

Dicembre 2020

Manuale del PAXgene[®] Blood RNA Kit

Versione 2



50 (n. di catalogo 762174)

R4 **MAT** 1122120IT

REF 762174

IVD

CE



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Prodotto da QIAGEN GmbH per PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

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

I PAXgene Blood RNA Kit non sono disponibili in tutti i Paesi – si prega di richiedere maggiori informazioni.

Contratto di licenza limitato

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del PAXgene Blood RNA Kit dei seguenti termini:

1. Il PAXgene Blood RNA Kit deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *Manuale del PAXgene Blood RNA Kit* e in combinazione con i componenti contenuti nel kit. PreAnalytiX non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nel *Manuale del PaXgene Blood RNA Kit* e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.preanalytix.com.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, PreAnalytiX non garantisce in alcun modo che questi kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un solo utilizzo e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. PreAnalytiX esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit concordano nel non consentire a nessuno di intervenire o consentire ad altri di realizzare o contribuire a realizzare azioni proibite.
6. PreAnalytiX può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di Licenza Limitato e recupererà tutte le spese di indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito www.preanalytix.com.

Vendita condizionale

Questo prodotto viene fornito con licenza ai sensi di determinate rivendicazioni dei brevetti US-7,270,953 e US-7,682,790, nonché EP-1820793 B1 ed equivalenti esteri delle stesse, che definiscono l'uso del prodotto per la processazione del complesso di acidi nucleici formati durante il prelievo di campioni in una PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, tutti i diritti riservati.

PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse
CH – 8634 Hombrechtikon
Svizzera
www.preanalytix.com

Distributori PreAnalytiX

I prodotti PreAnalytiX sono prodotti e distribuiti da QIAGEN o BD per PreAnalytiX. I prodotti non possono essere ordinati direttamente presso PreAnalytiX GmbH.

Per informazioni di contatto per il distributore PreAnalytiX locale, consultare l'ultima pagina.

Sommario

Contenuto del kit	5
Simboli	6
Condizioni di conservazione.....	7
Uso previsto	8
Limiti per l'uso del prodotto.....	8
Controllo qualità.....	9
Assistenza tecnica	9
Informazioni sulla sicurezza.....	10
Introduzione.....	14
Principio e procedura	14
Prelievo e stabilizzazione del campione.....	15
Concentrazione e purificazione dell'RNA.....	20
Purificazione dell'RNA manuale	20
Purificazione dell'RNA in automatico.....	30
Attrezzature e reagenti richiesti ma non forniti dall'utente.....	39
Note importanti	42
Utilizzo degli strumenti QIAcube	42
Installazione dei protocolli sugli strumenti QIAcube	45
Caricamento degli strumenti QIAcube.....	46
Protocollo: Purificazione manuale dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	56

Protocollo: purificazione in automatico dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	64
Guida alla risoluzione dei problemi	72
Appendice A: Note generali per il trattamento dell'RNA	75
Appendice B: Determinazione della concentrazione, resa e purezza dell'RNA totale	76
Appendice C: Utilizzo delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	78
Informazioni per gli ordini	79
Cronologia delle revisioni del manuale	81

Contenuto del kit

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
N. di catalogo			762174
Numero di preparazioni			50
BR1	Resuspension Buffer (Tampone di risospensione)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer* (Tampone di legame)	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1* (Tampone di lavaggio 1*)	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate)* (Tampone di lavaggio 2 (concentrato))	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Tampone di eluizione)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (bottle) (Acqua priva di RNasi (flacone))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinasi K (tappo verde))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (Colonne spin PAXgene RNA (rosse))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Provette di reazione) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Chiusure secondarie BD Hemogard™	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Provette per micro-centrifuga) (1.5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNasi I, priva di RNasi (liofilizzata))	DNA REM	1500 unità Kunitz [†]
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (Tampone di digestione DNA (tappo bianco))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Tampone di risospensione DNasi (provetta, tappo lilla))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac)	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Manuale	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (Version 2) (Manuale del PAXgene Blood RNA Kit (Versione 2))		1

* Non compatibile con disinfettanti a base di candeggina. Contiene un sale di guanidina. Per le informazioni di sicurezza, consultare pag. 10.

[†] Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96–100%, grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.

[‡] L'unità Kunitz viene normalmente utilizzata per misurare la DNasi I. Un'unità Kunitz si definisce come la quantità di DNasi I che provoca in A₂₆₀ un aumento dell'assorbanza di 0,001 per minuto e millilitro a 25°C e pH 5,0, utilizzando come substrato DNA altamente polimerizzato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

Simboli



Contenuto sufficiente per <N> test



Consultare le istruzioni per l'uso



Data di scadenza



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Numero di catalogo



Numero di lotto



Numero di materiale



Componenti



Numero



Metodo di sterilizzazione con radiazioni



Unità Kunitz



Aggiunta



Contiene



Ricostituito



Desossiribonucleasi I



Etanolo

GITC

Guanidina isotiocianato

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Codice GTIN (Global Trade Item Number)



Non riutilizzare



Limite di temperatura



Limite superiore di temperatura



Produttore



Nota importante

Condizioni di conservazione

Le colonne spin PAXgene RNA (PRC), le colonne spin PAXgene Shredder (PSC), nonché la proteinasi K (PK) e i tamponi (BR1, BR2, BR3, BR4 e BR5) devono essere conservati in un luogo asciutto alla temperatura indicata sull'etichetta del kit.

L'RNase-Free DNase Set, che contiene DNasi I (RNFD), tampone di digestione DNA (RDD) e tampone di risospensione della DNasi (DRB), viene fornito a temperatura ambiente. Alla consegna, conservare tutti i componenti dell'RNase-Free DNase Set alla temperatura indicata in etichetta. Se conservato correttamente, il kit è stabile fino alla data di scadenza riportata sulla rispettiva scatola.

Uso previsto

Il PAXgene Blood RNA System consiste in una provetta di raccolta ematica (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) e kit per la purificazione degli acidi nucleici (PAXgene Blood RNA Kit). È destinato a raccolta, conservazione e trasporto del sangue e alla stabilizzazione dell'RNA intracellulare in una provetta chiusa e successivo isolamento e purificazione dell'RNA ospite dal sangue intero per RT-PCR utilizzato nei test diagnostici molecolari.

Le caratteristiche di performance di PAXgene Blood RNA System indicate in questo manuale valgono per i trascritti genetici FOS e IL1B. È responsabilità di chi utilizza il prodotto stabilire per il PAXgene Blood RNA System relative caratteristiche di performance per altri trascritti target.

Indicazioni per l'uso

Il PAXgene Blood RNA Kit è destinato alla purificazione del RNA intracellulare da sangue intero, raccolto nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Usando il kit in combinazione con la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) il sistema fornisce RNA intracellulare purificato da sangue intero umano per i test di diagnostica clinica molecolare basati sulla RT PCR.

Limiti per l'uso del prodotto

Il PAXgene Blood RNA Kit è concepito per la purificazione dell'RNA intracellulare da sangue intero umano ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leucociti/ml) per applicazioni di diagnostica in vitro. Non è destinato alla purificazione del DNA genomico o di acidi nucleici virali da sangue intero umano. A causa del numero limitato di trascritti validati per le specifiche di stabilizzazione (trascritti genetici FOS e IL1B), le caratteristiche di performance del kit non sono state definite per tutti i trascritti. È compito di chi utilizza il prodotto verificare se per altri trascritti sia necessaria una validazione.

Questo prodotto è rivolto a utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti nelle procedure diagnostiche in vitro.

Per informazioni sull'impiego di PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), vedere il manuale PAXgene Blood RNA Tube.

Controllo qualità

In conformità al sistema di gestione della qualità secondo le norme ISO di QIAGEN, ogni lotto del PAXgene Blood RNA Kit viene testato in base a criteri di controllo prestabiliti, rispetto a specifiche prestabilite, per garantire la costante qualità del prodotto.

Assistenza tecnica

QIAGEN è orgogliosa della qualità e della disponibilità del proprio supporto tecnico. Personale qualificato e di grande esperienza nel settore della biologia molecolare è a vostra disposizione per qualsiasi domanda riguardante i prodotti PreAnalytix. In caso di dubbi sul PAXgene Blood RNA Kit non esitate a contattarci.

Per ottenere assistenza tecnica e altre informazioni, rivolgersi al servizio di assistenza tecnica QIAGEN.

Informazioni sulla sicurezza

UE - Gli utenti devono segnalare qualsiasi incidente grave relativo al dispositivo al produttore e all'autorità nazionale competente. Al di fuori dell'UE: contattare il rappresentante QIAGEN locale per qualsiasi incidente o richiesta relativa al dispositivo.

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi.

Per ridurre il rischio di infezione (ad esempio, da HIV o dai virus dell'epatite B) o lesioni, quando si opera con materiali biologici o sostanze chimiche, indossare sempre un adeguato camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS). Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito www.preanalytix.com, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare le schede SDS di questo kit.

CAUTELA



NON aggiungere candeggina o soluzioni acide direttamente nelle preparazioni di campione da eliminare.

Il tampone di legame (BR2) e quello di lavaggio 1 (BR3) contengono guanidina tiocianato, che può formare composti altamente reattivi in combinazione con la candeggina. Se si rovescia liquido contenente questi tamponi, pulire con un idoneo detergente da laboratorio e acqua. Se il liquido contiene agenti potenzialmente infettivi, innanzitutto pulire l'area interessata con acqua e detergente da laboratorio, e successivamente con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% (candeggina).

La soluzione di stabilizzazione per l'RNA e il sangue contenuto nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) possono essere disinfettati utilizzando 1 volume di una soluzione di candeggina disponibile in commercio (ipoclorito di sodio al 5%) per 9 volumi di soluzione di stabilizzazione per l'RNA e di sangue.

I residui della preparazione del campione, ad esempio i supernatanti provenienti dalle fasi di centrifugazione delle procedure di purificazione dell'RNA, devono essere considerati sempre potenzialmente infettivi. Per questo devono essere autoclavati o inceneriti per distruggere qualsiasi materiale infettivo. Lo smaltimento deve essere effettuato in conformità alle normative ufficiali vigenti.

Ai componenti del PAXgene Blood RNA Kit sono associate le seguenti informazioni su rischi e misure precauzionali. Per informazioni sulla sicurezza relative a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), consultare il *manuale PAXgene Blood RNA Tube*.

Buffer BR2



Contiene guanidina tiocianato. Pericolo! Nocivo se ingerito. Può essere nocivo in caso di contatto con la pelle o se inalato. Causa grave danno oculare. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. A contatto con acidi libera gas molto tossico. Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Buffer BR3



Contiene etanolo, guanidina tiocianato. Pericolo! Liquido e vapore infiammabile. Causa grave danno oculare. A contatto con acidi libera gas molto tossico. Conservare lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici molto calde. Non fumare. Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

DNasi I



Contiene: DNasi. Pericolo! Può provocare una reazione allergica cutanea. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Evitare di respirare le polveri/i fumi/i gas/il prodotto nebulizzato/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso. Indossare una protezione per la respirazione. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Portare la vittima all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione.

Proteinasi K



Contenuto: proteinasi K. Pericolo! Provoca irritazione cutanea lieve. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Evitare di respirare le polveri/i fumi/i gas/il prodotto nebulizzato/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso. Indossare una protezione per la respirazione. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Portare la vittima all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione.

Introduzione

La raccolta del sangue intero è la prima fase di molti test molecolari utilizzati per lo studio dell'RNA cellulare. Tuttavia, uno dei problemi principali in questi casi è l'instabilità del profilo dell'RNA cellulare in vitro. Studi effettuati da PreAnalytiX hanno mostrato che il numero di copie delle singole specie di mRNA nel sangue intero può variare di oltre 1.000 volte durante la conservazione e il trasporto a temperatura ambiente.* Ciò è provocato dalla rapida degradazione dell'RNA e dall'espressione indotta di alcuni geni dopo il prelievo ematico. Tali modifiche nel profilo dell'RNA impediscono di effettuare studi attendibili sull'espressione genica. Per un'analisi accurata dell'espressione genica nel sangue intero umano è quindi essenziale un metodo per conservare il profilo di espressione dell'RNA durante e dopo la flebotomia.

Principio e procedura

PreAnalytiX ha sviluppato un sistema che consente il prelievo, la stabilizzazione, la conservazione e il trasporto di campioni di sangue intero umano nonché un rapido ed efficiente protocollo per la purificazione dell'RNA intracellulare. Il sistema richiede l'uso di PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; brevetti USA 6,602,718 e 6,617,170) per il prelievo del sangue e la stabilizzazione dell'RNA, seguiti da una purificazione manuale o automatica dell'RNA mediante PAXgene Blood RNA Kit. Entrambi i protocolli, manuale e in automatico, forniscono sostanzialmente un'analogia performance per quanto riguarda la qualità e la resa dell'RNA. I dati di performance per il protocollo manuale (pag. 23–30) e il protocollo in automatico (pag. 32–36) sono inclusi in questo manuale.



Il QIAGEN QIAcube Connect MDx non è disponibile in tutti i Paesi. Per ulteriori dettagli, contattare il servizio tecnico QIAGEN.

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

Prelievo e stabilizzazione del campione

Le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contengono un reagente basato su una tecnologia di stabilizzazione dell'RNA coperta da brevetto. Questa composizione di reagenti protegge le molecole dell'RNA dalla degradazione causata dalla RNasi e minimizza i cambiamenti ex vivo nell'espressione genica. Le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) per il prelievo di sangue umano intero garantiscono la stabilizzazione dell'RNA cellulare fino a 3 giorni a 18–25°C (Figure 1 e 2, pagine 16 e 17) o fino a 5 giorni a 2–8°C (Figure 3 e 4, pagine 18 e 19). I dati attualmente disponibili mostrano che a -20°C o -70°C* l'RNA cellulare rimane stabile per almeno 11 anni. Per ulteriori informazioni su periodi di stabilizzazione più lunghi contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN.

La durata reale della stabilizzazione dell'RNA può variare in base alla specie di RNA cellulare e dall'applicazione downstream. A causa del numero limitato di trascritti validati per le specifiche di stabilizzazione (trascritti genetici FOS e IL1B), le caratteristiche di performance del kit non sono state definite per tutti i trascritti. È compito di chi utilizza il prodotto verificare se per altri trascritti sia necessaria una validazione.

* È in corso uno studio a lungo termine sulla conservazione del sangue nelle PAXgene Blood RNA Tubes.

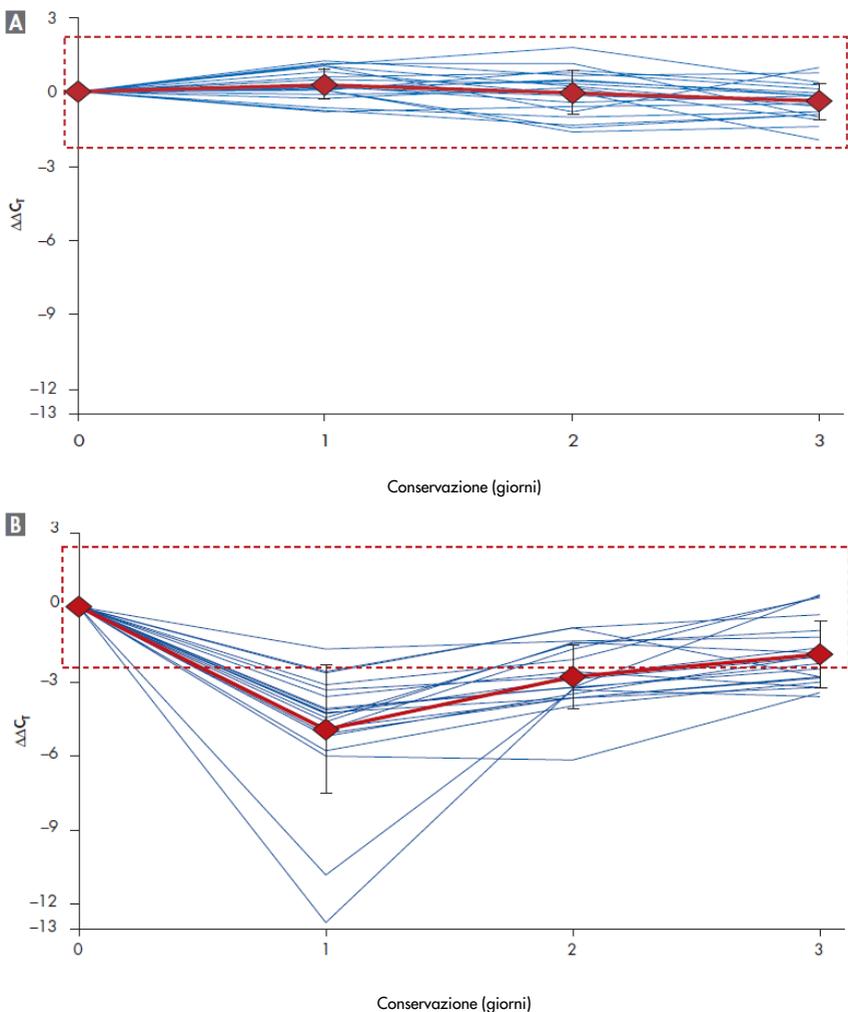


Figura 1. Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 18–25°C: FOS. Il sangue è stato prelevato da 10 donatori, con campioni in duplicato, e conservato a 18–25°C per il numero di giorni indicato. Quindi è stata eseguita la purificazione dell'RNA totale. **[A]** Il sangue è stato prelevato e conservato nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e l'RNA totale è stato purificato con il PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Il sangue è stato prelevato e conservato in provette standard per il prelievo ematico trattate con EDTA come anticoagulante. L'RNA totale è stato purificato utilizzando un metodo standard di estrazione organica con purificazione dell'RNA basata su membrane di silice. I livelli relativi di trascrizione del gene FOS sono stati determinati mediante RT PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3x$ del test (2,34 C_t).

