

December 2020

Handleiding PAXgene[®] Blood RNA Kit

Versie 2



50 (catalogusnr. 762174)

R4 **MAT** 1122120NL

REF 762174

IVD

CE



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Geproduceerd door QIAGEN GmbH voor PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

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

PAXgene Blood RNA Kits zijn niet in alle landen verkrijgbaar. Vraag om informatie.

Beperkte licentieovereenkomst

Door het gebruik van de PAXgene Blood RNA Kit verklaart de koper of gebruiker zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. De PAXgene Blood RNA Kit mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de *handleiding bij de PAXgene Blood RNA Kit* en in combinatie met de componenten in de kit. PreAnalytiX verleent geen licentie onder haar intellectuele eigendom om de bijgesloten componenten van deze kit te gebruiken of vermengen met componenten die niet met de kit zijn meegeleverd, behalve indien beschreven in de *handleiding bij de PAXgene Blood RNA Kit* en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.preanalytix.com.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert PreAnalytiX niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de componenten ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. PreAnalytiX doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen of niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken.
6. PreAnalytiX mag de verbodsbepalingen in deze beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten, inclusief advocaatkosten, verhalen bij elke rechtshandeling om deze beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de componenten ervan af te dwingen.

Zie www.preanalytix.com voor de meest actuele licentievoorwaarden.

Voorwaardelijke verkoop

Het huidige product wordt geleverd met een licentie onder bepaalde claims van US-7,270,953 en US-7,682,790, evenals EP-1820793 B1 en buitenlandse gelijkwaardige octrooiclaims voor het gebruik van het product om de nucleïnezuur-complex te verwerken die wordt gevormd tijdens de monstername in een PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, alle rechten voorbehouden.

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

PreAnalytiX-distributeurs

PreAnalytiX-producten worden geproduceerd en gedistribueerd door QIAGEN of BD voor PreAnalytiX. Producten kunnen niet worden besteld bij PreAnalytiX GmbH.


Raadpleeg de laatste pagina voor contactgegevens van uw lokale PreAnalytiX-distributeur.

Inhoud

Inhoud van de kit.....	5
Symbolen	6
Opslagomstandigheden	7
Beoogd gebruik.....	8
Beperkingen van het gebruik van het product.....	8
Kwaliteitscontrole.....	9
Technische ondersteuning	9
Veiligheidsinformatie.....	10
Inleiding	13
Principe en procedure.....	13
Monsterafname en stabilisatie.....	14
RNA-concentratie en zuivering	19
Handmatige RNA-zuivering	19
Geautomatiseerde RNA-zuivering.....	29
Apparatuur en reagentia die door de gebruiker moeten worden geleverd	38
Belangrijke opmerkingen	41
QIAcube-instrumenten gebruiken	41
Protocollen installeren op de QIAcube -instrumenten	44
De QIAcube-instrumenten laden	45
Protocol: Handmatige zuivering van totaal RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	55

Protocol: Geautomatiseerde zuivering van totaal RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	62
Gids voor problemen oplossen	69
Bijlage A: Algemene opmerkingen over de verwerking van RNA	71
Bijlage B: Kwantificatie en bepaling van de kwaliteit van totaal RNA	72
Bijlage C: Verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	74
Bestelgegevens	75
Revisiegeschiedenis van handleiding	77

Inhoud van de kit

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Catalogusnr.			762174
Aantal preparaten			50
BR1	Resuspension Buffer (Resuspensiebuffer)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Bindbuffer) *	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1* (Wasbuffer 1)	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Wasbuffer 2 (concentraat)) [†]	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Elutiebuffer)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (RNase-vrij water (fles))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteïnase K (groene deksel))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA-spinkolommen (rood))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 ml) (Verwerkingsbuisjes (2 ml))	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secundaire BD Hemogard™ Closures (BD Hemogard™-sluitingen)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Microcentrifugebuisjes (1,5 ml))	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNase I, RNase-vrij (gelyofiliseerd))	DNA REM	1500 Kunitz-eenheden [*]
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA-digestiebuffer (witte deksel))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (DNase-resuspensiebuffer (buisje, lila deksel))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (PAXgene Shredder-spinkolommen (lila))	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Handleiding	Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Kit (versie 2)		1

*Niet geschikt voor gebruik met desinfectieergentia die bleek bevatten. Bevat een guanidinezout. Zie pagina 10 voor Veiligheidsinformatie.

[†] Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Voeg 4 volumes ethanol (96–100%, zuiverheidsgraad p.a.) toe volgens de instructies op de fles om een werkoplossing te verkrijgen voordat u het concentraat voor de eerste keer gebruikt.

Symbolen



Bevat voldoende reagentia voor <N> tests



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing



Uiterste gebruiksdatum



In-vitrodiagnostisch medisch hulpmiddel



Catalogusnummer



Partijnummer



Materiaalnummer



Componenten



Nummer



Sterilisatiemethode met behulp van bestraling



Kunitz-eenheden



Toevoegen



Bevat












Gereconstitueerd



Deoxyribonuclease I

* Kunitz-eenheden worden algemeen gebruikt als eenheden voor het meten van DNase I, gedefinieerd als de hoeveelheid DNase I die een toename veroorzaakt in A_{260} van 0,001 per minuut per milliliter bij 25 °C, pH 5,0, met sterk gepolymeriseerd DNA als het substraat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 en 363).

