1B. Użytkownik jest odpowiedzialny za ustalenie odpowiednich parametrów skuteczności systemu PAXgene Blood RNA System dla innych transkryptów docelowych.

Wskazania dotyczące stosowania

Zestaw PAXgene Blood RNA Kit jest przeznaczony do oczyszczania RNA wewnątrzkomórkowego z krwi pełnej pobranej do probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT). W przypadku używania tego zestawu w połączeniu z probówką PAXgene Blood RNA Tube (BRT) system umożliwi uzyskanie oczyszczonego RNA wewnątrzkomórkowego z krwi pełnej odpowiedniego do reakcji RT-PCR wykonywanej w molekularnych testach diagnostycznych.

Ograniczenia w zakresie stosowania produktu

Zestaw PAXgene Blood RNA Kit jest przeznaczony do oczyszczania RNA wewnątrzkomórkowego z ludzkiej krwi pełnej ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leukocytów/ml) do zastosowań diagnostyki in vitro. Nie jest on przeznaczony do oczyszczania DNA genomowego lub wirusowych kwasów nukleinowych z ludzkiej krwi pełnej. Ze względu na ograniczoną liczbę transkryptów zwalidowanych pod kątem specyfikacji stabilizacji (transkrypty genów FOS i IL1B) nie określono parametrów skuteczności dla wszystkich transkryptów. W celu określenia, czy konieczne jest przeprowadzenie walidacji dla innych transkryptów, użytkownik powinien dokonać przeglądu danych producenta oraz własnych danych.

Produkt jest przeznaczony do stosowania przez profesjonalnych użytkowników, takich jak technicy i lekarze przeszkoleni w zakresie procedur diagnostyki in vitro.

Informacje na temat użycia probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawiera dokument *PAXgene Blood RNA Tube — Instrukcja obsługi* (PAXgene Blood RNA Tube Handbook).

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu PAXgene Blood RNA Kit jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.

Pomoc techniczna

W firmie QIAGEN szcycimy się jakością i dostępnością naszej pomocy technicznej. W naszych działach serwisu technicznego pracują doświadczeni naukowcy mający rozległą wiedzę praktyczną i teoretyczną w dziedzinie biologii molekularnej oraz stosowania produktów firmy PreAnalytiX. W razie jakichkolwiek pytań dotyczących zestawu PAXgene Blood RNA Kit prosimy o kontakt.

W celu uzyskania pomocy technicznej oraz dalszych informacji prosimy o kontakt telefoniczny z działem serwisu technicznego firmy QIAGEN.

Informacje dotyczące bezpieczeństwa

UE — wszelkie poważne incydenty związane z wyrobem użytkownicy powinni zgłaszać producentowi i właściwemu organowi krajowemu. Poza UE — informacje o incydentach i zapytania dotyczące wyrobu należy kierować do lokalnego przedstawiciela firmy QIAGEN.

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych.

Podczas pracy z materiałami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne, aby uniknąć ryzyka zakażenia (np. wirusem HIV lub wirusem zapalenia wątroby typu B). W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym, kompaktowym formacie PDF na stronie www.preanalytix.com, na której można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla tego zestawu.

PRZESTROGA



NIE dolewać wybielacza lub roztworów kwasowych bezpośrednio do odpadów powstałych po przygotowaniu próbek.

Bufor do wiązania (BR2) i bufor płuczący 1 (BR3) zawierają chlorowodorek guanidyny, który może tworzyć wysoce reaktywne związki w połączeniu z wybielaczem. W przypadku rozlania buforu do wiązania (BR2) lub buforu płuczącego 1 (BR3) należy usunąć go za pomocą odpowiedniego detergentu laboratoryjnego i wody. W przypadku rozlania płynu zawierającego czynniki potencjalnie zakaźne należy wyczyścić zalany obszar najpierw detergentem laboratoryjnym i wodą, a następnie 1-procentowym (stężenie objętościowe) podchlorynem sodu (wybielaczem).

Mieszaninę roztworu do stabilizacji RNA i krwi z próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) można zdezynfekować, używając 1 objętości dostępnego w handlu roztworu wybielacza (5-procentowy podchloryn sodu) na 9 objętości mieszaniny roztworu do stabilizacji RNA i krwi.

Odpady powstałe po przygotowaniu próbek, takie jak supernatanty z etapów wirowania wykonywanych w procedurze oczyszczania RNA, należy uznawać za materiały potencjalnie zakaźne. Przed utylizacją odpadów należy wysterylizować je w autoklawie lub spalić, aby zniszczyć wszelkie materiały zakaźne. Utylizację należy przeprowadzać zgodnie z obowiązującymi przepisami.

Do składników zestawu PAXgene Blood RNA Kit mają zastosowanie następujące zwroty wskazujące na zagrożenia i określające środki ostrożności. Informacje dotyczące bezpieczeństwa probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawiera dokument *PAXgene Blood RNA Tube — Instrukcja obsługi*.

Bufor BR2



Zawiera: tiocyjanian guanidyny. Niebezpieczeństwo! Działa szkodliwie po połknięciu. Może działać szkodliwie w kontakcie ze skórą lub w przypadku wdychania. Powoduje poważne uszkodzenie oczu. Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są założone i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem.

Bufor BR3



Zawiera: etanol; tiocyjanian guanidyny. Niebezpieczeństwo! Łatwopalna ciecz i opary. Powoduje poważne uszkodzenie oczu. W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. Trzymać z dala od źródeł ciepła/isquier/otwartego ognia/gorących powierzchni. Nie palić papierosów. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są założone i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem.

DNaza I



Zawiera: DNazę. Niebezpieczeństwo! Może powodować reakcję alergiczną skóry. Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgiełki/par/rozpylonej cieczy. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. W PRZYPADKU narażenia lub problemów: Skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub z lekarzem. Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie.

Proteinaza K



Zawiera: proteinazę K. Niebezpieczeństwo! Powoduje łagodne podrażnienie skóry. Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgiełki/par/rozpylonej cieczy. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. W PRZYPADKU narażenia lub problemów: Skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub z lekarzem. Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie.

Wstęp

Pobranie krwi pełnej to pierwszy etap wielu oznaczeń molekularnych wykonywanych w celu badania RNA komórkowego. Jednakże poważnym problemem występującym w takich eksperymentach jest niestabilność profilu RNA komórkowego w warunkach *in vitro*. W badaniach przeprowadzonych w firmie PreAnalytiX wykazano, że liczba kopii poszczególnych rodzajów mRNA w krwi pełnej może zmienić się ponad 1000-krotnie podczas przechowywania lub transportowania próbki w temperaturze pokojowej.* Jest to spowodowane szybkim rozkładem RNA oraz indukowaną ekspresją określonych genów po pobraniu krwi. Takie zmiany profilu ekspresji RNA uniemożliwiają prowadzenie wiarygodnych badań ekspresji genów. Z tego względu w celu dokładnej analizy ekspresji genów w ludzkiej krwi pełnej kluczowe jest zastosowanie metody, która umożliwia zachowanie profilu ekspresji RNA podczas i po pobraniu krwi.

Zasada działania i procedura

Firma PreAnalytiX opracowała system, który umożliwia pobranie, stabilizację, przechowywanie i transport próbek ludzkiej krwi pełnej, wraz z szybkim i wydajnym protokołem oczyszczania RNA wewnątrzkomórkowego. System wymaga użycia probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; patenty w Stanach Zjednoczonych o numerach 6,602,718 i 6,617,170) do pobierania krwi i stabilizacji RNA, a następnie ręcznego lub zautomatyzowanego oczyszczenia RNA za pomocą zestawu PAXgene Blood RNA Kit. Protokół ręczny i protokół zautomatyzowany zapewniają zasadniczo równoważną skuteczność pod względem jakości i uzysku RNA. W niniejszej instrukcji obsługi zawarto dane skuteczności dla protokołu ręcznego (strony 22–29) i protokołu zautomatyzowanego (strony 31–35).



Aparat QIAGEN QIAcube Connect MDx nie jest dostępny we wszystkich krajach. Aby uzyskać więcej informacji, należy skontaktować się z serwisem technicznym firmy QIAGEN.

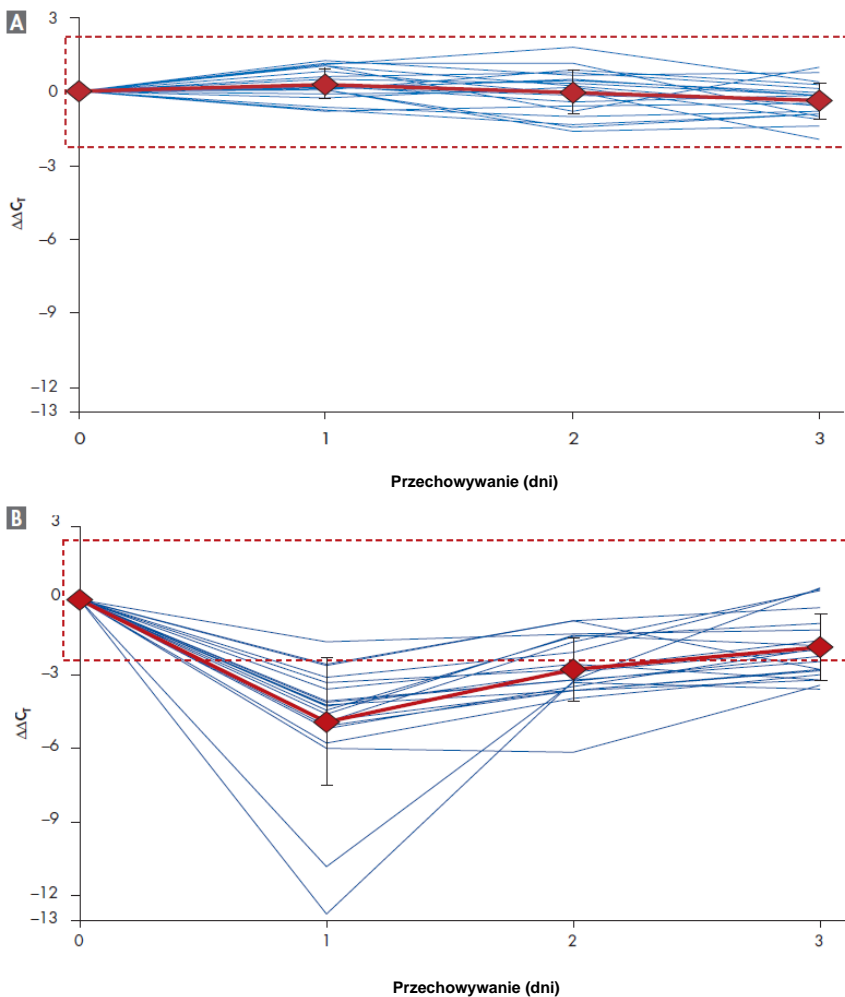
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin. Chem.* **48**, 1883.

Pobieranie i stabilizacja próbek

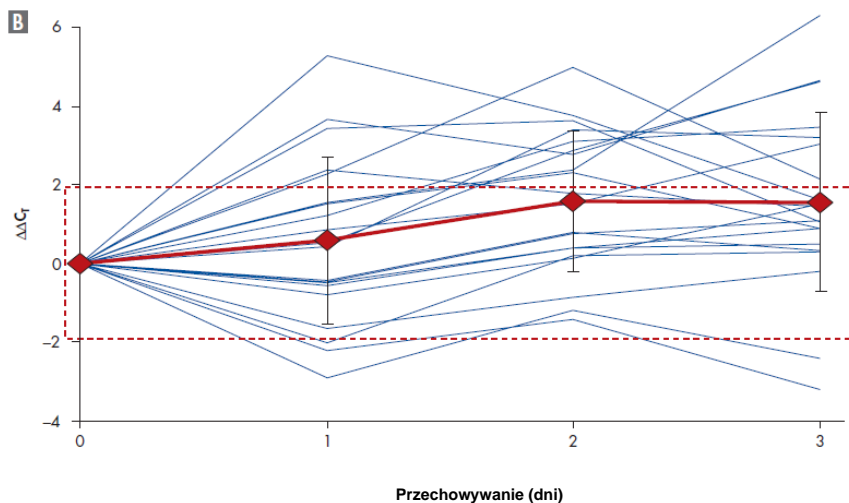
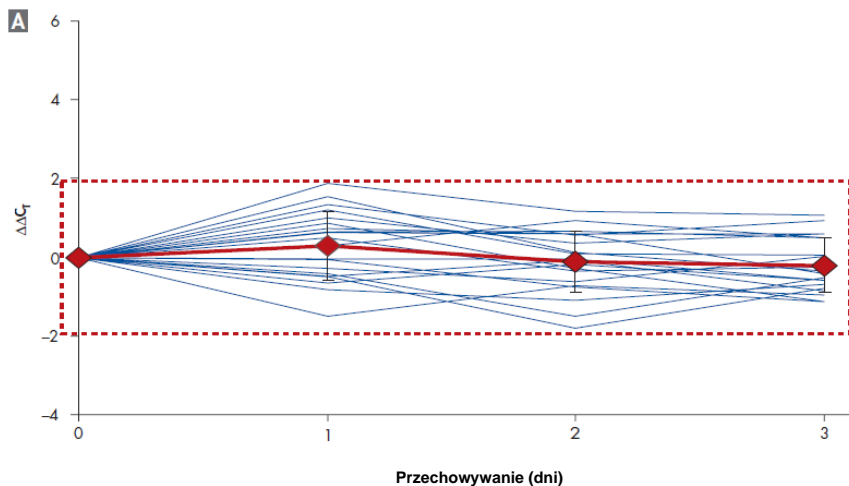
Probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawierają zastrzeżoną mieszaninę odczynników opracowaną na podstawie opatentowanej technologii stabilizacji RNA. Ta mieszanina odczynników chroni cząsteczki RNA przed rozkładem przez RNazy i minimalizuje zmiany w ekspresji genów zachodzące pozaustrojowo. Probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) są przeznaczone do pobierania ludzkiej krwi pełnej i stabilizacji RNA komórkowego przez maksymalnie 3 dni w temperaturze 18–25°C (Ryc. 1 i 2, strony 15 i 16) lub przez maksymalnie 5 dni w temperaturze 2–8°C (Ryc. 3 i 4, strony 17 i 18). Aktualnie dostępne dane wskazują, że możliwa jest stabilizacja RNA przez co najmniej 11 lat w temperaturze –20°C lub –70°C*. Aby uzyskać więcej danych z trwających badań dotyczących oceny stabilności próbek w dłuższej perspektywie czasowej, należy skontaktować się z działem serwisu technicznego firmy QIAGEN.

Rzeczywisty okres stabilizacji RNA może różnić się w zależności od rodzaju RNA komórkowego i jego dalszego zastosowania. Ze względu na ograniczoną liczbę transkryptów zwalidowanych pod kątem specyfikacji stabilizacji (transkrypty genów FOS i IL1B) nie określono parametrów skuteczności dla wszystkich transkryptów. W celu określenia, czy konieczne jest przeprowadzenie walidacji dla innych transkryptów, użytkownik powinien dokonać przeglądu danych producenta oraz własnych danych.

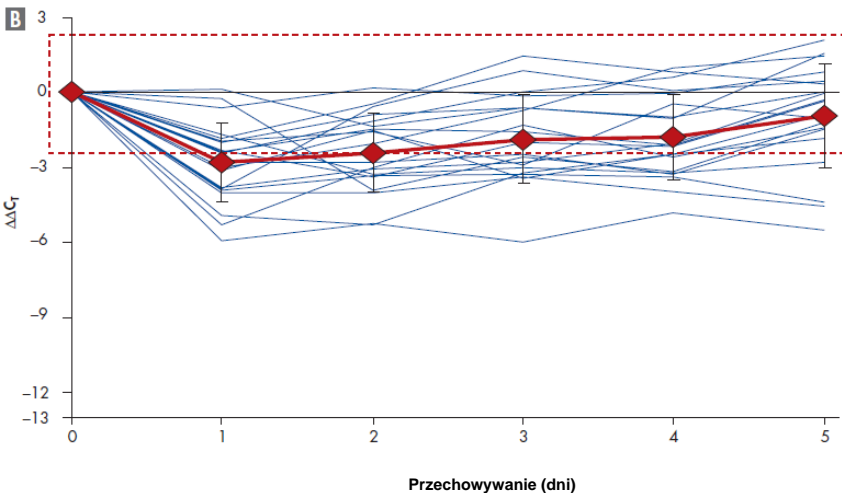
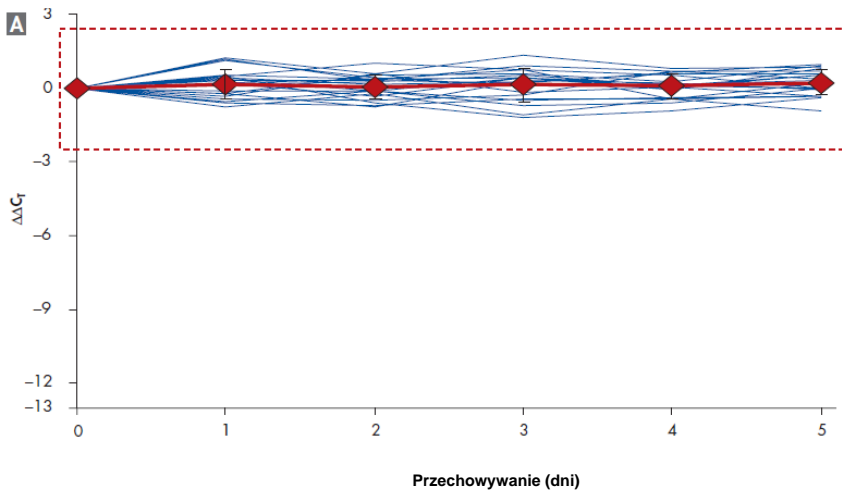
* Obecnie trwa długoterminowe badanie przechowywania krwi w probówkach PAXgene Blood RNA Tubes.



