

Desember 2020

Håndbok for PAXgene[®] Blood RNA Kit

Versjon 2



50 (katalognr. 762174)

R4 **MAT** 1122120NO

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Produsert av QIAGEN GmbH for PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

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

PAXgene Blood RNA Kit er ikke tilgjengelig i alle land. Hør fra deg om du trenger mer informasjon.

Begrenset lisensavtale

Bruk av dette produktet innebærer at en kjøper eller bruker av PAXgene Blood RNA Kit samtykker i følgende vilkår:

1. PAXgene Blood RNA Kit kan bare brukes i samsvar med *håndboken for PAXgene Blood RNA Kit* og er kun til bruk med komponenter som er i kitet. PreAnalytiX tilbyr ingen lisens når det gjelder immaterielle rettigheter til å bruke eller innlemme vedlagte komponenter i dette kitet med komponenter som ikke er inkludert i dette kitet, med unntak av det som er beskrevet i *håndboken for PAXgene Blood RNA Kit* og flere protokoller som nå finnes på www.preanalytix.com.
2. PreAnalytiX gir ingen garantier for at dette kitet og/eller bruksområdene ikke krenker rettighetene til tredjeparter bortsett fra tydelig uttrykte lisenser.
3. Dette kitet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. PreAnalytiX frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydte, bortsett fra det som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av kitet samtykker i ikke å gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan føre til eller tilrettelegge for handlinger som er forbudt ovenfor.
6. PreAnalytiX kan håndheve forbudene i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal refunderes alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, i enhver sak som reises for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller hvilke som helst av selskapets immaterielle rettigheter knyttet til kitet og/eller dets komponenter.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.preanalytix.com.

Betinget salg

Det aktuelle produktet kommer med en lisens under visse krav av US-7,270,953, og US-7,682,790, samt EP-1820793 B1 og ekvivalenter til disse patentkravene i andre land, for bruk av produktet til å prosessere nukleinsyrekomplekset dannet under prøvetaking i PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, med enerett.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Sveits

www.preanalytix.com

Forhandlere for PreAnalytiX

PreAnalytiX-produkter produseres og distribueres av QIAGEN eller BD for PreAnalytiX.

Produkter kan ikke bestilles fra PreAnalytiX GmbH.


Se siste side for kontaktinformasjon for din lokale PreAnalytiX-forhandler.

Innhold

Kitets innhold	5
Symboler	6
Oppbevaringsbetingelser.....	8
Tiltenkt bruk	8
Begrenset bruk av produktet.....	9
Kvalitetskontroll	9
Teknisk assistanse	9
Sikkerhetsinformasjon.....	10
Introduksjon	14
Prinsipp og prosedyre.....	14
Prøveinnsamling og stabilisering	15
RNA-konsentrasjon og rensing	20
Manuell RNA-rensing.....	20
Automatisk RNA-rensing.....	30
Utstyr og reagenser som brukeren må sørge for.....	39
Viktige merknader.....	42
Bruk av QIAcube-instrumenter	42
Installere protokoller på QIAcube -instrumenter	45
Innsetting i QIAcube-instrumentene	46
Protokoll: Manuell rensing av total RNA fra humant fullblod samlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	56

Protokoll: Automatisk rensing av totalt RNA fra humant fullblod samlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	63
Feilsøkingsveiledning	70
Vedlegg A: Generelle kommentarer om håndtering av RNA	72
Vedlegg B: Kvantifisering og bestemmelse av kvalitet for totalt RNA	73
Vedlegg C: Håndtere PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	75
Bestillingsinformasjon	76
Endringshistorikk for håndbok	78

Kitets innhold

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalognr.			762174
Antall klargjøringer			50
BR1	Resuspension Buffer (Resuspensjonsbuffer)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Bindende buffer)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Vaskebuffer 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Vaskebuffer 2 (konsentrat)) [†]	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Elusjonsbuffer)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-fritt vann (flaske)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinase K (grønt lokk))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA spinnkolonner (rød))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 ml) (Reagensrør (2 ml))	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™-heter	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Mikrosentrifugerør (1,5 ml))	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNase I, RNase-fritt (lyofilisert))	DNA REM	1500 Kunitz- enheter [‡]
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA-nedbrytningsbuffer (hvitt lokk))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (DNase-resuspensjonsbuffer (rør, lilla lokk))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (PAXgene Shredder spinnkolonner (lilla))	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Håndbok	Håndbok for PAXgene Blood RNA Kit (versjon 2)		1

Symboler



Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> tester



Se bruksanvisningen



Brukes innen



Medisinsk enhet for in vitro-diagnostikk



Katalognummer



Partinummer



Materialnummer



Komponenter



Nummer



Sterilisert ved stråling



Kunitz-enheter



Tilsetter



Inneholder

*Ikke kompatibel med desinfiseringsreagenser som inneholder blekemiddel. Inneholder et guanadinsalt. Se side 10 for sikkerhetsinformasjon.

[†] Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som konsentrat. Før førstegangsbruk tilsettes 4 volumer etanol (96–100 %, renhetsgrad p.a.) som vist på flasken, for å oppnå en arbeidsløsning.

[‡] Kunitz-enheter er enhetene som vanligvis brukes til å måle DNase I, definert som mengden av DNase I som fører til en økning i A_{260} på 0,001 per minutt per milliliter ved 25 °C, pH 5,0, med sterkt polymerisert DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 og 363).

RCNS

Rekonstituert

DNase

Deoksyribonuklease I

EtOH

Etanol

GITC

Guanidinisotiocyanat

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Globalt artikkelnummer



Ikke til gjenbruk



Temperaturbegrensning



Øvre temperaturgrense



Produsent



Viktig merknad

Oppbevaringsbetingelser

PAXgene RNA spinnkolonner (PRC), PAXgene Shredder spinnkolonner (PSC), proteinase K (PK) og buffere (BR1, BR2, BR3, BR4 og BR5) bør oppbevares tørt ved temperaturen som står på etiketten på kitet.

RNase-Free DNase Set, som inneholder DNase I (RNFD), DNA-nedbrytningsbuffer (RDD) og DNase-resuspensjonsbuffer (DRB), transporteres ved omgivelsestemperatur. Oppbevar alle komponenter av RNase-Free DNase Set straks ved mottak ved temperaturen som står på etiketten. Forutsatt riktig oppbevaring er kitet stabilt frem til utløpsdatoen på esken.

Tiltenkt bruk

PAXgene Blood RNA System består av et prøvetakingsrør for blod (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) og nukleinsyrerensepakke (PAXgene Blood RNA Kit). Det er beregnet for prøvetaking, oppbevaring og transport av blod og stabilisering av intracelle-RNA i et lukket rør og etterfølgende isolering og rensing av verts-RNA fra fullblod for RT-PCR brukt i molekylediagnostisk testing.

Ytelsesegenskaper for PAXgene Blood RNA System er etablert bare med FOS- og IL1B-gentranskripter. Brukeren er ansvarlig for å etablere ytelsesegenskaper for PAXgene Blood RNA System som egner seg for andre måltranskripter.

Indikasjoner for bruk

PAXgene Blood RNA Kit er for rensing av intracellulært RNA fra fullblod tatt i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Når kitet brukes sammen med PAXgene Blood RNA Tube (BRT), gir systemet renset intracellulært RNA fra fullblod for RT-PCR brukt i molekylær diagnostikk.

Begrenset bruk av produktet

PAXgene Blood RNA Kit er beregnet på rensing av intracellulært RNA fra humant fullblod ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytter/ml) for in vitro-diagnostiske applikasjoner. Det er ikke for rensing av genomisk DNA eller virusnukleinsyrer fra humant fullblod. På grunn av det begrensede antallet transkripter som er validert for stabiliseringsspesifikasjoner (FOS- og IL1B-gentranskripter), er ikke ytelsesegenskapene etablert for alle transkripter. Brukere skal gjennomgå produsentens data og egne data for å avgjøre om validering er nødvendig for andre transkripter.

Dette produktet skal brukes av fagpersoner, for eksempel teknikere og leger som har fått opplæring i in vitro-diagnostiske prosedyrer.

Se *håndboken for PAXgene Blood RNA Tube* for informasjon om bruken av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem testes hvert parti med PAXgene Blood RNA Kit mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Teknisk assistanse

Hos QIAGEN er vi stolte av kvaliteten på og tilgjengeligheten av vår tekniske støtte. Våre tekniske serviceavdelinger er bemannet av erfarne vitenskapsfolk med omfattende praktisk og teoretisk ekspertise i molekylær biologi og bruken av PreAnalytiX-produkter. Hvis du har spørsmål om PAXgene Blood RNA Kit, må du gjerne ta kontakt med oss.

For teknisk assistanse og mer informasjon, ta kontakt med QIAGEN tekniske serviceavdeling.

Sikkerhetsinformasjon

EU – Brukere må informere produsenten og den nasjonale kompetente myndigheten om alle alvorlige hendelser relatert til enheten. Utenfor EU – Kontakt den lokale QIAGEN-representanten ved eventuelle hendelser eller henvendelser relatert til enheten.

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier.

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller for å unngå risiko for infeksjon (f.eks. HIV- eller hepatitt B-virus) eller skade ved arbeid med biologiske og kjemiske materialer. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (Safety Data Sheets, SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige på nettet i praktisk og kompakt PDF-format på www.preanalytix.com. Her kan du se, vise og skrive ut SDS-er for dette kitet.

FORSIKTIG



IKKE tilsett blekemidler eller sure løsninger direkte i prøvepreparatavfallet.

Bindende buffer (BR2) og vaskebuffer 1 (BR3) inneholder guanidintiocyanat, som kan danne sterkt reaktive forbindelser når det kommer i kontakt med blekemiddel. Hvis bindende buffer (BR2) eller vaskebuffer 1 (BR3) søles, rengjør med egnet laboratorierengjøringsmiddel og vann. Hvis det søles væske som inneholder potensielt smittefarlig agens, må det berørte området først rengjøres med laboratorierengjøringsmiddel og vann, deretter med 1 % (vol./vol.) natriumhypokloritt (blekemiddel).

Den RNA-stabiliserende løsningen og blodblandingen fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan desinfiseres med 1 volum kommersiell blekemiddelløsning (5 % natriumhypokloritt) per 9 volumer RNA-stabiliserende løsning og blodblanding.

Prøvepreparatavfall, f.eks. supernatanter, fra sentrifugeringstrinn i RNA-renseprosedyren, er å anse som potensielt smittomt. Før kasting må avfallet autoklaveres eller forbrennes for å ødelegge smittefarlig materiale. Avfallsbehandlingen må skje i henhold til offisielle forskrifter.

Følgende risiko- og sikkerhetssetninger gjelder for komponenter i PAXgene Blood RNA Kit. Se *håndboken for PAXgene Blood RNA Tube* for sikkerhetsinformasjon om bruken av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Buffer BR2



Inneholder guanidintiocyanat. Fare! Skadelig ved svelging. Kan være farlig ved hudkontakt eller innånding. Gir alvorlig øyeskade. Skadelig, med langtidsvirkning, for vannlevende organismer. Ved kontakt med syrer utvikles meget giftig gass. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege umiddelbart.

Buffer BR3



Inneholder: etanol; guanidintiocyanat. Fare! Brannfarlig væske og damp. Gir alvorlig øyeskade. Ved kontakt med syrer utvikles meget giftig gass. Holdes vekk fra varme/gnister/åpen flamme/varme overflater. Røyking forbudt. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege umiddelbart.

DNase I



Inneholder: DNase. Fare! Kan utløse en allergisk hudreaksjon. Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding. Unngå å puste inn støv/avgasser/gass/tåke/damper/spray. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. Benytt åndedrettsvern. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege. Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende hviler i en stilling som letter åndedrettet.

Proteinase K



Inneholder: proteinase K. Fare! Forårsaker mild hudirritasjon. Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding. Unngå å puste inn støv/avgasser/gass/tåke/damper/spray. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. Benytt åndedrettsvern. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege. Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende hviler i en stilling som letter åndedrettet.

Introduksjon

Innsamling av fullblod er det første trinnet i mange molekylære analyser som brukes til å studere cellulært RNA. Et sentralt problem i slike eksperimenter er imidlertid ustabiliteten til profilen av cellulært RNA in vitro. Studier ved PreAnalytiX har vist at kopitallene på individuelle mRNA-arter i fullblod kan endres mer enn 1000 ganger under oppbevaring eller transport ved romtemperatur.* Dette forårsakes både av hurtig RNA-degradering og av induert uttrykk for visse gener etter at blod er innsamlet. Slike endringer i RNA-uttryksprofilen gjør det umulig med pålitelige studier av genuttrykk. En metode som konserverer RNA-uttryksprofilen under og etter prøvetaking, er derfor avgjørende for riktig analyse av genuttrykk i humant fullblod.

Prinsipp og prosedyre

PreAnalytiX har utviklet et system for prøvetaking, stabilisering, oppbevaring og transport av prøver med humant fullblod i tillegg til en hurtig og effektiv protokoll for rensing av intracellulært RNA. Systemet krever bruk av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; amerikanske patenter 6,602,718 og 6,617,170) for blodprøvetaking og RNA-stabilisering, etterfulgt av manuell eller automatisk rensing av RNA med PAXgene Blood RNA Kit. Både manuelle og automatiserte protokoller gir i det vesentlige lik ytelse når det gjelder RNA-kvalitet og -utbytte. Ytelsesdata for den manuelle protokollen (side 23–30) og den automatiske protokollen (side 32–36) er inkludert i denne håndboken.



QIAGEN QIAcube Connect MDx er ikke tilgjengelig i alle land. Kontakt QIAGENS tekniske serviceavdeling for mer informasjon.

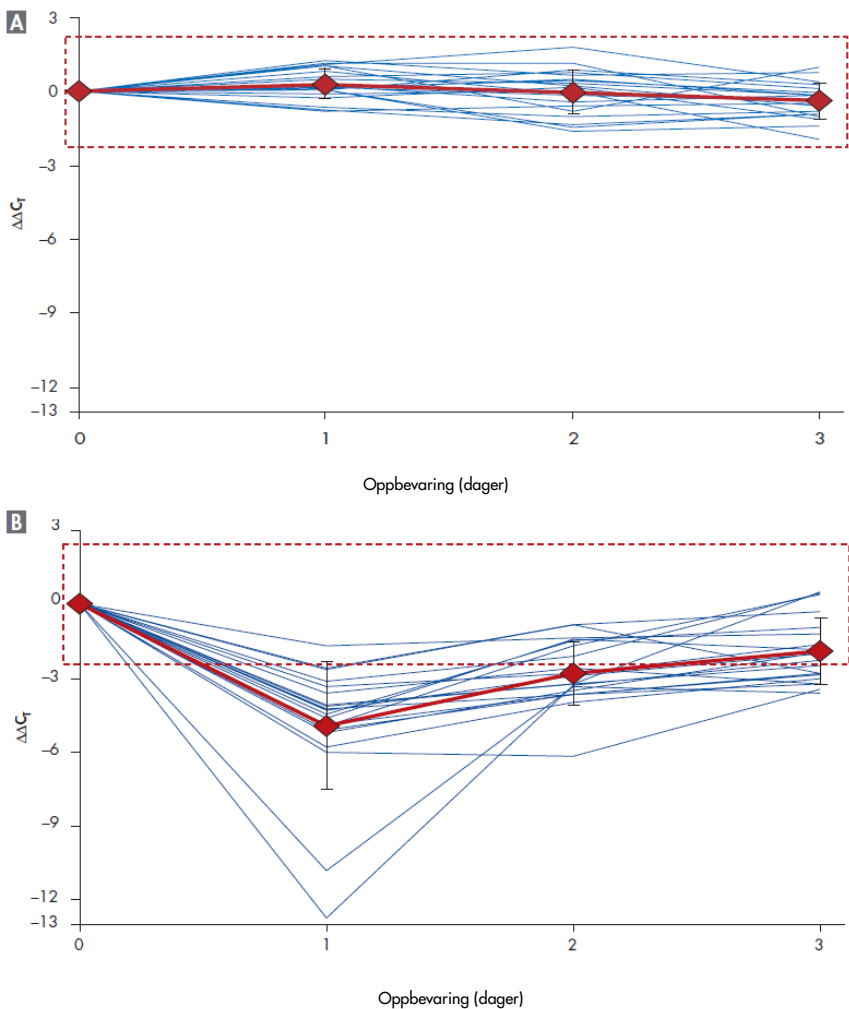
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Prøveinnsamling og stabilisering

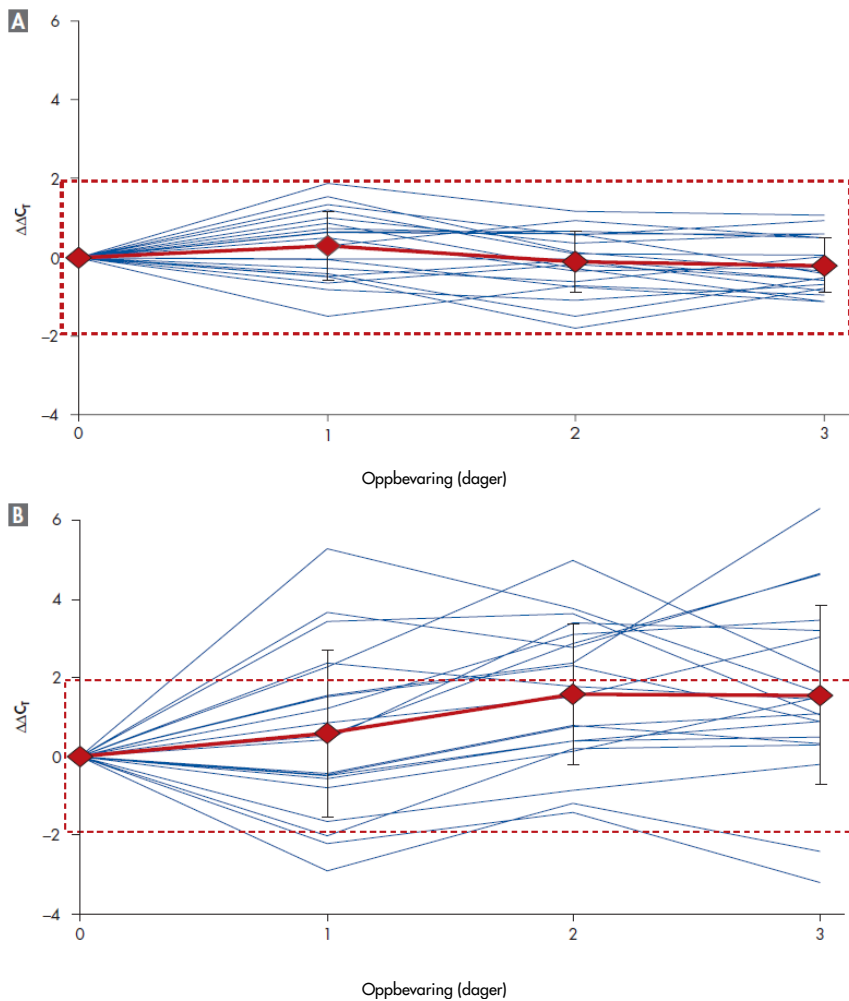
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inneholder en egen reagensforbindelse basert på en patentert RNA-stabiliseringsteknologi. Denne reagensforbindelsen beskytter RNA-molekyler mot degradering av RNaser og minimerer ex vivo-endringer i genuttrykk. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) skal brukes til humant fullblod og stabilisere cellulært RNA i opptil 3 dager ved 18–25 °C (figur 1 og 2, side 16 og 17) eller opptil 5 dager ved 2–8 °C (figur 3 og 4, side 18 og 19). Data som nå er tilgjengelige, viser stabilisering av cellulært RNA i minst 11 år ved –20 °C eller –70 °C*. For mer informasjon fra pågående studier som evaluerer stabilitet over lengre tidsperioder, ta kontakt med QIAGEN tekniske serviceavdeling.