	Ethanol
	Guanidine-isothiocyanaat
	RNase-Free DNase Set
	Global Trade Item Number
	Niet opnieuw gebruiken
	Temperatuurbepanking
	Maximale temperatuur
	Fabrikant
	Belangrijke opmerking

Opslagomstandigheden

PAXgene RNA-spinkolommen (PRC), PAXgene Shredder-spinkolommen (PSC), proteïnase K (PK) en buffers (BR1, BR2, BR3, BR4 en BR5) moeten droog worden opgeslagen bij de temperatuur die wordt vermeld op het etiket van de kit.

De RNase-Free DNase Set die DNase I (RNFD), DNA-digestiebuffer (RDD) en DNase-resuspensiebuffer (DRB) bevat, wordt bij omgevingstemperatuur verzonden. Sla alle componenten van de RNase-Free DNase Set onmiddellijk na ontvangst op bij een op het etiket aangegeven temperatuur. Wanneer de kit onder de juiste omstandigheden wordt bewaard, is hij stabiel tot de houdbaarheidsdatum die op de doos van de kit staat vermeld.

Beoogd gebruik

Het PAXgene Blood RNA System bestaat uit een bloedafnamebuisje (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) en nucleïnezuur-zuiveringskit (PAXgene Blood RNA Kit). Het is bedoeld voor de afname, opslag en transport van bloed en stabilisatie van intracellulair RNA in een gesloten buisje en de daarop volgende isolatie en zuivering van gastheer-RNA uit volbloed voor RT-PCR die wordt gebruikt voor moleculaire diagnostische tests.

Prestatiekenmerken van het PAXgene Blood RNA System zijn alleen bepaald met transcripten van het FOS- en IL1B-gen. Als gebruiker bent u zelf verantwoordelijk voor het vaststellen van de juiste prestatiekenmerken van het PAXgene Blood RNA System voor andere beoogde transcripten.

Indicaties voor gebruik

De PAXgene Blood RNA Kit is bedoeld voor de zuivering van intracellulair RNA uit volbloed dat is afgenomen in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Als de kit wordt gebruikt in combinatie met de PAXgene Blood RNA Tube (BRT), geeft het systeem gezuiverd intracellulair RNA uit volbloed voor RT-PCR dat wordt gebruikt bij moleculair diagnostisch testen.

Beperkingen van het gebruik van het product

De PAXgene Blood RNA Kit is bedoeld voor zuivering van intracellulair RNA uit menselijk volbloed ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocyten/ml) voor in-vitrodiagnostische toepassingen. Het is niet bedoeld voor de zuivering van genomisch DNA of virale nucleïnezuren uit menselijk volbloed. Door het beperkte aantal transcripten die gevalideerd zijn voor de stabilisatiespecificaties (transcripten van het FOS- en IL1B-gen) zijn de prestatiekenmerken niet bepaald voor alle transcripten. Gebruikers moeten de gegevens van de fabrikant en hun eigen gegevens beoordelen om te bepalen of validatie voor andere transcripten noodzakelijk is.

Het product is bedoeld voor gebruik door professionele gebruikers, zoals technici en artsen die zijn opgeleid in in-vitrodiagnostische procedures.

Raadpleeg de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube* voor informatie over het gebruik van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Kwaliteitscontrole

Elke partij van de PAXgene Blood RNA Kit wordt, in overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN, getest tegen vooraf vastgestelde specificaties om een consistente kwaliteit van het product te waarborgen.

Technische ondersteuning

Bij QIAGEN staan de kwaliteit en beschikbaarheid van onze technische ondersteuning hoog in het vaandel. Bij onze technische afdelingen werken ervaren wetenschappers met uitgebreide praktische en theoretische ervaring en deskundigheid in moleculaire biologie en het gebruik van PreAnalytiX-producten. Neemt u gerust contact met ons op als u vragen hebt over de PAXgene Blood RNA Kit.

Voor technische ondersteuning en meer informatie kunt u bellen met de afdeling Technische Services van QIAGEN.

Veiligheidsinformatie

EU - Gebruikers moeten alle ernstige ongevallen met betrekking tot het hulpmiddel melden bij de fabrikant en de landelijke bevoegde instantie. Buiten de EU - Neem contact op met uw plaatselijke vertegenwoordiger van QIAGEN voor elk ongeval of vragen met betrekking tot het hulpmiddel.

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril.

Draag bij het werken met biologische en chemische materialen altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril om het risico op infecties (zoals van hiv- of hepatitis B-virussen) terug te dringen en letsel te voorkomen. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB). Deze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat via www.preanalytix.com. Hier kunt u de SDS van deze kit vinden, bekijken en afdrukken.

LET OP



Voeg GEEN bleekmiddel of zuuroplossingen rechtstreeks toe aan het afval van monsterbereiding.