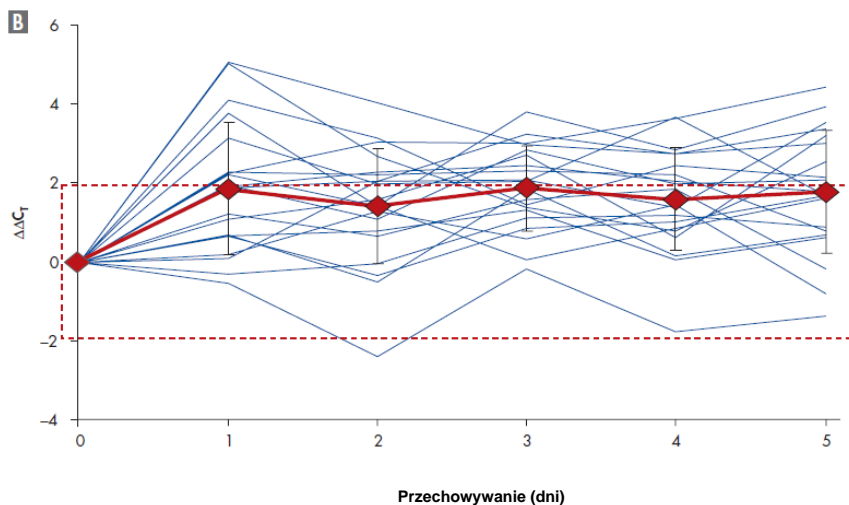
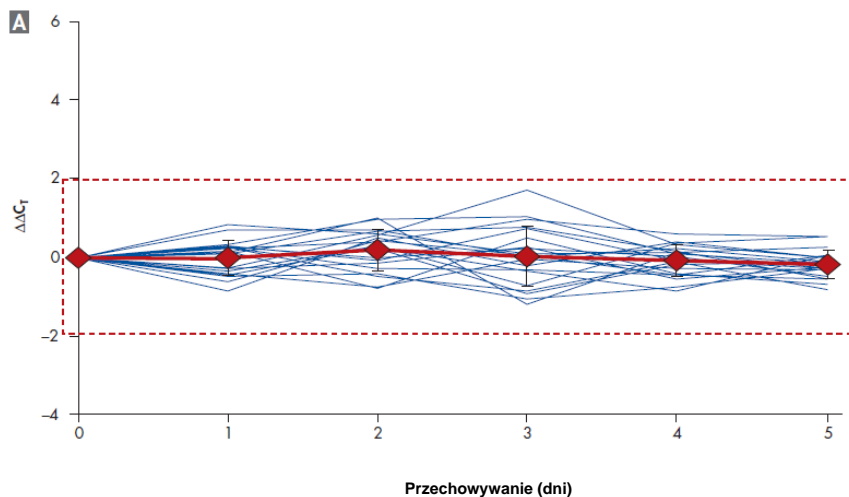
Ryc. 1. Stabilność RNA w próbkach krwi w temperaturze 18–25°C: FOS. Pobrano krew od 10 dawców i otrzymane próbki przechowywano (w dwóch powtórzeniach) w temperaturze 18–25°C przez wskazaną liczbę dni, po której wykonywano oczyszczenie całkowitego RNA. **[A]** Krew pobrano i przechowywano w probówkach PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a następnie oczyszczono całkowity RNA za pomocą zestawu PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krew pobrano i przechowywano w standardowych probówkach do pobierania krwi z EDTA jako antykoagulantem, a następnie oczyszczono całkowity RNA, stosując standardową metodę ekstrakcji związków organicznych z oczyszczeniem RNA na membranie krzemionkowej. Względne poziomy transkryptów FOS określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi wszystkich próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3x$ całkowitą precyzję oznaczenia ($2,34 C_t$).



Ryc. 2. Stabilność RNA w próbkach krwi w temperaturze 18–25°C: IL1B. Pobrano krew i oczyszczono całkowitą RNA po przechowywaniu próbek w temperaturze 18–25°C, zgodnie z opisem na Ryc. 1. Względne poziomy transkryptów IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi wszystkich próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3x$ całkowitą precyzję oznaczenia ($1,93 C_T$).



Ryc. 3. Stabilność RNA w próbkach krwi w temperaturze 2–8°C: FOS. Pobrano krew od 10 dawców i otrzymane próbki przechowywano (w dwóch powtórzeniach) w temperaturze 2–8°C przez wskazaną liczbę dni, po której wykonywano oczyszczenie całkowitego RNA. **[A]** Krew pobrano i przechowywano w próbkach PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a następnie oczyszczono całkowity RNA za pomocą zestawu PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krew pobrano i przechowywano w standardowych próbkach do pobierania krwi z EDTA jako antykoagulantem, a następnie oczyszczono całkowity RNA, stosując standardową metodę ekstrakcji związków organicznych z oczyszczeniem RNA na membranie krzemionkowej. Względne poziomy transkryptów FOS określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi wszystkich próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3x$ całkowitą precyzję oznaczenia ($2,34 C_T$).



Ryc. 4. Stabilność RNA w próbkach krwi w temperaturze 2–8°C: IL1B. Pobrano krew i oczyszczono całkowity RNA po przechowywaniu próbek w temperaturze 2–8°C, zgodnie z opisem na Ryc. 3. Względne poziomy transkryptów IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi wszystkich próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3x$ całkowitą precyzję oznaczenia ($1,93 C_T$).

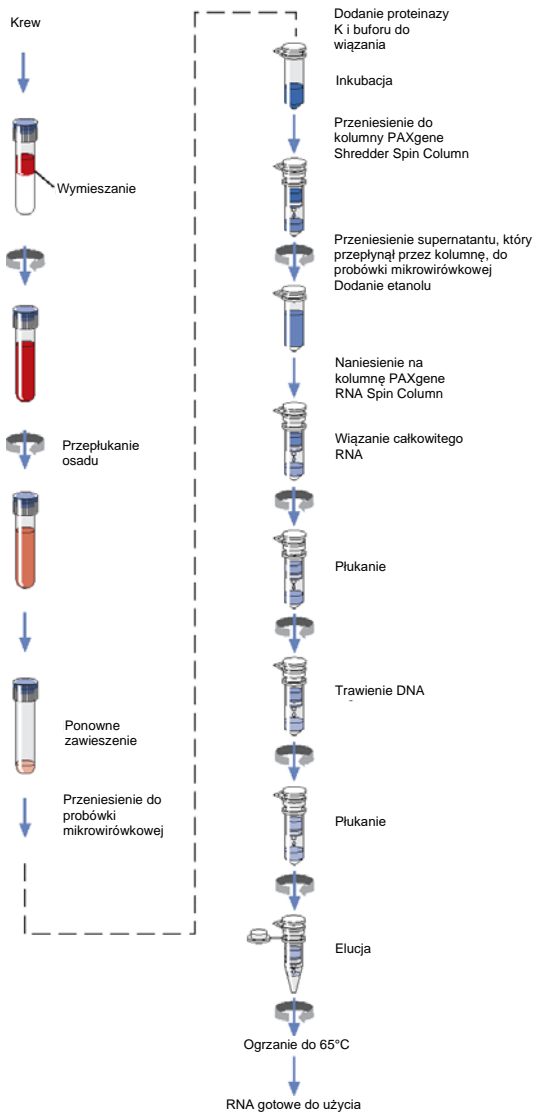
Zatężanie i oczyszczanie RNA

Zestaw PAXgene Blood RNA Kit jest przeznaczony do oczyszczania całkowitego RNA z 2,5 ml ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Procedura ta jest prosta i może być wykonywana w sposób ręczny lub zautomatyzowany (patrz Ryc. 5 i 10, strony 20 i 30). W obu protokołach oczyszczanie rozpoczyna się od etapu wirowania wykonywanego w celu osadzenia kwasów nukleinowych w probówce PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Osad jest przepłukiwany i zawieszony ponownie, a następnie wykonywane jest ręczne lub zautomatyzowane oczyszczenie RNA. Co do zasady, oba protokoły obejmują te same etapy protokołu, w których stosowane są te same składniki zestawu.

Ręczne oczyszczanie RNA

W ujęciu szczegółowym, zawieszony osad jest inkubowany w zoptymalizowanych buforach z proteinazą K (PK) w celu wytrawienia białek. W celu zhomogenizowania lizatu komórkowego i usunięcia pozostałości komórek wykonywany jest dodatkowy etap wirowania przez kolumnę wirówkową PAXgene Shredder (PSC), a supernatant frakcji, która przepływa przez kolumnę, jest przenoszony do świeżej probówki mikrowirówkowej. W celu dostosowania warunków wiązania dodawany jest etanol, a lizat jest nanoszony na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC). Podczas krótkiego wirowania RNA selektywnie wiąże się do membrany krzemionkowej PAXgene, a zanieczyszczenia przepływają przez kolumnę. Pozostałe zanieczyszczenia są usuwane w kilku wydajnych etapach płukania. Między pierwszym a drugim etapem płukania membrana jest poddawana działaniu DNazy I (RNFD) w celu usunięcia śladowych ilości związanego DNA. Po etapach płukania RNA jest eluowany za pomocą buforu do elucji (BR5) i poddawany denaturacji cieplnej.

Całkowity RNA wyizolowany za pomocą systemu PAXgene Blood RNA System jest czysty. W przypadku stosowania protokołu ręcznego wartości A_{260}/A_{280} mieszczą się w zakresie od 1,8 do 2,2, a DNA genomowy jest obecny w stężeniu $\leq 1\%$ (stężenie procentowe wagowe) w $\geq 95\%$ spośród wszystkich próbek, co zmierzono, wykonując ilościową reakcję real-time PCR dla sekwencji genu beta-aktyny. W co najmniej 95% spośród próbek nie zaobserwowano inhibicji reakcji RT-PCR w przypadku stosowania do 30% eluatu.

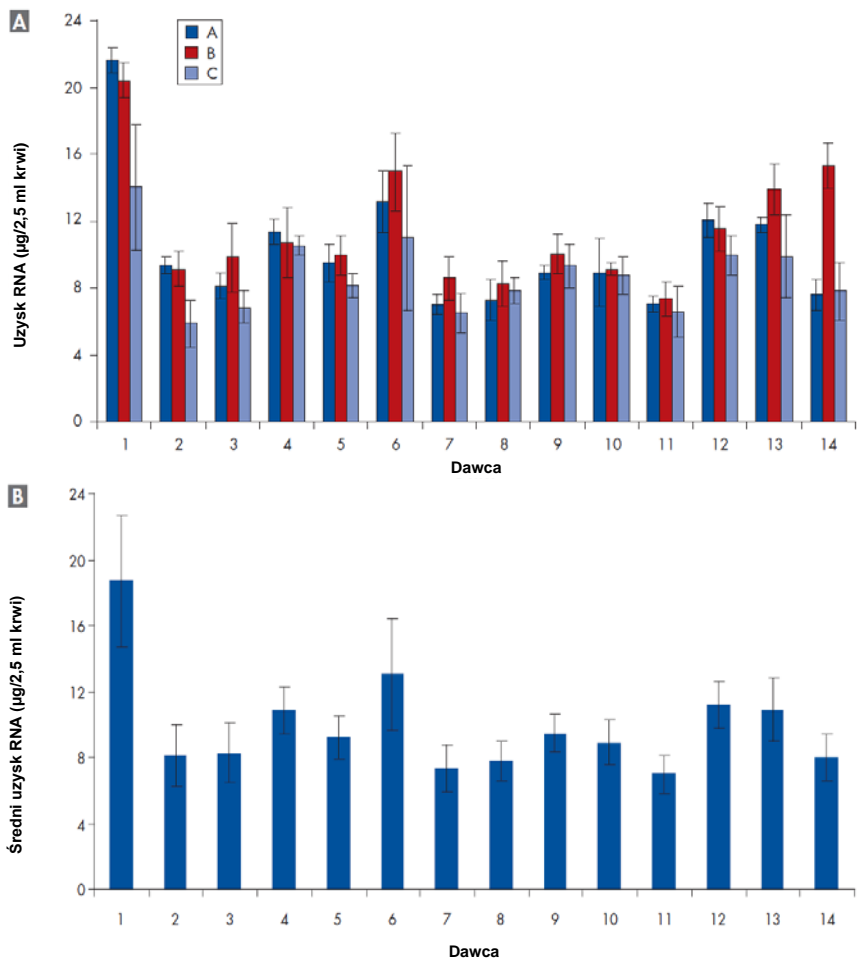


Ryc. 5. Ręczna procedura PAXgene Blood RNA.

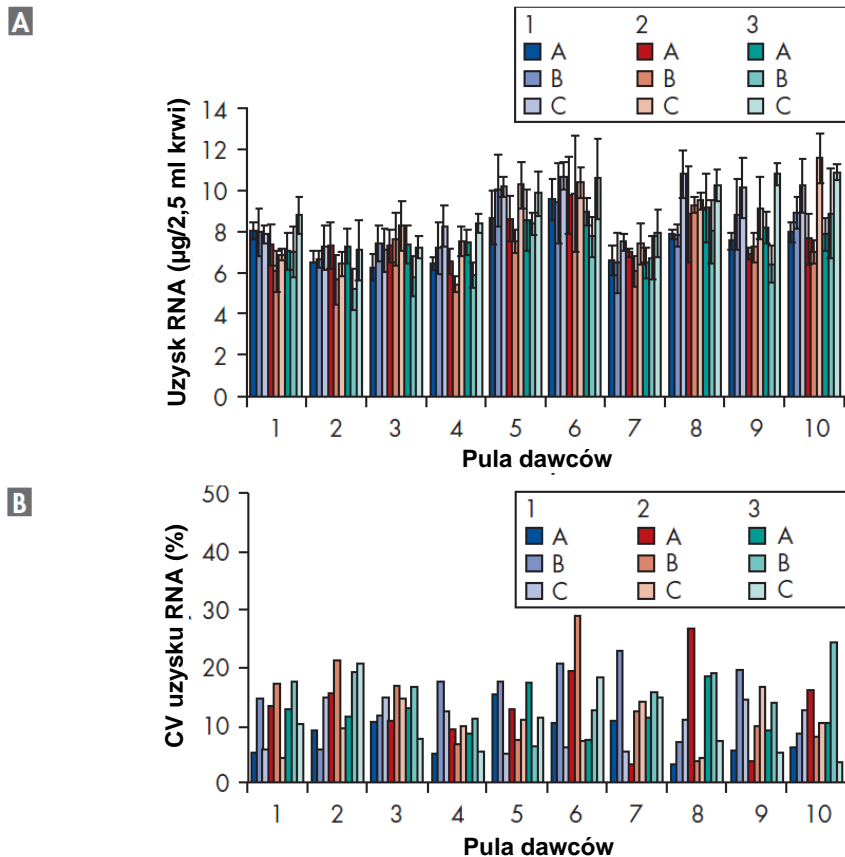
W przypadku stosowania protokołu ręcznego średni czas przygotowania próbki (na podstawie danych uzyskanych z 12 cykli przygotowań próbek) wynosi około 90 minut*, przy czym czas pracy ręcznej wynosi jedynie 40 minut. Uzyski RNA z 2,5 ml ludzkiej krwi pełnej są $\geq 3 \mu\text{g}$ dla $\geq 95\%$ spośród przetworzonych próbek. Ze względu na to, że uzyski zależą w znacznym stopniu od dawcy, poszczególne uzyski mogą się różnić między sobą. System PAXgene Blood RNA zapewnia wysoką odtwarzalność i powtarzalność uzysków (Ryc. 6 i 7, strony 22 i 23) oraz odtwarzalność i powtarzalność reakcji RT-PCR (Ryc. 8 i 9, strony 27 i 28) dla poszczególnych dawców, co sprawia, że jest wysoce skuteczny w przypadku klinicznych testów diagnostycznych.

Ryc. 6 (strona 22) wskazuje ogólną powtarzalność i odtwarzalność systemu PAXgene Blood RNA System. Wykonano dodatkowe badania w celu wykazania wpływu różnych serii zestawu PAXgene Blood RNA oraz różnych operatorów na odtwarzalność uzysku RNA i wydajność reakcji real-time RT-PCR. Ze względu na to, że do badań tych używano zbiorczych próbek krwi, a nie pojedynczych probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), wyniki nie odzwierciedlają powtarzalności systemu, w tym zmienności między poszczególnymi pobraniami krwi, ale jedynie powtarzalność przygotowania próbek (patrz Ryc. 7, strona 23).

* Całkowity czas trwania protokołu, w tym początkowe etapy postępowania z próbkami PAXgene Blood RNA Tubes (wirowania, przepłukiwanie osadu i ponowne zawieszanie osadu).



Ryc. 6. Odtwarzalne i powtarzalne oczyszczenie RNA. Każdy z 3 techników (A, B, C) przetworzył ręcznie po cztery próbki krwi od każdego z 14 dawców. Używano trzech zestawów wyposażenia, a wszystkie próbki przygotowane przez danego technika były przetwarzane za pomocą tego samego wyposażenia. **[A]** Przedstawiono średnie i odchylenia standardowe uzysku RNA dla powtórzeń próbek pobranych od tych samych dawców, przetwarzanych przez różnych techników. **[B]** 3 różnych techników przetworzyło po dwanaście powtórzeń próbek krwi od każdego z 14 dawców. Przedstawiono średnie i odchylenia standardowe uzysku RNA dla próbek pobranych od tych samych dawców, przetwarzanych przez wszystkich techników. Dla wszystkich próbek RNA wartości stosunku A_{260}/A_{280} mieściły się w zakresie od 1,8 do 2,2.