Den faktiske varigheten av RNA-stabilisering kan variere avhengig av arten med cellulært RNA og nedstrømsapplikasjonen som brukes. På grunn av det begrensede antallet transkripter som er validert for stabiliseringsspesifikasjoner (FOS- og IL1B-gentranskripter), er ikke ytelseegenskapene etablert for alle transkripter. Brukere skal gjennomgå produsentens data og egne data for å avgjøre om validering er nødvendig for andre transkripter.

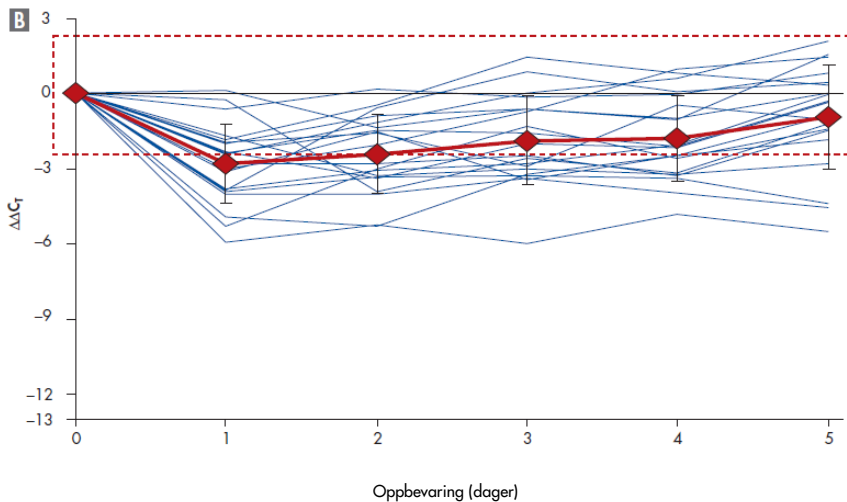
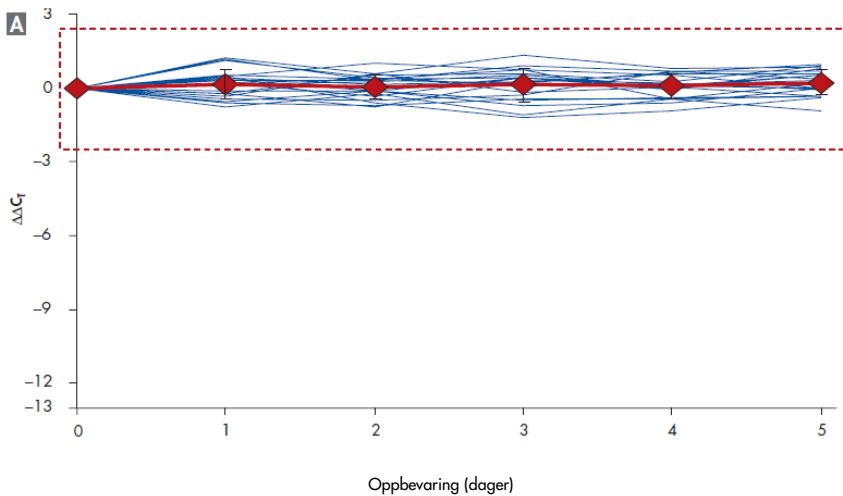
* Det pågår en langsiktig studie av blodlagring i PAXgene Blood RNA Tubes.



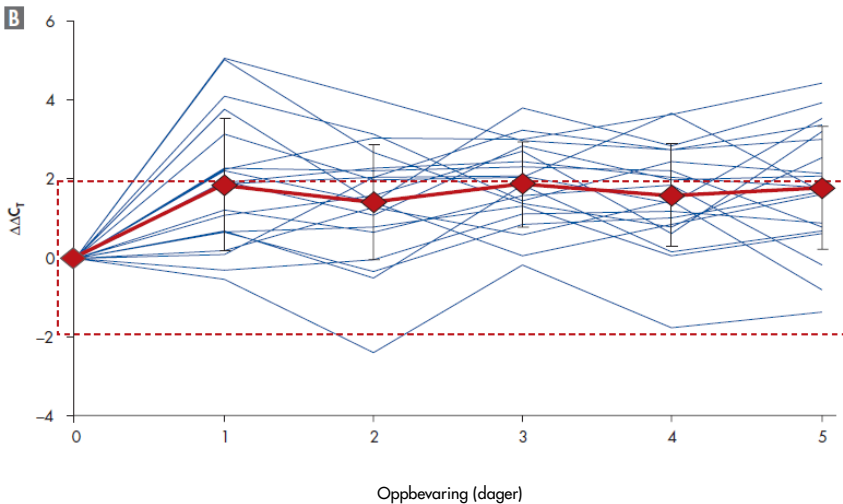
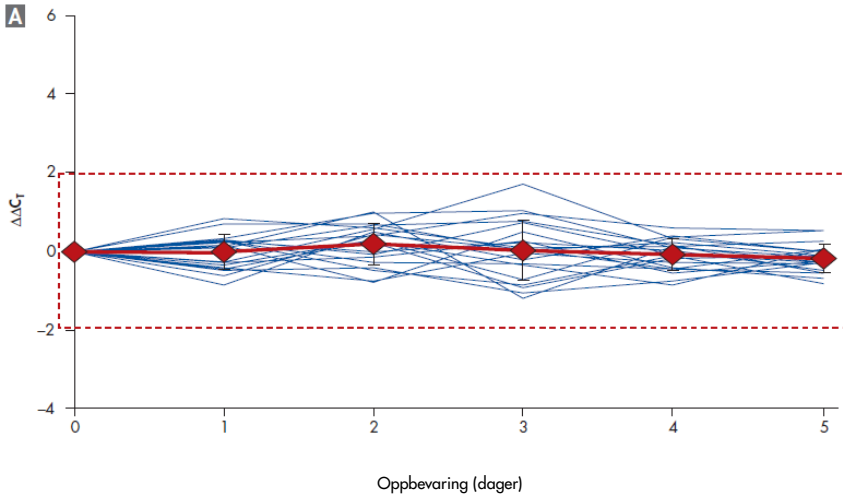
Figur 1. RNA-stabilitet i blodprøver ved 18–25 °C: FOS. Blod ble tatt fra 10 donorer med duplikate prøver og oppbevart ved 18–25 °C i det oppgitte antallet dager, etterfulgt av total RNA-rensing. **[A]** Blod ble tatt og lagret i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), og totalt RNA ble rensset med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blod ble tatt og lagret i standard prøvetakingsrør for blod med EDTA som antikoagulant, og totalt RNA ble rensset med standard organisk ekstraksjonsmetode med silikamembranbasert RNA-rengjøring. Relative transkriptnivåer av FOS ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR, med 18S rRNA som intern standard. Verdiene for alle prøver er plottet med middelerverdi og standardavvik for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3x$ total presisjon for analysen (2,34 C_t).



Figur 2. RNA-stabilitet i blodprøver ved 18–25 °C: IL1B. Det ble tatt blodprøver, og totalt RNA ble rensert etter oppbevaring ved 18–25 °C, som beskrevet i figur 1. Relative transkriptnivåer av IL1B ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR, med 18S rRNA som intern standard. Verdiene for alle prøver er plottet med middelerverdi og standardavvik for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3\times$ total presisjon for analysen ($1,93 C_T$).



Figur 3. RNA-stabilitet i blodprøver ved 2-8°C: FOS. Blod ble tatt fra 10 donorer med duplikate prøver og oppbevart ved 2-8°C i det oppgitte antallet dager, etterfulgt av total RNA-rensing. **[A]** Blod ble tatt og lagret i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), og totalt RNA ble rensert med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blod ble tatt og lagret i standard prøvetakingsrør for blod med EDTA som antikoagulant, og totalt RNA ble rensert med standard organisk ekstraksjonsmetode med silikemembranbasert RNA-rengjøring. Relative transkriptnivåer av FOS ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR, med 18S rRNA som intern standard. Verdiene for alle prøver er plottet med middelerverdi og standardavvik for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3x$ total presisjon for analysen (2,34 C_t).



Figur 4. RNA-stabilitet i blodprøver ved 2–8°C: IL1B. Det ble tatt blodprøver, og totalt RNA ble rensset etter oppbevaring ved 2–8°C, som beskrevet i figur 3. Relative transkriptnivåer av IL1B ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR, med 18S rRNA som intern standard. Verdiene for alle prøver er plottet med middelerddier og standardavvik for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3\times$ total presisjon for analysen (1,93 C_T).

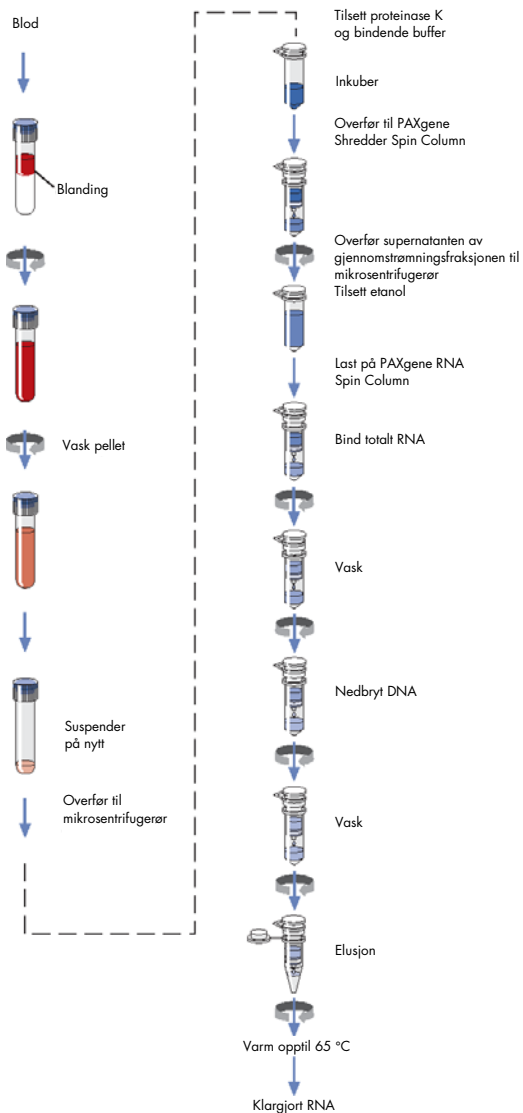
RNA-konsentrasjon og rensing

PAXgene Blood RNA Kit er for rensing av totalt RNA fra 2,5 ml humant fullblod samlet i en PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Prosedyren er enkel og kan utføres med manuelle eller automatiske prosedyrer (se figur 5 og 10, side 21 og 31). I begge protokoller starter rensing med et sentrifugeringstrinn til pellet-nukleinsyrer i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pelleten vaskes og resuspenderes, etterfulgt av manuell eller automatisk RNA-rensing. I prinsippet følger begge protokollene de samme protokolltrinnene med de samme kitkomponentene.

Manuell RNA-rensing

Den resuspenderte pelleten inkuberes i optimerte buffere sammen med proteinase K (PK) for å oppnå proteinnedbrytning. En tilleggssentrifugering gjennom PAXgene Shredder spinnkolonnen (PSC) utføres for å homogenisere cellelysatsen og fjerne restceller, og supernatanten av gjennomstrømningsfraksjonen overføres til et nytt mikrosentrifugerør. Etanol tilsettes for å justere bindingsforhold, og lysatsen anvendes på en PAXgene RNA-spinnkolonne (PRC). Under en kort sentrifugering bindes RNA selektivt til PAXgene-silikamembranen når kontaminanter går gjennom den. Resterende kontaminanter fjernes i flere effektive vasketrinn. Mellom første og andre vasketrinn behandles membranen med DNase I (RNFD) for å fjerne spor av bundet DNA. Etter vasketrinnene elueres RNA i elusjonsbuffer (BR5) og varmedenatureres.

Totalt RNA som isoleres med PAXgene Blood RNA System, er rent. Med den manuelle protokollen er A_{260}/A_{280} -verdier mellom 1,8 og 2,2, og ≤ 1 % (vekt/vekt) genomisk DNA finnes i ≥ 95 % av alle prøver, som målt med kvantitativ, sanntids-PCR av en sekvens av beta-aktin-genet. Minst 95 % av prøvene viser ingen hemming i RT-PCR ved bruk av opptil 30 % av eluatet.

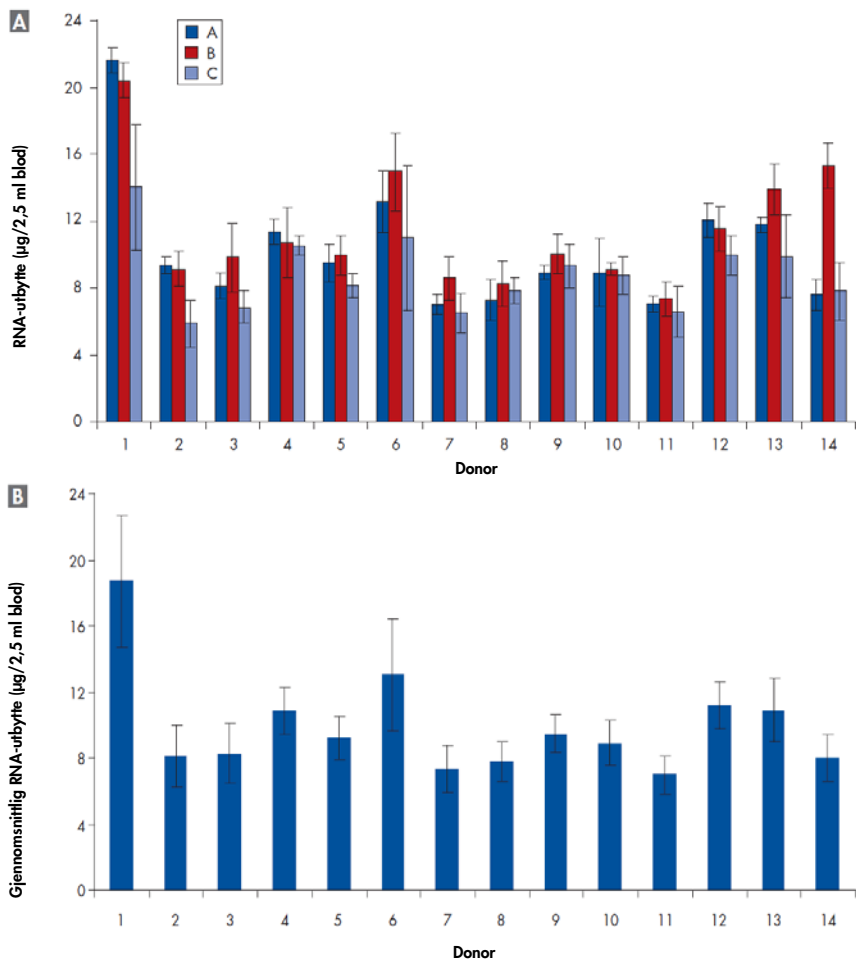


Figur 5. Manuell PAXgene Blood RNA-prosedyre.