Bindbuffer (BR2) en wasbuffer 1 (BR3) bevatten guanidinthiocynaat, dat sterk reactieve verbindingen kan vormen met bleekmiddelen. Als u bindbuffer (BR2) of wasbuffer 1 (BR3) hebt gemorst, moet deze worden opgeruimd met geschikt laboratoriumdetergens en water. Reinig de verontreinigde plek eerst met laboratoriumreinigingsmiddel en water en vervolgens met 1% (v/v) natriumhypochloriet (bleek) als de gemorste vloeistof mogelijk infectueuze stoffen bevat.

Het mengsel van RNA-stabilisatieoplossing en bloed uit de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan worden gedesinfecteerd met behulp van 1 volume commercieel bleekmiddel (5% natriumhypochloriet) per 9 volumes van het mengsel van RNA-stabilisatieoplossing en bloed.

Afval van monsterbereiding, zoals supernatant van centrifugatiestappen in de RNA-zuiveringsprocedure, is mogelijk besmettelijk. Het afval moet worden geautoclaveerd of verbrand om besmettelijk materiaal te vernietigen, voordat het afval wordt afgevoerd. Afval moet worden afgevoerd volgens officiële regelgeving.

De volgende gevarenaanduidingen en voorzorgsmaatregelen zijn van toepassing op de componenten van de PAXgene Blood RNA Kit. Raadpleeg de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube* voor veiligheidsinformatie over de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Buffer BR2



Bevat: guanidiniethiocynaat. Gevaar! Schadelijk bij opname door de mond. Kan schadelijk zijn bij contact met de huid of bij inademing. Veroorzaakt ernstige oogschade. Langdurig schadelijk voor in het water levende organismen. Door contact met zuren komt zeer giftig gas vrij. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen. Raadpleeg onmiddellijk een GIFCENTRUM of arts.

Buffer BR3



Bevat: ethanol; guanidiniethiocynaat. Gevaar! Ontbrandbare vloeistof en damp. Veroorzaakt ernstige oogschade. Door contact met zuren komt zeer giftig gas vrij. Uit de buurt houden van warmte/-vonken/open vuur/hete oppervlakken. Niet roken. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen. Raadpleeg onmiddellijk een GIFCENTRUM of arts.

DNase I



Bevat: DNase. Gevaar! Kan een allergische huidreactie veroorzaken. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming. Adembescherming dragen. NA (mogelijke) blootstelling: een GIFCENTRUM of arts raadplegen. Het slachtoffer in de frisse lucht brengen en laten rusten in een houding die het ademen vergemakkelijkt.

Proteïnase K



Bevat: proteïnase K. Gevaarlijk! Licht irriterend voor de huid. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming. Adembescherming dragen. NA (mogelijke) blootstelling: een GIFCENTRUM of arts raadplegen. Het slachtoffer in de frisse lucht brengen en laten rusten in een houding die het ademen vergemakkelijkt.

Inleiding

Het afnemen van volbloed is de eerste stap bij vele moleculaire assays die worden gebruikt om cellulair RNA te onderzoeken. De instabiliteit van het cellulaire RNA-profiel in vitro is echter een groot probleem bij dit soort experimenten. Onderzoeken van PreAnalytiX hebben aangetoond dat het aantal kopieën van individuele soorten mRNA in volbloed meer dan 1000 maal kunnen veranderen tijdens opslag of transport bij kamertemperatuur. * Dit wordt veroorzaakt door snelle RNA-degradatie en geïnduceerde expressie van bepaalde genen nadat het bloed is afgenomen. Deze veranderingen in het RNA-expressieprofiel maken betrouwbare onderzoeken naar genexpressie onmogelijk. Een methode om het RNA-expressieprofiel tijdens en na flebotomie te behouden is daarom essentieel voor een nauwkeurige analyse van genexpressie in menselijk volbloed.

Principe en procedure

PreAnalytiX heeft een systeem ontworpen dat het afnemen, stabiliseren, opslaan en transporteren van monsters van menselijk volbloed mogelijk maakt, tezamen met een snel en efficiënt protocol voor de zuivering van intracellulair RNA. Het systeem vereist het gebruik van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; Amerikaans octrooi 6,602,718 en 6,617,170) voor bloedafname en RNA-stabilisatie, gevolgd door een handmatige of geautomatiseerde RNA-zuivering met behulp van de PAXgene Blood RNA Kit. De handmatige en geautomatiseerde protocollen bieden nagenoeg gelijkwaardige prestaties met betrekking tot RNA-kwaliteit en -opbrengst. Prestatiegegevens voor het handmatige protocol (pagina's 22–29) en het geautomatiseerde protocol (pagina's 31–35) zijn inbegrepen in deze handleiding.



De QIAGEN QIAcube Connect MDx is niet in alle landen verkrijgbaar. Neem voor meer informatie contact op met de technische diensten van QIAGEN.