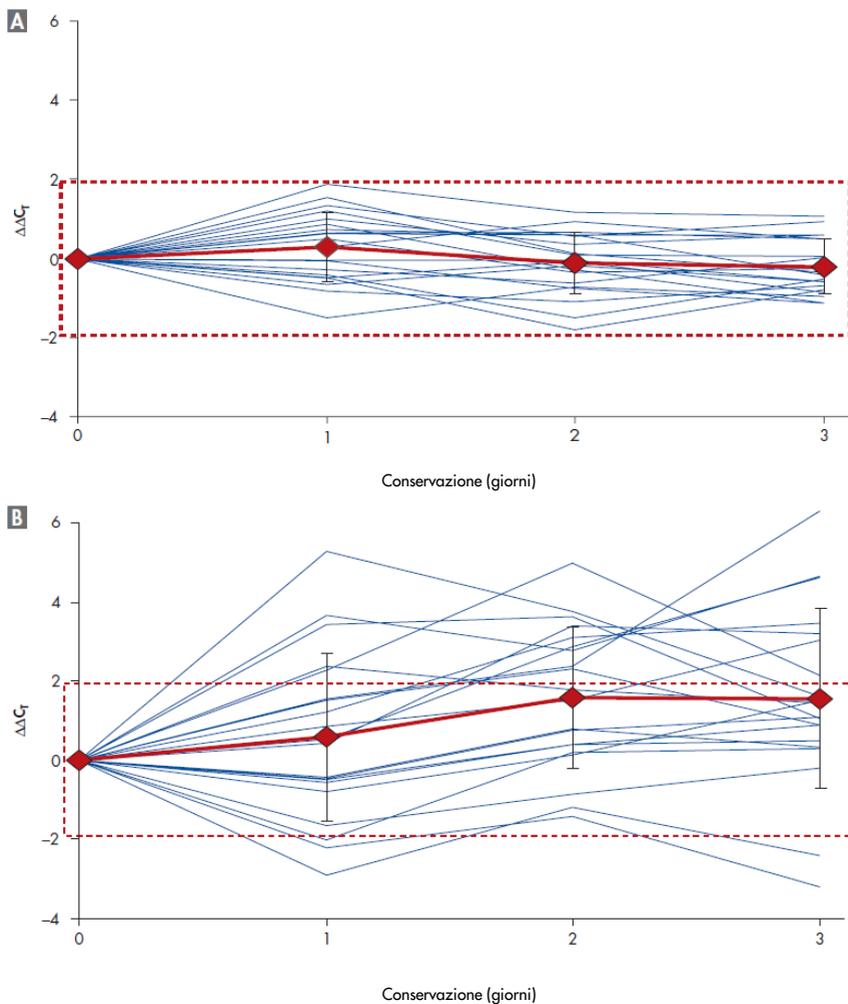


Figura 2. Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 18–25°C: IL1B. Il prelievo del sangue e la purificazione dell'RNA totale sono avvenuti, dopo conservazione a 18–25°C, come descritto nella Figura 1. I livelli relativi di trascrizione di IL1B sono stati determinati mediante RT PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3x$ del test (1,93 C_t).

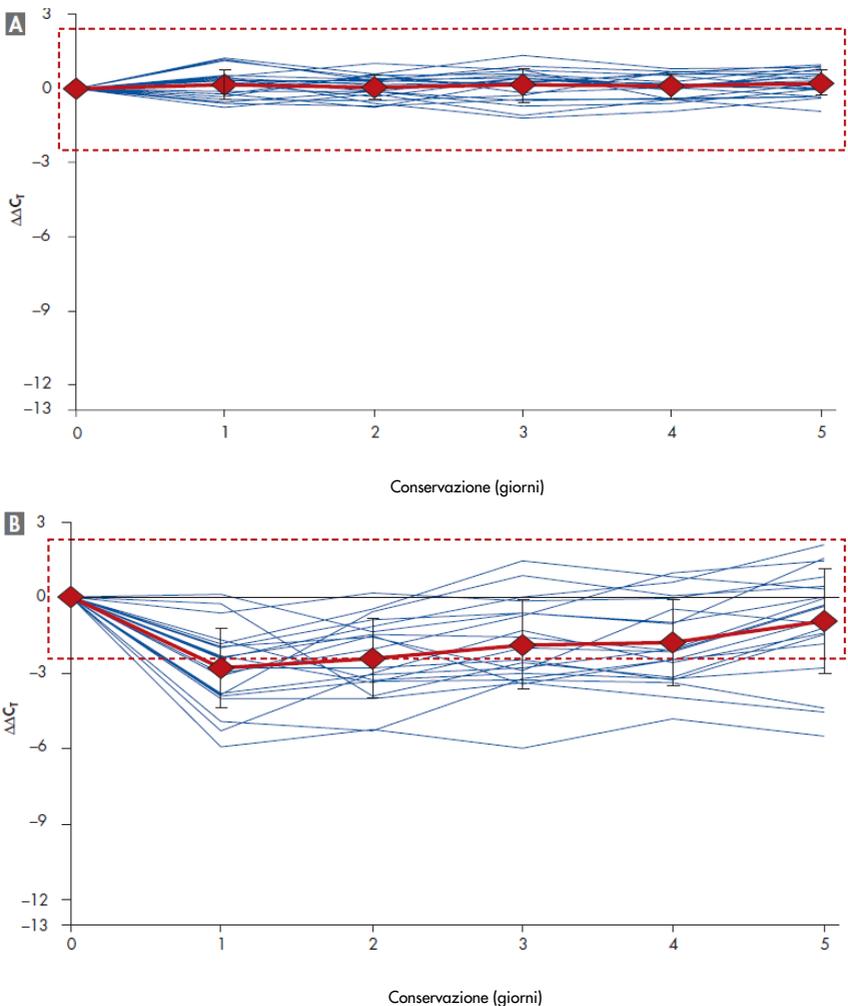


Figura 3. Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 2–8°C: FOS. Il sangue è stato prelevato da 10 donatori, con campioni in duplicato, e conservato a 2–8°C per il numero di giorni indicato. Quindi è stata eseguita la purificazione dell'RNA totale. **[A]** Il sangue è stato prelevato e conservato nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e l'RNA totale è stato purificato con il PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Il sangue è stato prelevato e conservato in provette standard per il prelievo ematico trattate con EDTA come anticoagulante. L'RNA totale è stato purificato utilizzando un metodo standard di estrazione organica con purificazione basata su membrane di silice. I livelli relativi di trascrizione del gene FOS sono stati determinati mediante RT PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3x$ del test ($2,34 C_t$).

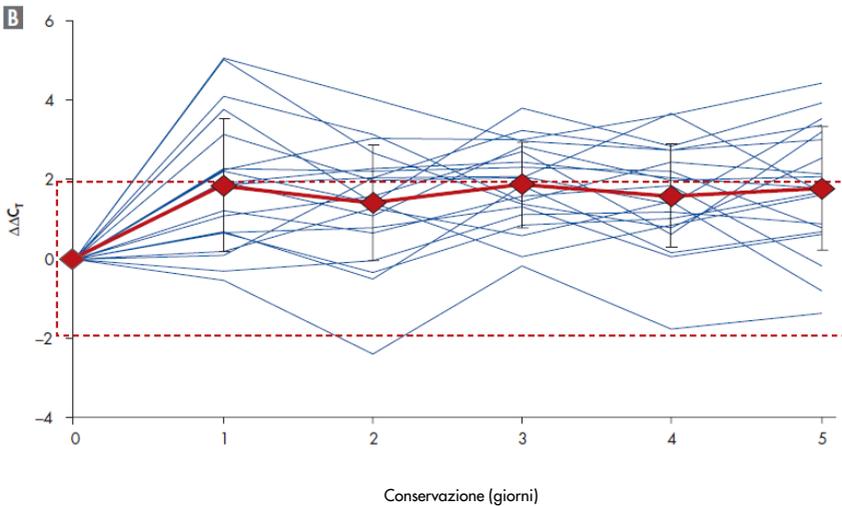
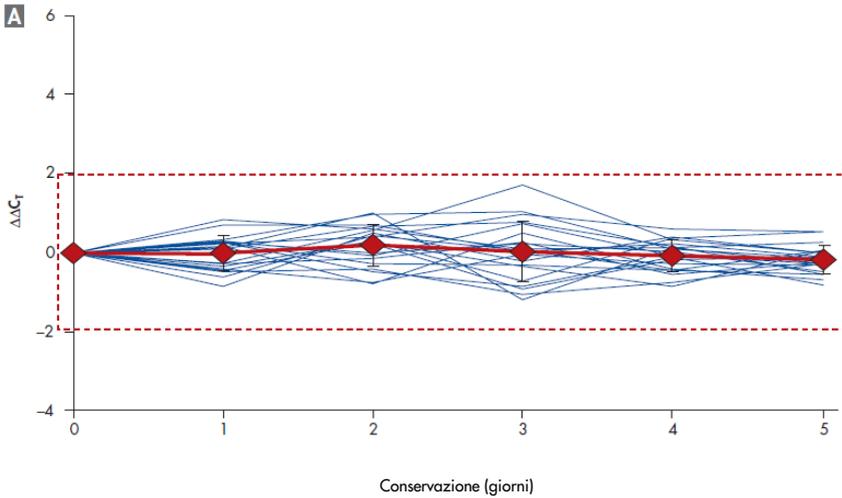


Figura 4. Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 2–8°C: IL1B. Il prelievo del sangue e la purificazione dell'RNA sono avvenuti, dopo conservazione a 2–8°C, come descritto nella Figura 3. I livelli relativi di trascrizione di IL1B sono stati determinati mediante RT PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3x$ del test ($1,93 C_t$).

Concentrazione e purificazione dell'RNA

Il PAXgene Blood RNA Kit è destinato alla purificazione dell'RNA totale da 2,5 ml di sangue intero umano raccolto in una PAXgene Blood RNA Tube (BRT). La procedura è semplice e può essere realizzata in automatico o manualmente (vedere le Figure 5 e 10, pagine 21 e 31). In entrambi i protocolli, la purificazione inizia con una fase di centrifugazioni per fare precipitare gli acidi nucleici nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Il pellet viene lavato e risospeso e segue poi la purificazione manuale o in automatico dell'RNA. Di massima, i due protocolli seguono le stesse fasi del protocollo con gli stessi componenti del kit.

Purificazione dell'RNA manuale

Dettagliatamente: il pellet risospeso viene incubato in tamponi ottimizzati con proteinasi K(PK) per la digestione delle proteine. Per omogeneizzare il lisato cellulare e rimuovere i detriti cellulari, si effettua una centrifugazione aggiuntiva utilizzando la colonna spin PAXgene Shredder (PSC). Il supernatante della frazione di flow-through viene trasferito in una microprovetta per centrifuga pulita. Per ottimizzare le condizioni di legame si aggiunge etanolo, quindi il lisato viene introdotto nella colonna spin PAXgene RNA (PRC). Con una breve centrifugazione l'RNA si lega selettivamente alla membrana in silice PAXgene mentre i contaminanti vengono eliminati. Eventuali altri contaminanti vengono rimossi nelle successive ed efficienti fasi di lavaggio. Fra la prima e la seconda fase di lavaggio la membrana viene incubata con DNasi I (RNFD) per eliminare qualsiasi traccia di DNA legato. Dopo le fasi di lavaggio l'RNA viene eluito nel tampone di eluizione (BR5) e denaturato al caldo.

L'RNA totale isolato usando il PAXgene Blood RNA System è puro. Usando il protocollo manuale, i valori A_{260}/A_{280} sono compresi tra 1,8 e 2,2, e $\leq 1\%$ (w/w) di DNA genomico è presente in $\geq 95\%$ di tutti i campioni, come misurato da PCR quantitativa in tempo reale di una sequenza del gene beta-actin. Almeno il 95% dei campioni non ha mostrato inibizione nella RT-PCR, quando si è usato fino al 30% dell'eluito.

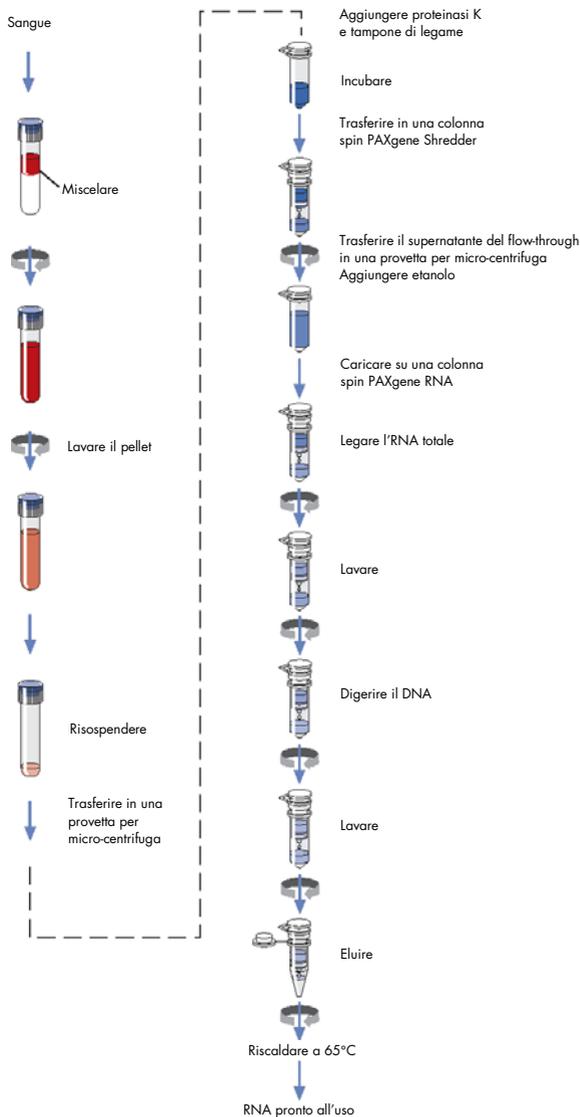


Figura 5. Procedura PAXgene Blood RNA manuale.

Usando il protocollo manuale, il tempo medio di preparazione dei campioni (in base ai dati da 12 preparazioni dei campioni) è circa 90 minuti*, con soli 40 minuti di passaggi manuali. Le rese dell'RNA da 2,5 ml di sangue umano intero da donatori sani sono ≥ 3 μg per il $\geq 95\%$ dei campioni processati. Le rese sono in ogni caso strettamente legate allo stato di salute del donatore e possono variare da un individuo all'altro. Per le analisi di singoli donatori, il sistema PAXgene Blood RNA fornisce rese altamente riproducibili e ripetibili (Figure 6 e 7, pagg. 23 e 24) e risultati per la RT-PCR riproducibili e ripetibili (Figure 8 e 9, pagg. 28 e 29), dimostrandosi quindi l'ideale per i test di diagnostica clinica.

La Figura 6 (pag. 23) mostra la riproducibilità e la ripetibilità complessive di PAXgene Blood RNA System. Sono stati condotti ulteriori studi per mostrare quanto i diversi lotti del PAXgene Blood RNA Kit e i diversi operatori possano influire sulla riproducibilità della resa dell'RNA e dei risultati per la RT-PCR in tempo reale. Poiché per queste analisi sono stati utilizzati campioni di sangue analizzati in pool – anziché campioni raccolti singolarmente con le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) – i risultati di tali esperimenti non rispecchiano la precisione della ripetibilità del sistema, che tiene conto anche delle differenze nel prelievo del sangue, ma solamente la precisione della ripetibilità nella preparazione del campione (vedere Figura 7, pag. 24).

* Durata totale di esecuzione, inclusa la manipolazione iniziale delle PAXgene Blood RNA Tubes (centrifughe, lavaggio e risospensione del pellet).