Ryc. 7. Powtarzalność i odtwarzalność uzysku RNA dla różnych operatorów i serii zestawu PAXgene Blood RNA Kit przy użyciu zbiorczych próbek krwi. Próbkę krwi pobrane od 30 różnych dawców zebrano do probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 probówek na dawcę, łącznie 360 probówek). Zawartość probówek zawierających próbki od 3 dawców połączono w jedną próbkę, a następnie ponownie rozdzielono na 36 próbek. 3 różnych operatorów przetworzyło ręcznie te 36 próbek otrzymanych z puli 3 dawców. Każdy operator używał 3 różnych serii zestawu PAXgene Blood RNA Kit do ekstrakcji i przetwarzania czterech powtórzeń próbek z każdej z 10 pul dawców. **[A]** Uzysk RNA i odchylenie standardowe dla każdej kombinacji operator-seria. 3 różnych operatorów (A, B, C) przetworzyło po cztery powtórzenia próbek krwi z 10 pul dawców, używając każdej z 3 serii zestawu (1, 2, 3). Przedstawiono średnie uzyski (kolumny) i odchylenia standardowe (słupki błędów) otrzymane na podstawie czterech powtórzeń próbki z tej samej puli dawców dla różnych operatorów i różnych serii zestawu. **[B]** Wartość CV uzysku RNA na pulę dawców dla wszystkich kombinacji operator-seria (A, B, C; 1, 2, 3) obliczona na podstawie wartości średniego uzysku i odchylenia standardowego uzysku przedstawionych na Ryc. 7A.

Tabela 1A. Odtwarzalność w obrębie każdej serii i dla każdego użytkownika dla wybranych pul dawców (1, 6, 9, 10)

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

Tabela 1B. Odtwarzalność dla każdego użytkownika i między wszystkimi seriami dla wybranych pul dawców (1, 6, 9, 10)

Kombinacja danych	Pula dawców 1 5,1 x 10 ⁶ komórek/ml			Pula dawców 6 6,5 x 10 ⁶ komórek/ml		
	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)
Użytkownik A, wszystkie serie	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Użytkownik B, wszystkie serie	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Użytkownik C, wszystkie serie	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombinacja danych	Pula dawców 9 8,4 x 10 ⁶ komórek/ml			Pula dawców 10 10,2 x 10 ⁶ komórek/ml		
	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)
Użytkownik A, wszystkie serie	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Użytkownik B, wszystkie serie	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Użytkownik C, wszystkie serie	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

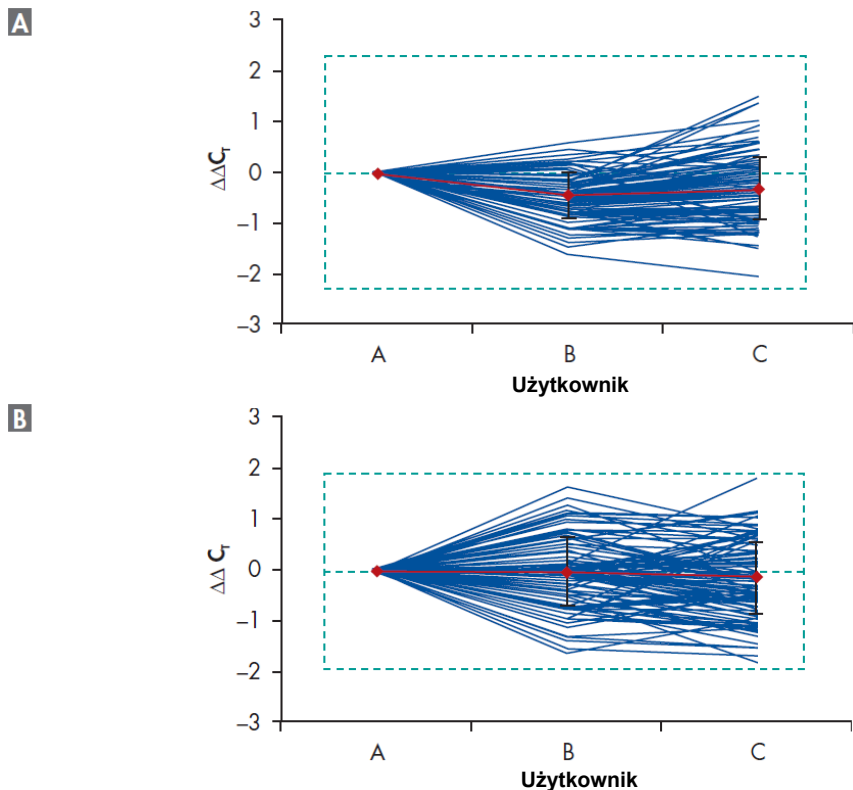
Tabela 1C. Odtwarzalność w obrębie każdej serii i między wszystkimi użytkownikami dla wybranych pul dawców (1, 6, 9, 10)

Kombinacja danych	Pula dawców 1 5,1 x 10 ⁶ komórek/ml			Pula dawców 6 6,5 x 10 ⁶ komórek/ml		
	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)
Seria 1, wszyscy użytkownicy	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Seria 2, wszyscy użytkownicy	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Seria 3, wszyscy użytkownicy	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombinacja danych	Pula dawców 9 8,4 x 10 ⁶ komórek/ml			Pula dawców 10 10,2 x 10 ⁶ komórek/ml		
	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)
Seria 1, wszyscy użytkownicy	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Seria 2, wszyscy użytkownicy	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Seria 3, wszyscy użytkownicy	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

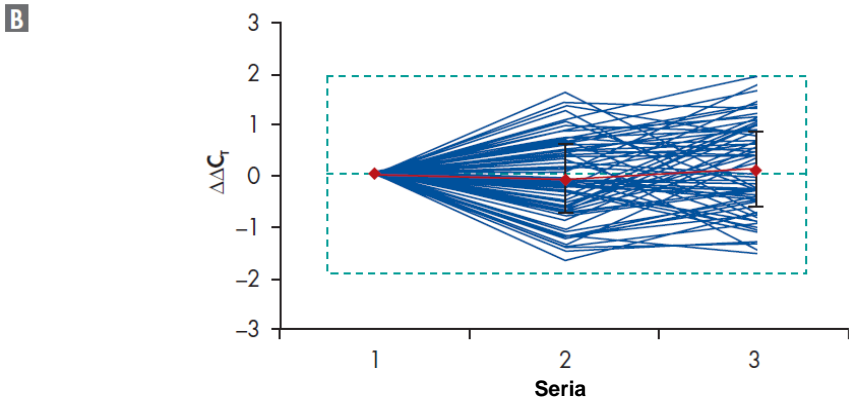
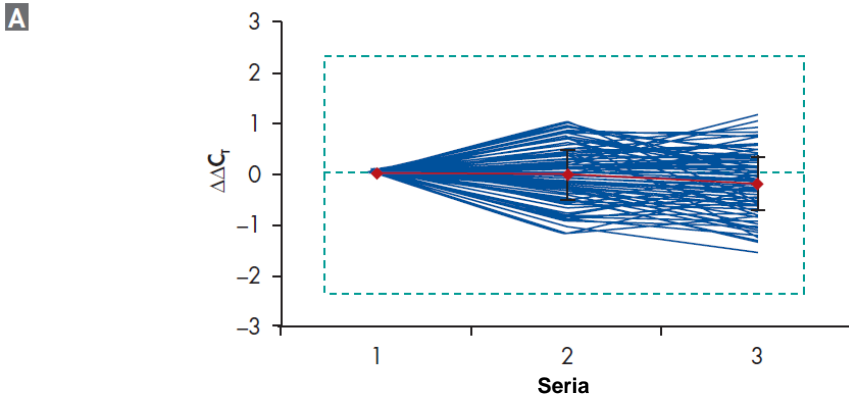
Tabela 1D. Odtwarzalność między wszystkimi seriami i wszystkimi użytkownikami dla wybranych pul dawców (1, 6, 9, 10)

Kombinacja danych	Pula dawców 1 5,1 x 10 ⁶ komórek/ml			Pula dawców 6 6,5 x 10 ⁶ komórek/ml		
	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)
Seria 1, wszyscy użytkownicy	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Kombinacja danych	Pula dawców 9 8,4 x 10 ⁶ komórek/ml			Pula dawców 10 10,2 x 10 ⁶ komórek/ml		
	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)
Seria 1, wszyscy użytkownicy	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Szczegółowa analiza 4 reprezentatywnych pul dawców. Pule te wybrano na podstawie liczby białych krwinek w taki sposób, aby odzwierciedlały górną, średnią i dolną wartość zakresu prawidłowego liczby białych krwinek (4,8 x 10⁶–1,1 x 10⁷ leukocytów/ml). Liczba białych krwinek reprezentuje średnią wartość obliczoną na podstawie 3 wyników liczby białych krwinek otrzymanych dla próbek 3 różnych dawców na pulę dawców.



Ryc. 8. Odtwarzalność reakcji RT-PCR — między użytkownikami. Do reakcji real-time RT-PCR wykorzystano RNA oczyszczony w eksperymencie opisanym na Ryc. 7. Względne poziomy transkryptów **[A] FOS** i **[B] IL1B** określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres w odniesieniu do wartości dla użytkownika A (10 puł dawców x 3 serie zestawu x 4 powtórzenia = 120 zestawów danych dla każdego genu), ze średnimi (czerwone linie) i odchyleniami standardowymi (czarne słupki) dla wszystkich przedstawionych próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3x$ całkowitą precyzję oznaczeń (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Ryc. 9. Odtwarzalność reakcji RT-PCR — między seriami zestawu. Do reakcji real-time RT-PCR wykorzystano RNA oczyszczony w eksperymencie opisanym na Ryc. 7. Względne poziomy transkryptów **[A]** FOS i **[B]** IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres w odniesieniu do wartości dla serii 1 zestawu (10 puł dawców x 3 użytkowników x 4 powtórzenia = 120 zestawów danych dla każdego genu), ze średnimi (czerwone linie) i odchyleniami standardowymi (czarne słupki) dla wszystkich przedstawionych próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3x$ całkowitą precyzję oznaczeń (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Tabela 2. Podsumowanie danych dla reakcji RT-PCR z Ryc. 8 i 9

System testowy	Oznaczenie FOS/18S rRNA		Oznaczenie IL1B/18S rRNA	
	Średnia ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Średnia ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Porównanie danych				
Odtwarzalność dla każdego użytkownika i między wszystkimi seriami				
Wszyscy użytkownicy, seria 1–seria 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Wszyscy użytkownicy, seria 1–seria 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Wszyscy użytkownicy, seria 1–seria 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Odtwarzalność dla każdego użytkownika i między wszystkimi seriami				
Wszystkie serie, użytkownik A–użytkownik A	0,00	0,00	0,00	0,00
Wszystkie serie, użytkownik A–użytkownik B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Wszystkie serie, użytkownik A–użytkownik C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Użytkownik: technik, osoba przeprowadzająca badanie.

Seria: numer serii zestawu używanego podczas badania.

SD: odchylenie standardowe.

Przedstawiono średnie wartości $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) i odchylenia standardowe dla danych przedstawionych na Ryc. 8 i 9.

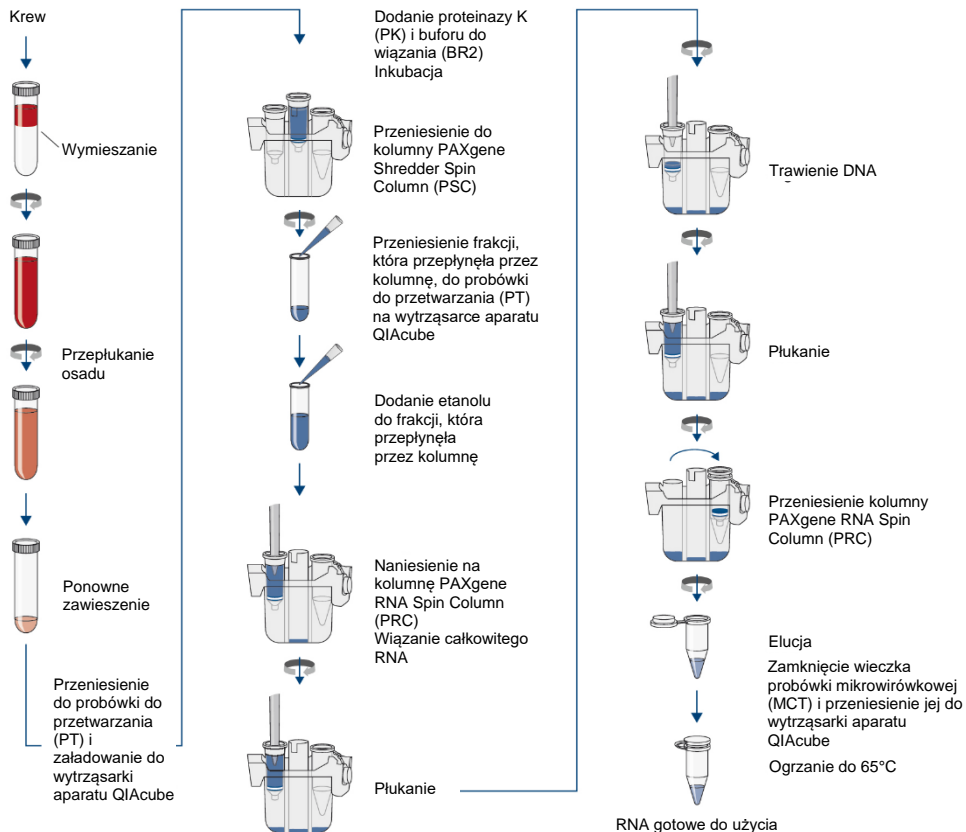
Zautomatyzowane oczyszczanie RNA

Oczyszczanie RNA z krwi odbywa się w sposób zautomatyzowany w aparacie QIAGEN QIAcube Connect MDx lub w klasycznym aparacie QIAGEN QIAcube (dalej określanym jako QIAcube). Innowacyjne aparaty QIAcube wykorzystują zaawansowaną technologię do przetwarzania kolumn wirówkowych QIAGEN, umożliwiając płynną integrację niskoprzepustowego, zautomatyzowanego przygotowywania próbek z pracą laboratoryjną. Przygotowanie próbek za pomocą aparatów QIAcube obejmuje te same etapy co procedura ręczna (tzn. lizę, wiązanie, płukanie i elucję), umożliwiając dalsze korzystanie z zestawu PAXgene Blood RNA Kit do oczyszczania w celu otrzymania RNA o wysokiej jakości.



Ryc. 10. QIAcube Connect MDx.

Zautomatyzowany protokół oczyszczania RNA składa się z 2 części (protokołów), „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA — część A) i „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA — część B), między którymi wymagane jest wykonanie krótkich czynności ręcznych (patrz Ryc. 11, strona 31).



Ryc. 11. Zautomatyzowana procedura PAXgene Blood RNA.

Odwirowany, przeplukany i ponownie zawieszony osad kwasu nukleinowego (patrz „Zaęzanie i oczyszczanie RNA”, strona 19) jest przenoszony z próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) do próbek do przetwarzania (PT), które są umieszczane w module wytrząsarki termicznej na stole roboczym aparatu QIAcube. Operator wybiera i uruchamia protokół „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA — część A) z menu. Aparaty QIAcube wykonują etapy protokołu aż do etapu elucji RNA w buforze do elucji (BR5).

Operator przenosi próbki mikrowirówkowe (MCT) zawierające oczyszczony RNA do modułu wytrząsarki termicznej aparatów QIAcube. Operator wybiera i uruchamia protokół „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA — część B) z menu, a aparaty QIAcube wykonują denaturację cieplną.

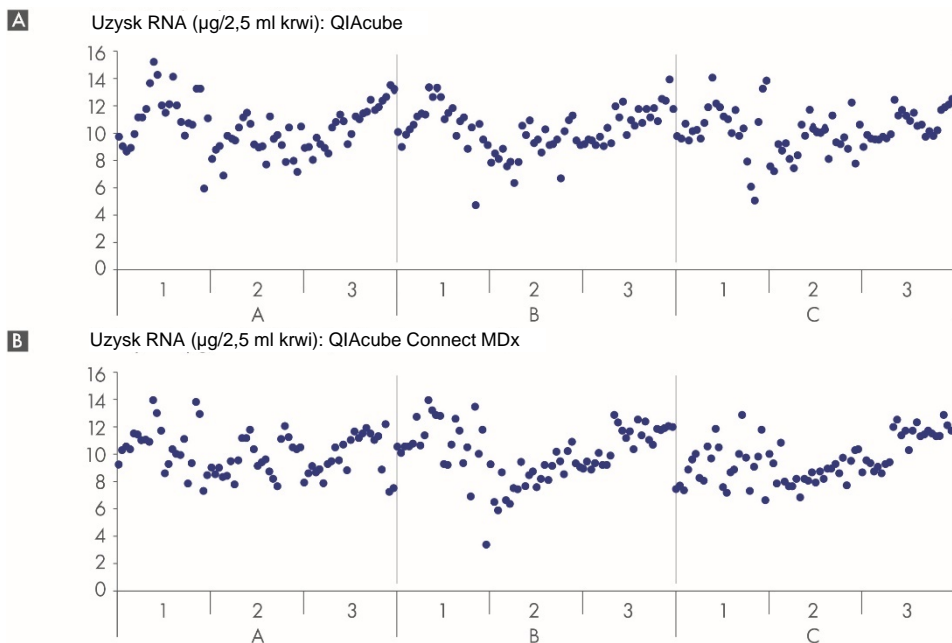
Średni czas przygotowania próbki (na podstawie danych z 12 cykli przygotowań próbek) wynosi 151 minut*, przy istotnie krótszym czasie pracy ręcznej w porównaniu do protokołu ręcznego.