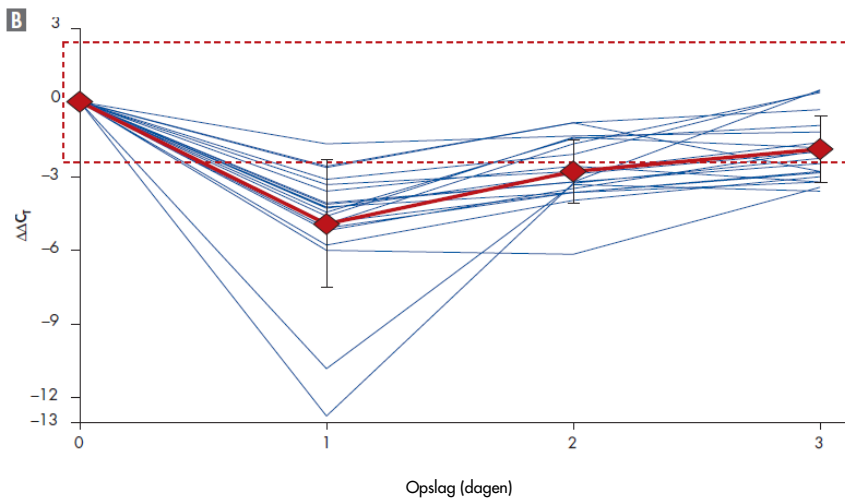
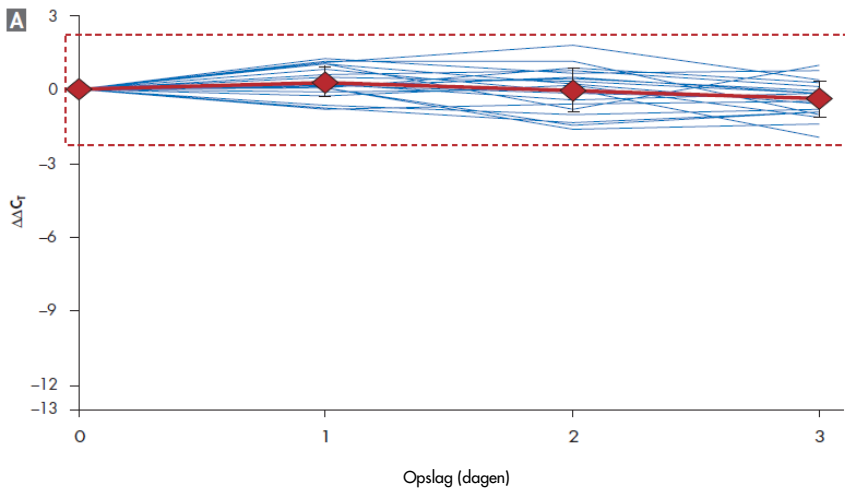
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Monsterafname en stabilisatie

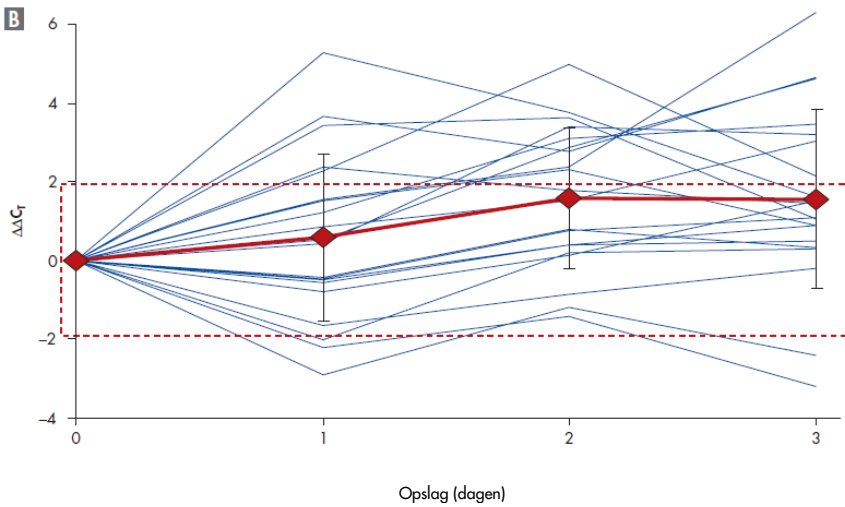
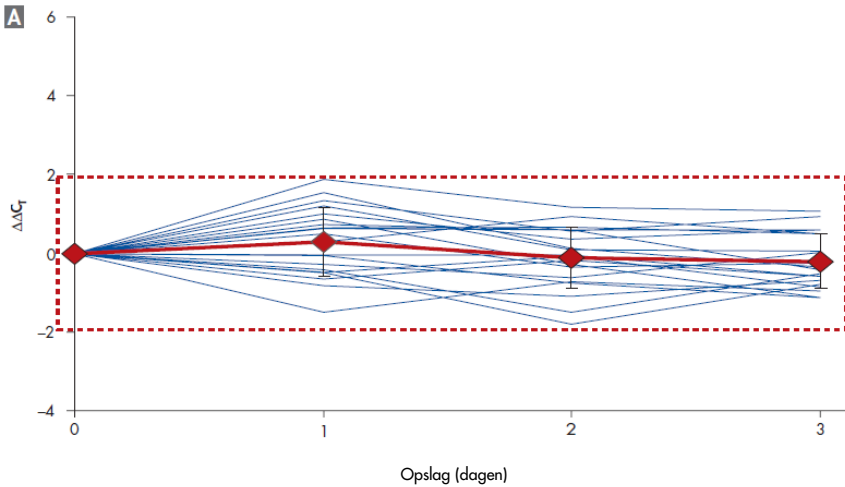
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) bevatten een gepatenteerde reagenssamenstelling op basis van een gepatenteerde RNA-stabilisatietechnologie. Deze reagenssamenstelling beschermt RNA-moleculen tegen degradatie door RNasen en minimaliseert veranderingen in genexpressie ex vivo. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zijn bedoeld voor afname van menselijk volbloed en stabilisatie van cellulair RNA tot 3 dagen bij 18–25 °C (afbeelding 1 en 2, pagina's 15 en 16) of tot 5 dagen bij 2–8 °C (afbeelding 3 en 4, pagina's 17 en 18). De huidige beschikbare gegevens tonen minimaal 11 jaar stabilisatie van cellulair RNA bij –20 °C of –70 °C*. Voor meer informatie uit lopende onderzoeken waarbij stabiliteit voor langere periodes wordt geëvalueerd neemt u contact op met de afdeling Technische Services van QIAGEN.