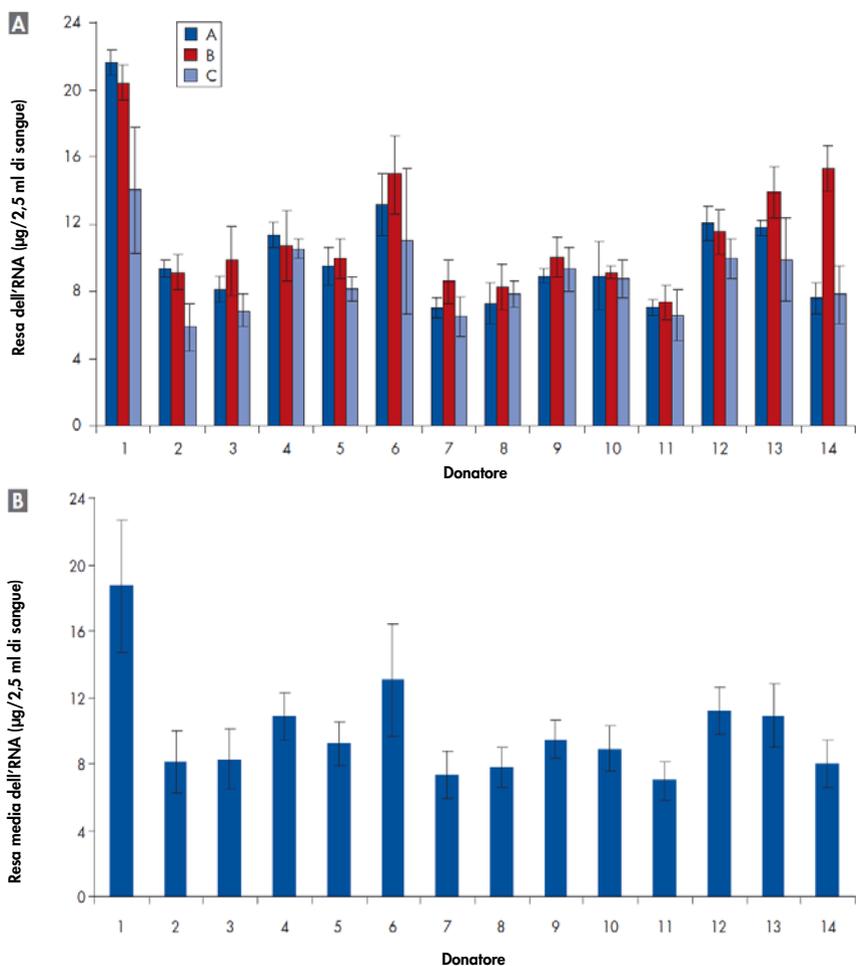


Figura 6. Purificazione dell'RNA riproducibile e ripetibile. Campioni di sangue di 14 donatori sono stati processati manualmente in quadruplicato da 3 tecnici (A, B, C). Sono stati utilizzati tre set di strumenti di laboratorio e tutti i campioni preparati da un tecnico sono stati processati con gli stessi strumenti. **[A]** Sono rappresentate medie e deviazioni standard della resa dell'RNA per campioni replicati dello stesso donatore e con tecnici diversi. **[B]** Dodici campioni di sangue in replica da ciascuno dei 14 donatori sono stati processati da 3 tecnici diversi. Sono rappresentate medie e deviazioni standard della resa dell'RNA per campioni dello stesso donatore e con tutti i tecnici. Per tutti i campioni di RNA, il rapporto A_{260}/A_{280} era compreso tra 1,8 e 2,2.

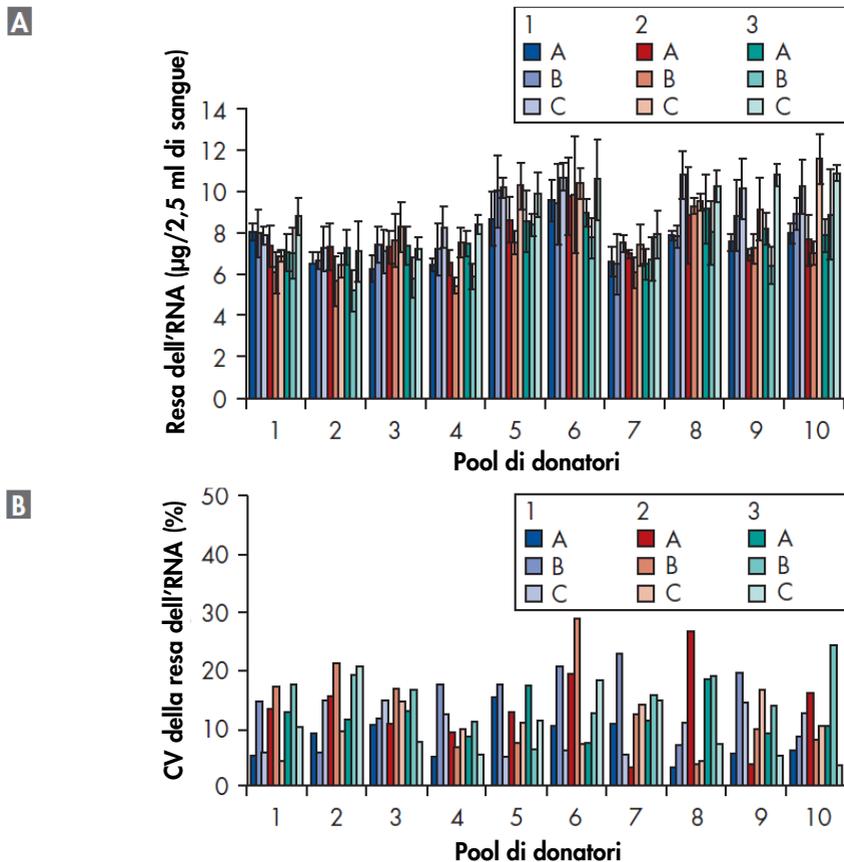


Figura 7. Ripetibilità e riproducibilità della resa dell'RNA con differenti operatori e diversi lotti del PAXgene Blood RNA Kit impiegando campioni di sangue in pool. Campioni di sangue di 30 differenti donatori sono stati raccolti nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 provette per donatore, 360 provette in totale). Il contenuto dei campioni da 3 donatori è stato messo in pool e rialiquotato in 36 campioni. Questi 36 campioni per ogni pool di 3 donatori sono stati processati manualmente da 3 diversi operatori. Ogni operatore ha utilizzato il PAXgene Blood RNA Kit da 3 diversi lotti per l'estrazione e da quadruplicati già processati da ognuno dei 10 pool. **[A]** Resa dell'RNA e deviazione standard di ogni combinazione lotto-operatore. I campioni di sangue di 10 pool di donatori sono stati processati da 3 diversi operatori (A, B e C) con ognuno dei 3 lotti di kit (1, 2 e 3). Sono riportate le rese medie (colonne) e le deviazioni standard (barre di errore) per quadruplicato di campione dello stesso pool di donatori per diversi operatori e lotti di kit. **[B]** Coefficiente di variazione (CV) della resa dell'RNA per pool di donatori di tutte le combinazioni operatore-lotto (A, B e C; 1, 2 e 3), calcolato dalla resa media e dalla deviazione standard riportate nella Figura 7A.

Tabella 1A. Riproducibilità nell'ambito di ogni lotto e per ogni tecnico per pool di donatori selezionati (1, 6, 9, 10)

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

Tabella 1B. Riproducibilità per ogni tecnico e tra tutti i lotti per pool di donatori selezionati (1, 6, 9, 10)

Combinazione di dati	Pool di donatori 1 5,1 x 10 ⁶ cellule/ml			Pool di donatori 6 6,5 x 10 ⁶ cellule/ml		
	Resa media (µg)	DS (µg)	CV (%)	Resa media (µg)	DS (µg)	CV (%)
	Tecnico A, tutti i lotti	7,46	0,85	11	9,43	1,22
Tecnico B, tutti i lotti	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Tecnico C, tutti i lotti	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Combinazione di dati	Pool di donatori 9 8,4 x 10 ⁶ cellule/ml			Pool di donatori 10 10,2 x 10 ⁶ cellule/ml		
	Resa media (µg)	DS (µg)	CV (%)	Resa media (µg)	DS (µg)	CV (%)
	Tecnico A, tutti i lotti	7,54	0,72	10	7,81	0,82
Tecnico B, tutti i lotti	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Tecnico C, tutti i lotti	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tabella 1C. Riproducibilità nell'ambito di ogni lotto e tra tutti i tecnici per pool di donatori selezionati (1, 6, 9, 10)

Combinazione di dati	Pool di donatori 1 5,1 x 10 ⁶ cellule/ml			Pool di donatori 6 6,5 x 10 ⁶ cellule/ml		
	Resa media (µg)	DS (µg)	CV (%)	Resa media (µg)	DS (µg)	CV (%)
	Lotto 1, tutti i tecnici	7,96	0,69	9	9,88	1,34
Lotto 2, tutti i tecnici	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lotto 3, tutti i tecnici	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Combinazione di dati	Pool di donatori 9 8,4 x 10 ⁶ cellule/ml			Pool di donatori 10 10,2 x 10 ⁶ cellule/ml		
	Resa media (µg)	DS (µg)	CV (%)	Resa media (µg)	DS (µg)	CV (%)
	Lotto 1, tutti i tecnici	8,83	1,63	19	9,02	1,27
Lotto 2, tutti i tecnici	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lotto 3, tutti i tecnici	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabella 1D. Riproducibilità tra tutti i lotti e tutti i tecnici per pool di donatori selezionati (1, 6, 9, 10)

Combinazione di dati	Pool di donatori 1 5,1 x 10 ⁶ cellule/ml			Pool di donatori 6 6,5 x 10 ⁶ cellule/ml		
	Resa media (µg)	DS (µg)	CV (%)	Resa media (µg)	DS (µg)	CV (%)
Lotto 1, tutti i tecnici	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Combinazione di dati	Pool di donatori 9 8,4 x 10 ⁶ cellule/ml			Pool di donatori 10 10,2 x 10 ⁶ cellule/ml		
	Resa media (µg)	DS (µg)	CV (%)	Resa media (µg)	DS (µg)	CV (%)
Lotto 1, tutti i tecnici	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Analisi dettagliata di 4 pool di donatori. I pool sono stati scelti in base al numero di leucociti e indicano il valore superiore, medio e inferiore del normale range del numero di leucociti ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leuciti/ml). I numeri di leucociti sono stati determinati dalla media dei 3 numeri di leucociti dei 3 donatori di ogni pool.

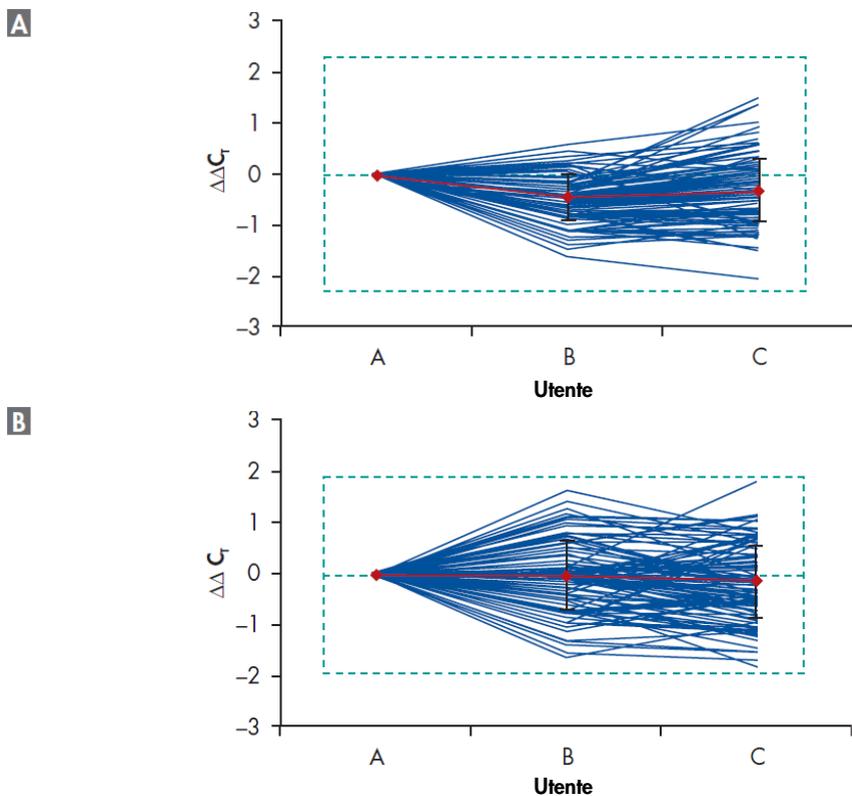


Figura 8. Riproducibilità della RT-PCR — tra tecnici. I campioni di RNA isolati nell'esperimento della Figura 7 sono stati impiegati nella RT-PCR in tempo reale. I livelli relativi dei trascritti di **[A]** FOS e **[B]** IL1B sono stati determinati per RT-PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Sono riportati i valori di tutti i campioni, relativamente ai valori per il tecnico A (10 pool di donatori x 3 lotti di kit x 4 ripetizioni = 120 set di dati per ogni gene) con valori medi (linee rosse) e deviazioni standard (barre nere). Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3x$ degli esami (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

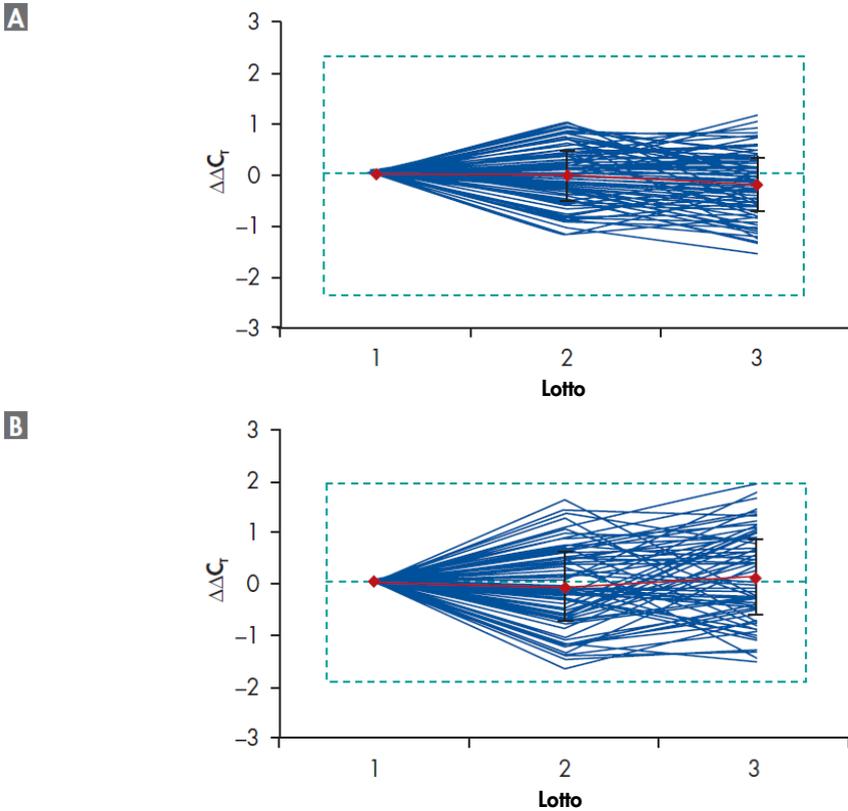


Figura 9. Riproducibilità della RT-PCR — tra lotti di kit. I campioni di RNA isolati nell'esperimento della Figura 7 sono stati impiegati nella RT-PCR in tempo reale. I livelli relativi dei trascritti di **[A] FOS** e **[B] IL1B** sono stati determinati per RT-PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Sono riportati i valori di tutti i campioni, relativamente ai valori per lotto 1 (10 pool di donatori x 3 tecnici x 4 ripetizioni = 120 set di dati per ogni gene) con valore medio (linea rossa) e deviazione standard (barra nera). Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3 \times$ degli esami (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Tabella 2. Riepilogo dei risultati RT-PCR (riportati nelle Figure 8 e 9)

Sistema del test	Esame FOS/rRNA 18S		Esame IL1B/rRNA 18S	
	Valori medi ($\Delta\Delta C_T$) \pm DS ($\Delta\Delta C_T$)		Valori medi ($\Delta\Delta C_T$) \pm DS ($\Delta\Delta C_T$)	
Riproducibilità tra tutti i lotti per ogni tecnico				
Tutti i tecnici, lotto 1–lotto 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Tutti i tecnici, lotto 1–lotto 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Tutti i tecnici, lotto 1–lotto 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Riproducibilità tra tutti i lotti per ogni tecnico				
Tutti i lotti, tecnico A–tecnico A	0,00	0,00	0,00	0,00
Tutti i lotti, tecnico A–tecnico B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Tutti i lotti, tecnico A–tecnico C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Utente: assistente tecnico che ha eseguito lo studio.

Lotto: numero di lotto del kit impiegato.

DS: Deviazione standard.

Vengono mostrati i valori $\Delta\Delta C_T$ medi (N = 120) e le deviazioni standard per i dati presentati nelle Figure 8 e 9.

Purificazione dell'RNA in automatico

La purificazione dell'RNA del sangue è automatizzata sul QIAGEN QIAcube Connect MDx o sul QIAcube QIAGEN classico (di seguito denominato QIAcube). Gli strumenti innovativi QIAcube utilizzano una tecnologia all'avanguardia per processare le colonne spin QIAGEN, permettendo l'integrazione perfetta di una preparazione automatizzata a bassa resa dei campioni nelle procedure di lavoro del laboratorio. Per la preparazione dei campioni con strumenti QIAcube, è necessario seguire le stesse fasi della procedura manuale (ossia, lisi, legame, lavaggio, eluizione) che permettono di continuare a usare il PAXgene Blood RNA Kit per la purificazione di RNA di alta qualità.



Figura 10. QIAcube Connect MDx.

Il protocollo per la purificazione dell'RNA in automatico consiste di 2 parti (o protocolli), il "PAXgene Blood RNA Part A" e il "PAXgene Blood RNA Part B", con un breve intervento manuale tra le 2 parti (vedere la Figura 11, pag. 32).