Uzyski RNA z 2,5 ml ludzkiej krwi pełnej są ≥ 3 μg dla $\geq 95\%$ spośród przetworzonych próbek. Ryc. 12 (strona 33) wskazuje uzyski RNA z łącznie 216 próbek przygotowanych za pomocą protokołu zautomatyzowanego przy użyciu 3 serii zestawu przez 3 operatorów. Ze względu na to, że do tych badań używano zbiorczych próbek krwi, a nie pojedynczych próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), wyniki nie odzwierciedlają uzysku RNA oczekiwanego dla pojedynczych próbek pobranych podczas pojedynczego pobrania krwi. Ze względu na to, że uzyski zależą w znacznym stopniu od dawcy, poszczególne uzyski mogą się różnić między sobą (Ryc. 12, strona 33).

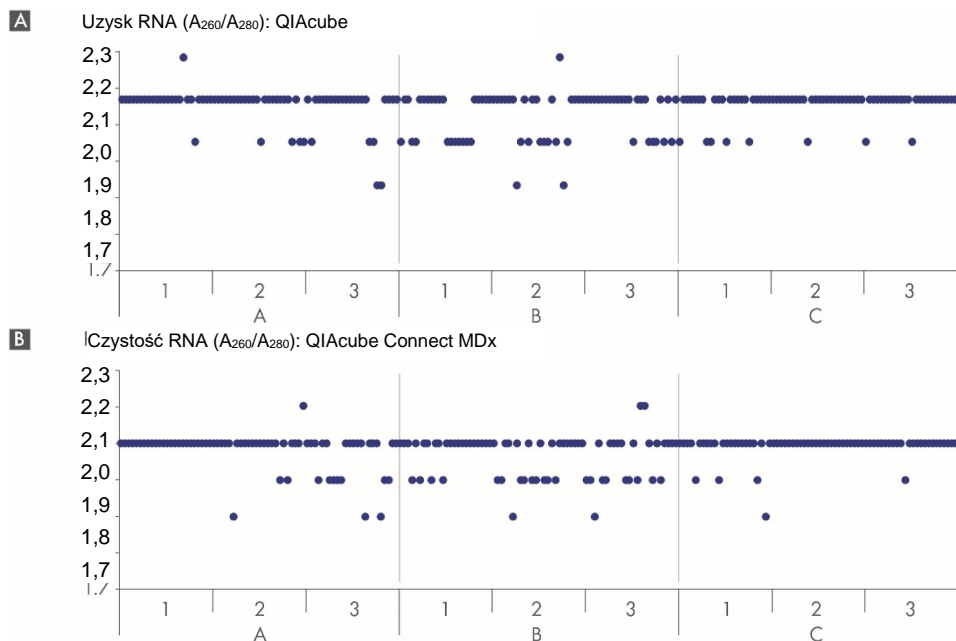
W co najmniej 95% spośród próbek nie zaobserwowano inhibicji reakcji RT-PCR w przypadku stosowania do 30% eluatu. W przypadku stosowania protokołu zautomatyzowanego zanieczyszczenie krzyżowe między próbkami jest niewykrywalne, co zmierzono, wykonując ilościową reakcję real-time RT-PCR dla sekwencji transkryptów ABL1 i FOS w próbkach negatywnych pod względem RNA (woda) sparowanych z próbkami pozytywnymi względem RNA (ludzka krew pełna) podczas tego samego cyklu pracy.

RNA wyizolowane za pomocą systemu PAXgene Blood RNA System i zautomatyzowanego protokołu jest czyste, na co wskazuje brak inhibicji reakcji RT-PCR oraz wartości A_{260}/A_{280} mieszczące się w zakresie od 1,8 do 2,2. DNA genomowy jest obecny w stężeniu $\leq 1\%$ (stężenie procentowe wagowe) w $\geq 95\%$ spośród wszystkich próbek, co zmierzono, wykonując ilościową reakcję real-time PCR dla sekwencji genu beta-aktyny. Na Ryc. 13 i 14 (strony 34 i 35) przedstawiono wartości A_{260}/A_{280} i względny DNA genomowy dla łącznie 216 próbek przygotowanych za pomocą protokołu zautomatyzowanego przy użyciu 3 serii zestawów przez 3 operatorów.

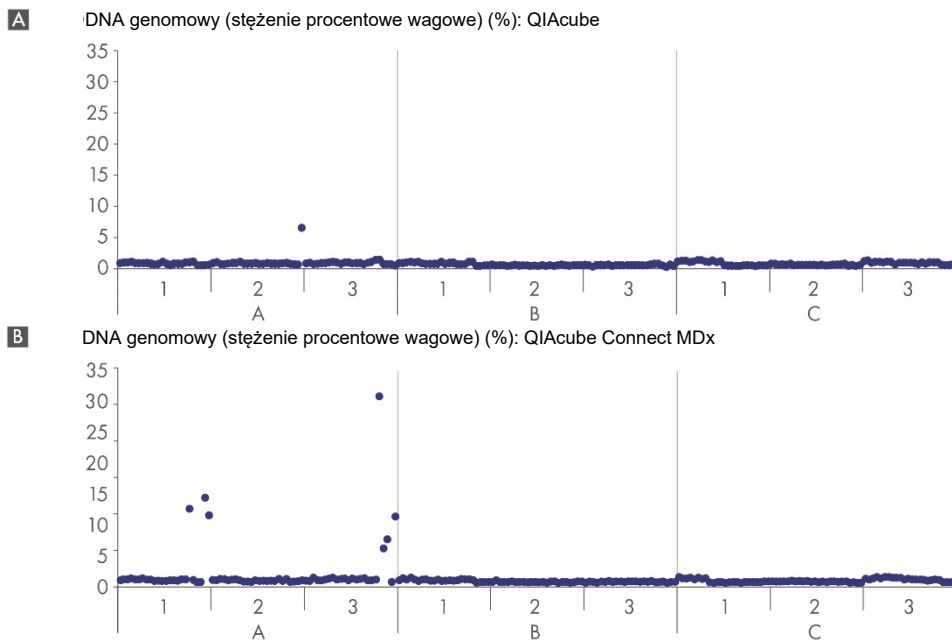
* Całkowity czas trwania protokołu, w tym początkowe etapy postępowania z próbkami PAXgene Blood RNA Tubes (wirowania, przepłukiwanie osadu i ponowne zawieszanie osadu).



Ryc. 12. Uzysk RNA — przetwarzanie zautomatyzowane A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Próbkę od poszczególnych dawców pobrano do próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Zawartość próbek połączono w 6 pul dawców, a następnie ponownie rozdzielono na porcje. 3 różnych operatorów (A, B, C) przetworzyło łącznie 216 próbek (po 36 na pulę). Każdy operator używał 3 różnych serii (1, 2, 3) zestawu PAXgene Blood RNA Kit do zautomatyzowanej ekstrakcji przy użyciu wielu aparatów QIAcube i QIAcube Connect MDx i przetworzył po cztery powtórzenia próbek z każdej z 6 pul dawców. Przedstawiono uzyski RNA dla wszystkich poszczególnych próbek dla każdej kombinacji operator-seria.

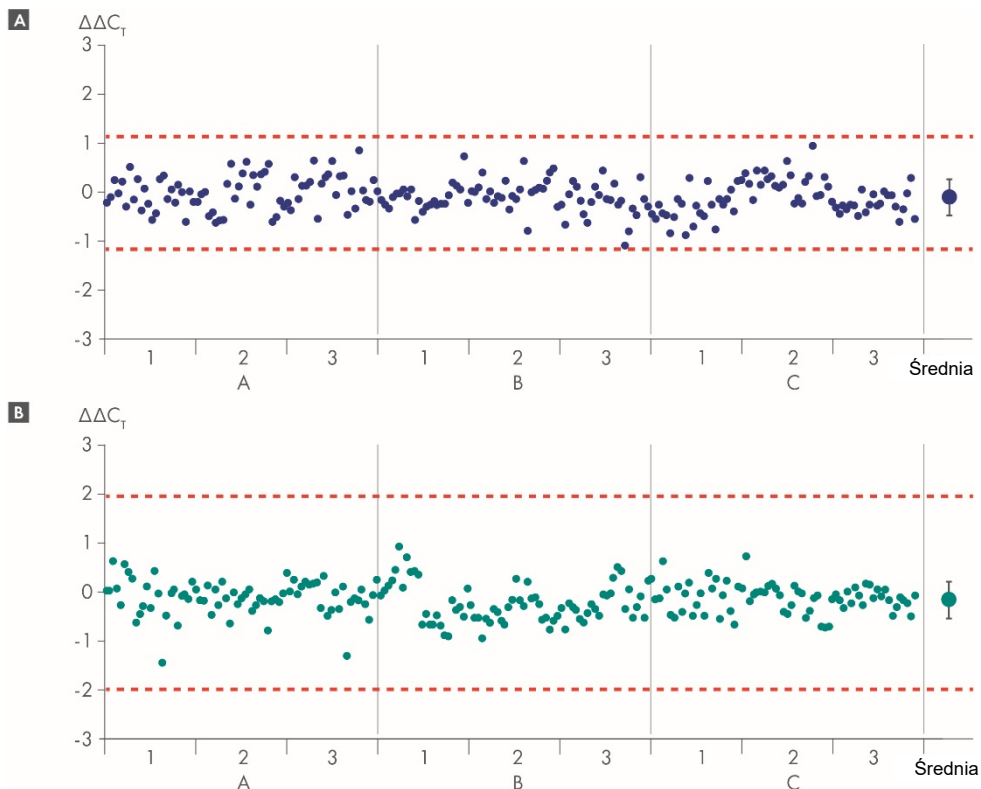


Ryc. 13. Czystość RNA (wartości A_{260}/A_{280}) — przetwarzanie zautomatyzowane. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx 3 różnych operatorów (A, B, C) przeprowadziło oczyszczanie RNA za pomocą 3 różnych serii (1, 2, 3) zestawu PAXgene Blood RNA Kit, używając wielu aparatów QIAcube i QIAcube Connect MDx w eksperymencie opisanym na Ryc. 12. Przedstawiono wartości A_{260}/A_{280} dla wszystkich poszczególnych próbek dla każdej kombinacji operator-seria.

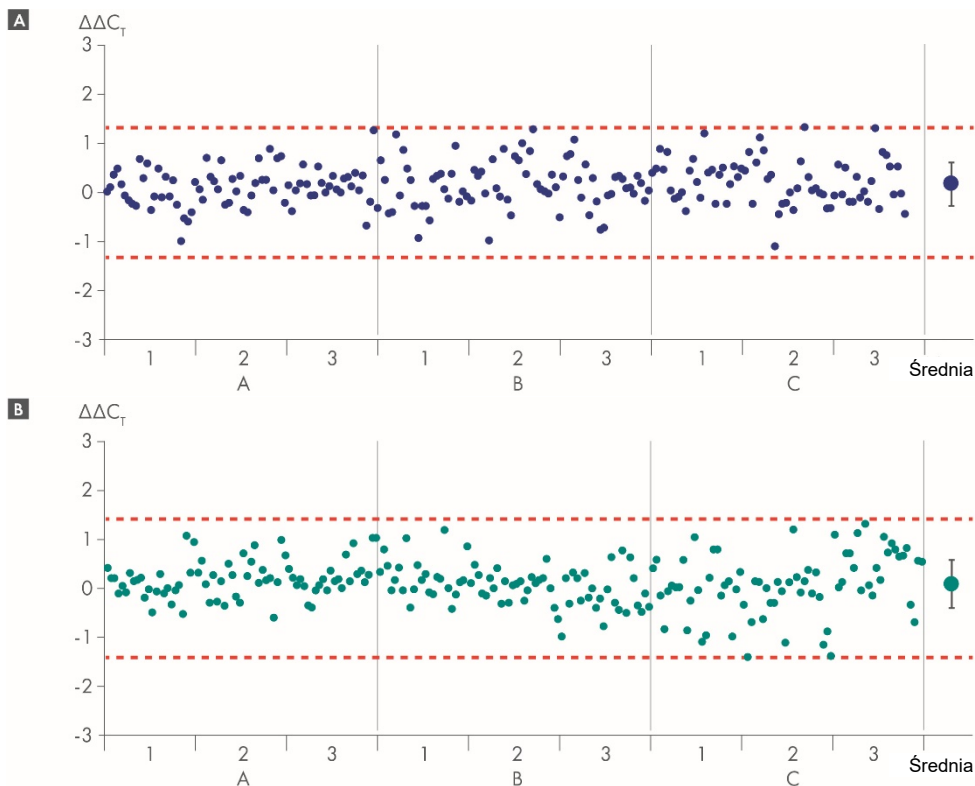


Ryc. 14. Czystość RNA (% zanieczyszczenia DNA genomowym) — przetwarzanie zautomatyzowane, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. 3 różnych operatorów (A, B, C) przeprowadziło oczyszczanie RNA za pomocą 3 różnych serii (1, 2, 3) zestawu PAXgene Blood RNA Kit, używając wielu aparatów QIAcube i QIAcube Connect MDx w eksperymencie opisanym na Ryc. 12. Przedstawiono ilości DNA genomowego (stężenie procentowe wagowe) dla wszystkich poszczególnych próbek dla każdej kombinacji operator-seria.

Protokół zautomatyzowanego oczyszczania RNA za pomocą systemu PAXgene Blood RNA System zapewnia wysoką odtwarzalność i powtarzalność wyników reakcji RT-PCR, jak przedstawiono na Ryc. 15 i Ryc. 16 (strona 36 i 37), co sprawia, że jest wysoce skuteczny w przypadku klinicznych testów diagnostycznych.



Ryc. 15. Odtwarzalność reakcji RT-PCR — między protokołem zautomatyzowanym (QIAcube) a ręcznym. 3 różnych operatorów (A, B, C) przeprowadziło oczyszczanie RNA za pomocą 3 różnych serii (1, 2, 3) zestawu PAXgene Blood RNA Kit, używając wielu aparatów QIAcube oraz QIAcube Connect MDx i protokołu zautomatyzowanego w eksperymencie opisanym na Ryc. 12. Równocześnie oczyszczano RNA z odpowiednich próbek zawierających powtórzenie próbki, używając protokołu ręcznego. Względne poziomy transkryptów **[A]** FOS i **[B]** IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Możliwe różnice poziomu transkryptu pomiędzy RNA przygotowanym ze sparowanych próbek krwi z wykorzystaniem obu protokołów ekstrakcji (automatycznego i ręcznego) obliczono metodą $\Delta\Delta C_T$. Poszczególne wartości $\Delta\Delta C_T$ dla wszystkich par próbek (4 powtórzenia x 6 pul dawców x 3 serie zestawu x 3 operatorów = 216 par dla każdego genu) naniesiono na wykres jako pojedyncze punkty ze średnimi (większe punkty) i odchyleniami standardowymi (czarne słupki) dla wszystkich przedstawionych próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3x$ całkowitą precyzję oznaczeń (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; różne precyzje oznaczenia w porównaniu do Ryc. 1–4, 8 i 9 z powodu różnych wersji oznaczenia).



Ryc. 16. Odtwarzalność reakcji RT-PCR — między aparatem QIAcube a aparatem QIAcube Connect MDx w przypadku użycia protokołu zautomatyzowanego. 3 różnych operatorów (A, B, C) przeprowadziło oczyszczanie RNA za pomocą 3 różnych serii (1, 2, 3) zestawu PAXgene Blood RNA Kit, używając protokołu zautomatyzowanego w wielu aparatach QIAcube i QIAcube Connect MDx w eksperymencie opisanym na Ryc. 12. Względne poziomy transkryptów [A] FOS i [B] IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Możliwe różnice poziomu transkryptu pomiędzy RNA przygotowanym ze sparowanych próbek krwi z wykorzystaniem obu aparatów obliczono metodą $\Delta\Delta C_T$. Poszczególne wartości $\Delta\Delta C_T$ dla wszystkich par próbek (4 powtórzenia x 6 pul dawców x 3 serie zestawu x 3 operatorów = 216 par dla każdego genu) naniesiono na wykres jako pojedyncze punkty ze średnimi (większe punkty) i odchyleniami standardowymi (czarne słupki) dla wszystkich przedstawionych próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3x$ całkowitą precyzję oznaczeń (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; różne precyzje oznaczenia w porównaniu do Ryc. 1–4, 8, 9 i 15 z powodu różnych wersji oznaczenia).

Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Dla wszystkich protokołów

- Probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; nr kat. 762165)
- Etanol (96–100%, stopień czystości cz.d.a.)
- Pipety* (od 10 µl do 4 ml)
- Jałowe końcówki do pipet z barierą aerozoloną, wolne od RNaz[†]
- Cylinder miarowy[‡]
- Wirówka* umożliwiająca wirowanie przy 3000–5000 x g, wyposażona w rotor wychylny i kosze na probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Wytrząsarka*
- Kruszony lód
- Marker permanentny do opisywania sprzętu

Dla protokołu ręcznego

- Mikrowirówka o zmiennej prędkości obrotowej* umożliwiająca wirowanie w zakresie co najmniej 1000–8000 x g, chociaż dopuszczalne są mniejsze i większe wartości siły odśrodkowej (szczegóły zawierają etapy protokołu), wyposażona w rotor dla probówek mikrowirówkowych o pojemności 2 ml

* Należy upewnić się, że wyroby i aparaty są regularnie sprawdzane, konserwowane i kalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

[†] Należy upewnić się, że użytkownik zaznajomił się z wytycznymi dotyczącymi postępowania z RNA (Załącznik A, strona 71).