De werkelijke tijd van RNA-stabilisatie is afhankelijk van het soort van cellulair RNA en de gebruikte vervolgtoepping. Door het beperkte aantal transcripten die gevalideerd zijn voor de stabilisatiespecificaties (transcripten van het FOS- en IL1B-gen) zijn de prestatiekenmerken niet bepaald voor alle transcripten. Gebruikers moeten de gegevens van de fabrikant en hun eigen gegevens beoordelen om te bepalen of validatie voor andere transcripten noodzakelijk is.

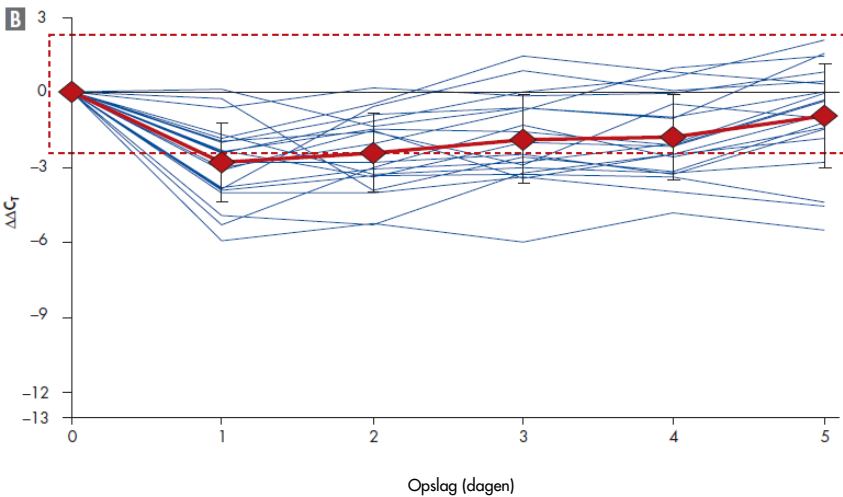
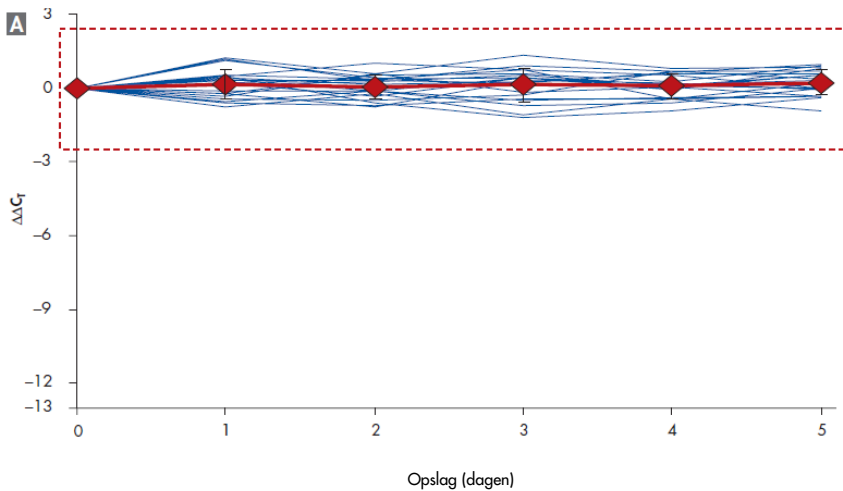
* Een langetermijnonderzoek naar opslag van bloed in PAXgene Blood RNA Tubes loopt nog.