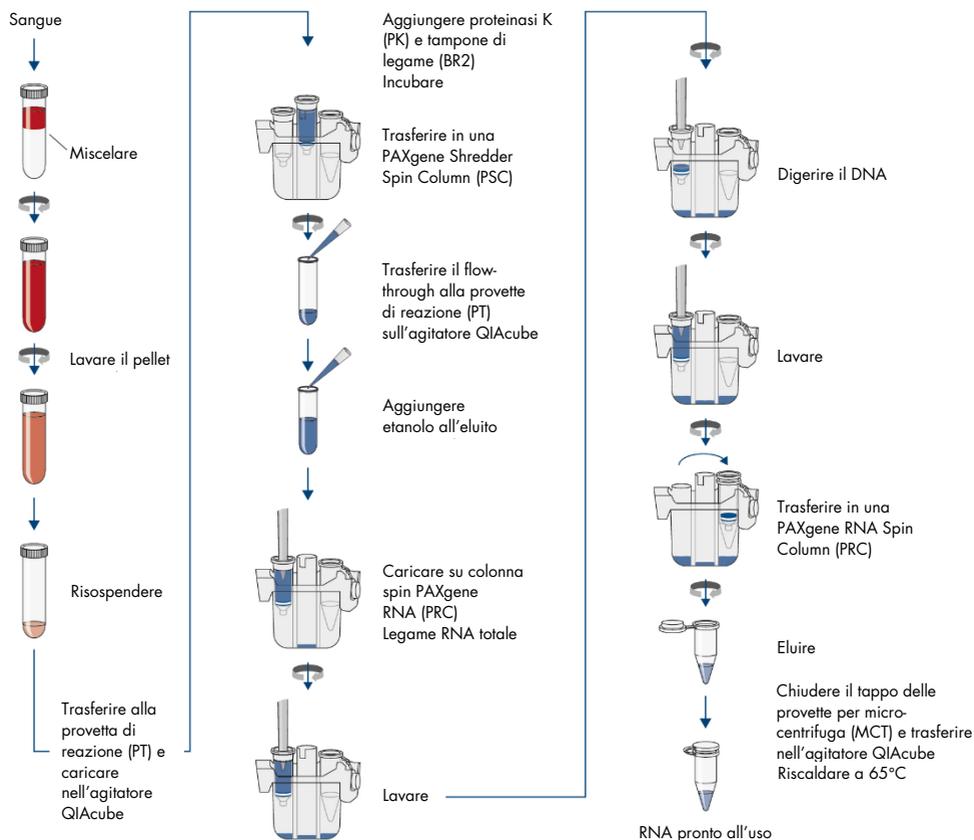


Figura 11. Procedura PAXgene Blood RNA in automatico.

Il pellet dell'acido nucleico centrifugato, lavato e risospeso (vedere "Concentrazione e purificazione dell'RNA", pag. 20) viene trasferito dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT) nelle provette di reazione (PT) che sono posizionate nell'unità termoshaker sul piano di lavoro degli strumenti QIAcube. L'operatore seleziona e fa partire il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B" dal menu. Gli strumenti QIAcube eseguono le fasi del protocollo attraverso l'eluizione dell'RNA nel tampone di eluizione (BR5). L'operatore trasferisce le provette per microcentrifuga (MCT), contenenti l'RNA purificato, nell'unità termoshaker degli strumenti QIAcube. L'operatore seleziona e fa partire il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B" dal menu e gli strumenti QIAcube eseguono la denaturazione a caldo.

Il tempo medio di preparazione del campione (basato sui dati di 12 preparazioni di campioni) è di 151 minuti*, con un tempo di utilizzo notevolmente inferiore rispetto al protocollo manuale.

Le rese dell'RNA da 2,5 ml di sangue umano intero da donatori sani sono $\geq 3 \mu\text{g}$ per il $\geq 95\%$ dei campioni processati. La Figura 12 (pag. 34) indica le rese dell'RNA da un totale di 216 campioni preparati usando il protocollo automatico con 3 lotti di kit con 3 diversi operatori. Quando per questi studi sono stati usati campioni di sangue in pool invece delle singole PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), i risultati non riflettono la resa dell'RNA attesa dai singoli campioni degli estratti di sangue individuali. Poiché le rese dipendono molto dal donatore, le singole rese possono variare (Figura 12, pag. 34).

Almeno il 95% dei campioni non ha mostrato inibizione nella RT-PCR, quando si è usato fino al 30% dell'eluito. Usando il protocollo in automatico, non sono rilevabili contaminazioni crociate tra i campioni, come misurato con la RT-PCR quantitativa in tempo reale di sequenze di ABL1 e dei trascritti FOS in campioni RNA-negativi (acqua) insieme a campioni RNA-positivi (campioni di sangue intero) nello stesso processo.

L'RNA isolato con il PAXgene Blood RNA System e il protocollo in automatico è puro, come risulta evidente dall'assenza di un'inibizione di RT-PCR e dai valori A_{260}/A_{280} compresi tra 1,8 e 2,2. Il DNA genomico è presente a $\leq 1\%$ (w/w) in $\geq 95\%$ di tutti i campioni, come misurato dalla PCR quantitativa in tempo reale di una sequenza del gene beta-actin. Le Figure 13 e 14 (pagg. 35 e 36) mostrano i valori A_{260}/A_{280} e il DNA genomico relativo di un totale di 216 campioni preparati usando il protocollo in automatico con 3 lotti di kit usati da 3 operatori.

* Durata totale di esecuzione, inclusa la manipolazione iniziale delle PAXgene Blood RNA Tubes (centrifughe, lavaggio e risospensione del pellet).

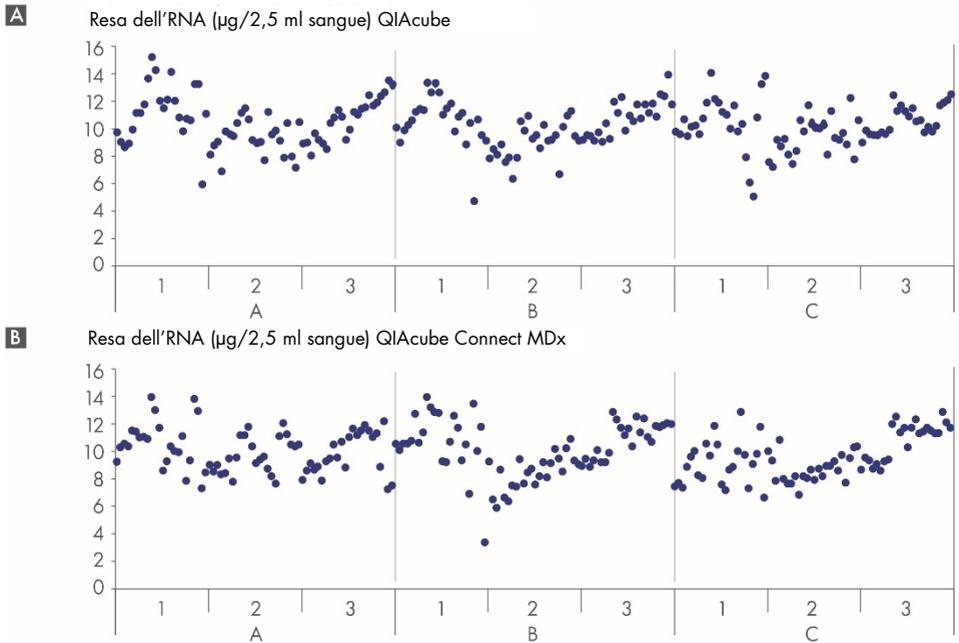


Figura 12. Resa dell'RNA — Procedura in automatico A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Sono stati raccolti campioni di sangue da singoli donatori in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Il contenuto delle provette è stato raccolto in 6 pool di donatori e successivamente rialiquotato. Sono state processate in totale 216 provette (ossia 36 per pool) di 3 diversi operatori (A, B, C). Ogni operatore ha usato 3 lotti differenti (1, 2, 3) del PAXgene Blood RNA Kit per l'estrazione in automatico con più strumenti QIAcube e QIAcube Connect MDx, e ha processato campioni quadruplicati da ognuno dei 6 pool di donatori. Le rese dell'RNA per tutti i singoli campioni sono mostrati per ogni combinazione operatore-lotto.

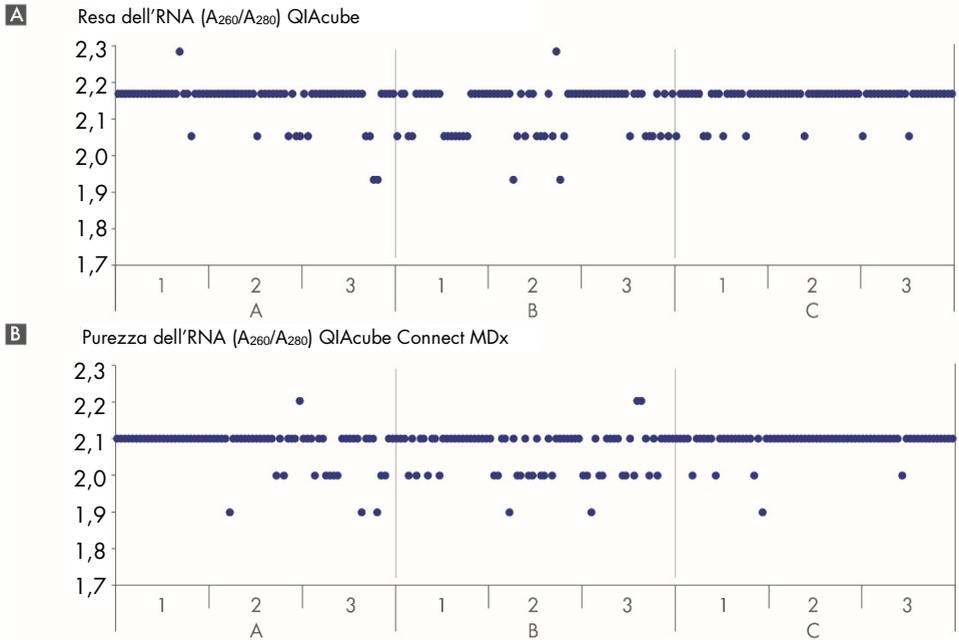


Figura 13. Purezza dell'RNA (valori A_{260}/A_{280}) – Procedura in automatico. A: QIAcube, B: L'RNA QIAcube Connect Mdx è stato purificato da 3 diversi operatori (A, B, C) usando 3 diversi lotti (1, 2, 3) del PAXgene Blood RNA Kit con più strumenti QIAcube e QIAcube Connect Mdx nell'esperimento descritto in Figura 12. I valori A_{260}/A_{280} di tutti i singoli campioni sono mostrati per ogni combinazione operatore-lotto.

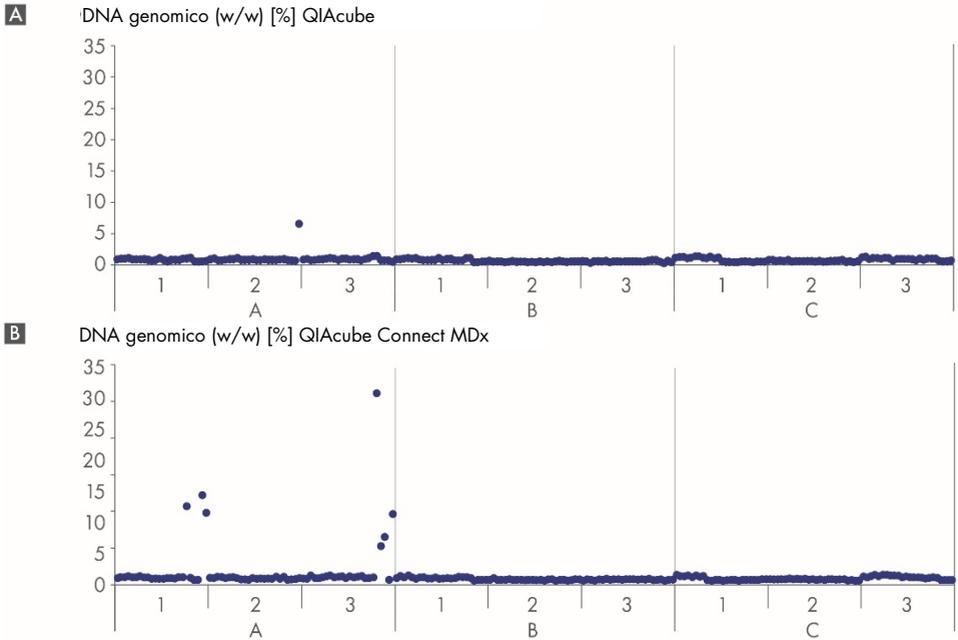


Figura 14. Purezza dell'RNA (% della contaminazione del DNA genomico) — Procedura in automatico, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. L'RNA è stato purificato da 3 diversi operatori (A, B, C) usando 3 diversi lotti (1, 2, 3) del PAXgene Blood RNA Kit con più strumenti QIAcube e QIAcube Connect MDx nell'esperimento descritto in Figura 12. Le quantità di DNA genomico (w/w) in tutti i singoli campioni sono mostrate per ogni combinazione operatore-lotto.

Il protocollo in automatico di purificazione dell'RNA mediante PAXgene Blood RNA System fornisce risultati altamente riproducibili e ripetibili per la RT-PCR, come mostrato nella Figura 15 e nella Figura 16 (pagg. 37 e 38), dimostrandosi quindi l'ideale per i test di diagnostica clinica.

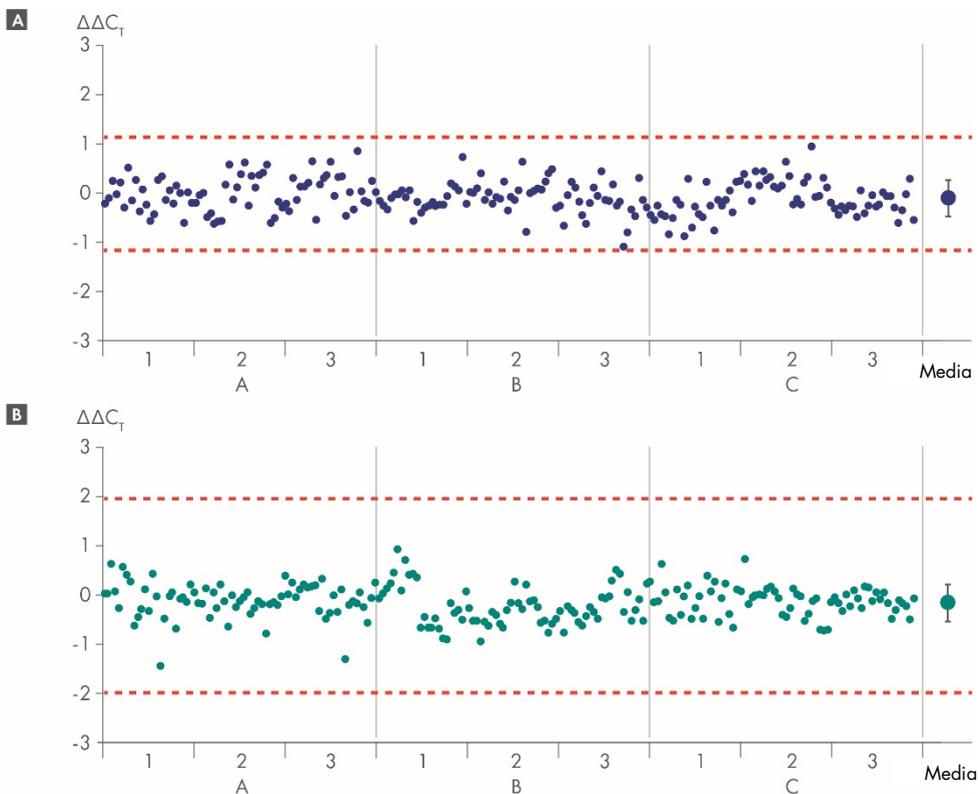


Figura 15. Riproducibilità della RT-PCR — tra protocolli in automatico (QIAcube) e manuali. L'RNA è stato purificato da 3 diversi operatori (A, B, C) usando 3 diversi lotti (1, 2, 3) del PAXgene Blood RNA Kit con strumenti multipli QIAcube e QIAcube Connect Mdx e il protocollo in automatico nell'esperimento descritto in Figura 12. In parallelo, l'RNA è stato purificato dalle corrispondenti provette in duplicati usando il protocollo manuale. I livelli relativi dei trascritti di **[A]** FOS e **[B]** IL1B sono stati determinati per RT-PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Possibili differenze dei livelli dei trascritti tra RNA preparato da campioni di sangue in coppia usando entrambi i protocolli di estrazione (in automatico e manuale) sono state calcolate dal metodo $\Delta\Delta C_T$. Singoli valori $\Delta\Delta C_T$ per tutte le coppie di campioni (4 replicati per 6 pool di donatori per 3 kit di lotti per 3 operatori = 216 coppie per ogni gene) sono rappresentati come singoli punti con medie (punti più grandi) e deviazioni standard (barre nere) per tutti campioni mostrati. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3x$ degli esami (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; precisioni di esame diverse rispetto alle Figure 1-4, 8 e 9 a causa delle versioni di esame differenti).