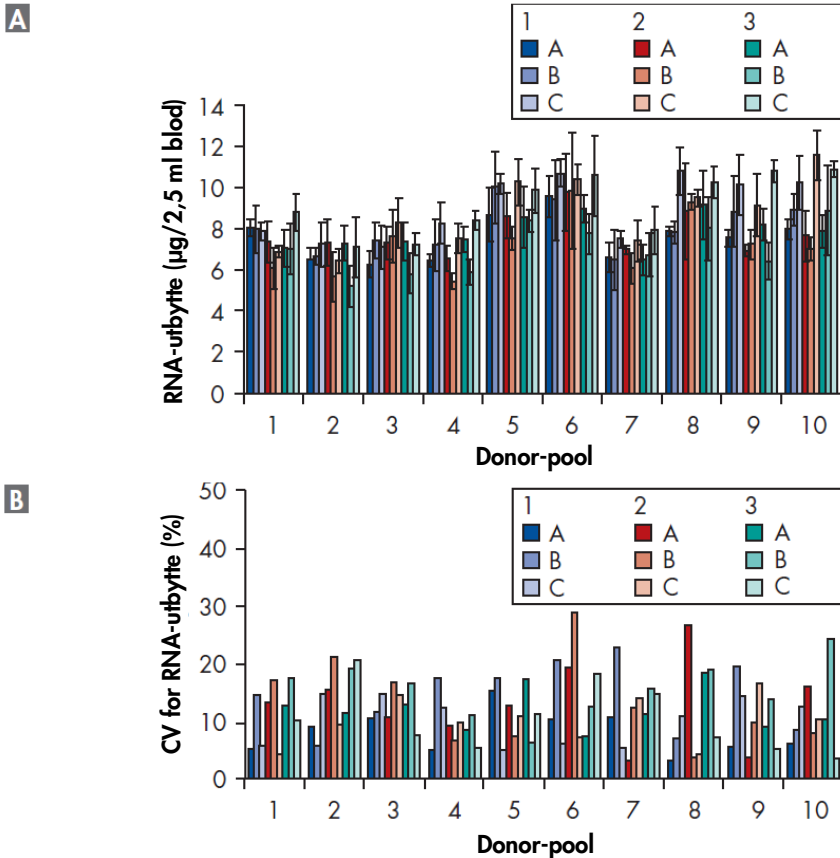
Med den manuelle protokollen er gjennomsnittlig prøveklargjøringstid (basert på data fra 12 prøveklargjøringer) ca. 90 minutter*, med bare 40 minutter praktisk arbeidstid. RNA-utbytte fra 2,5 ml friskt humant fullblod er $\geq 3 \mu\text{g}$ for $\geq 95 \%$ av prøvene som er behandlet. Siden utbytte er sterkt donoravhengig, kan individuelle utbytteverdier variere. For individuelle donorer gir PAXgene Blood RNA System svært reproduserbare og repeterbare utbytteverdier (figur 6 og 7, side 23 og 24) og reproduserbar og repeterbar RT-PCR (figur 8 and 9, side 28 og 29), noe som gjør systemet svært robust for kliniske diagnostiske tester.

Figur 6 (side 23) indikerer den generelle repeterbarheten og reproduserbarheten for PAXgene Blood RNA System. Flere studier ble utført for å vise påvirkningen av forskjellige PAXgene Blood RNA-pakkepartier og forskjellige operatører på reproduserbarheten av RNA-resultater og sanntids-RT-PCR-ytelse. Da samlinger av blodprøver ble brukt i stedet for individuelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) for disse studiene, gjenspeiler ikke resultatene systemets repeterbarhet, inkludert variasjoner mellom individuelle blodprøver, men bare repeterbarheten av prøveklargjøringen (se figur 7, side 24).

* Samlet protokollkjøretid, herunder foregående håndtering av PAXgene Blood RNA Tubes (sentrifugeringer, pelletvask og pelletresuspensjon).



Figur 6. Reproduserbar og repeterbar RNA-rensing. Blodprøver i kvadruplikat fra 14 donorer ble behandlet manuelt av hver av 3 teknikere (A, B, C). Tre sett med utstyr ble brukt, og alle prøver klargjort av én tekniker ble behandlet med det samme utstyret. **[A]** Gjennomsnitt og standardavvik for RNA-utbytte per replikatprøve fra de samme donorene og forskjellige teknikere vises. **[B]** Tolv replikatblodprøver fra hver av 14 donorer ble behandlet av de 3 forskjellige teknikerne. Gjennomsnitt og standardavvik for RNA-utbytte for prøver fra de samme donorene samt alle teknikere vises. For alle RNA-prøver varierte A_{260}/A_{280} -forhold fra 1,8 til 2,2.



Figur 7. Repeterbarhet og reproduserbarhet for RNA-utbytte for forskjellige operatører og PAXgene Blood RNA Kit-partier som bruker samlede blodprøver. Blodprøver fra 30 forskjellige donorer ble samlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, 12 rør per donor, totalt 360 rør). Innholdet i rørene fra 3 donorer ble samlet og deretter alikvotert på nytt til 36 prøver. Disse 36 prøvene per 3 donor-pool ble behandlet manuelt av 3 forskjellige operatører. Hver operatør brukte 3 forskjellige PAXgene Blood RNA Kit-partier for å trekke ut og behandle kvadruplikate prøver fra hver av de 10 donor-poolene. **[A]** RNA-utbytte og standardavvik for hver operatør-parti-kombinasjon. Kvadruplikate blodprøver fra 10 donor-pooler ble behandlet av 3 forskjellige operatører (A, B, C) med hver av 3 kit-partier (1, 2, 3). Gjennomsnittlige utbytteverdier (kolonnene) og standardavvikene (feilsøyler) per kvadruplikate prøve fra den samme donor-poolen for forskjellige operatører og forskjellige kit-partier vises. **[B]** CV for RNA-utbytte per donor-pool for alle operatør-parti-kombinasjoner (A, B, C, 1, 2, 3) som beregnet fra gjennomsnittlig utbytte og standardavvik for utbyttet vises i figur 7A.

Tabell 1A. Reproduserbarhet innenfor hvert parti og innenfor hver bruker for valgte donor-pooler (1, 6, 9, 10)

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

Tabell 1B. Reproduserbarhet innenfor hver bruker og mellom alle partier for valgte donor-pooler (1, 6, 9, 10)

Kombinasjon av data	Donor-pool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/ml			Donor-pool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/ml		
	Gjennomsnittlig utbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gjennomsnittlig utbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Bruker A, alle partier	7,46	0,85	11	9,43	1,22
Bruker B, alle partier	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Bruker C, alle partier	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombinasjon av data	Donor-pool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/ml			Donor-pool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/ml		
	Gjennomsnittlig utbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gjennomsnittlig utbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Bruker A, alle partier	7,54	0,72	10	7,81	0,82
Bruker B, alle partier	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Bruker C, alle partier	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tabell 1C. Reproduserbarhet innenfor hvert parti og mellom alle brukere for valgte donor-pooler (1, 6, 9, 10)

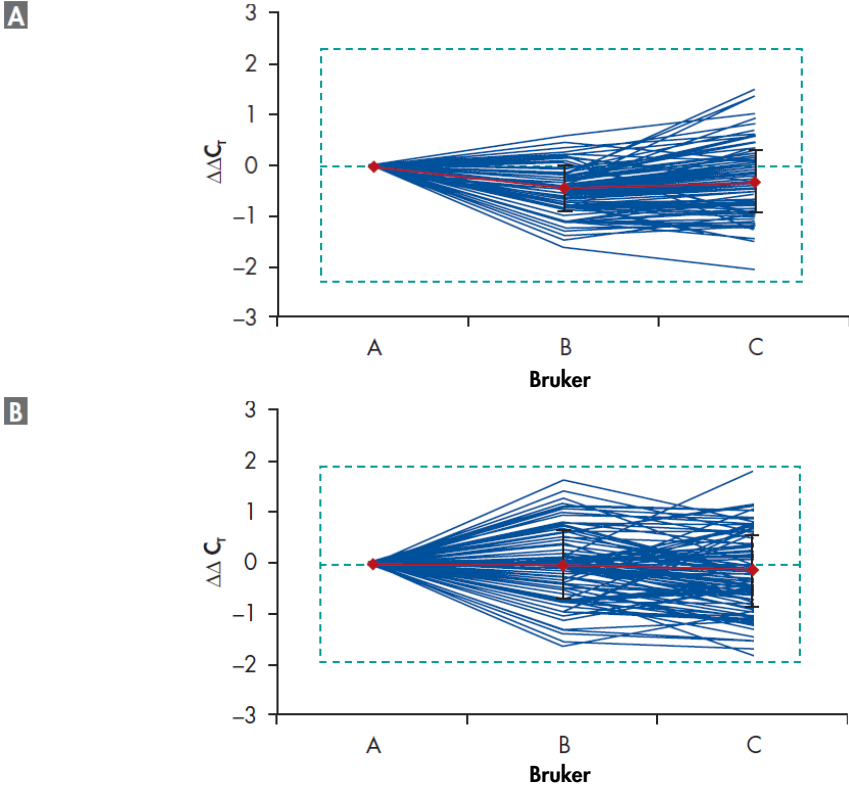
Kombinasjon av data	Donor-pool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/ml			Donor-pool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/ml		
	Gjennomsnittlig utbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gjennomsnittlig utbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Parti 1, alle brukere	7,96	0,69	9	9,88	1,34
Parti 2, alle brukere	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Parti 3, alle brukere	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombinasjon av data	Donor-pool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/ml			Donor-pool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/ml		
	Gjennomsnittlig utbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gjennomsnittlig utbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Parti 1, alle brukere	8,83	1,63	19	9,02	1,27
Parti 2, alle brukere	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Parti 3, alle brukere	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabell 1D. Reproduserbarhet mellom alle partier og alle brukere for valgte donor-pooler (1, 6, 9, 10)

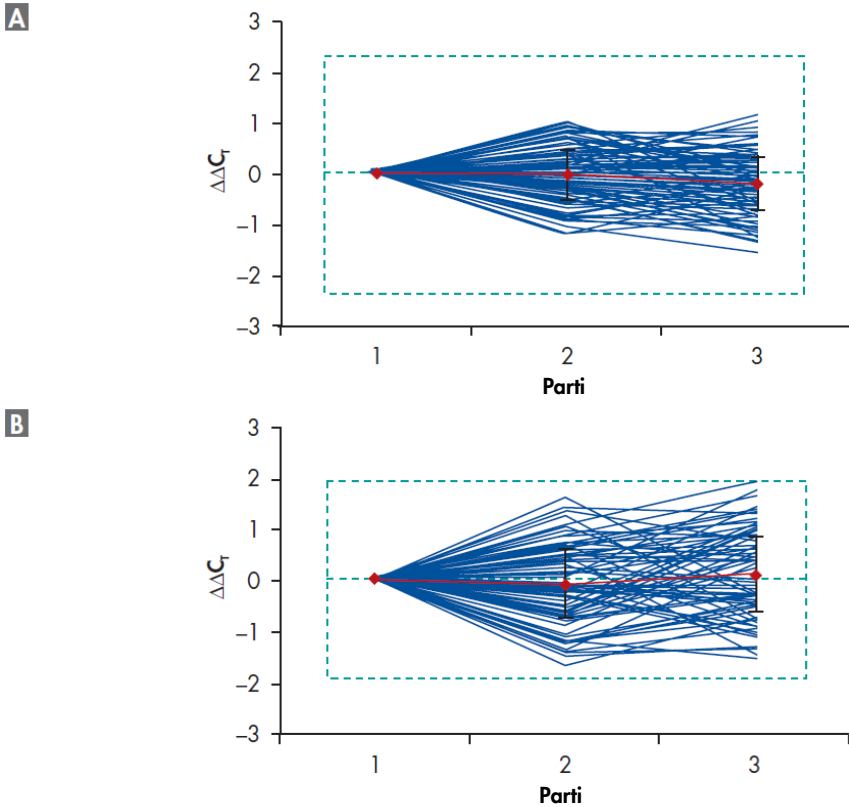
Kombinasjon av data	Donor-pool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/ml			Donor-pool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/ml		
	Gjennomsnittlig utbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gjennomsnittlig utbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Parti 1, alle brukere	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

Kombinasjon av data	Donor-pool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/ml			Donor-pool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/ml		
	Gjennomsnittlig utbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gjennomsnittlig utbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Parti 1, alle brukere	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detaljert analyse av 4 representative donor-pooler. Valg av poolene var basert på leukocyttantallet og reflekterte de øvre, mellomste og nedre verdiene for normalområdet for leukocyttantall ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytter/ml). Leukocyttantallet representerer gjennomsnittet for 3 leukocyttinger fra 3 donorer per donor-pool.



Figur 8. Reproduserbarhet for RT-PCR – mellom brukere. RNA renset i eksperimentet beskrevet i figur 7 ble brukt i sanntids-RT-PCR. Relative transkriptnivåer av **[A]** FOS og **[B]** IL1B ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR med 18S rRNA som intern standard. Verdiene for alle prøver er plottet inn, i forhold til verdiene for bruker A (10 donor-pooler x 3 kit-partier x 4 replikater = 120 datasett for hvert gen), med gjennomsnitt (røde linjer) og standardavvik (svarte søyler) for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3x$ total presisjon for analysene (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).



Figur 9. Reproduserbarhet for RT-PCR – mellom kit-partier. RNA renset i eksperimentet beskrevet i figur 7 ble brukt i sanntids-RT-PCR. Relative transkriptnivåer av **[A]** FOS og **[B]** IL1B ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR med 18S rRNA som intern standard. Verdiene for alle prøver er plottet inn, i forhold til verdiene for kit-parti 1 (10 donor-pooler x 3 brukere x 4 replikater = 120 datasett for hvert gen), med gjennomsnitt (røde linjer) og standardavvik (svarte søyler) for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3 \times$ total presisjon for analysene (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Tabell 2. Sammendrag av RT-PCR-data fra figur 8 og 9

Testsystem	FOS/18S rRNA-analyse		IL1B/18S rRNA-analyse	
	Gjennomsnitt ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Gjennomsnitt ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reproduserbarhet innen hver bruker og mellom alle partier				
Alle brukere, parti 1 – parti 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle brukere, parti 1 – parti 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Alle brukere, parti 1 – parti 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproduserbarhet innen hver bruker og mellom alle partier				
Alle partier, bruker A – bruker A	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle partier, bruker A – bruker B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Alle partier, bruker A – bruker C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Bruker: Tekniker, utførte studien.

Parti: Nummer på kit-parti som er brukt i denne studien.

SA: Standardavvik.

Gjennomsnittlige $\Delta\Delta C_T$ -verdier (N = 120) og standardavvik vises for data som presenteres i figur 8 og 9.

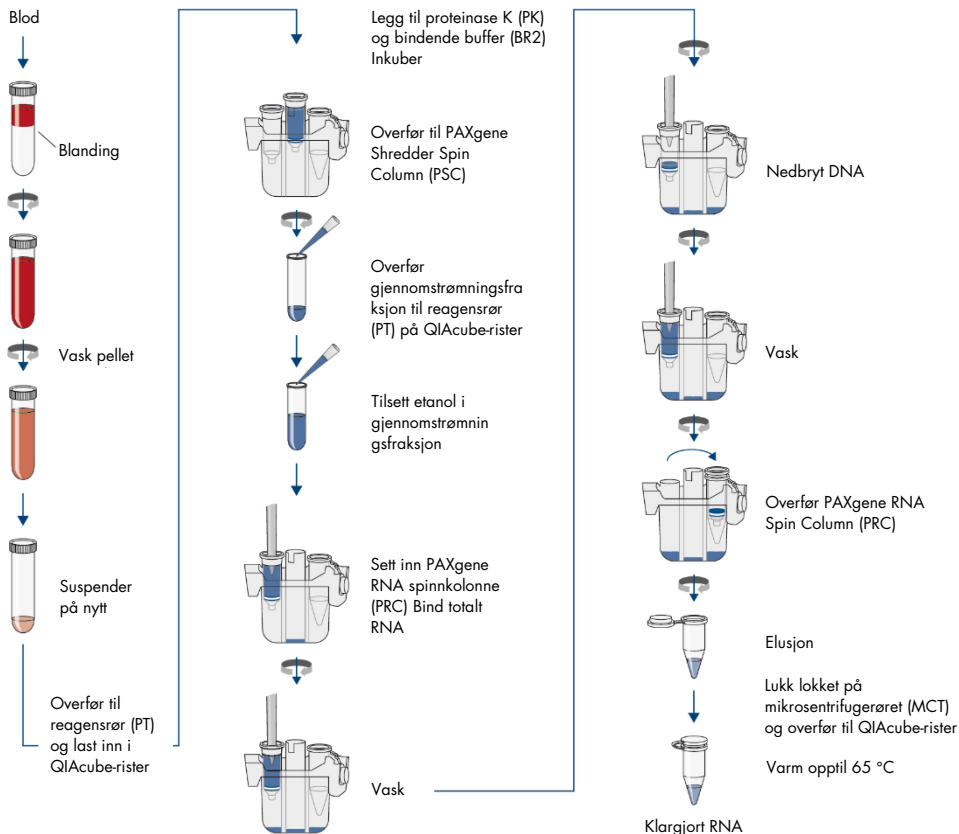
Automatisk RNA-rensing

Rensing av RNA fra blod blir automatisert på QIAGEN QIAcube Connect MDx eller den klassiske QIAGEN QIAcube (heretter kalt QIAcube). De innovative QIAcube-instrumentene bruker avansert teknologi til å prosessere QIAGEN-spinnkolonner, noe som muliggjør sømløs integrasjon av automatisert prøveklargjøring med lavt gjennomløp i laboratoriets arbeidsflyt. Prøveklargjøring ved bruk av QIAcube-instrumenter følger de samme trinnene som den manuelle prosedyren (dvs. lysere, binde, vaske og eluere), slik at du kan fortsette å bruke PAXgene Blood RNA Kit for å rense RNA av høy kvalitet.