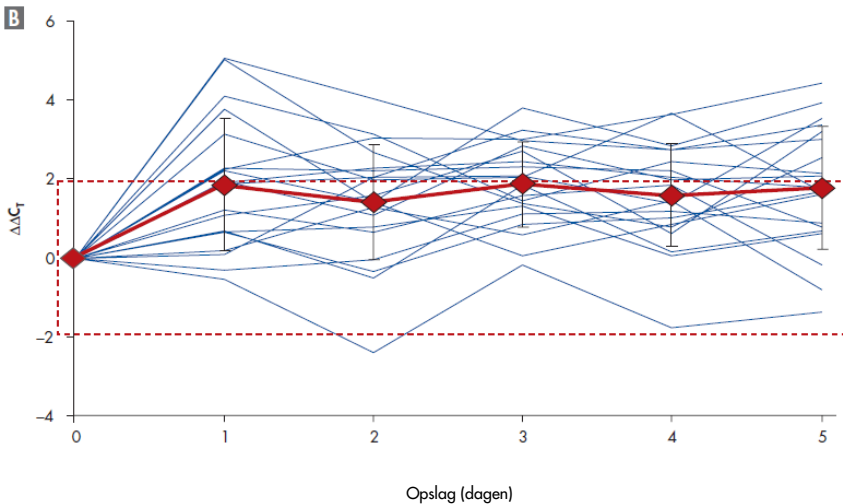
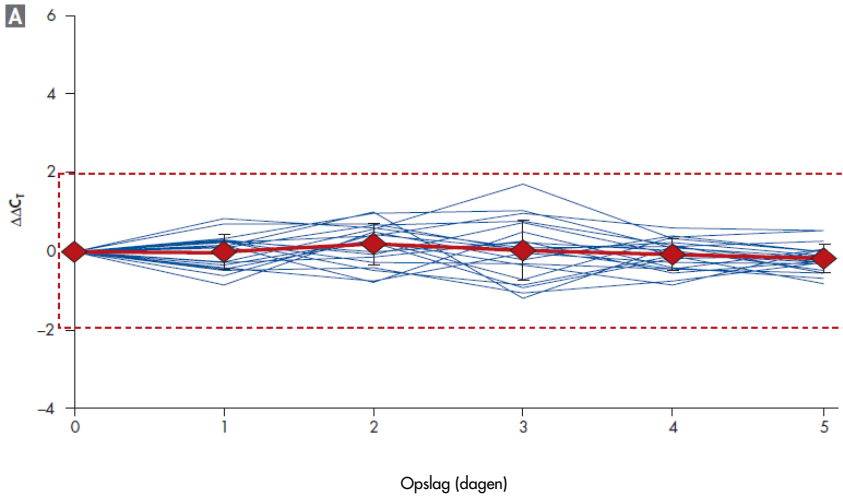
Afbeelding 1. RNA-stabiliteit in bloedmonsters bij 18–25 °C: FOS. Van 10 donoren werd bloed afgenomen, met tweevoudige monsters en opgeslagen bij 18–25 °C voor het aangegeven aantal dagen, gevolgd door totaal-RNA-zuivering. **[A]** Bloed werd afgenomen en opgeslagen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) en totaal RNA werd gezuiverd met behulp van de PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Bloed werd afgenomen en opgeslagen in standaard bloedafnamebuisjes met EDTA als antistollingsmiddel en totaal-RNA werd gezuiverd met behulp van een standaard organische extractiemethode met op silicamembraan gebaseerde zuivering van RNA. Relatieve transcriptniveaus van FOS zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als interne standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, waarbij van alle monsters de gemiddelden en deviaties worden getoond. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3x$ totale precisie van de assay (2,34 C_t).



Afbeelding 2. RNA-stabiliteit in bloedmonsters bij 18–25 °C: IL1B. Bloed werd afgenomen en totaal-RNA werd gezuiverd, na opslag bij 18–25 °C, zoals weergegeven in afbeelding 1. Relatieve transcriptniveaus van IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als interne standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, waarbij van alle monsters de gemiddelden en deviaties worden getoond. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3x$ totale precisie van de assay (1,93 C_t).



Afbeelding 3. RNA-stabiliteit in bloedmonsters bij 2–8 °C: FOS. Van 10 donoren werd bloed afgenomen, met tweevoudige monsters, en opgeslagen bij 2–8 °C voor het aangegeven aantal dagen, gevolgd door totaal-RNA-zuivering. **[A]** Bloed werd afgenomen en opgeslagen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) en totaal RNA werd gezuiverd met behulp van de PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Bloed werd afgenomen en opgeslagen in standaard bloedafnamebuisjes met EDTA als antistollingsmiddel en totaal-RNA werd gezuiverd met behulp van een standaard organische extractiemethode met op silicamembraan gebaseerde zuivering van RNA. Relatieve transcriptniveaus van FOS zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als interne standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, waarbij van alle monsters de gemiddelden en deviaties worden getoond. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3x$ totale precisie van de assay (2,34 C_t).



Afbeelding 4. RNA-stabiliteit in bloedmonsters bij 2–8 °C: IL1B. Bloed werd afgenomen en totaal-RNA werd gezuiverd, na opslag bij 2–8°C, zoals weergegeven in afbeelding 3. Relatieve transcriptniveaus van IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als interne standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, waarbij van alle monsters de gemiddelden en deviaties worden getoond. De gestreepte lijnen tonen de ± 3 x totale precisie van de assay (1,93 C_t).