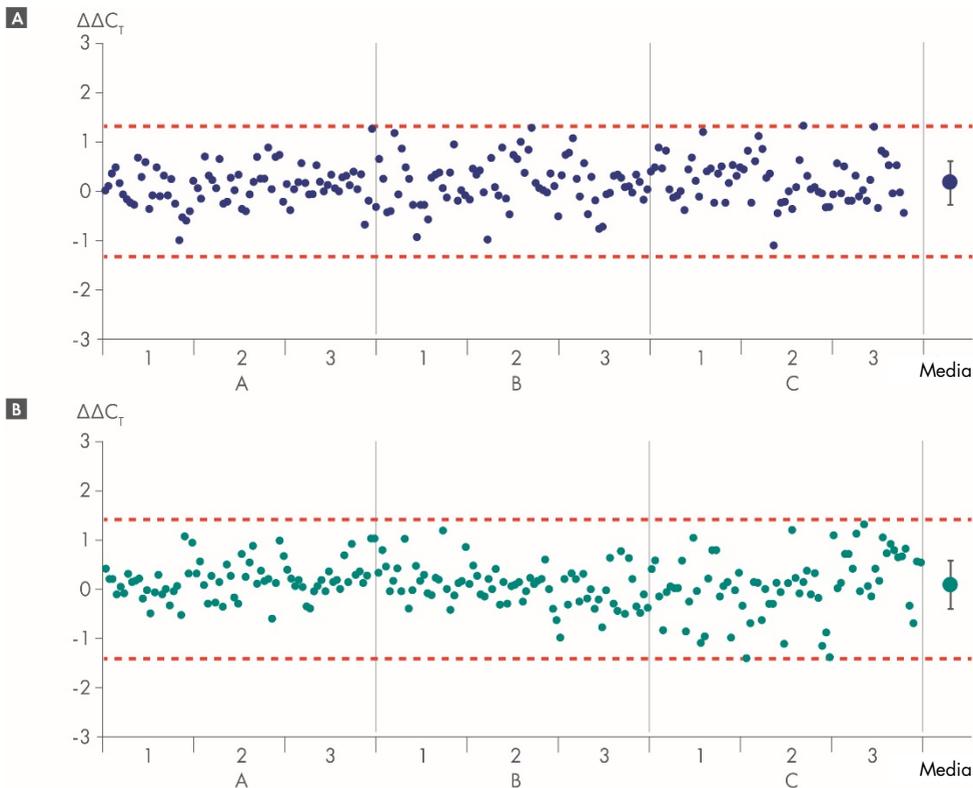


Figura 16. Riproducibilità della RT-PCR — tra QIAcube e QIAcube Connect MDx utilizzando il protocollo in automatico. L'RNA è stato purificato da 3 diversi operatori (A, B, C) usando 3 diversi lotti (1, 2, 3) del PAXgene Blood RNA Kit e il protocollo in automatico su strumenti QIAcube e QIAcube Connect Mdx nell'esperimento descritto in Figura 12. I livelli relativi dei trascritti di **[A]** FOS e **[B]** IL1B sono stati determinati per RT-PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Sono state calcolate le possibili differenze dei livelli dei trascritti tra RNA preparato da campioni di sangue in coppia usando entrambi gli strumenti con il metodo $\Delta\Delta C_T$. Singoli valori $\Delta\Delta C_T$ per tutte le coppie di campioni (4 replicati per 6 pool di donatori per 3 kit di lotti per 3 operatori = 216 coppie per ogni gene) sono rappresentati come singoli punti con medie (punti più grandi) e deviazioni standard (barre nere) per tutti i campioni mostrati. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3x$ degli esami (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; precisioni di esame diverse rispetto alle Figure 1-4, 8, 9 e 15 a causa delle versioni di esame differenti).

Attrezzature e reagenti richiesti ma non forniti dall'utente

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Per tutti i protocolli

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; n. cat. 762165)
- Etanolo (96–100%, grado di purezza p.a.)
- Pipette* (10 μ l–4 ml)
- Puntali sterili privi di RNasi con barriere aerosol anticontaminazione[†]
- Cilindro graduato[‡]
- Centrifuga* in grado di raggiungere 3.000–5.000 \times g, con rotore basculante e alloggiamenti per le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Miscelatore vortex*
- Ghiaccio tritato
- Pennarello indelebile per scrivere sulle etichette

Per il protocollo manuale

- Micro-centrifuga* a velocità variabile capace di raggiungere almeno 1000–8000 \times g, sebbene sia possibile applicare forze g inferiori e superiori (per informazioni dettagliate, vedere i passaggi del protocollo), dotata di rotore per provette per micro-centrifuga da 2 ml

* Assicurarsi che i dispositivi e gli strumenti siano stati revisionati, sottoposti a manutenzione e calibrati regolarmente secondo le raccomandazioni del produttore.

[†] Assicurarsi di avere familiarità con le linee guida per il trattamento dell'RNA (Appendice A, pag. 75).

[‡] Per l'aggiunta di etanolo al tampone BR4 concentrato.

- Incubatore-agitatore* in grado di incubare a 55°C e 65°C e di miscelare a ≥ 400 rpm; max. 1.400 rpm (ad es. Eppendorf® Thermomixer Compact o equivalente)

Per il protocollo in automatico (con QIAcube o QIAcube Connect MDx)

- Forbici

Materiali di consumo per strumenti QIAcube:

- Filter-Tips, 1000 μ l (1024) (QIAGEN, n. cat. 990352)†
- Flaconi per reagenti, 30 ml (6) (QIAGEN, n. cat. 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, n. cat. 990394)†

Accessori per strumenti QIAcube:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, n. cat. 990392) †

Per il protocollo in automatico utilizzando QIAcube Connect MDx

- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, n. cat. 9003070)

Pacchetti di servizi per QIAcube Connect Mdx:

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

* Assicurarsi che i dispositivi e gli strumenti siano stati revisionati, sottoposti a manutenzione e calibrati regolarmente secondo le raccomandazioni del produttore.

† Incluso anche nello Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, n. cat. 990395).

Per il protocollo in automatico utilizzando QIAcube

- QIAcube* (QIAGEN, n. cat. 9001882 [110 V])

* Assicurarsi che i dispositivi e gli strumenti siano stati revisionati, sottoposti a manutenzione e calibrati regolarmente secondo le raccomandazioni del produttore.

Note importanti

Utilizzo degli strumenti QIAcube

Assicurarsi di avere familiarità con l'uso degli strumenti QIAcube. Prima di iniziare i protocolli automatici PAXgene Blood RNA, leggere il manuale Strumenti utente QIAcube e ogni informazione ulteriore fornita con lo strumento QIAcube, ponendo particolare attenzione alle informazioni sulla sicurezza.

Le istruzioni in questa sezione si applicano a QIAcube Connect MDx nonché a QIAcube dove non specificato separatamente.

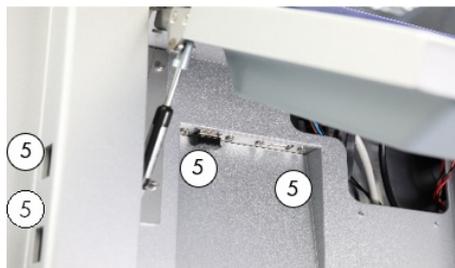
Avviamento degli strumenti QIAcube

Chiudere il coperchio dello strumento QIAcube e spegnere lo strumento con l'interruttore di alimentazione (QIAcube Connect MDx: vedere Figura 17, pag. 43; QIAcube: Figura 18, pag. 44).

Si sentirà un beep e apparirà la schermata di avvio. Lo strumento eseguirà automaticamente i test di inizializzazione.



Parte anteriore del QIAcube Connect MDx



Touch screen estratto



Parte posteriore del QIAcube Connect MDx



Parte posteriore del QIAcube Connect MDx

Figura 17. Caratteristiche esterne del QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|--|
| <p>① Touch screen</p> <p>② Coperchio</p> <p>③ Cassetto materiali di scarto</p> <p>④ Interruttore di alimentazione</p> | <p>⑤ 2 porte USB sul lato sinistro del touch screen; 2 porte USB dietro il touch screen (modulo Wi-Fi collegato a 1 porta USB)</p> <p>⑥ Porta ethernet RJ-45</p> <p>⑦ Presa del cavo di alimentazione</p> <p>⑧ Uscita aria di raffreddamento</p> |
|---|--|



Figura 18. Parte anteriore del QIAcube.

- | | | | |
|---|--|---|--|
| 1 | Touch screen | 4 | Porta USB dietro il pannello di protezione |
| 2 | Coperchio | 5 | Interruttore di alimentazione |
| 3 | Porta seriale RS232 dietro il pannello protettivo (solo per l'uso da parte di specialisti del centro di assistenza tecnica QIAGEN) | 6 | Cassetto materiali di scarto |

Touch screen

Gli strumenti QIAcube sono controllati tramite un touch screen. Il touch screen consente all'utente di utilizzare lo strumento e guidare gli utenti nella preparazione del piano di lavoro. Durante il processamento del campione, il touch screen mostra lo stato del protocollo e il tempo residuo.



Figura 19. Touch screen del QIAcube Connect Mdx estratto

Installazione dei protocolli sugli strumenti QIAcube

Prima di eseguire il primo processo di preparazione dell'RNA sul QIAcube, potrebbe essere richiesta l'installazione iniziale di un protocollo. Installare sia il protocollo "PAXgene Blood RNA Part A" che il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B".

I protocolli per QIAcube Connect MDx vengono forniti all'indirizzo www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources (www.qiagen.com/MyQIAcube per QIAcube) e devono essere scaricati sulla chiavetta USB fornita con gli strumenti QIAcube. Questi protocolli verranno trasferiti allo strumento tramite la porta USB.

La porta USB (QIAcube Connect MDx: situata sul lato del touch screen; vedere la Figura 17, pag. 43; QIAcube: dietro il pannello protettivo, vedere la Figura 18, pag. 44) consente il collegamento degli strumenti QIAcube alla chiavetta USB fornita con gli strumenti QIAcube. I file di dati, come i file di log e di report, possono essere anche trasferiti tramite la porta USB dagli strumenti QIAcube alla penna USB.

 La porta USB è da utilizzarsi esclusivamente con la penna USB fornita da QIAGEN. Non connettere altri dispositivi a questa porta.

 Non rimuovere la penna USB mentre si scaricano protocolli o mentre si trasferiscono file di dati o durante l'esecuzione di un protocollo.

Per ulteriori dettagli sul processo di caricamento dei protocolli sugli strumenti QIAcube, consultare il manuale relativo allo strumento utilizzato.

Caricamento degli strumenti QIAcube

Per guadagnare tempo si può caricare durante una o entrambe le fasi di centrifugazione da 10 minuti (fasi 3 e 5) in "Protocollo: purificazione in automatico dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", pag. 64.

Flaconi per reagenti

Prima di ogni processo sullo strumento QIAcube, riempire con precauzione i 4 flaconi per reagenti elencati nella Tabella 3 (pag. 47) fino al livello indicatore massimo oppure, qualora ciò non sia possibile, fino al livello consentito dai volumi dei tamponi forniti nel PAXgene Blood RNA Kit. Etichettare i flaconi e i tappi chiaramente con i nomi del tampone e collocarli nella posizione appropriata sul rack per flaconi per reagenti. Caricare il rack sul piano di lavoro dello strumento QIAcube come mostrato (Figure 20-22, pag. 47-49).

 Il volume fornito del tampone BR2 non riempirà un flacone per reagenti fino al livello indicatore. I tamponi BR3 e BR4 non possono riempire il flacone fino al livello indicatore dopo il trattamento di campioni multipli in processi precedenti.

 Assicurarsi di rimuovere i tappi dai flaconi prima di porli sul piano di lavoro.



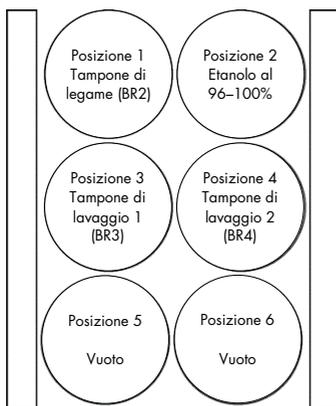
I volumi di tampone forniti nel PAXgene Blood RNA Kit (50) sono sufficienti per un massimo di 7 processi di preparazione dell'RNA sullo strumento QIAcube, con un numero di campioni per processo da 2 a 12. In generale, è necessario evitare i processi con numeri di campioni inferiori per trattare un totale di 50 campioni per kit con un massimo di 7 processi di preparazione dell'RNA. Un numero di processi di preparazione dell'RNA superiore a 7 può portare a volumi di tampone insufficienti per il trattamento degli ultimi campioni.

Tabella 3. Posizioni nel rack per flaconi reagenti

Posizione	Reagente
1	Tampone di legame (BR2)
2	Etanolo al 96–100%
3	Tampone di lavaggio 1 (BR3)
4	Tampone di lavaggio 2 (BR4)*
5	– (lasciare vuoto)
6	– (lasciare vuoto)

*Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96–100%, grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.

A



B



Figura 20. Caricamento del rack per flaconi per reagenti. [A] Schema delle posizioni e dei contenuti dei flaconi nel rack per reagenti. [B] Caricamento del rack sullo strumento QIAcube (QIAcube mostrato come esempio).

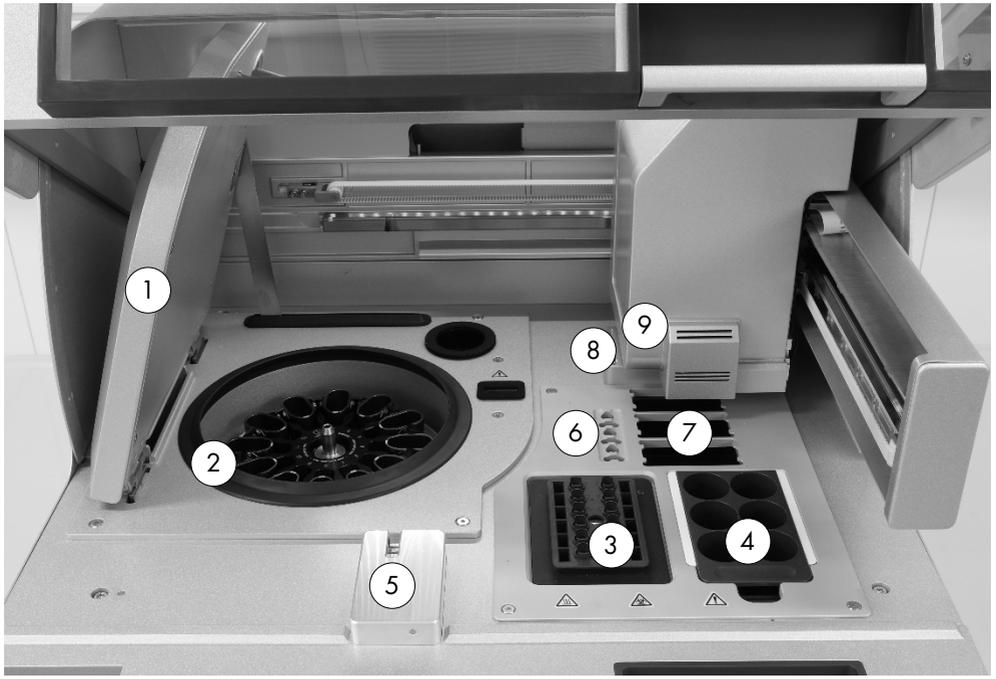


Figura 21. Interno del QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|--|
| <p>① Coperchio centrifuga</p> <p>② Centrifuga</p> <p>③ Agitatore</p> <p>④ Reagent Bottle Rack</p> <p>⑤ Sensore per puntali e chiusura coperchio</p> | <p>⑥ Slot delle provette per micro-centrifuga</p> <p>⑦ 3 slot per rack dei puntali</p> <p>⑧ Slot per lo smaltimento di puntali e colonne</p> <p>⑨ Braccio robotico (include pipettatore a 1 canale, pinza, sensore a ultrasuoni e ottico e LED UV)</p> |
|---|--|

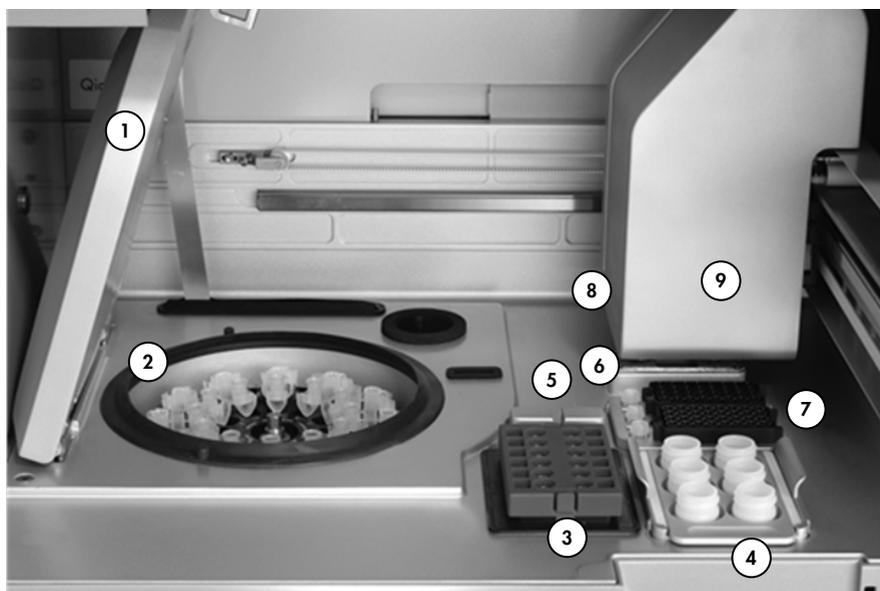


Figura 22. Interno del QIAcube.

