ธันวาคม 2020

คู่มือ PAXgene® Blood RNA Kit

เวอร์ชัน 2

50 (แค็ตตาล็อกหมายเลข 762174)

R4 MAT 1122120TH

REF 762174

IVD

CE

PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
ผลิตโดย QIAGEN GmbH สำหรับ PreAnalytiX

PreAnalytiX
A QIAGEN / BD Company

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

PAXgene Blood RNA Kits ไม่มีจำหน่ายในบางประเทศ กรุณาสอบถาม

สัญญาอนุญาตให้ใช้สิทธิแบบจำกัด

การใช้ผลิตภัณฑ์นี้แสดงถึงข้อตกลงของผู้ซื้อหรือผู้ใช้งาน PAXgene Blood RNA Kit ตามเงื่อนไขดังต่อไปนี้:

1. PAXgene Blood RNA Kit สามารถใช้ได้โดยลำพังตามคู่มือ *PAXgene Blood RNA Kit* และสำหรับใช้กับส่วนประกอบที่มีอยู่ในชุดอุปกรณ์เท่านั้น PreAnalytiX ไม่ให้ใบอนุญาตภายใต้ทรัพย์สินทางปัญญาใด ๆ ของบริษัทในการใช้หรือนำชิ้นส่วนอุปกรณ์ที่รวมอยู่ในชุดอุปกรณ์นี้ไปใช้ร่วมกับชิ้นส่วนอุปกรณ์ใด ๆ ที่ไม่ได้รวมอยู่ในชุดอุปกรณ์นี้ เว้นเสียแต่ได้อธิบายไว้ในคู่มือ *PAXgene Blood RNA Kit* และแนวทางปฏิบัติเพิ่มเติมต่าง ๆ มีให้ที่ www.preanalytix.com
2. นอกเหนือจากใบอนุญาตที่ได้แจ้งไว้โดยชัดแจ้งแล้ว PreAnalytiX ไม่ให้การรับรองว่าชุดอุปกรณ์และ/หรือการใช้งานชุดอุปกรณ์จะไม่ละเมิดสิทธิ์ของบุคคลที่สาม
3. ชุดอุปกรณ์และชิ้นส่วนประกอบของชุดอุปกรณ์นี้ได้รับอนุญาตสำหรับการใช้งานครั้งเดียว และห้ามใช้ซ้ำ ทำใหม่ หรือขายซ้ำ
4. PreAnalytiX ขอปฏิเสธความรับผิดชอบการอนุญาตอื่น ๆ โดยเฉพาะโดยชัดแจ้งหรือโดยนัยนอกเหนือจากที่ระบุไว้โดยชัดแจ้ง
5. ผู้ซื้อหรือผู้ใช้ชุดอุปกรณ์นี้ตกลงที่จะไม่นำหรืออนุญาตให้บุคคลอื่นใดดำเนินการในขั้นตอนใด ๆ ที่อาจนำไปสู่หรืออำนวยความสะดวกให้เกิดการกระทำต้องห้ามที่แสดงไว้ข้างต้น
6. PreAnalytiX อาจบังคับใช้ข้อห้ามของสัญญาอนุญาตใหใช้สิทธิแบบจำกัดในศาลใด ๆ และพึงเรียกชดใช้ค่าใช้จ่ายในการสืบสวนและค่าศาลทั้งหมด รวมถึงค่าทนาย ในการกระทำใด ๆ เพื่อบังคับใช้สัญญาอนุญาตให้ใช้สิทธิแบบจำกัดนี้ หรือสิทธิในทรัพย์สินทางปัญญาใด ๆ ของบริษัทที่เกี่ยวข้องกับชุดอุปกรณ์นี้และ/หรือชิ้นส่วนประกอบของชุดอุปกรณ์นี้

สำหรับเงื่อนไขการรับใบอนุญาตที่อัปเดตแล้ว ดู www.preanalytix.com

การขายตามเงื่อนไข

ผลิตภัณฑ์ปัจจุบันมาพร้อมกับใบอนุญาตภายใต้ข้อถือสิทธิ์บางประการของ US-7,270,953 และ US-7,682,790 เช่นเดียวกับ EP-1820793 B1 และข้อถือสิทธิ์สิทธิบัตรที่เทียบเท่าในต่างประเทศในการใช้ผลิตภัณฑ์เพื่อประมวลผลสารประกอบเชิงซ้อนของกรดนิวคลีอิกที่เกิดขึ้นในคอร์สการเก็บตัวอย่างใน PAXgene Blood RNA Tube

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH สงวนลิขสิทธิ์

PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse
CH - 8634 Hombrechtikon
สวิตเซอร์แลนด์
www.preanalytix.com

ผู้จัดจำหน่าย **PreAnalytiX**

ผลิตภัณฑ์ PreAnalytiX ผลิตและจัดจำหน่ายโดย QIAGEN หรือ BD สำหรับ PreAnalytiX ไม่สามารถสั่งซื้อผลิตภัณฑ์ได้ที่ PreAnalytiX GmbH

โปรดดูหน้าสุดท้ายสำหรับข้อมูลติดต่อตัวแทนจำหน่าย PreAnalytiX ในพื้นที่ของคุณ

สิ่งที่บรรจุ

สิ่งที่บรรจุในชุดอุปกรณ์ 5
สัญลักษณ์ 6
เงื่อนไขการจัดเก็บ 7
วัตถุประสงค์การใช้งาน 8
ข้อจำกัดการใช้ผลิตภัณฑ์ 8
การควบคุมคุณภาพ 9
ความช่วยเหลือทางเทคนิค 9
ข้อมูลด้านความปลอดภัย 10
บทนำ 13
หลักการและขั้นตอน 13
การเก็บตัวอย่างและการทำให้คงตัว 14
ความเข้มข้นของ RNA และการทำให้บริสุทธิ์ 19
การทำ RNA ให้บริสุทธิ์แบบแมนนวล 19
การทำ RNA ให้บริสุทธิ์แบบอัตโนมัติ 29
ผู้ใช้จะจัดหาอุปกรณ์และสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา 38
บันทึกสำคัญ 41
การใช้เครื่องมือ QIAcube 41
การติดตั้งแนวทางปฏิบัติบนเครื่องมือ QIAcube 44
กำลังโหลดเครื่องมือ QIAcube 45
แนวทางปฏิบัติ: การทำ RNA ทั้งหมดให้บริสุทธิ์แบบแมนนวลจากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่เก็บรวบรวมไว้ใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 55

แนวทางปฏิบัติ: การทำให้บริสุทธิ์โดยอัตโนมัติของ RNA ทั้งหมดจากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่เก็บรวบรวมลงใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)....62
แนวทางการแก้ไขปัญหา....69
ภาคผนวก A: ข้อสังเกตทั่วไปเกี่ยวกับการจัดการ RNA....71
ภาคผนวก B: การหาปริมาณและการกำหนดคุณภาพของ RNA ทั้งหมด....72
ภาคผนวก C: การจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)....74
ข้อมูลการสั่งซื้อ....75
ประวัติการแก้ไขคู่มือ....77

สิ่งที่บรรจุในชุดอุปกรณ์

PAXgene Blood RNA Kit			**(50)**
แค็ตตาล็อกหมายเลข			**762174**
จำนวน preps			**50**
BR1	Resuspension Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับแขวนลอย)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับการจับ)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2) (เข้มข้น)†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (น้ำที่ปราศจาก RNase-Free) (ขวด)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (โปรตีเอส K) (ฝาสีเขียว)	PROTK	2 × 1.4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (คอลัมน์สปิน PAXgene RNA) (สีแดง)	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (หลอดแปรรูป) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (ฝาปิด BD Hemogard™ ที่สอง)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (หลอดไมโครเซนติฟิวจ์) (1.5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNase I ปราศจาก RNase) (ไลโอฟิไลซ์)	DNA REM	1500 หน่วย Kunitz‡
RDD	DNA Digestion Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับการย่อย DNA) (ฝาสีขาว)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย DNase) (หลอด ฝาสีม่วง)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (คอลัมน์สปิน PAXgene Shredder) (สีม่วง)	PAXgene SHRED COL	5 × 10
คู่มือ	คู่มือ PAXgene Blood RNA Kit (เวอร์ชัน 2)		1

***** ไม่สามารถใช้ได้กับสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาฆ่าเชื้อที่มีสารฟอกขาว ประกอบด้วยเกลือควานิดีน ดูหน้า 10 สำหรับข้อมูลด้านความปลอดภัย

† บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) จัดมาให้เป็นสารเข้มข้น ก่อนใช้ครั้งแรก ให้เติมเอทานอล 4 ปริมาตร (96–100%, เกรดความบริสุทธิ์ p.a.) ตามที่ระบุไว้บนขวดเพื่อให้ได้สารละลายที่ใช้งานได้

‡ หน่วย Kunitz เป็นหน่วยที่ใช้โดยทั่วไปสำหรับการวัด DNase I ซึ่งกำหนดเป็นปริมาณ DNase I ที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นใน A_{260} ของ 0.001 ต่อนาทีต่อมิลลิลิตรที่ 25°C, pH 5.0 โดยมี DNA พอลิเมอไรซ์สูงเป็นสารตั้งต้น (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 และ 363)

สัญลักษณ์

	ประกอบด้วยสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่เพียงพอสำหรับ <N> การทดสอบ
	อ่านคำแนะนำในการใช้งาน
	ใช้โดย
	เครื่องมือแพทย์สำหรับการวินิจฉัยภายนอกร่างกาย
	หมายเลขแค็ตตาล็อก
	หมายเลขล็อต
	หมายเลขวัสดุ
	ส่วนประกอบ
	หมายเลข
	วิธีการฆ่าเชื้อโดยใช้การฉายรังสี
	หน่วย Kunitz
	การเพิ่ม
	ประกอบด้วย
	สร้างใหม่
	ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส I
	เอทานอล

GITC	Guanidine isothiocyanate
RNase-Free DNase Set	RNase-Free DNase Set
GTIN	หมายเลขรายการการค้าทั่วโลก
	ห้ามใช้ซ้ำ
	ข้อจำกัดด้านอุณหภูมิ
	ขีดจำกัดสูงสุดของอุณหภูมิ
	ผู้ผลิต
	บันทึกสำคัญ

เงื่อนไขการจัดเก็บ

สปินคอลัมน์ PAXgene RNA (PRC), สปินคอลัมน์ PAXgene Shredder (PSC), โปรติเนส K (PK) และบัฟเฟอร์ (BR1, BR2, BR3, BR4 และ BR5) ควรจัดเก็บไว้ในที่แห้งที่อุณหภูมิที่ระบุบนฉลากชุดอุปกรณ์

RNase-Free DNase Set ซึ่งประกอบด้วย DNase I (RNFD), บัฟเฟอร์สำหรับการย่อย DNA (RDD) และบัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย Dnase (DRB) จะถูกจัดส่งที่อุณหภูมิแวดล้อม จัดเก็บส่วนประกอบทั้งหมดของ RNase-Free DNase Set ทันทีที่ได้รับที่อุณหภูมิที่ระบุบนฉลาก เมื่อจัดเก็บอย่างเหมาะสม ชุดอุปกรณ์จะคงตัวจนถึงวันหมดอายุบนกล่องชุดอุปกรณ์

วัตถุประสงค์การใช้งาน

PAXgene Blood RNA System ประกอบด้วยหลอดเก็บเลือด (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) และชุดอุปกรณ์ทำให้กรดนิวคลีอิกบริสุทธิ์ (PAXgene Blood RNA Kit) มีไว้สำหรับการเก็บรวบรวม การจัดเก็บและการขนส่งเลือดและการทำให้ RNA ภายในเซลล์คงตัวในหลอดปิดและการแยกและการทำโฮสต์ RNA ให้บริสุทธิ์จากเลือดครบส่วนในภายหลังสำหรับ RT-PCR ที่ใช้ในการทดสอบวินิจฉัยระดับโมเลกุล

ลักษณะการทำงานของ PAXgene Blood RNA System ได้รับการกำหนดขึ้นด้วยการคัดลอกยีน FOS และ IL1B เท่านั้น ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการสร้างคุณลักษณะการทำงานของ PAXgene Blood RNA System ที่เหมาะสมสำหรับการคัดลอกเป้าหมายอื่น ๆ

ข้อบ่งใช้การใช้งาน

PAXgene Blood RNA Kit ใช้สำหรับการทำ RNA ภายในเซลล์ให้บริสุทธิ์จากเลือดครบส่วนที่เก็บในPAXgene Blood RNA Tube (BRT) เมื่อใช้ชุดอุปกรณ์นี้ร่วมกับ PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ระบบจะให้ RNA ภายในเซลล์ที่บริสุทธิ์จากเลือดครบส่วนสำหรับ RT-PCR ที่ใช้ในการทดสอบวินิจฉัยระดับโมเลกุล

ข้อจำกัดการใช้ผลิตภัณฑ์

PAXgene Blood RNA Kit มีไว้สำหรับการทำ RNA ภายในเซลล์ให้บริสุทธิ์จากเลือดครบส่วนของมนุษย์ (4.8×10^6 - 1.1×10^7 leukocytes/ml) สำหรับการวินิจฉัยในหลอดทดลอง อุปกรณ์นี้ไม่ได้ใช้เพื่อทำ DNA ในจีโนมหรือกรดนิวคลีอิกของไวรัสให้บริสุทธิ์จากเลือดครบส่วนของมนุษย์ เนื่องจากจำนวนการคัดลอกที่จำกัดได้รับการตรวจสอบความถูกต้องสำหรับข้อกำหนดการทำให้คงตัว (การคัดลอกยีน FOS และ IL1B) จึงไม่ได้กำหนดลักษณะการทำงานสำหรับการคัดลอกทั้งหมด ผู้ใช้ควรตรวจสอบข้อมูลของผู้ผลิตและข้อมูลของตนเองเพื่อพิจารณาว่าจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องสำหรับการคัดลอกอื่น ๆ หรือไม่

ผลิตภัณฑ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ใช้โดยผู้ใช้มืออาชีพ เช่น เจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการและแพทย์ที่ได้รับการฝึกอบรมขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยนอกร่างกาย

ดูคู่มือ *PAXgene Blood RNA Tube* สำหรับข้อมูลเกี่ยวกับการใช้ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

การควบคุมคุณภาพ

ตามระบบการจัดการคุณภาพที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO ของ QIAGEN แต่ละล็อตของ PAXgene Blood RNA Kit ได้รับการทดสอบตามข้อกำหนดจำเพาะที่กำหนดไว้ล่วงหน้าเพื่อให้มั่นใจได้ถึงคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่สอดคล้องกัน

ความช่วยเหลือทางเทคนิค

ที่ QIAGEN เราภูมิใจในคุณภาพและความพร้อมของการสนับสนุนทางเทคนิคของเรา แผนกบริการด้านเทคนิคของเรามีเจ้าหน้าที่ที่เป็นนักวิทยาศาสตร์ที่มีประสบการณ์ซึ่งมีความเชี่ยวชาญในเชิงปฏิบัติและเชิงทฤษฎีอย่างกว้างขวางในอณูชีววิทยาและการใช้ผลิตภัณฑ์ PreAnalytiX หากคุณมีคำถามใด ๆ เกี่ยวกับ PAXgene Blood RNA Kit โปรดอย่าลังเลที่จะติดต่อเรา

สำหรับความช่วยเหลือด้านเทคนิคและข้อมูลเพิ่มเติม โปรดติดต่อฝ่ายบริการด้านเทคนิค QIAGEN

ข้อมูลด้านความปลอดภัย

สหภาพยุโรป - ผู้ใช้ควรรายงานเหตุการณ์ร้ายแรงใด ๆ ที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ต่อผู้ผลิตและหน่วยงานที่มีอำนาจแห่งชาติ นอกสหภาพยุโรป - ติดต่อตัวแทน QIAGEN ในพื้นที่ของคุณสำหรับเหตุการณ์หรือคำถามใด ๆ ที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์

เมื่อทำงานกับสารเคมี ควรสวมเสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้งและแว่นตาป้องกันที่เหมาะสมเสมอ

เพื่อหลีกเลี่ยงความเสี่ยงของการติดเชื้อ (เช่น จากไวรัส HIV หรือไวรัสตับอักเสบบี) หรือการบาดเจ็บเมื่อทำงานกับวัสดุชีวภาพและสารเคมี ควรสวมใส่เสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้งและแว่นตาป้องกันดวงตาที่เหมาะสมเสมอ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดอ่านเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDSs) ที่เหมาะสม สิ่งเหล่านี้มีให้บริการทางออนไลน์ในรูปแบบ PDF ที่สะดวกและกะทัดรัดที่ www.preanalytix.com ซึ่งคุณสามารถค้นหา ชมและพิมพ์ SDSs สำหรับชุดอุปกรณ์นี้ได้

ข้อควรระวัง **อย่าเติมสารฟอกขาวหรือสารละลายที่เป็นกรดลงในของเสียจากการเตรียมตัวอย่างโดยตรง**

บัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2) และบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1 (BR3) มี Guanidine Thiocyanate ซึ่งสามารถสร้างสารประกอบที่มีปฏิกิริยาสูงเมื่อรวมกับสารฟอกขาว หากบัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2) หรือบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1 (BR3) กระจาย ให้ทำความสะอาดด้วยผงซักฟอกและน้ำในห้องปฏิบัติการที่เหมาะสม หากของเหลวที่มีสารที่อาจทำให้เกิดการติดเชื้อกระจาย ให้ทำความสะอาดบริเวณที่ได้รับผลกระทบก่อนด้วยผงซักฟอกและน้ำในห้องปฏิบัติการ และจากนั้นใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (สารฟอกขาว) 1% (v/v)

สารละลายที่ทำให้ RNA คงตัวและส่วนผสมของเลือดจาก PAXgene Blood RNA Tube (BRT) สามารถฆ่าเชื้อโดยใช้สารละลายฟอกขาวเชิงพาณิชย์ 1 ปริมาตร (โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5%) ต่อ 9 ปริมาตรของสารละลายที่ทำให้ RNA คงตัวและส่วนผสมของเลือด

ของเสียจากการเตรียมตัวอย่าง เช่น ของเหลวเหนือตะกอนจากขั้นตอนการหมุนเหวี่ยงในขั้นตอนการทำ RNA ให้บริสุทธิ์ ถือได้ว่าอาจติดเชื้อได้ ก่อนกำจัดขยะ จะต้องนึ่งหรือเผาให้เป็นเถ้าถ่านเพื่อทำลายวัสดุที่ติดเชื้อ การกำจัดจะต้องทำตามระเบียบข้อบังคับของทางราชการ

ข้อความแสดงความเป็นอันตรายและข้อควรระวังต่อไปนี้ใช้กับส่วนประกอบของ PAXgene Blood RNA Kit **ดูคู่มือ** *PAXgene Blood RNA Tube* **สำหรับข้อมูลด้านความปลอดภัยเกี่ยวกับ** PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

บัฟเฟอร์ BR2

ประกอบด้วย: Guanidine Thiocyanate อันตราย! อันตรายหากกลืนกิน อาจเป็นอันตรายเมื่อสัมผัสกับผิวหนังหรือเมื่อหายใจเข้าไป ทำลายดวงตาอย่างรุนแรง เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำโดยมีผลกระทบในระยะยาวได้ การสัมผัสกับกรดจะปลดปล่อยก๊าซที่เป็นพิษมาก ให้สวมใส่ถุงมือป้องกัน/ เสื้อผ้าป้องกัน/ อุปกรณ์ป้องกันดวงตา/ อุปกรณ์ป้องกันใบหน้า หากเข้าตา: ให้ล้างด้วยน้ำสะอาดอย่างระมัดระวังเป็นเวลาหลายนาที หากใส่คอนแทคเลนส์ ให้ถอดออกก่อนหากทำได้โดยง่าย แล้วจึงทำการล้างตาต่อไป ติดต่อศูนย์พิษวิทยาหรือหมอ/ แพทย์ทันที

บัฟเฟอร์ BR3

ประกอบด้วย: เอทานอล; Guanidine Thiocyanate อันตราย! ของเหลวและไอระเหยไวไฟ ทำลายดวงตาอย่างรุนแรง การสัมผัสกับกรดจะปลดปล่อยก๊าซที่เป็นพิษมาก เก็บให้ห่างจากความร้อน/ประกายไฟ/เปลวไฟ/พื้นผิวที่ร้อน ห้ามสูบบุหรี่ ให้สวมใส่ถุงมือป้องกัน/ เสื้อผ้าป้องกัน/ อุปกรณ์ป้องกันดวงตา/ อุปกรณ์ป้องกันใบหน้า หากเข้าตา: ให้ล้างด้วยน้ำสะอาดอย่างระมัดระวังเป็นเวลาหลายนาที หากใส่คอนแทคเลนส์ ให้ถอดออกก่อนหากทำได้โดยง่าย แล้วจึงทำการล้างตาต่อไป ติดต่อศูนย์พิษวิทยาหรือหมอ/ แพทย์ทันที

DNase I

ประกอบด้วย: DNase อันตราย! อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ที่ผิวหนัง อาจทำให้เกิดอาการภูมิแพ้หรือหอบหืดหรือหายใจลำบากหากหายใจเข้าไป หลีกเลี่ยงการหายใจเอาฝุ่น/ ควัน/ ก๊าซ/ ละออง/ ไอระเหย/ สเปรย์ ให้สวมใส่ถุงมือป้องกัน/ เสื้อผ้าป้องกัน/ อุปกรณ์ป้องกันดวงตา/ อุปกรณ์ป้องกันใบหน้า ให้สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันระบบทางเดินหายใจ หากมีการสัมผัสหรือเกี่ยวข้อง: ติดต่อศูนย์พิษวิทยาหรือหมอ/ แพทย์ ให้เคลื่อนย้ายผู้ป่วยไปยังที่ที่มีอากาศบริสุทธิ์และให้พักผ่อนในท่าที่หายใจได้สะดวก

โปรติเนส K

ประกอบด้วย: โปรติเนส K อันตราย! ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังเล็กน้อยได้ อาจทำให้เกิดอาการภูมิแพ้หรือหอบหืดหรือหายใจลำบากหากหายใจเข้าไป หลีกเลี่ยงการหายใจเอาฝุ่น/ ควัน/ ก๊าซ/ ละออง/ ไอระเหย/ สเปรย์ ให้สวมใส่ถุงมือป้องกัน/ เสื้อผ้าป้องกัน/ อุปกรณ์ป้องกันดวงตา/ อุปกรณ์ป้องกันใบหน้า ให้สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันระบบทางเดินหายใจ หากมีการสัมผัสหรือเกี่ยวข้อง: ติดต่อศูนย์พิษวิทยาหรือหมอ/ แพทย์ ให้เคลื่อนย้ายผู้ป่วยไปยังที่ที่มีอากาศบริสุทธิ์และให้พักผ่อนในท่าที่หายใจได้สะดวก

บทนำ

การเก็บเลือดครบส่วนเป็นขั้นตอนแรกในการทดสอบระดับโมเลกุลจำนวนมากที่ใช้ในการศึกษา RNA ของเซลล์ อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญในการทดลองดังกล่าวคือความไม่คงตัวของโปรไฟล์ RNA ของเซลล์ในหลอดทดลอง การศึกษาที่ PreAnalytiX แสดงให้เห็นว่าจำนวนสำเนาของ mRNA แต่ละชนิดในเลือดครบส่วนสามารถเปลี่ยนแปลงได้มากกว่า 1,000 เท่าในระหว่างการจัดเก็บหรือการขนส่งที่อุณหภูมิห้อง* สิ่งนี้เกิดจากทั้งโดยการสลายตัว RNA อย่างรวดเร็วและโดยทำให้เกิดการแสดงออกของยีนบางชนิดหลังจากเจาะเลือด การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในโปรไฟล์การแสดงออกของ RNA ทำให้การศึกษาการแสดงออกของยีนที่น่าเชื่อถือเป็นไปไม่ได้ วิธีการที่รักษาโปรไฟล์การแสดงออกของ RNA ระหว่างและหลังการถ่ายเลือดจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในเลือดครบส่วนของมนุษย์อย่างแม่นยำ

