

December 2020

Príručka súpravy PAXgene[®] Blood RNA Kit

Verzia 2



50 (katalógové č. 762174)

R4 **MAT** 1122120SK

REF 762174

IVD

CE



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Vyrobita spoločnosť QIAGEN GmbH pre PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

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

Súpravy PAXgene Blood RNA Kits nie sú dostupné vo všetkých krajinách, informujte sa, prosím.

Obmedzená licenčná zmluva

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa súpravy PAXgene Blood RNA Kit s nasledovnými podmienkami:

1. Súprava PAXgene Blood RNA Kit môže byť použitá výlučne v súlade s príručkou k súprave *PAXgene Blood RNA Kita* iba s komponentmi obsiahnutými v tejto súprave. Spoločnosť PreAnalytiX neudeluje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy so žiadnymi komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy, s výnimkou ustanovení uvádzaných v *príručke k súprave PAXgene Blood RNA Kit* a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese www.preanalytix.com.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť PreAnalytiX neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava a/alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť PreAnalytiX sa špecificky zrieka všetkých ostatných výslovných alebo implicitných licencií okrem tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolia vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať.
6. Spoločnosť PreAnalytiX môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou a/alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na www.preanalytix.com.

Podmienení predaj

Tento produkt sa dodáva s licenciou podľa určitých požiadaviek US-7,270,953 a US-7,682,790, ako aj EP-1820793 B1 a zahraničných ekvivalentov týchto patentových požiadaviek na použitie produktu na spracovanie komplexu nukleových kyselín vytvoreného počas odberu vzorky v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, všetky práva vyhradené.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Švajčiarsko

www.preanalytix.com

Distribútori PreAnalytiX

Výrobky PreAnalytiX vyrába a distribuuje spoločnosť QIAGEN alebo BD pre PreAnalytiX.

Výrobky nemôže spoločnosť PreAnalytiX GmbH objednať.


Pozri poslednú stranu s kontaktnými informáciami o vašom miestnom distribútorovi výrobkov PreAnalytiX.

Obsah

Obsah súpravy	5
Symboly.....	6
Podmienky uchovávania.....	7
Účel použitia	8
Obmedzenia používania produktu	8
Kontrola kvality	9
Technická pomoc	9
Bezpečnostné informácie	10
Úvod	14
Princíp a postup	14
Odber a stabilizácia vzoriek	15
Koncentrácia a purifikácia RNA.....	20
Manuálna purifikácia RNA.....	20
Automatizovaná purifikácia RNA.....	30
Zariadenie a reagenty, ktoré dodá používateľ	39
Dôležité poznámky	42
Použitie prístrojov QIAcube.....	42
Inštalácia protokolov na prístrojov QIAcube	45
Naloženie prístrojov QIAcube.....	46
Protokol: Manuálna purifikácia celkovej RNA z ľudskej plnej krvi odobranej do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	57

Protokol: Automatizovaná purifikácia celkovej RNA z ľudskej plnej krvi odobranej do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	65
Sprievodca riešením problémov	72
Príloha A: Všeobecné poznámky k manipulácii s RNA	75
Príloha B: Kvantifikácia a určenie kvality celkovej RNA	76
Príloha C: Manipulácia so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	78
Informácie o objednávaní	80
História revízií príručky	82

Obsah súpravy

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalógové č.			762174
Počet príprav			50
BR1	Resuspension Buffer (resuspenzný pufer)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer* (väzbový pufer)	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1* (premyvaci pufer)	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Pufer Wash Buffer 2 (premyvaci pufer) (koncentrát) [†]	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (elučný pufer)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (voda bez RNázy) (fľaša)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (proteináza K) (zelený uzáver)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (centrifugačné kolóny PAXgene RNA) (červené)	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (skúmavky na spracovanie) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (sekundárne uzávery BD Hemogard™)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (skúmavky do mikrocentrifúgy) (1,5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNáza I, bez RNázy) (lyofylizovaná)	DNA REM	1500 jednotiek Kunitz [‡]
RDD	DNA Digestion Buffer (digestívny pufer) (biely uzáver)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (resuspenzný pufer DNázy) (skúmavka, svetlofialový uzáver)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (kolóny PAXgene RNA Spin) (svetlofialové)	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Príručka	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (príručka súpravy PAXgene Blood RNA Kit) (verzia 2)		1

* Nekompatibilný s dezinfekčnými reagensmi obsahujúcimi bielidlo. Obsahuje guanidínovú soľ. Na strane 10 nájdete bezpečnostné informácie.

[†] Premývaci pufer 2 (BR4) sa dodáva ako koncentrát. Pred prvým použitím pridajte 4 objemy etanolu (stupeň čistoty 96 – 100 % p. a.) ako je uvedené na fľaši, aby ste dosiahli pracovný roztok.

[‡] Jednotky Kunitz sú bežne používané jednotky na meranie DNázy I, ktoré sú definované ako množstvo DNázy I, ktoré spôsobí zvýšenie A_{260} v množstve 0,001 na minútu na mililitr pri teplote 25 °C, pH 5,0, s vysoko polymerizovanou DNA ako substrát (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 a 363).

Symboly



Obsahuje reagentie postačujúce pre <N> testov



Prečítajte si návod na použitie



Použite do



Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro



Katalógové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Komponenty



Číslo



Metóda sterilizácie pomocou ožiarenia



Jednotky Kunitz



Pridávanie



Obsahuje



Pripravené pomocou vody



Deoxyribonukleáza I



Etanol



Guanidín izotiokyanát



Súprava DNázy bez RNázy



Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)



Nepoužívať opakovane



Teplotné obmedzenia



Horný limit teploty



Výrobca



Dôležitá poznámka

Podmienky uchovávania

Centrifugačné kolóny PAXgene RNA (PRC), centrifugačné kolóny PAXgene Shredder (PSC), proteínáza K (PK) a pufré (BR1, BR2, BR3, BR4 a BR5) by sa mali skladovať na suchom mieste pri teplote uvedenej na štítku súpravy.

Súprava DNázy bez RNázy, ktorá obsahuje DNázu (RNFD), digestívny pufer (RDD) a resuspenzný pufer DNázy (DRB) sa expedujú pri okolitej teplote. Všetky komponenty súpravy DNázy bez RNázy uskladnite ihneď po prijatí pri teplote uvedenej na štítku. Pri správnom skladovaní je súprava stabilná až do dátumu expirácie uvedeného na škatuli súpravy.

Účel použitia

Systém PAXgene Blood RNA System sa skladá zo skúmavky na odber krvi (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) a súpravy na purifikáciu nukleovej kyseliny (PAXgene Blood RNA Kit). Je určený na odber, skladovanie a prepravu krvi a stabilizáciu vnútrobunkovej RNA v uzatvorenej skúmavke a následne izoláciu a purifikáciu hostiteľskej RNA z plnej krvi na test RT-PCR používaný pri molekulárnom diagnostickom testovaní.

C systému PAXgene Blood RNA System boli stanovené len s génovými transkripciami FOS a IL1B. Používateľ je zodpovedný za určenie vhodných charakteristík účinnosti systému PAXgene Blood RNA System pre ostatné cieľové transkripcie.

Indikácie na použitie

Súprava PAXgene Blood RNA Kit je určená na purifikáciu vnútrobunkovej RNA z plnej krvi odobratej do skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Ak sa súprava používa spolu so skúmavkou PAXgene Blood RNA Tube (BRT), poskytuje systém purifikovanú vnútrobunkovú RNA z plnej krvi na RT-PCR používané v molekulárnom diagnostickom testovaní.

Obmedzenia používania produktu

Súprava PAXgene Blood RNA Kit je určená na purifikáciu medzibunkovej RNA z ľudskej plnej krvi ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytov/ml) v rámci použitia v in vitro diagnostike. Nie je určená na purifikáciu genómovej DNA alebo vírusových nukleových kyselín z ľudskej plnej krvi. Z dôvodu limitovaného počtu transkripcií validovaných pre stabilizačné špecifikácie (génové transkripcie FOS a IL1B) neboli charakteristiky účinnosti stanovené pre všetky transkripcie. Používatelia laboratória by mal posúdiť údaje výrobcu a svoje vlastné údaje a určiť, či je validácia pre ostatné transkripcie potrebná.

Tento produkt je určený na použitie profesionálnymi používateľmi, ako napr. technici a lekári vyškolení v postupoch in vitro diagnostiky.

Pozri *príručku pre skúmavku PAXgene Blood RNA Tube* s informáciami o použití skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Kontrola kvality

V súlade so certifikovaným systémom riadenia kvality QIAGEN ISO je každá šarža súpravy PAXgene Blood RNA Kit testovaná na základe vopred určených špecifikácií, aby bola zaistená konzistentná kvalita produktu.

Technická pomoc

V spoločnosti QIAGEN sme hrdí na kvalitu a dostupnosť našej technickej podpory. Na našich oddeleniach technického servisu pracujú skúsení vedci s rozsiahlymi praktickými a teoretickými poznatkami v oblasti molekulárnej biológie a používania výrobkov od spoločnosti PreAnalytiX. V prípade akýchkoľvek otázok týkajúcich sa súpravy PAXgene Blood RNA Kit nás neváhajte kontaktovať.

Ak potrebujete technickú pomoc a viac informácií, kontaktujte technickú podporu spoločnosti QIAGEN.

Bezpečnostné informácie

EÚ – Používatelia by mali výrobcovi a národnému kompetentnému orgánu nahlásiť každý vážny incident súvisiaci s pomôckou. Mimo EÚ – V prípade incidentu alebo otázky týkajúcej sa tejto pomôcky kontaktujte svojho miestneho zástupcu spoločnosti QIAGEN.

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare.

Aby ste predišli riziku (napr. vírusov HIV alebo hepatitídy typu B) alebo zraneniu pri práci s biologickými a chemickými materiálmi, noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii on-line v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese www.preanalytix.com, kde môžete vyhľadať, zobraziť a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (KBÚ) pre každú súpravu a jej súčasti.

UPOZORNENIE



NEPRIDÁVAJTE bieliace alebo kyslé roztoky priamo do odpadu z prípravy vzoriek.

Väzbový pufer (BR2) a premývací pufer 1 (BR3) obsahujú guanidín tiokyanát, ktorý môže v kombinácii s bielidlom vytvárať vysoko reaktívne zlúčeniny. Ak sa väzbový pufer (BR2) alebo premývací pufer 1 (BR3) rozlejú, vyčistite ich pomocou vhodného laboratórneho čistiaceho prostriedku a vody. Ak dôjde k rozliatiu kvapaliny obsahujúcej infekčné činidlá, vyčistite postihnuté miesto najskôr laboratórnym čistiacim prostriedkom a vodou a potom 1 % (v/v) chlórnanom sodným (bielidlo).

Zmes stabilizačného roztoku RNA a krvi zo skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sa môže dezinfikovať pomocou 1 objemu bežne dostupného roztoku bielidla (5 % chlórnan sodný) na 9 objemov zmesi stabilizačného roztoku RNA a krvi.

Odpad z prípravy vzoriek, ako napríklad supernatanty z centrifugácie v procese purifikácie RNA sa musia považovať za potenciálne infekčné. Pred likvidáciou sa musí obsah autoklávať alebo spáliť, aby došlo k zničeniu všetkých infekčných materiálov. Likvidácia musí prebiehať v súlade s oficiálnymi nariadeniami.

Na súčasti súpravy PAXgene Blood RNA Kit sa vzťahujú nasledujúce bezpečnostné vyhlásenia a preventívne opatrenia. Pozri *príručku pre skúmavku PAXgene Blood RNA Tube* s bezpečnostnými informáciami o skúmavkách PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Buffer BR2



Obsahuje: guanidín tiokyanát. Nebezpečenstvo! Škodlivý po požití. Môže byť škodlivý pri kontakte s pokožkou alebo pri vdýchnutí. Spôsobuje závažné poškodenie očí. Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami. Pri kontakte s kyselinami uvoľňuje vysoko toxický plyn. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. Okamžite volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára.

Buffer BR3



Obsahuje: etanol; guanidín tiokyanát. Nebezpečenstvo! Horľavá kvapalina a výpary. Spôsobuje závažné poškodenie očí. Pri kontakte s kyselinami uvoľňuje vysoko toxický plyn. Uchovávajte mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčte. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. Okamžite volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára.

DNáza I



Obsahuje: DNázu. Nebezpečenstvo! Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. Pri vdýchnutí môže vyvolať alergiu alebo príznaky astmy alebo dýchacie ťažkosti. Vyhnite sa vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. Používajte respiračnú ochranu. Po expozícii alebo podozrení z nej: Volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára. Preneste postihnutého na čerstvý vzduch a ponechajte ho v pokoji v polohe pohodlnej na dýchanie.

Proteináza K



Obsahuje: proteinázu K. Nebezpečenstvo! Spôsobuje mierne podráždenie pokožky. Pri vdýchnutí môže vyvolať alergiu alebo príznaky astmy alebo dýchacie ťažkosti. Vyhnite sa vdychovaniu prachu/dymu/plynu/oparu/pár/aerosólov. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. Používajte respiračnú ochranu. Po expozícii alebo podozrení z nej: Volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára. Preneste postihnutého na čerstvý vzduch a ponechajte ho v polohe pohodlnej na dýchanie.

Úvod

Odber plnej krvi je prvý krok mnohých molekulárnych testov v rámci študovania bunkovej RNA. Hlavným problémom v týchto experimentoch je ale nestabilita bunkového RNA profilu in vitro. Štúdie v spoločnosti PreAnalytiX ukázali, že počet kópií jednotlivých vzoriek mRNA v plnej krvi sa môže zmeniť viac ako 1000-násobne počas skladovania alebo prepravy pri izbovej teplote.* To je spôsobené rýchlou degradáciou RNA ale aj vyvolanou expresiou určitých génov po odobratí krvi. Takéto zmeny v profile expresie RNA znemožňujú spoľahlivé štúdie génovej expresie. Spôsob, ktorým sa zachová profil expresie RNA počas a po flebotómii je preto nevyhnutný pre presnú analýzu génovej expresie v ľudskej plnej krvi.

Princíp a postup

Spoločnosť PreAnalytiX vyvinula systém, ktorý umožňuje odber, stabilizovanie, skladovanie a prepravu vzoriek plnej krvi spolu s rýchlým a efektívnym protokolom pre purifikáciu vnútrobunkovej RNA. Tento systém vyžaduje použitie skúmaviek PAXgene Blood RNA Tube (BRT, americké patenty 6,602,718 a 6,617,170) na odber krvi a stabilizovanie RNA s následnou manuálnou alebo automatizovanou purifikáciou RNA pomocou súpravy PAXgene Blood RNA Kit. Manuálne aj automatizované protokoly poskytujú značne ekvivalentnú účinnosť s ohľadom na získanie a kvalitu RNA. Údaje o účinnosti pre manuálny protokol (strany 23–30) a automatizovaný protokol (strany 32–36) sú uvedené v tejto príručke.



Prístroj QIAGEN QIAcube Connect MDx nie je dostupný vo všetkých krajinách. Ďalšie podrobnosti vám poskytne technický servis spoločnosti QIAGEN.

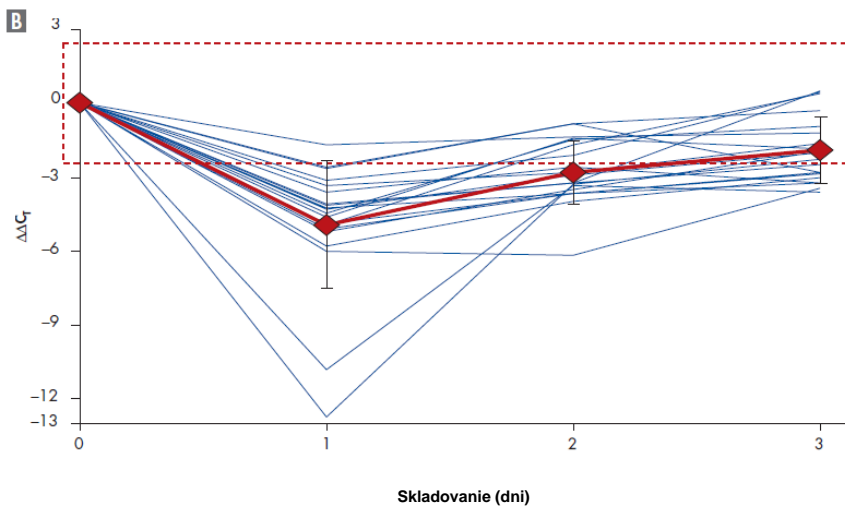
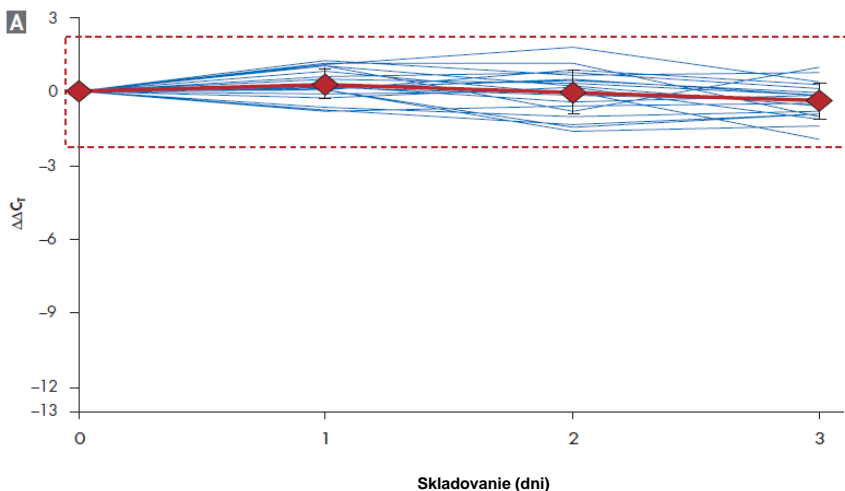
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Odber a stabilizácia vzoriek

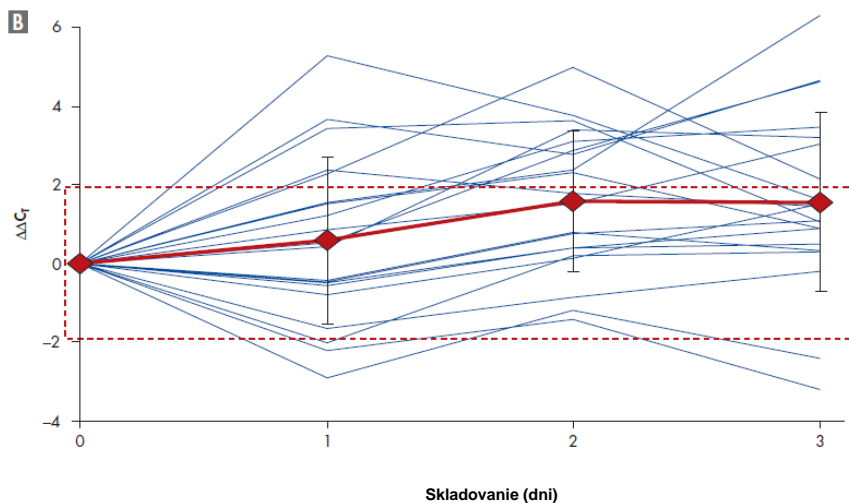
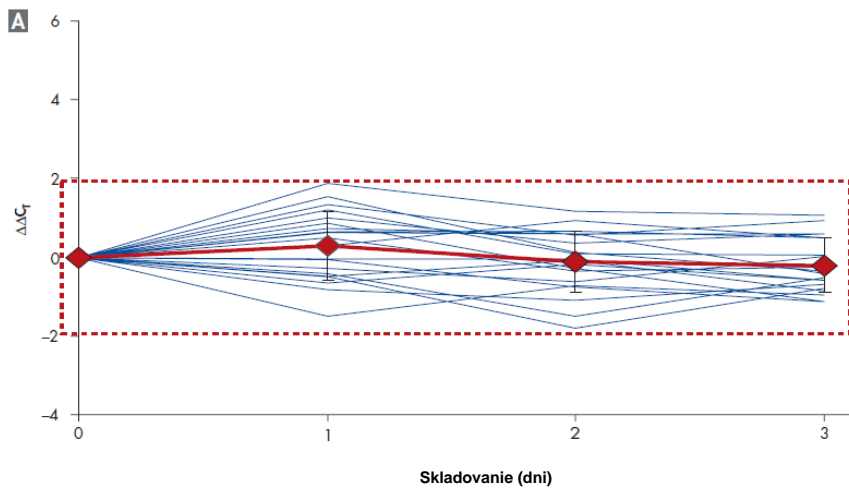
Skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) obsahujú originálne zloženie reagentie založené na patentovanej technológii stabilizácie RNA. Toto zloženie reagentie chráni molekuly RNA pre degradáciou RNázou a minimalizuje ex vivo zmeny v génovej expresii. Skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sú určené na odber ľudskej plnej krvi a stabilizovanie bunkovej RNA na 3 dni pri teplote 18 – 25 °C (obrázky 1 a 2, strany 16 a 17) alebo na 5 dní pri teplote 2 – 8 °C (obrázky 3 a 4, strany 18 a 19). Momentálne dostupné údaje ukazujú stabilizáciu bunkovej RNA na minimálne 11 rokov pri teplote -20 °C alebo -70 °C*. Viac informácií z prebiehajúcich štúdií, v ktorých sa hodnotí stabilita počas dlhších období vám poskytne technická podpora spoločnosti QIAGEN.