[‡] Potrzebny do dodania etanolu do koncentratu buforu BR4.

- Wytrząsarka-inkubator* umożliwiająca inkubację w temperaturze 55°C i 65°C oraz wytrząsanie przy ≥ 400 obr./min, nie przekraczając 1400 obr./min (np. Eppendorf® Thermomixer Compact lub równoważny aparat)

Dla protokołu zautomatyzowanego (z użyciem aparatu QIAcube lub QIAcube Connect MDx)

- Nożyczki

Materiały eksploatacyjne do aparatów QIAcube:

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

Akcesoria do aparatów QIAcube:

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

Dla protokołu zautomatyzowanego z użyciem aparatu QIAcube Connect MDx

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

Pakiety serwisowe do aparatu QIAcube Connect MDx:

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

* Należy upewnić się, że wyroby i aparaty są regularnie sprawdzane, konserwowane i kalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

[†] Zawarte również w pakiecie Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, nr kat. 990395).

Dla protokołu zautomatyzowanego z użyciem aparatu QIAcube

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

* Należy upewnić się, że wyroby i aparaty są regularnie sprawdzane, konserwowane i kalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

Ważne informacje

Korzystanie z aparatów QIAcube

Należy upewnić się, że użytkownik potrafi obsługiwać aparat QIAcube. Przed uruchomieniem zautomatyzowanych protokołów PAXgene Blood RNA należy przeczytać podręcznik użytkownika odpowiedniego aparatu QIAcube i wszelkie dodatkowe informacje dostarczone z aparatem QIAcube, zwracając szczególną uwagę na informacje dotyczące bezpieczeństwa.

O ile nie zaznaczono inaczej, instrukcje w tej sekcji mają zastosowanie zarówno do aparatu QIAcube Connect MDx, jak i do aparatu QIAcube.

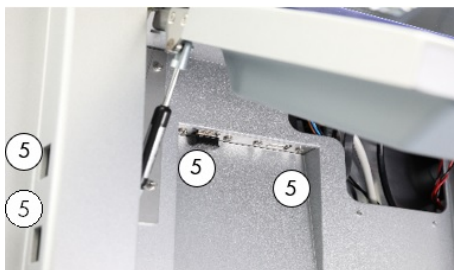
Uruchamianie aparatów QIAcube

Zamknąć pokrywę aparatu QIAcube i włączyć aparat QIAcube za pomocą przełącznika zasilania (QIAcube Connect MDx: patrz Ryc. 17, strona 42; QIAcube: Ryc. 18, strona 43).

Zostanie wyemitowany sygnał dźwiękowy i pojawi się ekran początkowy. Aparat automatycznie wykonuje testy inicjalizacji.



Widok aparatu QIAcube Connect MDx z przodu



Wyciągnięty ekran dotykowy



Widok aparatu QIAcube Connect MDx z tyłu



Widok aparatu QIAcube Connect MDx z tyłu

Ryc. 17. Elementy zewnętrzne aparatu QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|--|
| <p>① Ekran dotykowy</p> <p>② Pokrywa</p> <p>③ Szufłada Waste (Odpady)</p> <p>④ Przełącznik zasilania</p> | <p>⑤ 2 porty USB po lewej stronie ekranu dotykowego; 2 porty USB za ekranem dotykowym (do 1 portu USB jest podłączony moduł Wi-Fi)</p> <p>⑥ Port RJ-45 sieci Ethernet</p> <p>⑦ Gniazdo dla przewodu zasilania</p> <p>⑧ Wylot powietrza chłodzącego</p> |
|--|--|



Ryc. 18. Widok aparatu QIAcube z przodu.

- | | | | |
|---|---|---|-------------------------------|
| 1 | Ekran dotykowy | 4 | Port USB za panelem ochronnym |
| 2 | Pokrywa | 5 | Przełącznik zasilania |
| 3 | Port szeregowy RS232 za panelem ochronnym (do użytku wyłącznie przez techników serwisu aparatów firmy QIAGEN) | 6 | Szufflada Waste (Odpady) |

Ekran dotykowy

Aparatami QIAcube steruje się za pomocą ekranu dotykowego. Ekran dotykowy umożliwia użytkownikowi obsługę aparatu i prowadzi użytkownika przez konfigurację stołu roboczego. Podczas przetwarzania próbek na ekranie dotykowym wyświetlany jest status protokołu i czas pozostały do końca.



Ryc. 19. Wyciągnięty ekran dotykowy aparatu QIAcube Connect MDx

Instalowanie protokołów w aparatach QIAcube

Zanim możliwe będzie wykonanie pierwszego cyklu przygotowań RNA w aparatach QIAcube może być konieczna wstępna instalacja protokołów. Zainstalować oba protokoły „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA — część A) i „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA — część B).

Protokoły dla aparatu QIAcube Connect MDx są dostępne na stronie www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources (www.qiagen.com/MyQIAcube dla aparatu QIAcube) i należy je pobrać na pamięć USB dostarczaną z aparatami QIAcube. Te protokoły zostaną przesłane do aparatu przez port USB.

Port USB (QIAcube Connect MDx: znajduje się z boku ekranu dotykowego, patrz Ryc. 17, strona 42; QIAcube: za panelem ochronnym, patrz Ryc. 18, strona 43) umożliwia podłączanie aparatów QIAcube do dostarczanej razem z nimi pamięci USB.

Za pośrednictwem portu USB można również przesłać pliki danych, takie jak pliki dziennika lub pliki raportów, z aparatu QIAcube do pamięci USB.



Port USB jest przeznaczony do użytku wyłącznie z pamięcią USB dostarczoną przez firmę QIAGEN. Nie należy podłączać innych urządzeń do tego portu.



Nie należy wyciągać pamięci USB podczas pobierania protokołów, przesyłania plików danych lub w trakcie wykonywania protokołu.

Więcej informacji o procesie przekazywania protokołów do aparatów QIAcube można znaleźć w instrukcji obsługi używanego aparatu.

Ładowanie aparatu QIAcube

W celu zaoszczędzenia czasu ładowanie można wykonywać podczas jednego lub obu 10-minutowych etapów wirowania (etapy 3 i 5) w części „Protokół: zautomatyzowane oczyszczanie całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)”, strona 63.

Butelki na odczynniki

Przed każdym cyklem pracy w aparacie QIAcube należy ostrożnie napełnić 4 butelki na odczynniki odczynnikami wymienionymi w Tabeli 3 (strona 46) do wskaźnika poziomu maksymalnego lub, jeśli nie jest to możliwe, do poziomu, na który pozwalają objętości buforów dostarczonych w zestawie PAXgene Blood RNA Kit. Wyraźnie oznaczyć butelki i wieczka nazwami buforów i włożyć napełnione butelki z odczynnikami na odpowiednie miejsca w statywie na butelki na odczynniki. Załadować statyw na stół roboczy aparatu QIAcube w przedstawiony sposób (Ryc. 20–22, strony 46–48).



Dostarczona objętość buforu BR2 nie wypełni butelki na odczynnik do poziomu wskaźnika. Bufory BR3 i BR4 mogą nie wypełnić butelki do poziomu wskaźnika po przetworzeniu wielu próbek w poprzednich cyklach pracy.



Przed umieszczeniem butelek na stole roboczym należy upewnić się, że zdjęto z nich wieczka.



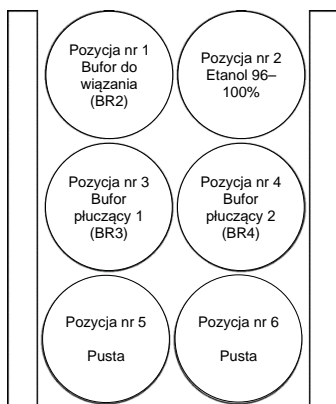
Objętości buforów dostarczone w zestawie PAXgene Blood RNA Kit (50) wystarczają na maksymalnie 7 cykli przygotowań RNA w aparacie QIAcube przy liczbie próbek od 2 do 12 na cykl. Ogólnie rzecz biorąc, należy unikać wykonywania cykli roboczych z małą liczbą próbek, aby przetworzyć łącznie 50 próbek na zestaw przy maksymalnie 7 cyklach przygotowań RNA. W przypadku wykonania więcej niż 7 cykli przygotowań RNA może zabraknąć buforów do przetworzenia ostatnich próbek.

Tabela 3. Pozycje w statywie na butelki na odczynniki

Pozycja	Odczynnik
1	Bufor do wiązania (BR2)
2	Etanol 96–100%
3	Bufor płuczący 1 (BR3)
4	Bufor płuczący 2 (BR4)*
5	— (pozostawić pustą)
6	— (pozostawić pustą)

* Bufor płuczący 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać 4 objętości etanolu (96–100%, stopień czystości cz.d.a.), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.

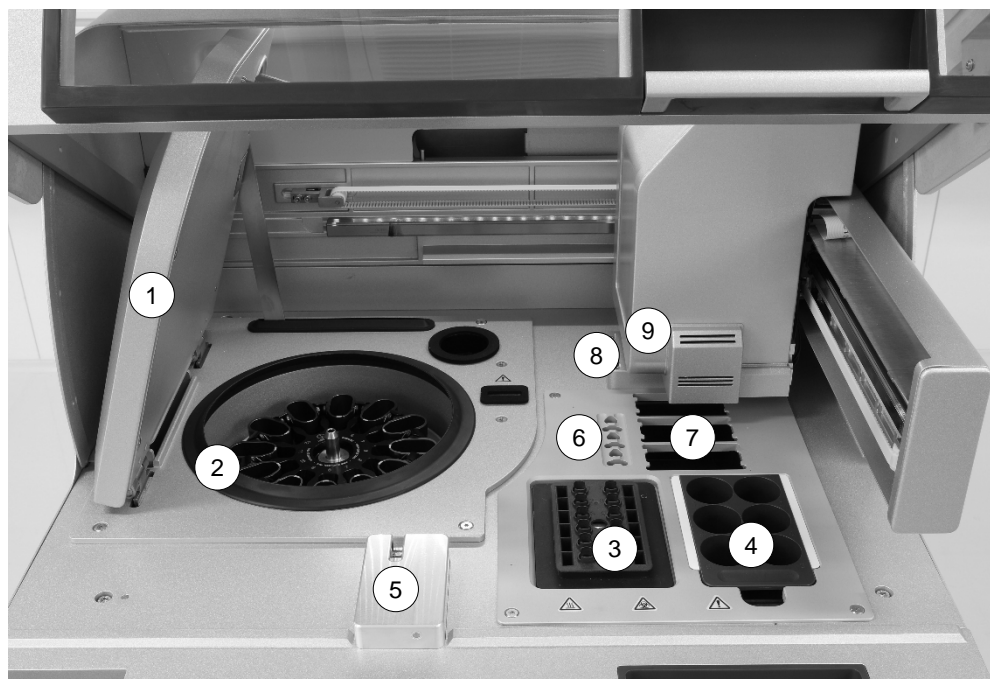
A



B

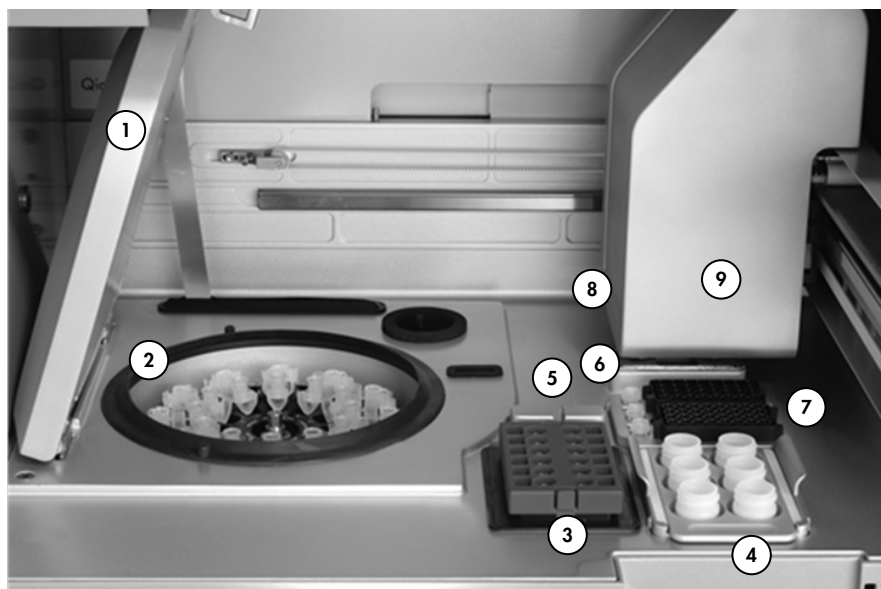


Ryc. 20. Ładowanie statywu na butelki na odczynniki. [A] Schemat pozycji i zawartości butelek w statywie na butelki na odczynniki. [B] Ładowanie statywu do aparatu QIAcube (jako przykład pokazano aparat QIAcube).



Ryc. 21. Widok wnętrza aparatu QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|---|
| <p>① Pokrywa wirówki</p> <p>② Wirówka</p> <p>③ Wytrząsarka</p> <p>④ Statyw na butelki na odczynniki</p> <p>⑤ Czujnik końcówek i zamek pokrywy</p> | <p>⑥ Gniazda na próbówki mikrowirówkowe</p> <p>⑦ 3 gniazda na statywy na końcówki</p> <p>⑧ Gniazda do utylizacji końcówek i kolumn</p> <p>⑨ Ramię robota (wyposażone w pipetor 1-kanalowy, chwytak, czujnik ultradźwiękowy i optyczny oraz diodę LED emitującą promieniowanie ultrafioletowe)</p> |
|---|---|



Ryc. 22. Widok wnętrza aparatu QIAcube.

- | | | | |
|---|---------------------------------|---|---|
| 1 | Pokrywa wirówki | 6 | Gniazda na probówki mikrowirówkowe |
| 2 | Wirówka | 7 | Statywy na końcówki |
| 3 | Wytrząsarka | 8 | Gniazda do utylizacji końcówek i kolumn |
| 4 | Statyw na butelki na odczynniki | 9 | Ramię robota |
| 5 | Czujnik końcówek | | |

Kolumny wirówkowe (PRC, PSC), próbki mikrowirówkowe (MCT) i sprzęty z tworzywa sztucznego do aparatów QIAcube

Umieścić 2 statywy na końcówki wypełnione końcówkami z filtrem, 1000 µl, w aparacie QIAcube (patrz Ryc. 21 i 22, strony 47 i 48). W razie potrzeby uzupełnić statywy końcówkami.



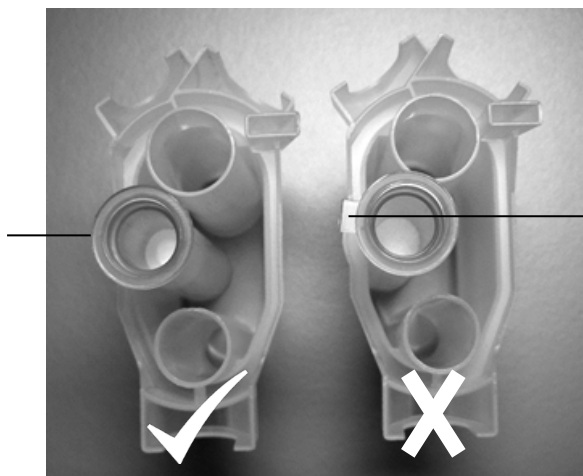
Używać wyłącznie końcówek z filtrem 1000 µl, przeznaczonych do użytku z aparatami QIAcube.

Oznaczyć adaptory rotora i próbki mikrowirówkowe (MCT) dla każdej próbki, używając markera permanentnego. Otworzyć kolumny wirówkowe PAXgene Shredder (PSC), które będą używane, a następnie całkowicie odciąć wieczka, używając nożyczek (patrz Ryc. 23, strona 49).



Dla prawidłowej pracy zmechanizowanego chwytaka aparatów QIAcube należy zupełnie usunąć (odciąć) wieczka i wszystkie elementy z tworzywa sztucznego łączące wieczko z kolumnami wirówkowymi PAXgene Shredder (PSC; patrz Ryc. 23). W przeciwnym razie zmechanizowany chwytak nie będzie mógł prawidłowo chwycić kolumn wirówkowych (PSC, PRC).

Prawidłowo
o usunięte
wieczko
kolumny



Nieprawidłowo usunięte
wieczko kolumny;
część
wieczka
wciąż
przyłączona
do kolumny

Ryc. 23. Ładowanie kolumny wirówkowej PAXgene Shredder (PSC). Kolumna wirówkowa PAXgene Shredder (PSC) jest ładowana na środkową pozycję adaptera rotora. Przed załadowaniem kolumny należy odciąć wieczko.

Władować kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC), kolumnę wirówkową PAXgene Shredder (PSC; bez wieczka, patrz Ryc. 23, strona 49) i opisaną probówkę mikrowirówkową na odpowiednie pozycje w każdym oznaczonym adapterze rotora w sposób przedstawiony w Tabeli 4 i na Ryc. 24.