หลักการและขั้นตอน

PreAnalytiX ได้พัฒนาระบบที่ช่วยให้สามารถเก็บรวบรวม การทำให้คงตัว การจัดเก็บและการขนส่งตัวอย่างเลือดครบส่วนของมนุษย์พร้อมกับแนวปฏิบัติที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสำหรับการทำ RNA ภายในเซลล์ให้บริสุทธิ์ ระบบจำเป็นต้องใช้ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; สิทธิบัตรของสหรัฐอเมริกา 6,602,718 และ 6,617,170) สำหรับการเก็บเลือดและการทำให้คงตัวของ RNA ตามด้วยการทำ RNA ให้บริสุทธิ์แบบแมนนวลหรือแบบอัตโนมัติโดยใช้ PAXgene Blood RNA Kit แนวทางปฏิบัติทั้งแบบแมนนวลและแบบอัตโนมัติให้ประสิทธิภาพเทียบเท่ากันอย่างมากโดยคำนึงถึงคุณภาพและปริมาณของ RNA ข้อมูลประสิทธิภาพสำหรับแนวทางปฏิบัติแบบแมนนวล (หน้า 22-29) และแนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติ (หน้า 31-35) รวมอยู่ในคู่มือเล่มนี้

QIAGEN QIAcube Connect MDx ไม่มีจำหน่ายในบางประเทศ สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติมกรุณาติดต่อฝ่ายบริการด้านเทคนิค QIAGEN

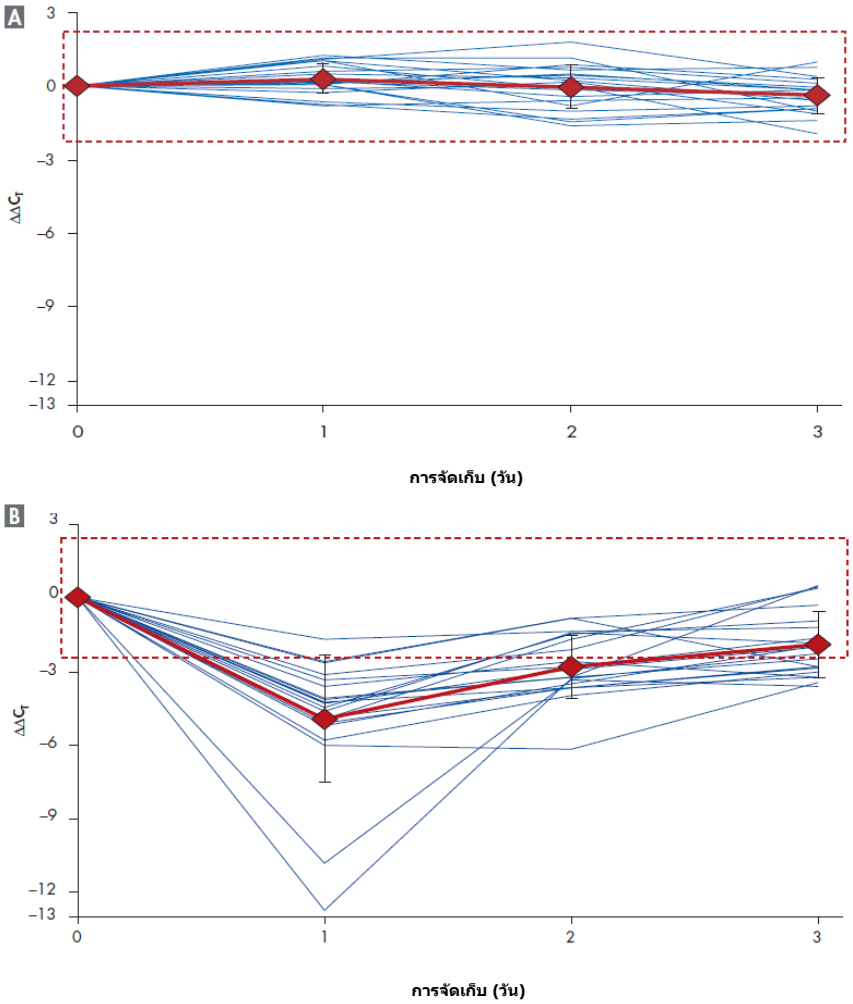
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

การเก็บตัวอย่างและการทำให้คงตัว

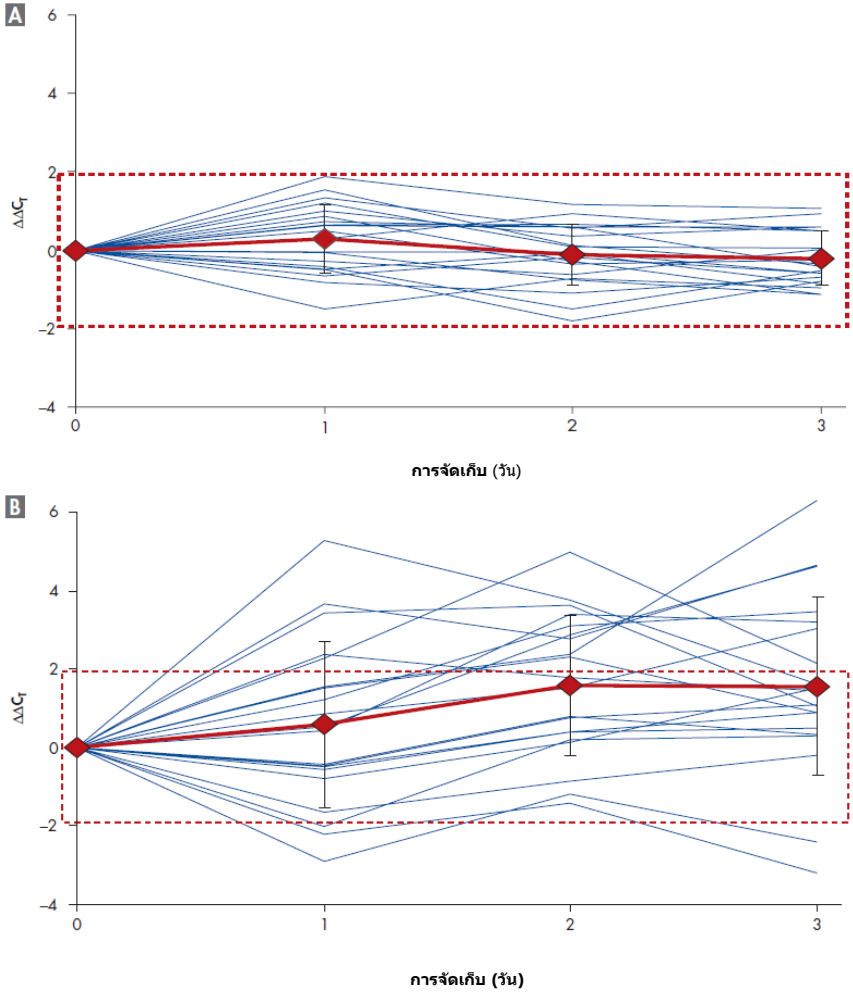
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) มีองค์ประกอบของสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่เป็นกรรมสิทธิ์ โดยอาศัยเทคโนโลยีการทำให้ RNA คงตัวที่จดสิทธิบัตร องค์ประกอบของสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยานี้ช่วยปกป้องโมเลกุลของ RNA จากการแตกสลายโดย RNases และลดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนจากภายนอกร่างกายให้น้อยที่สุด PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) มีไว้สำหรับการเก็บรวบรวมเลือดเต็มส่วนของมนุษย์และการทำให้ RNA ของเซลล์คงตัวได้ไม่เกิน 3 วันที่อุณหภูมิ 18–25°C (รูปที่ 1 และ 2, หน้า 15 และ 16) หรือไม่เกิน 5 วันที่อุณหภูมิ 2–8°C (รูปที่ 3 และ 4, หน้า 17 และ 18) ข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันแสดงให้เห็นถึงการทำให้ RNA ของเซลล์คงตัวเป็นเวลาอย่างน้อย 11 ปีที่ –20°C หรือ –70°C* สำหรับข้อมูลเพิ่มเติมจากการศึกษาอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับการประเมินความคงตัวเป็นระยะเวลานาน โปรดติดต่อฝ่ายบริการด้านเทคนิคของ QIAGEN

ระยะเวลาที่แท้จริงของการทำให้ RNA คงตัวอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของ RNA ของเซลล์และแอปพลิเคชันดาวน์สตรีมที่ใช้ เนื่องจากจำนวนการคัดลอกที่จำกัดได้รับการตรวจสอบความถูกต้องสำหรับข้อกำหนดการทำให้คงตัว (การคัดลอกยีน FOS และ IL1B) จึงไม่ได้กำหนดลักษณะการทำงานสำหรับการคัดลอกทั้งหมด ผู้ใช้ควรตรวจสอบข้อมูลของผู้ผลิตและข้อมูลของตนเองเพื่อพิจารณาว่าจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องสำหรับการคัดลอกอื่น ๆ หรือไม่

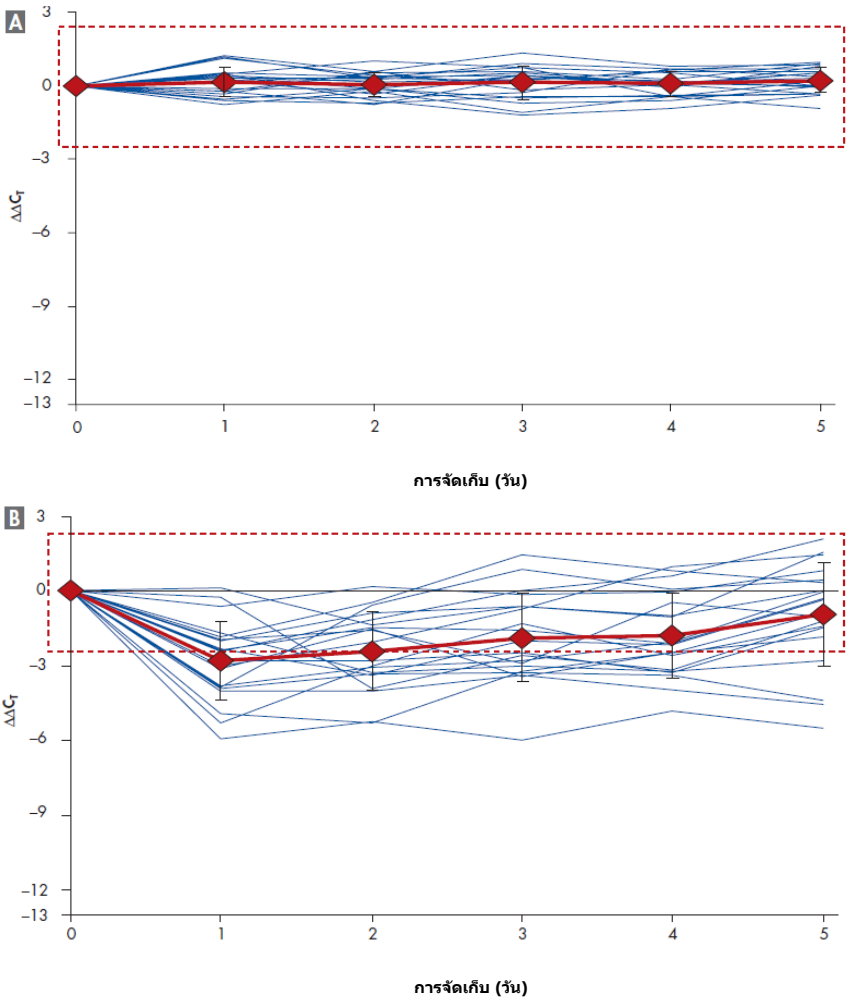
* การศึกษาระยะยาวเกี่ยวกับการจัดเก็บเลือดใน PAXgene Blood RNA Tubes กำลังดำเนินอยู่



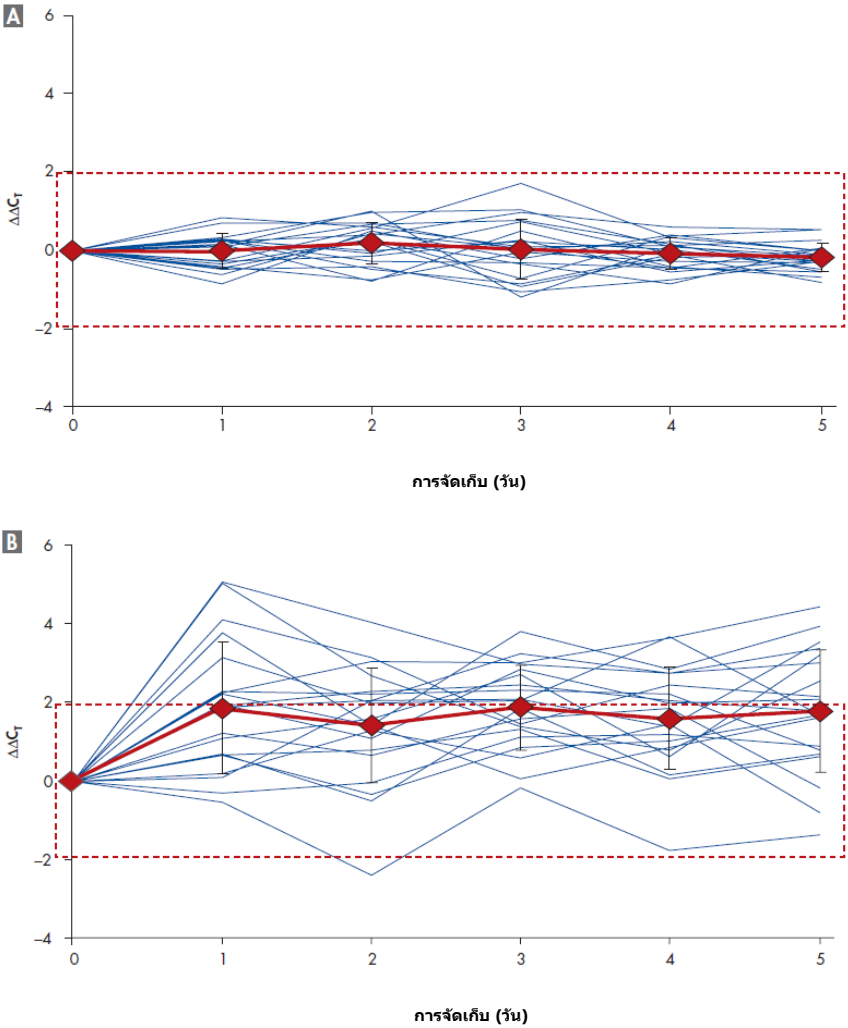
รูปที่ 1 ความคงตัวของ RNA ในตัวอย่างเลือดที่ 18–25°C: FOS เจาะเลือดมาจากผู้บริจาค 10 ราย ด้วยตัวอย่างซ้ำและจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 18–25°C ตามจำนวนวันที่ระบุตามด้วยการทำ RNA ให้บริสุทธิ์ทั้งหมด [**A**] เก็บเลือดและจัดเก็บไว้ใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) และ RNA ทั้งหมดถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PAXgene Blood RNA Kit [**B**] เก็บเลือดและจัดเก็บไว้ในหลอดเก็บเลือดมาตรฐานที่มี EDTA เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือดและ RNA ทั้งหมดได้รับการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการสกัดอินทรีย์มาตรฐานด้วยการล้าง RNA ที่ใช้ซิลิกาเมมเบรน ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ FOS ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ค่าสำหรับตัวอย่างทั้งหมดถูกพล็อตพร้อมค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างทั้งหมดที่แสดง เส้นประระบุความแม่นยำรวม ±3x ของการทดสอบ (2.34 C_T)



รูปที่ 2 ความคงตัวของ RNA ในตัวอย่างเลือดที่ 18–25°C: IL1B เจาะเลือดและทำ RNA ทั้งหมดให้บริสุทธิ์หลังการจัดเก็บที่อุณหภูมิ 18-25°C ตามที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 1 ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ IL1B ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ค่าสำหรับตัวอย่างทั้งหมดถูกพล็อตพร้อมค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างทั้งหมดที่แสดง เส้นประระบุความแม่นย่ารวม ±3x ของการทดสอบ (1.93 C_T)



รูปที่ 3 ความคงตัวของ RNA ในตัวอย่างเลือดที่ 2–8°C: FOS เจาะเลือดมาจากผู้บริจาค 10 ราย ด้วยตัวอย่างซ้ำและจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2–8°C ตามจำนวนวันที่ระบุตามด้วยการทำ RNA ให้บริสุทธิ์ทั้งหมด [**A**] เก็บเลือดและจัดเก็บไว้ใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) และ RNA ทั้งหมดถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PAXgene Blood RNA Kit [**B**] เก็บเลือดและจัดเก็บไว้ในหลอดเก็บเลือดมาตรฐานที่มี EDTA เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือดและ RNA ทั้งหมดได้รับการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการสกัดอินทรีย์มาตรฐานด้วยการล้าง RNA ที่ใช้ซิลิกาเมมเบรน ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ FOS ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ค่าสำหรับตัวอย่างทั้งหมดถูกพล็อตพร้อมค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างทั้งหมดที่แสดง เส้นประระบุความแม่นยำรวม ±3x ของการทดสอบ (2.34 C_T)



รูปที่ 4 ความคงตัวของ RNA ในตัวอย่างเลือดที่ 2–8°C: IL1B เจาะเลือดและทำ RNA ทั้งหมดให้บริสุทธิ์หลังการจัดเก็บที่อุณหภูมิ 2–8°C ตามที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 3 ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ IL1B ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ค่าสำหรับตัวอย่างทั้งหมดถูกพล็อตพร้อมค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างทั้งหมดที่แสดง เส้นประระบุความแม่นยำรวม ±3x ของการทดสอบ (1.93 C_T)

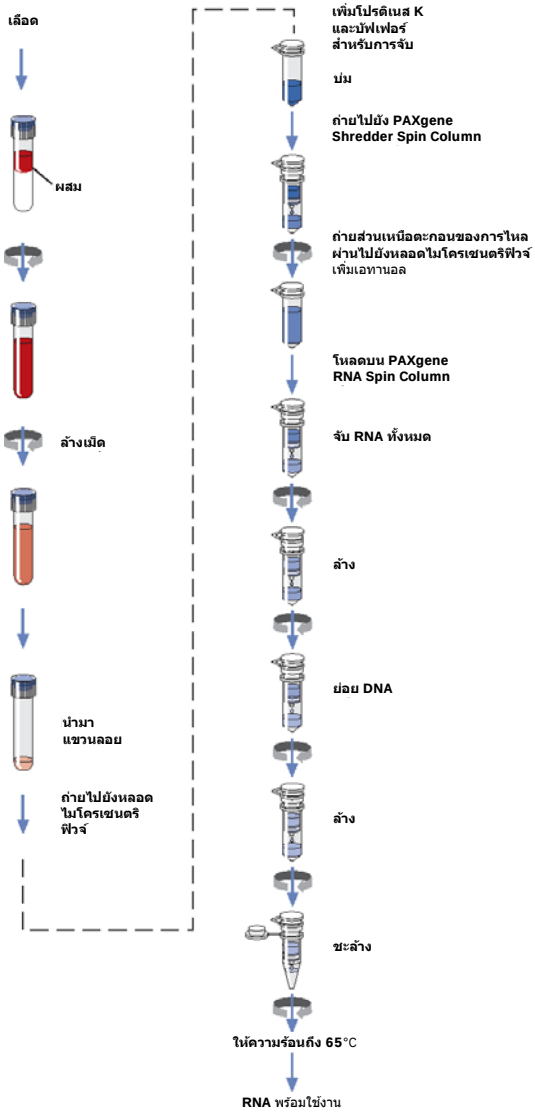
ความเข้มข้นของ RNA และการทำให้บริสุทธิ์

PAXgene Blood RNA Kit ใช้สำหรับการทำ RNA ทั้งหมดให้บริสุทธิ์จากเลือดครบส่วนของมนุษย์ 2.5 ml ที่เก็บใน PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ขั้นตอนนี้ง่ายและสามารถทำได้โดยใช้ขั้นตอนแบบแมนนวลหรือแบบอัตโนมัติ (ดูรูปที่ 5 และ 10, หน้า 20 และ 30) ในทั้งสองแนวทางปฏิบัติ การทำให้บริสุทธิ์เริ่มต้นด้วยขั้นตอนการหมุนเหวี่ยงเพื่ออัดเม็ดกรดนิวคลีอิกใน PAXgene Blood RNA Tube (BRT) เม็ดจะถูกล้างและนำมาแขวนลอย ตามด้วยการทำ RNA ให้บริสุทธิ์แบบแมนนวลหรือแบบอัตโนมัติ โดยหลักการแล้วทั้งสองแนวทางปฏิบัติจะทำตามขั้นตอนของแนวทางปฏิบัติเดียวกันโดยมีส่วนประกอบชุดอุปกรณ์เดียวกัน

การทำ RNA ให้บริสุทธิ์แบบแมนนวล

โดยละเอียดแล้วเม็ดที่นำมาแขวนลอย จะถูกบ่มในบัฟเฟอร์ที่ได้รับการปรับให้เหมาะสมพร้อมกับ โปรติเนส K (PK) เพื่อให้เกิดการย่อยโปรตีน การหมุนเหวี่ยงเพิ่มเติมผ่าน คอลัมน์สปิน PAXgene Shredder (PSC) จะดำเนินการเพื่อทำให้เซลล์ไลเสทเป็นเนื้อเดียวกันและกำจัดเศษเซลล์ที่เหลือออกและส่วนเหนือตะกอนของเศษไหลผ่านจะถูกถ่ายไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ มีการเพิ่มเอทานอลเพื่อปรับเงื่อนไขการจับและไลเซทจะถูกนำไปใช้กับคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC) ในระหว่างการหมุนเหวี่ยงสั้น ๆ RNA จะถูกจับเลือกเข้ากับเมมเบรนซิลิก้า PAXgene เมื่อสารปนเปื้อนไหลผ่าน สิ่งปนเปื้อนที่หลงเหลืออยู่จะถูกขจัดออกในขั้นตอนการล้างอย่างมีประสิทธิภาพหลายขั้นตอน ระหว่างขั้นตอนการล้างครั้งแรกและครั้งที่สอง เมมเบรนจะได้รับการบำบัดด้วย DNase I (RNFD) เพื่อกำจัดปริมาณเล็กน้อยของ DNA ที่จับ หลังจากขั้นตอนการล้าง RNA จะถูกขจัดออกในบัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) และทำให้แปลงสภาพด้วยความร้อน

RNA ทั้งหมดที่ถูกแยกโดยใช้ PAXgene Blood RNA System มีความบริสุทธิ์ ใช้แนวทางปฏิบัติแบบแมนนวล ค่า A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.8 ถึง 2.2 และ ≤1% (w/w) DNA ในจีโนมมีอยู่ใน ≥95% ของตัวอย่างทั้งหมดซึ่งวัดโดย real-time PCR เชิงปริมาณของลำดับยีนเบต้า-แอกติน ตัวอย่างอย่างน้อย 95% แสดงว่าไม่มีการยับยั้งใน RT-PCR เมื่อใช้การชะล้างถึง 30%