Skutočné trvanie stabilizácie RNA sa môže líšiť v závislosti od druhov bunkovej RNA a použitej následnej aplikácie. Z dôvodu limitovaného počtu transkripcií validovaných pre stabilizačné špecifikácie (génové transkripcie FOS a IL1B) neboli charakteristiky účinnosti stanovené pre všetky transkripcie. Používatelia laboratória by mal posúdiť údaje výrobcu a svoje vlastné údaje a určiť, či je validácia pre ostatné transkripcie potrebná.

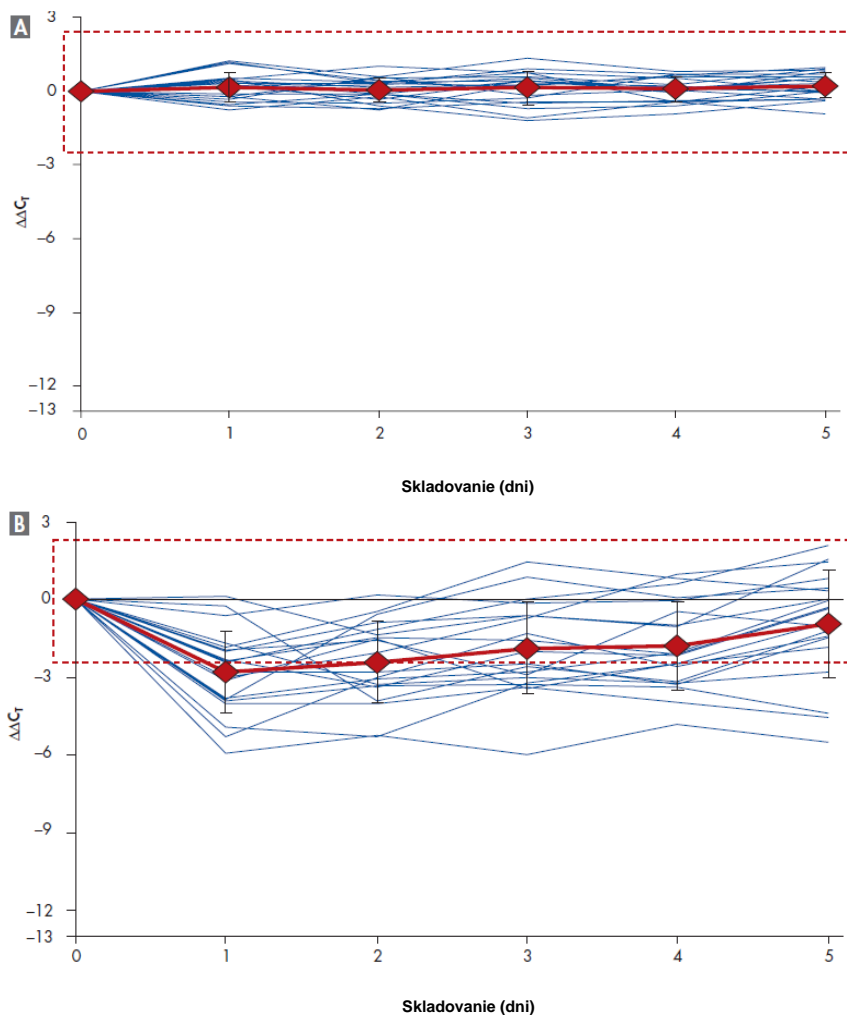
* Dlhodobá štúdia krvi uskladnenej v skúmavkách PAXgene Blood RNA Tubes prebieha.



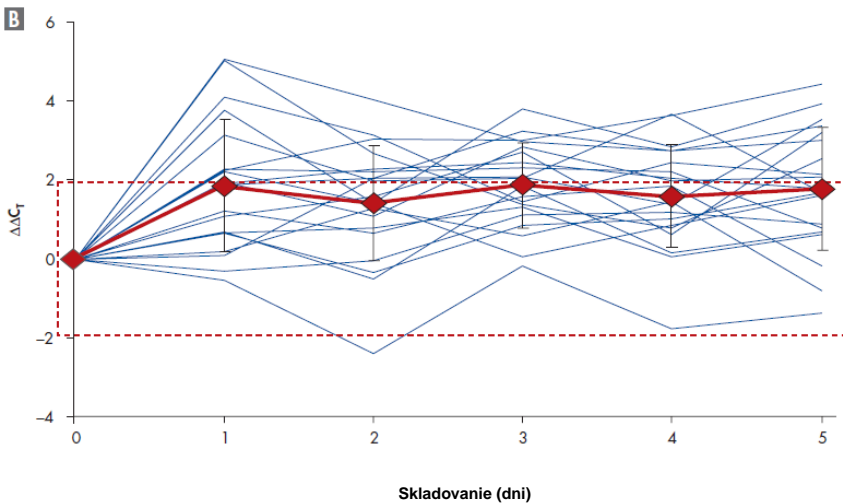
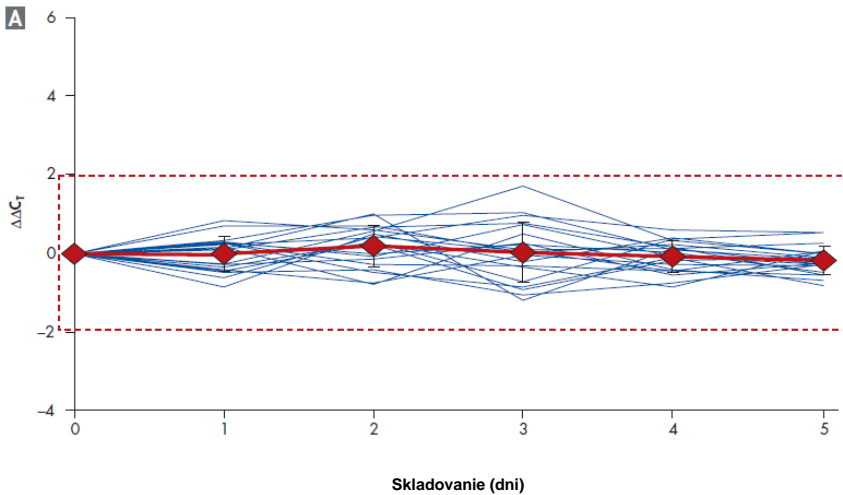
Obrazok 1. Stabilita RNA vo vzorkách krvi pri teplote 18 – 25 °C: FOS. Krv sa odobrala od 10 darcov v zdvojených vzorkách, ktoré sa uskladnili pri teplote 18 – 25 °C na uvedený počet dní, po ktorých nasledovala purifikácia RNA. **[A]** Krv sa odobrala a uskladnila v skúmavkách PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) a celková RNA sa purifikovala pomocou súpravy PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krv sa odobrala a uskladnila v štandardných skúmavkách na odber krvi s EDTA ako antikoagulant a celková RNA sa purifikovala pomocou štandardnej metódy organickej extrakcie s čistením RNA na báze oxidu kremičitého. Relatívne úrovne transkripcie FOS sa určili pomocou real-time RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Hodnoty pre všetky vzorky sa zakreslia s priemermi a štandardnými odchýlkami všetkých zobrazených vzoriek. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testu $\pm 3 \times (2,34 C_T)$.



Obrázok 2. Stabilita RNA vo vzorkách krvi pri teplote 18 – 25 °C: IL1B. Krv sa odobrala a celková RNA sa purifikovala po skladovaní pri teplote 18 – 25 °C podľa popisu na obrázku 1. Relatívne úrovne transkripce IL1B sa určili pomocou real-time, duplex RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Hodnoty pre všetky vzorky sa zakreslia s priemerami a štandardnými odchýlkami všetkých zobrazených vzoriek. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testu $\pm 3 \times (1,93 C_T)$.



Obrázok 3. Stabilita RNA vo vzorkách krvi pri teplote 2 – 8 °C: FOS. Krv sa odobrala od 10 darcov v zdvojených vzorkách, ktoré sa uskladnili pri teplote 2 – 8 °C na uvedený počet dní, po ktorých nasledovala purifikácia RNA. **[A]** Krv sa odobrala a uskladnila v skúmavkách PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) a celková RNA sa purifikovala pomocou súpravy PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krv sa odobrala a uskladnila v štandardných skúmavkách na odber krvi s EDTA ako antikoagulant a celková RNA sa purifikovala pomocou štandardnej metódy organickej extrakcie s čistením RNA na báze oxidu kremičitého. Relatívne úrovne transkripcie FOS sa určili pomocou real-time RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Hodnoty pre všetky vzorky sa zakreslia s priemermi a štandardnými odchýlkami všetkých zobrazených vzoriek. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testu $\pm 3 \times (2,34 C_T)$.



Obrázok 4. Stabilita RNA vo vzorkách krvi pri teplote 2 – 8 °C: IL1B. Krv sa odobrala a celková RNA sa purifikovala po skladovaní pri teplote 2 – 8 °C podľa popisu na obrázku 3. Relatívne úrovne transkripcie IL1B sa určili pomocou real-time, duplex RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Hodnoty pre všetky vzorky sa zakreslia s priemerom a štandardnými odchýlkami všetkých zobrazených vzoriek. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testu $\pm 3 \times (1,93 C_T)$.

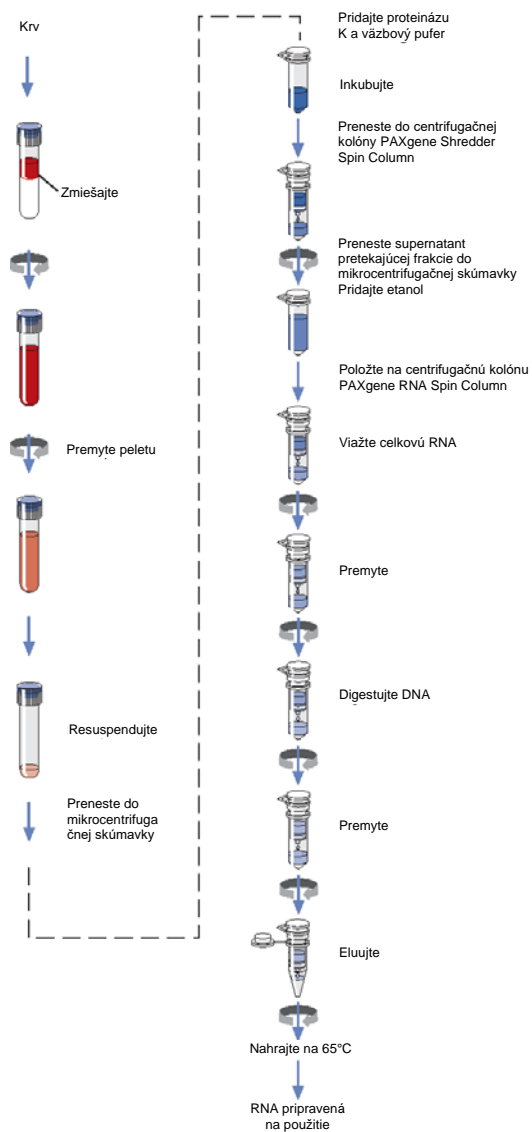
Koncentrácia a purifikácia RNA

Súprava PAXgene Blood RNA Kit je určená na purifikáciu celkovej RNA z objemu 2,5 ml plnej krvi odobratej do skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Tento postup je jednoduchý a môže sa vykonávať manuálne alebo automatizovane (pozri obrázky 5 a 10, strany 21 a 31). V oboch protokoloch začína purifikácia centrifugáciou s cieľom granulovať nukleové kyseliny v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Peleta sa premyje a resuspenduje a potom nasleduje manuálna alebo automatizovaná purifikácia RNA. V princípe prebiehajú obidva protokoly v rovnakých krokoch s rovnakými komponentmi súpravy.

Manuálna purifikácia RNA

Resuspendovaná peleta sa dôkladne inkubuje v optimalizovaných pufoch spolu s proteínázou K (PK), aby sa dosiahlo strávenie proteínu. Vykonáva sa ďalšia centrifugácia pomocou centrifugačnej kolóny PAXgene Shredder (PSC) s cieľom homogenizovať bunkový lyzát a odstrániť zvyškový bunkový debris (zvyšky buniek a ich organel) a supernatant pretekajúcej frakcie sa preniesie do čistej mikrocentrifugačnej skúmavky. Na upravenie väzobných podmienok sa pridá etanol a lyzát sa vloží do centrifugačnej kolóny PAXgene RNA (PRC). Počas krátkej centrifugácie sa RNA selektívne naviaže na membránu oxidu kremičitého PAXgene počas prechodu kontaminantov. Zvyšné kontaminanty sa odstránia počas niekoľkých efektívnych premývaní. Medzi prvým a druhým premývaním sa membrána ošetrí DNázou I (RNFD), aby sa odstránili stopové množstvá naviazanej DNA. Po premývaní sa RNA eluuje v elučnom pufri (BR5) a denaturuje teplotou.

Celková RNA izolovaná pomocou systému PAXgene Blood RNA System je čistá. Pomocou manuálneho protokolu sú hodnoty A_{260}/A_{280} v rozmedzí 1,8 a 2,2 a $\leq 1\%$ (w/w) genómovej DNA je prítomné v $\geq 95\%$ všetkých vzoriek pri meraní kvantitatívnou real-time PCR sekvencie β -aktín génu. Minimálne 95 % vzoriek nevykazuje žiadnu inhibíciu RT-PCR pri využití do 30 % eluátu.

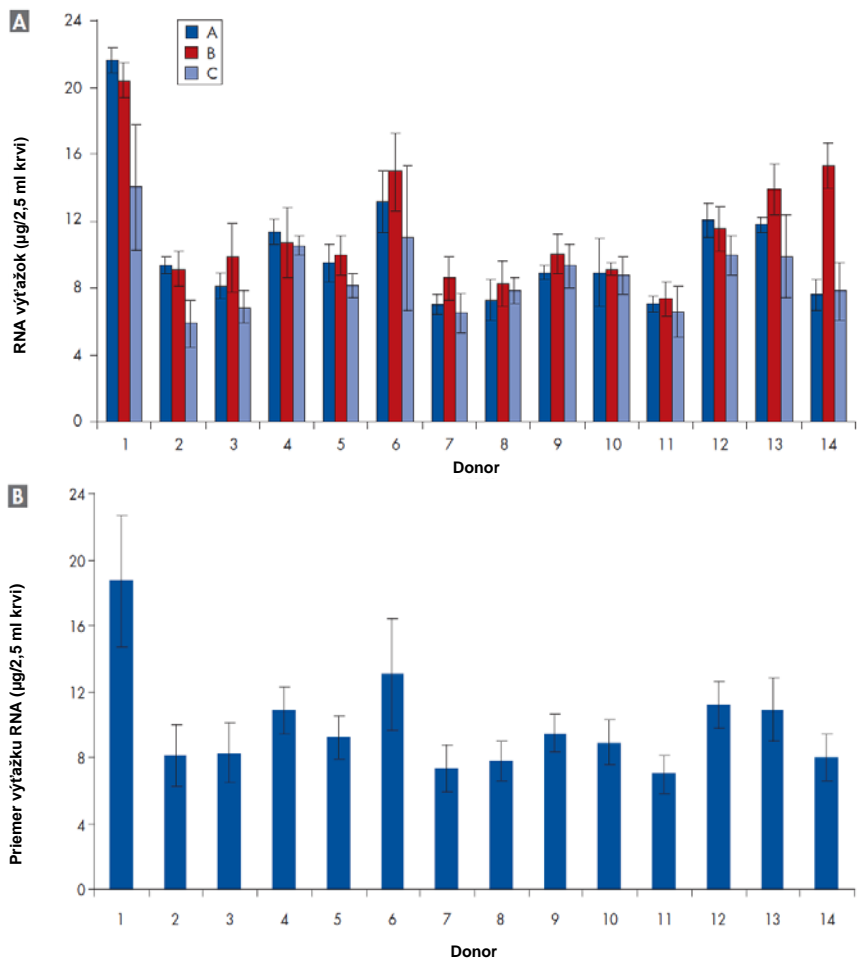


Obrázok 5. Manuálny postup s PAXgene Blood RNA.