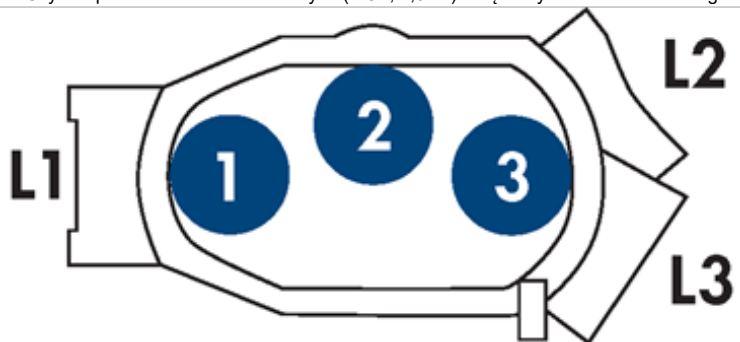


Upewnić się, że wieczka kolumny wirówkowej (PRC) i próbki mikrowirówkowej (MCT) są dopchnięte aż do dna gniazd przy krawędzi adaptera rotora. W przeciwnym razie wieczka zostaną odłamane podczas wirowania.

Tabela 4. Sprzęt laboratoryjny w adapterze rotora

Pozycja	Odczynnik	Pozycja wieczka
1	Kolumna wirówkowa PAXgene RNA (czerwona, PRC)	L1
2	Kolumna wirówkowa PAXgene Shredder (liliowa, PSC) (odciąć wieczko przed włożeniem do adaptera rotora)	–
3	Probówka mikrowirówkowa (MCT)*	L3

* Używać probówek mikrowirówkowych (MCT; 1,5 ml) dołączonych do zestawu PAXgene Blood RNA Kit.



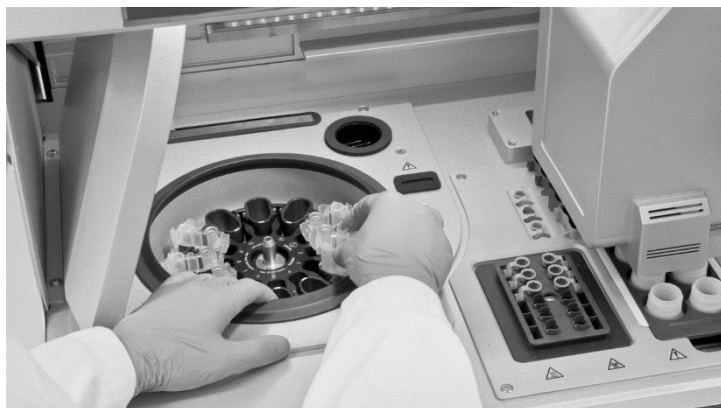
Ryc. 24. Pozycje w adapterze rotora. W adapterze rotora znajdują się trzy pozycje próbek (1–3) i trzy pozycje wieczek (L1–L3).

Ładowanie wirówki

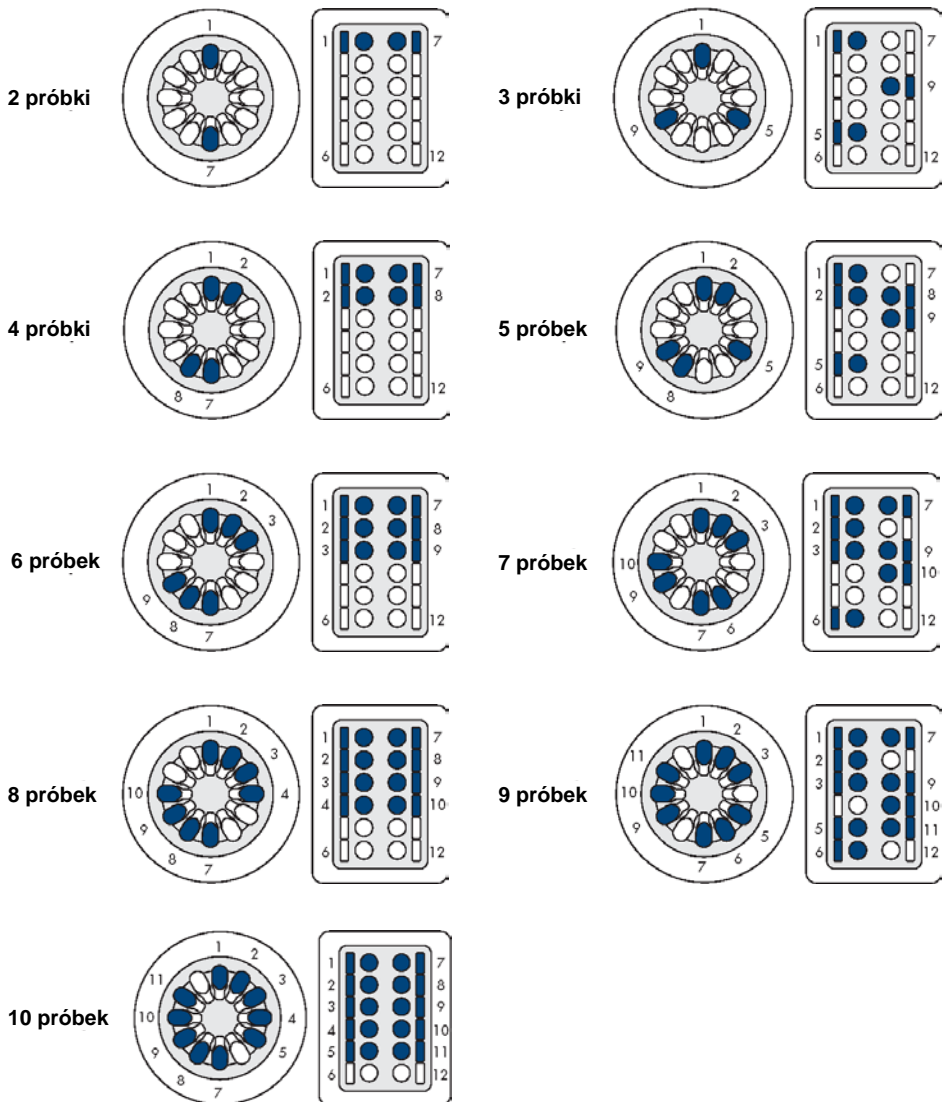
Załadować zmontowane adaptory rotora do koszy wirówki w sposób przedstawiony na Ryc. 25 poniżej.



W przypadku przetwarzania mniej niż 12 próbek należy upewnić się, że rotor wirówki załadowano w taki sposób, aby był wyważony promieniowo (patrz Ryc. 26, strona 52). Wszystkie kosze wirówki muszą być zamontowane przed rozpoczęciem protokołu, nawet jeśli przetwarzanych jest mniej niż 12 próbek. Nie można przetwarzać pojedynczej (jednej) próbki lub 11 próbek.



Ryc. 25. Ładowanie wirówki w aparatach QIAcube. Załadować zmontowane adaptory rotora do koszy wirówki (jako przykład pokazano aparat QIAcube Connect MDx).



Ryc. 26. Ładowanie wirówki i wytrząsarki. Przedstawiono pozycje wirówki i wytrząsarki używane w celu przetwarzania od dwóch (2) do dziesięciu (10) próbek. Nie można przetwarzać jednej (1) próbki ani 11 próbek. W przypadku przetwarzania 12 próbek zajęte są wszystkie pozycje wirówki i wstrząsarki (brak ilustracji).

Probówki do przetwarzania (PT)

Wyciągnąć wszystkie probówki do przetwarzania (PT), które pozostały w gniazdach na probówki mikrowirówkowe po poprzednich cyklach pracy (QIAcube Connect MDx: patrz Ryc. 21, strona 47; QIAcube: patrz Ryc. 22, strona 48). Napełnić 3 probówki do przetwarzania (PT) ilością odczynników podaną w Tabeli 5 odpowiednio do liczby próbek przetwarzanych w cyklu pracy.

W celu przygotowania mieszaniny inkubacyjnej DNazy I należy za pomocą pipety dodać wskazaną objętość buforu do trawienia DNA (RDD) do probówki do przetwarzania (PT), a następnie dodać wskazaną objętość roztworu podstawowego DNazy I (RNFD). Wymieszać, delikatnie pipetując całą objętość mieszaniny w górę i w dół 3 razy, używając końcówki do pipety 1000 µl.

Używać probówek do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml dołączonych do zestawu PAXgene Blood RNA Kit. Wyraźnie opisać probówki nazwami odczynników i umieścić je na odpowiednich pozycjach w gniazdach na probówki mikrowirówkowe, w sposób przedstawiony w Tabeli 6 (strona 54).



DNaza I (RNFD) jest szczególnie wrażliwa na denaturację fizyczną. Mieszać wyłącznie za pomocą pipety, używając końcówek do pipety o dużym otworze wylotowym, aby zminimalizować tarcie. Nie wytrząsać.



Należy upewnić się, że za pomocą pipety dodawane są wymagane objętości określone w Tabeli 5 poniżej.

Tabela 5. Wymagane objętości odczynników, które należy dodać do próbek do przetwarzania umieszczonych w gniazdach próbek mikrowirówkowych.

Liczba próbek	Objętość odczynnika dla wskazanej liczby próbek (µl)		
	Proteinaza K (PK)	Mieszanina inkubacyjna DNazy I	Bufor do elucji (BR5)
2	126	187 (23 DNazy I + 164 buforu Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNazy I + 228 buforu Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNazy I + 292 buforu Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNazy I + 356 buforu Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNazy I + 421 buforu Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNazy I + 485 buforu Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNazy I + 549 buforu Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNazy I + 613 buforu Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNazy I + 678 buforu Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNazy I + 806 buforu Buffer RDD)	1177

Tabela 6. Gniazda na próbki mikrowirówkowe

	Pozycja		
	A	B	C
Zawartość	Proteinaza K	Mieszanina inkubacyjna DNazy I	Bufor do elucji (BR5)
Naczynie	Probówka do przetwarzania (PT)*	Probówka do przetwarzania (PT)*	Probówka do przetwarzania (PT)*

* Używać próbek do przetwarzania o pojemności 2 ml dołączonych do zestawu PAXgene Blood RNA Kit.

Protokół: ręczne oczyszczanie całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Upewnić się, że opakowanie zestawu jest nienaruszone i nieuszkodzone, a żaden z buforów nie wyciekł. Nie używać zestawu, który jest uszkodzony.
- Podczas używania pipety należy upewnić się, że nastawiono ją na odpowiednią objętość, a aspiracja i dozowanie płynu są wykonywane ostrożnie — cała objętość płynu jest pobierana do pipety i wypuszczana z niej.
- Aby uniknąć przenoszenia próbek do nieprawidłowych probówek lub kolumn wirówkowych, należy upewnić się, że wszystkie probówki i kolumny wirówkowe zostały prawidłowo opisane markerem permanentnym. Opisać wieczko i boczną część każdej probówki (PT, MCT). W przypadku kolumny wirówkowej opisać boczną część powiązanej z nią probówki do przetwarzania (PT). Po przeniesieniu płynu do probówki lub kolumny wirówkowej należy ją zamknąć.
- Rozlanie próbek i buforów podczas procedury może spowodować obniżenie uzysku i jakości RNA.
- Wszystkie etapy tego protokołu, w tym etapy wirowania, należy wykonywać w temperaturze pokojowej (15–25°C), o ile nie określono inaczej.

Z powodu czułości technologii amplifikacji kwasu nukleinowego podczas postępowania z próbkami konieczne jest podjęcie następujących środków ostrożności w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego:

- Ostrożnie nanosić próbkę na kolumnę wirówkową (PRC, PSC) za pomocą pipety, bez zamaczania brzegu kolumny.
- Należy zawsze zmieniać końcówki pipet pomiędzy przenoszeniami płynów. Używać końcówek do pipet z barierą aerozolową.

- Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej (PRC, PSC) końcówką pipety.
- Po wytrząsaniu lub ogrzewaniu próbówki mikrowirówkowej (MCT) krótko odwirować kolumnę, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.
- Nosić rękawiczki przez cały czas przeprowadzania procedury. W przypadku kontaktu rękawiczek z próbką natychmiast zmienić rękawiczki.
- Przed umieszczeniem kolumny wirówkowej (PRC, PSC) w mikrowirówce należy ją zamknąć. Odwirować w sposób opisany w procedurze.
- Otwierać tylko jedną kolumnę wirówkową (PRC, PSC) naraz i zachować ostrożność, aby uniknąć wytwarzania aerozoli.
- W celu wydajnego równoległego przetwarzania wielu próbek należy napęłnić statyw próbkami do przetwarzania (PT), do których będzie można przenieść kolumny wirówkowe (PRC, PSC) po wirowaniu. Wyrzucić zużyte próbówki do przetwarzania (PT) zawierające płyn, który przepłynął przez kolumnę, a następnie umieścić nowe próbówki do przetwarzania (PT) z kolumnami wirówkowymi (PRC, PSC) bezpośrednio w mikrowirówce.



Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Krew należy pobrać do próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zgodnie z instrukcjami zawartymi w dokumencie *PAXgene Blood RNA Tube — Instrukcja obsługi*. W razie potrzeby można zapoznać się z zaleceniami dotyczącymi postępowania z próbkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), przedstawionymi w Załączniku C (strona 77).
- Aby zapewnić całkowitą liczę krwinek, należy upewnić się, że po pobraniu krwi próbówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) są inkubowane przez co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej. Inkubacja próbówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez noc może spowodować zwiększenie uzysku. Jeśli po pobraniu krwi próbówka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) była przechowywana w temperaturze 2–8°C, –20°C lub –70°C, przed rozpoczęciem procedury należy doprowadzić ją do temperatury pokojowej, a następnie przechowywać ją w temperaturze pokojowej przez 2 godziny.
- Przeczytać informacje dotyczące bezpieczeństwa na stronie 9.
- Przeczytać wytyczne dotyczące postępowania z RNA (Załącznik A, strona 74).

- Upewnić się, że wyroby i aparaty, takie jak pipety i wytrząsarka-inkubator, były regularnie sprawdzane i kalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.
- Wytrząsarka-inkubator jest używana w etapach 5 i 20. Ustawić temperaturę wytrząsarki-inkubatora na 55°C.
- Podczas przechowywania buforu do wiązania (BR2) może wytrącić się osad. W razie potrzeby ogrzać bufor do temperatury 37°C, aby rozpuścić osad.
- Bufor płuczący 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać 4 objętości etanolu (96–100%, stopień czystości cz.d.a.), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.
- W przypadku używania zestawu RNase-Free DNase Set po raz pierwszy należy przygotować roztwór podstawowy DNazy I. Rozpuścić DNazę I w postaci stałej (RNFD; 1500 jednostek Kunitza)* w 550 µl buforu do przygotowywania zawiesiny DNazy (DRB) dostarczonego z zestawem. Uważać, aby nie rozsypać DNazy I (RNFD) podczas otwierania fiolki. Nie wytrząsać zrekonstruowanej DNazy I (RNFD). DNaza I jest szczególnie wrażliwa na denaturację fizyczną. Mieszanie należy wykonywać jedynie poprzez delikatne odwracanie fiolki.
- Aktualne dane wskazują, że zrekonstruowaną DNazę I (RNFD) można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 6 tygodni. W celu długoterminowego przechowywania DNazy I (RNFD) należy przenieść roztwór podstawowy ze szklanej fiolki, podzielić go na porcje przeznaczone do jednorazowego użytku (użyć probówek mikrowirówkowych [MCT] o pojemności 1,5 ml dostarczonych z zestawem; wystarczają one do przygotowania 5 porcji) i przechowywać w temperaturze –20°C przez maksymalnie 9 miesięcy. Rozmrożone porcje można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 6 tygodni. Rozmrożonych porcji nie należy zamrażać ponownie.
- Należy upewnić się, że podczas rekonstrukcji i rozdzielania na porcje roztworu DNazy I (RNFD) przestrzegane są wytyczne dotyczące postępowania z RNA (Załącznik A, strona 74).



* Jednostki Kunitza to jednostki powszechnie stosowane do pomiaru DNazy I, definiowane jako ilość DNazy I, która powoduje wzrost wartości absorbancji A_{260} o 0,001 na minutę na mililitr w temperaturze 25°C, pH 5,0, przy stosowaniu wysoko spolimeryzowanego DNA jako substratu (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

Procedura

1. Wirować próbkę PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez 10 minut przy 3000–5000 x g, używając rotora wychylnego.
 -  Aby zapewnić całkowitą lizę krwinek, należy upewnić się, że próbka krwi była inkubowana w probówce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej (15–25°C).
 -  W rotorze muszą znajdować się adaptory do probówek o okrągłym dnie. W przypadku użycia innych typów adapterów do probówek może dojść do pęknięcia probówek podczas wirowania.
2. Usunąć supernatant poprzez dekantację lub za pomocą pipety. Dodać 4 ml wody wolnej od RNaz (RNFW) do osadu, a następnie zamknąć próbkę, używając nowego dodatkowego zamknięcia BD Hemogard (dostarczone z zestawem).

W przypadku dekantacji supernatantu należy uważać, aby nie naruszyć osadu, i należy osuszyć brzeg próbki czystym ręcznikiem papierowym.
3. Wytrząsać do momentu, gdy widoczne będzie rozpuszczenie osadu, a następnie wirować przez 10 minut przy 3000–5000 x g, używając rotora wychylnego. Usunąć i wyrzucić cały supernatant.

Niewielka ilość nierozpuszczonego osadu w supernatancie obecna po worteksowaniu, ale przed wirowaniem, nie zakłóci procedury.