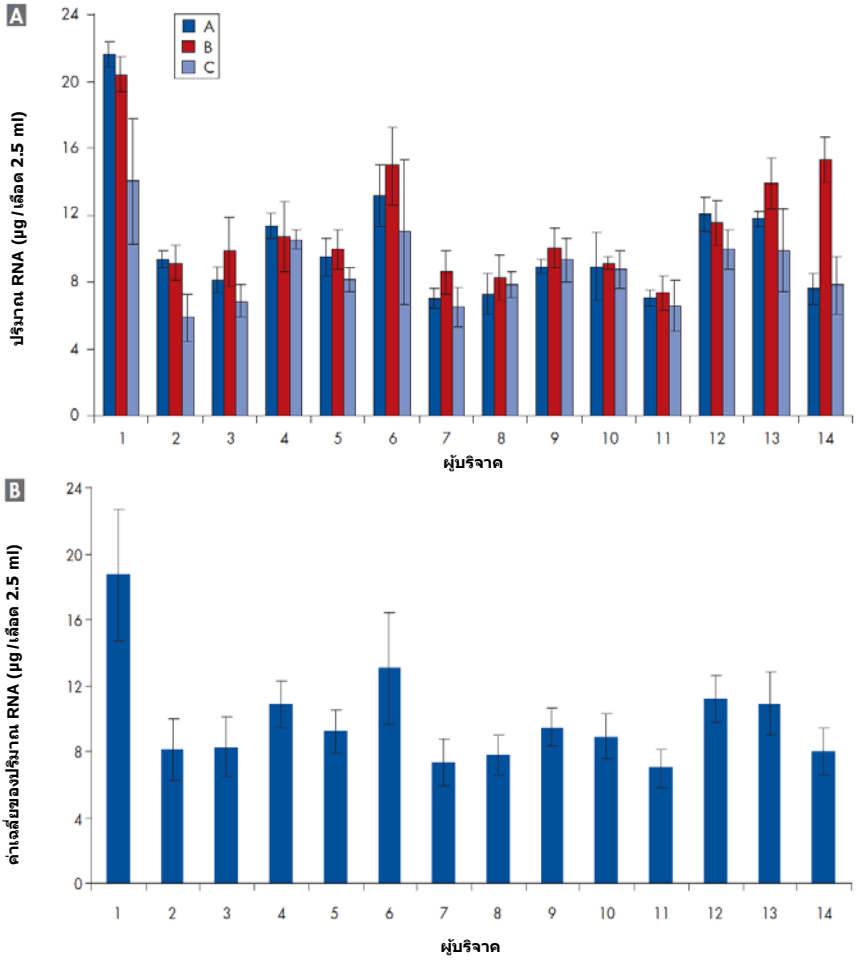


รูปที่ 5 ขั้นตอน PAXgene Blood RNA แบบแมนนวล

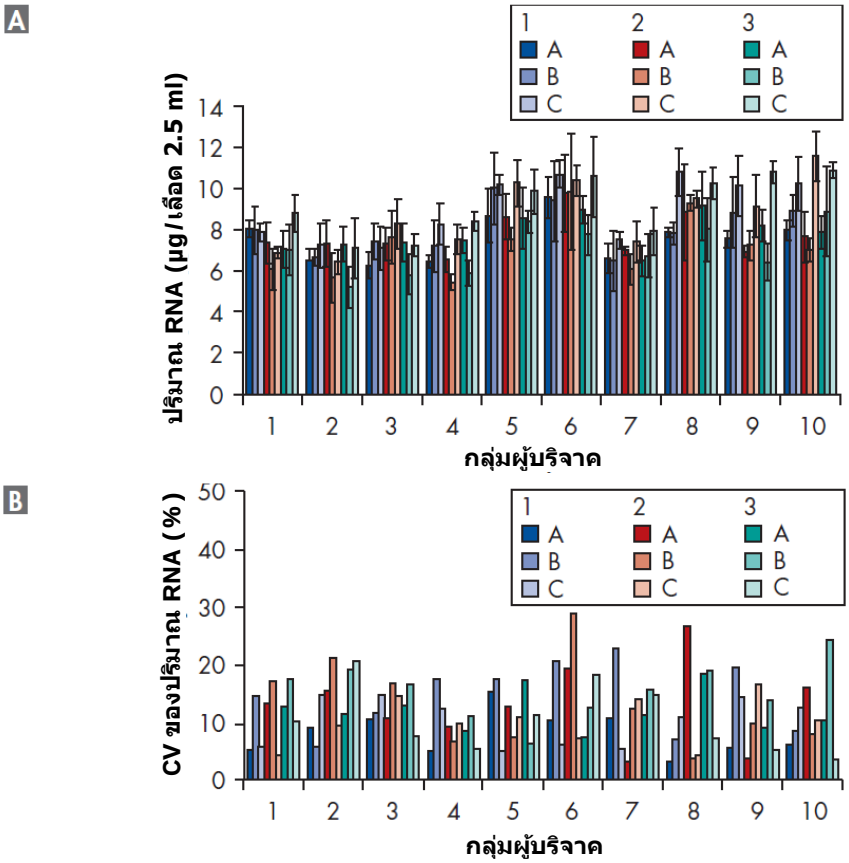
การใช้แนวทางปฏิบัติแบบแมนนวล เวลาในการเตรียมตัวอย่างโดยเฉลี่ย (ตามข้อมูลจากการดำเนินการเตรียมตัวอย่าง 12 ครั้ง) อยู่ที่ประมาณ 90 นาที* โดยใช้เวลาในการปฏิบัติจริงเพียง 40 นาที ปริมาณ RNA จากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่มีสุขภาพดี 2.5 ml คือ ≥3 µg สำหรับ ≥95% ของตัวอย่างที่ประมวลผล เนื่องจากปริมาณขึ้นอยู่กับผู้บริจาคเป็นอย่างยิ่ง ปริมาณของแต่ละรายอาจแตกต่างกันไป สำหรับผู้บริจาคแต่ละราย PAXgene Blood RNA system ให้ปริมาณที่สามารถวัดซ้ำได้และทำซ้ำได้สูง (รูปที่ 6 และ 7, หน้า 22 และ 23) และ RT-PCR ที่วัดซ้ำได้และทำซ้ำได้ (รูปที่ 8 และ 9, หน้า 27 และ 28) ทำให้มีความทนทานสูงสำหรับการทดสอบวินิจฉัยทางคลินิก

รูปที่ 6 (หน้า 22) แสดงถึงความสามารถในการวัดซ้ำและความสามารถในการทำซ้ำของ PAXgene Blood RNA System มีการดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของล็อต PAXgene Blood RNA kit ที่ต่างกันและผู้ปฏิบัติงานที่ต่างกันเกี่ยวกับความสามารถในการทำซ้ำของปริมาณ RNA และประสิทธิภาพของ RT-PCR แบบเรียลไทม์ เนื่องจากมีการใช้ตัวอย่างเลือดที่รวมกันแทนแต่ละ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) สำหรับการศึกษาเหล่านี้ ผลลัพธ์ไม่ได้สะท้อนถึงความสามารถในการวัดซ้ำของระบบรวมถึงความผันผวนระหว่างการเจาะเลือดแต่ละครั้ง แต่เป็นเพียงความสามารถในการวัดซ้ำของการเตรียมตัวอย่าง (ดู รูปที่ 7, หน้า 23)

*** เวลาในการดำเนินการตามแนวทางปฏิบัติทั้งหมดรวมถึงการจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes ล่วงหน้า (การหมุนเหวี่ยง การล้างเม็ดและการแขวนลอยของเม็ด)**



รูปที่ 6 การทำ RNA ให้บริสุทธิ์ที่วัดซ้ำได้และทำซ้ำได้ ตัวอย่างเลือดสี่ส่วนจากผู้บริจาค 14 รายได้รับการประมวลผลแบบแมนนวลโดยเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการ 3 ราย (A, B, C) มีการใช้อุปกรณ์สามชุดและตัวอย่างทั้งหมดที่เตรียมโดยเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการรายเดียวได้รับการประมวลผลโดยใช้อุปกรณ์เดียวกัน [**A**] ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณ RNA ต่อตัวอย่างที่ทำซ้ำจากผู้บริจาครายเดียวกันและเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการที่ต่างกันจะแสดง [**B**] ตัวอย่างเลือดที่ทำซ้ำสิบสองตัวอย่างจากผู้บริจาคแต่ละรายจาก 14 รายได้รับการประมวลผลโดยเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการที่ต่างกัน 3 ราย ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณ RNA ต่อตัวอย่างจากผู้บริจาครายเดียวกันและเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการทั้งหมดจะถูกนำเสนอ สำหรับตัวอย่าง RNA ทั้งหมด อัตราส่วน A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.8 ถึง 2.2



รูปที่ 7 ความสามารถในการวัดซ้ำและความสามารถในการทำซ้ำของปริมาณ RNA สำหรับผู้ปฏิบัติงานที่ต่างกันและล็อตชุดอุปกรณ์ PAXgene Blood RNA Kit โดยใช้ตัวอย่างเลือดที่รวมกัน เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาค 30 รายที่ต่างกันใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 หลอดต่อผู้บริจาคหนึ่งราย รวม 360 หลอด) สิ่งที่บรรจุของหลอดจากผู้บริจาค 3 รายถูกรวมเข้าด้วยกันและแยกออกเป็น 36 ตัวอย่างในเวลาต่อมา ตัวอย่าง 36 รายการต่อกลุ่มผู้บริจาค 3 รายได้รับการประมวลผลแบบแมนนวลโดยผู้ปฏิบัติงานที่ต่างกัน 3 ราย ผู้ปฏิบัติงานแต่ละรายใช้ล็อต PAXgene Blood RNA Kit ที่ต่างกัน 3 ล็อตสำหรับการสกัดและประมวลผลตัวอย่างสี่ส่วนจากแต่ละรายของกลุ่มผู้บริจาค 10 กลุ่ม [**A**] ปริมาณ RNA และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการรวมล็อต-ผู้ปฏิบัติงานทุกราย ตัวอย่างเลือดสี่ส่วนจากกลุ่มผู้บริจาค 10 กลุ่มได้รับการประมวลผลโดยผู้ปฏิบัติงานที่แตกต่างกัน 3 ราย (A, B, C) ด้วยแต่ละล็อตของชุดอุปกรณ์ 3 ล็อต (1, 2, 3) ปริมาณเฉลี่ย (คอลัมน์) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แถบข้อผิดพลาด) ต่อตัวอย่างสี่ส่วนจากกลุ่มผู้บริจาคเดียวกันสำหรับผู้ปฏิบัติงานที่ต่างกันและล็อตชุดอุปกรณ์ที่ต่างกันจะถูกนำเสนอ [**B**] CV ของปริมาณ RNA ต่อกลุ่มผู้บริจาคสำหรับการรวมล็อต - ผู้ปฏิบัติงานทั้งหมด (A, B, C; 1, 2, 3) ซึ่งคำนวณจากปริมาณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณที่แสดงใน รูปที่ 7A

ตารางที่ 1A ความสามารถในการทำซ้ำภายในแต่ละล็อตและภายในผู้ใช้แต่ละรายสำหรับกลุ่มผู้บริจาคที่เลือก (1, 6, 9, 10)

	กลุ่มผู้บริจาค 1 5.1 x 10^6 cells/ml			กลุ่มผู้บริจาค 6 6.5 x 10^6 cells/ml		
การรวมกันของข้อมูล	**ปริมาณเฉลี่ย (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**ปริมาณเฉลี่ย (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**
ล็อต 1, ผู้ใช้ A	8.03	0.42	5	9.55	0.99	10
ล็อต 1, ผู้ใช้ B	7.98	1.17	15	9.38	1.94	21
ล็อต 1, ผู้ใช้ C	7.87	0.45	6	10.71	0.65	6
ล็อต 2, ผู้ใช้ A	7.32	0.98	13	9.78	1.89	19
ล็อต 2, ผู้ใช้ B	6.09	1.04	17	9.82	2.83	29
ล็อต 2, ผู้ใช้ C	6.87	0.31	4	10.37	0.74	7
ล็อต 3, ผู้ใช้ A	7.04	0.90	13	8.96	0.68	8
ล็อต 3, ผู้ใช้ B	6.98	1.22	17	7.73	0.97	13
ล็อต 3, ผู้ใช้ C	8.78	0.89	10	10.59	1.94	18
	กลุ่มผู้บริจาค 9 8.4 x 10^6 cells/ml			**กลุ่มผู้บริจาค 10 10.2 x 10^6 cells/ml**		
การรวมกันของข้อมูล	**ปริมาณเฉลี่ย (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**ปริมาณเฉลี่ย (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**
ล็อต 1, ผู้ใช้ A	7.52	0.41	6	7.96	0.49	6
ล็อต 1, ผู้ใช้ B	8.82	1.72	19	8.90	0.76	9
ล็อต 1, ผู้ใช้ C	10.14	1.46	14	10.22	1.29	13
ล็อต 2, ผู้ใช้ A	6.92	0.27	4	7.63	1.23	16
ล็อต 2, ผู้ใช้ B	7.20	0.71	10	7.00	0.56	8
ล็อต 2, ผู้ใช้ C	9.14	1.52	17	11.56	1.21	10
ล็อต 3, ผู้ใช้ A	8.18	0.76	9	7.85	0.82	10
ล็อต 3, ผู้ใช้ B	6.41	0.88	14	8.88	2.17	24
ล็อต 3, ผู้ใช้ C	10.78	0.56	5	10.88	0.37	3

ตารางที่ 1B ความสามารถในการทำซ้ำภายในผู้ใช้แต่ละรายและระหว่างล็อตทั้งหมดสำหรับกลุ่มผู้บริจาคที่เลือก (1, 6, 9, 10)

	กลุ่มผู้บริจาค 1 5.1 x 10^6 cells/ml			กลุ่มผู้บริจาค 6 6.5 x 10^6 cells/ml		
การรวมกันของข้อมูล	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)
ผู้ใช้ A, ล็อตทั้งหมด	7.46	0.85	11	9.43	1.22	13
ผู้ใช้ B, ล็อตทั้งหมด	7.02	1.31	19	8.98	2.09	23
ผู้ใช้ C, ล็อตทั้งหมด	7.84	0.98	13	10.56	1.15	11
	กลุ่มผู้บริจาค 9 8.4 x 10^6 cells/ml			กลุ่มผู้บริจาค 10 10.2 x 10^6 cells/ml		
การรวมกันของข้อมูล	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)
ผู้ใช้ A, ล็อตทั้งหมด	7.54	0.72	10	7.81	0.82	11
ผู้ใช้ B, ล็อตทั้งหมด	7.48	1.50	20	8.26	1.54	19
ผู้ใช้ C, ล็อตทั้งหมด	10.02	1.34	13	10.89	1.10	10

ตารางที่ 1C ความสามารถในการทำซ้ำภายในแต่ละล็อตและระหว่างผู้ใช้ทั้งหมดสำหรับกลุ่มผู้บริจาคที่เลือก (1, 6, 9, 10)

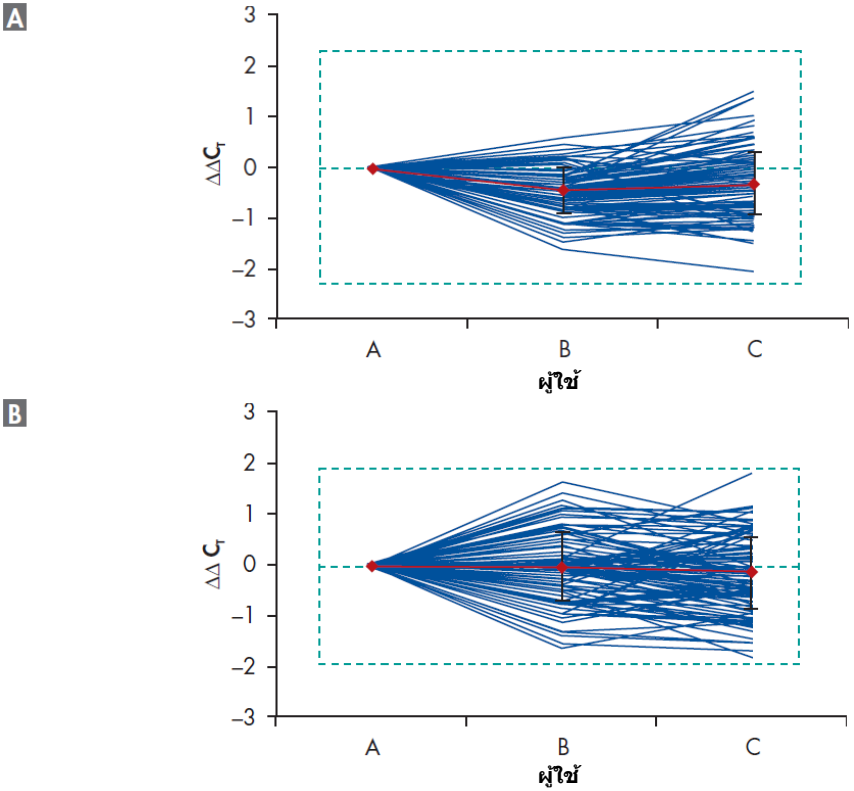
	กลุ่มผู้บริจาค 1 5.1 x 10^6 cells/ml			กลุ่มผู้บริจาค 6 6.5 x 10^6 cells/ml		
การรวมกันของข้อมูล	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)
ล็อต 1, ผู้ใช้ทั้งหมด	7.96	0.69	9	9.88	1.34	14
ล็อต 2, ผู้ใช้ทั้งหมด	6.76	0.93	14	9.99	1.84	18
ล็อต 3, ผู้ใช้ทั้งหมด	7.60	1.27	17	9.09	1.71	19
	กลุ่มผู้บริจาค 9 8.4 x 10^6 cells/ml			กลุ่มผู้บริจาค 10 10.2 x 10^6 cells/ml		
การรวมกันของข้อมูล	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)
ล็อต 1, ผู้ใช้ทั้งหมด	8.83	1.63	19	9.02	1.27	14
ล็อต 2, ผู้ใช้ทั้งหมด	7.75	1.36	18	8.73	2.31	26
ล็อต 3, ผู้ใช้ทั้งหมด	8.46	1.99	24	9.20	1.80	20

ตารางที่ 1D ความสามารถในการทำซ้ำระหว่างล็อตทั้งหมดและผู้ใช้ทั้งหมดสำหรับกลุ่มผู้บริจาคที่เลือก (1, 6, 9, 10)

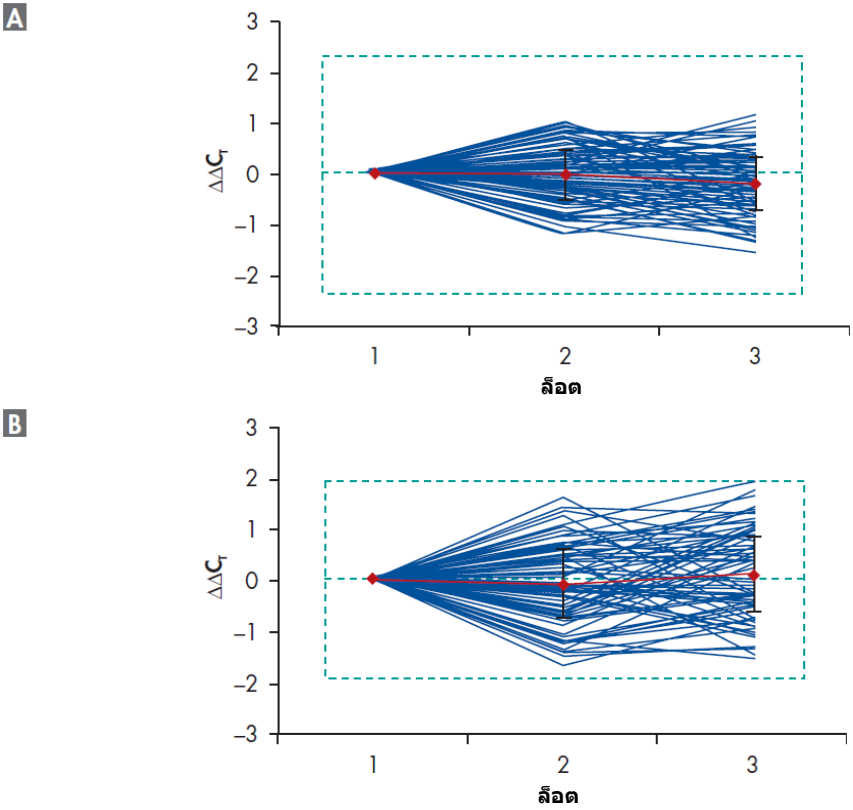
	กลุ่มผู้บริจาค 1 5.1 x 10^6 cells/ml			กลุ่มผู้บริจาค 6 6.5 x 10^6 cells/ml		
การรวมกันของข้อมูล	**ปริมาณเฉลี่ย (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**ปริมาณเฉลี่ย (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**
ล็อต 1, ผู้ใช้ทั้งหมด	7.44	1.09	15	9.66	1.65	17

	กลุ่มผู้บริจาค 9 8.4 x 10^6 cells/ml			กลุ่มผู้บริจาค 10 10.2 x 10^6 cells/ml		
การรวมกันของข้อมูล	**ปริมาณเฉลี่ย (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**ปริมาณเฉลี่ย (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**
ล็อต 1, ผู้ใช้ทั้งหมด	8.35	1.70	20	8.99	1.80	20

การวิเคราะห์รายละเอียดของกลุ่มผู้บริจาคตัวแทน 4 กลุ่ม กลุ่มถูกคัดเลือกตามจำนวนเม็ดเลือดขาวและแสดงค่าบน ค่ากลางและค่าล่างของช่วงปกติของจำนวนเม็ดเลือดขาว (4.8 x 10^6 - 1.1 x 10^7 leukocytes/ml) จำนวนเม็ดเลือดขาวแสดงถึงค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดเลือดขาว 3 ตัวจากผู้บริจาค 3 รายต่อกลุ่มผู้บริจาค



รูปที่ 8 ความสามารถในการทำซ้ำของ RT-PCR - ระหว่างผู้ใช้ RNA บริสุทธิ์ในการทดลองที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 7 ถูกใช้สำหรับ RT-PCR แบบเรียลไทม์ ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ [**A**] FOS และ [**B**] IL1B ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ค่าสำหรับตัวอย่างทั้งหมดจะถูกพล็อต สัมพันธ์กับค่าสำหรับผู้ใช้ A (กลุ่มผู้บริจาค 10 x ล็อตชุดอุปกรณ์ 3 x การทำซ้ำ 4 = ชุดข้อมูลสำหรับแต่ละยีน 120) โดยมีค่าเฉลี่ย (เส้นสีแดง) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แถบสีดำ) สำหรับตัวอย่างทั้งหมดที่แสดง เส้นประระบุความแม่นยำรวมของการทดสอบ ±3x (FOS: 2.34 C_T; IL1B: 1.93 C_T)



รูปที่ 9 ความสามารถในการทำซ้ำของ RT-PCR - ระหว่างล็อตชุดอุปกรณ์ RNA บริสุทธิ์ในการทดลองที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 7 ถูกใช้สำหรับ RT-PCR แบบเรียลไทม์ ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ [**A**] FOS และ [**B**] IL1B ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ค่าสำหรับตัวอย่างทั้งหมดจะถูกพล็อต สัมพันธ์กับค่าสำหรับล็อตชุดอุปกรณ์ 1 (กลุ่มผู้บริจาค 10 x ผู้ใช้ 3 x การทำซ้ำ 4 = ชุดข้อมูลสำหรับแต่ละยีน 120) โดยมีค่าเฉลี่ย (เส้นสีแดง) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แถบสีดำ) สำหรับตัวอย่างทั้งหมดที่แสดง เส้นประระบุความแม่นยำรวมของการทดสอบ ±3x (FOS: 2.34 C_T; IL1B: 1.93 C_T)

ตารางที่ 2 สรุปข้อมูล RT-PCR จากรูปที่ 8 และ 9

ระบบทดสอบ	การทดสอบ FOS/18S rRNA		การทดสอบ IL1B/18S rRNA	
การเปรียบเทียบข้อมูล	ค่าเฉลี่ย ($\Delta\Delta C_T$)	± SD ($\Delta\Delta C_T$)	ค่าเฉลี่ย ($\Delta\Delta C_T$)	± SD ($\Delta\Delta C_T$)
ความสามารถในการทำซ้ำภายในผู้ใช้แต่ละรายและระหว่างล็อตทั้งหมด				
ผู้ใช้ทั้งหมด, ล็อต 1- ล็อต 1	0.00	0.00	0.00	0.00
ผู้ใช้ทั้งหมด, ล็อต 1- ล็อต 2	–0.03	0.48	–0.07	0.66
ผู้ใช้ทั้งหมด, ล็อต 1- ล็อต 3	–0.21	0.52	0.11	0.71
ความสามารถในการทำซ้ำภายในผู้ใช้แต่ละรายและระหว่างล็อตทั้งหมด				
ล็อตทั้งหมด, ผู้ใช้ A- ผู้ใช้ A	0.00	0.00	0.00	0.00
ล็อตทั้งหมด, ผู้ใช้ A–ผู้ใช้ B	–0.46	0.44	–0.06	0.69
ล็อตทั้งหมด, ผู้ใช้ A–ผู้ใช้ C	–0.31	0.60	–0.15	0.71