Figur 10. QIAcube Connect MDx.

Den automatiske RNA-renningsprotokollen består av 2 deler (eller protokoller), "PAXgene Blood RNA Part A" og "PAXgene Blood RNA Part B", med en kort manuell intervensjon mellom de 2 delene (se figur 11, side 32).



Figur 11. Automatisk PAXgene Blood RNA-prosedyre.

Den sentrifugerte, vaskede og resuspenderte nukleinsyrepelletten (se "RNA-konsentrasjon og rensing", side 20) overføres fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT) til reagensrør som settes i termo-/risterenheten på QIAcube-instrumentenes arbeidsbenk. Operatøren velger og starter "PAXgene Blood RNA Part A"-protokollen fra menyen. QIAcube-instrumentene utfører trinnene i protokollen frem til elusjon av RNA i elusjonsbufferen (BR5). Operatøren overfører mikrosentrifugerørene som inneholder rensed RNA, til termo-/risterenheten til QIAcube-instrumentene. Operatøren velger og starter "PAXgene Blood RNA Part B"-protokollen fra menyen, og varmedenatureringen utføres av QIAcube-instrumentene.

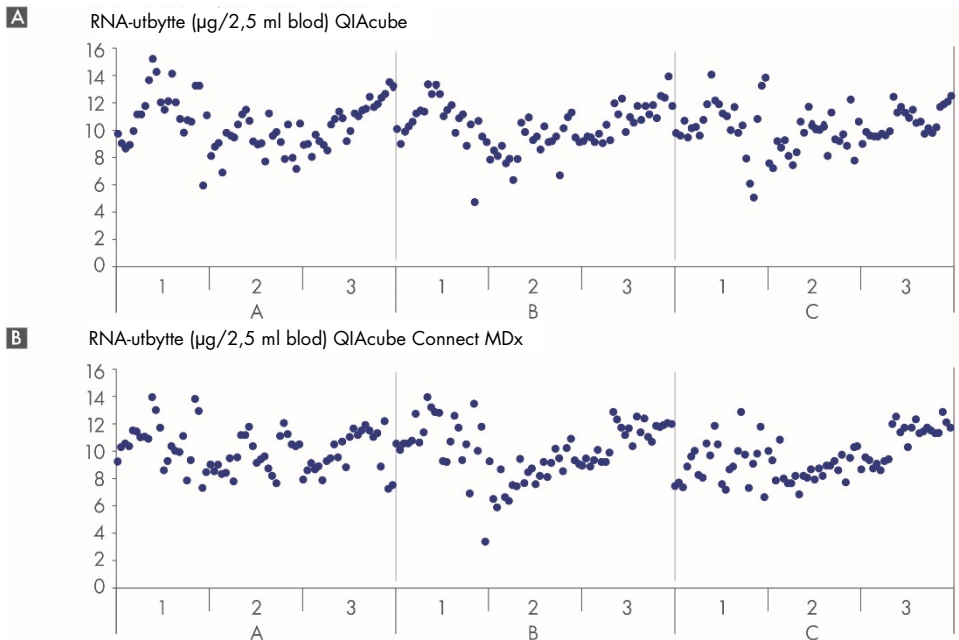
Gjennomsnittlig prøveklargjørings tid (basert på data fra 12 prøveklargjøringer) er 151 minutter*, med vesentlig mindre praktisk arbeidstid sammenlignet med den manuelle protokollen.

RNA-utbytte fra 2,5 ml friskt humant fullblod er $\geq 3 \mu\text{g}$ for $\geq 95\%$ av prøvene som er behandlet. Figur 12 (side 34) viser RNA-utbytteverdiene fra totalt 216 prøver klargjort med den automatiske protokollen med 3 kit-partier av 3 operatører. Da samlede blodprøver ble brukt til disse studiene i stedet for individuelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), viser ikke resultatene RNA-utbyttet forventet fra enkeltprøver av individuelle blodprøver. Siden utbytteverdier er sterkt donoravhengige, kan individuelle utbytteverdier variere (figur 12, side 34).

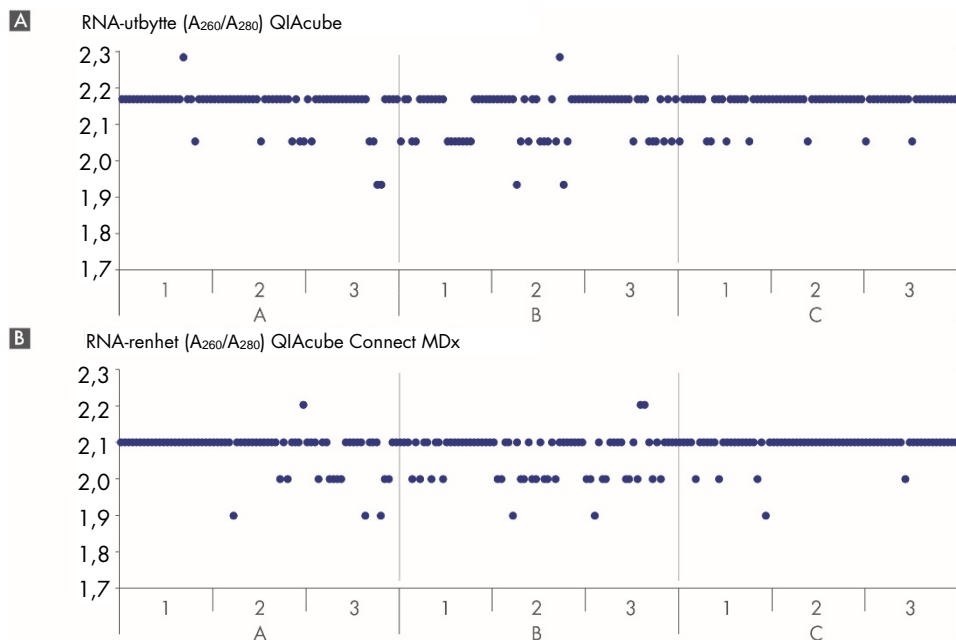
Minst 95 % av prøvene viser ingen hemming i RT-PCR ved bruk av opptil 30 % av eluatet. Krysskontaminering mellom prøvene kan ikke detekteres med den automatiske protokollen, målt med kvantitativ, sanntids-RT-PCR av sekvensene av ABL1- og FOS-transkripter i RNA-negative prøver (vann) parert med RNA-positive prøver (humant fullblod) i samme kjøring.

RNA isolert med PAXgene Blood RNA System og den automatiske protokollen er rent, som vist av manglende RT-PCR-hemming og A_{260}/A_{280} -verdier mellom 1,8 og 2,2. Genomisk DNA finnes ved $\leq 1\%$ (vekt/vekt) i $\geq 95\%$ av alle prøver, som målt med kvantitativ, sanntids-PCR av en sekvens av beta-aktin-genet. Figur 13 og 14 (side 35 og 36) viser A_{260}/A_{280} -verdiene og relativt genomisk DNA av totalt 216 prøver klargjort med den automatiske protokollen med 3 kit-partier av 3 operatører.

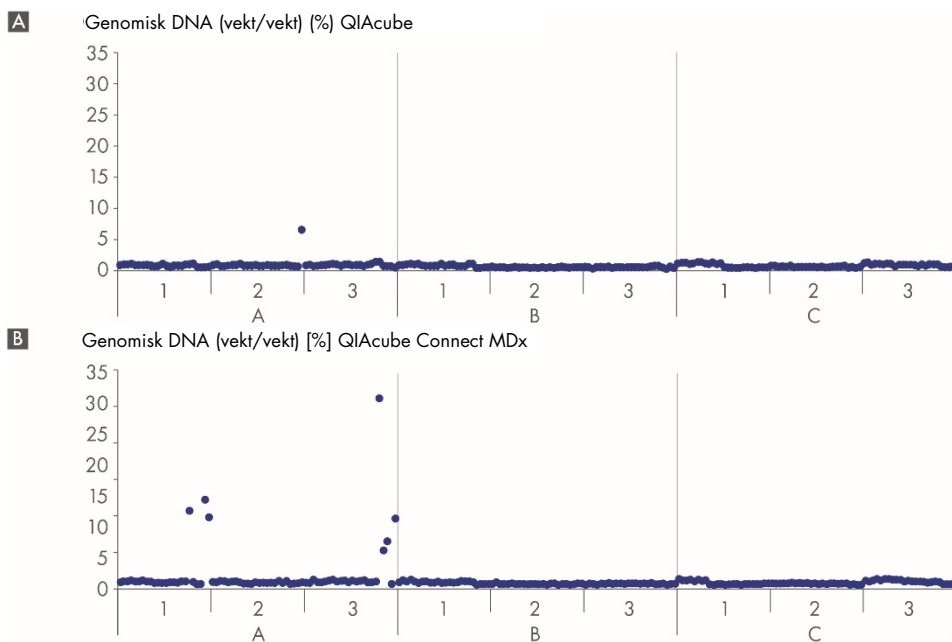
* Samlet protokollkjøretid, herunder foregående håndtering av PAXgene Blood RNA Tubes (sentrifugeringer, pelletvask og pelletresuspensjon).



Figur 12. RNA-utbytte – automatisk behandling A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Blodprøver fra individuelle donorer ble tatt i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Innholdet i rørene ble samlet i 6 donor-pooler og deretter omfordelt. Totalt 216 rør (dvs. 36 per pool) ble behandlet av 3 forskjellige operatører (A, B, C). Hver operatør brukte 3 forskjellige partier (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit for automatisk å trekke ut og behandle kvadruplikate prøver fra hver av de 6 donor-poolene ved hjelp av flere QIAcube- and QIAcube Connect MDx-instrumenter. RNA-utbytter for alle individuelle prøver vises for hver operatør-parti-kombinasjon.

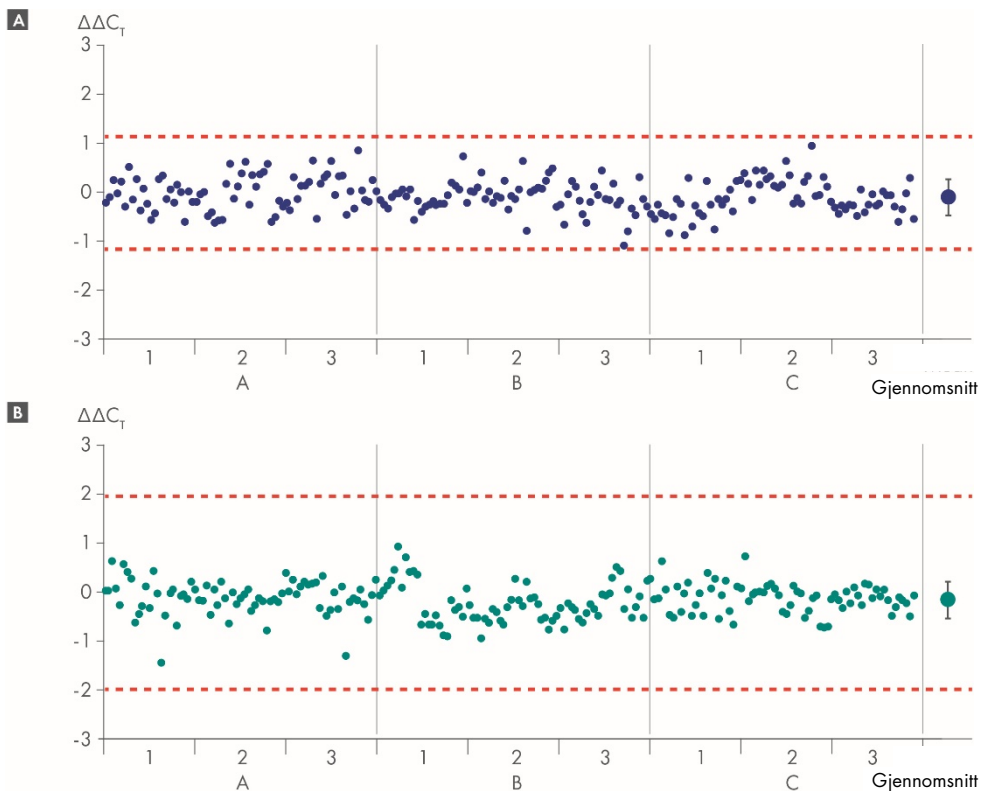


Figur 13. RNA-renhet (A_{260}/A_{280} -verdier) — automatisk behandling. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx RNA ble rensset av 3 forskjellige operatører (A, B, C) med 3 forskjellige partier (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit ved bruk av flere QIAcube- og QIAcube Connect MDx-instrumenter i eksperimentet beskrevet i figur 12. A_{260}/A_{280} -verdier av alle individuelle prøver vises for hver operatør-parti-kombinasjon.

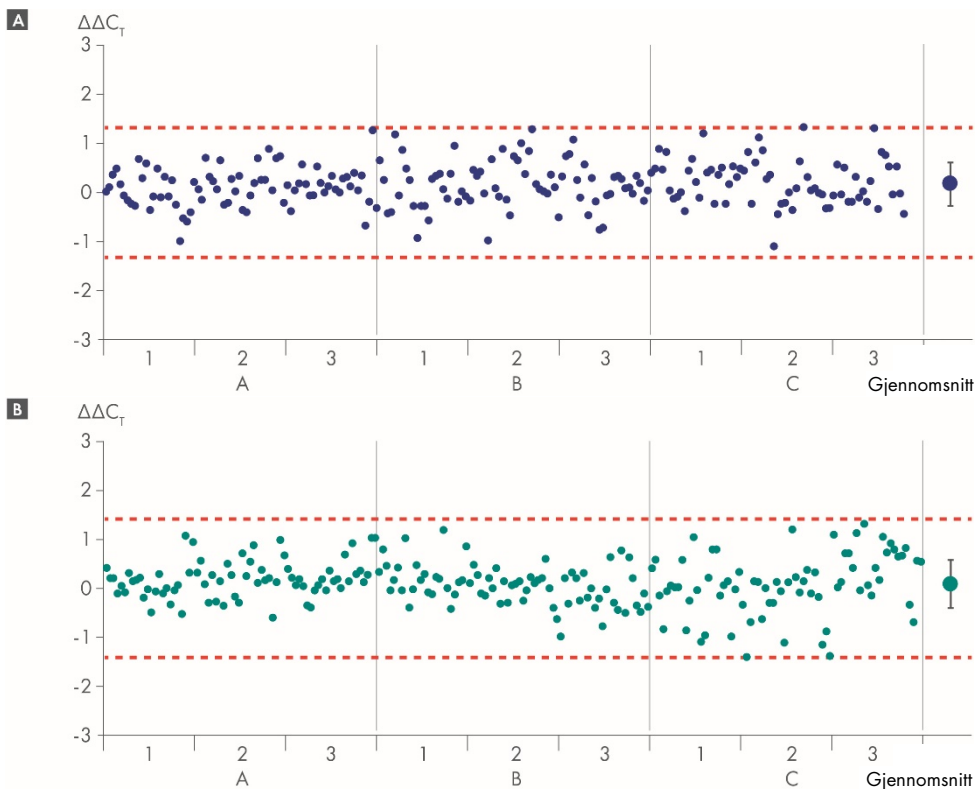


Figur 14. RNA-renhet (% genomisk DNA-kontaminering) – automatisert behandling, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. RNA ble rensert av 3 forskjellige operatører (A, B, C) med 3 forskjellige partier (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit ved bruk av flere QIAcube- og QIAcube Connect MDx-instrumenter i eksperimentet beskrevet i figur 12. Genomiske DNA-mengder (vekt/vekt) i alle individuelle prøver vises for hver operatør-parti-kombinasjon.

Den automatiske protokollen for RNA-rensing med PAXgene Blood RNA System gir høyst reproducerbare og repeterbare RT-PCR-resultater, som vist i figur 15 figur 16 (side 37 og 38), noe som gjør den svært robust for kliniske diagnostiske tester.



Figur 15. Reproduserbarheten for RT-PCR – mellom automatiske (QIAcube) og manuelle protokoller. RNA ble renset av 3 forskjellige operatører (A, B, C) med 3 forskjellige partier (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit ved bruk av flere QIAcube- og QIAcube Connect MDx-instrumenter ved hjelp av den automatiske protokollen i eksperimentet beskrevet i figur 12. Parallelt ble RNA renset fra tilsvarende replikatrør ved hjelp av den manuelle protokollen. Relative transkriptnivåer av **[A]** FOS og **[B]** IL1B ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR med 18S rRNA som intern standard. Mulige forskjeller i transkriptnivåer mellom RNA klargjort fra parede blodprøver med begge ekstraksjonsprotokoller (automatisk og manuell protokoll) ble beregnet med $\Delta\Delta C_T$ -metoden. Individuelle $\Delta\Delta C_T$ -verdier for alle prøvepar (4 replikater x 6 donor-pooler x 3 kit-partier x 3 operatører = 216 par for hvert gen) plottes som enkeltprikker med gjennomsnitt (større prikker) og standardavvik (svarte søyler) for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3x$ total presisjon for analysene (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; forskjellige analysepresisjoner sammenlignet med figur 1–4, 8 og 9 på grunn av forskjellige analyseversjoner).