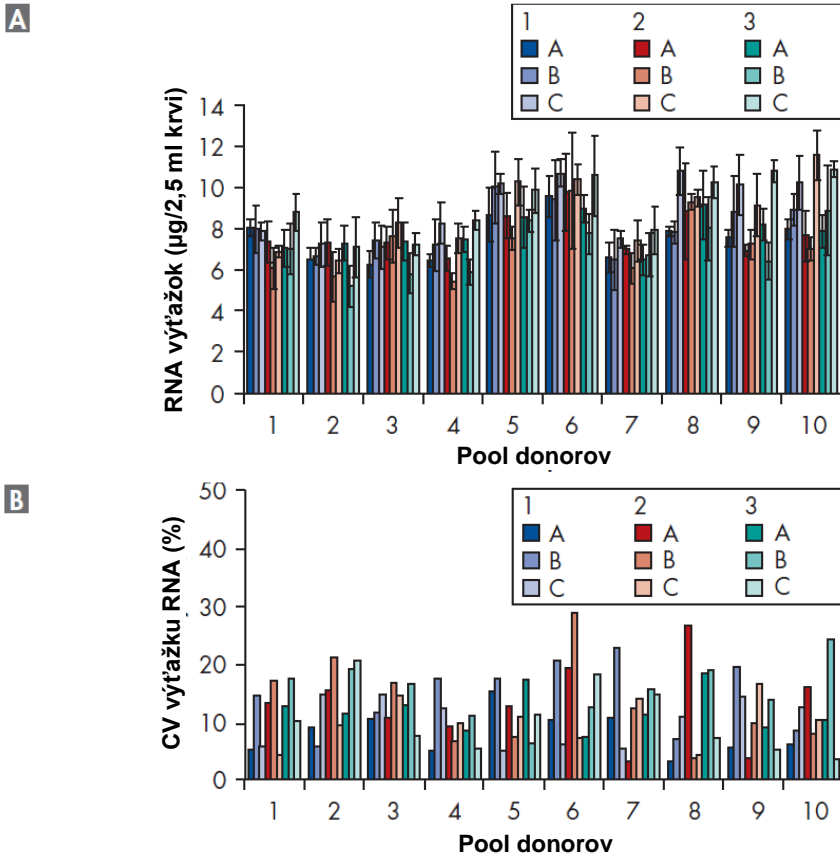
Pomocou manuálneho protokolu je priemerný čas prípravy vzorky (na základe údajov z 12 cyklov prípravy vzoriek) približne 90 minút*, pričom čas práce je len 40 minút. Výťažky RNA z 2,5 ml plnej krvi zdravého človeka sú $\geq 3 \mu\text{g}$ u $\geq 95\%$ spracovaných vzoriek. Keďže výťažky závisia do veľkej miery od darcu, môžu sa jednotlivé výťažky líšiť. U individuálnych darcov poskytuje systém PAXgene Blood RNA System vysoko reprodukovateľné a opakovateľné výťažky (obrázky 6 a 7, strany 23 a 24) a reprodukovateľnú a opakovateľnú RT-PCR (obrázky 8 a 9, strany 28 a 29), vďaka čomu je vysoko robustná pri klinických diagnostických testoch.

Obrázok 6 (strana 23) udáva celkovú opakovateľnosť a reprodukovateľnosť systému PAXgene Blood RNA System. Uskutočnili sa doplnkové štúdie, ktoré ukázali vplyv rôznych šarží súpravy PAXgene Blood RNA Kit a rôznych operátorov na reprodukovateľnosť výťažku RNA a účinnosti real-time RT-PCR. Keďže sa v týchto štúdiách namiesto jednotlivých skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) použili vzorky z poolu, nereflektujú výsledky opakovateľnosť systému, vrátane fluktuácie medzi jednotlivými odbermi krvi, ale len opakovateľnosť prípravy vzorky (pozri obrázok 7, strana 24).

* Celkové trvanie protokolu, vrátane počiatočnej manipulácia so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugácia, premývanie pelety a resuspenzia pelety).



Obrázok 6. Reprodukateľná a opakovateľná purifikácia RNA. Štyri kópie vzoriek krvi od 14 darcov manuálne spracoval každý z 3 technikov (A, B, C). Použili sa tri sady zariadenia a všetky vzorky pripravil jeden technik pomocou rovnakého vybavenia. **[A]** Sú zobrazené stredné a štandardné odchýlky výtazku RNA z každej kópie vzorky od rovnakých darcov a rôznych technikov. **[B]** Dvanásť kópií vzoriek krvi od každého zo 14 darcov spracovali 3 rôzni technici. Sú zobrazené stredné a štandardné odchýlky výtazku RNA z každej vzorky od rovnakých darcov a všetkých technikov. Pre všetky RNA vzorky boli pomery A_{260}/A_{280} od 1,8 do 2,2.



Obrázok 7. Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť výtazku RNA od rôznych operátorov a šarží súpravy PAXgene Blood RNA Kit pomocou vzoriek krvi z poolu. Do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tube sa odobrali vzorky krvi od 30 rôznych darcov (BRT; 12 skúmaviek na darcu, 360 skúmaviek celkovo). Obsah skúmaviek od 3 darcov sa vložil do poolu a následne sa opakovane alikvotoval na 36 vzoriek. Týchto 36 vzoriek na pool 3 darcov manuálne spracovali 3 rôzni operátori. Každý operátor použil na extrakciu 3 rôzne šarže súpravy PAXgene Blood RNA Kit a spracoval vzorky v štyroch kópiách z každého poolu s 10 darcami. **[A]** Výtazok RNA a štandardná odchýlka pre každú kombináciu operátora a šarže. Vzorky krvi v štyroch kópiách z poolov s 10 darcami spracovali 3 rôzni operátori (A, B, C) pomocou každej šarže 3 súprav (1, 2, 3). Sú zobrazené priemerné výtazky (stĺpce) a štandardné odchýlky (stĺpce chýb) na každú zo štyroch kópií vzorky z rovnakého poolu donorov pre rôzneho operátora a rôznu šaržu súpravy. **[B]** CV výtazku RNA na pool donorov pre všetky kombinácie operátora a šarže (A, B, C; 1, 2, 3) podľa výpočtu z priemerného výtazku a štandardnej odchýlky výtazku zobrazeného na obrázku 7A.

Tabuľka 1A. Reprodukovateľnosť v každej šarže a pre každého používateľa pre vybrané pooly darcov (1, 6, 9, 10)

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

Tabuľka 1B. Reprodukovateľnosť pre každého používateľa a medzi všetkými šaržami pre vybrané pooly darcov (1, 6, 9, 10)

Kombinácia údajov	Pool donorov 1 5,1 x 10 ⁶ buniek/ml			Pool donorov 6 6,5 x 10 ⁶ buniek/ml		
	Priemerný výťažok (µg)	SD (µg)	CV (%)	Priemerný výťažok (µg)	SD (µg)	CV (%)
Používateľ A, všetky šarže	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Používateľ B, všetky šarže	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Používateľ C, všetky šarže	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombinácia údajov	Pool donorov 9 8,4 x 10 ⁶ buniek/ml			Pool donorov 10 10,2 x 10 ⁶ buniek/ml		
	Priemerný výťažok (µg)	SD (µg)	CV (%)	Priemerný výťažok (µg)	SD (µg)	CV (%)
Používateľ A, všetky šarže	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Používateľ B, všetky šarže	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Používateľ C, všetky šarže	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

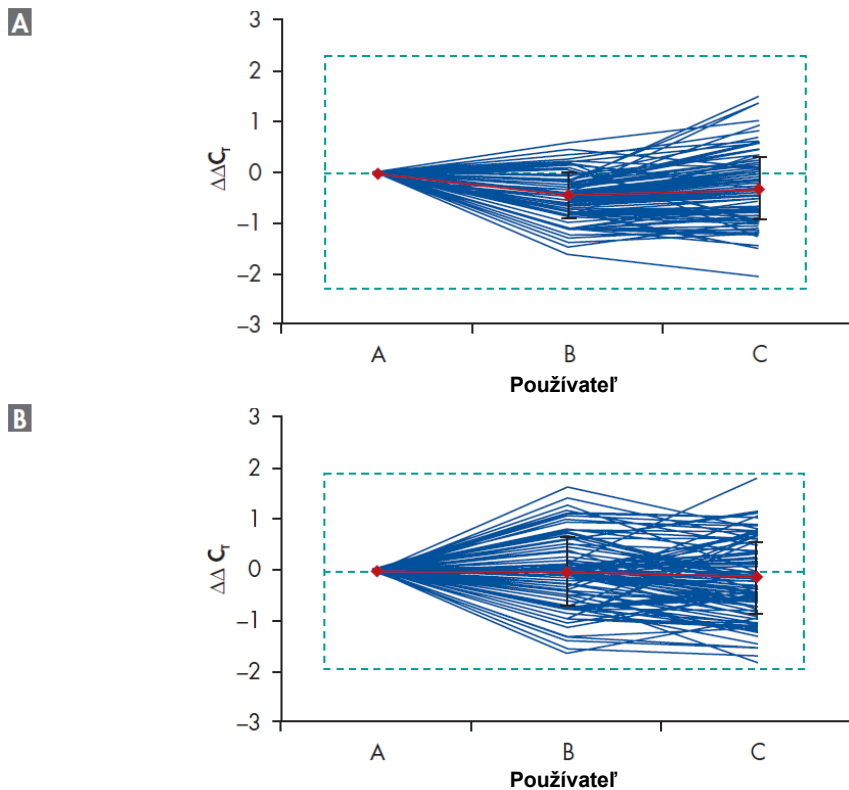
Tabuľka 1C. Reprodukovateľnosť pre každú šaržu a medzi všetkými používateľmi pre vybrané pooly darcov (1, 6, 9, 10)

Kombinácia údajov	Pool donorov 1 5,1 x 10 ⁶ buniek/ml			Pool donorov 6 6,5 x 10 ⁶ buniek/ml		
	Priemerný výťažok (µg)	SD (µg)	CV (%)	Priemerný výťažok (µg)	SD (µg)	CV (%)
Šarža 1, všetci používatelia	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Šarža 2, všetci používatelia	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Šarža 3, všetci používatelia	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombinácia údajov	Pool donorov 9 8,4 x 10 ⁶ buniek/ml			Pool donorov 10 10,2 x 10 ⁶ buniek/ml		
	Priemerný výťažok (µg)	SD (µg)	CV (%)	Priemerný výťažok (µg)	SD (µg)	CV (%)
Šarža 1, všetci používatelia	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Šarža 2, všetci používatelia	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Šarža 3, všetci používatelia	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

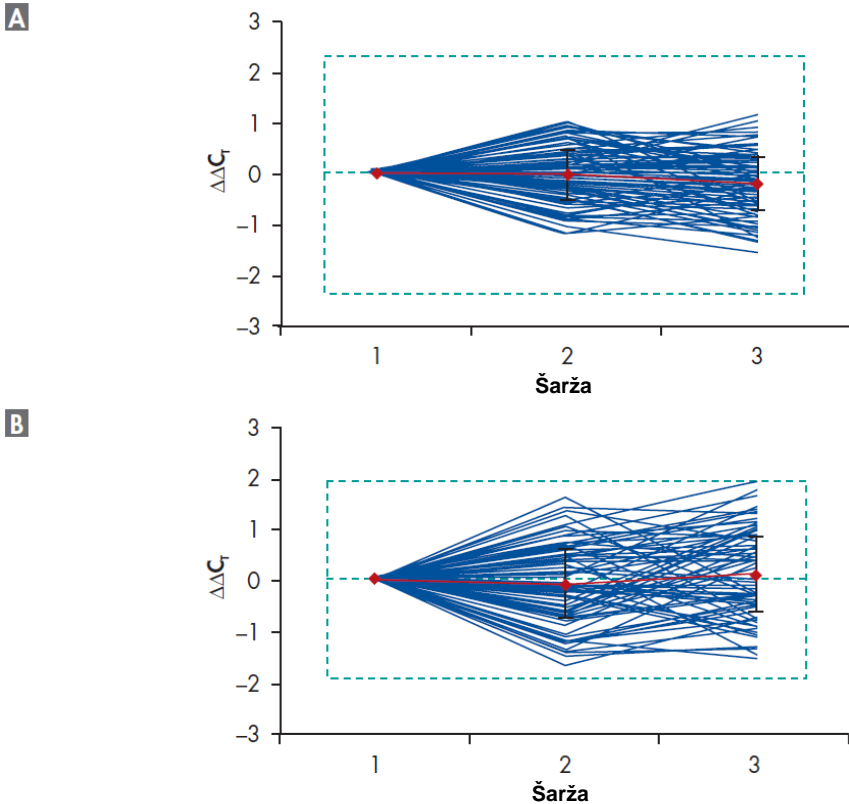
Tabuľka 1D. Reprodukovateľnosť medzi všetkými šaržami a všetkými používateľmi pre vybrané pooly darcov (1, 6, 9, 10)

Kombinácia údajov	Pool donorov 1 5,1 x 10 ⁶ buniek/ml			Pool donorov 6 6,5 x 10 ⁶ buniek/ml		
	Priemerný výťažok (µg)	SD (µg)	CV (%)	Priemerný výťažok (µg)	SD (µg)	CV (%)
Šarža 1, všetci používatelia	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Kombinácia údajov	Pool donorov 9 8,4 x 10 ⁶ buniek/ml			Pool donorov 10 10,2 x 10 ⁶ buniek/ml		
	Priemerný výťažok (µg)	SD (µg)	CV (%)	Priemerný výťažok (µg)	SD (µg)	CV (%)
Šarža 1, všetci používatelia	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detailný analýza 4 reprezentatívnych poolov darcov. Pools sa vybrali podľa počtu bielych krviniek a reflektujú horné, stredné a dolné hodnoty normálneho rozsahu počtu bielych krviniek ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytov/ml). Počet bielych krviniek predstavuje priemernú hodnotu 3 počtov bielych krviniek od 3 donorov z každého poolu.



Obrázok 8. Reprodukovateľnosť RT-PCR – medzi používateľmi. Na real-time RT-PCR sa použila RNA purifikovaná počas experimentu popísaného na obrázku 7. Relatívne úrovne transkripcie **[A]** FOS a **[B]** IL1B sa určili pomocou real-time RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Hodnoty pre všetky vzorky sa zakreslia vzhľadom na hodnoty pre používateľa A (pooly s 10 donormi x 3 šarže súpravy x 4 kópie = 120 sád údajov pre každý gén), so strednými hodnotami (červené čiary) a štandardnými odchýlkami (čierny stĺpce) pre všetky zobrazené vzorky. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testov $\pm 3 \times$ (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Obrázok 9. Reprodukovateľnosť RT-PCR – medzi šaržami súprav. Na real-time RT-PCR sa použila RNA purifikovaná počas experimentu popísaného na obrázku 7. Relatívne úrovne transkripcie [A] FOS a [B] IL1B sa určili pomocou real-time RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Hodnoty pre všetky vzorky sa zakreslia vzhľadom na hodnoty pre šaržu súpravy 1 (pooly s 10 donormi x 3 používatelia x 4 kópie = 120 sád údajov pre každý gén), so strednými hodnotami (červené čiary) a štandardnými odchýlkami (čierny stĺpce) pre všetky zobrazené vzorky. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testov $\pm 3 \times$ (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Tabuľka 2. Súhrn údajov RT-PCR z obrázkov 8 a 9

Systém testu	Test rRNA FOS/18S		Test rRNA IL1B/18S	
	Stredná hodnota ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Stredná hodnota ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reprodukovateľnosť v rámci každého používateľa a medzi všetkými šaržami				
Všetci používatelia, šarža 1 – šarža 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Všetci používatelia, šarža 1 – šarža 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Všetci používatelia, šarža 1 – šarža 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reprodukovateľnosť v rámci každého používateľa a medzi všetkými šaržami				
Všetky šarže, používateľ A – používateľ A	0,00	0,00	0,00	0,00
Všetky šarže, používateľ A – používateľ B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Všetky šarže, používateľ A – používateľ C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Používateľ: Technik, vykonal štúdiu.

Šarža: Počet šarží súpravy, ktoré sa v tejto štúdii použili.

SD: Standard deviation (Štandardná odchýlka).

Stredné hodnoty $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) a štandardné odchýlky sú zobrazené pre údaje uvedené na obrázkoch 8 a 9.

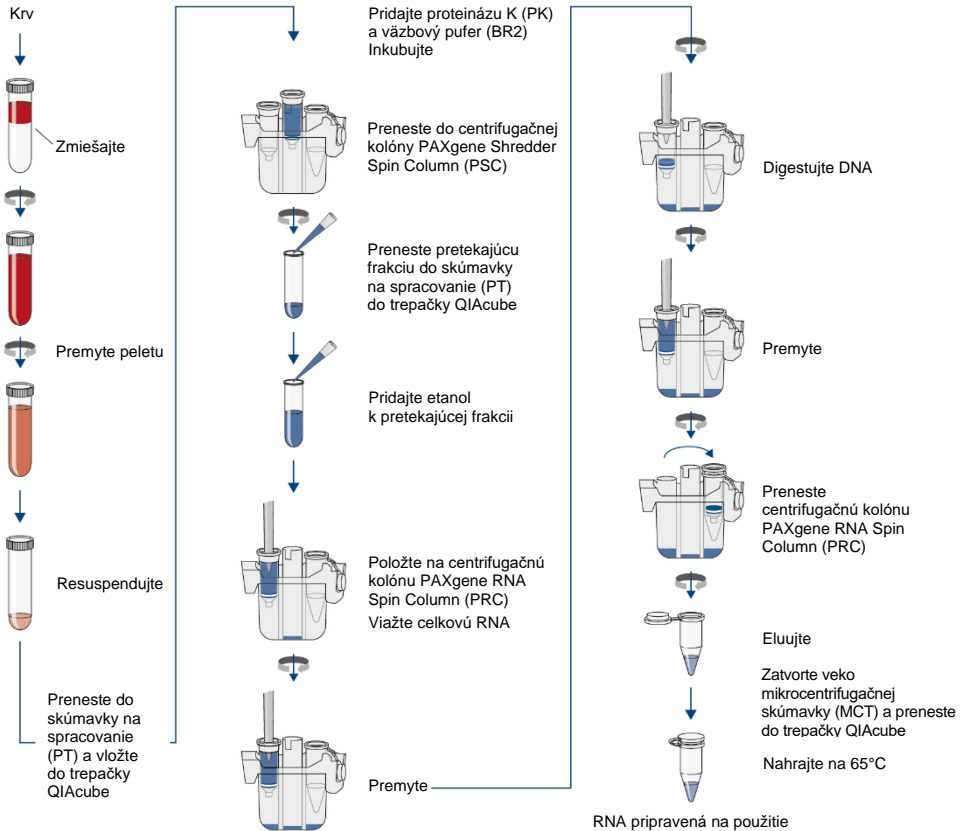
Automatizovaná purifikácia RNA

Purifikácia krvnej RNA je na prístroji QIAGEN QIAcube Connect MDx alebo klasickom prístroji QIAGEN QIAcube (ďalej len ako prístroj QIAcube) automatizovaná. Inovatívne prístroje QIAcube využíva pokrokovú technológiu na spracovanie odstredňovacích stĺpcov QIAGEN, čo umožňuje bezproblémovú integráciu automatizovanej prípravy vzoriek do vášho laboratórneho pracovného postupu s nízkou priepustnosťou. Príprava vzorky pomocou prístrojov QIAcube sa riadi rovnakými krokmi ako manuálny postup (t. j. lýza, viazanie, premytie a elúcia), čo vám umožňuje používať súpravu PAXgene Blood RNA Kit na purifikáciu vysokokvalitnej RNA.



Obrázok 10. QIAcube Connect MDx.

Protokol automatizovanej purifikácie RNA pozostáva z 2 častí (alebo protokolov), „PAXgene Blood RNA Part A“ a „PAXgene Blood RNA Part B“ s krátkou manuálnou intervenciou medzi 2 dielmi (pozri obrázok 11, strana 32).



Obrázok 11. Automatizovaný postup s PAXgene Blood RNA.