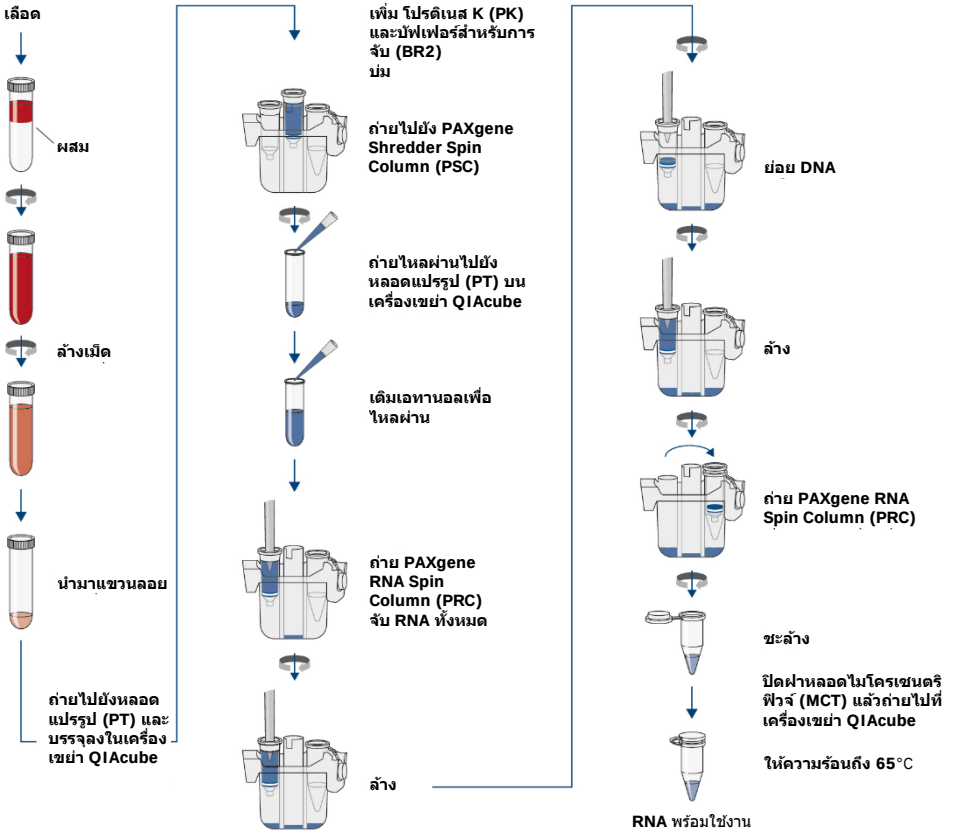
ผู้ใช้: เจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการ ทำการศึกษา
ล็อต: จำนวนล็อตชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษานี้
SD: ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ค่าเฉลี่ย $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจะแสดงสำหรับข้อมูลที่แสดงในรูปที่ 8 และ 9

การทำ RNA ให้บริสุทธิ์แบบอัตโนมัติ

การทำ RNA ในเลือดให้บริสุทธิ์เป็นไปโดยอัตโนมัติบน QIAGEN QIAcube Connect MDx หรือ QIAGEN QIAcube แบบคลาสสิก (ต่อไปนี้เรียกว่า QIAcube) เครื่องมือ QIAcube ที่เป็นนวัตกรรมใหม่ใช้เทคโนโลยีขั้นสูงในการประมวลผลคอลัมน์สปิน QIAGEN ทำให้สามารถทำการรวมการเตรียมตัวอย่างอัตโนมัติที่มีปริมาณงานต่ำเข้ากับขั้นตอนการทำงานในห้องปฏิบัติการของคุณได้อย่างราบรื่น การเตรียมตัวอย่างโดยใช้เครื่องมือ QIAcube เป็นไปตามขั้นตอนเดียวกับขั้นตอนแบบแมนนวล (เช่น ทำให้แตกออก จับ ล้างและชะล้าง) ทำให้คุณสามารถใช้ PAXgene Blood RNA Kit ต่อไปเพื่อการทำ RNA คุณภาพสูงให้บริสุทธิ์

รูปที่ 10 QIAcube Connect MDx

แนวทางปฏิบัติในการทำ RNA **ให้บริสุทธิ์แบบอัตโนมัติประกอบด้วย** 2 **ส่วน (หรือแนวทางปฏิบัติ) คือ** "PAXgene Blood RNA Part A" **และ** "PAXgene Blood RNA Part B" **โดยมีการแทรกแซงแบบแมนนวลสั้น ๆ ระหว่าง** 2 **ส่วน (ดู รูปที่** 11, **หน้า** 31)



รูปที่ 11 ขั้นตอน PAXgene Blood RNA อัตโนมัติ

เม็ดกรดนิวคลีอิกที่ผ่านการหมุนเหวี่ยง ล้างและนำมาแขวนลอยใหม่ (ดู "ความเข้มข้นของ RNA และการทำให้บริสุทธิ์", หน้า 19) จะถูกถ่ายจาก PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ไปยังหลอดแปรรูป (PT) ซึ่งถูกวางลงในชุดเครื่องให้ความร้อนแบบหมุนวนบนโต๊ะทำงานของเครื่องมือ QIAcube ผู้ปฏิบัติงานจะเลือกและเริ่มแนวทางปฏิบัติ "PAXgene Blood RNA Part A" จากเมนู เครื่องมือ QIAcube ดำเนินการตามขั้นตอนของแนวทางปฏิบัติจนถึงการชะล้าง RNA ใน บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) ผู้ปฏิบัติงานจะถ่ายหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (MCT) ที่มี RNA บริสุทธิ์ไปยังชุดเครื่องให้ความร้อนแบบหมุนวนของ

เครื่องมือ QIAcube ผู้ปฏิบัติงานจะเลือกและเริ่มแนวทางปฏิบัติ "PAXgene Blood RNA Part B" จากเมนู และการแปลงสภาพด้วยความร้อนจะดำเนินการโดยเครื่องมือ QIAcube

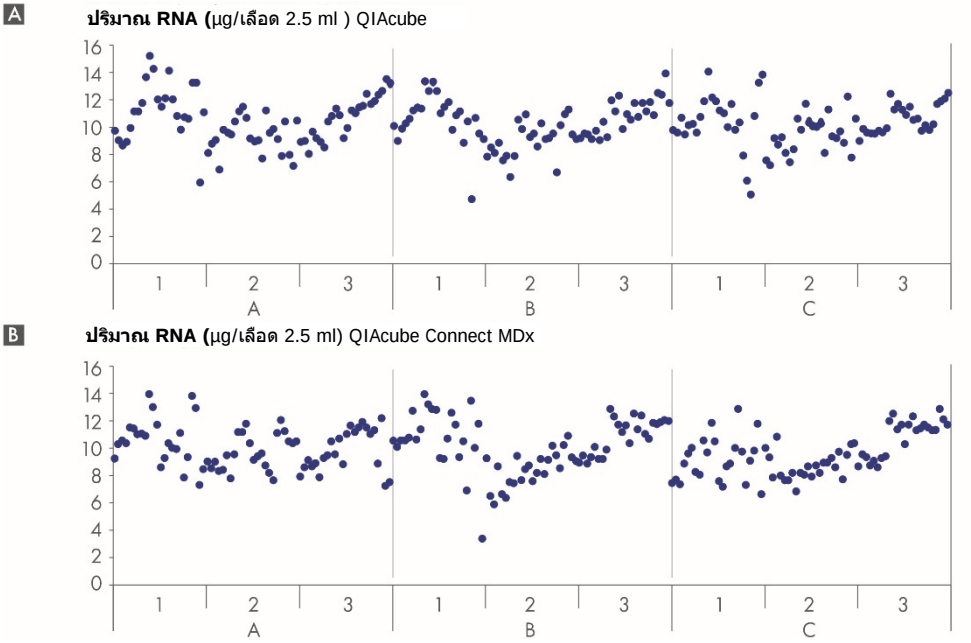
เวลาในการเตรียมตัวอย่างเฉลี่ย (ตามข้อมูลจากการดำเนินการเตรียมตัวอย่าง 12 ครั้ง) คือ 151 นาที * โดยมีเวลาในการปฏิบัติจริงน้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับแนวทางปฏิบัติแบบแมนนวล

ปริมาณ RNA จากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่มีสุขภาพดี 2.5 ml คือ ≥3 µg สำหรับ ≥95% ของตัวอย่างที่ประมวลผล รูปที่ 12 (หน้า 33) ระบุปริมาณ RNA จากทั้งหมด 216 ตัวอย่างที่เตรียมโดยใช้แนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติที่มีล็อตชุดอุปกรณ์ 3 ล็อต โดยผู้ปฏิบัติงาน 3 ราย เนื่องจากมีการใช้ตัวอย่างเลือดที่รวมกันแทน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) สำหรับการศึกษาเหล่านี้ ผลลัพธ์ไม่ได้แสดงถึงปริมาณ RNA ที่คาดหวังจากตัวอย่างเดียวของการเจาะเลือดแต่ละครั้ง เนื่องจากปริมาณขึ้นอยู่กับผู้บริจาคเป็นอย่างยิ่ง ปริมาณของแต่ละรายอาจแตกต่างกันไป (รูปที่ 12, หน้า 33)

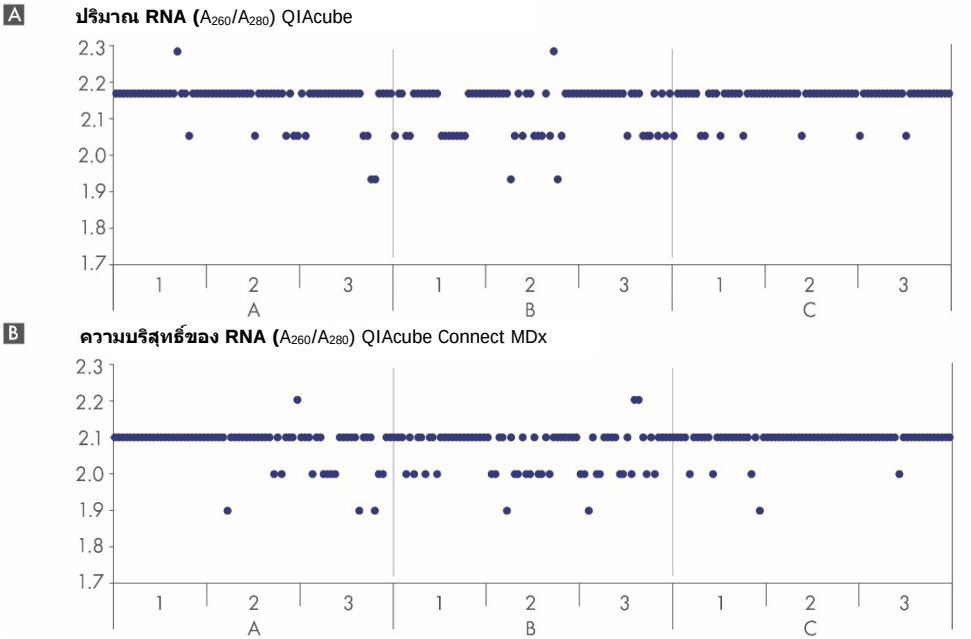
ตัวอย่างอย่างน้อย 95% แสดงว่าไม่มีการยับยั้งใน RT-PCR เมื่อใช้การชะล้างถึง 30% การใช้แนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติ การปนเปื้อนข้ามระหว่างตัวอย่างจะไม่สามารถตรวจจับได้โดยวัดจากลำดับ RT-PCR เชิงปริมาณแบบเรียลไทม์ของการคัดลอก ABL1 และ FOS ในตัวอย่าง RNA ลบ (น้ำ) ที่จับคู่กับตัวอย่าง RNA บวก (เลือดครบส่วนของมนุษย์) ในการดำเนินการเดียวกัน

RNA ที่แยกด้วย PAXgene Blood RNA System และแนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติมีความบริสุทธิ์ดังที่แสดงโดยไม่มีการยับยั้ง RT-PCR และค่า A_{260}/A_{280} ระหว่าง 1.8 ถึง 2.2 DNA ของจีโนมมีอยู่ที่ ≤1% (w/w) ใน ≥95% ของตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งวัดโดย real-time PCR เชิงปริมาณของลำดับของยีนเบต้า - แอกติน รูปที่ 13 และ 14 (หน้า 34 และ 35) แสดงค่า A_{260}/A_{280} และ DNA ของจีโนมสัมพัทธ์จากทั้งหมด 216 ตัวอย่างที่เตรียมโดยใช้แนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติที่มีล็อตชุดอุปกรณ์ 3 ล็อตโดยผู้ปฏิบัติงาน 3 ราย

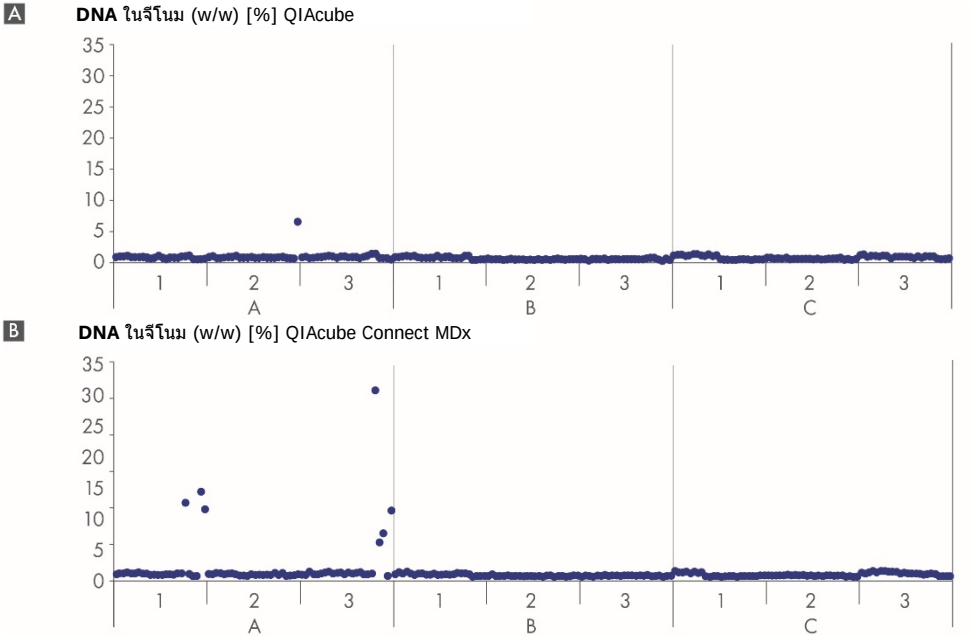
* เวลาในการดำเนินการตามแนวทางปฏิบัติทั้งหมดรวมถึงการจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes ล่วงหน้า (การหมุนเหวี่ยง การล้างเม็ดและการแขวนลอยของเม็ด)



รูปที่ 12 ปริมาณ RNA - การประมวลผลอัตโนมัติ A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคแต่ละรายใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) สิ่งที่บรรจุของหลอดถูกรวมเข้าด้วยกันในกลุ่มผู้บริจาค 6 กลุ่ม และต่อมาได้รับการจัดสรรใหม่ ทั้งหมด 216 หลอด (เช่น 36 ต่อกลุ่ม) ถูกประมวลผลโดยผู้ปฏิบัติงาน 3 ราย (A, B, C) ผู้ปฏิบัติงานแต่ละรายใช้ล็อต (1, 2, 3) ของ PAXgene Blood RNA Kit ที่ต่างกัน 3 ล็อตสำหรับการสกัดแบบอัตโนมัติด้วยเครื่องมือ QIAcube และ QIAcube Connect MDx หลายเครื่องและประมวลผลตัวอย่างสี่ส่วนจากแต่ละกลุ่มผู้บริจาค 6 กลุ่ม ปริมาณ RNA ของแต่ละตัวอย่างทั้งหมดจะแสดงสำหรับการรวมล็อต - ผู้ปฏิบัติงานทุกราย

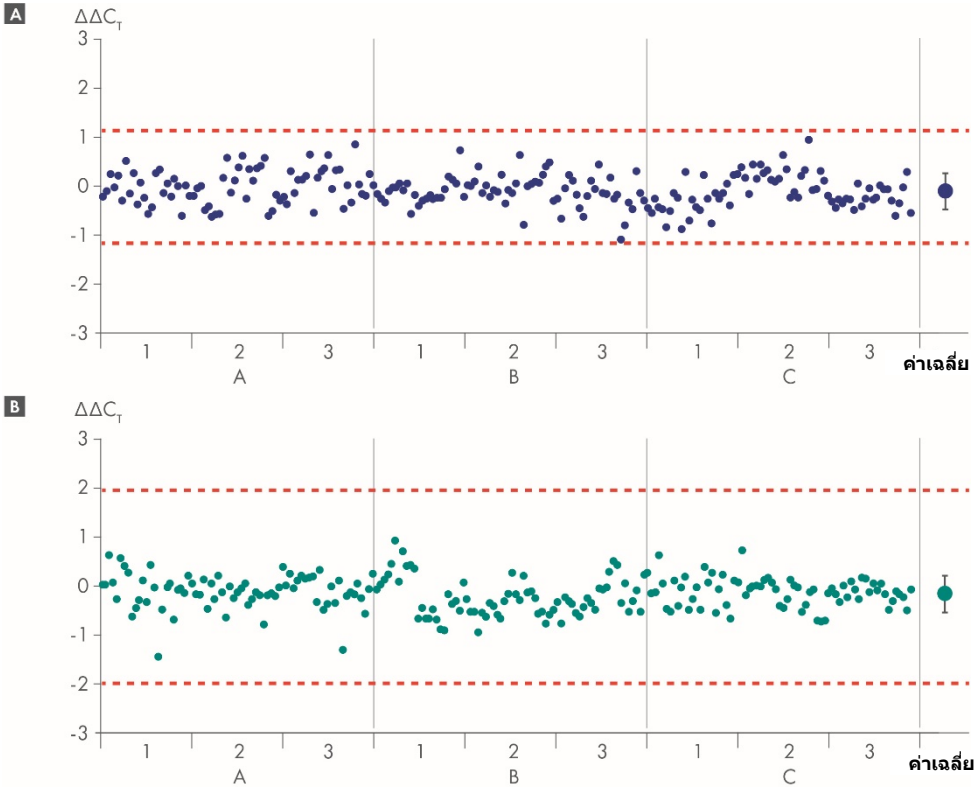


รูปที่ 13 ความบริสุทธิ์ของ RNA (ค่า A_{260}/A_{280}) — การประมวลผลอัตโนมัติ A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx RNA ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผู้ปฏิบัติงาน 3 รายที่ต่างกัน (A, B, C) โดยใช้ 3 ล็อตที่ต่างกัน (1, 2, 3) ของ PAXgene Blood RNA Kit พร้อมด้วยเครื่องมือ QIAcube และ QIAcube Connect MDx หลายเครื่องในการทดลองที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 12 ค่า A_{260}/A_{280} ของแต่ละตัวอย่างจะแสดงสำหรับการรวมล็อต- ผู้ปฏิบัติงานทุกราย

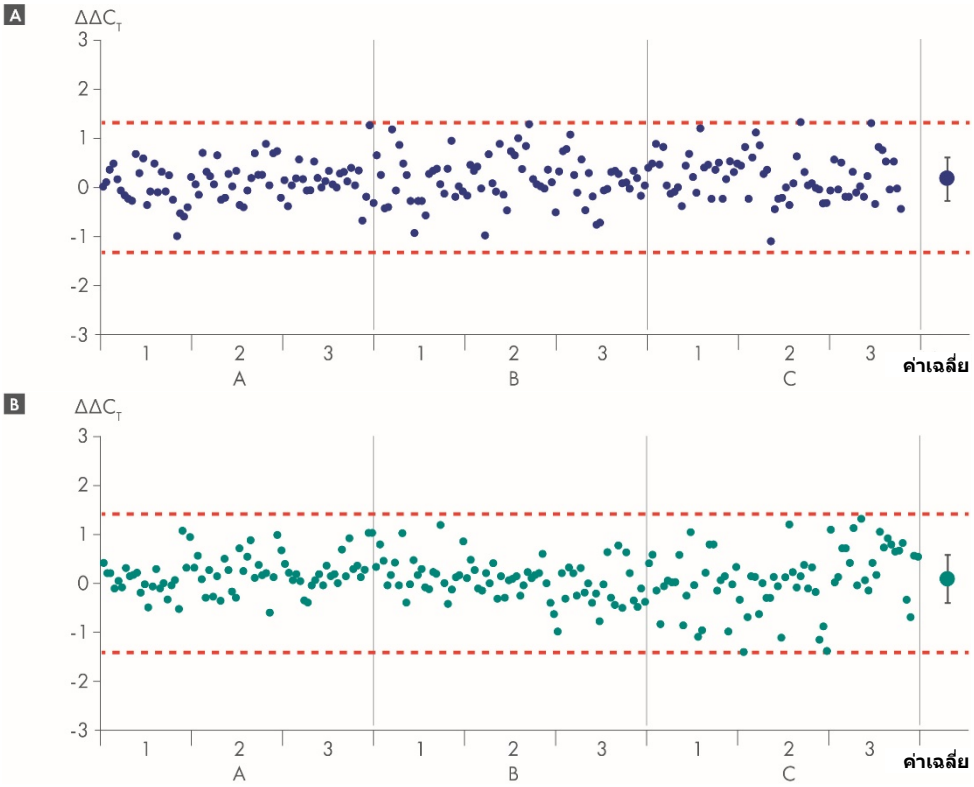


รูปที่ 14 ความบริสุทธิ์ของ RNA (% การปนเปื้อนของ DNA ในจีโนม) - การประมวลผลอัตโนมัติ A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx RNA ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผู้ปฏิบัติงาน 3 ราย (A, B, C) โดยใช้ 3 ล็อตที่ต่างกัน (1, 2, 3) ของ PAXgene Blood RNA Kit พร้อมด้วยเครื่องมือ QIAcube และ QIAcube Connect MDx หลายเครื่องในการทดลองที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 12 จำนวน DNA ในจีโนม (w/w) ในแต่ละตัวอย่างจะแสดงสำหรับการรวมล็อต - ผู้ปฏิบัติงานทุกราย

แนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติของการทำ RNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ PAXgene Blood RNA System ให้ผลลัพธ์ RT-PCR ที่วัดซ้ำได้และทำซ้ำได้ดังที่แสดงในรูปที่ 15 และ รูปที่ 16 (หน้า 36 และ 37) ทำให้มีความทนทานสูงสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางคลินิก



รูปที่ 15 ความสามารถในการทำซ้ำของ RT-PCR - ระหว่างแนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติ (QIAcube) และแบบแมนนวล RNA ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผู้ปฏิบัติงาน 3 ราย (A, B, C) โดยใช้ 3 ล็อตที่ต่างกัน (1, 2, 3) ของ PAXgene Blood RNA Kit พร้อมเครื่องมือ QIAcube และ QIAcube Connect MDx หลายเครื่องโดยใช้แนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติในการทดลองที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 12 ในแบบคู่ขนาน RNA ถูกทำให้บริสุทธิ์จากหลอดทำซ้ำที่ตรงกันโดยใช้แนวทางปฏิบัติแบบแมนนวล ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ [**A**] FOS และ [**B**] IL1B ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ความแตกต่างของระดับการคัดลอกที่เป็นไปได้ระหว่าง RNA ที่เตรียมจากตัวอย่างเลือดที่จับคู่โดยใช้แนวทางปฏิบัติของการสกัดทั้งสองแบบ (แนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติและแบบแมนนวล) ค่านวณโดยวิธี $\Delta\Delta C_T$ ค่า $\Delta\Delta C_T$ แต่ละค่าสำหรับคู่ตัวอย่างทั้งหมด (การทำซ้ำ 4 x กลุ่มผู้บริจาค 6 x ล็อตชุดอุปกรณ์ 3 x ผู้ปฏิบัติการ 3 = คู่สำหรับแต่ละยีน 216) ถูกพล็อตเป็นจุดเดียวด้วยค่าเฉลี่ย (จุดใหญ่กว่า) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แถบสีดำ) สำหรับตัวอย่างทั้งหมดที่แสดง เส้นประระบุความแม่นยำรวมของการทดสอบ ±3x (FOS: 1.16 C_T; IL1B: 1.98 C_T; ความแม่นยำในการทดสอบที่ต่างกันเมื่อเทียบกับรูปที่ 1-4,8 และ 9 เนื่องจากเวอร์ชันการทดสอบที่ต่างกัน)