- | | | | |
|---|----------------------|---|--|
| 1 | Coperchio centrifuga | 6 | Slot delle provette per micro-centrifuga |
| 2 | Centrifuga | 7 | Rack per puntali |
| 3 | Agitatore | 8 | Slot per lo smaltimento di puntali e colonne |
| 4 | Reagent Bottle Rack | 9 | Braccio robotico |
| 5 | Sensore per puntali | | |

Colonne spin (PRC, PSC), provette per micro-centrifuga (MCT) e materiale in plastica dello strumento QIAcube

Posizionare 2 rack per puntali con Filter-Tips 1000 µl sullo strumento QIAcube (vedere Figure 21 e 22, pagg. 48 e 49). Caricare i rack con altri puntali quando necessario.

 Usare solo puntali per filtro da 1000 µl destinati all'uso con strumenti QIAcube.

Con un pennarello indelebile etichettare gli adattatori per il rotore e le provette per micro-centrifuga (MCT) per ogni campione. Aprire le colonne spin PAXgene Shredder (PSC) da usare e tagliare completamente i tappi con le forbici (vedere la Figura 23, pag. 50).

 Per un corretto funzionamento della pinza robotica degli strumenti QIAcube, rimuovere completamente (tagliare) i tappi e tutte le parti di plastica che uniscono il tappo alle colonne spin PAXgene Shredder (PSC; vedere Figura 23). Diversamente la pinza robotica non può afferrare correttamente le colonne spin (PSC, PRC).

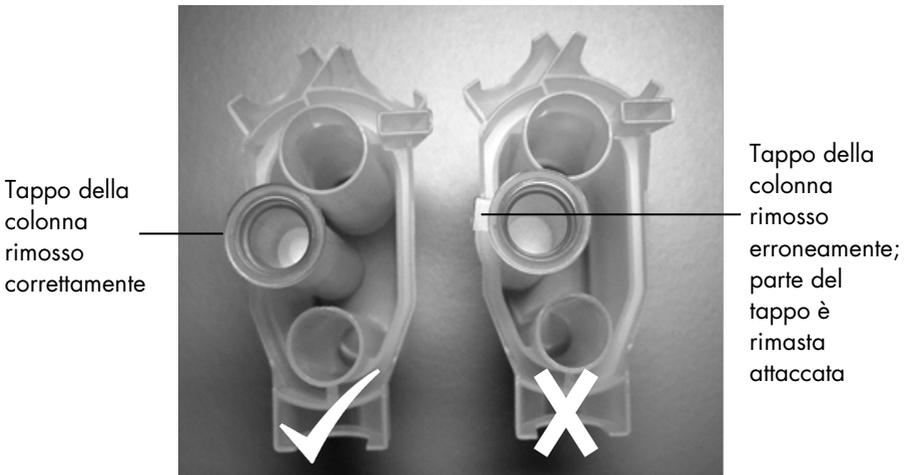


Figura 23. Caricamento di una colonna spin PAXgene Shredder (PSC). La colonna spin PAXgene Shredder (PSC) è caricata nella posizione centrale dell'adattatore per rotore. Tagliare il tappo prima di caricare la colonna.

Caricare la colonna spin PAXgene RNA (PRC), la colonna spin PAXgene Shredder (PSC, senza tappo, vedere Figura 23, pag. 50) e la provetta per micro-centrifuga etichettata nelle posizioni relative in ciascun adattatore per rotore etichettato, come riportato nella Tabella 4 e nella Figura 24.



Assicurarsi che i tappi della colonna spin (PRC) e della provetta per micro-centrifuga (MCT) siano spinti completamente sul fondo degli slot al margine dell'adattatore del rotore, altrimenti potrebbero rompersi durante la centrifugazione.

Tabella 4. Strumenti nell'adattatore per rotore

Posizione	Reagente	Posizione tappo
1	Colonna spin PAXgene RNA (rossa, PRC)	L1
2	Colonne spin PAXgene Shredder (lilla, PSC) (tagliare il tappo prima di inserirlo nell'adattatore rotore)	–
3	Provetta per micro-centrifuga (MCT)*	L3

* Usare le provette per micro-centrifuga (MCT, 1,5 ml) incluse nel PAXgene Blood RNA Kit.

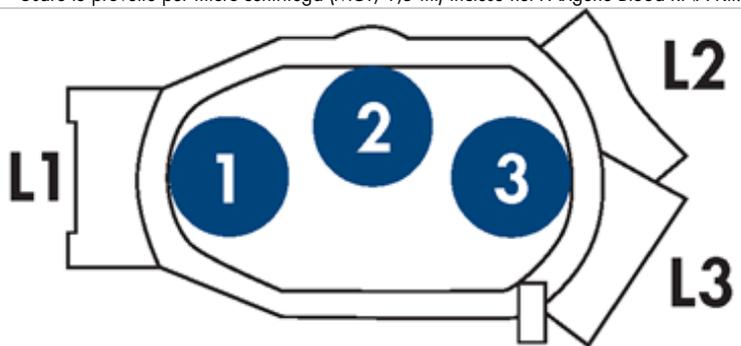


Figura 24. Posizioni nell'adattatore per rotore. L'adattatore per rotore ha tre posizioni per provette (1-3) e tre posizioni per tappi (L1-L3).

Caricamento della centrifuga

Caricare gli adattatori per rotore negli scomparti della centrifuga come illustrato nella Figura 25 di seguito.



Se si processano meno di 12 campioni, assicurarsi di caricare il rotore della centrifuga bilanciato radialmente (vedere Figura 26, pag. 53). Tutti gli scomparti della centrifuga devono essere montati prima di far partire un protocollo, anche se i campioni da processare sono meno di 12. Un singolo (uno) campione o 11 campioni non possono essere processati.



Figura 25. Caricamento della centrifuga sugli strumenti QIAcube. Caricare gli adattatori del rotore assemblati negli scomparti della centrifuga (QIAcube Connect MDx mostrato come esempio).

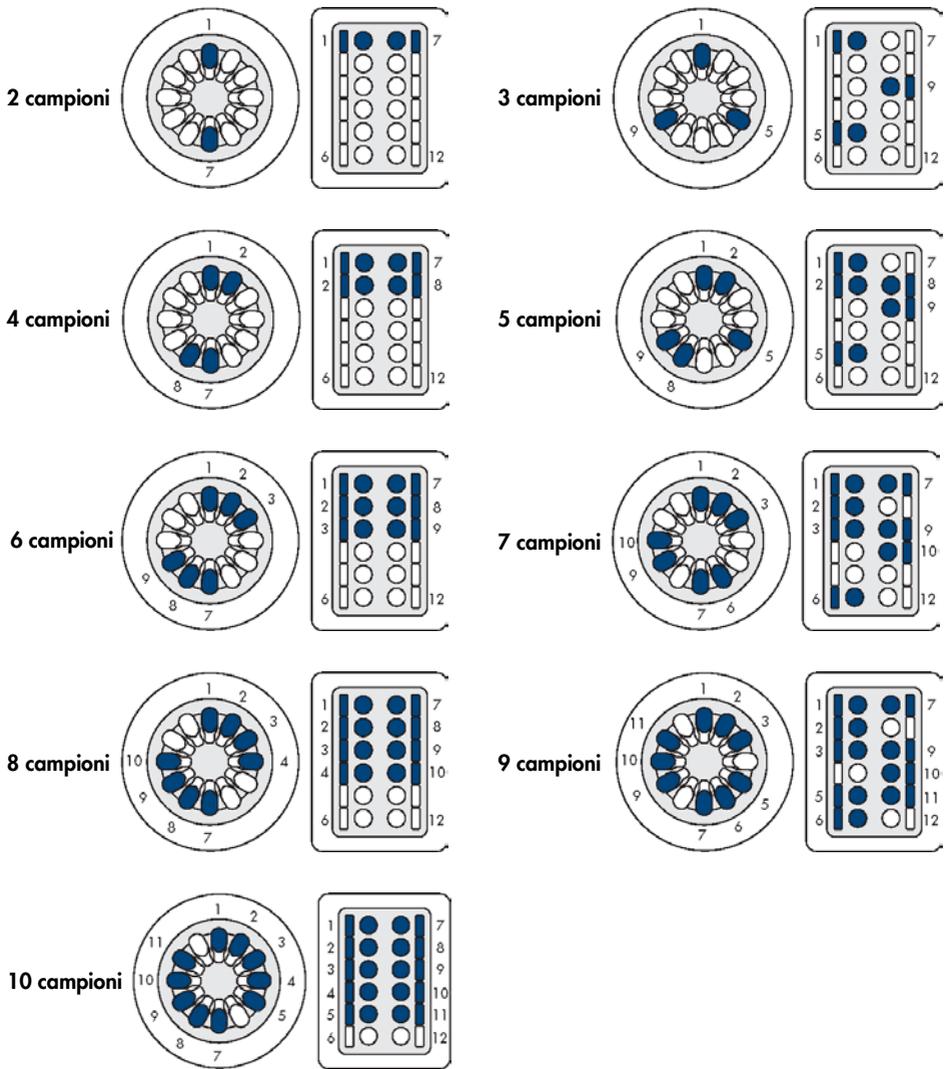


Figura 26. Caricamento della centrifuga e dell'agitatore. Vengono mostrate le posizioni di centrifuga e agitatore per il trattamento di un numero di campioni compreso tra due (2) e dieci (10). Uno (1) o undici (11) campioni non possono essere processati. Per processare 12 campioni, vengono caricate tutte le posizioni della centrifuga e dell'agitatore (immagine non mostrata).

Provette di reazione (PT)

Eliminare tutte le provette di reazione (PT) lasciate negli slot delle provette per micro-centrifuga e provenienti dai processi precedenti (QIAcube Connect MDx: vedere Figura 21, pag. 48, QIAcube: vedere Figura 22, pag. 49). Riempire 3 provette di reazione (PT) con la quantità di reagenti data nella Tabella 5, in base al numero di campioni nel processo.

Per la miscela per incubazione DNasi I, pipettare il volume indicato di tampone di digestione DNA (RDD) in una provetta di reazione (PT) e aggiungere il volume indicato di soluzione concentrata di DNasi I (RNFD). Miscelare delicatamente il tutto pipettando su e giù 3 volte, usando un puntale per pipetta da 1.000 µl.

Usare le provette di reazione (PT) da 2 ml incluse nel PAXgene Blood RNA Kit. Etichettare chiaramente le provette con i nomi dei reagenti e collocarle nella posizione appropriata negli slot delle provette per micro-centrifuga, come indicato nella Tabella 6 (pag. 55).



La DNasi I (RNFD) è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare soltanto pipettando, utilizzando puntali per pipette wide-bore per ridurre la frammentazione. Non utilizzare il vortex.



Assicurarsi di pipettare solo il volume richiesto come indicato nella Tabella 5 di seguito.

Tabella 5. Volume dei reagenti richiesto nelle provette di reazione per gli slot delle provette per micro-centrifuga.

Numero di campioni	Volume di reagente per il numero di campioni indicato (µl)		
	Proteinasi K (PK)	Miscela per incubazione di DNasi I	Tampone di eluizione (BR5)
2	126	187 (23 DNasi I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNasi I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNasi I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNasi I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNasi I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNasi I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNasi I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNasi I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNasi I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNasi I + 806 Buffer RDD)	1177

Tabella 6. Slot delle provette per micro-centrifuga

	Posizione		
	A	B	C
Contenuto	Proteinasi K	Miscela per incubazione di DNasi I	Tampone di eluizione (BR5)
Recipiente	Provetta di reazione (PT)*	Provetta di reazione (PT)*	Provetta di reazione (PT)*

*Usare le provette di reazione da 2 ml incluse nel PAXgene Blood RNA Kit.

Protocollo: Purificazione manuale dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Punti importanti prima di iniziare

- Assicurarsi che la confezione del kit sia intatta e non danneggiata e che la provette dei tamponi non mostrino perdite. Non utilizzare un kit danneggiato.
- Quando si utilizza una pipetta, assicurarsi che sia impostata sul volume corretto e che il liquido venga aspirato e dispensato completamente.
- Per evitare di trasferire un campione alla provetta o alla colonna sbagliata, assicurarsi che tutte le provette e le colonne siano etichettate in modo appropriato con un pennarello indelebile. Applicare un'etichetta al tappo e alla parete esterna (PT, MCT). Per le colonne spin applicare un'etichetta alla parete esterna della rispettiva provetta di reazione (PT). Dopo avervi trasferito il liquido chiudere sempre ogni provetta e ogni colonna.
- Versamenti di campioni e tamponi durante la procedura possono ridurre resa e purezza dell'RNA.
- Se non indicato diversamente, tutte le fasi di questo protocollo, incluse quelle di centrifugazione, devono essere effettuate a temperatura ambiente (15–25°C).

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, durante la manipolazione dei campioni è necessario attenersi alle seguenti precauzioni per evitare contaminazioni crociate:

- Pipettare con attenzione il campione nella colonna (PRC, PSC) senza bagnarne il bordo.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Utilizzare puntali con barriera aerosol anticontaminazione.
- Non toccare la membrana della colonna (PRC, PSC) con il puntale della pipetta.

- Dopo la miscelazione con vortex o il riscaldamento di una provetta (MCT), centrifugare brevemente per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.
- Indossare i guanti per l'intera procedura. In caso di contatto fra guanti e campione, sostituire immediatamente i guanti.
- Chiudere sempre la colonna (PRC, PSC) prima di posizionarla nella micro-centrifuga. Centrifugare come descritto nel protocollo.
- Aprire una colonna spin (PRC, PSC) per volta, facendo attenzione a non creare aerosol.
- Per un trattamento in parallelo efficiente di campioni multipli, preparare un rack con provette di reazione (PT) in cui trasferire le colonne spin (PRC, PSC) dopo la centrifugazione. Smaltire le provette di reazione (PT) usate che contengono il liquido eluito e disporre le nuove provette di reazione (PT) con le colonne spin (PRC, PSC) direttamente nella micro-centrifuga.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Il sangue deve essere raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) secondo le istruzioni riportate nella relativa descrizione nel manuale PAXgene Blood RNA Tube. Se necessario, per consigli sull'uso delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) consultare l'Appendice C (pag. 78).
- Assicurarsi che le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) vengano incubate per almeno 2 ore a temperatura ambiente dopo il prelievo di sangue, per garantire la completa lisi delle cellule ematiche. L'incubazione delle PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per tutta la notte può aumentare la resa. Se una delle PAXgene Blood RNA Tube (BRT) è stata conservata a 2–8°C o -20°C o -70°C dopo il prelievo del sangue, innanzitutto equilibrarla a temperatura ambiente e incubarla sempre a temperatura ambiente per almeno 2 ore prima di iniziare la procedura.
- Leggere le informazioni sulla sicurezza a pag. 10.
- Leggere le linee guida sulla manipolazione dell'RNA (Appendice A, pag. 75).
- Assicurarsi che gli strumenti, ad esempio, pipette e incubatore-agitatore, vengano controllati e calibrati regolarmente in base alle indicazioni del produttore.

- Per le fasi 5 e 20 è necessario un incubatore–agitatore. Impostare la temperatura di questo strumento a 55°C.
- Dopo una lunga conservazione il tampone di legame (BR2) può formare un precipitato. Se necessario, riscaldare a 37°C per scioglierlo.
- Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96–100%, grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.
- Se si usa per la prima volta l’RNase-Free DNase Set, preparare una soluzione concentrata di DNasi I. Sciogliere la DNasi I solida (RNFD; 1.500 unità Kunitz)* in 550 µl di tampone di risospensione DNasi (DRB) presente nel set. Assicurarsi di non disperdere la DNasi I (RNFD) aprendo la fiala. La DNasi I (RNFD) ricostituita non deve essere miscelata su vortex. La DNasi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare la soluzione con cautela capovolgendo la fiala.
- Dati attualmente disponibili mostrano che la DNasi I ricostituita (RNFD) si mantiene stabile per un massimo di 6 settimane se conservata a 2–8°C. Per periodi di conservazione più lunghi, rimuovere la soluzione concentrata dalla fiala in vetro, suddividerla in aliquote monouso (utilizzare provette per micro-centrifuga da 1,5 ml [MCT] presenti nel kit; sono sufficienti per 5 aliquote) e conservarla a -20°C fino a 9 mesi. Le aliquote scongelate possono essere conservate a 2–8°C fino a 6 settimane. Non ricongelare le aliquote dopo lo scongelamento.
- Quando si ricostituisce e si aliquota la DNasi I (RNFD), attenersi alle “Note generali per il trattamento dell’RNA” (Appendice A, pag. 75).

* L’unità Kunitz viene normalmente utilizzata per misurare la DNasi I. Un’unità Kunitz si definisce come la quantità di DNasi I che provoca in A_{260} un aumento dell’assorbanza di 0,001 per minuto e millilitro a 25°C e pH 5,0, utilizzando come substrato DNA altamente polimerizzato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

Procedura

1. Centrifugare la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per 10 minuti a 3.000–5.000 x g utilizzando un rotore basculante.



Assicurarsi che il campione di sangue sia stato incubato nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per almeno 2 ore a temperatura ambiente (15–25°C) per garantire la completa lisi delle cellule ematiche.



Il rotore deve contenere adattatori per provette a fondo arrotondato. Se si utilizzano altri tipi di adattatori le provette possono danneggiarsi durante la centrifugazione.

2. Rimuovere il supernatante per decantazione o pipettamento. Aggiungere al pellet 4 ml di acqua priva di RNasi (RNFW) e chiudere la provetta con una nuova chiusura secondaria BD Hemogard (fornita con il kit).