Figur 16. Reproduserbarhet av RT-PCR – mellom QIAcube og QIAcube Connect MDx ved hjelp av den automatiske protokollen. RNA ble rensset av 3 forskjellige operatører (A, B, C) med 3 forskjellige partier (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit ved hjelp av den automatiske protokollen på flere QIAcube- og QIAcube Connect MDx-instrumenter i eksperimentet beskrevet i figur 12. Relative transkriptnivåer av **[A]** FOS og **[B]** IL1B ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR med 18S rRNA som intern standard. Mulige forskjeller i transkriptnivåer mellom RNA klargjort fra parede blodprøver med begge instrumenter ble beregnet med $\Delta\Delta C_T$ -metoden. Individuelle $\Delta\Delta C_T$ -verdier for alle prøvepar (4 replikater x 6 donor-pooler x 3 kit-partier x 3 operatører = 216 par for hvert gen) plottes som enkeltprikker med gjennomsnitt (større prikker) og standardavvik (svarte søyler) for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3x$ total presisjon for analysene (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; forskjellige analysepresisjoner sammenlignet med figur 1–4, 8, 9 og 15 på grunn av forskjellige analyseversjoner).

Utstyr og reagenser som brukeren må sørge for

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

For alle protokoller

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; kat.nr. 762165)
- Etanol (96–100 %, renhetsgrad p.a.)
- Pipetter* (10 µl – 4 ml)
- Steril, aerosolbarriere, RNase-frie pipettespisser†
- Gradert sylinder‡
- Sentrifuge* som kan oppnå 3000–5000 x g, og er utstyrt med en svingbar rotor og beholdere for PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Vorteksmikser*
- Knust is
- Permanent penn for merking

For den manuelle protokollen

- Mikrosentrifuge* med variabel hastighet som kan oppnå et område på minst 1000–8000 x g, men lavere og høyere g-krefter kan gjelde (se protokolltrinn for detaljer), og er utstyrt med en rotor for 2 ml mikrosentrifugerør

* Pass på at enhetene og instrumentene er sjekket, vedlikeholdt og kalibrert regelmessig i henhold til produsentens anbefalinger.

† Pass på at du er godt kjent med retningslinjene for håndtering av RNA (Vedlegg A, side 72).

‡ For tilsetning av etanol til Buffer BR4-konsentrat.

- Rister/inkubator* som kan inkubere ved 55 °C og 65 °C og riste ved ≥ 400 o/min, ikke over 1400 o/min (for eksempel Eppendorf® Thermomixer Compact eller tilsvarende)

For den automatiske protokollen (ved bruk av QIAcube eller QIAcube Connect MDx)

- Saks

Forbruksvarer til QIAcube-instrumenter:

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

Tilbehør til QIAcube-instrumenter:

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

For den automatiske protokollen ved bruk av QIAcube Connect MDx

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

QIAcube Connect MDx servicepakker:

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

* Pass på at enhetene og instrumentene er sjekket, vedlikeholdt og kalibrert regelmessig i henhold til produsentens anbefalinger.

† Også inkludert i Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat.nr. 990395).

For den automatiske protokollen ved bruk av QIAcube

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

* Pass på at enheter og instrumenter er sjekket, vedlikeholdt og kalibrert regelmessig i henhold til produsentens anbefalinger.

Viktige merknader

Bruk av QIAcube-instrumenter

Sørg for at du er kjent med bruken av QIAcube-instrumentet. Les brukerhåndboken til QIAcube-instrumentet og eventuell tilleggsinformasjon som er levert med QIAcube-instrumentet, og vær spesielt oppmerksom på sikkerhetsinformasjonen før du starter de automatiske PAXgene Blood RNA-protokollene.

Instruksjonene i denne delen gjelder både QIAcube Connect MDx og QIAcube der dette ikke er spesifisert separat.

Starte QIAcube-instrumenter

Lukk dekselet til QIAcube-instrumentet, og slå av QIAcube-instrumentet med strømbryteren (QIAcube Connect MDx: se figur 17, side 43; QIAcube: Figur 18, side 44).

En pipelyd avgis, og oppstartskjerm bildet vises. Instrumentet utfører initialiseringstester automatisk.



QIAcube Connect MDx sett forfra.



Uttrukket berøringsskjerm



QIAcube Connect MDx sett bakfra



QIAcube Connect MDx sett bakfra

Figur 17. Eksterne funksjoner i QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|---|
| <p>1 Berøringsskjerm</p> <p>2 Deksel</p> <p>3 Avfallsskuff</p> <p>4 Strømbryter</p> | <p>5 2 USB-porter på venstre side av berøringsskjermen; 2 USB-porter bak berøringsskjermen (Wi-Fi-modulen koblet til 1 USB-port)</p> <p>6 RJ-45 Ethernet-port</p> <p>7 Strømledningkontakt</p> <p>8 Utløp for kald luft</p> |
|---|---|



Figur 18. QIAcube sett forfra.

- | | | | |
|---|--|---|----------------------|
| 1 | Berøringskjerm | 4 | USB-port bak panelet |
| 2 | Deksel | 5 | Strømbryter |
| 3 | RS232-serieporten bak panelet (kun til bruk av QIAGEN instrumentservicespesialister) | 6 | Avfallsskuff |

Berøringsskjerm

QIAcube-instrumenter styres ved hjelp av en berøringsskjerm. Berøringsskjermen gjør at brukeren kan betjene instrumentet og veilede brukerne gjennom oppsett av arbeidsbenk. Under prøvebehandlingen viser berøringsskjermen protokollstatus og gjenværende tid.





Figur 19. Uttrukket berøringsskjerm på QIAcube Connect MDx

Installere protokoller på QIAcube -instrumenter

Det kan være nødvendig å utføre en protokollinstallasjon før den første RNA-forberedende kjøringen på QIAcube-instrumenter kan utføres. Installer både "PAXgene Blood RNA Part A"- og "PAXgene Blood RNA Part B"-protokollene.

Protokoller for QIAcube Connect MDx er tilgjengelig på www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources (www.qiagen.com/MyQIAcube for QIAcube) og må nedlastes til USB-minnepinnen som følger med QIAcube-instrumentene. Disse protokollene vil bli overført til instrumentet via USB-porten.

Med USB-porten (QIAcube Connect MDx: ved siden av berøringsskjermen, se figur 17, side 43; QIAcube: bak panelet, se figur 18, side 44) kan QIAcube-instrumenter kobles til en USB-minnepinne som følger med QIAcube-instrumentene. Datafiler, f.eks. loggfiler eller rapportfiler, kan også overføres via USB-porten fra QIAcube til USB-minnepinnen.

-  USB-porten er kun til bruk med USB-minnepinnen som er levert av QIAGEN. Ikke koble andre enheter til denne porten.
-  Ikke ta ut USB-pinnen når du laster ned protokoller eller overfører datafiler, eller under en protokollkjøring.



Du finner mer informasjon om prosessen med å laste opp protokoller til QIAcube-instrumenter i den aktuelle håndboken for instrumentet som brukes.

Innsetting i QIAcube-instrumentene

For å spare tid kan innsettingen skje under ett av eller begge sentrifugeringstrinnene på 10 minutter (trinn 3 og 5) i "Protokoll: Automatisk rensing av totalt RNA fra humant fullblod samlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", side 63.

Reagensflasker

Før hver kjøring på QIAcube må du forsiktig fylle de 4 reagensflaskene med reagensene angitt i tabell 3 (side 47) opptil maksimalt indikatornivå eller, hvis dette ikke er mulig, til nivået tillatt av buffervolumene medfølgende PAXgene Blood RNA Kit. Merk flaskene og lokkene tydelig med buffernavnene, og sett de fylte reagensflaskene i riktig posisjon i reagensflaskestativet. Sett inn stativet i QIAcube-arbeidsbenken som vist (figur 20–22, side 47–49).

-  Det leverte volumet av Buffer BR2 vil ikke fylle en reagensflaske til indikatornivået. Buffere BR3 og BR4 fyller kanskje ikke flasken til indikatornivået etter behandling av flere prøver i tidligere kjøring.
-  Pass på å fjerne lokkene fra flaskene før de settes på arbeidsbenken.



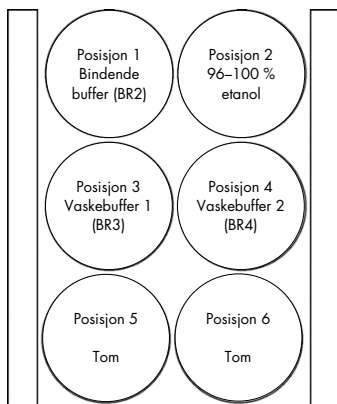
Buffervolumer som er gitt i PAXgene Blood RNA Kit (50) er nok til maks 7 RNA-klargjøringskjøringer på QIAcube-instrumentet, med prøveantall på 2 til 12 per kjøring. Generelt bør kjøring med lave prøveantall unngås for å behandle i alt 50 prøver per kit med høyst 7 RNA-klargjøringskjøringer. Mer enn 7 RNA-klargjøringskjøringer kan føre til utilstrekkelige buffervolumer for behandling av de siste prøvene.

Tabell 3. Posisjoner i reagensflaskestativet

Posisjon	Reagens
1	Bindende buffer (BR2)
2	96–100% etanol
3	Vaskebuffer 1 (BR3)
4	Vaskebuffer 2 (BR4) *
5	– (la stå tomt)
6	– (la stå tomt)

* Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som konsentrat. Før førstegangsbruk tilsettes 4 volumer etanol (96–100 %, renhetsgrad p.a.) som vist på flasken, for å oppnå en arbeidsløsning.

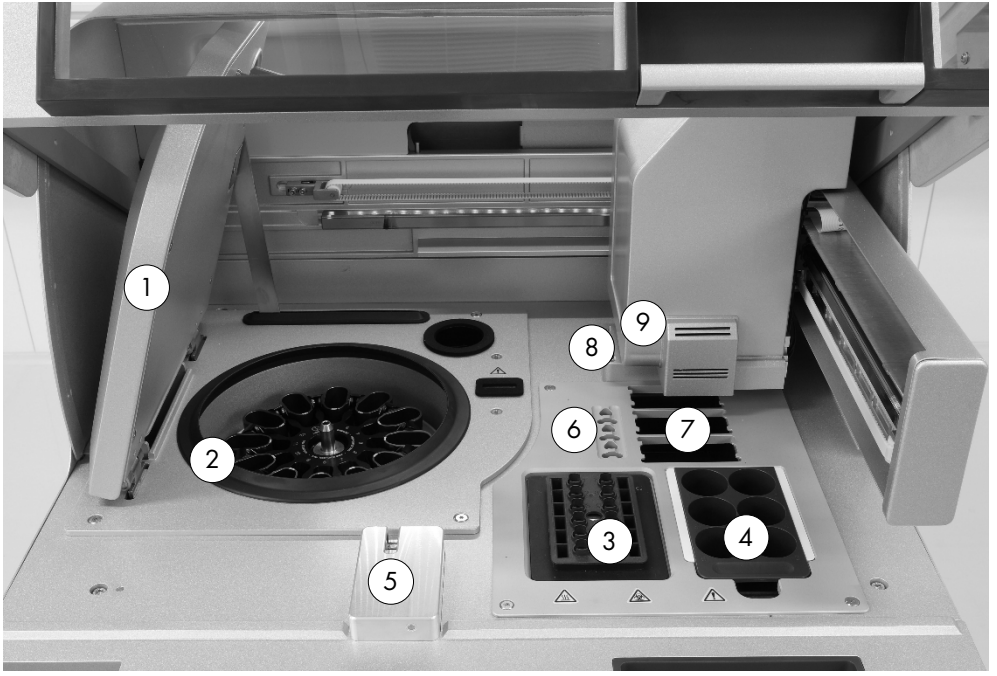
A



B

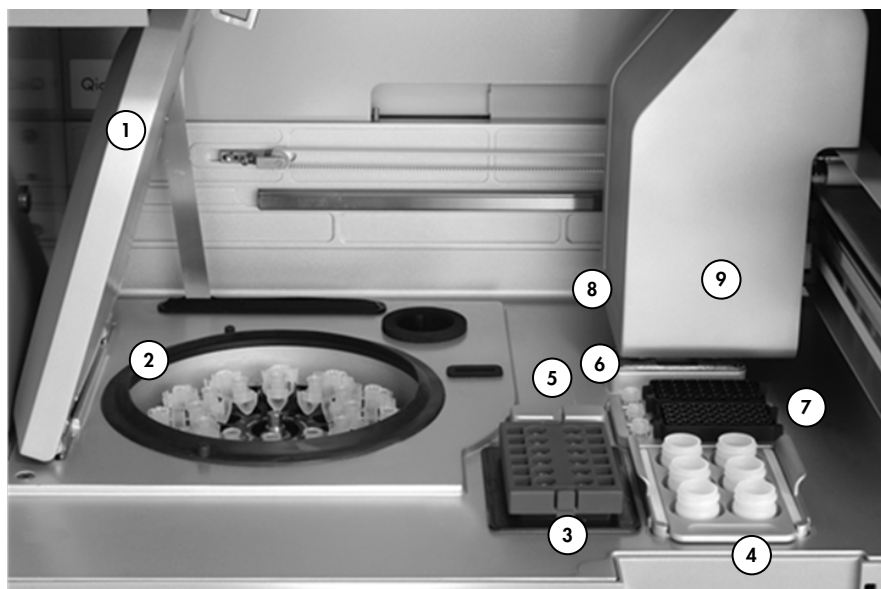


Figur 20. Sette inn reagensflaskestativet. [A] Oversikt over posisjoner og innhold i flaskene i reagensflaskestativet. **[B]** Innsetting av stativet på QIAcube-instrumentet (QIAcube vist som eksempel).



Figur 21. QIAcube Connect MDx sett innenfra.

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ① Sentrifugelokk ② Sentrifuge ③ Rister ④ Reagensflaskestativ ⑤ Spiss-sensor og deksellås | <ul style="list-style-type: none"> ⑥ Plasser for mikrosentrifugerør ⑦ 3 spor til spisstativer ⑧ Engangsplasser for spisser og søyler ⑨ Robotarm (inkluderer 1 kanalpipette, gripeenhet, ultralydsensor, optisk sensor og UV-LED) |
|--|--|




Figur 22. QIAcube sett innenfra.


- | | | | |
|---|---------------------|---|--------------------------------------|
| 1 | Sentrifugelokk | 6 | Plasser for mikrosentrifugerør |
| 2 | Sentrifuge | 7 | Spisstativer |
| 3 | Rister | 8 | Engangsplasser for spisser og søyler |
| 4 | Reagensflaskestativ | 9 | Robotarm |
| 5 | Spiss-sensor | | |

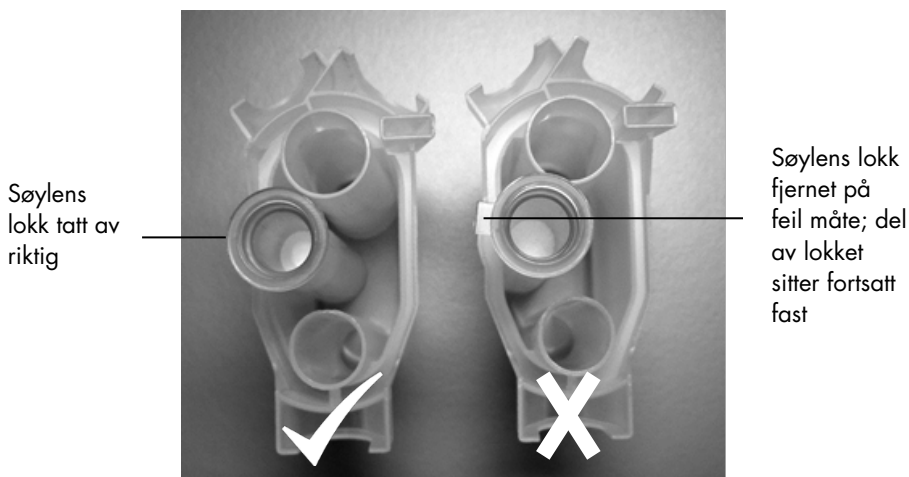
Spinnkolonner (PRC, PSC), mikrosentrifugerør (MCT) og plastutstyr til QIAcube-instrumenter

Sett 2 spisstativer fylt med filterspisser 1000 µl i QIAcube (se figur 21 og 22, side 48 og 49). Fyll på stativene med spisser ved behov.

 Bruk bare 1000 µl filterspisser utviklet til bruk med QIAcube-instrumenter.

Merk rotoradaptere og mikrosentrifugerør (MCT) for hver prøve med permanent penn. Åpne PAXgene Shredder spinnkolonner (PSC) som skal brukes, og klipp lokkene helt av med saks (se figur 23, side 50).