รูปที่ 16 ความสามารถในการทำซ้ำของ RT-PCR - ระหว่าง QIAcube และ QIAcube Connect MDx โดยใช้แนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติ RNA ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผู้ปฏิบัติงานที่ต่างกัน 3 ราย (A, B, C) โดยใช้ 3 ล็อตที่ต่างกัน (1, 2, 3) ของ PAXgene Blood RNA Kit โดยใช้แนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติบนเครื่องมือ QIAcube และ QIAcube Connect MDx หลายเครื่องในการทดลองที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 12 ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ [**A**] FOS และ [**B**] IL1B ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ความแตกต่างของระดับการคัดลอกที่เป็นไปได้ระหว่าง RNA ที่เตรียมจากตัวอย่างเลือดที่จับคู่โดยใช้เครื่องมือทั้งสองถูกคำนวณโดยวิธี $\Delta\Delta C_T$ ค่า $\Delta\Delta C_T$ แต่ละค่าสำหรับคู่ตัวอย่างทั้งหมด (การทำซ้ำ 4 x กลุ่มผู้บริจาค 6 x ล็อตชุดอุปกรณ์ 3 x ผู้ปฏิบัติการ 3 = คู่สำหรับแต่ละยีน 216) ถูกพล็อตเป็นจุดเดียวด้วยค่าเฉลี่ย (จุดใหญ่กว่า) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แถบสีดำ) สำหรับตัวอย่างทั้งหมดที่แสดง เส้นประระบุความแม่นยำรวมของการทดสอบ ±3x (FOS: 1.30 C_T; IL1B: 1.42 C_T; ความแม่นยำในการทดสอบที่ต่างกันเมื่อเทียบกับรูปที่ 1-4, 8, 9 และ 15 เนื่องจากเวอร์ชันการทดสอบที่ต่างกัน)

ผู้ใช้จะจัดหาอุปกรณ์และสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา

เมื่อทำงานกับสารเคมี ควรสวมเสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้งและแว่นตาป้องกันที่เหมาะสมเสมอ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดอ่านเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDSs) ที่เหมาะสม ที่มีให้จากผู้ผลิตสินค้า

สำหรับแนวทางปฏิบัติทั้งหมด

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; หมายเลขแคตตาล็อก 762165)
- เอทานอล (96–100%, เกรดความบริสุทธิ์ p.a.)
- ปิเปต* (10 µl – 4 ml)
- ทิปปิเปตปลอดเชื้อ กันละออง ปราศจาก RNase†
- กระบอกตวง‡
- เครื่องหมุนเหวี่ยง* สามารถรับ 3,000–5,000 x *g* และติดตั้งโรเตอร์แบบแกว่งออกและถังสำหรับเก็บ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- เครื่องผสมสารละลาย*
- น้ำแข็งเกล็ด
- ปากกาชนิดหมึกติดถาวรสำหรับปิดฉลาก

* ตรวจสอบให้มั่นใจว่าอุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ได้รับการตรวจสอบ บำรุงรักษาและสอบเทียบมาตรฐานเป็นประจำตามคำแนะนำของผู้ผลิต

† ตรวจสอบให้มั่นใจว่าคุณคุ้นเคยกับแนวปฏิบัติในการจัดการ RNA (ภาคผนวก A, หน้า 71)

‡ สำหรับการเติมเอทานอลลงในบัฟเฟอร์ BR4 เข้มข้น

สำหรับแนวทางปฏิบัติแบบแมนนวล

- ไมโครเซนติฟิวจ์ความเร็วรอบ* ที่สามารถเข้าถึงช่วงได้อย่างน้อย 1,000–8000 x *g* แม้ว่าจะใช้แรง g ที่ต่ำกว่าและสูงกว่าก็ตาม (ดูขั้นตอนของแนวทางปฏิบัติสำหรับรายละเอียด) และติดตั้งโรเตอร์สำหรับหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 2 ml
- ตู้บ่มแบบเขย่า * สามารถบ่มที่อุณหภูมิ 55°C และ 65°C และเขย่าที่ ≥400 rpm ไม่เกิน 1,400 rpm (เช่น Eppendorf® Thermomixer Compact หรือเทียบเท่า)

สำหรับแนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติ (ใช้ QIAcube หรือ QIAcube Connect MDx)

- กรรไกร

วัสดุสิ้นเปลืองเครื่องมือ QIAcube:

- ทิปฟิลเตอร์, 1000 µl (1024) (QIAGEN, หมายเลขแคตตาล็อก 990352)†
- ขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา, 30 ml (6) (QIAGEN, หมายเลขแคตตาล็อก 990393)†
- อะแดปเตอร์โรเตอร์ (10 x 24) (QIAGEN, หมายเลขแคตตาล็อก 990394)†

อุปกรณ์เสริมเครื่องมือ QIAcube:

- ที่ยึดอะแดปเตอร์โรเตอร์ (QIAGEN, หมายเลขแคตตาล็อก 990392)†

สำหรับแนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติโดยใช้ QIAcube Connect MDx

- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, หมายเลขแคตตาล็อก 9003070)

* ตรวจสอบให้มั่นใจว่าอุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ได้รับการตรวจสอบ บำรุงรักษาและสอบเทียบมาตรฐานเป็นประจำตามคำแนะนำของผู้ผลิต

† รวมอยู่ใน Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, หมายเลขแคตตาล็อก 990395)

รวมชุดบริการ QIAcube Connect MDx:

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

สำหรับแนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติโดยใช้ QIAcube

- QIAcube * (QIAGEN, **หมายเลขแคตตาล็อก** 9001882 [110 V])

***** **ตรวจสอบให้มั่นใจว่าอุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ได้รับการตรวจสอบ บำรุงรักษาและสอบเทียบมาตรฐานเป็นประจำตามคำแนะนำของผู้ผลิต**

บันทึกสำคัญ

การใช้เครื่องมือ QIAcube

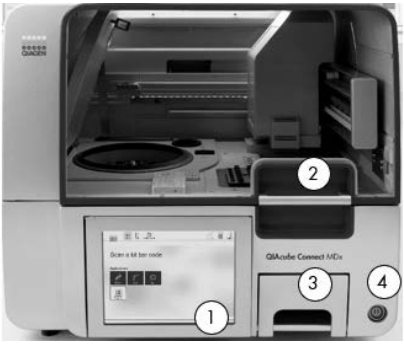
ตรวจสอบให้มั่นใจว่าคุณคุ้นเคยกับการใช้งานเครื่องมือ QIAcube โปรดอ่านคู่มือผู้ใช้เครื่องมือ QIAcube ที่เหมาะสม และข้อมูลเพิ่มเติมใด ๆ ที่ให้มาพร้อมกับเครื่องมือ QIAcube โดยให้ความสำคัญกับข้อมูลความปลอดภัยอย่างรอบคอบก่อนที่จะเริ่มแนวทางปฏิบัติ PAXgene Blood RNA แบบอัตโนมัติ

คำแนะนำในส่วนนี้ใช้กับ QIAcube Connect MDx เช่นเดียวกับ QIAcube ที่ไม่ได้ระบุแยกต่างหาก

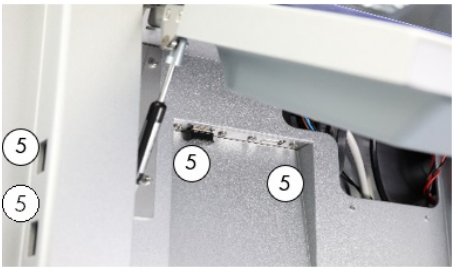
การเริ่มใช้เครื่องมือ QIAcube

ปิดฝาครอบเครื่องมือ QIAcube และเปิดสวิตช์เครื่องมือ QIAcube ด้วยสวิตช์เปิด/ปิด (QIAcube Connect MDx: ดู **รูปที่** 17, หน้า42; QIAcube: **รูปที่** 18, หน้า 43)

เสียงบี๊บดังขึ้นและหน้าจอเริ่มต้นจะปรากฏขึ้น เครื่องมือทำการทดสอบการเริ่มต้นโดยอัตโนมัติ



มุมมองด้านหน้าของ QIAcube Connect MDx



หน้าจอสัมผัสแบบดึงออก

มุมมองด้านหลังของ QIAcube Connect MDx

มุมมองด้านหลังของ QIAcube Connect MDx

รูปที่ 17 คุณลักษณะภายนอกของ QIAcube Connect MDx

1	หน้าจอสัมผัส	5	พอร์ต USB 2 พอร์ตที่ด้านซ้ายของหน้าจอสัมผัส พอร์ต USB 2 พอร์ตด้านหลังหน้าจอสัมผัส (โมดูล Wi-Fi เสียบเข้ากับพอร์ต USB 1 พอร์ต)
2	ฝาครอบ	6	พอร์ต RJ-45 Ethernet
3	ลิ้นชักขยะ	7	ซ็อกเก็ตสายไฟ
4	สวิตช์เปิด/ปิด	8	ช่องระบายความร้อน

รูปที่ 18 มุมมองด้านหน้าของ QIAcube

1	หน้าจอสัมผัส	4	พอร์ต USB หลังแผงป้องกัน
2	ฝาครอบ	5	สวิตช์เปิด/ปิด
3	พอร์ตอนุกรม RS232 หลังแผงป้องกัน (สำหรับใช้โดยผู้เชี่ยวชาญด้านบริการเครื่องมือ QIAGEN เท่านั้น)	6	ลิ้นชักขยะ

หน้าจอสัมผัส

เครื่องมือ QIAcube ควบคุมโดยใช้หน้าจอสัมผัส หน้าจอสัมผัสช่วยให้ผู้ใช้สามารถใช้งานเครื่องมือและให้แนวทางผู้ใช้ผ่านการตั้งโต๊ะทำงาน ในระหว่างการประมวลผลตัวอย่าง หน้าจอสัมผัสจะแสดงสถานะแนวทางปฏิบัติและเวลาที่เหลือ

รูปที่ 19 หน้าจอสัมผัสแบบดึงออกของ QIAcube Connect MDx

การติดตั้งแนวทางปฏิบัติบนเครื่องมือ QIAcube

อาจจำเป็นต้องทำการติดตั้งแนวทางปฏิบัติเริ่มต้นก่อนที่จะสามารถดำเนินการจัดเตรียม RNA ครั้งแรกบนเครื่องมือ QIAcube ติดตั้งทั้งแนวทางปฏิบัติ "PAXgene Blood RNA Part A" และ "PAXgene Blood RNA Part B"

แนวทางปฏิบัติสำหรับ QIAcube Connect MDx มีให้ที่ www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources (www.qiagen.com/MyQIAcube **สำหรับ** QIAcube) **และจำเป็นต้องดาวน์โหลดลงในแท่ง USB ที่มาพร้อมกับเครื่องมือ QIAcube แนวทางปฏิบัติเหล่านี้จะถูกถ่ายโอนไปยังเครื่องมือผ่านทางพอร์ต USB**

พอร์ต USB (QIAcube Connect MDx: อยู่ที่ด้านข้างของหน้าจอสัมผัส ดูรูปที่ 17, หน้า 42; QIAcube: ด้านหลังแผงป้องกัน ดูรูปที่ 18, หน้า 43) อนุญาตให้เชื่อมต่อเครื่องมือ QIAcube กับแท่ง USB ที่มาพร้อมกับเครื่องมือ QIAcube ไฟล์ข้อมูล เช่น ไฟล์บันทึกหรือไฟล์รายงานสามารถถ่ายโอนผ่านพอร์ต USB จากเครื่องมือ QIAcube ไปยังแท่ง USB ได้

พอร์ต USB ใช้กับแท่ง USB ที่ QIAGEN จัดให้เท่านั้น อย่าเชื่อมต่ออุปกรณ์อื่นเข้ากับพอร์ตนี้

อย่าถอดแท่ง USB ออกขณะดาวน์โหลดแนวทางปฏิบัติหรือถ่ายโอนไฟล์ข้อมูลหรือในระหว่างการเรียกใช้แนวทางปฏิบัติ

สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับขั้นตอนการอัปโหลดแนวทางปฏิบัติไปยังเครื่องมือ QIAcube โปรดดูคู่มือที่เกี่ยวข้องสำหรับเครื่องมือที่ใช้

กำลังโหลดเครื่องมือ QIAcube

เพื่อประหยัดเวลา การโหลดสามารถทำได้ในระหว่างขั้นตอนการหมุนเหวี่ยง 10 นาที หนึ่งหรือทั้งสองขั้นตอน (ขั้นตอนที่ 3 และ 5) ใน "แนวทางปฏิบัติ: การทำให้บริสุทธิ์โดยอัตโนมัติของ RNA ทั้งหมดจากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่เก็บรวบรวมลงใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", หน้า 62

ขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา

ก่อนที่จะใช้เครื่องมือ QIAcube ทุกครั้ง ให้เติมขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาทั้ง 4 ขวดอย่างระมัดระวังด้วยสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่ระบุไว้ใน ตารางที่ 3 (หน้า 46) จนถึงระดับตัวบ่งชี้สูงสุด หรือถ้าเป็นไปไม่ได้ให้ถึงระดับที่อนุญาตโดยปริมาณบัฟเฟอร์ที่ให้มาใน PAXgene Blood RNA Kit ปิดฉลากขวดและฝาให้ชัดเจนด้วยชื่อบัฟเฟอร์ และวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่เติมลงในตำแหน่งที่เหมาะสมบนชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา ใส่ชั้นวางลงบนโต๊ะทำงานของเครื่องมือ QIAcube ดังที่แสดง (รูปที่ 20-22, หน้า 46-48)

ปริมาตรของบัฟเฟอร์ BR2 ที่ให้มาจะไม่เติมขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาจนถึงระดับตัวบ่งชี้ บัฟเฟอร์ BR3 และ BR4 ไม่สามารถเติมขวดจนถึงระดับตัวบ่งชี้หลังจากประมวลผลหลายตัวอย่างในการการดำเนินการครั้งก่อน

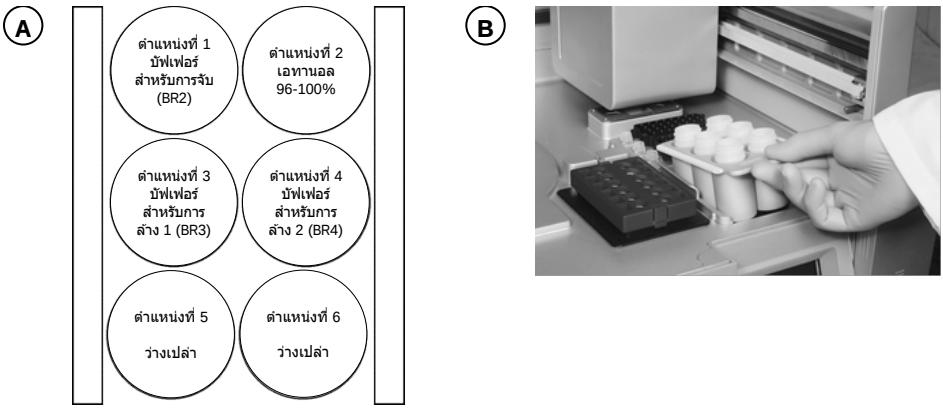
อย่าลืมถอดฝาออกจากขวดก่อนวางลงบนโต๊ะทำงาน

ปริมาณบัฟเฟอร์ที่ให้มาใน PAXgene Blood RNA Kit (50) เพียงพอสำหรับการดำเนินการเตรียม RNA สูงสุด 7 ครั้งบนเครื่องมือ QIAcube โดยมีหมายเลขตัวอย่าง 2 ถึง 12 ต่อการดำเนินการ โดยทั่วไปควรหลีกเลี่ยงการดำเนินการด้วยจำนวนตัวอย่างต่ำกว่าเพื่อประมวลผลทั้งหมด 50 ตัวอย่างต่อชุดอุปกรณ์โดยมีการดำเนินการเตรียม RNA สูงสุด 7 ครั้ง การดำเนินการเตรียม RNA มากกว่า 7 ครั้งอาจทำให้ปริมาณบัฟเฟอร์ไม่เพียงพอสำหรับการประมวลผลตัวอย่างสุดท้าย

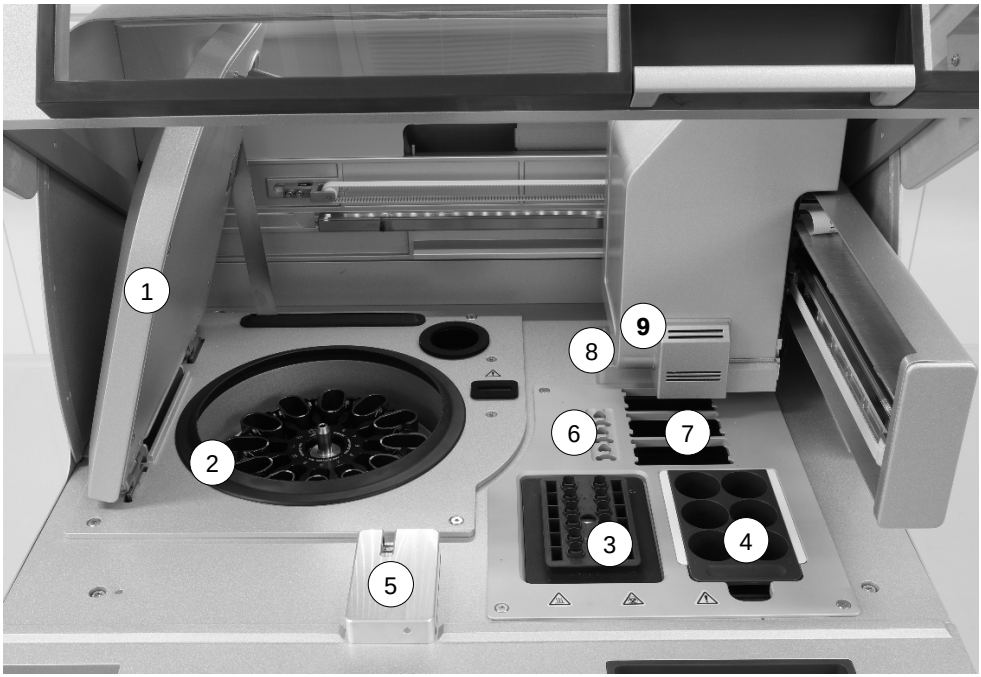
ตารางที่ 3 ตำแหน่งในชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา

ตำแหน่ง	สารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา
1	บัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2)
2	เอทานอล 96-100%
3	บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1 (BR3)
4	บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4)*
5	- (เว้นว่าง)
6	- (เว้นว่าง)

* บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) จัดมาให้เป็นสารเข้มข้น ก่อนใช้ครั้งแรก ให้เติมเอทานอล 4 ปริมาตร (96–100%, เกรดความบริสุทธิ์ p.a.) ตามที่ระบุไว้บนขวดเพื่อให้ได้สารละลายที่ใช้งานได้

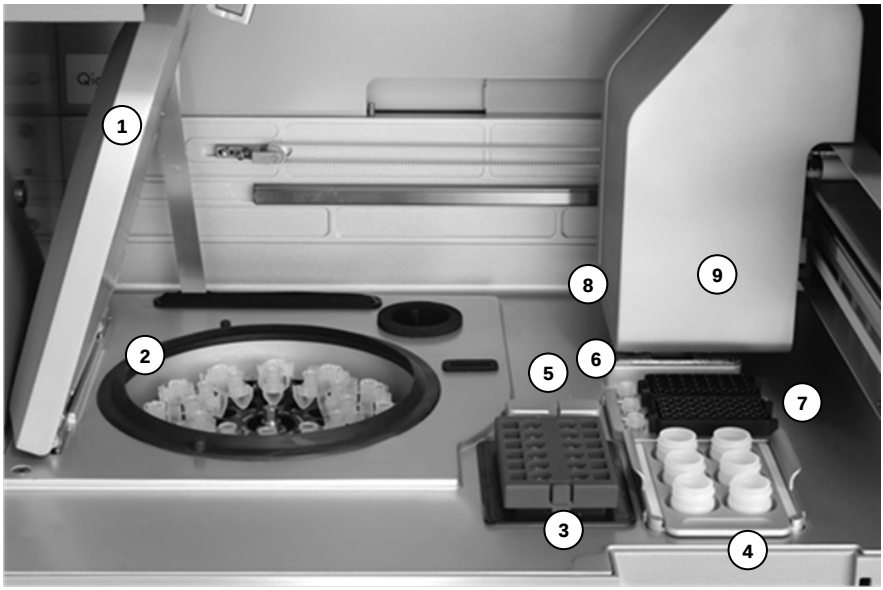


รูปที่ 20 การโหลดชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา [**A**] แผนผังตำแหน่งและสิ่งบรรจุของขวดในชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา [**B**] กำลังโหลดชั้นวางเข้ากับเครื่องมือ QIAcube (QIAcube แสดงเป็นตัวอย่าง)



รูปที่ 21 มุมมองภายในของ QIAcube Connect MDx

1. ฝาหมุนเหวี่ยง
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง
3. เครื่องเขย่า
4. ชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา
5. เซนเซอร์ทิปและตัวล็อกฝาครอบ
6. ช่องใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์
7. 3 ช่องสำหรับชั้นวางทิป
8. ช่องทิ้งสำหรับทิปและคอลัมน์
9. แขนกล (ประกอบด้วย pipettor 1 ช่อง, กริปเปอร์, เซนเซอร์อัลตราโซนิกและออปติคอลและ UV LED)



รูปที่ 22 มุมมองภายในของ QIAcube

1. ฝาหมุนเหวี่ยง
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง
3. เครื่องเขย่า
4. ชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา
5. เซนเซอร์ทิป
6. ช่องใส่หลอดไมโครเซนดิฟิวจ์
7. ชั้นวางทิป
8. ช่องทิ้งสำหรับทิปและคอลัมน์
9. แขนกล

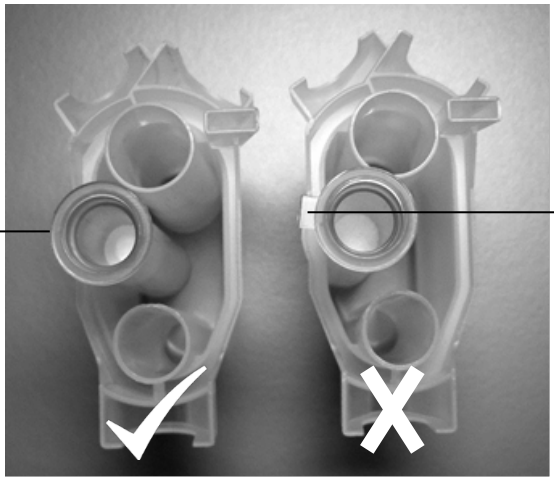
คอลัมน์สปิน (PRC, PSC), หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (MCT) และอุปกรณ์พลาสติกเครื่องมือ QIAcube

วางชั้นวางทิป 2 อันที่มีทิปฟิลเตอร์ 1,000 µl ลงบนเครื่องมือ QIAcube (ดูรูปที่ 21 และ 22, หน้า 47 และ 48) เติมชั้นวางพร้อมทิปเมื่อจำเป็น

ใช้เฉพาะทิปฟิลเตอร์ 1000 µl ที่ออกแบบมาเพื่อใช้กับเครื่องมือ QIAcube

ปิดฉลากโรเตอร์อะแดปเตอร์และหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (MCT) สำหรับแต่ละตัวอย่างโดยใช้ปากกาชนิดหมึกติดถาวร เปิดคอลัมน์สปิน PAXgene Shredder (PSC) ที่จะใช้และตัดฝาออกให้หมดโดยใช้กรรไกร (ดู รูปที่ 23, หน้า 49)