Centrifugovaná premytá a resuspendovaná peleta nukleovej kyseliny (pozri „Koncentrácia a purifikácia RNA“, strana 20) sa preniesie zo skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) do procesných skúmaviek (PT), ktoré sa umiestnia do jednotky termo trepačky na pracovnom stole prístrojov QIAcube. Operátor vyberie a spustí z menu časť protokolu „PAXgene Blood RNA Part A“. Prístroje QIAcube vykonajú kroky protokolu cez elúciu RNA do elučného pufru

(BR5). Operátor prenesie skúmavky do mikrocentrifúgy (MCT) obsahujúce purifikovanú RNA do jednotky termo trepačky prístrojov QIAcube. Operátor vyberie a spustí z menu časť protokolu „PAXgene Blood RNA Part B“ a prístroje QIAcube vykonajú tepelnú denaturáciu.

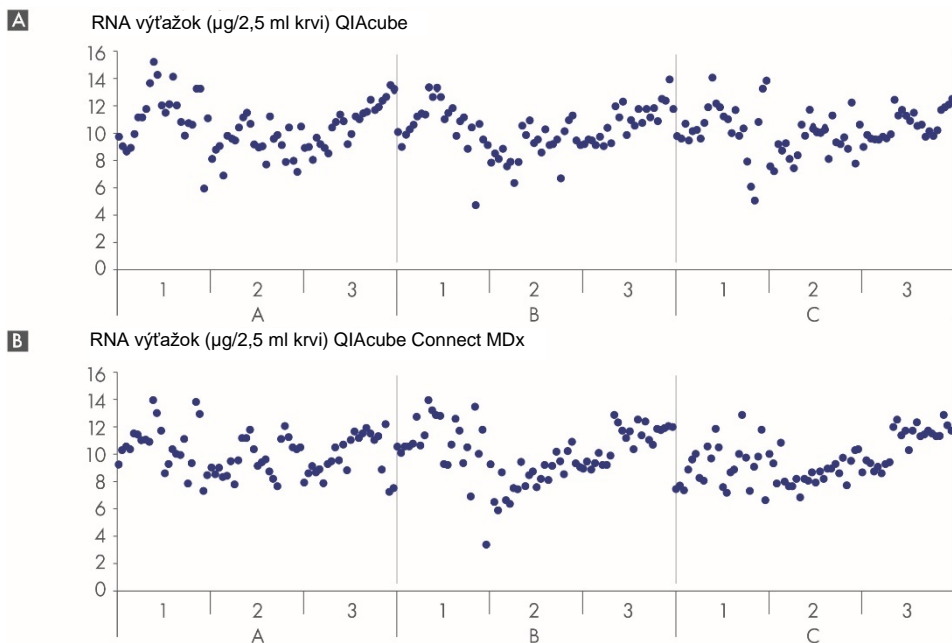
Priemerný čas prípravy vzorky (na základe údajov z 12 cyklov prípravy vzorky) je 151 minút* s výrazne kratším časom práce v porovnaní s manuálnym protokolom.

Výťažky RNA z 2,5 ml plnej krvi zdravého človeka sú $\geq 3 \mu\text{g}$ u $\geq 95 \%$ spracovaných vzoriek. Obrázok 12 (strana 34) zobrazuje výťažky RNA z celkovo 216 vzoriek pripravených pomocou automatizovaného protokolu s 3 šaržami súprav 3 tromi operátormi. Keďže sa v týchto štúdiách namiesto jednotlivých skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) použili vzorky z poolu, nereflektujú výsledky výťažok RNA očakávaný z jednotlivých vzoriek jednotlivých odberov krvi. Keďže výťažky sú veľmi závislé od donora, môžu sa jednotlivé výťažky líšiť (obrázok 12, strana 34).

Minimálne 95 % vzoriek nevykazuje žiadnu inhibíciu RT-PCR pri využití do 30 % eluátu. Pri použití automatizovaného protokolu nie je možné meraním kvantitatívnej real-time RT-PCR sekvencie transkripcí ABL1 a FOS vo vzorkách bez RNA (voda) spárovaných so vzorkami s RNA (ľudská plná krv) v tom istom cykle detegovať krížovú kontamináciu medzi vzorkami.

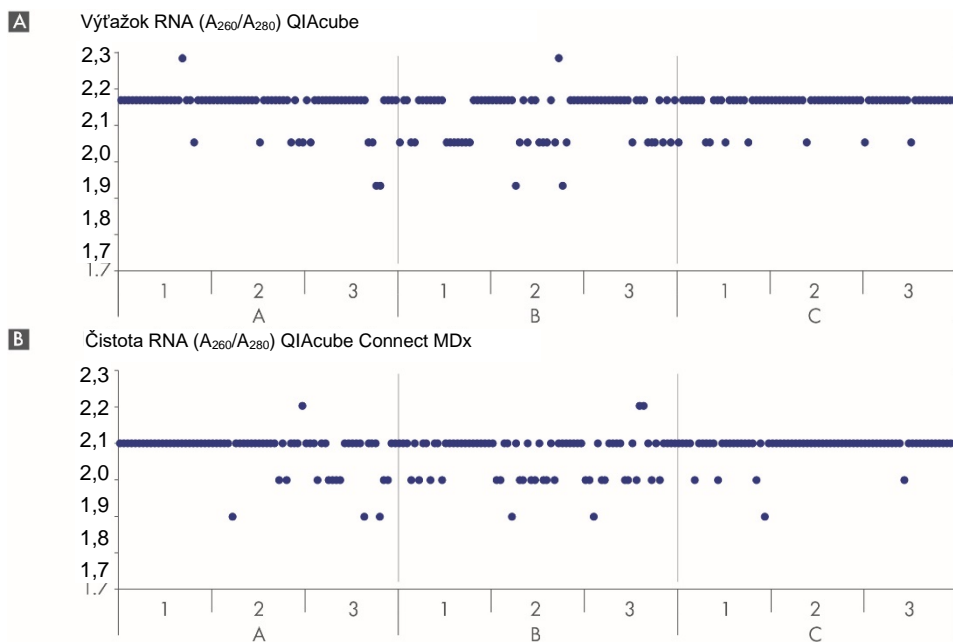
RNA izolovaná pomocou systému PAXgene Blood RNA System a automatizovaný protokol je čistý tak, ako to udáva nedostatok inhibície RT-PCR a hodnoty A_{260}/A_{280} medzi 1,8 a 2,2. Genómová DNA je prítomná v $\leq 1 \%$ (w/w) v $\geq 95 \%$ všetkých vzoriek podľa merania kvantitatívnou real-time PCR sekvencie β -aktín génu. Obrázky 13 a 14 (strany 35 a 36) zobrazujú hodnoty A_{260}/A_{280} a relatívnu genómovú DNA celkovo 216 vzoriek pripravených pomocou automatizovaného protokolu s 3 šaržami súprav 3 operátormi.

* Celkové trvanie protokolu, vrátane počiatočnej manipulácia so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugácia, premývanie pelety a resuspenzia pelety).

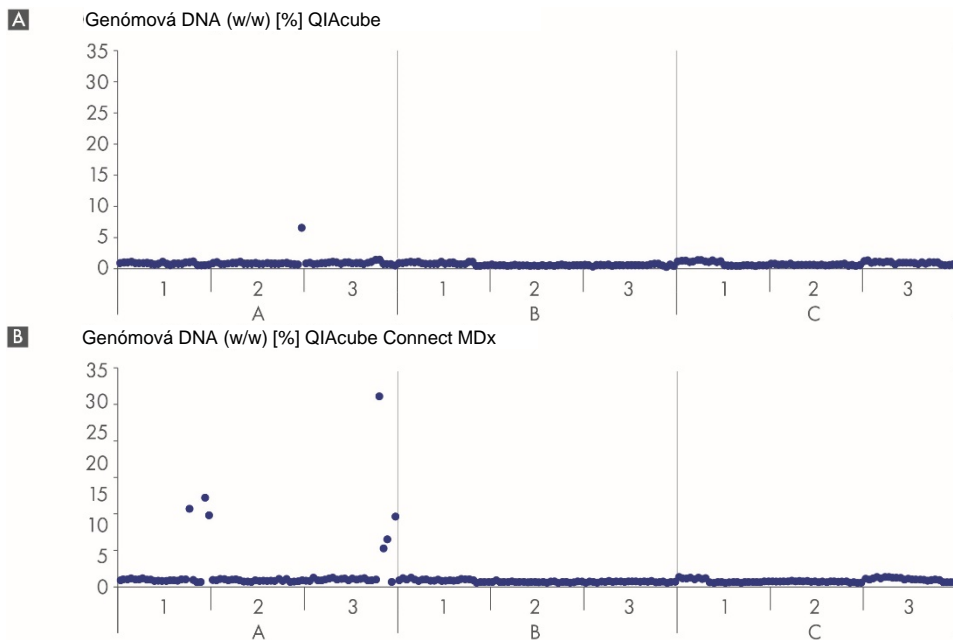


Obrázok 12. Výtazok RNA – automatizované spracovanie A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx.

Do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sa odobrali vzorky krvi od rôznych darcov. Obsah skúmaviek sa vložil do poolu 6 darcov a následne sa opakovane alikvótoval. 3 rôzni operátori (A, B, C) spracovali celkovo 216 skúmaviek (t. j. 36 na pool). Každý operátor použil na automatizovanú extrakciu pomocou viacerých prístrojov QIAcube a QIAcube Connect MDx 3 rôzne šarže (1, 2, 3) súpravy PAXgene Blood RNA Kit a spracoval vzorky v štyroch kópiách z každého poolu s 6 darcami. Výtazky RNA všetkých jednotlivých vzoriek sú zobrazené pre každú kombináciu operátora a šarže.

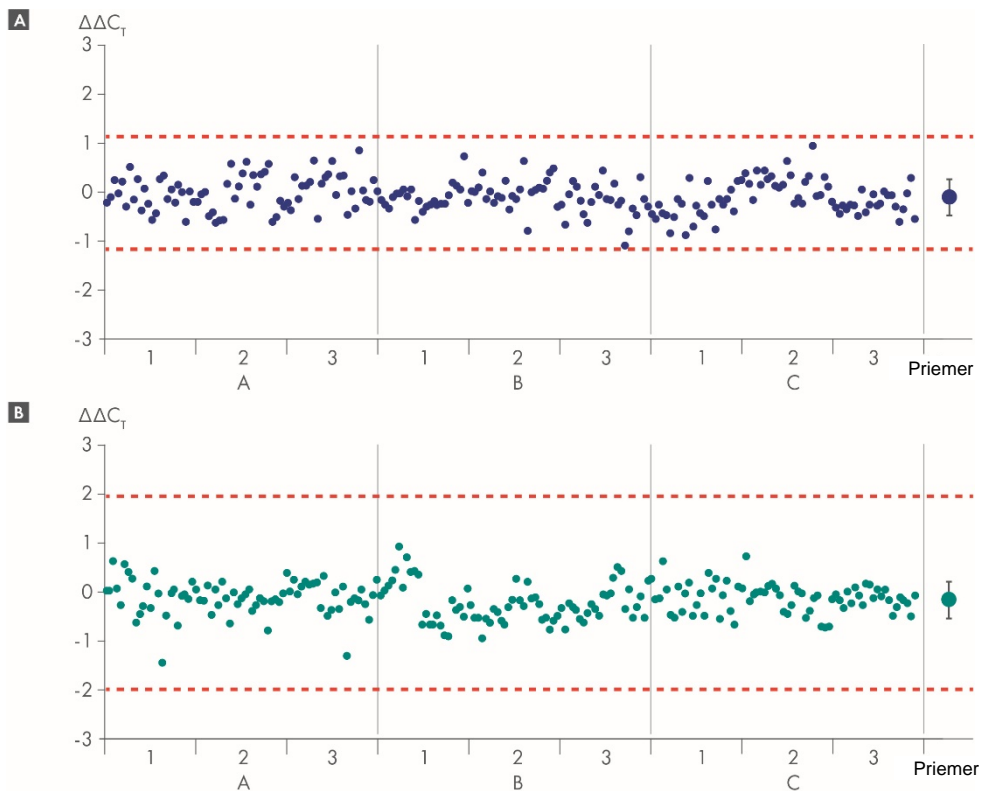


Obrázok 13. Čistota RNA (hodnoty A_{260}/A_{280}) – automatizované spracovanie. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx
 RNA počas pokusu popísaného na obrázku 12 purifikovali 3 operátori (A, B, C) pomocou 3 rôznych šarží (1, 2, 3) súpravy PAXgene Blood RNA Kit s využitím viacerých prístrojov QIAcube a QIAcube Connect MDx. Hodnoty A_{260}/A_{280} všetkých jednotlivých vzoriek sú zobrazené pre všetky kombinácie operátora a šarže.



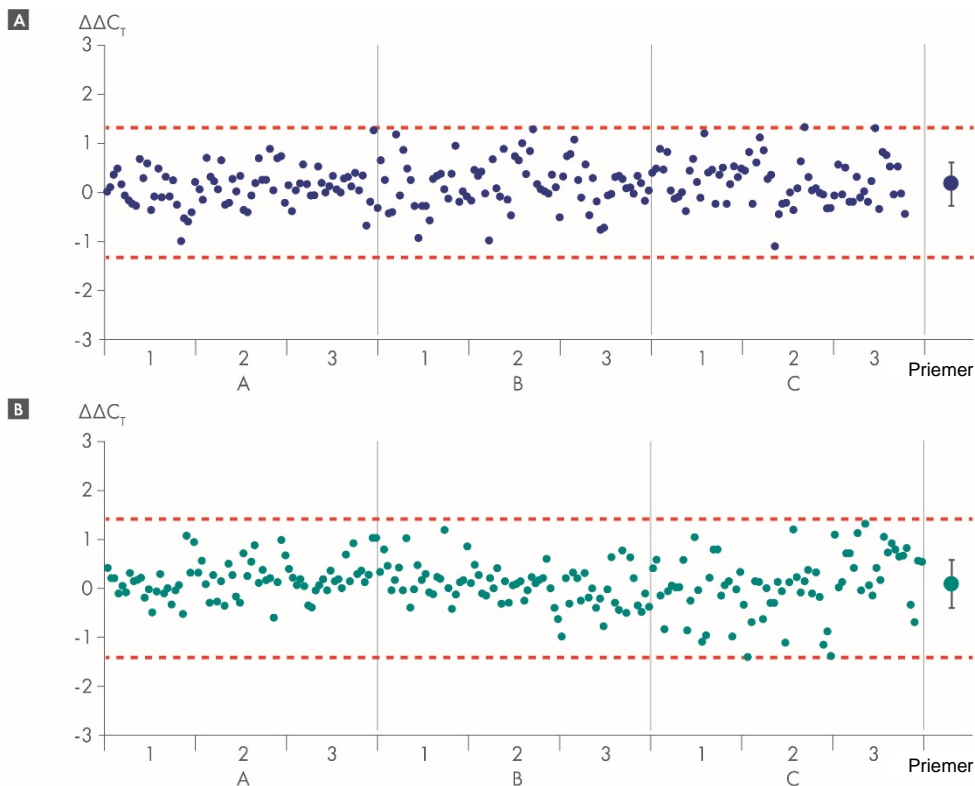
Obrázok 14. Čistota RNA (% kontaminácie genómovej DNA) – automatizované spracovanie, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. RNA počas pokusu popísaného na obrázku 12 purifikovali 3 operátori (A, B, C) pomocou 3 rôznych šarží (1, 2, 3) súpravy PAXgene Blood RNA Kit s využitím viacerých prístrojov QIAcube a QIAcube Connect MDx. Množstvá genómovej DNA (w/w) všetkých jednotlivých vzoriek sú zobrazené pre každú kombináciu operátora a šarže.

Automatizovaný protokol purifikácie RNA pomocou systému PAXgene Blood RNA System poskytuje vysoko reprodukovateľné a opakovateľne výsledky RT-PCR, ako je zobrazené na obrázku 15 a obrázku 16 (strana 37 a 38), vďaka čomu je veľmi robustný pre klinické diagnostické testy.



Obrázok 15. Reprodukovateľnosť RT-PCR – medzi automatizovanými (QIAcube) a manuálnymi protokolmi.

RNA počas pokusu popísaného na obrázku 12 purifikovali 3 operátori (A, B, C) pomocou 3 rôznych šarží (1, 2, 3) súpravy PAXgene Blood RNA Kit s využitím viacerých prístrojov QIAcube a QIAcube Connect MDx pomocou automatizovaného protokolu. Paralelne sa RNA purifikovala zo zodpovedajúcich skúmaviek s kópiami pomocou manuálneho protokolu. Relatívne úrovne transkripcie **[A]** FOS a **[B]** IL1B sa určili pomocou real-time RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Možné rozdiely úrovni transkripcie medzi RNA pripravenou zo spárovaných vzoriek krvi pomocou obidvoch extrakčných protokolov (automatizovaný a manuálny protokol) sa vy počítali pomocou metódy $\Delta\Delta C_T$. Jednotlivé hodnoty $\Delta\Delta C_T$ pre všetky páry vzoriek (4 kópie x pooly so 6 darcami x 3 šarže súpravy x 3 operátori = 216 párov pre každý gén) sa zakreslia ako bodky so strednými hodnotami (väčšie bodky) a štandardné odchýlky (čierne stĺpce) pre všetky zobrazené vzorky. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testov $\pm 3 \times$ (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; rôzne presnosti testu v porovnaní s obrázkami 1–4, 8 a 9 z dôvodu rozdielnych verzíí testu).



Obrázok 16. Reprodukateľnosť RT-PCR – medzi QIAcube a QIAcube Connect MDx pomocou automatizovaného protokolu. RNA počas pokusu popísaného na obrázku 12 purifikovali 3 operátori (A, B, C) pomocou 3 rôznych šarží (1, 2, 3) súpravy PAXgene Blood RNA Kit s využitím automatizovaného protokolu na viacerých prístrojoch QIAcube a QIAcube Connect MDx pomocou. Relatívne úrovne transkripcie [A] FOS a [B] IL1B sa určili pomocou real-time RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Možné rozdiely úrovni transkripcie medzi RNA pripravenou zo spárovaných vzoriek krvi pomocou oboch prístrojov sa vy počítali pomocou metódy $\Delta\Delta C_T$. Jednotlivé hodnoty $\Delta\Delta C_T$ pre všetky páry vzoriek (4 kópie x pooly so 6 darcami x 3 šarže súpravy x 3 operátori = 216 párov pre každý gén) sa zakreslia ako bodky so strednými hodnotami (väčšie bodky) a štandardné odchýlky (čierne stĺpce) pre všetky zobrazené vzorky. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testov $\pm 3 \times$ (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; rôzne presnosti testu v porovnaní s obrázkami 1–4, 8, 9 a 15 z dôvodu rozdielnych verzií testu).

Zariadenie a reagenty, ktoré dodá používateľ

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

Pre všetky protokoly

- Skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; kat. č. 762165)
- Etanol (96 – 100 %, stupeň čistoty p.a.)
- Pipety* (10 µl – 4 ml)
- Sterilné, špičky na pipety bez RNázy s bariérou proti aerosólu†
- Odmerný valec‡
- Odstredivka* schopná dosiahnuť rýchlosť 3000 – 5000 x g vybavená výkyvným rotorom a komorou na skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Vírivý mixér*
- L'adová triešť
- Permanentný popisovač na označenie

Manuálny protokol

- Mikrocentrifúga* s premenlivou rýchlosťou schopná dosiahnuť minimálne rýchlosť 1000 – 8000 x g s možnosťou využitia nižších a vyšších gravitačných síl (pozri kroky protokolu s podrobnosťami) vybavená rotorom na skúmavky do mikrocentrifúgy s objemom 2 ml

* Uistite sa, že pomôcky a prístroje boli skontrolované, bola na nich vykonaná údržba a pravidelne sa kalibrujú podľa odporúčaní výrobcu.