 For riktig bruk av QIAcube-instrumentenes robotgrep: Ta helt av (klipp av) lokkene og alle plastdeler som kobler lokket til PAXgene Shredder spinnkolonner (PSC, se figur 23). Ellers kan ikke robotgrepet ta tak i spinnkolonnene (PSC, PRC) på riktig måte.



Figur 23. Laste PAXgene Shredder spinnkolonnen (PSC). PAXgene Shredder spinnkolonnen (PSC) settes inn i midtre posisjon i rotoradapteren. Klipp av lokket før innsetting av kolonnen.

Sett inn PAXgene RNA spinnkolonnen (PRC), PAXgene Shredder spinnkolonnen (PSC; uten lokk, se figur 23, side 50), og merket mikrosentrifugerør i riktige posisjoner i hver merkede rotoradapter som vist i tabell 4 og figur 24.

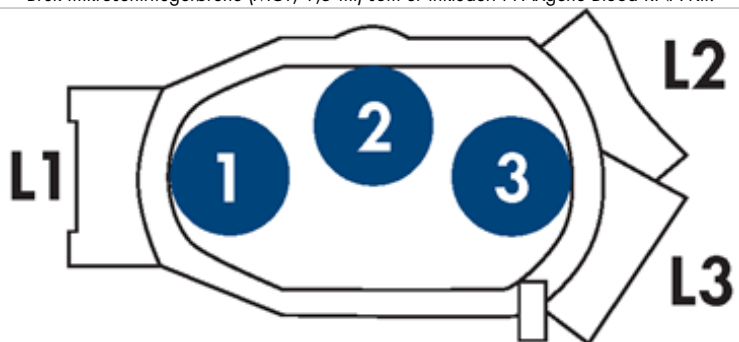


Pass på at spinnkolonnen (PRC) og lokkene til mikrosentrifugerørene (MCT) er trykt helt ned i bunnen av sporene på kanten av rotoradapteren, ellers vil de brekkes av under sentrifugering.

Tabell 4. Laboratorieartikler i rotoradapteren

Posisjon	Reagens	Lokkposisjon
1	PAXgene RNA spinnkolonne (rød, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder spinnkolonne (lilla, PSC) (klipp av toppen før du setter den inn i rotoradapteren)	–
3	Mikrosentrifugerør (MCT)*	L3

* Bruk mikrosentrifugerørene (MCT; 1,5 ml) som er inkludert i PAXgene Blood RNA Kit.



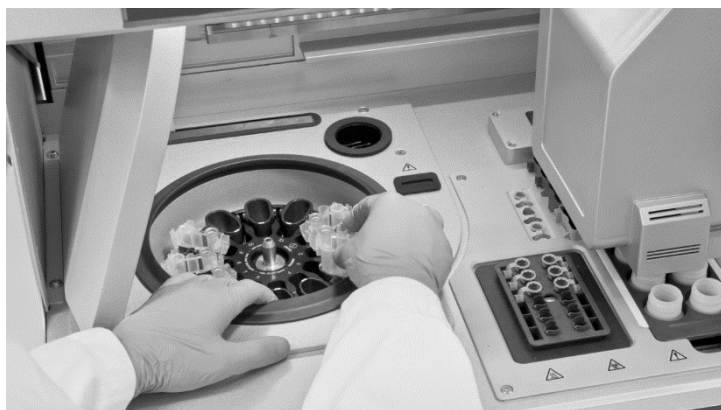
Figur 24. Posisjoner i rotoradapteren. Rotoradapteren har tre røropisjoner (1–3) og tre lokkposisjoner (L1–L3).

Laste sentrifugen

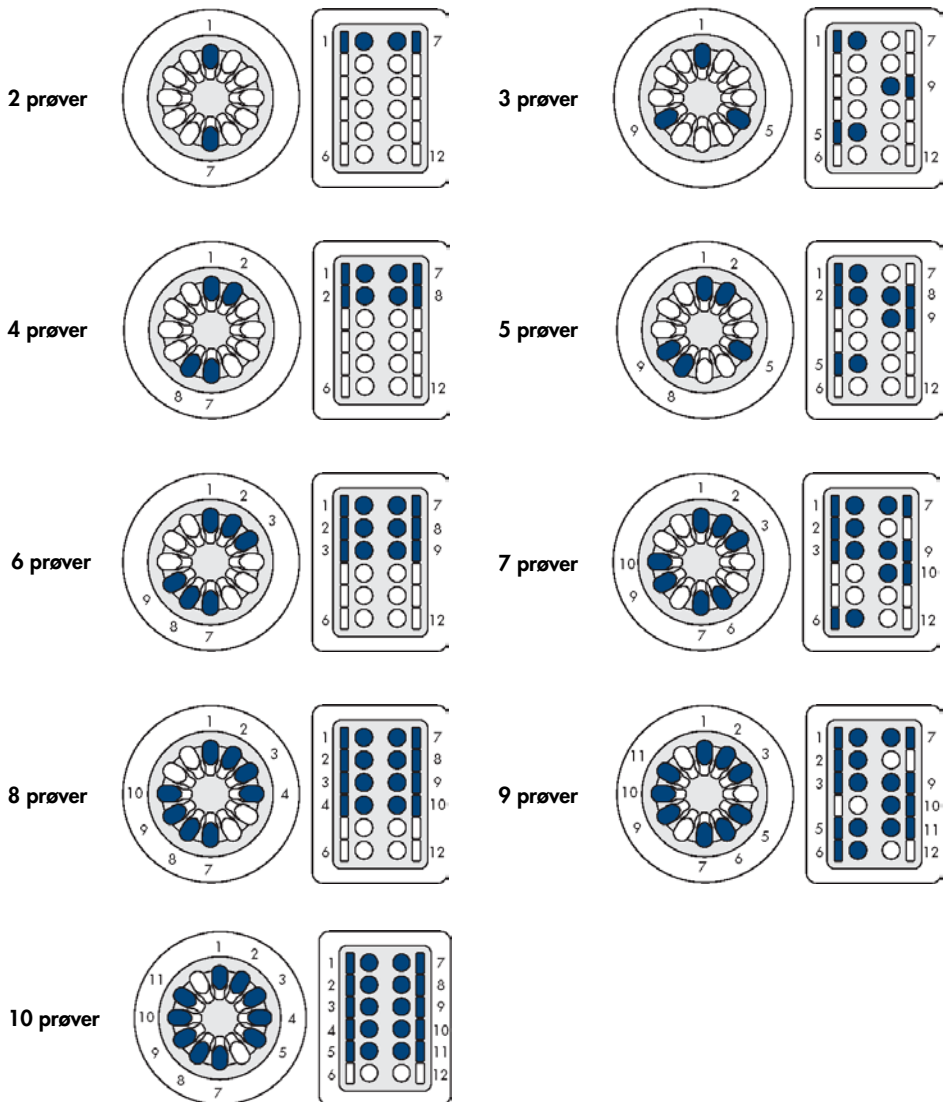
Sett inn de monterte rotoradapterne i sentrifugebeholderne som vist i figur 25 under.



Hvis det behandles færre enn 12 prøver, må du passe på at du setter inn sentrifugerotoren slik at den er balansert radially (se figur 26, side 53). Alle sentrifugebeholdere må monteres før en protokoll kjøres, selv om det skal behandles færre enn 12 prøver. Én enkelt prøve eller 11 prøver kan ikke behandles.



Figur 25. Innsetting i sentrifugen på QIAcube-instrumentene. Sett inn de monterte rotoradapterne i sentrifugebeholderne (QIAcube Connect MDx er vist som eksempel).



Figur 26. Innsetting i sentrifugen og risteren. Sentrifuge- og risterposisjoner vises for behandling av to (2) til ti (10) prøver. En (1) eller 11 prøver kan ikke behandles. Ved behandling av 12 prøver vil alle sentrifuge- og risterposisjoner bli opptatt (ikke bilde av dette).

Reagensrør (PT)

Ta ut reagensrør (PT) som sitter igjen i mikrosentrifugerørplassene fra tidligere kjøring (QIAcube Connect MDx: se figur 21, side 48, QIAcube: se figur 22, side 49). Fyll 3 reagensrør (PT) med mengden av reagenser gitt i tabell 5 i henhold til antall prøver i kjøringen.

For DNase I-inkuberingsmiks pipetterer du det indikerte volumet av DNA-nedbrytningsbufferen (RDD) i et reagensrør (PT) og tilsetter indikert volum av DNase I (RNFD)-arbeidsløsning. Bland ved å pipettere hele blandingen forsiktig opp og ned 3 ganger med en 1000 µl pipettespiss.

Bruk 2 ml-reagensrørene (PT) som er inkludert i PAXgene Blood RNA Kit. Merk rørene tydelig med reagensnavnene, og plasser dem i riktig posisjon i mikrosentrifugerørplassene, som indikert i tabell 6 (side 55).



DNase I (RNFD) er spesielt sensitiv for fysisk denaturering. Bland bare ved pipettering, ved bruk av pipettespiss med stor åpning for å redusere avskjæring. Ikke bruk vorteksmikser.



Sørg for at du bare pipetterer nødvendig volum som indikert i tabell 5.

Tabell 5. Reagensvolumer som kreves i reagensrør for mikrosentrifugerørplassene.

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

Tabell 6. Plasser for mikrosentrifugerør

	Posisjon		
	A	B	C
Innhold	Proteinase K	DNase I-inkubasjonsblanding	Elusjonsbuffer (BR5)
Kar	Reagensrør (PT)*	Reagensrør (PT)*	Reagensrør (PT)*

* Bruk 2 ml-reagensrørene som er inkludert i PAXgene Blood RNA Kit.

Protokoll: Manuell rensing av total RNA fra humant fullblod samlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Viktige punkter før du starter

- Pass på at esken er intakt og uskadet, og at bufferne ikke har lekket. Ikke bruk et kit som er skadet.
- Når du bruker pipette, pass på at den er stilt til riktig volum, og at væsken er forsiktig og fullstendig aspirert og dispensert.
- For å unngå å overføre prøver til feil rør eller spinnkolonne, pass på at alle rør og spinnkolonner er riktig merket med permanent penn. Merk lokket og hoveddelen på hvert rør (PT, MCT). For spinnkolonner merkes hoveddelen på reagensrøret (PT). Lukk hvert rør eller hver spinnkolonne etter at væsken er overført.
- Hvis prøver og buffere søles under prosedyren, kan det redusere RNA-utbyttet og -renheten.
- Med mindre noe annet er oppgitt, skal alle trinn i denne protokollen, inkludert sentrifugeringstrinn, utføres ved romtemperatur (15–25 °C).

På grunn av sensitiviteten til nukleinsyreamplifikasjonsteknologi, er det viktig å følge disse forholdsreglene ved håndtering av prøver for å unngå krysskontaminering:

- Pipetter prøven forsiktig i spinnkolonnen (PRC, PSC) uten å fukte kanten på søylen.
- Skift alltid pipettespiss mellom væskeoverføringer. Bruk pipettespiss med aerosolbarriere.
- Unngå at spinnkolonnenmembranen (PRC, PSC) kommer i kontakt med pipettespissen.

- Etter vorteksblending eller oppvarming av et mikrosentrifugerør (MCT) skal det sentrifugeres kort for å fjerne dråpene fra innsiden av lokket.
- Bruk hansker gjennom hele prosedyren. Bytt hansker straks hvis de kommer i kontakt med prøven.
- Lukk spinnkolonnen (PRC, PSC) før den plasseres i mikrosentrifugen. Sentrifuger som beskrevet i prosedyren.
- Åpne bare én spinnkolonne (PRC, PSC) om gangen, og vær forsiktig så du unngår å generere aerosoler.
- For effektiv parallell behandling av flere prøver kan du fylle et stativ med reagensrør (PT) som spinnkolonnene (PRC, PC) kan overføres til etter sentrifugering. Kast de brukte reagensrørene (PT) som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen, og plasser de nye reagensrørene (PT) som inneholder spinnkolonner (PRC, PSC) direkte i mikrosentrifugen.

Dette må du gjøre før du starter

- Blod må samles i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) i henhold til instruksjonene i *håndboken for PAXgene Blood RNA Tube*. Om nødvendig kan du se Vedlegg C (side 75) for anbefalinger om håndtering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Pass på at PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkuberes i minst 2 timer ved romtemperatur etter at blodet er tatt, for å sikre riktig lysering av blodcellene. Inkubasjon av PAXgene Blood RNA Tube (BRT) over natten kan føre til bedre utbytte. Hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ble oppbevart ved 2–8 °C, –20 °C eller –70 °C etter at blodet er tatt, må det først nå romtemperatur og deretter oppbevares ved romtemperatur i 2 timer før prosedyren startes.
- Les sikkerhetsinformasjonen på side 10.
- Les retningslinjene om håndtering av RNA (Vedlegg A, side 72).
- Pass på at instrumentene, som pipetter og rister/inkubator, er sjekket og kalibrert regelmessig i henhold til produsentens anbefalinger.
- En rister/inkubator trengs til trinn 5 og 20. Still inn temperaturen på risteren/inkubatoren til 55 °C.

- Bindende buffer (BR2) kan danne et presipitat ved oppbevaring. Om nødvendig varmes den opp til 37 °C for å løse opp.
- Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som konsentrat. Før førstegangsbruk tilsettes 4 volumer etanol (96–100 %, renhetsgrad p.a.) som vist på flasken, for å oppnå en arbeidsløsning.
- Hvis du bruker RNase-Free DNase Set for første gang, må en DNase I-arbeidsløsning klargjøres. Oppløs det faste DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-enheter)* i 550 µl av DNase resuspensjonsbuffer (DRB) som leveres med settet. Pass på at ingen DNase I (RNFD) går tapt når flasken åpnes. Ikke vorteksblend rekonstituert DNase I (RNFD). DNase I er spesielt følsomt for fysisk denaturering. Blanding skal kun utføres ved å vende flasken forsiktig opp og ned.
- Gjeldende data viser at rekonstituert DNase I (RNFD) kan oppbevares ved 2–8 °C i opptil 6 uker. For langsiktig oppbevaring av DNase I (RNFD) fjerner du arbeidsløsningen fra glassflasken, fordeler den i enkelaliquoter (bruk 1,5 ml-mikrosentrifugerør [MCT] som følger med kitet – det er nok til 5 aliquoter) og oppbevarer disse ved –20 °C i opptil 9 måneder. Tinte aliquoter kan oppbevares ved 2–8 °C i opptil 6 uker. Ikke frys aliquotene på nytt etter tining.
- Når du rekonstruerer og aliquoterer DNase I (RNFD), må du passe på at du følger retningslinjene for håndtering av RNA (vedlegg A, side 72).

* Kunitz-enheter er enhetene som vanligvis brukes til å måle DNase I, definert som mengden av DNase I som fører til en økning i A_{260} på 0,001 per minutt per milliliter ved 25 °C, pH 5,0, med sterkt polymerisert DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* **33**, 349 og 363).

Prosedyre

1. Sentrifuger PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 minutter ved 3000–5000 x g med en svingbar rotor.
 -  Pass på at blodprøven har vært inkubert i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i minst 2 timer ved romtemperatur (15–25 °C) for å oppnå fullstendig lysering av blodceller.
 -  Rotoren må inneholde røradaptere for rør med rund bunn. Hvis andre typer røradaptere brukes, kan rørene knuses under sentrifugering.
2. Fjern supernatanten ved å dekantere eller pipettere. Tilsett 4 ml RNase-fritt vann (RNFV) til pelleten, og lukk røret med en fersk, sekundær BD Hemogard-hette (følger med kitet). Hvis supernatanten er dekantert, pass på så ikke pelleten forstyrres, og tørk av kanten på røret med rent tørkepapir.
3. Vorteksblend til pelleten er synlig oppløst, og sentrifuger i 10 minutter ved 3000–5000 x g med en svingbar rotor. Ta av og kast hele supernatanten.
Smårester som er liggende igjen etter supernatanten etter vorteksblending, men før sentrifugering, vil ikke påvirke prosedyren.
 -  Ufullstendig fjerning av supernatant vil hemme lyseringen og fortynne lysatet, og vil derfor påvirke forholdene for binding av RNA til PAXgene-membranen.
4. Tilsett 350 µl resuspensjonsbuffer (BR1), og vorteksblend til pelleten er synlig oppløst.
5. Pipetter prøven i et 1,5 ml mikrosentrifugerør (MCT). Tilsett 300 µl bindende buffer (BR2) og 40 µl proteinase K (PK). Vorteksblend i 5 sekunder, og inkuber i 10 minutter ved 55 °C med en rister/inkubator ved 400–1400 o/min. Etter inkubasjon må temperaturen på risteren/inkubatoren stilles inn til 65 °C (for trinn 20).
 -  Ikke bland bindende buffer (BR2) og proteinase K (PK) sammen før de tilsettes i prøven.
6. Pipetter lysatet direkte i en PAXgene Shredder spinnkolonne (PSC; lilla) plassert i et 2 ml reagensrør (PT), og sentrifuger i 3 minutter ved maks hastighet (men ikke mer enn 20 000 x g).



Pipetter lysatet forsiktig i spinnkolonnen (PSC), og sjekk visuelt at alt lysatet er overført til spinnkolonnen (PSC).

For å forhindre at søylene (PSC) og rørene (PT) skades, ikke overstig 20 000 x g.



Noen prøver kan strømme gjennom PAXgene Shredder spinnkolonnen (PSC) uten sentrifugering. Dette skyldes lav viskositet for noen prøver og bør ikke oppfattes som en indikasjon på produktdefekt.