เพื่อการทำงานที่เหมาะสมของอุปกรณ์จับยึดแขนกลเครื่องมือ QIAcube ให้ถอด (ตัด) ฝาและชิ้นส่วนพลาสติกทั้งหมดที่เชื่อมต่อฝาเข้ากับคอลัมน์สปิน PAXgene Shredder (PSC ดูรูปที่ 23) มิฉะนั้นอุปกรณ์จับยึดแขนกลจะไม่สามารถจับคอลัมน์สปิน (PSC, PRC) ได้อย่างถูกต้อง



รูปที่ 23 กำลังโหลดคอลัมน์สปิน PAXgene Shredder (PSC) คอลัมน์สปิน PAXgene Shredder (PSC) ถูกโหลดลงในตำแหน่งกลางของโรเตอร์อะแดปเตอร์ ตัดฝาก่อนโหลดคอลัมน์

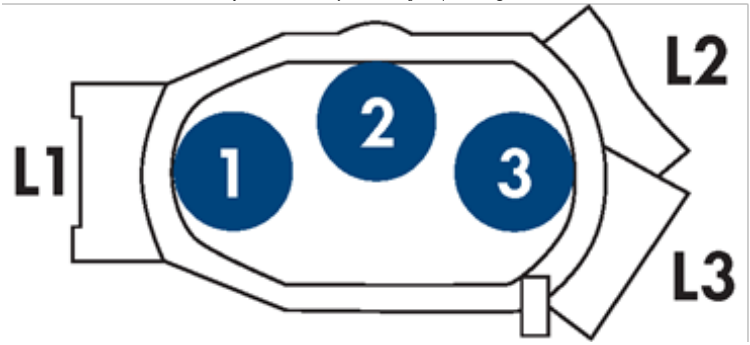
โหลดคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC),คอลัมน์สปิน PAXgene Shredder (PSC; ไม่มีฝาปิด ดู รูปที่ 23, หน้า 49) และหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ปิดฉลากลงในตำแหน่งที่เหมาะสมในโรเตอร์อะแดปเตอร์แต่ละตัวที่ปิดฉลากดังแสดงใน ตารางที่ 4 และ รูปที่ 24

ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้ดันฝาคอลัมน์สปิน (PRC) และฝาหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (MCT) ลงไปจนสุดที่ด้านล่างของช่องที่ขอบของโรเตอร์อะแดปเตอร์มิฉะนั้นฝาจะแตกระหว่างการหมุนเหวี่ยง

ตารางที่ 4 อุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการในโรเตอร์อะแดปเตอร์

ตำแหน่ง	สารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา	ตำแหน่งฝา
1	คอลัมน์สปิน PAXgene RNA (สีแดง, PRC)	L1
2	คอลัมน์สปิน PAXgene Shredder (สีม่วง, PSC) (ตัดฝาก่อนวางในโรเตอร์อะแดปเตอร์)	–
3	หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (MCT)*	L3

* ใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (MCT; 1.5 ml) ที่รวมอยู่ในชุด PAXgene Blood RNA Kit



รูปที่ 24 ตำแหน่งในโรเตอร์อะแดปเตอร์ โรเตอร์อะแดปเตอร์มีตำแหน่งหลอดสามตำแหน่ง (1–3) และตำแหน่งฝาสามตำแหน่ง (L1 – L3)

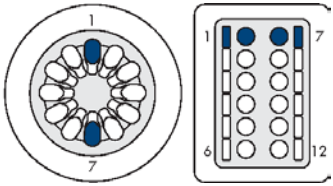
กำลังโหลดเครื่องหมุนเหวี่ยง

โหลดโรเตอร์อะแดปเตอร์ที่ประกอบเข้ากับถังหมุนเหวี่ยงตามที่แสดงใน รูปที่ 25 ด้านล่าง

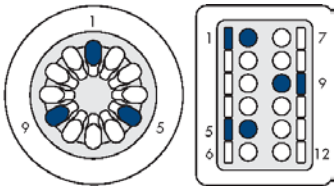
หากประมวลผลน้อยกว่า 12 ตัวอย่าง ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้โหลดโรเตอร์หมุนเหวี่ยงที่สมดุลในแนวรัศมี (ดู รูปที่ 26, หน้า 52) ต้องติดตั้งถังหมุนเหวี่ยงทั้งหมดก่อนเริ่มการดำเนินการแนวทางปฏิบัติแม้ว่าจะต้องดำเนินการน้อยกว่า 12 ตัวอย่างก็ตาม ไม่สามารถประมวลผลตัวอย่างเดียว (หนึ่ง) หรือ 11 ตัวอย่างได้

รูปที่ 25 กำลังโหลดเครื่องหมุนเหวี่ยงบนเครื่องมือ QIAcube โหลดโรเตอร์อะแดปเตอร์ที่ประกอบเข้ากับถังหมุนเหวี่ยง (QIAcube Connect MDx แสดงเป็นตัวอย่าง)

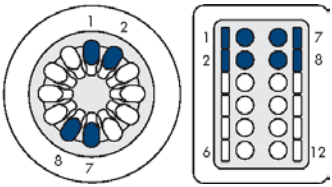
2 ตัวอย่าง



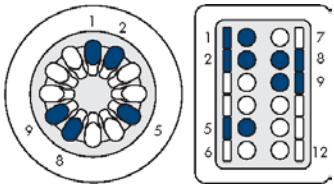
3 ตัวอย่าง



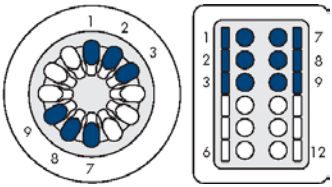
4 ตัวอย่าง



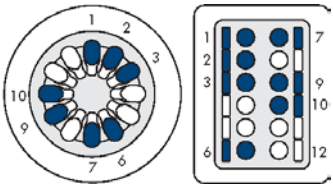
5 ตัวอย่าง



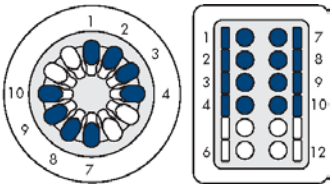
6 ตัวอย่าง



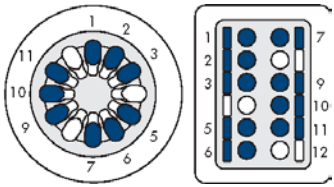
7 ตัวอย่าง



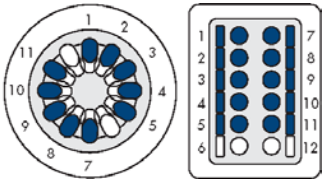
8 ตัวอย่าง



9 ตัวอย่าง



10 ตัวอย่าง



รูปที่ 26 กำลังโหลดเครื่องหมุนเหวี่ยงและเขย่า ตำแหน่งเครื่องหมุนเหวี่ยงและเขย่าจะแสดงสำหรับการประมวลผลจากสอง (2) ถึงสิบ (10) ตัวอย่าง ไม่สามารถดำเนินการหนึ่ง (1) หรือ 11 ตัวอย่างได้ สำหรับการประมวลผล 12 ตัวอย่างจะมีการโหลดตำแหน่งเครื่องหมุนเหวี่ยงและเขย่าทั้งหมด (ไม่แสดงภาพ)

Processing tubes (หลอดแปรรูป) (PT)

ถอดหลอดแปรรูป (PT) ที่เหลืออยู่ในช่องหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ออกจากการดำเนินการก่อนหน้านี้ (QIAcube Connect MDx: ดู รูปที่ 21, หน้า 47, QIAcube: ดู รูปที่ 22, หน้า 48) เติมหลอดแปรรูป 3 หลอด (PT) ด้วยปริมาณสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่ให้มา ตารางที่ 5 ตามจำนวนตัวอย่างในการดำเนินการ

สำหรับส่วนผสมการบ่ม DNase I ให้ปิเปตปริมาตรที่ระบุของบัฟเฟอร์สำหรับการย่อย DNA (RDD) ลงในหลอดแปรรูป (PT) และเพิ่มปริมาตรที่ระบุของสารละลายเข้มข้น DNase I (RNFD) ผสมโดยค่อย ๆ ปิเปตส่วนผสมทั้งหมดขึ้นและลง 3 ครั้งโดยใช้ทิปปิเปต 1,000 µl

ใช้หลอดแปรรูป (PT) ขนาด 2 ml ที่รวมอยู่ใน PAXgene Blood RNA Kit ปิดฉลากหลอดด้วยชื่อสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาอย่างชัดเจนและวางไว้ในตำแหน่งที่เหมาะสมในช่องใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ตามที่ระบุไว้ใน ตารางที่ 6 (หน้า 54)

DNase I (RNFD) มีความไวต่อการแปลงสภาพทางกายภาพเป็นพิเศษ ผสมโดยการปิเปตเท่านั้นโดยใช้ทิปปิเปตแบบเจาะกว้างเพื่อลดการตัดเฉือน อย่าหมุนวน

ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้ปิเปตเฉพาะปริมาตรที่ต้องการตามที่ระบุไว้ใน ตารางที่ 5 ด้านล่าง

ตารางที่ 5 ปริมาณของสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่ต้องใช้ในหลอดแปรรูปสำหรับช่องใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์

	ปริมาณสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาสำหรับจำนวนตัวอย่างที่ระบุ (µl)		
จำนวนตัวอย่าง	**โปรตีเนส K (PK)**	**ผสมการบ่ม DNase I**	**บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5)**
2	126	187 (23 DNase I + 164 บัฟเฟอร์ RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 บัฟเฟอร์ RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 บัฟเฟอร์ RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 บัฟเฟอร์ RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 บัฟเฟอร์ RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 บัฟเฟอร์ RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 บัฟเฟอร์ RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 บัฟเฟอร์ RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 บัฟเฟอร์ RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 บัฟเฟอร์ RDD)	1177

ตารางที่ 6 ช่องใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

	ตำแหน่ง		
	A	**B**	**C**
สิ่งที่บรรจุ	โปรตีเนส K	ผสมการบ่ม DNase I	บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5)
หลอด	หลอดแปรรูป (PT)*	หลอดแปรรูป (PT)*	หลอดแปรรูป (PT)*

* ใช้หลอดแปรรูปขนาด 2 ml ที่รวมอยู่ใน PAXgene Blood RNA Kit

แนวทางปฏิบัติ: การทำ RNA ทั้งหมดให้บริสุทธิ์แบบแมนนวลจากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่เก็บรวบรวมไว้ใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

จุดสำคัญก่อนเริ่ม

- **ตรวจสอบให้มั่นใจว่ากล่องชุดอุปกรณ์ไม่บุบสลายและไม่เสียหายและบัฟเฟอร์ไม่รั่วไหล อย่าใช้ชุดอุปกรณ์ที่ได้รับความเสียหาย**
- **เมื่อใช้ปิเปต ตรวจสอบให้มั่นใจว่าตั้งค่าเป็นปริมาตรที่ถูกต้องและมีการดูดและจ่ายของเหลวนั้นอย่างระมัดระวังและสมบูรณ์**
- **เพื่อหลีกเลี่ยงการถ่ายโอนตัวอย่างไปยังหลอดหรือคอลัมน์สปินที่ไม่ถูกต้อง ตรวจสอบให้มั่นใจว่าหลอดและคอลัมน์สปินทั้งหมดปิดฉลากอย่างถูกต้องโดยใช้ปากกาชนิดหมึกติดถาวร ปิดฉลากที่ฝาและตัวของแต่ละหลอด (PT, MCT) สำหรับคอลัมน์สปิน ให้ปิดฉลากที่ตัวหลอดแปรรูป (PT) ปิดหลอดหรือคอลัมน์สปินแต่ละอันหลังจากถ่ายโอนของเหลวเข้าไป**
- **การรั่วไหลของตัวอย่างและบัฟเฟอร์ในระหว่างขั้นตอนอาจทำให้ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA ลดลง**
- **ขั้นตอนทั้งหมดของแนวทางปฏิบัตินี้รวมถึงขั้นตอนการหมุนเหวี่ยง ควรดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง (15-25°C) เว้นแต่จะระบุไว้เป็นอย่างอื่น**

เนื่องจากความไวของเทคโนโลยีการขยายกรดนิวคลีอิก จึงจำเป็นต้องมีข้อควรระวังต่อไปนี้ในการจัดการตัวอย่างเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม:

- **ปิเปตตัวอย่างลงในคอลัมน์สปิน (PRC, PSC) อย่างระมัดระวังโดยไม่ทำให้ขอบของคอลัมน์เปียกชื้น**
- **เปลี่ยนทิปปิเปตเสมอระหว่างการถ่ายโอนของเหลว ใช้ทิปปิเปตป้องกันละอองลอย**
- **หลีกเลี่ยงการสัมผัสเมมเบรนคอลัมน์สปิน (PRC, PSC) ด้วยทิปปิเปต**
- **หลังจากหมุนวนหรือให้ความร้อนกับหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (MCT) ให้หมุนเหวี่ยงสั้น ๆ เพื่อเอาหยดออกจากด้านในของฝา**

- สวมถุงมือตลอดขั้นตอนทั้งหมด ในกรณีที่สัมผัสกันระหว่างถุงมือกับตัวอย่าง ให้เปลี่ยนถุงมือทันที
- ปิดคอลัมน์สปิน (PRC, PSC) ก่อนวางลงในไมโครเซนติฟิวจ์ หมุนเหวี่ยงตามที่อธิบายไว้ในขั้นตอน
- เปิดคอลัมน์สปินเพียงครั้งละหนึ่งคอลัมน์ (PRC, PSC) และระวังเพื่อหลีกเลี่ยงให้เกิดละอองลอย
- สำหรับการประมวลผลหลายตัวอย่างแบบขนานที่มีประสิทธิภาพ ให้เติมชั้นวางด้วยหลอดแปรผล (PT) ซึ่งสามารถถ่ายโอนไปคอลัมน์สปิน (PRC, PSC) ได้หลังจากการหมุนเหวี่ยง ทิ้งหลอดแปรผล (PT) ที่ใช้แล้วที่มีการไหลผ่านและวางหลอดแปรผล (PT) ใหม่ที่มีคอลัมน์สปิน (PRC, PSC) โดยตรงในไมโครเซนตริฟิวจ์

สิ่งที่ต้องทำก่อนเริ่ม

- ต้องเก็บเลือดใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ตามคำแนะนำในคู่มือ *PAXgene Blood RNA Tube* หากจำเป็น ดูภาคผนวก C (หน้า 74) สำหรับคำแนะนำในการจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- ตรวจสอบให้มั่นใจว่า PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ได้รับการบ่มอย่างน้อย 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหลังการเจาะเลือดเพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์เม็ดเลือดแตกสมบูรณ์ การบ่มโดย PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ตลอดคืนอาจเพิ่มปริมาณได้ ถ้า PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ถูกจัดเก็บไว้ที่ 2–8°C, –20°C หรือ –70°C หลังการเจาะเลือด ให้ปรับให้สมดุลกับอุณหภูมิห้องก่อนแล้วจึงจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนเริ่มขั้นตอน
- อ่านข้อมูลความปลอดภัยในหน้า 10
- อ่านคำแนะนำในการจัดการ RNA (ภาคผนวก A, หน้า 71)
- ตรวจสอบให้มั่นใจว่าเครื่องมือต่าง ๆ นั้น เช่น ปิเปตและตู้บ่มแบบเขย่าได้รับการตรวจสอบและสอบเทียบมาตรฐานเป็นประจำตามคำแนะนำของผู้ผลิต
- ต้องใช้ตู้บ่มแบบเขย่าในขั้นตอนที่ 5 และ 20 ตั้งอุณหภูมิของตู้บ่มแบบเขย่าเป็น 55°C
- บัฟเฟอร์การจับ (BR2) อาจก่อตัวเป็นตะกอนเมื่อจัดเก็บ ถ้าจำเป็นให้อุ่นที่ 37°C เพื่อละลาย
- บัฟเฟอร์การล้าง 2 (BR4) จัดมาให้เป็นสารเข้มข้น ก่อนใช้ครั้งแรก ให้เติมเอทานอล 4 ปริมาตร (96–100%, เกรดความบริสุทธิ์ p.a.) ตามที่ระบุไว้บนขวดเพื่อให้ได้สารละลายที่ใช้งานได้

- **หากใช้ RNase-Free DNase Set เป็นครั้งแรก ให้เตรียมสารละลายเข้มข้น DNase I ละลายของแข็ง DNase I (RNFD; 1500 หน่วย Kunitz) * ใน 550 µl ของบัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย Dnase (DRB) ที่มาพร้อมกับชุด ระวังอย่าให้ DNase I (RNFD) หายไปเมื่อเปิดขวด อย่าหมุนวน DNase I (RNFD) ที่สร้างขึ้นใหม่ DNase I มีความไวต่อการแปลงสภาพทางกายภาพเป็นพิเศษ การผสมควรทำโดยการพลิกขวดเบา ๆ เท่านั้น**
- **ข้อมูลปัจจุบันแสดงให้เห็นว่า DNase I (RNFD) ที่สร้างขึ้นใหม่สามารถจัดเก็บที่อุณหภูมิ 2–8°C ได้นานถึง 6 สัปดาห์ สำหรับการจัดเก็บ DNase I (RNFD) ในระยะยาว ให้นำสารละลายเข้มข้นออกจากขวดแก้ว แบ่งออกเป็นส่วนย่อยใช้ครั้งเดียว (ใช้หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 ml [MCT] ที่ให้มาพร้อมกับชุดอุปกรณ์ มีเพียงพอสำหรับ 5 ส่วน) และจัดเก็บที่อุณหภูมิ –20°C ได้นานถึง 9 เดือน ส่วนย่อยที่ละลายแล้วสามารถจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2–8°C ได้นานถึง 6 สัปดาห์ อย่าแช่แข็งส่วนย่อยหลังจากละลาย**
- **เมื่อสร้างใหม่และแยกส่วนย่อยของ DNase I (RNFD) ตรวจสอบให้มั่นใจว่าคุณปฏิบัติตามคำแนะนำในการจัดการ RNA (ภาคผนวก A, หน้า 71)**

* หน่วย Kunitz เป็นหน่วยที่ใช้โดยทั่วไปสำหรับการวัด DNase I ซึ่งกำหนดเป็นปริมาณ DNase I ที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นใน A_{260} ของ 0.001 ต่อนาทีต่อมิลลิลิตรที่ 25°C, pH 5.0 โดยมี DNA พอลิเมอไรซ์สูงเป็นสารตั้งต้น (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 และ 363)

ขั้นตอน

1. หมุนเหวี่ยง PAXgene Blood RNA Tube (BRT) เป็นเวลา 10 นาทีที่ 3,000–5,000 x *g* โดยใช้โรเตอร์แบบแกว่งออก

   ตรวจสอบให้มั่นใจว่าตัวอย่างเลือดได้รับการบ่มในหลอด PAXgene Blood RNA Tube (BRT) เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (15–25°C) เพื่อให้ได้เซลล์เม็ดเลือดแตกอย่างสมบูรณ์

   โรเตอร์ต้องมีอะแดปเตอร์หลอดสำหรับหลอดก้นกลม หากใช้อะแดปเตอร์หลอดชนิดอื่น หลอดอาจแตกระหว่างการหมุนเหวี่ยง

2. นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยการรินหรือปิเปต เติมน้ำปราศจาก RNase (RNFW) 4 ml ลงในเม็ด และปิดหลอดโดยใช้แผ่นปิด BD Hemogard รองใหม่ (ให้มาพร้อมกับชุดอุปกรณ์)

   หากรินสารเหนือตะกอน ให้ระวังอย่ารบกวนเม็ดและเช็ดขอบหลอดให้แห้งด้วยกระดาษเช็ดมือที่สะอาด

3. หมุนวนจนกว่าเม็ดจะละลายอย่างเห็นได้ชัดและหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาทีที่ 3,000–5,000 x *g* โดยใช้โรเตอร์แบบแกว่งออก นำส่วนเหนือตะกอนทั้งหมดออกและทิ้ง

   เศษเล็กเศษน้อยที่เหลืออยู่ในส่วนเหนือตะกอนหลังจากการหมุนวน แต่ก่อนการหมุนเหวี่ยงจะไม่ส่งผลกระทบต่อขั้นตอน

   การกำจัดส่วนเหนือตะกอนที่ไม่สมบูรณ์จะยับยั้งการแตกตัวและทำให้ไลเสตเจือจางลง ดังนั้นจึงส่งผลต่อเงื่อนไขในการจับ RNA กับเมมเบรน PAXgene

4. เติมบัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย (BR1) 350 µl และหมุนวนจนเม็ดละลายอย่างเห็นได้ชัด

5. ปิเปตตัวอย่างลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (MCT) ขนาด 1.5 ml เพิ่มบัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2) 300 µl และ โปรติเนส K (PK) 40 µl ผสมโดยการหมุนวนเป็นเวลา 5 วินาทีและบ่มเป็นเวลา 10 นาทีที่ 55°C โดยใช้ตู้บ่มแบบเขย่าที่ 400–1,400 rpm หลังจากการบ่ม ให้ตั้งอุณหภูมิของตู้บ่มแบบเขย่าเป็น 65°C (สำหรับขั้นตอนที่ 20)

   อย่าผสมบัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2) และ โปรติเนส K (PK) เข้าด้วยกันก่อนที่จะเพิ่มลงในตัวอย่าง

6. ปิเปตไลเซทโดยตรงลงในคอลัมน์สปิน PAXgene Shredder (PSC; สีม่วง) ที่วางไว้ในหลอดแปรรูป (PT) ขนาด 2 ml และหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาทีด้วยความเร็วสูงสุด (แต่ไม่เกิน 20,000 x *g*)

   ปิเปตไลเซทลงในคอลัมน์สปิน (PSC) อย่างระมัดระวังและตรวจสอบด้วยสายตาว่าไลเซทถูกถ่ายโอนไปยังคอลัมน์สปิน (PSC) อย่างสมบูรณ์

   เพื่อป้องกันความเสียหายของ Column (PSC) และหลอด (PT) ห้ามเกิน 20,000 x *g*

   บางตัวอย่างอาจไหลผ่านคอลัมน์สปิน PAXgene Shredder (PSC) โดยไม่ต้องหมุนเหวี่ยง นี้เนื่องจากบางตัวอย่างมีความหนืดต่ำและไม่ควรนำมาเป็นตัวบ่งชี้ความล้มเหลวของผลิตภัณฑ์

7. ถ่ายส่วนเหนือตะกอนทั้งหมดของส่วนการไหลผ่านอย่างระมัดระวังไปยังหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (MCT) ขนาด 1.5 ml โดยไม่รบกวนเม็ดในหลอดแปรรูป
8. เติมเอทานอล 350 µl (96–100%, เกรดบริสุทธิ์ p.a.) ผสมโดยการหมุนวนและหมุนเหวี่ยงสั้น ๆ (1–2 วินาทีที่ 500–1,000 x *g*) เพื่อขจัดหยดจากด้านในของฝาหลอด

   ความยาวของการหมุนเหวี่ยงต้องไม่เกิน 1–2 วินาทีเนื่องจากอาจทำให้กรดนิวคลีอิกอัดเป็นเม็ดและปริมาณ RNA ทั้งหมดลดลง

9. ปิเปตตัวอย่าง 700 µl ลงในคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC; สีแดง) ที่วางไว้ในหลอดแปรรูป (PT) ขนาด 2 ml และหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g* วางคอลัมน์สปิน (PRC) ในหลอดแปรรูป (PT) ขนาด 2 ml ใหม่และทิ้งหลอดแปรรูป (PT) เก่าที่มีการไหลผ่าน
10. ปิเปตตัวอย่างที่เหลือลงในคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC) และหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g* วางคอลัมน์สปิน (PRC) ในหลอดประมวลผล (PT) ใหม่ขนาด 2 ml และทิ้งหลอดประมวลผล (PT) เก่าที่มีการไหลผ่าน

    ปิเปตตัวอย่างลงในคอลัมน์สปิน (PRC) อย่างระมัดระวังและตรวจสอบด้วยสายตาว่าตัวอย่างถูกถ่ายไปยังคอลัมน์สปิน (PRC) อย่างสมบูรณ์

11. ปิเปตบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1 (BR3) ขนาด 350 µl ลงในคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC) หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g* วางคอลัมน์สปิน (PRC) ในหลอดแปรรูป (PT) ขนาด 2 ml ใหม่และทิ้งหลอดแปรรูป (PT) เก่าที่มีการไหลผ่าน
12. เติมสารละลายเข้มข้น DNase I (RNFD) 10 µl ลงใน บัฟเฟอร์สำหรับการย่อย DNA (RDD) 70 µl ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (MCT) ขนาด 1.5 ml ผสมโดยการสะบัดหลอดเบา ๆ และหมุนเหวี่ยงสั้น ๆ เพื่อรวบรวมของเหลวที่เหลือจากด้านข้างของหลอด

ตัวอย่างเช่น หากประมวลผล 10 ตัวอย่าง ให้เพิ่มสารละลายเข้มข้น DNase I (RNFD) 100 µl ลงใน บัฟเฟอร์สำหรับการย่อย DNA (RDD) 700 µl ใช้หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (MCT) ขนาด 1.5 ml ที่ให้มาพร้อมกับชุด

DNase I มีความไวต่อการแปลงสภาพทางกายภาพเป็นพิเศษ การผสมควรทำโดยการสะบัดหลอดเบา ๆ เท่านั้น อย่าหมุนวน

13. ปิเปตส่วนผสมการบ่ม DNase I (RNFD) (80 µl) ลงบนเมมเบรนคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC)โดยตรงและวางบนโต๊ะที่ตั้ง (20–30°C) เป็นเวลา 15 นาที

ตรวจสอบให้มั่นใจว่าส่วนผสมการบ่ม DNase I (RNFD) ถูกวางลงบนเมมเบรนโดยตรง การย่อย DNase จะไม่สมบูรณ์หากส่วนหนึ่งของส่วนผสมถูกใช้และยังคงอยู่บนผนังหรือโอริงของคอลัมน์สปิน (PRC)

14. ปิเปตบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1 (BR3) 350 µl ลงในคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC) และหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g* วางคอลัมน์สปิน (PRC) ในหลอดแปรรูป (PT) ขนาด 2 ml ใหม่และทิ้งหลอดแปรรูป (PT) เก่าที่มีการไหลผ่าน
15. ปิเปตบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) 500 µl ลงในคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC) และหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g* วางคอลัมน์สปิน (PRC) ในหลอดแปรรูป (PT) ขนาด 2 ml ใหม่และทิ้งหลอดแปรรูป (PT) เก่าที่มีการไหลผ่าน

บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) จัดมาให้เป็นสารเข้มข้น ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้เติมเอทานอลลงในบัฟเฟอร์สำหรับล้าง 2 (BR4) ก่อนใช้ (ดู"สิ่งที่ต้องทำก่อนเริ่ม", หน้า 56)

16. เพิ่มบัฟเฟอร์สำหรับล้าง 2 (BR4) อีก 500 µl ไปที่คอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC) หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g*
17. ทิ้งหลอดแปรรูป (PT) ที่มีการไหลผ่านและวางคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC) ลงในหลอดแปรรูป (PT) ขนาด 2 ml ใหม่ หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g*
18. ทิ้งหลอดแปรรูป (PT) ที่มีการไหลผ่าน วางคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC) ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (MCT) ขนาด 1.5 ml และปิเปต บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) 40 µl ลงบนเมมเบรนคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC) โดยตรง หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g* เพื่อชะล้าง RNA

สิ่งสำคัญคือต้องทำให้เมมเบรนทั้งหมดเปียกด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการชะล้างสูงสุด

19. ทำซ้ำขั้นตอนการชะล้าง (ขั้นตอนที่ 18) ตามที่อธิบายโดยใช้บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) 40 µl และหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (MCT) เดียวกัน

20. บ่มการชะล้างเป็นเวลา 5 นาทีที่ 65°C ในตู้บ่มแบบเขย่า (จากขั้นตอนที่ 5) โดยไม่ต้องเขย่า หลังจากการบ่มแล้ว ทำให้เย็นลงบนน้ำแข็งทันที

    การบ่มที่อุณหภูมิ 65°C แปลงสภาพ RNA สำหรับแอปพลิเคชันดาวน์สตรีม อย่าให้เกินเวลาหรืออุณหภูมิการบ่ม

21. หากไม่ได้ใช้ตัวอย่าง RNA ทันที ให้จัดเก็บที่อุณหภูมิ −20°C หรือ −70°C

    เนื่องจาก RNA ยังคงแปลงสภาพหลังจากการแช่แข็งและการละลายซ้ำ จึงไม่จำเป็นต้องทำการบ่มซ้ำที่ 65°C หากใช้ตัวอย่าง RNA ในการตรวจวินิจฉัย ให้ทำตามคำแนะนำที่จัดทำโดยผู้ผลิต

    สำหรับการหาปริมาณ RNA ที่แม่นยำโดยการดูดซับที่ 260 nm เราขอแนะนำให้เจือจางตัวอย่างด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5* การเจือจางตัวอย่างในน้ำที่ปราศจาก RNase อาจทำให้ได้ค่าต่ำอย่างไม่ถูกต้อง

    ปรับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นศูนย์โดยใช้ช่องว่างที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) และ บัฟเฟอร์สำหรับ Tris-HCl ในสัดส่วนเดียวกับในตัวอย่างที่จะวัด บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) มีการดูดซับสูงที่ 220 nm ซึ่งอาจทำให้ระดับการดูดซับพื้นหลังสูงหากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่ได้รับการปรับค่าเป็นศูนย์อย่างเหมาะสม

    สำหรับการหาปริมาณใน บัฟเฟอร์สำหรับ Tris-HCl ให้ใช้ความสัมพันธ์ A_{260} = 1⇒44 µg/ml ดูภาคผนวก B, หน้า 72

* เมื่อทำงานกับสารเคมี ควรสวมเสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้งและแว่นตาป้องกันที่เหมาะสมเสมอ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดอ่านเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDSs) ที่เหมาะสม ที่มีให้จากผู้ผลิตสินค้า

แนวทางปฏิบัติ: การทำให้บริสุทธิ์โดยอัตโนมัติของ RNA ทั้งหมดจากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่เก็บรวบรวมลงใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

จุดสำคัญก่อนเริ่ม

- **ตรวจสอบให้มั่นใจว่ากล่องชุดอุปกรณ์ไม่บุบสลายและไม่เสียหายและบัฟเฟอร์ไม่รั่วไหล อย่าใช้ชุดอุปกรณ์ที่ได้รับความเสียหาย**
- **เมื่อใช้ปิเปต ตรวจสอบให้มั่นใจว่าตั้งค่าเป็นปริมาตรที่ถูกต้องและมีการดูดและจ่ายของเหลวนั้นอย่างระมัดระวังและสมบูรณ์**
- **เพื่อหลีกเลี่ยงการถ่ายตัวอย่างไปยังหลอดและวัสดุสิ้นเปลืองพลาสติกที่ไม่ถูกต้อง ตรวจสอบให้มั่นใจว่าหลอดแปรรูป (PT), หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (MCT) และโรเตอร์อะแดปเตอร์ทั้งหมดปิดฉลากอย่างถูกต้องโดยใช้ปากกาชนิดหมึกติดถาวร ปิดฉลากที่ฝาและตัวหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (MCT) ตัวหลอดแปรรูป (PT) แต่ละหลอดและผนังด้านนอกของโรเตอร์อะแดปเตอร์แต่ละตัว**
- **การรั่วไหลของตัวอย่างและบัฟเฟอร์ในระหว่างขั้นตอนอาจทำให้ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA ลดลง**
- **ขั้นตอนทั้งหมดของแนวทางปฏิบัตินี้รวมถึงขั้นตอนการหมุนเหวี่ยง ควรดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง (15-25°C) เว้นแต่จะระบุไว้เป็นอย่างอื่น**

เนื่องจากความไวของเทคโนโลยีการขยายกรดนิวคลีอิก จึงจำเป็นต้องมีข้อควรระวังต่อไปนี้ในการจัดการตัวอย่างเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม:

- **ปิเปตตัวอย่างลงในหลอดแปรรูป (PT) อย่างระมัดระวังในด้านล่างของหลอดโดยไม่ทำให้ขอบหลอดเปียกชื้น**
- **เปลี่ยนทิปปิเปตเสมอระหว่างการถ่ายโอนของเหลว ใช้ทิปปิเปตป้องกันละอองลอย**
- **หลีกเลี่ยงการสัมผัสเมมเบรนคอลัมน์สปิน (PRC, PSC) ด้วยทิปปิเปต**

- หลังจากหมุนวนหรือให้ความร้อนกับหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (MCT) ให้หมุนเหวี่ยงสั้น ๆ เพื่อเอาหยดออกจากด้านในของฝา
- สวมถุงมือตลอดขั้นตอนทั้งหมด ในกรณีที่สัมผัสกันระหว่างถุงมือกับตัวอย่าง ให้เปลี่ยนถุงมือทันที

สิ่งที่ต้องทำก่อนเริ่ม

- ต้องเก็บเลือดใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ตามคำแนะนำในคู่มือ *PAXgene Blood RNA Tube* หากจำเป็น ดูภาคผนวก C (หน้า 74) สำหรับคำแนะนำในการจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- ตรวจสอบให้มั่นใจว่า PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ได้รับการบ่มอย่างน้อย 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหลังการเจาะเลือดเพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์เม็ดเลือดแตกสมบูรณ์ การบ่มโดย PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ตลอดคืนอาจเพิ่มปริมาณได้ ถ้า PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ถูกจัดเก็บไว้ที่ 2–8°C, –20°C หรือ –70°C หลังการเจาะเลือด ให้ปรับให้สมดุลกับอุณหภูมิห้องก่อนแล้วจึงจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนเริ่มขั้นตอน
- อ่านข้อมูลความปลอดภัยในหน้า 10
- อ่าน "บันทึกสำคัญ", หน้า 41
- อ่านคำแนะนำในการจัดการ RNA (ภาคผนวก A, หน้า 71)
- อ่านคู่มือผู้ใช้เครื่องมือ QIAcube ที่เหมาะสมและข้อมูลเพิ่มเติมที่ให้มาพร้อมกับเครื่องมือ QIAcube โดยให้ความสำคัญกับข้อมูลด้านความปลอดภัย
- ตรวจสอบให้มั่นใจว่าอุปกรณ์และเครื่องมือ เช่น ปิเปตและเครื่องมือ QIAcube ได้รับการตรวจสอบและสอบเทียบอย่างสม่ำเสมอตามคำแนะนำของผู้ผลิต
- บัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2) อาจก่อตัวเป็นตะกอนเมื่อจัดเก็บ ถ้าจำเป็นให้อุ่นที่ 37°C เพื่อละลาย
- บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) จัดมาให้เป็นสารเข้มข้น ก่อนใช้ครั้งแรก ให้เติมเอทานอล ในปริมาตรที่เหมาะสม (96–100%, เกรดความบริสุทธิ์ p.a.) ตามที่ระบุไว้บนขวดเพื่อให้ได้สารละลายที่ใช้งานได้

- หากใช้ RNase-Free DNase Set เป็นครั้งแรก ให้เตรียมสารละลายเข้มข้น DNase I ละลายของแข็ง DNase I (RNFD; 1500 หน่วย Kunitz) * ใน 550 µl ของบัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย DNase (DRB) ที่มาพร้อมกับชุด ระวังอย่าให้ DNase I (RNFD) หายไปเมื่อเปิดขวด อย่าหมุนวน DNase I (RNFD) ที่สร้างขึ้นใหม่ DNase I มีความไวต่อการแปลงสภาพทางกายภาพเป็นพิเศษ การผสมควรทำโดยการพลิกขวดเบา ๆ เท่านั้น
- ข้อมูลปัจจุบันแสดงให้เห็นว่า DNase I (RNFD) ที่สร้างขึ้นใหม่สามารถจัดเก็บที่อุณหภูมิ 2–8°C ได้นานถึง 6 สัปดาห์ สำหรับการจัดเก็บ DNase I (RNFD) ในระยะยาว ให้นำสารละลายเข้มข้นออกจากขวดแก้ว แบ่งออกเป็นส่วนย่อยใช้ครั้งเดียว (ใช้หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 ml [MCT] ที่ให้มาพร้อมกับชุดอุปกรณ์ มีเพียงพอสำหรับ 5 ส่วน) และจัดเก็บที่อุณหภูมิ –20°C ได้นานถึง 9 เดือน ส่วนย่อยที่ละลายแล้วสามารถจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2–8°C ได้นานถึง 6 สัปดาห์ อย่าแช่แข็งส่วนย่อยหลังจากละลาย
- เมื่อสร้างใหม่และแยกส่วนย่อยของ DNase I (RNFD) ตรวจสอบให้มั่นใจว่าคุณปฏิบัติตามคำแนะนำในการจัดการ RNA (ภาคผนวก A, หน้า 71)
- ติดตั้งอะแดปเตอร์เครื่องเขย่าที่ถูกต้อง (มาพร้อมกับเครื่องมือ QIAcube ใช้อะแดปเตอร์สำหรับหลอดล็อกสนิทขนาด 2 ml ที่มีเครื่องหมาย "2") และวางชั้นวางเครื่องเขย่าไว้ด้านบนของอะแดปเตอร์
- ตรวจสอบลิ้นชักขยะและเททิ้งหากจำเป็น
- ติดตั้งแนวทางปฏิบัติที่เกี่ยวข้องหากยังไม่ได้ดำเนินการสำหรับการดำเนินการก่อนหน้านี้ QIAcube Connect MDx ต้องการแนวทางปฏิบัติทั้งหมดที่พบในไฟล์ zip ที่เกี่ยวข้องเพื่อดาวน์โหลด สำหรับ QIAcube แบบคลาสสิก ให้ติดตั้งทั้งแนวทางปฏิบัติ "PAXgene Blood RNA Part A" และ" PAXgene Blood RNA Part B" ดู "การติดตั้งแนวทางปฏิบัติบนเครื่องมือ QIAcube ", หน้า 44

ขั้นตอน

1. ปิดฝาครอบเครื่องมือ QIAcube และเปิดเครื่องมือ QIAcube ด้วยสวิตช์เปิด/ปิด (QIAcube Connect MDx: ดูรูปที่ 17, หน้า 42; QIAcube: ดู รูปที่ 18, หน้า 43)

   เสียงบี๊บดังขึ้นและหน้าจอเริ่มต้นจะปรากฏขึ้น เครื่องมือจะทำการทดสอบการเริ่มต้นโดยอัตโนมัติ
2. เปิดฝาครอบเครื่องมือ QIAcube และใส่สารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาและอุปกรณ์พลาสติกที่จำเป็นลงในเครื่องมือ QIAcube ดู "กำลังโหลดเครื่องมือ QIAcube ", หน้า 45

* หน่วยKunitz เป็นหน่วยที่ใช้โดยทั่วไปสำหรับการวัด DNase I ซึ่งกำหนดเป็นปริมาณ DNase I ที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นใน A_{260} ของ 0.001 ต่อนาทีต่อมิลลิลิตรที่ 25°C, pH 5.0 โดยมี DNA พอลิเมอไรซ์สูงเป็นสารตั้งต้น (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 และ 363)

เพื่อประหยัดเวลา การโหลดสามารถทำได้ในระหว่างขั้นตอนการหมุนเหวี่ยง 10 นาที หนึ่งหรือทั้งสองขั้นตอนต่อไปนี้ (ขั้นตอนที่ 3 และ 5)

3. หมุนเหวี่ยง PAXgene Blood RNA Tube (BRT) เป็นเวลา 10 นาทีที่ 3,000–5,000 x *g* โดยใช้โรเตอร์แบบแกว่งออก

   ตรวจสอบให้มั่นใจว่าตัวอย่างเลือดได้รับการบ่มในหลอด PAXgene Blood RNA Tube (BRT) เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (15–25°C) เพื่อให้ได้เซลล์เม็ดเลือดแตกอย่างสมบูรณ์

   โรเตอร์ต้องมีอะแดปเตอร์หลอดสำหรับหลอดก้นกลม หากใช้อะแดปเตอร์หลอดชนิดอื่น หลอดอาจแตกระหว่างการหมุนเหวี่ยง

4. นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยการรินหรือปิเปต เติมน้ำปราศจาก RNase (RNFW) 4 ml ลงในเม็ด และปิดหลอดโดยใช้แผ่นปิด BD Hemogard รองใหม่ (ให้มาพร้อมกับชุดอุปกรณ์)

   หากรินสารเหนือตะกอน ให้ระวังอย่ารบกวนเม็ดและเช็ดขอบหลอดให้แห้งด้วยกระดาษเช็ดมือที่สะอาด

5. หมุนวนจนกว่าเม็ดจะละลายอย่างเห็นได้ชัดและหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาทีที่ 3,000–5,000 x *g* โดยใช้โรเตอร์แบบแกว่งออก นำส่วนเหนือตะกอนทั้งหมดออกและทิ้ง

   เศษเล็กเศษน้อยที่เหลืออยู่ในส่วนเหนือตะกอนหลังจากการหมุนวน แต่ก่อนการหมุนเหวี่ยงจะไม่ส่งผลกระทบต่อขั้นตอน

   การกำจัดส่วนเหนือตะกอนที่ไม่สมบูรณ์จะยับยั้งการแตกตัวและทำให้ไลเสตเจือจางลง ดังนั้นจึงส่งผลต่อเงื่อนไขในการจับ RNA กับเมมเบรน PAXgene

6. เติมบัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย (BR1) 350 µl และหมุนวนจนเม็ดละลายอย่างเห็นได้ชัด
7. ปิเปตตัวอย่างลงในหลอดแปรรูป (PT) ขนาด 2 ml

   ใช้หลอดแปรรูป (PT) ขนาด 2 ml ที่รวมอยู่ใน PAXgene Blood RNA Kit

8. ใส่หลอดแปรรูป (PT) แบบเปิดที่มีตัวอย่างลงในเครื่องเขย่าเครื่องมือ QIAcube (QIAcube Connect MDx: ดู รูปที่ 21, หน้า 47; QIAcube: ดู รูปที่ 22, หน้า 48) ตำแหน่งตัวอย่างจะถูกกำหนดหมายเลขเพื่อความสะดวกในการโหลด เสียบปลั๊กของชั้นวางเครื่องเขย่า (มาพร้อมกับเครื่องมือ QIAcube) ลงในช่องที่ขอบของชั้นวางเครื่องเขย่าที่อยู่ติดกับหลอดแปรรูปแต่ละหลอด สิ่งนี้ทำให้สามารถตรวจจับตัวอย่างระหว่างการตรวจสอบโหลด

ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้ติดตั้งอะแดปเตอร์เครื่องเขย่าที่ถูกต้อง (อะแดปเตอร์เครื่องเขย่า, 2 ml, หลอดล็อกสนิท ซึ่งมีเครื่องหมาย "2" ที่มาพร้อมกับเครื่องมือ QIAcube)

หากประมวลผลน้อยกว่า 12 ตัวอย่าง ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้ใส่ชั้นวางเครื่องเขย่าตามที่แสดงใน รูปที่ 26, หน้า 52 ไม่สามารถดำเนินการหนึ่ง (1) หรือ 11 ตัวอย่างได้ หมายเลขตำแหน่งในชั้นวางเครื่องเขย่าจะตรงกับหมายเลขตำแหน่งในเครื่องหมุนเหวี่ยง

9. ปิดฝาครอบเครื่องมือ QIAcube (QIAcube Connect MDx: ดู รูปที่ 17, หน้า 42; QIAcube: ดู รูปที่ 18, หน้า 43)
10. เลือกแนวทางปฏิบัติ "PAXgene Blood RNA Part A" และเริ่มแนวทางปฏิบัติ

    ทำตามคำแนะนำที่ให้ไว้บนหน้าจอสัมผัสของเครื่องมือ QIAcube

    ตรวจสอบให้มั่นใจว่าทั้งสองส่วนของโปรแกรม (ส่วน A และส่วน B) ได้รับการติดตั้งบนเครื่องมือ QIAcube แล้ว (ดู "การติดตั้งแนวทางปฏิบัติบนเครื่องมือ QIAcube ", หน้า 44)

    เครื่องมือ QIAcube จะทำการตรวจสอบโหลดสำหรับตัวอย่าง ทิป โรเตอร์อะแดปเตอร์ และขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา
11. หลังจากแนวทางปฏิบัติ "PAXgene Blood RNA Part A" เสร็จสิ้น ให้เปิดฝาครอบเครื่องมือ QIAcube (QIAcube Connect MDx: ดู รูปที่ 17, หน้า 42; QIAcube: ดู รูปที่ 18, หน้า 43) ถอดและทิ้งคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC) จากโรเตอร์อะแดปเตอร์และหลอดแปรรูป (PT) เปล่าออกจากเครื่องเขย่า

    ระหว่างการดำเนินการคอลัมน์สปิน จะถูกโอนจากตำแหน่งโรเตอร์อะแดปเตอร์ 1 (ตำแหน่งฝา L1) ไปยังตำแหน่งโรเตอร์อะแดปเตอร์ 3 (ตำแหน่งฝา L2) โดยเครื่องมือ (ดู รูปที่ 24, หน้า 50)
12. ปิดฝาของหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml (MCT) ทั้งหมดที่มี RNA บริสุทธิ์ในโรเตอร์อะแดปเตอร์ (ตำแหน่ง 3, ตำแหน่งฝา L3 ดูรูปที่ 24, หน้า 50) ถ่ายโอนหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 ml (MCT) ไปยังอะแดปเตอร์เครื่องเขย่าเครื่องมือ QIAcube (QIAcube Connect MDx: ดู รูปที่ 21, หน้า 47; QIAcube: ดู รูปที่ 22, หน้า 48)
13. ปิดฝาครอบเครื่องมือ QIAcube (QIAcube Connect MDx: ดู รูปที่ 17, หน้า 42; QIAcube: ดู รูปที่ 18, หน้า 43)

14. เลือกแนวทางปฏิบัติ "PAXgene Blood RNA Part B" และเริ่มแนวทางปฏิบัติ

ทำตามคำแนะนำที่ให้ไว้บนหน้าจอสัมผัสของเครื่องมือ QIAcube

โปรแกรมนี้จะบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65°C และแปลงสภาพ RNA สำหรับแอปพลิเคชันดาวน์สตรีม แม้ว่าแอปพลิเคชันดาวน์สตรีมจะมีขั้นตอนการแปลงสภาพความร้อนอย่าละเว้นขั้นตอนนี้ การแปลงสภาพ RNA ที่เพียงพอเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับประสิทธิภาพสูงสุดในแอปพลิเคชันดาวน์สตรีม

15. หลังจากโปรแกรม "PAXgene Blood RNA Part B" เสร็จสิ้นให้เปิดฝาครอบเครื่องมือ QIAcube (QIAcube Connect MDx: ดู รูปที่ 17, หน้า 42; QIAcube: ดู รูปที่ 18, หน้า 43) วางหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (MCT) ที่มี RNA บริสุทธิ์บนน้ำแข็งทันที

คำเตือน: พื้นผิวร้อน เครื่องเขย่าสามารถเข้าถึงอุณหภูมิได้สูงถึง 70°C (158°F) หลีกเลี่ยงการสัมผัสเมื่อมันร้อน

อย่าปล่อยให้ RNA บริสุทธิ์ค้างอยู่ในเครื่องมือ QIAcube เนื่องจากตัวอย่างไม่ได้ถูกทำให้เย็นลง RNA ที่บริสุทธิ์จึงสามารถย่อยสลายได้ ดังนั้นจึงไม่แนะนำให้ดำเนินการเตรียมตัวอย่างค้างคืนโดยไม่มีการดูแล