† Určite sa oboznámte s odporúčaniami k manipulácii s RNA (príloha A, strana 71).

‡ Na pridanie etanolu do koncentráту pufru Buffer BR4.

- Trepačí inkubátor* schopný inkubácie pri teplote 55 °C a 65 °C a rýchlosť trepania ≥ 400 ot/min, pričom sa nepresiahne rýchlosť 1400 ot/min (napr. Eppendorf® Thermomixer Compact alebo podobný)

Pre automatizovaný protokol (pomocou prístroja QIAcube alebo QIAcube Connect MDx)

- Nožnice

Spotrebný materiál prístrojov QIAcube:

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

Príslušenstvo prístrojov QIAcube:

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

Pre automatizovaný protokol pomocou prístroja QIAcube Connect MDx

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

Servisné balíky prístroja QIAcube Connect MDx:

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

* Uistite sa, že pomôcky a prístroje boli skontrolované, bola na nich vykonaná údržba a pravidelne sa kalibrujú podľa odporúčaní výrobcu.

† Sú tiež súčasťou balíka Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. č. 990395)

Pre automatizovaný protokol pomocou prístroja QIAcube

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

* Uistite sa, že pomôcky a prístroje boli skontrolované, bola na nich vykonaná údržba a pravidelne sa kalibrujú podľa odporúčaní výrobcu.

Dôležité poznámky

Použitie prístrojov QIAcube

Uistite sa, že ste oboznámení s ovládaním prístroja QIAcube. Prečítajte si používateľskú príručku prístroja QIAcube a všetky dodatočné informácie dodané s prístrojom QIAcube, pred začatím automatizovaných protokolov PAXgene Blood RNA venujte mimoriadnu pozornosť bezpečnostným informáciám.

Pokyny v tejto časti platia pre prístroje QIAcube Connect MDx, ako aj QIAcube, ak nie sú uvedené samostatne.

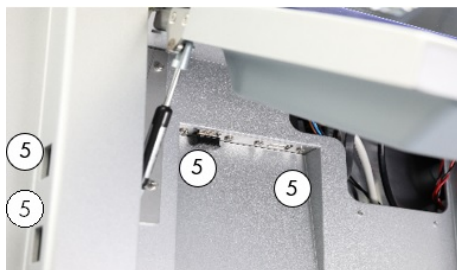
Spustenie prístrojov QIAcube

Zatvorte kryt prístroja QIAcube a zapnite ho pomocou vypínača (QIAcube Connect MDx: pozri obrázok 17, strana 43; QIAcube: obrázok 18, strana 44).

Zaznie zvukový signál a zobrazí sa obrazovka spustenia. Nástroj automaticky vykoná inicializačné testy.



Predný pohľad na prístroj QIAcube Connect MDx



Vysunutá dotyková obrazovka



Zadný pohľad na prístroj QIAcube Connect MDx



Zadný pohľad na prístroj QIAcube Connect MDx

Obrázok 17. Externé prvky prístroja QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ① Dotyková obrazovka ② Kryt ③ Zásuvka Odpad ④ Sieťový vypínač | <ul style="list-style-type: none"> ⑤ 2 USB porty na ľavej strane dotykového obrazovky;
2 USB porty za dotykovou obrazovkou
(Wi-Fi modul zapojený do 1 USB portu) ⑥ Ethernetový port RJ-45 ⑦ Zásuvka na napájací kábel ⑧ Výstup chladiaceho vzduchu |
|--|--|



Obrázok 18. Predný pohľad na prístroj QIAcube.

- | | | | |
|---|--|---|-------------------------------|
| 1 | Dotyková obrazovka | 4 | USB port za ochranným panelom |
| 2 | Kryt | 5 | Sieťový vypínač |
| 3 | Sériový port RS232 za ochranným panelom
(len na použitie servisnými odborníkmi na
nástroje QIAGEN) | 6 | Zásuvka Odpad |

Dotyková obrazovka

Prístroje QIAcube sa ovládajú pomocou dotykovej obrazovky. Dotyková obrazovka umožňuje používateľovi obsluhovať prístroj a prevedie používateľov nastavením pracovného stola. Počas spracovania vzoriek zobrazuje dotyková obrazovka stav protokolu a zostávajúci čas.



Obrázok 19. Vysunutá dotyková obrazovka prístroja QIAcube Connect MDx

Inštalácia protokolov na prístrojov QIAcube

Pred prvým cyklom prípravy RNA na prístrojoch QIAcube môže byť potrebná prvotná inštalácia protokolu. Nainštalujte protokoly „PAXgene Blood RNA Part A“ aj „PAXgene Blood RNA Part B“.

Protokoly pre prístroj QIAcube Connect MDx sú dostupné na adrese **www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources** (www.qiagen.com/MyQIAcube pre prístroj QIAcube) a je potrebné ich stiahnuť na USB kľúč dodaný s prístrojmi QIAcube. Tieto protokoly sa prenesú do prístroja cez USB port.

USB port (QIAcube Connect MDx: umiestnený na ľavej strane dotykovej obrazovky, pozri obrázok 17, strana 43; QIAcube: za ochranným panelom, pozri obrázok 18, strana 44) umožňuje pripojiť do prístrojov QIAcube USB kľúč dodaný spolu s týmito prístrojmi. Dátové súbory ako napríklad súbory denníka alebo súbory správ je možné tiež prenášať cez USB port z prístrojov QIAcube na USB kľúč.



USB port je určený len na použitie s USB kľúčom dodaným spoločnosťou QIAGEN. K tomuto portu nepripájajte iné zariadenia.



USB kľúč nevyberajte počas sťahovania protokolov alebo prenosu dátových súborov alebo počas chodu protokolu.




Ďalšie podrobnosti o procese nahrávania protokolu do prístrojov QIAcube nájdete v príslušnej príručke používaného prístroja.

Naloženie prístrojov QIAcube

Aby ste ušetrili čas, môže naloženie prebehnúť počas jedného alebo oboch krokov centrifugácie, ktoré trvajú 10 minút (kroky 3 a 5) v „Protokol: Automatizovaná purifikácia celkovej RNA z ľudskej plnej krvi odobranej do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)“, strana 65.

Reagent bottles

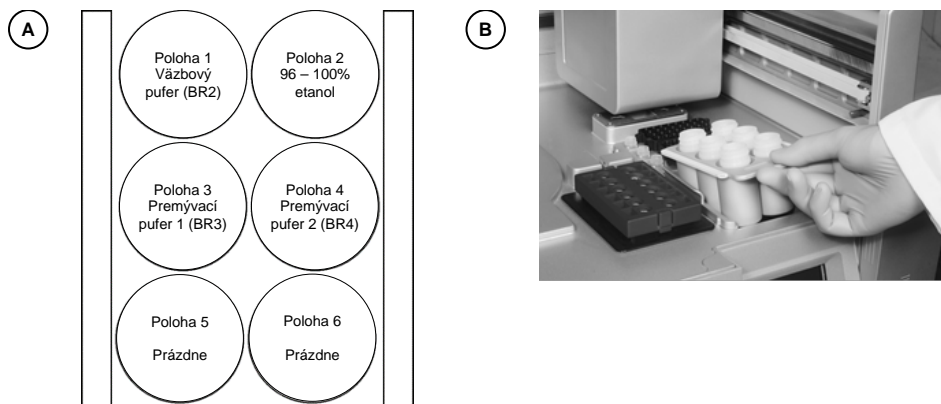
Pred každým cyklom na prístroji QIAcube opatrne naplňte 4 fľašky na reagentie reagentiami uvedenými v tabuľke 3 (strana 47) po maximálnu značku hladiny alebo, ak to nie je možné, po hladinu, ktorú umožňujú objemy pufrom dodaných v súprave PAXgene Blood RNA Kit. Fľaštičky a uzávery označte názvom pufru a naplnené fľašky na reagentia vložte na príslušné miesta v stojane na fľašky na reagentie. Stojan položte na pracovný stôl prístroja QIAcube podľa obrázka (obrázky 20 – 22, strany 48 – 50).

-  Dodaný objem pufru Buffer BR2 nie je dostatočný na naplnenie fľašky na reagentie po značku. Pufre Buffer BR3 a BR4 nemusia naplniť fľašku po značku hladiny po spracovaní niekoľkých vzoriek v predchádzajúcich cykloch.
-  Dávajte pozor, aby ste z fľašiek odobrali uzávery predtým, ako ich položíte na pracovný stôl.
-  Objemy pufrů v súprave PAXgene Blood RNA Kit (50) postačujú na maximálne 7 cyklov prípravy RNA na prístroji QIAcube s počtom vzoriek 2 až 12 na jeden cyklus. Vo všeobecnosti by ste nemali spúšťať cykly s nízkym počtom vzoriek, aby ste dokázali spracovať celkovo 50 vzoriek na súpravu v maximálne 7 cykloch prípravy RNA. Viac ako 7 cyklov prípravy RNA môže viesť k nedostatočnému objemu pufrů na spracovanie posledných vzoriek.

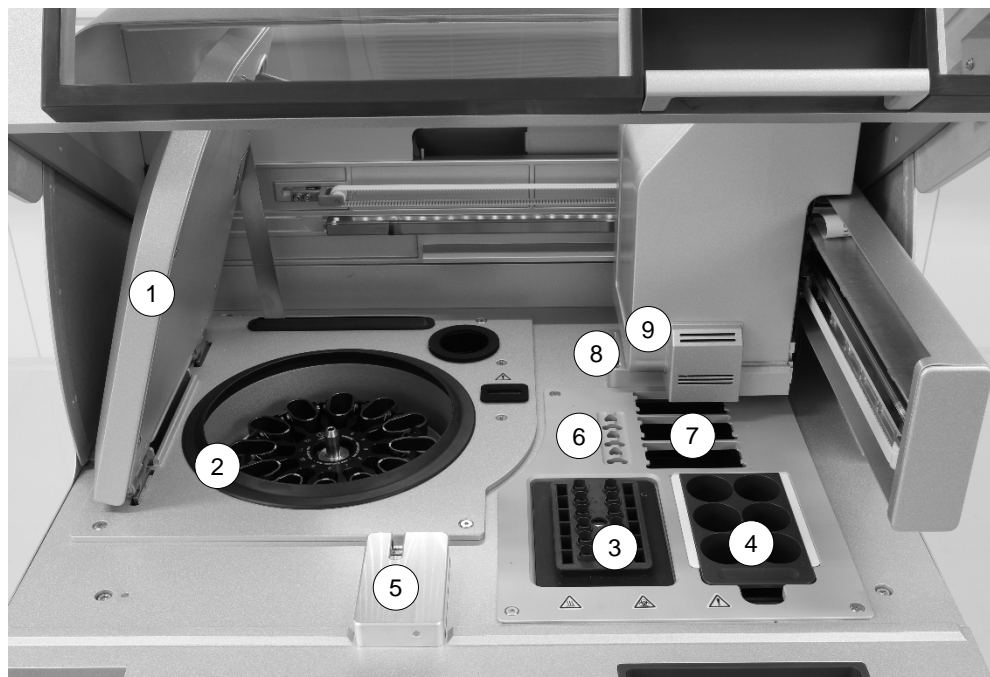
Tabuľka 3. Polohy v stojane na fľašky na reagentie

Poloha	Reagentia
1	Premývací pufer (BR2)
2	96 – 100 % etanol
3	Premývací pufer 1 (BR3)
4	Premývací pufer 2 (BR4)*
5	– (ponechajte prázdne)
6	– (ponechajte prázdne)

* Premývací pufer 2 (BR4) sa dodáva ako koncentrát. Pred prvým použitím pridajte 4 objemy etanolu (stupeň čistoty 96 – 100 % p.a.) ako je uvedené na fľaši, aby ste dosiahli pracovný roztok.

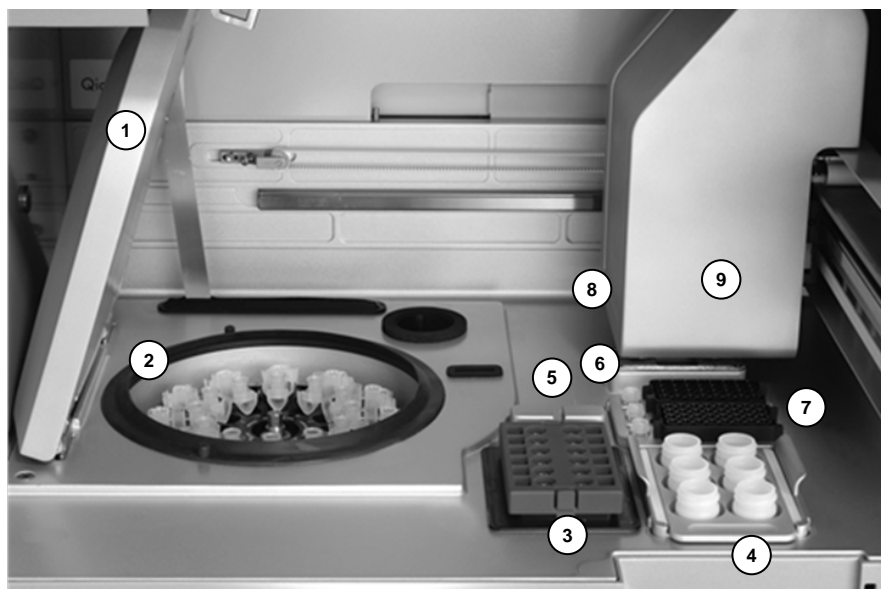


Obrázok 20. Naloženie stojana na fľašky na reagentie. [A] Schéma polôh a obsahu fliaš v stojane na fľašky na reagentie. **[B]** Naloženie stojanu do prístroja QIAcube (prístroj QIAcube slúži ako príklad).



Obrázok 21. Vnútrotný pohľad na prístroj QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|---|
| <p>1 Veko odstredivky</p> <p>2 Odstredivka</p> <p>3 Trepačka</p> <p>4 Stoja na fľašky na reagencie</p> <p>5 Snímač špičky a zámok krytu</p> | <p>6 Sloty na skúmavky do mikrocentrifúgy</p> <p>7 3 sloty na stojany na špičky</p> <p>8 Sloty na likvidáciu špičiek a kolón</p> <p>9 Robotické rameno (zahŕňa 1 kanálový pipetovač, unášač, ultrazvukový a optický senzor a UV LED svetlo)</p> |
|---|---|



Obrázok 22. Vnútrotný pohľad na prístroj QIAcube.

- | | |
|---|---|
| <p>1 Veko odstredivky</p> <p>2 Odstredivka</p> <p>3 Trepačka</p> <p>4 Stoja na fľašky na reagentie</p> <p>5 Snímač špičky</p> | <p>6 Sloty na skúmavky do mikrocentrifúgy</p> <p>7 Stojany na špičky</p> <p>8 Sloty na likvidáciu špičiek a kolón</p> <p>9 Robotické rameno</p> |
|---|---|

Centrifugačné kolóny (PRC, PSC), skúmavky do mikrocentrifúgy (MCT) a plastové pomôcky prístroja QIAcube

Do prístroja QIAcube vložte 2 stojany na špičky naplnené špičkami filtra 1000 μ l (pozri obrázok 21 a 22, strany 49 a 50). Stojany v prípade potreby znova naplňte špičkami.

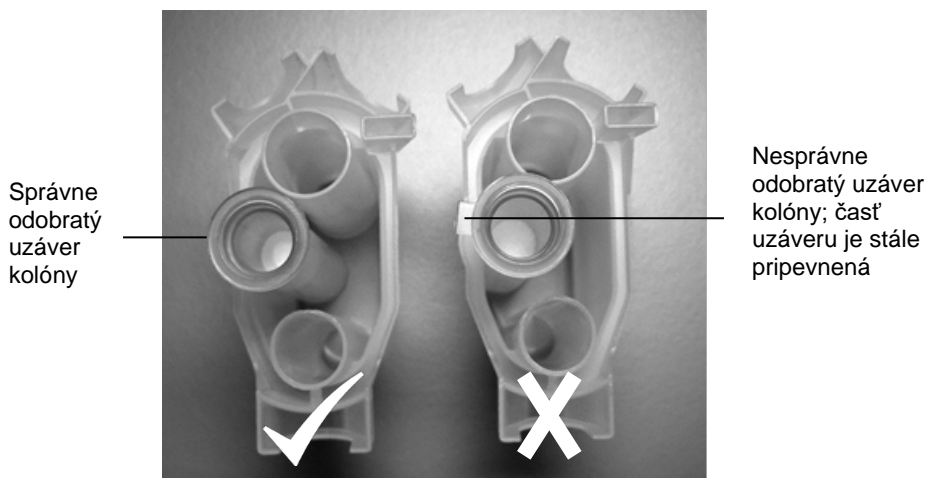


Používajte len filtračné špičky s objemom 1000 μ l navrhnuté na použitie s prístrojmi QIAcube.

Adaptéri rotora a skúmavky do mikrocentrifúgy (MCT) označte pri každom použití vzorky pomocou permanentného označovača. Otvorte centrifugačné kolóny PAXgene Shredder (PSC), ktoré budete používať, a pomocou nožníc úplne odstrihnite uzávery (pozri obrázok 23, strana 51).



Na správnu obsluhu robotického unášača prístroja QIAcube úplne odstráňte (odrežte) uzávery a všetky plastové časti, ktoré spájajú uzáver s centrifugačnými kolónami PAXgene Shredder (PSC; pozri obrázok 23). V opačnom prípade nedokáže robotický unášač riadne uchytiť centrifugačné kolóny (PSC, PRC).



Obrázok 23. Naloženie centrifugačnej kolóny PAXgene Shredder (PSC). Centrifugačná kolóna PAXgene Shredder (PSC) sa naloží do stredy adaptéra rotora. Pred naložením kolóny odrežte uzáver.

Vložte centrifugačnú kolónu PAXgene RNA (PRC) centrifugačnú kolónu PAXgene Shredder (PSC, bez uzáveru, pozri obrázok 23, strana 51) a označenú skúmavku do mikrocentrifúgy na príslušné miesta v každom označenom adaptéri rotora podľa obrázku v tabuľke 4 a obrázku 24.

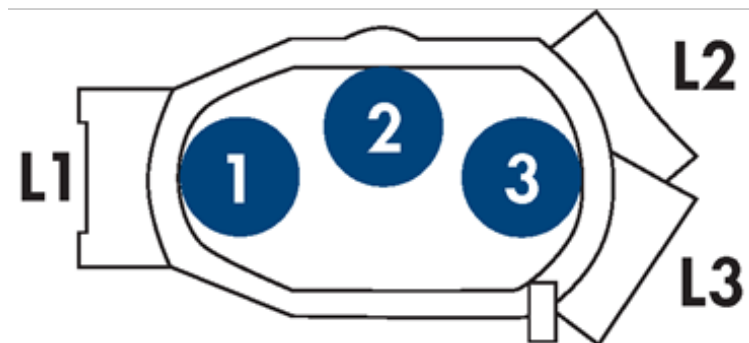


Uistite sa, že uzávery centrifugačnej kolóny (PRC) a skúmavky do mikrocentrifúgy (MCT) sa zatlačia úplne nadol na dno slotov na okraji adaptéra rotora, v opačnom prípade dôjde k prasknutiu uzáveru počas centrifugácie.