7. Overfør forsiktig hele supernatanten av gjennomstrømningsfraksjonen til et nytt 1,5 ml mikrosentrifugerør (MCT) uten å forstyrre pelleten i reagensrøret.

8. Tilsett 350 µl etanol (96–100 %, renhetsgrad p.a.). Vorteksbland og sentrifuger en kort stund (1–2 sekunder ved 500–1000 x g) for å fjerne dråper fra innsiden av rørløkket.



Det må ikke sentrifugeres i mer enn 1–2 sekunder, da dette kan resultere i pelletering av nukleinsyrer og lavere utbytte av totalt RNA.

9. Pipetter 700 µl prøve i PAXgene RNA spinnkolonnen (PRC; rød) i et 2 ml reagensrør (PT), og sentrifuger i 1 minutt ved 8000–20 000 x g. Plasser spinnkolonnen (PRC) i et nytt 2 ml reagensrør (PT), og kast det gamle reagensrøret (PT) som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen.

10. Pipetter resten av prøven i PAXgene RNA spinnkolonnen (PRC), og sentrifuger i 1 minutt ved 8000–20 000 x g. Plasser spinnkolonnen (PRC) i et nytt 2 ml reagensrør (PT), og kast det gamle reagensrøret (PT) som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen.



Pipetter prøven forsiktig i spinnkolonnen (PRC), og sjekk visuelt at prøven er overført helt til spinnkolonnen (PRC).

11. Pipetter 350 µl vaskebuffer 1 (BR3) i PAXgene RNA spinnkolonnen (PRC). Sentrifuger i 1 minutt ved 8000–20 000 x g. Plasser spinnkolonnen (PRC) i et nytt 2 ml reagensrør (PT), og kast det gamle reagensrøret (PT) som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen.

12. Tilsett 10 µl DNase I (RNFD)-arbeidsløsning i 70 µl DNA-nedbrytningsbuffer (RDD) i et 1,5 ml mikrosentrifugerør (MCT). Blant ved å slå forsiktig på røret, og sentrifuger kort for å samle resterende væske fra sidene av røret.

Hvis du for eksempel behandler 10 prøver, tilsett 100 µl DNase I (RNFD)-arbeidsløsning til 700 µl DNA-nedbrytningsbuffer (RDD). Bruk 1,5 ml-mikrosentrifugerørene (MCT) som følger med kitet.



DNase I er spesielt følsomt for fysisk denaturering. Blanding skal kun utføres ved å slå forsiktig på røret. Ikke bruk vorteksmikser.

13. Pipetter DNase I (RNFD)-inkubasjonsblandingen (80 µl) direkte på PAXgene RNA spinnkolonnens (PRC) membran, og plasser på bordflaten (20–30 °C) i 15 minutter.



Pass på at DNase I (RNFD)-inkubasjonsblandingen plasseres direkte på membranen. DNase-nedbrytningen vil være ufullstendig hvis en del av blandingen tilsettes og blir værende på veggene eller O-ringen til spinnkolonnen (PRC).

14. Pipetter 350 µl vaskebuffer 1 (BR3) i PAXgene RNA spinnkolonnen (PRC), og sentrifuger i 1 minutt ved 8000–20 000 x g. Plasser spinnkolonnen (PRC) i et nytt 2 ml reagensrør (PT), og kast det gamle reagensrøret (PT) som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen.

15. Pipetter 500 µl vaskebuffer 2 (BR4) i PAXgene RNA spinnkolonnen (PRC), og sentrifuger i 1 minutt ved 8000–20 000 x g. Plasser spinnkolonnen (PRC) i et nytt 2 ml reagensrør (PT), og kast det gamle reagensrøret (PT) som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen.



Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som konsentrat. Pass på at etanol er tilsatt i vaskebuffer 2 (BR4) før bruk (se "Dette må du gjøre før du starter", side 57).

16. Tilsett ytterligere 500 µl vaskebuffer 2 (BR4) i PAXgene RNA spinnkolonnen (PRC). Sentrifuger i 3 minutter ved 8000–20 000 x g.

17. Kast reagensrøret (PT) som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen, og plasser PAXgene RNA spinnkolonnen (PRC) i et nytt 2 ml reagensrør (PT). Sentrifuger i 1 minutt ved 8000–20 000 x g.

18. Kast reagensrøret (PT) som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen. Plasser PAXgene RNA spinnkolonnen (PRC) i et 1,5 ml mikrosentrifugerør (MCT), og pipetter 40 µl elusjonsbuffer (BR5) direkte på PAXgene RNA spinnkolonmembranen (PRC). Sentrifuger i 1 minutt ved 8000–20 000 x g for å eluere RNA.

Det er viktig å fukte hele membranen med elusjonsbuffer (BR5) for å oppnå maksimal elusjonseffektivitet.

19. Gjenta elusjonstrinnet (trinn 18) som beskrevet, med 40 µl elusjonsbuffer (BR5) og det samme mikrosentrifugerøret (MCT).

20. Inkuber eluatet i 5 minutter ved 65 °C i risteren/inkubatoren (fra trinn 5) uten å riste. Avkjøl straks på is etter inkubasjon.

Denne inkubasjonen ved 65 °C denaturerer RNA for nedstrømsapplikasjoner. Ikke overstig inkubasjonstiden eller temperaturen.

21. Hvis RNA-prøvene ikke brukes straks, oppbevares de ved –20 °C eller –70 °C.

Siden RNA forblir denaturert etter gjentatt frysing og tining, er det ikke nødvendig å gjenta ved 65 °C. Hvis du bruker RNA-prøver i en diagnostisk analyse, følg produsentens anvisninger.

For nøyaktig kvantifisering av RNA ved absorbans ved 260 nm anbefaler vi at prøver fortynnes med 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. * Hvis du fortynner prøven i RNase-fritt vann, kan dette føre til unøyaktig lave verdier.

Nullstill spektralfotometeret ved hjelp av en blank prøve bestående av det samme forholdet av elusjonsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i prøvene som skal måles. Elusjonsbuffer (BR5) har høy absorbans ved 220 nm, noe som kan føre til høye bakgrunnsabsorbansnivåer hvis spektralfotometeret ikke er riktig nullstilt.



For kvantifisering i Tris-HCl-buffer brukes forholdet $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$.
Se vedlegg B, side 73.

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

Protokoll: Automatisk rensing av totalt RNA fra humant fullblod samlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Viktige punkter før du starter

- Pass på at esken er intakt og uskadet, og at bufferne ikke har lekket. Ikke bruk et kit som er skadet.
- Når du bruker pipette, pass på at den er stilt til riktig volum, og at væsken er forsiktig og fullstendig aspirert og dispensert.
- For å unngå å overføre prøver til feil rør eller forbruksvarer av plast, pass på at alle reagensrør (PT), mikrosentrifugerør (MCT) og rotoradaptere er riktig merket med permanent penn. Merk lokket og hoveddelen på hvert mikrosentrifugerør (MCT), hoveddelen på hvert reagensrør (PT) og den utvendige veggen av hver rotoradapter.
- Hvis prøver og buffere søles under prosedyren, kan det redusere RNA-utbyttet og -renheten.
- Med mindre noe annet er oppgitt, skal alle trinn i denne protokollen, inkludert sentrifugeringstrinn, utføres ved romtemperatur (15–25 °C).

På grunn av sensitiviteten til nukleinsyreamplifikasjonsteknologi, er det viktig å følge disse forholdsreglene ved håndtering av prøver for å unngå krysskontaminering:

- Pipetter prøven forsiktig inn i bunnen av reagensrøret (PT), uten å fukte kanten.
- Skift alltid pipettespiss mellom væskeoverføringer. Bruk pipettespiss med aerosolbarriere.
- Unngå at spinnkolonmembranen (PRC, PSC) kommer i kontakt med pipettespissen.

- Etter vorteksblending eller oppvarming av et mikrosentrifugerør (MCT) skal det sentrifugeres kort for å fjerne dråpene fra innsiden av lokket.
- Bruk hansker gjennom hele prosedyren. Bytt hansker straks hvis de kommer i kontakt med prøven.

Dette må du gjøre før du starter

- Blod må samles i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) i henhold til instruksjonene i *håndboken for PAXgene Blood RNA Tube*. Om nødvendig kan du se Vedlegg C (side 75) for anbefalinger om håndtering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Pass på at PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkuberes i minst 2 timer ved romtemperatur etter at blodet er tatt, for å sikre riktig lysering av blodcellene. Inkubasjon av PAXgene Blood RNA Tube (BRT) over natten kan føre til bedre utbytte. Hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ble oppbevart ved 2–8 °C, –20 °C eller –70 °C etter at blodet er tatt, må det først nå romtemperatur og deretter oppbevares ved romtemperatur i 2 timer før prosedyren startes.
- Les sikkerhetsinformasjonen på side 10.
- Les "Viktige merknader", side 42.
- Les retningslinjene om håndtering av RNA (Vedlegg A, side 72).
- Les tilhørende brukerhåndbok til QIAcube-instrumentet og eventuell tilleggsinformasjon som er levert med QIAcube-instrumentet, og vær spesielt oppmerksom på sikkerhetsinformasjonen.
- Pass på at enheter og instrumenter, som pipetter og QIAcube-instrument, er sjekket og kalibrert regelmessig i henhold til produsentens anbefalinger.
- Bindende buffer (BR2) kan danne et presipitat ved oppbevaring. Om nødvendig varmes den opp til 37 °C for å løse opp.
- Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som konsentrat. Før førstegangsbruk tilsettes korrekt volum med etanol (96–100 %, renhetsgrad p.a.), angitt på flasken, for å oppnå en arbeidsløsning.

- Hvis du bruker RNase-Free DNase Set for første gang, må en DNase I-arbeidsløsning klargjøres. Oppløs det faste DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-enheter)* i 550 µl av DNase resuspensjonsbuffer (DRB) som leveres med settet. Pass på at ingen DNase I (RNFD) går tapt når flasken åpnes. Ikke vorteksblend rekonstituert DNase I (RNFD). DNase I er spesielt følsomt for fysisk denaturering. Blanding skal kun utføres ved å vende flasken forsiktig opp og ned.
- Gjeldende data viser at rekonstituert DNase I (RNFD) kan oppbevares ved 2–8 °C i opptil 6 uker. For langsiktig oppbevaring av DNase I (RNFD) fjerner du arbeidsløsningen fra glassflasken, fordeler den i enkelaliquoter (bruk 1,5 ml-mikrosentrifugerør [MCT] som følger med kitet – det er nok til 5 aliquoter) og oppbevarer disse ved –20 °C i opptil 9 måneder. Tinte aliquoter kan oppbevares ved 2–8 °C i opptil 6 uker. Ikke frys aliquotene på nytt etter tining.
- Når du rekonstituerer og aliquoterer DNase I (RNFD), må du passe på at du følger retningslinjene for håndtering av RNA (vedlegg A, side 72).
- Installer riktig risteradapter (følger med QIAcube-instrumentene: bruk adapteren til 2 ml Safe-Lock-rør, merket med "2"), og plasser risterstativet øverst på adapteren.
- Sjekk avfallsskuffen, og tøm den om nødvendig.
- Installer aktuelle protokoller hvis dette ikke allerede er gjort for tidligere kjøring. For QIAcube Connect MDx må alle protokoller i den aktuelle zip-filen lastes ned. Installer både "PAXgene Blood RNA Part A"- og "PAXgene Blood RNA Part B"-protokollene for klassisk QIAcube. Se "Installere protokoller på QIAcube -instrumenter" på side 45.

* Kunitz-enheter er enhetene som vanligvis brukes til å måle DNase I, definert som mengden av DNase I som fører til en økning i A_{260} på 0,001 per minutt per milliliter ved 25 °C, pH 5,0, med sterkt polymerisert DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 og 363).

Prosedyre

1. Lukk dekselet til QIAcube-instrumentet, og slå av QIAcube-instrumentet med strømbryteren (QIAcube Connect MDx: se figur 17, side 43; QIAcube: se figur 18, side 44).

En pipelyd avgis, og oppstartskjermbildet vises. Instrumentene utfører initialiseringstester automatisk.

2. Åpne dekselet til QIAcube-instrumentet, og sett inn de nødvendige reagensene og plastdelene i QIAcube-instrumentet. Se "Innsetting i QIAcube-instrumentene" på side 46. For å spare tid kan innsettingen utføres under ett av eller begge sentrifugeringstrinnene på 10 minutter (trinn 3 og 5).

3. Sentrifuger PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 minutter ved 3000–5000 x g med en svingbar rotor.



Pass på at blodprøven har vært inkubert i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i minst 2 timer ved romtemperatur (15–25 °C), for å oppnå fullstendig lysing av blodceller.



Rotoren må inneholde røradaptere for rør med rund bunn. Hvis andre typer røradaptere brukes, kan rørene knuses under sentrifugering.

4. Fjern supernatanten ved å dekantere eller pipettere. Tilsett 4 ml RNase-fritt vann (RNFV) til pelleten, og lukk røret med en fersk, sekundær BD Hemogard-hette (følger med kitet).

Hvis supernatanten er dekantert, pass på så ikke pelleten forstyrres, og tørk av kanten på røret med rent tørkepapir.

5. Vorteksbland til pelleten er synlig oppløst, og sentrifuger i 10 minutter ved 3000–5000 x g med en svingbar rotor. Ta av og kast hele supernatanten.

Smårester som er liggende igjen etter supernatanten etter vorteksblending, men før sentrifugering, vil ikke påvirke prosedyren.



Ufullstendig fjerning av supernatant vil hemme lysingen og fortynde lysatet, og vil derfor påvirke forholdene for binding av RNA til PAXgene-membranen.

6. Tilsett 350 µl resuspensjonsbuffer (BR1), og vorteksbland til pelleten er synlig oppløst.

7. Pipetter prøven i et 2 ml reagensrør (PT).



Bruk 2 ml-reagensrørene (PT) som er inkludert i PAXgene Blood RNA Kit.

8. Legg de åpne reagensrørene (PT) som inneholder prøven, i QIAcube-instrumentets rister (QIAcube Connect MDx: se figur 21, side 48; QIAcube: se figur 22, side 49). Prøveposisjonene er nummerert for å gjøre det enklere å laste. Sett inn risterstativpluggen (følger med QIAcube-instrumentene) i plassene i kanten av risterstativet ved siden av hvert reagensrør. Dette aktiverer deteksjon av prøver under innsetningskontrollen.



Pass på at riktig risteradapter (risteradapter, 2 ml Safe-Lock-rør, merket med "2", følger med QIAcube-instrumentene) er installert.



Hvis det behandles færre enn 12 prøver, pass på at du setter inn risterstativet som vist i figur 26, side 53. Én (1) eller 11 prøver kan ikke behandles. Posisjonsnumrene i risterstativet tilsvarer posisjonsnumrene i sentrifugen.

9. Lukk dekselet til QIAcube-instrumentet (QIAcube Connect MDx: se figur 17, side 43; QIAcube: se figur 18, side 44).

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

Følg instruksjonene som står på berørings skjermen på QIAcube-instrumentet.



Pass på at begge programdeler (del A og del B) er installert på QIAcube-instrumentet (se "Installere protokoller på QIAcube-instrumenter", side 45).



QIAcube-instrumenter utfører innsetningskontroller for prøver, spisser, rotoradaptere og reagensflasker.

11. Når "PAXgene Blood RNA Part A"-protokollen er ferdig, skal dekselet til QIAcube-instrumentet åpnes (QIAcube Connect MDx: se figur 17, side 43; QIAcube: se figur 18, side 44). Ta ut og kast PAXgene RNA spinnkolonnene (PRC) fra rotoradapterne og de tomme reagensrørene (PT) fra risteren.



Under kjøringen overfører instrumentet spinnkolonner fra rotoradapterens posisjon 1 (lokkposisjon L1) til rotoradapterposisjon 3 (lokkposisjon L2) (se figur 24, side 51).

12. Lukk lokkene på alle 1,5 ml-mikrosentrifugerørene (MCT) som inneholder rensed RNA i rotoradapterne (posisjon 3, lokkposisjon L3, se figur 24, side 51). Overfør 1,5 ml mikrosentrifugerør (MCT) til QIAcube-instrumentets risteradapter (QIAcube Connect MDx: se figur 21, side 48; QIAcube: se figur 22, side 49).
13. Lukk dekselet til QIAcube-instrumentet (QIAcube Connect MDx: se figur 17, side 43; QIAcube: se figur 18, side 44).
14. Velg protokollen "PAXgene Blood RNA Part B", og start protokollen.

Følg instruksjonene som angitt på berørings skjemen på QIAcube-instrumentet.



Dette programmet inkuberer prøvene ved 65 °C og denaturerer RNA for nedstrømsapplikasjoner. Ikke utelat dette trinnet selv om nedstrømsapplikasjonen inkluderer et varmedenatureringstrinn. Det er avgjørende med tilstrekkelig RNA-denaturering for maksimal effektivitet i nedstrømsapplikasjoner.

15. Når "PAXgene Blood RNA Part B"-programmet er ferdig, skal dekselet til QIAcube-instrumentet åpnes (QIAcube Connect MDx: se figur 17, side 43; QIAcube: se figur 18, side 44). Mikrosentrifugerørene (MCT) som inneholder rensed RNA, skal straks plasseres på is.



ADVARSEL: Varm overflate. Risteren kan nå temperaturer på opptil 70 °C (158 °F). Ikke rør den når den er varm.