Se il supernatante viene eliminato per decantazione attenzione a non staccare il pellet e asciugare il bordo della provetta con carta assorbente pulita.

3. Miscelare con il vortex finché il pellet non si scioglie e centrifugare per 10 minuti a 3.000–5.000 x g utilizzando un rotore basculante. Rimuovere ed eliminare tutto il supernatante. Eventuali detriti cellulari che rimangono nel supernatante dopo la miscelazione con vortex non influenzano la procedura.



La rimozione incompleta del supernatante inibisce la lisi e diluisce il lisato, compromettendo le condizioni di legame dell'RNA alla membrana PAXgene.

4. Aggiungere 350 µl di tampone di risospensione (BR1) e miscelare su vortex fino alla completa dissoluzione del pellet.
5. Pipettare il campione in una provetta (MCT) da 1,5 ml. Aggiungere 300 µl di tampone di legame (BR2) e 40 µl di proteinasi K (PK). Miscelare su vortex per 5 secondi e incubare a 55°C per 10 minuti utilizzando un incubatore–agitatore a 400–1400 rpm. Dopo l'incubazione, impostare la temperatura dell'incubatore–agitatore a 65°C (per la fase 20).



Non mescolare il tampone di legame (BR2) e la proteinasi K (PK) prima di aggiungerli al campione.

6. Pipettare il lisato direttamente nella colonna spin PAXgene Shredder (PSC, lilla) posta in una provetta di reazione da 2 ml (PT) e centrifugare per 3 minuti alla velocità massima (non superiore a 20.000 x g).



Pipettare con attenzione il lisato nella colonna (PSC) e controllare che il lisato sia trasferito completamente alla colonna spin (PSC).

Per evitare danni a colonne (PSC) e provette di reazione (PT), non superare 20.000 x g.



Alcuni campioni possono uscire dalla colonna spin PAXgene Shredder (PSC) senza centrifugazione. Questo è dovuto alla bassa viscosità di alcuni campioni e non dovrebbe essere considerato un difetto del prodotto.

7. Con la massima cura, trasferire tutto il supernatante della frazione eluita in una provetta per micro-centrifuga pulita da 1,5 ml (MCT) senza interferire con il pellet nella provetta di reazione.
8. Aggiungere 350 µl di etanolo (96–100 %, grado di purezza p.a.). Miscelare su vortex e centrifugare brevemente (1–2 secondi a 500–1.000 x g) per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.



La durata della centrifugazione non deve superare 1–2 secondi; in caso contrario gli acidi nucleici possono precipitare riducendo la resa dell'RNA totale.

9. Pipettare 700 µl di campione nella colonna spin PAXgene RNA (PRC; rossa) posta in una provetta di reazione (PT) da 2 ml e centrifugare per 1 minuto 8000–20.000 x g. Collocare la colonna spin (PRC) in una nuova provetta di reazione (PT) da 2 ml e smaltire la vecchia provetta (PT) contenente il flow-through.
10. Pipettare il rimanente campione nella colonna spin PAXgene RNA (PRC) e centrifugare per 1 minuto a 8000–20.000 x g. Collocare la colonna spin (PRC) in una nuova provetta di reazione (PT) da 2 ml e smaltire la vecchia provetta (PT) contenente il flow-through.



Pipettare con attenzione il campione nella colonna spin (PRC) e controllare visivamente che esso sia completamente trasferito nella colonna spin (PRC).

11. Pipettare 350 µl di tampone di lavaggio 1 (BR3) nella colonna spin PAXgene RNA (PRC). Centrifugare per 1 minuto a 8000–20.000 x g. Collocare la colonna spin (PRC) in una nuova provetta di reazione (PT) da 2 ml e smaltire la vecchia provetta (PT) contenente il flow-through.
12. Aggiungere 10 µl di soluzione concentrata di DNasi I (RNFD) a 70 µl di tampone di digestione DNA (RDD) in una provetta per micro-centrifuga da 1,5 ml (MCT). Miscelare dando leggeri colpetti con le dita alla provetta e centrifugare brevemente per raccogliere il liquido residuo dalle pareti interne della provetta.
- Se si opera, ad esempio, su 10 campioni, aggiungere 100 µl di soluzione concentrata di DNasi I (RNFD) a 700 µl di tampone di digestione DNA (RDD). Utilizzare le provette da 1,5 ml (MCT) in dotazione con il kit.



La DNasi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Per questo motivo miscelare la soluzione solo dando leggeri colpetti con le dita alla provetta. Non utilizzare il vortex.

13. Pipettare la miscela di incubazione DNasi I (RNFD) (80 µl) direttamente sulla membrana della colonna spin PAXgene RNA (PRC) e lasciare sul piano di lavoro (20–30°C) per 15 minuti.



Assicurarsi di pipettare la miscela di incubazione di DNasi I (RNFD) direttamente sulla membrana. Se parte della miscela rimane sulle pareti o sull'O-ring della colonna (PRC), la digestione della DNasi può risultare incompleta.

14. Pipettare 350 µl di tampone di lavaggio 1 (BR3) nella colonna spin PAXgene RNA (PRC) e centrifugare per 1 minuto a 8.000–20.000 x g. Collocare la colonna spin (PRC) in una nuova provetta di reazione (PT) da 2 ml e smaltire la vecchia provetta (PT) contenente il flow-through.

15. Pipettare 500 µl di tampone di lavaggio 2 (BR4) nella colonna spin PAXgene RNA (PRC) e centrifugare per 1 minuto a 8.000–20.000 x g. Collocare la colonna spin (PRC) in una nuova provetta di reazione (PT) da 2 ml e smaltire la vecchia provetta contenente il flow-through.



Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Assicurarsi di avere aggiunto etanolo al tampone di lavaggio 2 (BR4) prima dell'uso (vedere "Ulteriori accorgimenti prima di iniziare", pag. 57).

16. Aggiungere altri 500 µl di tampone di lavaggio 2 (BR4) nella colonna spin PAXgene RNA (PRC). Centrifugare per 3 minuti a 8.000–20.000 x g.

17. Smaltire la provetta di reazione (PT) contenente il flow-through e disporre la colonna spin PAXgene RNA (PRC) in una nuova provetta di reazione (PT) da 2 ml. Centrifugare per 1 minuto a 8.000–20.000 x g.

18. Smaltire la provetta di reazione (PT) contenente il flow-through. Collocare la colonna spin PAXgene RNA (PRC) in una provetta per micro-centrifuga (MCT) da 1,5 ml e pipettare 40 µl di tampone di eluizione (BR5) direttamente sulla membrana della colonna spin PAXgene RNA (PRC). Centrifugare per 1 minuto a 8.000–20.000 x g per eluire l'RNA. Per la massima efficienza di eluizione è importante bagnare l'intera membrana con il tampone di eluizione (BR5).

19. Ripetere la fase di eluizione (fase 18) come descritto, utilizzando 40 µl di tampone di eluizione (BR5) e la stessa provetta (MCT).

20. Incubare l'eluato per 5 minuti a 65°C nell'incubatore-agitatore (vedere fase 5), senza agitare. Dopo l'incubazione raffreddare immediatamente in ghiaccio.

Questa incubazione a 65°C denatura l'RNA per applicazioni downstream. Non superare tempo e temperatura di incubazione.

21. Se i campioni di RNA non vengono utilizzati subito, conservare a -20°C o -70°C.

Poiché l'RNA rimane denaturato dopo ripetuti passaggi di congelamento/scongelamento, non è necessario ripetere l'incubazione a 65°C. Se si utilizzano i campioni di RNA per test diagnostici, attenersi alle istruzioni fornite dal produttore.

Per una quantificazione dell'RNA più precisa e attendibile, misurando l'assorbanza a 260 nm, consigliamo di diluire i campioni con 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5. * Una diluizione del campione con acqua priva di RNasi potrebbe portare a risultati imprecisi o troppo bassi.

Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tampone Tris-HCl presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.



Per la quantificazione in tampone Tris-HCl, usare la relazione $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Vedere Appendice B, pag. 76.

* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Protocollo: purificazione in automatico dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Punti importanti prima di iniziare

- Assicurarsi che la confezione del kit sia intatta e non danneggiata e che la provette dei tamponi non mostrino perdite. Non utilizzare un kit danneggiato.
- Quando si utilizza una pipetta, assicurarsi che sia impostata sul volume corretto e che il liquido venga aspirato e dispensato completamente.
- Per evitare di trasferire un campione alla provetta o al materiale di laboratorio in plastica sbagliato, assicurarsi che tutte le provette di reazione (PT), le provette per micro-centrifuga (MCT) e gli adattatori per rotore siano etichettati in modo appropriato con un pennarello indelebile. Applicare un'etichetta al tappo, alla parete esterna di ogni provetta per micro-centrifuga (MCT), di ogni provetta di reazione (PT) e di ogni adattatore per rotore.
- Versamenti di campioni e tamponi durante la procedura possono ridurre resa e purezza dell'RNA.
- Se non indicato diversamente, tutte le fasi di questo protocollo, incluse quelle di centrifugazione, devono essere effettuate a temperatura ambiente (15–25°C).

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, durante la manipolazione dei campioni è necessario attenersi alle seguenti precauzioni per evitare contaminazioni crociate:

- Pipettare con attenzione il campione dentro la provetta di reazione (PT), sul fondo della provetta, senza bagnare il bordo.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Utilizzare puntali con barriera aerosol anticontaminazione.

- Non toccare la membrana della colonna (PRC, PSC) con il puntale della pipetta.
- Dopo la miscelazione con vortex o il riscaldamento di una provetta (MCT), centrifugare brevemente per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.
- Indossare i guanti per l'intera procedura. In caso di contatto fra guanti e campione, sostituire immediatamente i guanti.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Il sangue deve essere raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) secondo le istruzioni riportate nella relativa descrizione nel manuale PAXgene Blood RNA Tube. Se necessario, per consigli sull'uso delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) consultare l'Appendice C (pag. 78).
- Assicurarsi che le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) vengano incubate per almeno 2 ore a temperatura ambiente dopo il prelievo di sangue, per garantire la completa lisi delle cellule ematiche. L'incubazione delle PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per tutta la notte può aumentare la resa. Se una delle PAXgene Blood RNA Tube (BRT) è stata conservata a 2–8°C o -20°C o -70°C dopo il prelievo del sangue, innanzitutto equilibrarla a temperatura ambiente e incubarla sempre a temperatura ambiente per almeno 2 ore prima di iniziare la procedura.
- Leggere le informazioni sulla sicurezza a pag. 10.
- Leggere "Note importanti", pag. 42.
- Leggere le linee guida sulla manipolazione dell'RNA (Appendice A, pag. 75).
- Leggere il manuale utente relativo allo strumento QIAcube in uso e ogni ulteriore informazione fornita con il QIAcube, prestando particolare attenzione alle informazioni sulla sicurezza.
- Assicurarsi che i dispositivi e gli strumenti, come le pipette e lo strumento QIAcube, siano stati controllati e calibrati regolarmente secondo le raccomandazioni del produttore.
- Dopo una lunga conservazione il tampone di legame (BR2) può formare un precipitato. Se necessario, riscaldare a 37°C per scioglierlo.

- Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere il volume di etanolo appropriato (96–100%, grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.
- Se si usa per la prima volta l’RNase-Free DNase Set, preparare una soluzione concentrata di DNasi I. Sciogliere la DNasi I solida (RNFD; 1.500 unità Kunitz)* in 550 µl di tampone di risospensione DNasi (DRB) presente nel set. Assicurarsi di non disperdere la DNasi I (RNFD) aprendo la fiala. La DNasi I (RNFD) ricostituita non deve essere miscelata su vortex. La DNasi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare la soluzione con cautela capovolgendo la fiala.
- Dati attualmente disponibili mostrano che la DNasi I ricostituita (RNFD) si mantiene stabile per un massimo di 6 settimane se conservata a 2–8°C. Per periodi di conservazione più lunghi, rimuovere la soluzione concentrata dalla fiala in vetro, suddividerla in aliquote monouso (utilizzare provette per micro-centrifuga da 1,5 ml [MCT] presenti nel kit; sono sufficienti per 5 aliquote) e conservarla a -20°C fino a 9 mesi. Le aliquote scongelate possono essere conservate a 2–8°C fino a 6 settimane. Non ricongelare le aliquote dopo lo scongelamento.
- Quando si ricostituisce e si aliquota la DNasi I (RNFD), attenersi alle “Note generali per il trattamento dell’RNA” (Appendice A, pag. 75).
- Installare il corretto adattatore per agitatore (incluso negli strumenti QIAcube; usare l’adattatore per provette safe-lock da 2 ml, segnato con un “2”) e porre il rack dell’agitatore sopra l’adattatore.
- Controllare il cassetto rifiuti e se necessario svuotarlo.
- Installare gli idonei protocolli se non lo si è già fatto per i processi precedenti. Il QIAcube Connect MDx richiede il download di tutti i protocolli che si trovano nel relativo file zip. Per il QIAcube classico, installare sia il protocollo “PAXgene Blood RNA Part A” che il protocollo “PAXgene Blood RNA Part B”. Vedere “Installazione dei protocolli sugli strumenti QIAcube”, pag. 45.

* L’unità Kunitz viene normalmente utilizzata per misurare la DNasi I. Un’unità Kunitz si definisce come la quantità di DNasi I che provoca in A_{260} un aumento dell’assorbanza di 0,001 per minuto e millilitro a 25°C e pH 5,0, utilizzando come substrato DNA altamente polimerizzato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

Procedura

1. Chiudere il coperchio dello strumento QIAcube e accendere lo strumento QIAcube con l'interruttore di alimentazione (QIAcube Connect MDx: vedere Figura 17, pag. 43; QIAcube: vedere Figura 18, pag. 44).

Si sentirà un beep e apparirà la schermata di avvio. Gli strumenti eseguiranno automaticamente i test di inizializzazione.

2. Aprire il coperchio dello strumento QIAcube e caricare i reagenti e il materiale in plastica necessari nello strumento QIAcube. Vedere "Caricamento degli strumenti QIAcube", pag. 46.

Per guadagnare tempo si può caricare durante uno o entrambe le successive fasi di centrifugazione da 10 minuti (fasi 3 e 5).

3. Centrifugare la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per 10 minuti a 3.000–5.000 x g utilizzando un rotore basculante.



Assicurarsi che il campione di sangue sia stato incubato nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per almeno 2 ore a temperatura ambiente (15–25°C), per garantire la completa lisi delle cellule ematiche.



Il rotore deve contenere adattatori per provette a fondo arrotondato. Se si utilizzano altri tipi di adattatori le provette possono danneggiarsi durante la centrifugazione.

4. Rimuovere il supernatante per decantazione o pipettamento. Aggiungere al pellet 4 ml di acqua priva di RNasi (RNFV) e chiudere la provetta con una nuova chiusura secondaria BD Hemogard (fornita con il kit).

Se il supernatante viene eliminato per decantazione attenzione a non staccare il pellet e asciugare il bordo della provetta con carta assorbente pulita.

5. Miscelare con il vortex finché il pellet non si scioglie e centrifugare per 10 minuti a 3.000–5.000 x g utilizzando un rotore basculante. Rimuovere ed eliminare tutto il supernatante.

Eventuali detriti cellulari che rimangono nel supernatante dopo la miscelazione con vortex non influenzano la procedura.



La rimozione incompleta del supernatante inibisce la lisi e diluisce il lisato, compromettendo le condizioni di legame dell'RNA alla membrana PAXgene.

6. Aggiungere 350 µl di tampone di risospensione (BR1) e miscelare su vortex fino alla completa dissoluzione del pellet.

7. Pipettare il campione in una provetta di reazione da 2 ml (PT).



Usare le provette di reazione (PT) da 2 ml incluse nel PAXgene Blood RNA Kit.

8. Caricare le provette di reazione aperte (PT) contenente il campione nell'agitatore per strumenti QIAcube (QIAcube Connect MDx: vedere Figura 21, pag. 48; QIAcube: vedere Figura 22, pag. 49). Le posizioni del campione sono numerate per agevolare il caricamento. Inserire gli innesti per i rack dell'agitatore (inclusi con gli strumenti QIAcube) negli slot sul bordo di ogni rack dell'agitatore vicino a ogni provetta di reazione. Questo permette la rilevazione dei campioni durante il controllo del caricamento.



Assicurarsi che sia installato il corretto adattatore per agitatore (adattatore agitatore, 2 ml, provette safe-lock, contrassegnate con un "2", incluse con gli strumenti QIAcube).



Se si processano meno di 12 campioni, assicurarsi di caricare il rack dell'agitatore come mostrato in Figura 26, pag. 53. Uno (1) o undici (11) campioni non possono essere processati. I numeri di posizione nel rack dell'agitatore corrispondono ai numeri di posizione nella centrifuga.

9. Chiudere il coperchio dello strumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: vedere Figura 17, pag. 43; QIAcube: vedere Figura 18, pag. 44).

10. Selezionare il protocollo "PAXgene Blood RNA Part A" e far partire il protocollo.

Seguire le istruzioni fornite sul touch screen dello strumento QIAcube.



Assicurarsi che le due parti del programma (parte A e B) siano installate sullo strumento QIAcube (vedere "Installazione dei protocolli sugli strumenti QIAcube", pag. 45).