Tabuľka 4. Laboratórne vybavenie v adaptéri rotora

Poloha	Reagencia	Poloha uzáveru
1	Centrifugačná kolóna PAXgene RNA (červená, PRC)	L1
2	Centrifugačná kolóna PAXgene RNA Spin Column (svetlofialové (PSC)) (pred umiestnením do adaptéra rotora odrežte veko)	–
3	Skúmavka do mikrocentrifúgy (MCT)*	L3

* Použite skúmavky do mikrocentrifúgy (MCT; 1,5 ml), ktoré sú súčasťou súpravy PAXgene Blood RNA Kit.



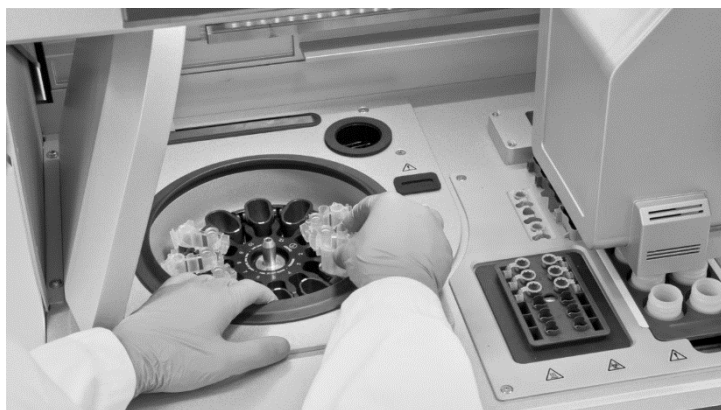
Obrázok 24. Polohy v adaptéri rotora. Adaptér rotora má tri polohy skúmaviek (1 – 3) a polohy uzáverov (L1 – L3).

Naloženie odstredivky

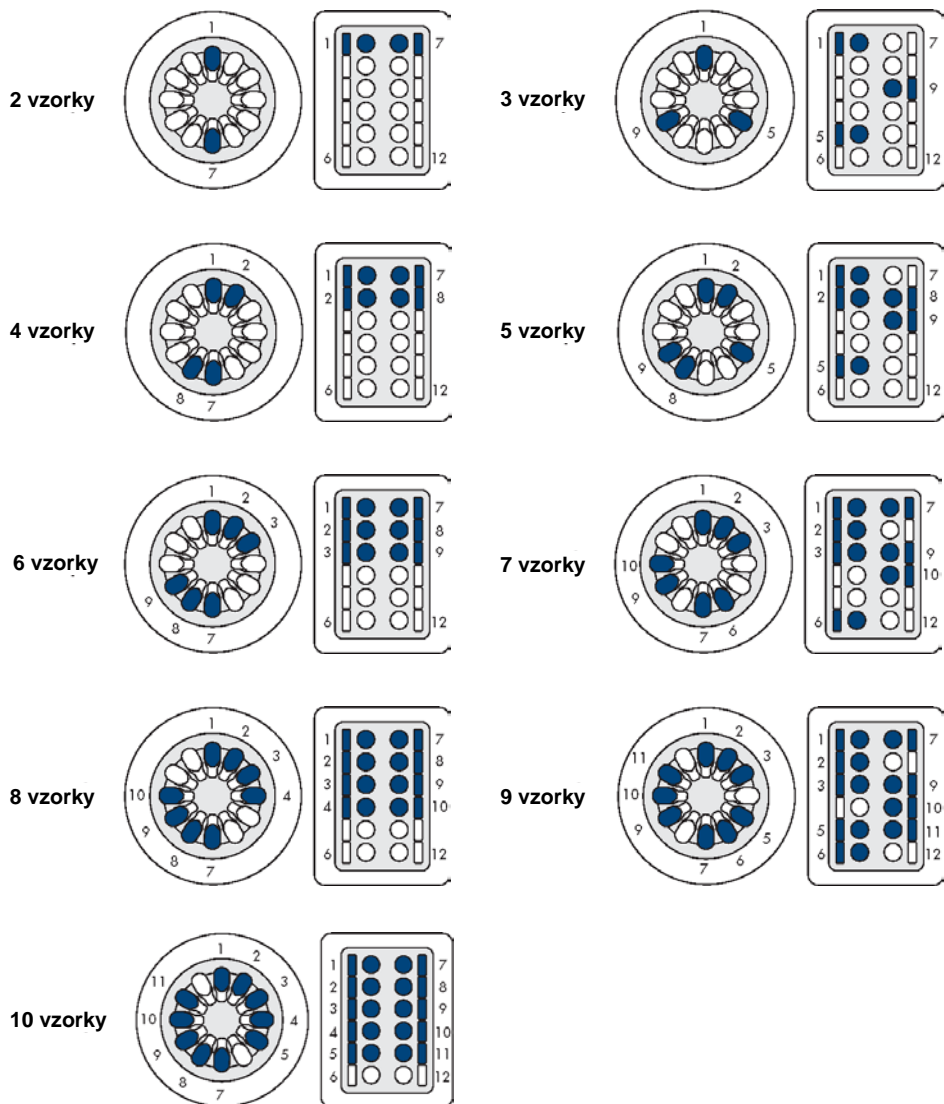
Zmontovaný adaptér rotora vložte do rotorov odstredivky podľa obrázku 25 nižšie.



Ak spracúvate menej ako 12 vzoriek, uistite sa, že rotor odstredivky naložíte tak, aby bol radiálne vyvážený (pozri obrázok 26, strana 54). Všetky rotory centrifúgy sa musia namontovať pred spustením cyklu protokolu, dokonca aj keď sa spracuje menej ako 12 vzoriek. Nie je možné spracovať jedinú (jednu) vzorku alebo 11 vzoriek.



Obrázok 25. Naloženie centrifúgy na prístrojoch QIAcube, Zmontované adaptéry rotora vložte do rotorov centrifúgy (QIAcube Connect MDx zobrazený na príklade).



Obrázok 26. Naloženie odstredivky a trepačky. Sú zobrazené polohy v centrifúge a trepačke na spracovanie od dvoch (2) do desiatich (10) vzoriek. Nie je možné spracovať jednu (1) vzorku alebo 11 vzoriek. Na spracovanie 12 vzoriek musia byť všetky pozície v centrifúge a trepačke naložené (obrázok nie je zobrazený).

Skúmavky na spracovanie (PT)

Vyberte všetky skúmavky na spracovanie (PT), ktoré zostali v slotoch na tieto skúmavky z predchádzajúcich cyklov (QIAcube Connect MDx: pozri obrázok 21, strana 49, QIAcube: pozri obrázok 22, strana 50). Naplňte 3 skúmavky na spracovanie (PT) množstvom reagensíí, ktoré je uvedené v tabuľke 5 podľa počtu vzoriek v cykle.

Na prípravu inkubačnej zmesi DNázy I napipetujte uvedený objem digestívneho pufru (RDD) DNA do skúmavky na spracovanie (PT) a pridajte uvedený objem zásobného roztoku DNázy I (RNFD). Jemne zmiešajte pipetovaním celej zmesi nahor a nadol 3-krát pomocou špičky pipety s objemom 1000 µl.

Použite skúmavky na spracovanie (PT) s objemom 2 ml, ktoré sú súčasťou súpravy PAXgene Blood RNA Kit. Skúmavky viditeľne označte názvom reagensie a umiestnite ich do príslušnej polohy v slotoch na skúmavky do mikrocetrifúgy podľa tabuľky 6 (strana 56).



DNáza I (RNFD) je mimoriadne citlivá na fyzickú denaturáciu. Zmiešajte len pipetovaním, použite špičky pipety so širokým otvorom, aby ste znížili deformáciu bočným tlakom. Nemiešajte vo vortexe.



Napipetujte len potrebný objem podľa tabuľky 5 nižšie.

Tabuľka 5. Objem reagentií potrebný v skúmavkách na spracovanie do slotov na skúmavku do mikrocentrifúgy.

Počet vzoriek	Objem reagentie pre uvedený počet vzoriek (µl)		
	Proteináza K (PK)	Inkubačná zmes DNázy I	Elučný pufer (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

Tabuľka 6. Sloty na skúmavky do mikrocentrifúgy

	Poloha		
	A	B	C
Obsah	Proteináza K	Inkubačná zmes DNázy I	Elučný pufer (BR5)
Nádoba	Skúmavka na spracovanie (PT)*	Skúmavka na spracovanie (PT)*	Skúmavka na spracovanie (PT)*

* Použite skúmavky na spracovanie s objemom 2 ml, ktoré sú súčasťou súpravy PAXgene Blood RNA Kit.

Protokol: Manuálna purifikácia celkovej RNA z ľudskej plnej krvi odobranej do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Dôležité body pred začatím činnosti

- Skontrolujte, či je balenie súpravy nedotknuté a nepoškodené a či nedošlo k úniku pufrov. Ak je súprava poškodená, nepoužívajte ju.
- Pri použití pipety zaistíte, aby bola nastavená na správny objem a aby sa kvapalina dôkladne a úplne nasala a nadávkovala.
- Aby ste predišli prenosu vzoriek do nesprávnej skúmavky alebo centrifugačnej kolóny, skontrolujte, či sú všetky skúmavky a kolóny správne označené pomocou permanentného označovača. Uzáver a telo každej skúmavky označte (PT, MCT). V prípade centrifugačných kolón označte telo skúmavky na spracovanie (PT). Po prenesení kvapaliny zatvorte každú skúmavku alebo centrifugačnú kolónu.
- Úniky vzoriek a pufrov počas procesu môžu znížiť výťažok a čistotu RNA.
- Ak nie je uvedené inak, mali by sa všetky kroky tohto protokolu, vrátane centrifugácie, vykonávať pri izbovej teplote (15 – 25 °C).

Z dôvodu senzitivity amplifikačných technológií nukleovej kyseliny sú pri manipulácii potrebné tieto preventívne opatrenia na zabránenie krížovej kontaminácii:

- Opatrne napipetujte vzorku do centrifugačnej kolóny (PRC, PSC) bez zmáčania okraja kolóny.
- Medzi prenosmi kvapaliny vždy vymeňte špičky pipety. Použite špičky na pipetu s bariérou proti aerosólu.
- Nedotýkajte sa membrány centrifugačnej kolóny (PRC, PSC) špičkou pipety.

- Po vortexovaní alebo ohriatí skúmavky do mikrocentrifúgy (MCT) ju nakrátko centrifugujte, aby ste odstránili kvapky z znútra uzáveru.
- Počas celého procesu noste rukavice. V prípade kontaktu medzi rukavicami a vzorkou ich ihneď vymeňte.
- Pred vložением do mikrocentrifúgy zatvorte centrifugačnú kolónu (PRC, PSC). Odstredenie vykonajte podľa popisu procesu.
- Naraz otvorte len jednu centrifugačnú kolónu (PRC, PSC) a dávajte pozor, aby ste nevytvorili aerosóly.
- Na efektívne paralelné spracovanie viacerých vzoriek naplňte stojan skúmavkami na spracovanie (PT), do ktorých sa môžu centrifugačné kolóny (PRC, PSC) preniesť po centrifugácii. Použité skúmavky na spracovanie (PT) obsahujúce pretekajúcu tekutinu vyhodte a priamo do mikrocentrifúgy vložte novú skúmavku na spracovanie (PT) obsahujúce centrifugačné kolóny (PRC, PSC).

Veci, ktoré je potrebné vykonať pred začatím

- Krv sa musí odobrať do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) podľa pokynov v *príručke pre skúmavku PAXgene Blood RNA Tube*. V prípade potreby pozri prílohu C (strana 78) s odporúčaniami k manipulácii so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubujte minimálne 2 hodiny pri izbovej teplote po odbere krvi, aby ste zaistili úplnú lýzu krvných buniek. Inkubácie skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) cez noc môže zvýšiť výťažky. Ak sa skúmavka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) po odbere krvi skladuje pri teplote 2 – 8 °C, -20 °C alebo -70 °C, najprv vyrovnajte jej teplotu na izbovú teplotu a potom ju uskladnite pri izbovej teplote na 2 hodiny pred začatím procesu.
- Prečítajte si bezpečnostné informácie na strane 10.
- Prečítajte si odporúčania k manipulácii s RNA (príloha A, strana 75).
- Zabezpečte, aby boli nástroje, ako napríklad pipety a trepací inkubátor, skontrolované a pravidelne kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.

- Trepací inkubátor je potrebný v kroku 5 a 20. Teplotu trepacieho inkubátora nastavte na 55 °C.
- Väzbový pufer (BR2) môže pri skladovaní tvoriť precipitát. V prípade potreby ho ohrejte na 37 °C, aby sa rozpustil.
- Väzbový pufer 2 (BR4) sa dodáva ako koncentrát. Pred prvým použitím pridajte 4 objemy etanolu (stupeň čistoty 96 – 100 % p.a.) ako je uvedené na fľaši, aby ste dosiahli pracovný roztok.
- Ak sa používa súprava DNázy bez RNázy po prvýkrát, pripravte zásobný roztok DNázy. Rozpustíte pevnú DNázu I (RNFD; 1500 jednotiek Kunitz)* v 550 µl resuspenzného pufru (DRB) DNázy dodaného so súpravou. Dávajte pozor, aby pri otváraní liekovky nedošlo k strane DNázy I (RNFD). DNázu I (RNFD) pripravenú pomocou vody nemiešajte vo vortexe. DNáza I je mimoriadne citlivá na fyzickú denaturáciu. Miešanie je možné len jemným otáčaním liekovky.
- Aktuálne údaje ukazujú, že DNáza I (RNFD) pripravená pomocou vody sa môže skladovať pri teplote 2 – 8 °C až na 6 týždňov. Pri dlhodobom skladovaní DNázy I (RNFD) vylejte zásobný roztok zo sklenenej liekovky, rozdeľte ho na jednotlivé alikvóty (použite skúmavky do mikrocentrifúgy [MCT] s objemom 1,5 ml dodané spolu so súpravou; skúmavky by mali vystačiť na 5 alikvót) a uskladnite ich pri teplote -20 °C na maximálne 9 mesiacov. Rozmrazené alikvóty sa môžu skladovať pri teplote 2 – 8 °C až na 6 týždňov. Alikvóty po rozmrazení znovu nezmrazujte.
- Pri príprave DNázy I (RNFD) pomocou vody a jej alikvótovaní postupujte podľa odporúčaní na manipuláciu s RNA (príloha A, strana 75).

* Jednotky Kunitz sú bežne používané jednotky na meranie DNázy I, ktoré sú definované ako množstvo DNázy I, ktoré spôsobí zvýšenie A_{260} v množstve 0,001 na minútu na mililiter pri teplote 25 °C, pH 5,0, s vysoko polymerizovanou DNA ako substrát (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 a 363).

Postup

1. Skúmavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) centrifúgujte na 10 minút pri rýchlosti 3000 – 5000 x g pomocou výkyvného rotora.



Zaistite, aby sa vzorka krvi inkubovala v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT) na minimálne 2 hodiny pri izbovej teplote (15 - 25 °C), aby sa dosiahla úplná lýza krvných buniek.



Rotor musí zahŕňať adaptéri na skúmavky s okrúhlym dnom. Ak sa používa iný typ adaptéra na skúmavky, môže dôjsť počas centrifugácie k ich prasknutiu.

2. Supernatant odstráňte preliatím alebo pipetovaním. Do pelety pridajte 4 ml vody bez RNázy (RNFW) a skúmavku zatvorte čistým sekundárnym uzáverom BD Hemogard (dodáva sa so súpravou).

Ak je supernatant preliaty, dávajte pozor, aby ste peletu nenarušili a okraj skúmavky osušte čistou papierovou utierkou.

3. Peletu premiešajte vo vortexe, kým sa viditeľne nerozpustí a centrifúgujte na 10 minút pri rýchlosti 3000 – 5000 x g pomocou výkyvného rotora. Celý supernatant vylejte a zlikvidujte.

Malý debris, ktorý zostane v supernatante po vortexovaní ale pred centrifugáciou nemá na proces žiadny vplyv.



Nedokonalé vylíatie supernatantu spomalí lýzu a rozriedi lyzát, a preto má vplyv na podmienky naviazania RNA na membránu PAXgene.

4. Pridajte 350 µl resuspenzného pufru (BR1) a vortexujte, kým sa peleta viditeľne nerozpustí.
5. Vzorku napipetujte do skúmavka do mikrocentrifúgy (MCT) s objemom 1,5 ml. Pridajte 300 µl väzbového pufru (BR2) a 40 µl proteinázy K (PK). Zamiešajte vortexovaním na 5 sekúnd a inkubujte na 10 minút pri teplote 55 °C pomocou trepacieho inkubátora pri rýchlosti 400 – 1400 ot/min. Po inkubácii nastavte teplotu trepacieho inkubátora na 65 °C (pre krok 20).



Nemiešajte väzbový pufer (BR2) a proteinázu K (PK) dokopy pred ich pridaním do vzorky.

6. Lyzát napipetujte priamo do centrifugačnej kolóny PAXgene Shredder (PSC, fialová) umiestnenej v skúmavke na spracovanie (PT) s objemom 2 ml a centrifugujte na 3 minúty na maximálnej rýchlosti (ale nesmie presiahnuť rýchlosť 20 000 x g).



Opatrne napipetujte lyzát do centrifugačnej kolóny (PSC) a vizuálne skontrolujte, či sa úplne preniesol do kolóny (PSC).

Aby ste predišli poškodeniu kolón (PSC) a skúmaviek (PT), neprekračujte rýchlosť 20 000 x g.



Niektoré vzorky môžu pretiecť cez centrifugačnú kolónu PAXgene Shredder (PSC) bez centrifugácie. To je spôsobené nízkou viskozitou niektorých vzoriek a nemalo by sa to brať ako znak zlyhania produktu.

7. Opatrne preneste celý supernatant pretekajúcej frakcie do čistej skúmavky do mikrocentrifúgy (MCT) s objemom 1,5 ml bez narušenia pelety v skúmavke na spracovanie.
8. Pridajte 350 µl etanolu (96 – 100 %, stupeň čistoty p.a.). Zamiešajte vortexovaním a krátko centrifugujte (1 – 2 sekundy pri rýchlosti 500 – 1000 x g), aby ste z vnútra uzáveru skúmavky odstránili kvapky.



Dĺžka centrifugácie nesmie presiahnuť 1 – 2 sekundy, pretože inak môže dôjsť ku granulácii nukleových kyselín a zníženým výťažkom celkovej RNA.

9. Napipetujte 700 µl vzorky do centrifugačnej kolóny PAXgene RNA (PRC, červená) umiestnenej v skúmavke na spracovanie (PT) s objemom 2 ml a centrifugujte na 1 minútu na rýchlosti 8000 – 20 000 x g. Centrifugačnú kolónu (PRC) vložte do novej skúmavky na spracovanie (PT) s objemom 2 ml a starú skúmavku na spracovanie (PT) obsahujúce pretekajúcu vzorku zlikvidujte.
10. Napipetujte zvyšok vzorky do centrifugačnej kolóny PAXgene RNA (PRC) a centrifugujte na 1 minútu na rýchlosti 8000 – 20 000 x g. Centrifugačnú kolónu (PRC) vložte do novej skúmavky na spracovanie (PT) s objemom 2 ml a starú skúmavku na spracovanie (PT) obsahujúce pretekajúcu vzorku zlikvidujte.