Ikke la rensed RNA bli værende i QIAcube-instrumentet. Renset RNA kan degraderes, siden prøvene ikke er nedkjølt. Det anbefales derfor ikke å kjøre prøveklargjøringskjøringer over natten uten tilsyn.

16. Hvis RNA-prøvene ikke brukes straks, oppbevares de ved -20 °C eller -70 °C.

Siden RNA forblir denaturert etter gjentatt frysing og tining, er det ikke nødvendig å gjenta varmeinkubasjonsprotokollen ("PAXgene Blood RNA Part B"). Hvis du bruker RNA-prøver i en diagnostisk analyse, følg produsentens anvisninger.

For nøyaktig kvantifisering av RNA ved absorbanmåling ved 260 nm, anbefaler vi at prøver fortynnes i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. * Hvis du fortynner prøven i RNase-fritt vann, kan dette føre til unøyaktig lave verdier.

Nullstill spektralfotometeret ved hjelp av en blank prøve bestående av det samme forholdet av elusjonsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i prøvene som skal måles. Elusjonsbuffer (BR5) har høy absorban ved 220 nm, noe som kan føre til høye bakgrunnsabsorbansnivåer hvis spektralfotometeret ikke er riktig nullstilt.



For kvantifisering i Tris-HCl-buffer brukes forholdet

$A_{260} = 1 = > 44 \mu\text{g/ml}$. Se vedlegg B, side 73.

17. Fjern reagensflaskestativet fra QIAcube-instrumentets arbeidsbenk (QIAcube Connect MDx: se figur 21, side 48; QIAcube: se figur 22, side 49), og lukk alle flasker med riktig merkede lokk. Buffer kan lagres i flasker ved romtemperatur (15–25 °C) i opptil 3 måneder. Ta ut og kast resterende reagenser i reagensrørene (PT) i plassene på mikrosentrifugerørene i QIAcube-instrumentet. Ta ut og kast rotoradaptere fra sentrifugen. Tøm QIAcube Connect MDx-avfallsskuffen (QIAcube Connect MDx: se figur 17, side 43; QIAcube: se figur 18, side 44). Lukk dekelet til QIAcube-instrumentet, og slå av instrumentet med strømbryteren.

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, kan du se siden med ofte stilte spørsmål (Frequently Asked Questions, FAQ) på vårt tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENs tekniske serviceavdeling er alltid klare til å svare på eventuelle spørsmål, enten det dreier seg om innholdet og protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (du finner kontaktinformasjon på siste side eller ved å gå til www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

RNA degradert

RNase-kontaminering



Pass på så det ikke innføres noen RNaser i reagensene under prosedyren eller senere håndtering (se Vedlegg A, side 72).

Lavt RNA-utbytte

a) Mindre enn 2,5 ml blod tappet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Pass på at 2,5 ml blod er samlet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT, se *håndboken for PAXgene Blood RNA Tube*).

b) RNA-konsentrasjon målt i vann



RNA må fortynnes i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* for nøyaktig kvantifisering (se Vedlegg B, side 73).



c) Cellerester overført til PAXgene RNA spinnkolonne (PRC) i trinn 9 og 10 i den manuelle protokollen





Ikke overfør store partikler ved pipettering av supernatanten i trinn 7 av den manuelle protokollen (overføring av smårester vil ikke påvirke prosedyren).

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

Kommentarer og forslag

- d) Supernatanten ikke helt fjernet i trinn 3  Pass på at hele supernatanten er fjernet. Hvis supernatanten er dekantert, fjern dråpene fra kanten av PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ved hjelp av tørkepapir. Bruk riktige forholdsregler for å forhindre krysskontaminering.
- e) Etter innsamling i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inkuberes blodet i mindre enn 2 timer  Inkuber blodet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i minst 2 timer etter innsamling.

Lav A_{260}/A_{280} -verdi

- a) Vann brukt til å fortynne RNA for A_{260}/A_{280} -måling  Bruk 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, for å fortynne RNA før måling av renhet* (se Vedlegg B, side 73).
- b) Spektrofotometeret ikke riktig nullstilt  Nullstill spektrofotometeret ved hjelp av en blank prøve bestående av det samme forholdet av elusjonsbuffer (BR5) og 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, som i prøvene som skal måles. Elusjonsbuffer (BR5) har høy absorbans ved 220 nm, noe som kan føre til høye bakgrunnsabsorbansnivåer hvis spektrofotometeret ikke er riktig nullstilt.

Instrumentfeil

- QIAcube-instrumenter fungerte ikke som normalt Les den aktuelle brukerhåndboken for QIAcube, og vær spesielt oppmerksom på avsnittet om feilsøking. Pass på at QIAcube-instrumentet blir riktig vedlikeholdt, som beskrevet i brukerhåndboken.

* 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.

Vedlegg A: Generelle kommentarer om håndtering av RNA

Håndtere RNA



Ribonukleaser (RNaser) er svært stabile og aktive enzymer som vanligvis ikke trenger kofaktorer for å fungere. Siden RNaser er vanskelige å inaktivere og selv svært små mengder er nok til å nedbryte RNA, skal det ikke brukes plast- eller glassartikler uten først å eliminere mulig RNase-kontaminering. Du bør være svært nøye med å unngå at RNase utilsiktet introduseres i RNA-prøven under eller etter renseprosedyren. For å opprette og vedlikeholde et RNase-fritt miljø må du være nøye under forhåndsbehandling og bruk av engangs- og ikke-engangskar og løsninger når du jobber med RNA.

Generell håndtering



Riktig mikrobiologisk, aseptisk teknikk skal alltid brukes ved arbeid med RNA. Det er bakterier og muggsopper på hender og støvpartikler, og disse er de vanligste kildene til RNase-kontaminering. Bruk alltid lateks- eller vinylhansker ved håndtering av reagenser og RNA-prøver for å forhindre RNase-kontaminering fra overflaten av huden eller fra støvete laboratorieutstyr. Bytt hansker ofte, og hold rørene lukket når det er mulig. Oppbevar rensed RNA på is når alikvoter pipetteres for nedstrømsapplikasjoner.

Protokoller for fjerning av RNase-kontaminering fra glassartikler og løsninger står i generelle veiledninger for molekylær biologi, for eksempel Sambrook, J. og Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Vedlegg B: Kvantifisering og bestemmelse av kvalitet for totalt RNA

Kvantifisering av RNA

Konsentrasjonen av RNA bør bestemmes ved å måle absorbansen ved 260 nm (A_{260}) i et spektralfotometer. For å sikre signifikans skal avlesningene være i spektralfotometerets lineære område. En absorbans på 1 enhet ved 260 nm tilsvarer 44 μg RNA per ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Dette forholdet er bare gyldig for målinger i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5,*. Hvis det er nødvendig å fortynne RNA-prøven, må dette derfor utføres i 10 mM Tris-HCl. Som vist nedenfor (se "Renhet av RNA", side 74) gir forholdet mellom absorbansverdiene ved 260 og 280 nm et estimat av RNA-renhet. Pass på at kyvettene er RNase-frie ved måling av RNA-prøver. Nullstill spektralfotometeret ved hjelp av en blank prøve bestående av det samme forholdet av elusjonsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i prøvene som skal måles. Elusjonsbuffer (BR5) har høy absorbans ved 220 nm, noe som kan føre til høye bakgrunnsabsorbansnivåer hvis spektralfotometeret ikke er riktig nullstilt. Et eksempel på beregningen involvert i kvantifisering av RNA vises nedenfor.

Volum av RNA-prøve	=	80 μl
Fortynning (1/15)	=	10 μl RNA-prøve + 140 μl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Mål absorbans for fortynnet prøve i en kyvette (RNase-fri).		
A_{260}	=	0,3
Konsentrasjon av prøve	=	$44 \times A_{260} \times \text{fortynningsfaktor}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 $\mu\text{g/ml}$
Totalt utbytte	=	konsentrasjon x volum av prøven i milliliter
	=	198 $\mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 μg RNA

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

Renhet av RNA

Forholdet mellom avlesningene ved 260 nm og 280 nm (A_{260}/A_{280}) gir et estimat av renheten av RNA når det gjelder kontaminanter som absorberes i UV, for eksempel protein. A_{260}/A_{280} -forholdet påvirkes imidlertid i stor grad av pH. Lavere pH fører til et lavere A_{260}/A_{280} -forhold og redusert sensitivitet for proteinkontaminering.* For nøyaktige verdier anbefaler vi å måle absorbans i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Rent RNA har et A_{260}/A_{280} -forhold på 1,8–2,2 i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Nullstill spektralfotometeret ved hjelp av en blank prøve bestående av det samme forholdet av elusjonsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i prøvene som skal måles. Elusjonsbuffer (BR5) har høy absorbans ved 220 nm, noe som kan føre til høye bakgrunnsabsorbansnivåer hvis spektralfotometeret ikke er riktig nullstilt.

* 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.

Vedlegg C: Håndtere PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Følgende anbefalinger fra BD kan være nyttige ved håndtering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Se *håndboken for PAXgene Blood RNA Tube* for mer informasjon om bruken av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Instruksjoner for fjerning av BD Hemogard-hetten

1. Hold PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i den ene hånden, og hold tommelen under BD Hemogard-hetten. (For ekstra stabilitet kan du legge armen på et fast underlag.) Vri BD Hemogard-hetten med den andre hånden samtidig som du skyver opp med tommelen på den andre hånden **BARE TIL RØRSTOPPEREN ER LØSNET**.
2. Ta bort tommelen før hetten løftes. Ikke bruk tommelen til å skyve hetten av PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Forsiktig: Det foreligger eksponeringsfare hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inneholder blod. For å bidra til å forhindre skade når hetten fjernes, er det viktig at tommelen som du bruker til å skyve hetten oppover, ikke er i kontakt med PAXgene Blood RNA Tube (BRT) når BD Hemogard-hetten er løsnet.
3. Løft hetten av PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Hvis plastskjoldet mot formodning ikke separeres fra gummistopperen, **IKKE SETT HETTEN TILBAKE**. Fjern gummistopperen forsiktig fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Instruksjoner for innsetting av sekundær BD Hemogard-hette

1. Sett hetten tilbake på PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Vri og trykk godt ned til stopperen sitter helt på plass. Stopperen må settes helt inn for at hetten skal sitte godt på PAXgene Blood RNA Tube under håndtering.

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Kat.nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, reagensrør, RNase-fri DNase I, RNase-frie reagenser og buffere. Brukes sammen med PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 blodsamlingsrør	762165
Relaterte produkter som kan bestilles fra QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Pakken inneholder: reagensflaskestativer (3), stativmerkingsstrips (8), 200 µl filterspisser (1024), 1000 µl filterspisser (1024), 1000 µl filterspisser med stor åpning (1024), 30 ml reagensflasker (18), rotoradaptere (240), rotoradapterholder	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Sterile, engangsfilterspisser, i stativ	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagensflasker (30 ml) med lokk, pakke med 6; til bruk med QIAcube- instrumentets reagensflaskestativ	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Til 240 klargjøringer: 240 engangsrotoradaptere, til bruk med QIAcube-instrumenter	990394

Reagent Bottle Rack	Stativ for 6 x 30 ml reagensflasker på QIAcube-instrumentets arbeidsbenk	990390
Rotor Adapter Holder	Holder for 12 engangsrotoradaptere, til bruk med QIAcube-instrumenter	990392

Relaterte produkter som kan bestilles fra BD*

Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,75 tommers (0,8 x 19 mm) nål, 12 tommers (305 mm) slange med luer-adapter; 50 per eske, 200 per kasse	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Kasse bare til 13 mm og 16 mm diameter, 1000/kasse	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4,0 ml trekk med rød BD Hemogard-hette og papiretikett; 100/eske, 1000/kasse	368975

* Dette blodinnsamlingstilbehøret representerer typiske produkter som kan brukes med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Hvis du vil ha mer informasjon om dette tilbehøret, bl.a. hvordan det skal bestilles, se www.preanalytix.com.

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, kan du se i den aktuelle håndboken eller bruksanvisningen for PreAnalytiX- eller QIAGEN-kitet. Håndbøker og bruksanvisninger for PreAnalytiX- og QIAGEN-kit er tilgjengelige på www.preanalytix.com og www.qiagen.com eller kan leveres fra PreAnalytiXs tekniske tjenester.

Endringshistorikk for håndbok

Dokument og revisjon	Endringer	Dato
HB-0101-004, R2	Endringer for å overholde GHS-bestemmelser gjennom hele dokument	Juni 2015
HB-0101-005, R3	Ny mal, revideringer av automatisk protokoll og ytelsesdata, oppdatering av sikkerhetsinformasjon for å overholde GHS-bestemmelser, endringer i instrumentdetaljer og erklæring om produktbruksbegrensninger.	Februar 2019
HB-0101-006, R3	Retting av navn på kit i tabellen over kitets innhold, side 5.	Januar 2020
HB-0101-007, R4	Lagt til QIAcube Connect MDx til automatisk protokoll; oppdatert språk globalt for å inkludere referanser til QIAcube Connect MDx; oppdatert tall på tabeller, sider og figurer globalt.	Desember 2020

PreAnalytiX Worldwide

PreAnalytiX-produkter er distribuert av QIAGEN og BD-selskaper

QIAGEN – Kundeservice

Bestilling www.QIAGEN.com/shop | Teknisk støtte support.qiagen.com | Nettsted www.qiagen.com

BD – kundeservice

Argentina, Uruguay and Paraguay

Orders: 0800.444.5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Australia

Orders: 1.800.656.100

Fax: 1.800.656.110

E-mail: bd_anz@bd.com

Austria

Orders: 43.1.7063660

Fax: 43.1.706366011

E-mail: customercare.at@bd.com

Belgium

Orders: 32.53.720.556

Fax: 32.53.720.549

E-mail: orders.be@bd.com

Brazil

Orders: 0800.055.56.54

E-mail: consultoria_vacutainer@bd.com

Canada

Technical support: 1.800.631.0174

Orders: 1.866.979.9408

Fax: 1.800.565.0897

E-mail: customer.service.canada@bd.com

Central and Eastern Europe

Orders: 48.22.377.11.11

Fax: 48.22.377.11.02

Bulgaria orders: info_bulgaria@bd.com

Czech Republic orders: info_czech@bd.com

Croatia orders: info_croatia@bd.com

Hungary orders: info_hungary@bd.com

Poland orders: info_poland@bd.com

Romania orders: info_romania@bd.com

Southeast Europe orders: info_balkan@bd.com

Serbia orders: info_serbia@bd.com

Slovakia orders: info_slovakia@bd.com

Slovenia orders: info_slovenia@bd.com

Denmark

Orders: 45.43.43.45.66

Fax: 45.43.96.56.76

Orders: ordre.dk@bd.com

Technical support: bddenmark@bd.com

Finland

Orders: 358.9.88.70.780

Fax: 358.9.88.70.7816

Orders: tilauksef.fi@bd.com

E-mail: bdsuomi@bd.com

France

Orders: 33.476.68.36.36

Fax: 33.476.68.36.93

E-mail: serviceclientbdf@bd.com

Orders: commandesfr@bd.com

Technical support: vacutainerfr@bd.com

Germany

Orders: 49.6221.3050

Fax: 49.6221.305.216

E-mail: customercare.de@bd.com

India

Orders: 91.124.3949390

Orders: bd_india@bd.com

Ireland (Aquilant Specialist Healthcare Services)

Customer support: 353.1.404.8350

Fax: 353.1.404.8352

E-mail: contactus@aquilantscientific.ie

Israel (Lapidot Medical)

Customer Support: 972.700.70.90.22

E-mail: cs@lapidot.com

Italy

Orders: 39.02.48240.500

Fax: 39.02.48240.775

Technical support: 39.3450655140

E-mail: ordini.it@bd.com

Middle East & Africa

Orders: 971.45.592.555

Fax: 971.45.592.599

E-mail: EMA_PAS@bd.com

The Netherlands

Orders: 31.20.582.94.20

Fax: 31.20.582.94.21

Orders: orders.nl@bd.com

New Zealand

Orders: 0800.572.468

Fax: 0800.572.469

E-mail: nz_customerservice@bd.com

Norway

Customer Support: 64.00.99.00

E-mail: bdnorge@bd.com

Orders: ordre.no@bd.com

Southeast Asia

E-mail: PAS.SEA@bd.com

Indonesia orders: 622.1577.1920

Malaysia orders: 603.2093.8788

Philippines orders: 63.2478.8881

Singapore orders: 65.6861.0633

Thailand orders: 662.646.1800

Vietnam orders: 848.3822.7409

South Korea

Orders: 02.3404.3706

Fax: 02.3404.3785

Technical: 02.3404.3706

Technical support: Korea_PAS@bd.com

Spain, Portugal and Andorra

Orders: 34.91.848.8174

Customer support: 34.902.27.17.27

Fax: 34.91.848.8115

E-mail: info.spain@bd.com

Sweden

Orders: 46.8.775.51.00

Fax: 46.8.645.08.08

Orders: order.se@bd.com

Technical support: bds sweden@bd.com

Switzerland

Orders: 41.61.485.22.24

Fax: 41.61.485.22.00

E-mail: infoch@bd.com

UK

Orders: 0800.917.8776

E-mail: bduk_customerservice@bd.com

USA

Customer support: 800.631.0174

E-mail: productcomplaints@bd.com



HB-0101-007 1122120EN BD-8945 12/2020
Produkt fra Tyskland