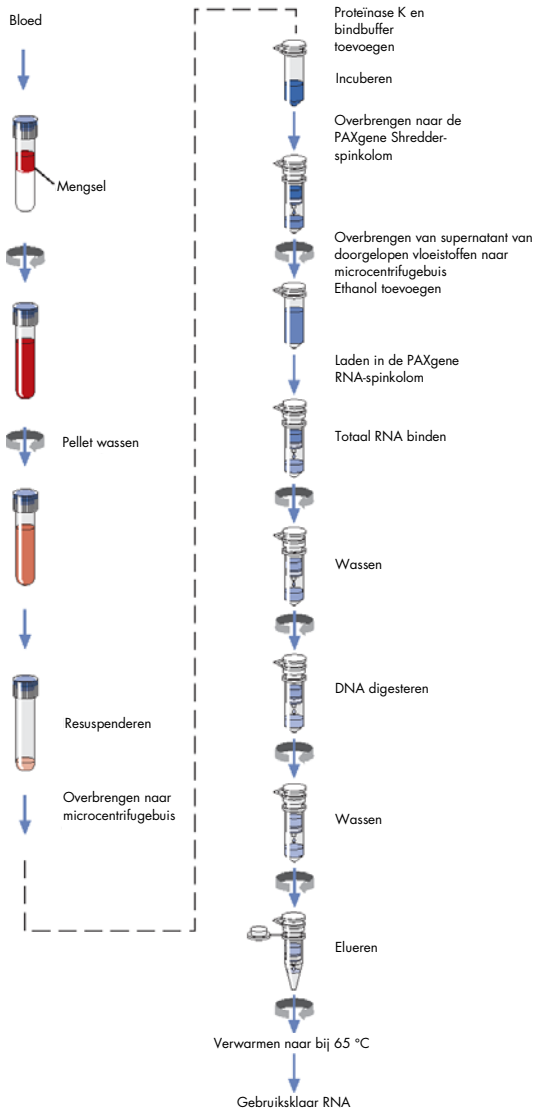
RNA-concentratie en zuivering

De PAXgene Blood RNA Kit is bedoeld voor de zuivering van totaal RNA uit 2,5 ml menselijk volbloed dat is afgenomen in een PAXgene Blood RNA Tube (BRT). De procedure is eenvoudig en kan met behulp van handmatige of geautomatiseerde procedures worden uitgevoerd (zie afbeelding 5 en 10, pagina's 20 en 30). In beide protocollen begint de zuivering met een centrifugeringsstap om nucleïnezuren te pelletiseren in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT). De pellet wordt gewassen en geresuspendeerd, daarna volgt handmatige of geautomatiseerde RNA-zuivering. In principe volgen beide protocollen dezelfde stappen met dezelfde componenten uit de kit.

Handmatige RNA-zuivering

De geresuspendeerde pellet wordt geïncubeerd in geoptimaliseerde buffers samen met proteïnase K (PK) om proteïne-afbraak te veroorzaken. Er wordt een extra centrifugatie door de PAXgene Shredder-spinkolom (PSC) uitgevoerd om het cellysaat te homogeniseren en overgebleven celresten te verwijderen. Ook wordt de supernatant van de doorgelopen fractie overgebracht naar een nieuwe microcentrifugebuis. Ethanol wordt toegevoegd om de bindingscondities aan te passen en het lysaat wordt aangebracht op een PAXgene RNA-spinkolom (PRC). Tijdens een korte centrifugatie wordt het RNA selectief gebonden aan het PAXgene-silicamembraan, terwijl verontreinigingen passeren. Achtergebleven verontreinigingen worden verwijderd met diverse efficiënte wasstappen. Tussen de eerste en de tweede wasstap wordt het membraan behandeld met DNase I (RNFD) om kleine hoeveelheden gebonden DNA te verwijderen. Na de wasstappen wordt RNA geëluëerd in elutiebuffer (BR5) en door verhitting gedenateerd.

Totaal-RNA geïsoleerd met behulp van het PAXgene Blood RNA System is puur. Met behulp van het handmatige protocol liggen de waarden van A_{260}/A_{280} tussen 1,8 en 2,2, en is $\leq 1\%$ (w/w) genomisch DNA aanwezig in $\geq 95\%$ van alle monsters, gemeten met behulp van kwantitatieve realtime PCR van een sequentie van het gen voor bèta-actine. Bij minstens 95% van de monsters werd geen remming van RT-PCR gedetecteerd, wanneer er tot 30% van het eluaat werd gebruikt.