Opatrne napipetujte vzorku do centrifugačnej kolóny (PRC) a vizuálne skontrolujte, či sa úplne preniesla do centrifugačnej kolóny (PRC).

11. Napipetujte 350 µl premývacieho pufru 1 (BR3) do centrifugačnej kolóny PAXgene RNA (PRC). Centrifúgujte na 1 minútu na rýchlosti 8000 – 20 000 x g. Centrifugačnú kolónu (PRC) vložte do novej skúmavky na spracovanie (PT) s objemom 2 ml a starú skúmavku na spracovanie (PT) obsahujúce pretekajúcu vzorku zlikvidujte.
12. Pridajte 10 µl zásobného roztoku DNázy I (RNFD) do 70 µl digestívneho pufru (RDD) DNA v skúmavke do mikrocentrifúgy (MCT) s objemom 1,5 ml. Jemne zamiešajte trasením skúmavky a krátko centrifúgujte, aby sa zo strán skúmavky nahromadila zvyšková kvapalina.

Ak spracúvate napríklad 10 vzoriek, pridajte 100 µl zásobného roztoku DNázy I (RNFD) do 700 µl digestívneho pufru (RDD) DNA. Použite skúmavky do mikrocentrifúgy (MCT) s objemom 1,5 ml dodané so súpravou.



DNáza I je mimoriadne citlivá na fyzickú denaturáciu. Miešanie je možné len jemným trepaním skúmavky. Nemiešajte vo vortexe.

13. Napipetujte inkubačnú zmes (80 µl) DNázy I (RNFD) priamo do membrány centrifugačnej kolóny PAXgene RNA (PRC) a umiestnite ju do stolnej centrifúgy (20 – 30 °C) na 15 minút.



Zaistite, aby sa inkubačná zmes DNázy I (RNFD) umiestnila priamo na membránu. Digescia DNázy nebude úplná, ak sa časť zmesi naniesie a zostane na stenách alebo O-krúžku centrifugačnej kolóny (PCR).

14. Napipetujte 350 µl premývacieho pufru 1 (BR3) do centrifugačnej kolóny PAXgene RNA (PRC) a centrifúgujte na 1 minútu na rýchlosti 8000 – 20 000 x g. Centrifugačnú kolónu (PRC) vložte do novej skúmavky na spracovanie (PT) s objemom 2 ml a starú skúmavku na spracovanie (PT) obsahujúce pretekajúcu vzorku zlikvidujte.
15. Napipetujte 500 µl premývacieho pufru 2 (BR4) do centrifugačnej kolóny PAXgene RNA (PRC) a centrifúgujte na 1 minútu na rýchlosti 8000 – 20 000 x g. Centrifugačnú kolónu (PRC) vložte do novej skúmavky na spracovanie (PT) s objemom 2 ml a starú skúmavku na spracovanie (PT) obsahujúce pretekajúcu vzorku zlikvidujte.



Premývací pufer 2 (BR4) sa dodáva ako koncentrát. Zaistite, aby sa etanol pridal do premývacieho pufru 2 (BR4) pred použitím (pozri „Veci, ktoré je potrebné vykonať pred začatím“, strana 58).

16. Pridajte ďalších 500 µl premývacieho pufru 2 (BR4) do centrifugačnej kolóny PAXgene RNA (PRC). Centrifugujte na 3 minúty pri rýchlosti 8000 – 20 000 x g.
17. Skúmavku na spracovanie (PT) obsahujúce pretekajúcu tekutinu zlikvidujte a centrifugačnú kolónu PAXgene RNA (PRC) vložte do novej skúmavky na spracovanie (PT) s objemom 2 ml. Centrifugujte na 1 minútu pri rýchlosti 8000 – 20 000 x g.
18. Skúmavku na spracovanie (PT) obsahujúce pretekajúcu tekutinu zlikvidujte. Centrifugačnú kolónu PAXgene RNA (PRC) vložte do skúmavky do mikrocentrifúgy (MCT) s objemom 1,5 ml a napipetujte 40 µl elučného pufru (BR5) priamo na membránu centrifugačnej kolóny PAXgene RNA (PRC). Centrifugujte 1 minútu pri rýchlosti 8000 – 20 000 x g, aby ste dosiahli elúciu RNA.

Je dôležité celú membránu navlhčiť elučným pufrom (BR5), aby sa dosiahla maximálna účinnosť elúcie.

19. Elučný krok (krok 18) zopakujte podľa popisu pomocou 40 µl elučného pufru (BR5) a rovnakej skúmavky do mikrocentrifúgy (MCT).
20. Eluát inkubujte na 5 minút pri teplote 65 °C v trepacom inkubátora (z kroku 5) bez trepania. Po inkubácii ho okamžite schladte na ľade.
Táto inkubácia pri teplote 65 °C denaturuje RNA pre následné aplikácie. Neprekračujte inkubačnú dobu ani teplotu.
21. Ak sa vzorky RNA nepoužijú hneď, uskladnite ich pri teplote -20 °C alebo -70 °C.

Keďže RNA zostáva po opakovanom zmrazení a rozmrazení denaturovaná, nie je potrebné opakovať inkubáciu pri teplote 65 °C. Ak používate vzorky RNA v diagnostickom teste, postupujte podľa pokynov od výrobcu.

Na presnú kvantifikáciu RNA podľa absorbancie pri 260 nm odporúčame vzorky zriediť v pufrí 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Riedenie vzorky vo vode bez RNázy môže viesť k nesprávne nízkym hodnotám.

Spektrofotometer vynulujte pomocou prázdnej vzorky, ktorá sa skladá z rovnakého pomeru elučného pufru (BR5) a pufru Tris-HCl ako vo vzorkách, ktoré sa majú merať. Elučný pufer (BR5) má vysokú absorbanciu na hodnote 220 nm, ktorá môže viesť k vysokým základným úrovniám absorbancie, ak sa spektrofotometer poriadne nevynuluje.



Na kvantifikáciu v pufrí Tris HCl použite vzťah $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$.
Pozri prílohu B, strana 76.

* Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

Protokol: Automatizovaná purifikácia celkovej RNA z ľudskej plnej krvi odobranej do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Dôležité body pred začatím činnosti

- Skontrolujte, či je balenie súpravy nedotknuté a nepoškodené a či nedošlo k úniku pufrov. Ak je súprava poškodená, nepoužívajte ju.
- Pri použití pipety zaistíte, aby bola nastavená na správny objem a aby sa kvapalina dôkladne a úplne nasala a nadávkovala.
- Aby ste predišli prenosu vzoriek do nesprávnych skúmaviek a plastového spotrebného materiálu, skontrolujte, či sú všetky skúmavky na spracovanie (PT), skúmavky do mikrocentrifúgy (MCT) a adaptéri rotora správne označené pomocou permanentného označovača. Označte uzáver a telo každej skúmavky do mikrocentrifúgy (MCT), telo každej skúmavky na spracovanie (PT) a vonkajšiu stenu každého adaptéra rotora.
- Úniky vzoriek a pufrov počas procesu môžu znížiť výťažok a čistotu RNA.
- Ak nie je uvedené inak, mali by sa všetky kroky tohto protokolu, vrátane centrifugácie, vykonávať pri izbovej teplote (15 – 25 °C).

Z dôvodu senzitivity amplifikačných technológií nukleovej kyseliny sú pri manipulácii potrebné tieto preventívne opatrenia na zabránenie krížovej kontaminácii:

- Opatrne napipetujte vzorku do skúmavky na spracovanie (PT) na dno skúmavky bez zmáčania jej okraja.
- Medzi prenosmi kvapaliny vždy vymeňte špičky pipety. Použite špičky na pipetu s bariérou proti aerosólu.
- Nedotýkajte sa membrány centrifugačnej kolóny (PRC, PSC) špičkou pipety.

- Po vortexovaní alebo ohriatí skúmavky do mikrocetrifúgy (MCT) ju nakrátko centrifúgujte, aby ste odstránili kvapky z znútra uzáveru.
- Počas celého procesu noste rukavice. V prípade kontaktu medzi rukavicami a vzorkou ich ihneď vymeňte.

Veci, ktoré je potrebné vykonať pred začatím

- Krv sa musí odobrať do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) podľa pokynov v *príručke pre skúmavku PAXgene Blood RNA Tube*. V prípade potreby pozri prílohu C (strana 78) s odporúčaniami k manipulácii so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubujte minimálne 2 hodiny pri izbovej teplote po odbere krvi, aby ste zaistili úplnú lýzu krvných buniek. Inkubácie skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) cez noc môže zvýšiť výťažky. Ak sa skúmavka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) po odbere krvi skladuje pri teplote 2 – 8 °C, -20 °C alebo -70 °C, najprv vyrovnajte jej teplotu na izbovú teplotu a potom ju uskladnite pri izbovej teplote na 2 hodiny pred začatím procesu.
- Prečítajte si bezpečnostné informácie na strane 10.
- Prečítajte si „Dôležité poznámky“, strana 42.
- Prečítajte si odporúčania k manipulácii s RNA (príloha A, strana 75).
- Prečítajte si príslušnú používateľskú príručku prístroja QIAcube a všetky dodatočné informácie dodané s prístrojom a venujte mimoriadnu pozornosť bezpečnostným informáciám.
- Zabezpečte, aby boli pomôcky a prístroje, ako napríklad pipety a prístroj QIAcube, skontrolované a pravidelne kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.
- Vázbový pufer (BR2) môže pri skladovaní tvoriť precipitát. V prípade potreby ho ohrejte na 37 °C, aby sa rozpustil.
- Premývací pufer 2 (BR4) sa dodáva ako koncentrát. Pred prvým použitím pridajte príslušné miesta objemy etanolu (stupeň čistoty 96 – 100 % p.a.) ako je uvedené na fľaši, aby ste dosiahli pracovný roztok.

- Ak sa používa súprava DNázy bez RNázy po prvýkrát, pripravte zásobný roztok DNázy. Rozpustíte pevnú DNázu I (RNFD; 1500 jednotiek Kunitz)* v 550 µl resuspenzného pufru (DRB) DNázy dodaného so súpravou. Dávajte pozor, aby pri otváraní liekovky nedošlo k strane DNázy I (RNFD). DNázu I (RNFD) pripravenú pomocou vody nemiešajte vo vortexe. DNáza I je mimoriadne citlivá na fyzickú denaturáciu. Miešanie je možné len jemným otáčaním liekovky.
- Aktuálne údaje ukazujú, že DNáza I (RNFD) pripravená pomocou vody sa môže skladovať pri teplote 2 – 8 °C až na 6 týždňov. Pri dlhodobom skladovaní DNázy I (RNFD) vylejte zásobný roztok zo sklenenej liekovky, rozdeľte ho na jednotlivé alikvóty (použite skúmavky do mikrocentrifúgy [MCT] s objemom 1,5 ml dodané spolu so súpravou; skúmavky by mali vystačiť na 5 alikvót) a uskladnite ich pri teplote -20 °C na maximálne 9 mesiacov. Rozmrazené alikvóty sa môžu skladovať pri teplote 2 – 8 °C až na 6 týždňov. Alikvóty po rozmrazení znovu nezmrazujte.
- Pri príprave DNázy I (RNFD) pomocou vody a jej alikvótovaní postupujte podľa odporúčaní na manipuláciu s RNA (príloha A, strana 75).
- Nainštalujte správny adaptér trepačky (dodáva sa s prístrojmi QIAcube Zariadenie; použite adaptér na skúmavky safe-lock s objemom 2 ml označené ako „2“) a stojan trepačky položte na vrch adaptéra.
- Skontrolujte zásuvku na odpad a v prípade potreby ju vyprázdňte.
- Nainštalujte všetky súvisiace protokoly, ak ste tak nespravili pri predchádzajúcich cykloch. Prístroj QIAcube Connect MDx vyžaduje stiahnutie všetkých protokolov nachádzajúcich sa v súvisiacom zip súbore. Pre klasický prístroj QIAcube nainštalujte protokoly „PAXgene Blood RNA Part A“ aj „PAXgene Blood RNA Part B“. Pozri časť „Inštalácia protokolov na prístrojov QIAcube“, strana 45.

* Jednotky Kunitz sú bežne používané jednotky na meranie DNázy I, ktoré sú definované ako množstvo DNázy I, ktoré spôsobí zvýšenie A_{260} v množstve 0,001 na minútu na mililiter pri teplote 25 °C, pH 5,0, s vysoko polymerizovanou DNA ako substrát (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. 33, 349 a 363).

Postup

1. Zatvorte kryt prístroja QIAcube a zapnite ho pomocou vypínača (QIAcube Connect MDx: pozri obrázok 17, strana 43; QIAcube: pozri obrázok 18, strana 44).

Zaznie zvukový signál a zobrazí sa obrazovka spustenia. Nástroje automaticky vykonajú inicializačné testy.

2. Otvorte kryt prístroja QIAcube a naložte potrebné reagensie a plastový materiál do prístroja QIAcube. Pozri časť „Naloženie prístrojov QIAcube“, strana 46.

Aby ste ušetrili čas, môže naloženie prebehnúť počas jedného alebo oboch týchto krokov centrifugácie, ktoré trvajú 10 minút (kroky 3 a 5).

3. Skúmavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) centrifugujte na 10 minút pri rýchlosti 3000 – 5000 x g pomocou výkyvného rotora.



Zaistite, aby sa vzorka krvi inkubovala v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT) na minimálne 2 hodiny pri izbovej teplote (15 - 25 °C), aby sa dosiahla úplná lýza krvných buniek.



Rotor musí zahŕňať adaptéri na skúmavky s okrúhlym dnom. Ak sa používa iný typ adaptéra na skúmavky, môže dôjsť počas centrifugácie k ich prasknutiu.

4. Supernatant odstráňte preliatím alebo pipetovaním. Do pelety pridajte 4 ml vody bez RNázy (RNFW) a skúmavku zatvorte čistým sekundárnym uzáverom BD Hemogard (dodáva sa so súpravou).

Ak je supernatant preliaty, dávajte pozor, aby ste peletu nenarušili a okraj skúmavky osušte čistou papierovou utierkou.

5. Peletu premiešajte vo vortexe, kým sa viditeľne nerozpustí a centrifugujte na 10 minút pri rýchlosti 3000 – 5000 x g pomocou výkyvného rotora. Celý supernatant vylejte a zlikvidujte.

Malý debris, ktorý zostane v supernatante po vortexovaní ale pred centrifugáciou nemá na proces žiadny vplyv.



Nedokonalé vylíatie supernatantu spomalí lýzu a rozriedí lyzát, a preto má vplyv na podmienky naviazania RNA na membránu PAXgene.

6. Pridajte 350 µl resuspenzného pufru (BR1) a vortexujte, kým sa peleta viditeľne nerozpustí.

7. Vzorku napipetujte do skúmavky na spracovanie (PT) s objemom 2 ml.



Použite skúmavky na spracovanie (PT) s objemom 2 ml, ktoré sú súčasťou súpravy PAXgene Blood RNA Kit.

8. Naložte otvorené skúmavky na spracovanie (PT) obsahujúce vzorky do trepačky prístroja QIAcube (QIAcube Connect MDx: pozri obrázok 21, strana 49; QIAcube: pozri obrázok 22, strana 50). Polohy vzorky sú očíslované, aby bolo naloženie jednoduché. Vložte konektory stojana trepačky (dodávané s prístrojmi QIAcube) do otvorov na okraji stojana trepačky vedľa každej skúmavky na spracovanie. Tak bude možná detekcia vzoriek počas kontroly naloženia.



Zaistite, aby bol nainštalovaný správny adaptér trepačky (Shaker Adapter, 2 ml, skúmavky safe-lock, označené číslom „2“, dodávané s prístrojmi QIAcube).



Ak spracúvate menej ako 12 vzoriek, uistite sa, že stojan trepačky naložíte podľa obrázku 26, strana 54. Nie je možné spracovať jednu (1) vzorku alebo 11 vzoriek. Čísla pozícií v stojane trepačky zodpovedajú číslam pozícií v centrifúge.

9. Zatvorte dvierka krytu prístroja QIAcube (QIAcube Connect MDx: pozri obrázok 17, strana 43; QIAcube: pozri obrázok 18, strana 44).

10. Vyberte protokol „PAXgene Blood RNA Part A“ a spustite ho.

Postupujte podľa pokynov uvedených na dotykovej obrazovke prístroja QIAcube.



Uistite sa, že obidve časti programu (časť A aj B) sú nainštalované na prístroji QIAcube (pozri „Inštalácia protokolov na prístrojov QIAcube“, strana 45).



Prístroje QIAcube skontrolujte, či sú naložené vzorky, špičky, adaptéri rotora a fľašky s reagentami.

11. Po dokončení protokolu „PAXgene Blood RNA Part A“ otvorte kryt prístroja QIAcube (QIAcube Connect MDx: pozri obrázok 17, strana 43; QIAcube: pozri obrázok 18, strana 44). Vyberte centrifugačné kolóny PAXgene RNA (PRC) z adaptérov rotora a zlikvidujte ich a vyberte skúmavky na spracovanie (PT) z trepačky.



Počas cyklu prenesie prístroj centrifugačné kolóny z pozície v adaptéri rotora 1 (poloha uzáveru L1) do pozície v adaptéri rotora 3 (poloha uzáveru L2) (pozri obrázok 24, strana 52).

12. Zatvorte uzávery všetkých skúmaviek do mikrocentrifúgy (MCT) s objemom 1,5 ml, ktoré obsahujú purifikovanú RNA v adaptéroch rotora (poloha 3, poloha uzáveru L3, pozri obrázok 24, strana 52). Preneste skúmavky do mikrocentrifúgy s objemom 1,5 ml (MCT) do adaptéra trepačky prístroja QIAcube (QIAcube Connect MDx: pozri obrázok 21, strana 49; QIAcube: pozri obrázok 22, strana 50).

13. Zatvorte dvierka krytu prístroja QIAcube (QIAcube Connect MDx: pozri obrázok 17, strana 43; QIAcube: pozri obrázok 18, strana 44).

14. Vyberte protokol „PAXgene Blood RNA Part B“ a spustíte ho.

Postupujte podľa pokynov uvedených na dotykovej obrazovke prístroja QIAcube.



Tento program inkubuje vzorky pri teplote 65 °C a denaturuje RNA pre následné aplikácie. Aj keď následný postup zahŕňa denaturáciu teplom, nepreskočte ho. Dostatočná denaturácia RNA je nevyhnutná na dosiahnutia maximálnej efektívnosti v ďalších krokoch procesu.

15. Po dokončení programu „PAXgene Blood RNA Part B“ otvorte kryt prístroja QIAcube (QIAcube Connect MDx: pozri obrázok 17, strana 43; QIAcube: pozri obrázok 18, strana 44). Okamžite položte skúmavka do mikrocentrifúgy (MCT) obsahujúce purifikovanú RNA na ľad.



VAROVANIE: Horúci povrch. Trepačka môže dosiahnuť teploty až do 70 °C. Nedotýkajte sa jej, keď je horúca.