Gli strumenti QIAcube eseguiranno i controlli del caricamento dei campioni, dei puntali, degli adattatori del rotore e dei flaconi per reagenti.

11. Al termine del protocollo "PAXgene Blood RNA Part A", aprire il coperchio dello strumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: vedere Figura 17, pag. 43; QIAcube: vedere Figura 18, pag. 44). Rimuovere e scartare le colonne spin PAXgene RNA (PRC) dagli adattatori del rotore e le provette di reazione (PT) vuote dall'agitatore.



Durante il processo le colonne spin vengono trasferite dalla posizione 1 (posizione tappo L1) alla posizione 3 dell'adattatore del rotore (posizione tappo L2) tramite lo strumento (vedere Figura 24, pag. 51).

12. Chiudere i tappi di tutte le provette per micro-centrifuga (MCT) da 1,5 ml contenenti l'RNA purificato negli adattatori del rotore (posizione 3, posizione tappo L3, vedere Figura 24, pag. 51). Trasferire le provette per micro-centrifuga (MCT) da 1,5 ml sull'adattatore dell'agitatore dello strumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: vedere Figura 21, pag. 48; QIAcube: vedere Figura 22, pag. 49).

13. Chiudere il coperchio dello strumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: vedere Figura 17, pag. 43; QIAcube: vedere Figura 18, pag. 44).

14. Selezionare il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B" e far partire il protocollo.

Seguire le istruzioni fornite sul touch screen dello strumento QIAcube.



Questo programma incuba i campioni a 65°C e denatura l'RNA per applicazioni downstream dell'RNA. Se l'applicazione downstream comprende una fase di denaturazione a caldo non saltare questa fase. Una sufficiente denaturazione dell'RNA è essenziale per ottenere la massima efficacia nelle applicazioni downstream.

15. Al termine del programma "PAXgene Blood RNA Part B", aprire il coperchio dello strumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: vedere Figura 17, pag. 43; QIAcube: vedere Figura 18, pag. 44). Posizionare immediatamente le provette per micro-centrifuga (MCT) contenenti l'RNA purificato sul ghiaccio.



AVVERTENZA: superficie rovente. L'agitatore può raggiungere temperature superiori a 70°C. Evitare di toccarlo quando è bollente.



Non lasciare l'RNA purificato nello strumento QIAcube. Poiché i campioni non sono raffreddati, l'RNA purificato può essere degradato. Si sconsiglia per questo la preparazione dei campioni durante la notte senza opportuna sorveglianza.

16. Se i campioni di RNA non vengono utilizzati subito, conservare a -20°C o -70°C.

Poiché l'RNA rimane denaturato dopo ripetuti congelamenti e scongelamenti, non è necessario ripetere il protocollo di incubazione a caldo ("PAXgene Blood RNA Part B"). Se si utilizzano i campioni di RNA per test diagnostici, attenersi alle istruzioni fornite dal produttore.

Per una quantificazione dell'RNA più precisa e attendibile misurando l'assorbanza a 260 nm, consigliamo di diluire i campioni in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5. * Una diluizione del campione con acqua priva di RNasi potrebbe portare a risultati imprecisi o troppo bassi.

Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tampone Tris-HCl presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.



Per la quantificazione in tampone Tris-HCl, usare la relazione $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Vedere Appendice B, pag. 76.

* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

17. Rimuovere il rack dei flaconi per reagenti dal piano di lavoro dello strumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: vedere Figura 21, pag. 48; QIAcube: vedere Figura 22, pag. 49), e chiudere tutti i flaconi con i tappi opportunamente etichettati. La soluzione tampone in flaconi può essere conservata a temperatura ambiente (15–25°C) per un massimo di 3 mesi. Rimuovere e gettare i reagenti rimasti nelle provette di reazione (PT) negli slot per provette da micro-centrifuga dello strumento QIAcube. Rimuovere e gettare gli adattatori del rotore dalla centrifuga. Svuotare il cassetto dei materiali di scarto QIAcube Connect MDx (QIAcube Connect MDx: vedere Figura 17, pag. 43; QIAcube: vedere Figura 18, pag. 44). Chiudere il coperchio dello strumento QIAcube e spegnere lo strumento con l'interruttore di alimentazione.

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare la pagina relativa alle domande frequenti (Frequently Asked Questions, FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti dei servizi tecnici QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni ed esami (per le informazioni sui contatti, vedere l'ultima pagina o visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti

RNA degradato

Contaminazione da RNasi



Prestare attenzione a non introdurre RNasi nei reagenti durante la procedura o la successiva manipolazione (vedere Appendice A, pag. 75).

Bassa resa dell'RNA

a) Meno di 2,5 ml di sangue raccolti nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Verificare che siano raccolti 2,5 ml di sangue nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT, vedere il manuale PAXgene Blood RNA Tube).

b) Concentrazione di RNA misurata in acqua



Per una quantificazione più precisa, l'RNA deve essere diluito in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5* (vedere Appendice B, pag. 76).

* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Commenti e suggerimenti

- c) Detriti cellulari trasferiti nella colonna spin PAXgene RNA (PRC) nella fasi 9 e 10 del protocollo manuale  Evitare di trasferire particelle di grandi dimensioni mentre si pipetta il supernatante nella fase 7 del protocollo manuale (il trasferimento di detriti di piccole dimensioni non influenza la procedura).
- d) Supernatante non eliminato completamente nel passaggio 3  Assicurarsi di rimuovere completamente il supernatante. Se il supernatante viene fatto decantare, rimuovere le gocce dal bordo del PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tamponando con carta assorbente. Prendere le necessarie precauzioni per evitare contaminazioni crociate.
- e) Dopo il prelievo il sangue è stato incubato meno di 2 ore nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT)  Dopo il prelievo incubare il sangue nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per almeno 2 ore.

Basso valore A_{260}/A_{280}

- a) Acqua utilizzata per diluire l'RNA per misurazioni di A_{260}/A_{280}  Utilizzare 10 mM di Tris-HCl pH 7,5 per diluire l'RNA prima di misurare la purezza* (vedere Appendice B pag. 76).

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

Commenti e suggerimenti

- b) Spettrofotometro non azzerato completamente



Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5, presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.

Malfunzionamento dello strumento

Gli strumenti QIAcube non funzionavano correttamente

Leggere il manuale utente QIAcube appropriato, prestando particolare attenzione alla sezione Risoluzione dei problemi. Assicurarsi che lo strumento QIAcube sia sottoposto a corretta manutenzione, come descritto nel manuale utente.

Appendice A: Note generali per il trattamento dell'RNA

Trattamento dell'RNA



Le ribonucleasi (RNasi) sono enzimi molto stabili e attivi che non necessitano normalmente di cofattori per espletare la loro funzione. Poiché le RNasi sono difficili da inattivare e anche minime quantità sono sufficienti a degradare l'RNA, non utilizzare materiale in plastica o vetro senza aver prima eliminato le possibili contaminazioni da RNasi. Fare molta attenzione a non introdurre inavvertitamente RNasi nel campione di RNA durante o dopo la procedura di purificazione. Per creare e mantenere un ambiente privo di RNasi, occorre prendere le seguenti precauzioni durante il pre-trattamento e l'utilizzo di flaconi e soluzioni, monouso e non, mentre si opera con l'RNA.

Raccomandazioni generali per il trattamento



Quando si lavora con l'RNA è necessario utilizzare tecniche di asepsi microbiologiche appropriate. Le mani e le particelle di polvere trasportano batteri e muffe e rappresentano le fonti più comuni di contaminazione da RNasi. Indossare sempre guanti in lattice o vinile quando si manipolano i reagenti e i campioni di RNA, per evitare la contaminazione da RNasi dovuta alla superficie della pelle o alla polvere delle attrezzature di laboratorio. Cambiare i guanti frequentemente e chiudere le provette subito dopo l'uso. Mantenere l'RNA purificato in ghiaccio mentre si pipettano le aliquote per le applicazioni successive.

I protocolli per la rimozione della contaminazione da RNasi dai materiali in vetro e dalle soluzioni sono disponibili nelle guide di biologia molecolare, ad esempio, Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Appendice B: Determinazione della concentrazione, resa e purezza dell'RNA totale

Quantificazione dell'RNA

La concentrazione di RNA deve essere determinata misurando l'assorbanza a 260 nm (A_{260}) con uno spettrofotometro. Per garantire la significatività, le letture devono rientrare nel range di linearità dello spettrofotometro. L'assorbanza di 1 unità a 260 nm corrisponde a 44 µg di RNA per ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Questa relazione è valida solo per le misurazioni effettuate in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5*. Pertanto, se occorre diluire il campione di RNA, è necessario utilizzare 10 mM di Tris-HCl. Come illustrato di seguito (vedere "Purezza dell'RNA", pag. 77), il rapporto fra i valori di assorbanza a 260 e 280 nm fornisce una stima della purezza dell'RNA. Quando si misurano campioni di RNA, assicurarsi che le cuvette siano prive di RNasi. Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tampone Tris-HCl presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente. Di seguito è riportato un esempio per il calcolo relativo alla quantificazione dell'RNA.

Volume del campione di RNA = 80 µl
Diluizione (1/15) = 10 µl di campione di RNA + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Misurare l'assorbanza del campione diluito in una cuvetta (priva di RNasi).
 A_{260} = 0,3
Concentrazione del campione di = $44 \times A_{260} \times \text{fattore di diluizione}$
= $44 \times 0,3 \times 15$
= 198 µg/ml
Resa totale = concentrazione x volume del campione in millilitri
= 198 µg/ml x 0,08 ml
= 15,8 µg RNA

* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Purezza dell'RNA

Il rapporto dei valori di assorbanza compresi tra 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) rappresenta una misura per la purezza dell'RNA rispetto ai contaminanti che assorbono nell'UV, come le proteine. Tuttavia il rapporto A_{260}/A_{280} dipende notevolmente dal valore pH. Un pH relativamente basso genera un rapporto A_{260}/A_{280} relativamente basso e riduce la sensibilità rispetto alle contaminazioni proteiche. * Se sono necessari dati precisi e affidabili consigliamo di misurare l'assorbanza in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5. L'RNA puro ha un rapporto A_{260}/A_{280} pari a 1,8–2,2 in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5. Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tampone Tris-HCl presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.

* 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.

Appendice C: Utilizzo delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Le seguenti istruzioni di BD forniscono indicazioni per l'uso delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Per ulteriori informazioni sull'impiego delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), consultare il manuale PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Istruzioni per rimuovere la chiusura BD Hemogard

1. Afferrare la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) con una mano, disponendo il pollice sotto la chiusura BD Hemogard. (per maggiore stabilità, tenere il braccio su una superficie solida). Con l'altra mano ruotare la chiusura BD Hemogard e contemporaneamente spingere con il pollice verso l'alto FINCHÉ IL FERMO DELLA PROVETTA NON SI ALLENTA.
2. Allontanare il pollice prima di sollevare la chiusura. NON utilizzare il pollice per rimuovere la chiusura dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Attenzione: se la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) contiene sangue, esiste un rischio di infezione. Per evitare lesioni durante la rimozione della chiusura, è importante che il pollice utilizzato per spingerla verso l'alto non venga in contatto con la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) quando la chiusura BD Hemogard viene allentata.
3. Sollevare la chiusura dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Se, come accade di rado, la schermatura in plastica si separa dal fermo in gomma, NON RIASSEMBLARE LA CHIUSURA. Rimuovere con cautela il fermo in gomma dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Istruzioni per inserire la chiusura secondaria BD Hemogard

1. Riposizionare la copertura sulla PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Ruotare e spingere verso il basso con decisione, finché non si blocca in posizione. Il reinserimento completo del fermo è necessario affinché la chiusura rimanga bloccata in posizione sulla PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante la manipolazione.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, Processing Tubes, RNase-Free DNase I, RNase-Free Reagents e Buffers. Da utilizzare con le PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 provette per il prelievo di sangue	762165
Prodotti correlati che possono essere ordinati presso QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	La confezione include: rack per i flaconi per reagenti (3), etichette per i rack (8), puntali per filtro da 200 µl (1024), puntali per filtro da 1.000 µl (1.024), puntali per filtro da 1.000 µl, wide bore (1.024); flaconi per reagenti da 30 ml (18); adattatori per rotore (240); supporti per adattatori per rotore	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Disposable filter-tips, sterili, su rack	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Flaconi per reagenti, 30 ml con tappi; confezione da 6; per l'uso con il rack dei flaconi per reagenti dello strumento QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Per 240 preparazioni: 240 adattatori per rotore monouso; per l'uso con strumenti QIAcube	990394

Prodotto	Contenuto	N. cat.
Reagent Bottle Rack	Rack dei flaconi per reagenti da 6 x 30 ml sul tavolo di lavoro dello strumento QIAcube	990390
Rotor Adapter Holder	Supporto per 12 adattatori di rotore monouso, per l'uso con strumenti QIAcube	990392
Prodotti correlati che possono essere ordinati presso BD*		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: Ago cannula 21 G, 0,75 pollici (0,8 x 19 mm), tubo da 12 pollici (305 mm) con adattatore luer; 50 in ogni scatola, 200 in ogni confezione	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Contentitore solo per diametro di 13 mm e 16 mm; 1.000/confezione	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm, per prelievo da 4,0 ml, con chiusura di sicurezza BD Hemogard rossa e con etichetta in carta; 100/scatola, 1.000/confezione	368975

*Questi accessori per il prelievo di sangue rappresentano tipici prodotti che possono essere usati con le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Per saperne di più, visitare www.preanalytix.com.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il rispettivo manuale del kit o il manuale utente PreAnalytiX o QIAGEN. I libretti di istruzioni e i manuali utente dei kit PreAnalytiX e QIAGEN sono disponibili su www.preanalytix.com e su www.qiagen.com o possono essere richiesti presso i servizi di assistenza tecnica di PreAnalytiX.

Cronologia delle revisioni del manuale

Documento e revisioni	Modifiche	Data
HB-0101-004, R2	Modifiche per la conformità alle normative GHS in tutto il documento	Giugno 2015
HB-0101-005, R3	Nuovo modello; revisioni al protocollo automatico e ai dati delle prestazioni; aggiornamento delle informazioni per la sicurezza per conformità alle normative GHS; modifiche ai dettagli dello strumento e alla dichiarazione relativa alle limitazioni per l'uso del prodotto.	Febbraio 2019
HB-0101-006, R3	Correzione del nome del kit nella tabella del contenuto del kit p. 5.	Gennaio 2020
HB-0101-007, R4	QIAcube Connect MDx aggiunto al protocollo automatico; lingua aggiornata ovunque per includere riferimenti a QIAcube Connect MDx; numeri di tabelle, pagine e figure aggiornati.	Dicembre 2020

PreAnalytiX nel mondo

I prodotti PreAnalytiX sono distribuiti dalle aziende QIAGEN e BD

QIAGEN – Servizio clienti

Ordini www.QIAGEN.com/shop | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com

BD – Servizio clienti

Argentina, Uruguay and Paraguay

Orders: 0800.444.5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Australia

Orders: 1.800.656.100

Fax: 1.800.656.110

E-mail: bd_anz@bd.com

Austria

Orders: 43.1.7063660

Fax: 43.1.706366011

E-mail: customercare.at@bd.com

Belgium

Orders: 32.53.720.556

Fax: 32.53.720.549

E-mail: orders.be@bd.com

Brazil

Orders: 0800.055.56.54

E-mail: consultoria_vacutainer@bd.com

Canada

Technical support: 1.800.631.0174

Orders: 1.866.979.9408

Fax: 1.800.565.0897

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

Central and Eastern Europe

Orders: 48.22.377.11.11

Fax: 48.22.377.11.02

Bulgaria orders: info_bulgaria@bd.com

Czech Republic orders: info_czech@bd.com

Croatia orders: info_croatia@bd.com

Hungary orders: info_hungary@bd.com

Poland orders: info_poland@bd.com

Romania orders: info_romania@bd.com

Southeast Europe orders: info_balkan@bd.com

Serbia orders: info_serbia@bd.com

Slovakia orders: info_slovakia@bd.com

Slovenia orders: info_slovenia@bd.com

Denmark

Orders: 45.43.43.45.66

Fax: 45.43.96.56.76

Orders: ordre.dk@bd.com

Technical support: bddenmark@bd.com

Finland

Orders: 358.9.88.70.780

Fax: 358.9.88.70.7816

Orders: tilauksef.fi@bd.com

E-mail: bdsuomi@bd.com

France

Orders: 33.476.68.36.36

Fax: 33.476.68.36.93

E-mail: serviceclientbdf@bd.com

Orders: commandesfr@bd.com

Technical support: vacutainerfr@bd.com

Germany

Orders: 49.6221.3050

Fax: 49.6221.305.216

E-mail: customercare.de@bd.com

India

Orders: 91.124.3949390

Orders: bd_india@bd.com

Ireland (Aquilant Specialist Healthcare Services)

Customer support: 353.1.404.8350

Fax: 353.1.404.8352

E-mail: contactus@aquilantscientific.ie

Israel (Lapidot Medical)

Customer Support: 972.700.70.90.22

E-mail: cs@lapidot.com

Italy

Orders: 39.02.48240.500

Fax: 39.02.48240.775

Technical support: 39.3450655140

E-mail: ordini.it@bd.com

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

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

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

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

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

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

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

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

Switzerland
Orders: 41.61.485.22.24
Fax: 41.61.485.22.00
E-mail: info.ch@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 1122120IT BD-8945 12/2020
Prodotto in Germania