16. หากไม่ได้ใช้ตัวอย่าง RNA ทันที ให้จัดเก็บที่อุณหภูมิ –20°C หรือ –70°C

เนื่องจาก RNA ยังคงถูกเปลี่ยนสภาพหลังจากการแช่แข็งและการละลายซ้ำ จึงไม่จำเป็นต้องทำซ้ำแนวทางปฏิบัติการบ่มด้วยความร้อน (" PAXgene Blood RNA Part B") หากใช้ตัวอย่าง RNA ในการตรวจวินิจฉัย ให้ทำตามคำแนะนำที่จัดทำโดยผู้ผลิต

สำหรับการหาปริมาณ RNA ที่แม่นยำโดยการดูดซับที่ 260 nm เราขอแนะนำให้เจือจางตัวอย่างใน Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 * การเจือจางตัวอย่างในน้ำที่ปราศจาก RNase อาจทำให้ได้ค่าต่ำอย่างไม่ถูกต้อง

ปรับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นศูนย์โดยใช้ช่องว่างที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) และ บัฟเฟอร์ Tris-HCl ในสัดส่วนเดียวกับในตัวอย่างที่จะวัด บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) มีการดูดซับสูงที่ 220 nm ซึ่งอาจทำให้ระดับการดูดซับพื้นหลังสูงหากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่ได้รับการปรับค่าเป็นศูนย์อย่างเหมาะสม

* เมื่อทำงานกับสารเคมี ควรสวมเสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้งและแว่นตาป้องกันที่เหมาะสมเสมอ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดอ่านเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDSs) ที่เหมาะสม ที่มีให้จากผู้ผลิตสินค้า

สำหรับการหาปริมาณในบัฟเฟอร์ Tris-HCl ให้ใช้ความสัมพันธ์

A_{260} = 1 => 44 µg/ml ดูภาคผนวก B, หน้า 72

17. ถอดชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาออกจากโต๊ะทำงานของเครื่องมือ QIAcube (QIAcube Connect MDx: ดู รูปที่ 21, หน้า 47; QIAcube: ดู รูปที่ 22, หน้า 48) และปิดขวดทั้งหมดด้วยฝาปิดที่ปิดฉลากเหมาะสม บัฟเฟอร์ในขวดสามารถจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15–25°C) ได้นานถึง 3 เดือน ถอดและทิ้งสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่เหลืออยู่ในหลอดแปรรูป (PT) ในช่องเสียบหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ของเครื่องมือ QIAcube ถอดและทิ้งโรเตอร์อะแดปเตอร์จากเครื่องหมุนเหวี่ยง ล้างลิ้นชักขยะ QIAcube Connect MDx (QIAcube Connect MDx: ดู รูปที่ 17, หน้า 42; QIAcube: ดู รูปที่ 18, หน้า 43) ปิดฝาครอบเครื่องมือ QIAcube และปิดเครื่องมือด้วยสวิตช์เปิด/ปิด

แนวทางการแก้ไขปัญหา

แนวทางการแก้ไขปัญหานี้อาจช่วยแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้น สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูหน้าคำถามที่พบบ่อยที่ศูนย์สนับสนุนด้านเทคนิคของเรา: **www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx** นักวิทยาศาสตร์ในฝ่ายบริการด้านเทคนิคของบริษัท QIAGEN ยินดีตอบคำถามที่คุณอาจมีเกี่ยวกับทั้งข้อมูลหรือแนวทางปฏิบัติในคู่มือฉบับนี้ หรือตัวอย่างและเทคโนโลยีการทดสอบ (สำหรับข้อมูลติดต่อดูหน้าสุดท้าย หรือไปที่ www.qiagen.com)

	ข้อคิดเห็นและข้อแนะนำ
RNA ย่อยสลาย	
การปนเปื้อนของ RNase	ระวังอย่านำ RNases เข้าไปในสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในระหว่างขั้นตอนหรือการจัดการในภายหลัง (ดูภาคผนวก A หน้า 71)
ปริมาณ RNA ต่ำ	
a) เลือดน้อยกว่า 2.5 ml ที่เก็บใน PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้เก็บเลือด 2.5 ml ใน PAXgene Blood RNA Tube (BRT ดูคู่มือ *PAXgene Blood RNA Tube*)
b) ความเข้มข้นของ RNA ที่วัดได้ในน้ำ	RNA ต้องเจือจางใน Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 * เพื่อการหาปริมาณที่ถูกต้อง (ดูภาคผนวก B หน้า 72)
c) เศษเซลล์ที่ถ่ายโอนไปยังคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC) ในขั้นตอนที่ 9 และ 10 ของแนวทางปฏิบัติแบบแมนนวล	หลีกเลี่ยงการถ่ายโอนอนุภาคขนาดใหญ่เมื่อทำการปีเปตส่วนเหนือตะกอนในขั้นตอนที่ 7 ของแนวทางปฏิบัติแบบแมนนวล (การถ่ายโอนเศษเล็กเศษน้อยจะไม่ส่งผลกระทบต่อขั้นตอน)

* เมื่อทำงานกับสารเคมี ควรสวมเสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้งและแว่นตาป้องกันที่เหมาะสมเสมอ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดอ่านเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDSs) ที่เหมาะสม ที่มีให้จากผู้ผลิตสินค้า

	ข้อคิดเห็นและข้อแนะนำ
d) ส่วนเหนือตะกอนไม่ได้ถูกกำจัดออกทั้งหมดในขั้นตอนที่ 3	ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้ส่วนเหนือตะกอนออกทั้งหมดแล้ว หากรินส่วนเหนือตะกอน ให้นำหยดออกจากขอบของ PAXgene Blood RNA Tube (BRT) โดยการซับลงบนกระดาษ ใช้มาตรการป้องกันที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้าม
e) หลังจากเก็บเข้า PAXgene Blood RNA Tube (BRT) เลือดจะถูกบ่มเป็นเวลาน้อยกว่า 2 ชั่วโมง	บ่มเลือดใน PAXgene Blood RNA Tube (BRT) อย่างน้อย 2 ชั่วโมงหลังการเก็บ
ค่า A_{260}/A_{280} ต่ำ	
a) น้ำที่ใช้ในการเจือจาง RNA สำหรับการวัด A_{260}/A_{280}	ใช้ Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 เพื่อเจือจาง RNA ก่อนวัดความบริสุทธิ์ * (ดูภาคผนวก B หน้า 72)
b) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่ได้ปรับเป็นศูนย์อย่างเหมาะสม	ปรับสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นศูนย์โดยใช้ช่องว่างที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับชะล้าง (BR5) และ Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 ในสัดส่วนเดียวกับในตัวอย่างที่จะวัด บัฟเฟอร์สำหรับชะล้าง (BR5) มีการดูดซับสูงที่ 220 nm ซึ่งอาจทำให้ระดับการดูดซับพื้นหลังสูงหากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่ได้รับการปรับค่าเป็นศูนย์อย่างเหมาะสม
เครื่องมือทำงานผิดปกติ	
เครื่องมือ QIAcube ทำงานไม่ถูกต้อง	อ่านคู่มือผู้ใช้ QIAcube ที่เหมาะสมโดยให้ความสำคัญกับส่วนการแก้ไขปัญหา ตรวจสอบให้มั่นใจว่าเครื่องมือ QIAcube ได้รับการบำรุงรักษาอย่างเหมาะสมตามที่อธิบายไว้ในคู่มือผู้ใช้

* 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.

ภาคผนวก A: ข้อสังเกตทั่วไปเกี่ยวกับการจัดการ RNA

การจัดการ RNA

ไรโบนิวคลีเอส (RNases) เป็นเอ็นไซม์ที่มีความเสถียรและแอคทีฟมากซึ่งโดยทั่วไปไม่ต้องการปัจจัยร่วมในการทำงาน เนื่องจาก RNases เป็นเรื่องยากที่จะปิดการใช้งานและแม้ปริมาณนาทีเพียงพอต่อการย่อยสลาย RNA อย่าใช้อุปกรณ์พลาสติกหรือเครื่องแก้วใด ๆ โดยไม่ได้กำจัดการปนเปื้อนของ RNase ที่เป็นไปได้ก่อน ควรใช้ความระมัดระวังเป็นอย่างยิ่งเพื่อหลีกเลี่ยงการนำ RNases เข้าสู่ตัวอย่าง RNA โดยไม่ได้ตั้งใจระหว่างหรือหลังขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ในการสร้างและรักษาสภาพแวดล้อมที่ปราศจาก RNase ต้องใช้ความระมัดระวังในระหว่างการปรับสภาพและการใช้ภาชนะและสารละลายที่ใช้แล้วทิ้งและใช้แล้วไม่ทิ้งในขณะที่ทำงานกับ RNA

การจัดการทั่วไป

ควรใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและปลอดเชื้อที่เหมาะสมเมื่อทำงานกับ RNA มือและอนุภาคฝุ่นเป็นพาหะของแบคทีเรียและเชื้อราและเป็นแหล่งที่มาของการปนเปื้อน RNase ที่พบบ่อยที่สุด สวมถุงมือลาเท็กซ์หรือไวนิลทุกครั้งในขณะที่จัดการสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาและตัวอย่าง RNA เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของ RNase จากพื้นผิวของผิวหรือจากอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการที่เต็มไปด้วยฝุ่น เปลี่ยนถุงมือบ่อย ๆ และปิดหลอดทุกครั้งที่ทำได้ เก็บ RNA ที่บริสุทธิ์ไว้บนน้ำแข็งเมื่อปิเปตส่วนย่อยสำหรับแอปพลิเคชันดาวน์สตรีม

แนวทางปฏิบัติสำหรับกำจัดการปนเปื้อนของ RNase จากเครื่องแก้วและสารละลายสามารถพบได้ในคู่มืออณูชีววิทยาทั่วไป เช่น Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ภาคผนวก B: การหาปริมาณและการกำหนดคุณภาพของ RNA ทั้งหมด

การหาปริมาณของ RNA

ความเข้มข้นของ RNA ควรถูกกำหนดโดยการวัดการดูดซับที่ 260 nm (A_{260}) ในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตรวจสอบให้มั่นใจว่ามีความสำคัญ การอ่านควรอยู่ในช่วงเชิงเส้นของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ การดูดซับ 1 หน่วยที่ 260 nm สอดคล้องกับ 44 µg ของ RNA ต่อ ml (A_{260} = 1⇒ 44 µg/m) ความสัมพันธ์นี้ใช้ได้เฉพาะกับการวัดใน Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5, * ดังนั้นหากจำเป็นต้องเจือจางตัวอย่าง RNA และควรทำใน Tris-HCl 10 mM ตามที่กล่าวไว้ด้านล่าง (ดู "ความบริสุทธิ์ของ RNA", หน้า 73) อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดซับที่ 260 และ 280 nm ให้ความบริสุทธิ์ของ RNA โดยประมาณ เมื่อทำการวัดตัวอย่าง RNA ต้องแน่ใจว่า Cuvettes นั้นปราศจาก RNase ปรับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นศูนย์โดยใช้ช่องว่างที่ประกอบด้วย บัฟเฟอร์สำหรับชะล้าง (BR5) และบัฟเฟอร์สำหรับ Tris-HClในสัดส่วนเดียวกับในตัวอย่างที่จะวัด บัฟเฟอร์สำหรับชะล้าง (BR5) มีการดูดซับสูงที่ 220 nm ซึ่งอาจทำให้ระดับการดูดซับพื้นหลังสูงหากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่ได้รับการปรับค่าเป็นศูนย์อย่างเหมาะสม ตัวอย่างการคำนวณที่เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณ RNA แสดงไว้ด้านล่าง

ปริมาตรของตัวอย่าง RNA = 80 µl

การเจือจาง (1/15) = ตัวอย่าง RNA 10 µl + 10 mM Tris-HCl 140 µl ค่า pH 7.5

วัดการดูดซับของตัวอย่างเจือจางใน Cuvette (ปราศจาก RNase)

A_{260} = 0.3

ความเข้มข้นของตัวอย่าง = 44 x A_{260} x ปัจจัยการเจือจาง

= 44 x 0.3 x 15

= 198 µg/ml

ปริมาณรวม = ความเข้มข้น x ปริมาตรของตัวอย่างเป็นมิลลิลิตร

= 198 µg/ml x 0.08 ml

= 15.8 µg RNA

* เมื่อทำงานกับสารเคมี ควรสวมเสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้งและแว่นตาป้องกันที่เหมาะสมเสมอ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดอ่านเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDSs) ที่เหมาะสม ที่มีให้จากผู้ผลิตสินค้า

ความบริสุทธิ์ของ RNA

อัตราส่วนของการอ่านที่ 260 nm และ 280 nm (A_{260}/A_{280}) ให้ความบริสุทธิ์ของ RNA โดยประมาณ เกี่ยวกับสารปนเปื้อนที่ดูดซับใน UV เช่นโปรตีน อย่างไรก็ตาม อัตราส่วน A_{260}/A_{280} ได้รับอิทธิพลอย่างมากจาก pH pH ที่ต่ำลงส่งผลให้อัตราส่วน A_{260}/A_{280} และลดความไวในการปนเปื้อนของโปรตีน* สำหรับค่าที่ถูกต้อง เราขอแนะนำให้วัดค่าการดูดซับใน Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 RNA บริสุทธิ์มีอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ของ 1.8–2.2 ใน Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 ปรับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นศูนย์โดยใช้ช่องว่างที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับชะล้าง (BR5) และบัฟเฟอร์สำหรับ Tris-HCl ในสัดส่วนเดียวกับในตัวอย่างที่จะวัด บัฟเฟอร์สำหรับชะล้าง (BR5) มีการดูดซับสูงที่ 220 nm ซึ่งอาจทำให้ระดับการดูดซับพื้นหลังสูงหากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่ได้รับการปรับค่าเป็นศูนย์อย่างเหมาะสม

* 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.

ภาคผนวก C: การจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

คำแนะนำต่อไปนี้จาก BD อาจเป็นประโยชน์เมื่อจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) **ดูคู่มือ** *PAXgene Blood RNA Tube* **สำหรับข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับ** PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

คำแนะนำในการกำจัดฝาปิด BD Hemogard

1. **จับ** PAXgene Blood RNA Tube (BRT) **ด้วยมือเดียวโดยวางนิ้วหัวแม่มือไว้ใต้ฝาปิด BD Hemogard (เพื่อเพิ่มความมั่นคง ให้วางแขนบนพื้นผิวทึบ) ใช้มืออีกข้างหนึ่ง บิดฝาปิด BD Hemogard ในขณะที่ดันขึ้นพร้อมกันด้วยนิ้วหัวแม่มือของมืออีกข้างหนึ่งเท่านั้นจนกว่าจุกปิดหลอดจะคลาย**
2. **เลื่อนนิ้วหัวแม่มือออกไปก่อนยกฝาปิด ห้ามใช้นิ้วหัวแม่มือดันฝาปิดหลอด** PAXgene Blood RNA Tube (BRT) **ออก ข้อควรระวัง: มีอันตรายจากการสัมผัสหาก** PAXgene Blood RNA Tube (BRT) **บรรจุเลือด เพื่อช่วยป้องกันการบาดเจ็บในระหว่างการถอดฝาปิดออก สิ่งสำคัญคือต้องเอานิ้วหัวแม่มือที่ใช้ดันฝาปิดขึ้นด้านบนออกจากการสัมผัสกับ** PAXgene Blood RNA Tube (BRT) **ทันทีที่ฝาปิด BD Hemogard คลายออก**
3. **ยกฝาปิด** PAXgene Blood RNA Tube (BRT) **ออก ในกรณีที่ไม่น่าจะเป็นไปได้ที่ตัวป้องกันพลาสติกแยกออกจากจุกยาง ห้ามประกอบฝาปิดใหม่ ถอดจุกยางออกจาก** PAXgene Blood RNA Tube (BRT) **อย่างระมัดระวัง**

คำแนะนำสำหรับการใส่ฝาปิด BD Hemogard รอง

1. **เปลี่ยนฝาปิด** PAXgene Blood RNA Tube (BRT)
2. **บิดและดันลงให้แน่นจนกระทั่งจุกปิดเข้าที่จนสุด จำเป็นต้องใส่จุกปิดเข้าไปใหม่อย่างสมบูรณ์เพื่อให้ฝาปิดยังคงอยู่อย่างปลอดภัยบน** PAXgene Blood RNA Tube (BRT) **ในระหว่างการจัดการ**

ข้อมูลการสั่งซื้อ

ผลิตภัณฑ์	สิ่งที่บรรจุ	หมายเลขแคตตาล็อก
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, หลอดแปรรูป, RNase-Free DNase I, สารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาและบัฟเฟอร์ที่ปราศจาก RNase	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	หลอดเก็บเลือด 100	762165
ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องที่สามารถสั่งซื้อได้จากบริษัท QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	แพ็คประกอบด้วย: ชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา (3); แถบติดฉลากชั้นวาง (8); ทิปฟิลเตอร์ 200 µl (1024); ทิปฟิลเตอร์ 1000 µl (1024); ทิปฟิลเตอร์ 1000 µl, wide-bore (1024); ขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา 30 ml (18); อะแดปเตอร์โรเตอร์ (240); ที่ยึดอะแดปเตอร์โรเตอร์	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	ทิปฟิลเตอร์แบบใช้แล้วทิ้งที่ปราศจากเชื้อวางบนชั้น	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	ขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา (30 ml) พร้อมฝา แพ็ค 6; สำหรับใช้กับชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาเครื่องมือ QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	สำหรับ 240 การจัดเตรียม: 240 โรเตอร์อะแดปเตอร์แบบใช้แล้วทิ้ง; สำหรับใช้กับเครื่องมือ QIAcube	990394

ผลิตภัณฑ์	สิ่งที่บรรจุ	หมายเลขแคตตาล็อก
Reagent Bottle Rack	ชั้นวางสำหรับใส่ขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา 6 x 30 ml บนโต๊ะทำงานของเครื่องมือ QIAcube	990390
Rotor Adapter Holder	อุปกรณ์จับยึดสำหรับโรเตอร์อะแดปเตอร์แบบใช้แล้วทิ้ง 12 ตัว; สำหรับใช้กับเครื่องมือ QIAcube	990392
ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องที่สามารถสั่งซื้อได้จาก BD*		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ ชุดเก็บเลือด 6: 21G, เข็ม 0.75 inch (0.8 × 19 mm), หลอด 12 inch (305 mm) พร้อมอะแดปเตอร์ Luer; 50 ต่อกล่อง, 200 ต่อลัง	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	ลังสำหรับเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm และ 16 mm เท่านั้น 1,000/ลัง	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	การดูด 13 x 75 mm 4.0 ml พร้อมฝาปิด BD Hemogard สีแดงและฉลากกระดาษ 100/กล่อง 1,000/ลัง	368975

* อุปกรณ์เสริมสำหรับการเก็บเลือดเหล่านี้เป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์ทั่วไปที่สามารถใช้กับ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ได้ หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับอุปกรณ์เสริมเหล่านี้รวมถึงวิธีการสั่งซื้อโปรดไปที่ **www.preanalytix.com**

สำหรับข้อมูลใบอนุญาตและข้อมูลปฏิเสธความรับผิดชอบผลิตภัณฑ์จำเพาะที่เป็นปัจจุบัน ดูคู่มือชุดอุปกรณ์ QIAGEN **หรือคู่มือผู้ใช้งาน** PreAnalytiX **ที่เกี่ยวข้อง คู่มือชุดอุปกรณ์และคู่มือผู้ใช้งาน** PreAnalytiX **และ** QIAGEN **จะมีให้ที่ www.preanalytix.com และ www.qiagen.com หรือสามารถขอได้จากฝ่ายบริการด้านเทคนิคของ** PreAnalytiX

ประวัติการแก้ไขคู่มือ

เอกสารและการแก้ไข	การเปลี่ยนแปลง	วันที่
HB-0101-004, R2	การเปลี่ยนแปลงเพื่อให้สอดคล้องกับกฎระเบียบ GHS ตลอดทั้งเอกสาร	มิถุนายน 2015
HB-0101-005, R3	เทมเพลตใหม่ การแก้ไขแนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติและข้อมูลประสิทธิภาพ การอัปเดตข้อมูลด้านความปลอดภัยเพื่อให้สอดคล้องกับกฎระเบียบ GHS การเปลี่ยนแปลงรายละเอียดเครื่องมือและข้อความข้อจำกัดการใช้ผลิตภัณฑ์	กุมภาพันธ์ 2019
HB-0101-006, R3	การแก้ไขชื่อชุดอุปกรณ์ในตารางสิ่งที่บรรจุในชุดอุปกรณ์ หน้า 5	มกราคม 2020
HB-0101-007, R4	เพิ่ม QIAcube Connect MDx ไปยังแนวทางปฏิบัติแบบอัตโนมัติ อัปเดตภาษาตลอดเพื่อรวมการอ้างอิงถึง QIAcube Connect MDx; อัปเดตตาราง หน้าและตัวเลขตลอด	ธันวาคม 2020

PreAnalytiX ทั่วโลก

ผลิตภัณฑ์ PreAnalytiX จัดจำหน่ายโดยบริษัท QIAGEN และ BD

QIAGEN – ฝ่ายบริการลูกค้า

การสั่งซื้อ www.QIAGEN.com/shop | ฝ่ายสนับสนุนด้านเทคนิค support.qiagen.com | เว็บไซต์ www.qiagen.com

BD – ฝ่ายบริการลูกค้า

Argentina, Uruguay and Paraguay
Orders: 0800.444.5523
E-mail: crc_argentina@bd.com

Australia
Orders: 1.800.656.100
Fax: 1.800.656.110
E-mail: bd_anz@bd.com

Austria
Orders: 43.1.7063660
Fax: 43.1.706366011
E-mail: customercare.at@bd.com

Belgium
Orders: 32.53.720.556
Fax: 32.53.720.549
E-mail: orders.be@bd.com

Brazil
Orders: 0800.055.56.54
E-mail: consultoria_vacutainer@bd.com

Canada
Technical support: 1.800.631.0174
Orders: 1.866.979.9408
Fax: 1.800.565.0897
E-mail: customer.service.canada@bd.com

Central and Eastern Europe
Orders: 48.22.377.11.11
Fax: 48.22.377.11.02
Bulgaria orders: info_bulgaria@bd.com
Czech Republic orders: info_czech@bd.com
Croatia orders: info_croatia@bd.com
Hungary orders: info_hungary@bd.com
Poland orders: info_poland@bd.com
Romania orders: info_romania@bd.com
Southeast Europe orders: info_balkan@bd.com
Serbia orders: info_serbia@bd.com
Slovakia orders: info_slovakia@bd.com
Slovenia orders: info_slovenia@bd.com

Denmark
Orders: 45.43.43.45.66
Fax: 45.43.96.56.76
Orders: ordre.dk@bd.com
Technical support: bddenmark@bd.com

Finland
Orders: 358.9.88.70.780
Fax: 358.9.88.70.7816
Orders: 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: customercare.de@bd.com

India
Orders: 91.124.3949390
Orders: bd_india@bd.com

Ireland (Aquilant Specialist Healthcare Services)
Customer support: 353.1.404.8350
Fax: 353.1.404.8352
E-mail: contactus@aquilantscientific.ie

Israel (Lapidot Medical)
Customer Support: 972.700.70.90.22
E-mail: cs@lapidot.com

Italy
Orders: 39.02.48240.500
Fax: 39.02.48240.775
Technical support: 39.3450655140
E-mail: ordini.it@bd.com

Middle East & Africa
Orders: 971.45.592.555
Fax: 971.45.592.599
E-mail: EMA_PAS@bd.com

The Netherlands
Orders: 31.20.582.94.20
Fax: 31.20.582.94.21
Orders: orders.nl@bd.com

New Zealand
Orders: 0800.572.468
Fax: 0800.572.469
E-mail: nz_customerservice@bd.com

Norway
Customer Support: 64.00.99.00
E-mail: bdnorge@bd.com
Orders: ordre.no@bd.com

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

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

Spain, Portugal and Andorra
Orders: 34.91.848.8174
Customer support: 34.902.27.17.27
Fax: 34.91.848.8115
E-mail: info.spain@bd.com

Sweden
Orders: 46.8.775.51.00
Fax: 46.8.645.08.08
Orders: order.se@bd.com
Technical support: bdsweden@bd.com

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

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

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

HB-0101-007 1122120TH BD-8945 12/2020
ผลิตภัณฑ์ของเยอรมนี