Nenechajte purifikovanú RNA v prístroji QIAcube. Keď sa vzorky neschladia, môže purifikovaná RNA degradovať. Preto sa neodporúča pripravovať vzorky počas cyklov prebiehajúcich v noci a bez dohľadu.

16. Ak sa vzorky RNA nepoužijú hneď, uskladnite ich pri teplote -20 °C alebo -70 °C.

Keďže RNA zostane denaturovaná po opakovanom zmrazení a rozmrazení, nie je potrebné zopakovať protokol inkubácie teplom („PAXgene Blood RNA Part B“). Ak používate vzorky RNA v diagnostickom teste, postupujte podľa pokynov výrobcu.

Na presnú kvantifikáciu RNA podľa absorbancie pri 260 nm odporúčame vzorky zriediť v pufrí 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Riedenie vzorky vo vode bez RNázy môže viesť k nesprávne nízkym hodnotám.

Spektrofotometer vynulujte pomocou prázdnej vzorky, ktorá sa skladá z rovnakého pomeru elučného pufru (BR5) a pufru Tris-HCl ako vo vzorkách, ktoré sa majú merať. Elučný pufer (BR5) má vysokú absorbanciu na hodnote 220 nm, ktorá môže viesť k vysokým základným úrovniam absorbancie, ak sa spektrofotometer poriadne nevynuluje.



Na kvantifikáciu v pufrí Tris-HCl použite vzťah

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Pozri prílohu B, strana 76.

17. Vyberte stojan na fľašky na reagentie z pracovného stola prístroja QIAcube (QIAcube Connect MDx: pozri obrázok 21, strana 49, QIAcube: pozri obrázok 22, strana 50) a zatvorte všetky fľašky vhodne označeným uzáverom. Pufer vo fľaškách sa môže skladovať pri izbovej teplote (15 – 25 °C) po dobu max. 3 mesiace. Vyberte a zvyšné reagentie v skúmavkách na spracovanie (PT) v slotoch na skúmavky do mikrocetrifúgy prístroja QIAcube a zlikvidujte ich. Vyberte adaptéry rotora z odstredivky a zlikvidujte ich. Vyprázdňte zásuvku na odpad prístroja QIAcube Connect MDx (QIAcube Connect MDx: pozri obrázok 17, strana 43; QIAcube: pozri obrázok 18, strana 44). Zatvorte kryt prístroja QIAcube a vypnite ho pomocou vypínača.

* Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

Spríevodca riešením problémov

Tento sprievodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Viac informácií nájdete na stránke často kladených otázok v našom stredisku technickej podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vedci v technických službách QIAGEN vám vždy radi zodpovedajú všetky otázky týkajúce sa informácií a protokolov v tejto príručke alebo technológií vzoriek a testov (kontaktné informácie nájdete na poslednej strane alebo na stránke www.qiagen.com).

Komentáre a návrhy

Degradovaná RNÁza

Kontaminácia RNÁzy



Dávajte pozor, aby ste do reagensov počas procesu alebo neskoršej manipulácie nezaviedli RNÁzu (pozri prílohu A, strana 75).

Nízky výťažok RNA

a) Menej ako 2,5 ml krvi odobranej v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Zaistite, aby sa do skúmavky PAXgene Blood RNA Tube odobralo 2,5 ml krvi (BRT; pozri *príručku k skúmavke PAXgene Blood RNA Tube*).




b) Koncentrácia RNA nameraná vo vode




RNA sa musí zriediť v pufrí 10 mM Tris-HCl, pH 7,5*, aby sa dosiahla presná kvantifikácia (pozri prílohu B, strana 76).

* Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

Komentáre a návrhy

- c) Zvyšky buniek a ich organel prenesené do centrifugačnej kolóny PAXgene RNA (PRC) v krokoch 9 a 10 manuálneho protokolu
-  Pri pipetovaní supernatantu v kroku 7 manuálneho protokolu zabráňte prenosu veľkých častíc (prenos malého množstva zvyškov buniek a ich organel protokol neovplyvní).
- d) V kroku 3 nedošlo k úplnému odstráneniu supernatantu
-  Zaistite, aby sa odstránil celý supernatant. Ak sa supernatant vyleje, utrite z okraja skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kvapky poklepaním papierovou utierkou po okraji skúmavky. Prijmite potrebné preventívne opatrenia, aby ste zabránili krížovej kontaminácii.
- e) Po odbere do skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sa krv inkubuje na kratšie ako 2 hodiny
-  Po odbere inkubujte krv v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT) na minimálne 2 hodiny.

Nízka hodnota A_{260}/A_{280}

- a) Voda použitá na riedenie RNA na meranie A_{260}/A_{280}
-  Na riedenie RNA pred meraním čistoty použite pufer 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* (pozri prílohu B, strana 76).

* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

Komentáre a návrhy

- b) Spektrofotometer nie je riadne vynulovaný



Spektrofotometer vynulujte pomocou prázdnej vzorky, ktorá sa skladá z rovnakého pomeru elučného pufru (BR5) a pufru 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 ako vo vzorkách, ktoré sa majú merať. Elučný pufer (BR5) má vysokú absorbanciu na hodnote 220 nm, ktorá môže viesť k vysokým základným úrovniam absorbancie, ak sa spektrofotometer poriadne nevynuluje.

Porucha prístroja

Prístroje QIAcube nefungujú správne

Prečítajte si príslušnú používateľskú príručku prístroja QIAcube a mimoriadnu pozornosť venujte časti Riešenie problémov. Zabezpečte riadnu údržbu prístroja QIAcube podľa pokynov v používateľskej príručke tohto prístroja.

Príloha A: Všeobecné poznámky k manipulácii s RNA

Manipulácia s RNA



Ribonukleázy (RNázy) sú veľmi stabilné a aktívne enzýmy, ktoré spravidla nevyžadujú fungovanie kofaktorov. Keďže je ťažké inaktivovať RNázy a na zničenie RNA postačujú dokonca aj malé množstvá, nepoužívajte žiadny plastový ani sklenený riad bez predchádzajúcej eliminácie možnej kontaminácie RNázou. Je potrebné postupovať opatrne, aby sa zabránilo neúmyselnému zavedeniu RNáz do vzorky RNA počas procesu purifikácie alebo po ňom. Na vytvorenie a zachovanie prostredia bez RNázy je potrebné počas predbežnej úpravy prijať preventívne opatrenia a počas práce s RNA používať jednorazové a opakovanie použiteľné nádoby a roztoky.

Všeobecná manipulácia



Počas práce s RNA by ste mali vždy používať správnu mikrobiologickú aseptickú techniku. Na rukách a v prachových časticách sa nachádzajú baktérie a plesne a sú najčastejšími zdrojmi kontaminácie RNázy. Pri manipulácii s reagentami a vzorkami RNA vždy noste latexové alebo vinylové rukavice, aby ste predišli kontaminácii RNázy povrchom pokožky alebo prašným laboratórnym vybavením. Rukavice si často meňte a skúmavky držte zatvorené vždy, keď je to možné. Keď pipetujete alikvóty do následných aplikácií, majte purifikovanú RNA na ľade.

Protokoly na odstránenie kontaminácie RNázy zo skleneného vybavenia a roztokov nájdete vo všeobecných molekulárnych biologických odporúčaniach, ako napríklad Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Príloha B: Kvantifikácia a určenie kvality celkovej RNA

Kvantifikácia RNA

Koncentrácia RNA by sa mala určiť meraním absorbancie pri 260 nm (A_{260}) v spektrofotometri. Na zaistenie významnosti by mali byť údaje v lineárnom rozsahu spektrofotometra. Absorbancia 1 jednotky pri 260 nm zodpovedá 44 μg RNA na ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Tento vzťah platí len pre merania v pufrí 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Ak je preto potrebné vzorku RNA zriediť, mala by sa zriediť v pufrí 10 mM Tris-HCl. Ako je uvedené nižšie (pozri „Čistota RNA“, strana 77), udáva pomer medzi hodnotami absorbancie na 260 a 280 nm odhadovanú čistotu RNA. Pri meraní vzoriek RNA sa uistite, že sú kvety bez RNázy. Spektrofotometer vynulujte pomocou prázdnej vzorky, ktorá sa skladá z rovnakého pomeru elučného pufru (BR5) a pufru Tris-HCl ako vo vzorkách, ktoré sa majú merať. Elučný pufer (BR5) má vysokú absorbanciu na hodnote 220 nm, ktorá môže viesť k vysokým základným úrovniam absorbancie, ak sa spektrofotometer poriadne nevynuluje. Príklad výpočtu použitého pri kvantifikácii RNA je zobrazený nižšie.

Objem vzorky RNA = 80 μl
Riedenie (1/15) = 10 μl vzorky RNA + 140 μl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Zmerajte absorbanciu riedenej vzorky v kvete (bez RNázy).
 A_{260} = 0,3
Koncentrácia vzorky = $44 \times A_{260} \times \text{faktor riedenia}$
= $44 \times 0,3 \times 15$
= 198 $\mu\text{g/ml}$
Celkový výťažok = koncentrácia \times objem vzorky v mililitroch
= 198 $\mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
= 15,8 μg RNA

* Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

Čistota RNA

Pomer údajov pri 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) poskytuje odhad čistoty RNA s ohľadom na kontaminanty, ktoré absorbujú UV, ako napríklad proteín. Pomer A_{260}/A_{280} je ale výrazne ovplyvnený hodnotou pH. Nižšie pH má za následok nižší pomer A_{260}/A_{280} a zníženú senzitivitu na kontamináciu proteínu.* Na dosiahnutie presných hodnôt odporúčame zmerať absorbanciu v pufrí 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Čistá RNA má pomer A_{260}/A_{280} na úrovni 1,8 – 2,2 v pufrí 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Spektrofotometer vynulujte pomocou prázdnej vzorky, ktorá sa skladá z rovnakého pomeru elučného pufru (BR5) a pufru Tris-HCl ako vo vzorkách, ktoré sa majú merať. Elučný pufer (BR5) má vysokú absorbanciu na hodnote 220 nm, ktorá môže viesť k vysokým základným úrovniam absorbancie, ak sa spektrofotometer poriadne nevynuluje.

* 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.

Príloha C: Manipulácia so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Tieto odporúčania od spoločnosti BD môžu byť užitočné pri manipulácii so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Pozri *príručku pre skúmavku PAXgene Blood RNA Tube* s ďalšími informáciami o skúmavkách PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Pokyny na odobratie uzáveru BD Hemogard Closure

1. Zoberte skúmavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) do jednej ruky, pričom palec položíte pod uzáver BD Hemogard. (Ruku položte na pevný podklad, aby ste dosiahli lepšiu stabilitu) Druhou rukou otočte uzáver BD Hemogard a zároveň zatlačte palcom nahor, KÝM SA ZÁTKA SKÚMAVKY NEUVOLNÍ.
2. Pred zdvihnutím uzáveru dajte palec preč. **NEPOUŽÍVAJTE** palec na vytlačte uzáver skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Upozornenie: Ak je v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT) krv, vzniká riziko expozície. Aby ste pomohli predchádzať zraneniam počas odoberania uzáveru, je dôležité, aby sa palec, ktorým sa uzáver vytlačil nahor, nedostal do kontaktu so skúmavkou PAXgene Blood RNA Tube (BRT) po uvoľnení uzáveru BD Hemogard.
3. Zdvihnite uzáver skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). V nepravdepodobnom prípade, že sa plastový štít oddelí od gumovej zátky sa **NESNAŽTE UZÁVER ZNOVU ZMONTOVAŤ**. Opatrne odoberte plastovú zátku zo skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Pokyny na zasunutie sekundárneho uzáveru Secondary BD Hemogard Closure

1. Vymeňte uzáver skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Otočte ho a silno zatlačte nadol, kým nie je zarážka znova na svojom mieste. Úplné zasunutie zátky je nevyhnutné pre to, aby bol uzáver bezpečne umiestnený na skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 centrifugačných kolón PAXgene Spin Column, 50 centrifugačných kolón Shredder Spin Column, DNáza I bez RNázy, reagentie a pufré bez RNázy. Na použitie spolu so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tube	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 skúmaviek na odber krvi	762165
Súvisiace výrobky, ktoré môžete objednať od spoločnosti QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Balík obsahuje: stojany na fľašky na reagentie (3), označovanie pásiky stojana (8), filtračné špičky s objemom 200 µl (1024), filtračné špičky s objemom 1000 µl (1024), filtračné špičky so širokým otvorom s objemom 1000 µl (1024), fľašky na reagentie s objemom 30 ml (18), adaptéri rotora (240), držiak adaptéra rotora	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Sterilné jednorazové filtračné špičky, v stojane	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Fľašky na reagentie (30 ml) s uzávermi, balenie po 6, na použitie so stojanom na fľašky na reagentie prístroja QIAcube	990393

Rotor Adapters (10 x 24)	Na 240 preparátov: 240 jednorazových adaptérov rotora, na použitie s prístrojmi QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Stojan na uloženie 6 × 30 ml fľašiek na reagencie na pracovnom stole prístroja QIAcube	990390
Rotor Adapter Holder	Držiak na 12 jednorazových adaptérov rotora, na použitie s prístrojmi QIAcube	990392

Súvisiace výrobky, ktoré môžete objednať od spoločnosti BD*

Blood Collection Set	Odberová súprava BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, ihla 0,8 × 19 mm, hadička s dĺžkou 305 mm s adaptérom luer; 50 v boxe, 200 v obale	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Obal len na priemer 13 mm a 16 mm; 1000/obal	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 × 75 mm 4,0 ml odber s červeným uzáverom BD Hemogard a papierovým štítkom; 100/box, 1000/obal	368975

* Toto príslušenstvo na odber krvi predstavuje bežné výrobky, ktoré sa môžu použiť so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Viac informácií o tomto príslušenstve, vrátane spôsobu objednávky, nájdete na adrese www.preanalytix.com.

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave PreAnalytiX alebo QIAGEN. Manuálny a používateľské príručky pre súpravy PreAnalytiX a QIAGEN sú dostupné na stránke www.preanalytix.com a www.qiagen.com alebo si ich môžete vyžiadať od technickej podpory spoločnosti PreAnalytiX.

História revízií príručky

Dokument a revízia	Zmeny	Dátum
HB-0101-004, R2	Zmeny, vďaka ktorým sa v celom dokumente dosiahne súlad s nariadeniami GHS	Jún 2015
HB-0101-005, R3	Nové šablóny: revízie automatizovaného protokolu a údajov o účinnosti, aktualizácia bezpečnostných informácií tak, aby spĺňali nariadenia GHS, zmeny podrobností o prístrojoch a vyhlásenia o obmedzení používania produktu.	Február 2019
HB-0101-006, R3	Oprava názvu súpravy v tabuľke obsahu na strane 5.	Január 2020
HB-0101-007, R4	Prístroj QIAcube Connect MDx pridaný do automatizovaného protokolu; aktualizovaný jazyk v celom dokumente tak, aby obsahoval referencie na prístroj QIAcube Connect MDx; aktualizované čísla tabuliek, strán a obrázkov v celom dokumente.	December 2020

PreAnalytiX celosvetovo

Výrobky PreAnalytiX distribuujú spoločnosti QIAGEN a BD

QIAGEN – Zákaznícky servis

Objednávky www.QIAGEN.com/shop | Technická podpora support.qiagen.com | Webová stránka www.qiagen.com

BD – Zákaznícky servis

Argentina, Uruguay and Paraguay

Orders: 0800.444.5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Australia

Orders: 1.800.656.100

Fax: 1.800.656.110

E-mail: bd_anz@bd.com

Austria

Orders: 43.1.7063660

Fax: 43.1.706366011

E-mail: customer-care.at@bd.com

Belgium

Orders: 32.53.720.556

Fax: 32.53.720.549

E-mail: orders.be@bd.com

Brazil

Orders: 0800.055.56.54

E-mail: consultoria_vacutainer@bd.com

Canada

Technical support: 1.800.631.0174

Orders: 1.866.979.9408

Fax: 1.800.565.0897

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

Central and Eastern Europe

Orders: 48.22.377.11.11

Fax: 48.22.377.11.02

Bulgaria orders: info_bulgaria@bd.com

Czech Republic orders: info_czech@bd.com

Croatia orders: info_croatia@bd.com

Hungary orders: info_hungary@bd.com

Poland orders: info_poland@bd.com

Romania orders: info_romania@bd.com

Southeast Europe orders: info_balkan@bd.com

Serbia orders: info_serbia@bd.com

Slovakia orders: info_slovakia@bd.com

Slovenia orders: info_slovenia@bd.com

Denmark

Orders: 45.43.43.45.66

Fax: 45.43.96.56.76

Orders: ordre.dk@bd.com

Technical support: bddenmark@bd.com

Finland

Orders: 358.9.88.70.780

Fax: 358.9.88.70.7816

Orders: tilaukset.fi@bd.com

E-mail: bdsuomi@bd.com

France

Orders: 33.476.68.36.36

Fax: 33.476.68.36.93

E-mail: serviceclientbdf@bd.com

Orders: commandesfr@bd.com

Technical support: vacutainerfr@bd.com

Germany

Orders: 49.6221.3050

Fax: 49.6221.305.216

E-mail: customer-care.de@bd.com

India

Orders: 91.124.3949390

Orders: bd_india@bd.com

Ireland (Aquilant Specialist Healthcare Services)

Customer support: 353.1.404.8350

Fax: 353.1.404.8352

E-mail: contactus@aquilantscientific.ie

Israel (Lapidot Medical)

Customer Support: 972.700.70.90.22

E-mail: cs@lapidot.com

Italy

Orders: 39.02.48240.500

Fax: 39.02.48240.775

Technical support: 39.3450655140

E-mail: ordini.it@bd.com

Middle East & Africa

Orders: 971.45.592.555

Fax: 971.45.592.599

E-mail: EMA_PAS@bd.com

The Netherlands

Orders: 31.20.582.94.20

Fax: 31.20.582.94.21

Orders: orders.nl@bd.com

New Zealand

Orders: 0800.572.468

Fax: 0800.572.469

E-mail: nz_customerservice@bd.com

Norway

Customer Support: 64.00.99.00

E-mail: bdnorge@bd.com

Orders: ordre.no@bd.com

Southeast Asia

E-mail: PAS.SEA@bd.com

Indonesia orders: 622.1577.1920

Malaysia orders: 603.2093.8788

Philippines orders: 63.2478.8881

Singapore orders: 65.6861.0633

Thailand orders: 662.646.1800

Vietnam orders: 848.3822.7409

South Korea

Orders: 02.3404.3706

Fax: 02.3404.3785

Technical: 02.3404.3706

Technical support: Korea_PAS@bd.com

Spain, Portugal and Andorra

Orders: 34.91.848.8174

Customer support: 34.902.27.17.27

Fax: 34.91.848.8115

E-mail: info.spain@bd.com

Sweden

Orders: 46.8.775.51.00

Fax: 46.8.645.08.08

Orders: order.se@bd.com

Technical support: bds sweden@bd.com

Switzerland

Orders: 41.61.485.22.24

Fax: 41.61.485.22.00

E-mail: infoch@bd.com

UK

Orders: 0800.917.8776

E-mail: bduk_customerservice@bd.com

USA

Customer support: 800.631.0174

E-mail: productcomplaints@bd.com



HB-0101-007 1122120SK BD-8945 12/2020
Vyrobené v Nemecku