 -  Niecałkowite usunięcie supernatantu doprowadzi do inhibicji lizy i rozcieńczenia lizatu, co spowoduje zakłócenie warunków wiązania RNA do membrany PAXgene.
4. Dodać 350 µl buforu do przygotowywania zawiesiny (BR1) i wytrząsać do momentu, gdy widoczne będzie rozpuszczenie osadu.
5. Za pomocą pipety przenieść próbkę do próbki mikrowirówkowej (MCT) o pojemności 1,5 ml. Dodać 300 µl buforu do wiązania (BR2) i 40 µl proteiny K (PK). Wymieszać, wytrząsając przez 5 sekund, a następnie inkubować przez 10 minut w temperaturze 55°C przy 400–1400 obr./min, używając wytrząsarki-inkubatora. Po inkubacji ustawić temperaturę wytrząsarki-inkubatora na 65°C (do etapu 20).
 -  Nie mieszać buforu do wiązania (BR2) i proteiny K (PK) przed dodaniem ich do próbki.

6. Za pomocą pipety nanieść lizat bezpośrednio na kolumnę wirówkową PAXgene Shredder (PSC; liliowa) umieszczoną w próbówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml, a następnie wirować przez 3 minuty przy maksymalnej prędkości (ale nie przekraczając siły odśrodkowej 20 000 x g).



Ostrożnie nanieść lizat na kolumnę wirówkową (PSC) za pomocą pipety, a następnie wzrokowo sprawdzić, czy cały lizat został przeniesiony na kolumnę wirówkową (PSC).

Aby uniknąć uszkodzenia kolumn (PSC) i próbek (PT), nie należy przekraczać siły odśrodkowej 20 000 x g.



Niektóre próbki mogą przepłynąć przez kolumnę wirówkową PAXgene Shredder (PSC) bez wirowania. Jest to spowodowane niską lepkością próbek i nie należy tego uznawać za oznakę nieprawidłowego działania produktu.

7. Ostrożnie przenieść cały supernatant frakcji, która przepłynęła przez kolumnę, do świeżej próbówki mikrowirówkowej (MCT) o pojemności 1,5 ml, nie naruszając osadu w próbówce do przetwarzania.
8. Dodać 350 µl etanolu (96–100%, stopień czystości cz.d.a.). Wymieszać, wytrząsając, a następnie krótko odwirować (1–2 sekundy przy 500–1000 x g), aby usunąć krople z wnętrza wieczka.



Wirowanie nie może trwać dłużej niż 1–2 sekundy, gdyż mogłoby to doprowadzić do osadzenia kwasów nukleinowych i zmniejszenia uzysku całkowitego RNA.

9. Za pomocą pipety nanieść 700 µl próbki na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC; czerwona) umieszczoną w próbówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml, a następnie wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej próbówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml i wyrzucić starą próbkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.

10. Za pomocą pipety nanieść pozostałą objętość próbki na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC), a następnie wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej probówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml i wyrzucić starą probówkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.



Ostrożnie nanieść próbkę na kolumnę wirówkową (PRC) za pomocą pipety, a następnie wzrokowo sprawdzić, czy cała próbka została przeniesiona na kolumnę wirówkową (PRC).

11. Za pomocą pipety nanieść 350 µl buforu płuczącego 1 (BR3) na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC). Wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej probówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml i wyrzucić starą probówkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.

12. Dodać 10 µl roztworu podstawowego DNazy I (RNFD) do 70 µl buforu do trawienia DNA (RDD) w probówce mikrowirówkowej (MCT) o pojemności 1,5 ml. Wymieszać, delikatnie ostukując probówkę, a następnie krótko odwirować, aby zebrać pozostałości płynu ze ścianek próbki.

W przypadku przetwarzania, na przykład 10 próbek, dodać 100 µl roztworu podstawowego DNazy I (RNFD) do 700 µl buforu do trawienia DNA (RDD). Używać probówek mikrowirówkowych (MCT) o pojemności 1,5 ml dostarczonych z tym zestawem.



DNaza I jest szczególnie wrażliwa na denaturację fizyczną. Mieszanie należy wykonywać jedynie poprzez delikatne ostukiwanie próbki. Nie wytrząsać.

13. Za pomocą pipety nanieść mieszaninę inkubacyjną DNazy I (RNFD) (80 µl) bezpośrednio na membranę kolumny wirówkowej PAXgene RNA (PRC) i pozostawić na stole roboczym (20–30°C) na 15 minut.



Upewnić się, że mieszanina inkubacyjna DNazy I (RNFD) została naniesiona bezpośrednio na membranę. Trawienie DNazy I będzie niecałkowite, jeśli część mieszaniny zostanie naniesiona na ścianki lub pierścień O-ring kolumny wirówkowej (PRC) i pozostanie na nim.

14. Za pomocą pipety nanieść 350 µl buforu płuczającego 1 (BR3) na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC), a następnie wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej probówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml i wyrzucić starą probówkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.

15. Za pomocą pipety nanieść 500 µl buforu płuczającego 2 (BR4) na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC), a następnie wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej probówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml i wyrzucić starą probówkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.



Bufor płuczający 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed użyciem upewnić się, że do buforu płuczającego 2 (BR4) dodano etanol (patrz „Czynności do wykonania przed rozpoczęciem”, strona 56).

16. Nanieść kolejne 500 µl buforu płuczającego 2 (BR4) na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC). Wirować przez 3 minuty przy 8000–20 000 x g.

17. Wyrzucić probówkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę, i umieścić kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC) w nowej probówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml. Wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g.

18. Wyrzucić probówkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę. Umieścić kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC) w probówce mikrowirówkowej (MCT) o pojemności 1,5 ml, a następnie za pomocą pipety nanieść 40 µl buforu do elucji (BR5) bezpośrednio na membranę kolumny wirówkowej PAXgene RNA (PRC). Wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g w celu elucji RNA.

W celu osiągnięcia maksymalnej wydajności elucji istotne jest, aby zwilżyć całą membranę buforem do elucji (BR5).

19. Powtórzyć etap elucji (etap 18) w opisany sposób, używając 40 µl buforu do elucji (BR5) i tej samej próbki mikrowirówkowej (MCT).

20. Inkubować eluat przez 5 minut w temperaturze 65°C w wytrząsarce-inkubatorze (z etapu 5) bez wytrząsania. Po inkubacji niezwłocznie schłodzić na lodzie.

Ta inkubacja w temperaturze 65°C powoduje denaturację RNA do dalszych zastosowań. Nie przekraczać czasu lub temperatury inkubacji.

21. Jeśli próbki RNA nie będą od razu wykorzystywane, należy przechowywać je w temperaturze –20°C lub –70°C.

Ze względu na to, że po cyklach zamrażania i rozmrażania RNA pozostaje w postaci zdenaturowanej, nie jest konieczne powtarzanie inkubacji w temperaturze 65°C.

W przypadku używania próbek RNA w oznaczeniu diagnostycznym należy postępować zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta.

W celu dokładnego oznaczenia ilościowego RNA poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm zalecamy rozcieńczenie próbek buforem Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5. * Rozcieńczenie próbki w wodzie wolnej od RNaz może spowodować otrzymanie nieprawidłowo niskich wartości.

Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła.



W celu oznaczenia ilościowego w buforze Tris-HCl należy skorzystać z zależności $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Patrz Załącznik B, strona 75.

* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Protokół: zautomatyzowane oczyszczanie całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Upewnić się, że opakowanie zestawu jest nienaruszone i nieuszkodzone, a żaden z buforów nie wyciekł. Nie używać zestawu, który jest uszkodzony.
- Podczas używania pipety należy upewnić się, że nastawiono ją na odpowiednią objętość, a aspiracja i dozowanie płynu są wykonywane ostrożnie — cała objętość płynu jest pobierana do pipety i wypuszczana z niej.
- Aby uniknąć przenoszenia próbek do nieprawidłowych probówek i sprzętu wykonanego z tworzywa sztucznego, należy upewnić się, że wszystkie probówki do przetwarzania (PT), probówki mikrowirówkowe (MCT) i adaptory rotora zostały prawidłowo opisane markerem permanentnym. Opisać wieczko i boczną część każdej probówki mikrowirówkowej (MCT), boczną część każdej probówki do przetwarzania (PT) i zewnętrzną ściankę każdego adaptera rotora.
- Rozlanie próbek i buforów podczas procedury może spowodować obniżenie uzysku i jakości RNA.
- Wszystkie etapy tego protokołu, w tym etapy wirowania, należy wykonywać w temperaturze pokojowej (15–25°C), o ile nie określono inaczej.

Z powodu czułości technologii amplifikacji kwasu nukleinowego podczas postępowania z próbkami konieczne jest podjęcie następujących środków ostrożności w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego:

- Za pomocą pipety ostrożnie dodać próbkę na dno probówki do przetwarzania (PT), bez zamaczania brzegu probówki.
- Należy zawsze zmieniać końcówki pipet pomiędzy przenoszeniami płynów. Używać końcówek do pipet z barierą aerozolową.

- Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej (PRC, PSC) końcówką pipety.
- Po wytrząsaniu lub ogrzewaniu próbki mikrowirówkowej (MCT) krótko odwirować kolumnę, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.
- Nosić rękawiczki przez cały czas przeprowadzania procedury. W przypadku kontaktu rękawiczek z próbką natychmiast zmienić rękawiczki.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Krew należy pobrać do próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zgodnie z instrukcjami zawartymi w dokumencie *PAXgene Blood RNA Tube — Instrukcja obsługi*. W razie potrzeby można zapoznać się z zaleceniami dotyczącymi postępowania z próbkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), przedstawionymi w Załączniku C (strona 77).
- Aby zapewnić całkowitą liczę krwinek, należy upewnić się, że po pobraniu krwi próbki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) są inkubowane przez co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej. Inkubacja próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez noc może spowodować zwiększenie uzysku. Jeśli po pobraniu krwi próbka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) była przechowywana w temperaturze 2–8°C, –20°C lub –70°C, przed rozpoczęciem procedury należy doprowadzić ją do temperatury pokojowej, a następnie przechowywać ją w temperaturze pokojowej przez 2 godziny.
- Przeczytać informacje dotyczące bezpieczeństwa na stronie 9.
- Należy zapoznać się z zawartością sekcji „Ważne informacje” na stronie 41.
- Przeczytać wytyczne dotyczące postępowania z RNA (Załącznik A, strona 74).
- Przeczytać podręcznik użytkownika odpowiedniego aparatu QIAcube i wszelkie dodatkowe informacje dostarczone z aparatem QIAcube, zwracając szczególną uwagę na informacje dotyczące bezpieczeństwa.
- Należy dopilnować, aby wyroby i aparaty, takie jak pipety oraz aparat QIAcube, były regularnie sprawdzane i kalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.
- Podczas przechowywania buforu do wiązania (BR2) może wytrącić się osad. W razie potrzeby ogrzać bufor do temperatury 37°C, aby rozpuścić osad.
- Bufor płuczący 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać odpowiednią objętość etanolu (96–100%, stopień czystości cz.d.a.), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.

- W przypadku używania zestawu RNase-Free DNase Set po raz pierwszy należy przygotować roztwór podstawowy DNazy I. Rozpuścić DNazę I w postaci stałej (RNFD; 1500 jednostek Kunitza)* w 550 µl buforu do przygotowywania zawiesiny DNazy (DRB) dostarczonego z zestawem. Uważać, aby nie rozsypać DNazy I (RNFD) podczas otwierania fiolki. Nie wytrząsać zrekonstruowanej DNazy I (RNFD). DNaza I jest szczególnie wrażliwa na denaturację fizyczną. Mieszanie należy wykonywać jedynie poprzez delikatne odwracanie fiolki.
- Aktualne dane wskazują, że zrekonstruowaną DNazę I (RNFD) można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 6 tygodni. W celu długoterminowego przechowywania DNazy I (RNFD) należy przenieść roztwór podstawowy ze szklanej fiolki, podzielić go na porcje przeznaczone do jednorazowego użytku (użyć probówek mikrowirówkowych [MCT] o pojemności 1,5 ml dostarczonych z zestawem; wystarczają one do przygotowania 5 porcji) i przechowywać w temperaturze –20°C przez maksymalnie 9 miesięcy. Rozmrożone porcje można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 6 tygodni. Rozmrożonych porcji nie należy zamrażać ponownie.
- Należy upewnić się, że podczas rekonstrukcji i rozdzielania na porcje roztworu DNazy I (RNFD) przestrzegane są wytyczne dotyczące postępowania z RNA (Załącznik A, strona 74).
- Zamontować odpowiedni adapter wytrząsarki (dostarczany z aparatami QIAcube; używać adaptera dla probówek z zabezpieczeniem typu safe-lock o pojemności 2 ml, oznaczony cyfrą „2”), a następnie umieścić statyw wytrząsarki na adapterze.
- Sprawdzić szufladę Waste (Odpady) i w razie potrzeby opróżnić ją.
- Zainstalować wszelkie powiązane protokoły, jeśli nie wykonano tego wcześniej przy okazji poprzednich cykli roboczych. Aparat QIAcube Connect MDx wymaga pobrania wszystkich protokołów zapisanych w powiązonym pliku zip. W przypadku klasycznego aparatu QIAcube, zainstalować oba protokoły: „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA — część A) i „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA — część B). Patrz „Instalowanie protokołów w aparatach QIAcube”, strona 44.

* Jednostki Kunitza to jednostki powszechnie stosowane do pomiaru DNazy I, definiowane jako ilość DNazy I, która powoduje wzrost wartości absorbancji A_{260} o 0,001 na minutę na mililitr w temperaturze 25°C, pH 5,0, przy stosowaniu wysoko spolimeryzowanego DNA jako substratu (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

Procedura

1. Zamknąć pokrywę aparatu QIAcube, a następnie włączyć aparat QIAcube, używając przełącznika zasilania (QIAcube Connect MDx: patrz Ryc. 17, strona 42; QIAcube: patrz Ryc. 18, strona 43 Ryc. 15).

Zostanie wyemitowany sygnał dźwiękowy i pojawi się ekran początkowy. Aparaty automatycznie wykonują testy podczas inicjalizacji.

2. Otworzyć pokrywę aparatu QIAcube, a następnie załadować wymagane odczynniki i sprzęt wykonany z tworzywa sztucznego do aparatu QIAcube. Patrz „Ładowanie aparatu QIAcube”, strona 45.

W celu zaoszczędzenia czasu ładowanie można wykonywać podczas jednego lub obu 10-minutowych etapów wirowania (etapy 3 i 5) opisanych poniżej.

3. Wirować próbkę PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez 10 minut przy 3000–5000 x g, używając rotora wychylonego.



Aby zapewnić całkowitą lizę krwinek, należy upewnić się, że próbka krwi była inkubowana w próbówce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej (15–25°C).



W rotorze muszą znajdować się adaptory do próbek o okrągłym dnie. W przypadku użycia innych typów adapterów do próbek może dojść do pęknięcia próbek podczas wirowania.

4. Usunąć supernatant poprzez dekantację lub za pomocą pipety. Dodać 4 ml wody wolnej od RNaz (RNFw) do osadu, a następnie zamknąć próbkę, używając nowego dodatkowego zamknięcia BD Hemogard (dostarczone z zestawem).

W przypadku dekantacji supernatantu należy uważać, aby nie naruszyć osadu, i należy osuszyć brzeg próbki czystym ręcznikiem papierowym.

5. Wytrząsać do momentu, gdy widoczne będzie rozpuszczenie osadu, a następnie wirować przez 10 minut przy 3000–5000 x g, używając rotora wychylonego. Usunąć i wyrzucić cały supernatant.

Niewielka ilość nierozpuszczonego osadu w supernatancie obecna po worteksowaniu, ale przed wirowaniem, nie zakłóci procedury.



Niecałkowite usunięcie supernatantu doprowadzi do inhibicji lizy i rozcieńczenia lizatu, co spowoduje zakłócenie warunków wiązania RNA do membrany PAXgene.

6. Dodać 350 µl buforu do przygotowywania zawiesiny (BR1) i wytrząsać do momentu, gdy widoczne będzie rozpuszczenie osadu.
7. Za pomocą pipety przenieść próbkę do próbki do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml.



Używać próbek do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml dołączonych do zestawu PAXgene Blood RNA Kit.

8. Załadować otwarte próbki do przetwarzania (PT) zawierające próbki do wytrząsarki aparatu QIAcube (QIAcube Connect MDx: patrz Ryc. 21, strona 47; QIAcube: patrz Ryc. 22, strona 48 Ryc. 15). W celu ułatwienia ładowania ponumerowano pozycje próbek. Włożyć złącza statywu wytrząsarki (dostarczane z aparatami QIAcube) do gniazd znajdujących się przy krawędzi wytrząsarki, obok każdej próbki do przetwarzania. Umożliwia to detekcję próbek podczas kontroli załadowanych materiałów.



Należy upewnić się, że zamontowano odpowiedni adapter wytrząsarki (adapter wytrząsarki, próbki z zabezpieczeniem typu safe-lock o pojemności 2 ml, oznaczony cyfrą „2”, dostarczany z aparatami QIAcube).



W przypadku przetwarzania mniej niż 12 próbek należy upewnić się, że statyw wytrząsarki załadowano w sposób przedstawiony na Ryc. 26, strona 52. Nie można przetwarzać jednej (1) próbki ani 11 próbek. Numery pozycji w statywie wytrząsarki odpowiadają numerom pozycji w wirówce.

9. Zamknąć pokrywę aparatu QIAcube (QIAcube Connect MDx: patrz Ryc. 17, strona 42; QIAcube: patrz Ryc. 18, strona 43).
10. Wybrać protokół „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA — część A) i uruchomić go.

Postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie dotykowym aparatu QIAcube.



Upewnić się, że w aparacie QIAcube zainstalowano obie części programu (część A i część B) (patrz „Instalowanie protokołów w aparatach QIAcube”, strona 44).



Aparaty QIAcube wykonują kontrole załadowanych materiałów dla próbek, końcówek do pipet, adapterów rotora i butelek na odczynniki.

11. Po ukończeniu protokołu „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA — część A) należy otworzyć pokrywę aparatu QIAcube (QIAcube Connect MDx: patrz Ryc. 17, strona 42; QIAcube: patrz Ryc. 18, strona 43). Wyciągnąć kolumny wirówkowe PAXgene RNA (PRC) z adapterów rotora i puste próbówki do przetwarzania (PT) z wyrząsarki i wyrzucić je.



Podczas cyklu pracy aparat przenosi kolumny wirówkowe z pozycji 1 adaptera rotora (pozycja L1 wieczka) na pozycję 3 adaptera rotora (pozycja L2 wieczka) (patrz Ryc. 24, strona 50).

12. Zamknąć wieczka wszystkich próbek mikrowirówkowych (MCT) o pojemności 1,5 ml zawierających oczyszczony RNA w adapterach rotora (pozycja 3, pozycja L3 wieczka, patrz Ryc. 24, strona 50). Przenieść próbówki mikrowirówkowe (MCT) o pojemności 1,5 ml do adaptera wyrząsarki aparatu QIAcube (QIAcube Connect MDx: patrz Ryc. 21, strona 47; QIAcube: patrz Ryc. 22, strona 48).

13. Zamknąć pokrywę aparatu QIAcube (QIAcube Connect MDx: patrz Ryc. 17, strona 42; QIAcube: patrz Ryc. 18, strona 43).

14. Wybrać protokół „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA — część B) i uruchomić go.

Postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie dotykowym aparatu QIAcube.



W trakcie tego programu wykonywana jest inkubacja próbek w temperaturze 65°C, która powoduje denaturację RNA do dalszych zastosowań. Etapu tego nie należy pomijać nawet jeśli w dalszych zastosowaniach uwzględniony jest etap denaturacji cieplnej. Dostateczny stopień denaturacji RNA ma kluczowe znaczenie dla uzyskania maksymalnej wydajności w dalszych zastosowaniach.

15. Po ukończeniu programu „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA — część B) należy otworzyć pokrywę aparatu QIAcube (QIAcube Connect MDx: patrz Ryc. 17, strona 42; QIAcube: patrz Ryc. 18, strona 43). Niezwłocznie umieścić zawierające oczyszczone RNA próbki mikrowirówkowe (MCT) na lodzie.



OSTRZEŻENIE: Gorąca powierzchnia. Wytrząsarka może osiągnąć temperaturę do 70°C (158°F). Unikać kontaktu z gorącą powierzchnią.



Nie pozostawiać oczyszczonego RNA w aparacie QIAcube. Oczyszczone RNA może ulec rozkładowi, gdyż próbki nie są schłodzone. Z tego względu nie jest zalecane przeprowadzanie cykli przygotowań próbek przez noc, bez nadzoru.

16. Jeśli próbki RNA nie będą od razu wykorzystywane, należy przechowywać je w temperaturze -20°C lub -70°C .

Ze względu na to, że po cyklach zamrażania i rozmrażania RNA pozostaje w postaci zdenaturowanej, nie jest konieczne powtarzanie protokołu inkubacji cieplnej („PAXgene Blood RNA Part B”) (PAXgene Blood RNA — część B). W przypadku używania próbek RNA w oznaczeniu diagnostycznym należy postępować zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta.

W celu dokładnego oznaczenia ilościowego RNA poprzez absorbancję przy długości fali 260 nm zalecamy rozcieńczenie próbek buforem Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5.* Rozcieńczenie próbki w wodzie wolnej od RNaz może spowodować otrzymanie nieprawidłowo niskich wartości.

* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła.



W celu oznaczenia ilościowego w buforze Tris-HCl należy skorzystać z następującej zależności

$$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml. Patrz Załącznik B, strona 75.}$$

17. Wyciągnąć statyw na butelki na odczynniki ze stołu roboczego aparatu QIAcube (QIAcube Connect MDx: patrz Ryc. 21, strona 47; QIAcube: patrz Ryc. 22, strona 48), a następnie zamknąć wszystkie butelki odpowiednio oznaczonymi wieczkami. Bufory w butelkach można przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez maksymalnie 3 miesiące. Usunąć i wyrzucić pozostałe odczynniki znajdujące się w probówkach do przetwarzania (PT) w gniazdach na próbki mikrowirówkowe aparatu QIAcube. Wyciągnąć adaptory rotora z wirówki i wyrzucić je. Opróżnić szufladę Waste (Odpady) aparatu QIAcube Connect MDx (QIAcube Connect MDx: patrz Ryc. 17, strona 42; QIAcube: patrz Ryc. 18, strona 43). Zamknąć pokrywę aparatu QIAcube, a następnie wyłączyć aparat, używając przełącznika zasilania.

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może przydać się w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy zapoznać się ze stroną poświęconą często zadawanym pytaniom (frequently asked questions, FAQ) w witrynie naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z działu serwisu technicznego firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące informacji i protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii próbek i oznaczeń (informacje kontaktowe znajdują się na ostatniej stronie lub pod adresem www.qiagen.com).

Komentarze i wskazówki

RNA uległ rozkładowi

Zanieczyszczenie RNazami



Należy zachować ostrożność, aby podczas procedury lub dalszego postępowania nie wprowadzić RNaz do odczynników (patrz Załącznik A, strona 74).





Niski uzysk RNA

- a) Do próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pobrano mniej niż 2,5 ml krwi



Należy upewnić się, że do próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT; patrz *PAXgene Blood RNA Tube — Instrukcja obsługi*) pobrano 2,5 ml krwi.

Komentarze i wskazówki

- b) Stężenie RNA zmierzono w wodzie  W celu dokładnego oznaczenia ilościowego RNA należy rozcieńczyć w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5* (patrz Załącznik B, strona 75).
- c) Na etapie 9 i 10 protokołu ręcznego przeniesiono pozostałości komórek do kolumny wirówkowej PAXgene RNA (PRC)  Należy unikać przenoszenia dużych cząstek podczas przenoszenia supernatantu za pomocą pipety na etapie 7 protokołu ręcznego (przeniesienie niewielkiej ilości osadu nie zakłóci procedury).
- d) Supernatant nie został całkowicie usunięty na etapie 3  Należy upewnić się, że usunięto cały supernatant. W przypadku dekantacji supernatantu należy usunąć krople z brzegu probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT), osuszając ją ręcznikiem papierowym. Należy podjąć odpowiednie środki ostrożności, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego.
- e) Po pobraniu krwi do probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) krew była inkubowana przez mniej niż 2 godziny  Po pobraniu krwi należy ją inkubować w probówce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez co najmniej 2 godziny.

* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Komentarze i wskazówki

Niska wartość A_{260}/A_{280}

- a) Do rozcieńczenia RNA w celu pomiaru stosunku A_{260}/A_{280} użyto wody



W celu rozcieńczenia RNA przed pomiarem czystości należy użyć buforu Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5* (patrz Załącznik B, strona 75).

- b) Nieprawidłowe wyzerowanie spektrofotometru



Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5, w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła.

Awaria aparatu

Aparaty QIAcube nie działają prawidłowo

Przeczytać odpowiedni podręcznik użytkownika aparatu QIAcube, ze szczególnym uwzględnieniem sekcji „Rozwiązywanie problemów”. Upewnić się, że aparat QIAcube jest prawidłowo konserwowany, zgodnie z opisem w podręczniku użytkownika.

* 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.

Załącznik A: Ogólne uwagi dotyczące postępowania z RNA

Postępowanie z RNA



Rybonukleazy (RNazy) są bardzo stabilnymi i aktywnymi enzymami, które na ogół nie wymagają kofaktorów do działania. Ponieważ RNazy trudno inaktywować i nawet bardzo małe ich ilości wystarczają do rozkładu RNA, nie wolno używać jakichkolwiek sprzętów wykonanych ze szkła lub z tworzywa sztucznego bez wcześniejszego wyeliminowania możliwego zanieczyszczenia RNazami. Należy zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć przypadkowego wprowadzenia RNaz do próbki z RNA w trakcie trwania lub po zakończeniu procedury oczyszczania. Aby wytworzyć i zachować środowisko niezawierające RNaz, należy wdrożyć środki ostrożności na etapach obróbki wstępnej oraz stosowania jednorazowych i wielorazowych naczyń i roztworów podczas pracy z RNA.

Ogólne postępowanie



Podczas pracy z RNA należy zawsze stosować prawidłową mikrobiologiczną technikę aseptyczną. Dłonie i cząsteczki kurzu przenoszą bakterie i pleśń i są najczęstszymi źródłami zanieczyszczeń RNazami. Podczas postępowania z odczynnikami i próbkami RNA należy zawsze nosić lateksowe lub winylowe rękawiczki, aby uniknąć zanieczyszczenia RNazami z powierzchni skóry lub zakurzonych urządzeń laboratoryjnych. Rękawiczki należy często zmieniać, a próbki trzymać zamknięte, gdy tylko to możliwe. Podczas rozdzielania porcji do dalszych zastosowań za pomocą pipety należy trzymać oczyszczony RNA na lodzie.

Protokoły usuwania zanieczyszczeń RNazami ze sprzętów wykonanych ze szkła oraz roztworów można znaleźć w ogólnych wytycznych dotyczących metod biologii molekularnej, takich jak publikacja Sambrook, J. i Russella, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Załącznik B: Oznaczenie ilościowe i określenie jakości całkowitego RNA

Oznaczenie ilościowe RNA

Stężenie RNA należy określić poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm (A_{260}) w spektrofotometrze. Aby zagwarantować istotność wyniku, odczyty powinny mieścić się w zakresie liniowym spektrofotometru. Absorbancja równa 1 jednostce przy długości fali 260 nm odpowiada 44 μg RNA na ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Ta zależność jest ważna tylko w przypadku pomiarów w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5*. Z tego względu jeśli konieczne jest rozcieńczenie próbki RNA, należy ją rozcieńczyć w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM. Zgodnie z poniższym omówieniem (patrz „Czystość RNA”, strona 76), proporcja wartości absorbancji przy 260 i 280 nm zapewnia szacunkową ocenę czystości RNA. Podczas pomiaru próbek RNA należy być pewnym, że kuwety są wolne od RNaz. Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła. Poniżej przedstawiono przykład obliczenia wykonywanego podczas oznaczenia ilościowego RNA.

Objętość próbki RNA	=	80 μl
Rozcieńczenie (1/15)	=	10 μl próbki RNA + 140 μl buforu Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5
Zmierzyć absorbancję rozcieńczonej próbki w kuwecie (wolnej od RNaz).		
A_{260}	=	0,3
Stężenie próbki	=	$44 \times A_{260} \times \text{współczynnik rozcieńczenia}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 $\mu\text{g/ml}$
Całkowity uzysk	=	stężenie \times objętość próbki w mililitrach
	=	$198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 μg RNA

* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Czystość RNA

Stosunek odczytów przy długości fali 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}) udostępnia szacunkową wartość czystości RNA w odniesieniu do zanieczyszczeń, które charakteryzują się absorbancją światła ultrafioletowego (UV), takich jak białka. Jednakże, pH ma znaczący wpływ na stosunek A_{260}/A_{280} . Niższe pH prowadzi do uzyskania niższego stosunku A_{260}/A_{280} i zmniejszonej czułości na zanieczyszczenia białkowe.* W celu uzyskania dokładnych wartości zalecamy wykonywanie pomiaru absorbancji w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5. Stosunek A_{260}/A_{280} czystego RNA w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5, mieści się w zakresie 1,8–2,2. Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła.

* 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.

Załącznik C: Postępowanie z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Poniższe zalecenia firmy BD mogą ułatwić postępowanie z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Więcej informacji na temat probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawiera dokument *PAXgene Blood RNA Tube — Instrukcja obsługi*.

Instrukcja zdejmowania zamknięcia BD Hemogard

1. Chwycić probówkę PAXgene Blood RNA Tube (BRT) jedną ręką, kładąc kciuk pod zamknięciem BD Hemogard. (W celu zwiększenia stabilności położyć ramię na twardej powierzchni). Przekręcić zamknięcie BD Hemogard drugą ręką, jednocześnie naciskając kciukiem drugiej ręki w górę DO MOMENTU POLUZOWANIA KORKA PROBÓWKI.
2. Przed uniesieniem zamknięcia należy odsunąć kciuk. NIE NALEŻY używać kciuka do zepchnięcia zamknięcia z próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Przestroga: Jeśli próbka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) zawiera krew, istnieje ryzyko narażenia na czynniki zakaźne. Aby uniknąć obrażeń podczas zdejmowania zamknięcia, istotne jest, aby odsunąć kciuk, który jest używany do naciskania zamknięcia w górę, od próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) od razu po poluzowaniu zamknięcia BD Hemogard.
3. Zdjąć zamknięcie z próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT). W mało prawdopodobnym przypadku oddzielenia osłony wykonanej z tworzywa sztucznego od gumowego korka NIE NALEŻY PONOWNIE MONTOWAĆ ZAMKNIĘCIA. Ostrożnie zdjąć gumowy korek z próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Instrukcje dotyczące wkładania dodatkowego zamknięcia BD Hemogard

1. Wymienić zamknięcie próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Przekręcić i mocno wciskać do momentu całkowitego osadzenia korka. Całkowite ponowne wprowadzenie korka jest kluczowe, aby zamknięcie pozostawało na swoim miejscu podczas postępowania z probówką PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 kolumn PAXgene Spin Columns, 50 kolumn Shredder Spin Columns, probówki do przetwarzania, DNaza I wolna od RNaz, odczynniki i bufony wolne od RNaz. Do użytku w połączeniu z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 probówek do pobierania krwi	762165
Powiązane produkty, które można zamówić w firmie QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Pakiet zawiera: statywy na butelki na odczynniki (3); paski do oznaczania statywów (8); końcówki z filtrem, 200 µl (1024); końcówki z filtrem, 1000 µl (1024); końcówki z filtrem, 1000 µl, duży otwór wylotowy (1024); butelki na odczynniki o pojemności 30 ml (18); adaptery rotora (240); uchwyt do adaptera rotora	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Jałowe, jednorazowe końcówki z filtrem, na statywie	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Butelki na odczynniki (30 ml) z wieczkami; pakiet po 6; do użytku ze statywem na butelki na odczynniki aparatu QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Na 240 przygotowań: 240 jednorazowych adapterów rotora; do użytku z aparatami QIAcube	990394

Reagent Bottle Rack	Statyw mieszczący 6 butelek na odczynniki o pojemności 30 ml na stole roboczym aparatu QIAcube	990390
Rotor Adapter Holder	Uchwyt na 12 jednorazowych adapterów rotora; do użytku z aparatami QIAcube	990392

Powiązane produkty, które można zamówić w firmie BD*

Blood Collection Set	Zestaw BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: Igła 21 G, 0,75 cala (0,8 x 19 mm), 12-calowy (305 mm) wężyk z adapterem typu luer; 50 na pudełko, 200 na opakowanie zbiorcze	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Opakowanie zbiorcze tylko dla średnicy 13 mm i 16 mm; 1000/opakowanie zbiorcze	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Probówka do pobierania próbek 13 x 75 mm, pojemność 4,0 ml z czerwonym zamknięciem BD Hemogard i papierową etykietą; 100/pudełko, 1000/opakowanie zbiorcze	368975

* Te akcesoria do pobierania krwi reprezentują typowe produkty, których można używać z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Więcej informacji na temat tych akcesoriów, w tym sposobu ich zamawiania, przedstawiono na stronie www.preanalytix.com.

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu firmy PreAnalytiX lub QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika firm PreAnalytiX i QIAGEN są dostępne na stronach www.preanalytix.com i www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie technicznym firmy PreAnalytiX.

Historia zmian w instrukcji obsługi

Dokument i wersja	Zmiany	Data
HB-0101-004, R2	Zmiany wprowadzone w celu spełnienia wymogów systemu GHS w całej treści dokumentu	Czerwiec 2015 r.
HB-0101-005, R3	Nowy szablon; zmiany w protokole zautomatyzowanym i danych dotyczących skuteczności; aktualizacja informacji dotyczących bezpieczeństwa w celu spełnienia wymogów systemu GHS; zmiany w szczegółach dotyczących aparatu oraz w oświadczeniu dotyczącym ograniczeń w zakresie stosowania produktu.	Luży 2019 r.
HB-0101-006, R3	Poprawiono nazwę zestawu w tabeli „Zawartość zestawu”, str. 5.	Styczeń 2020 r.
HB-0101-007, R4	Dodano QIAcube Connect MDx do protokołu zautomatyzowanego; w całym tekście wprowadzono wzmianki o aparacie QIAcube Connect MDx; zaktualizowano numery tabel, stron i rycin.	Grudzień 2020 r.

PreAnalytiX na świecie

Produkty firmy PreAnalytiX są dystrybuowane przez firmy QIAGEN i BD

QIAGEN – obsługa klienta

Składanie zamówień www.QIAGEN.com/shop | Pomoc techniczna support.qiagen.com | Strona WWW www.qiagen.com

BD — obsługa klienta

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: bddenmark@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: bdnorge@bd.com
Orders: ordre.no@bd.com

Southeast Asia

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

South Korea

Orders: 02.3404.3706
Fax: 02.3404.3785
Technical: 02.3404.3706
Technical support: Korea_PAS@bd.com

Spain, Portugal and Andorra

Orders: 34.91.848.8174
Customer support: 34.902.27.17.27
Fax: 34.91.848.8115
E-mail: info.spain@bd.com

Sweden

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

Switzerland

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

UK

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

USA

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



HB-0101-007 1122120PL BD-8945 12/2020
Wyprodukowano w Niemczech