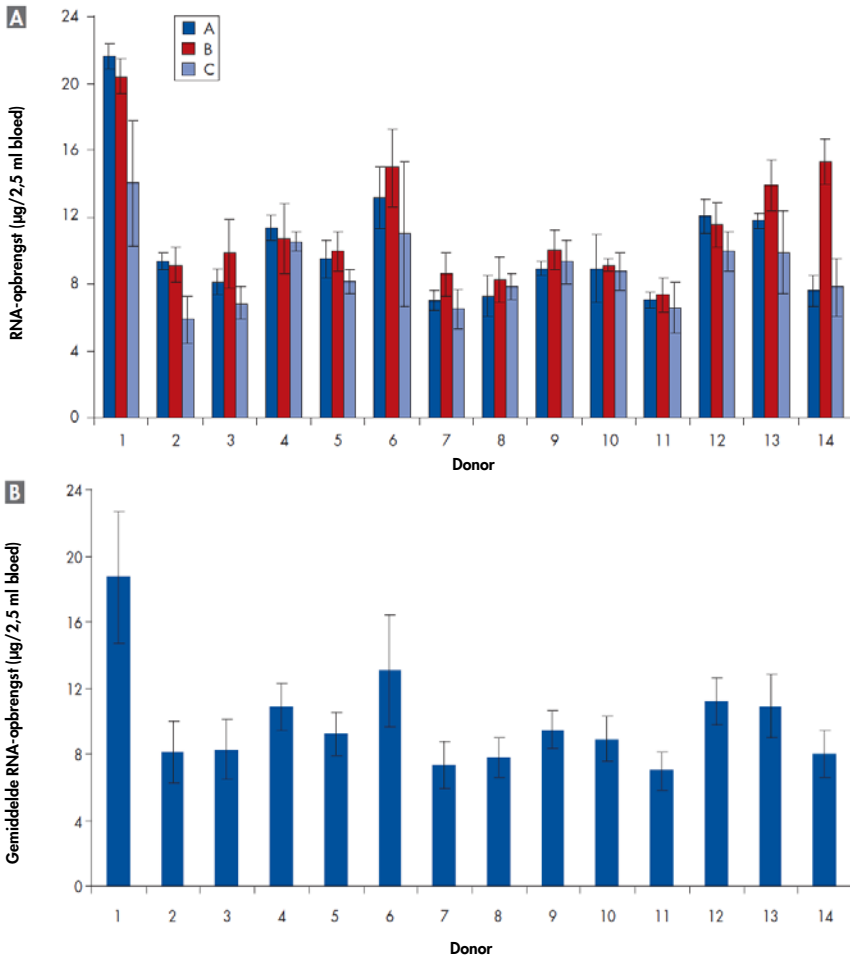


Afbeelding 5. De handmatige PAXgene Blood RNA-procedure.

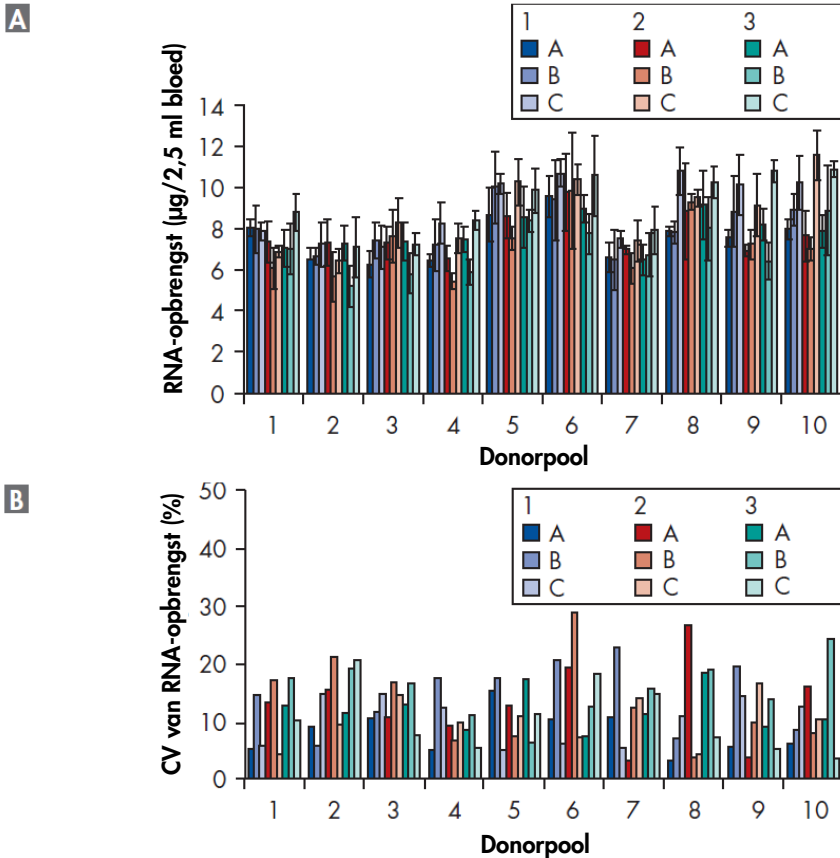
Met behulp van het handmatige protocol is de gemiddelde monsterbereidingstijd (op basis van gegevens uit 12 monsterbereidingsruns) ongeveer 90 minuten*, met slechts 40 minuten tijd voor handelingen van de gebruiker. RNA-opbrengst van 2,5 ml gezond menselijke volbloed is $\geq 3 \mu\text{g}$ bij $\geq 95\%$ van de verwerkte monsters. Aangezien opbrengsten sterk afhankelijk zijn van de donor, kunnen individuele opbrengsten variëren. Voor individuele donoren biedt het PAXgene Blood RNA System zeer reproduceerbare en herhaalbare opbrengsten (afbeelding 6 en 7, pagina's 22 en 23) en reproduceerbaar en herhaalbaar RT-PCR (afbeelding 8 en 9, pagina's 27 en 28), waardoor het zeer robuust is voor klinisch diagnostische tests.

Afbeelding 6 (pagina 22) toont de algehele herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van het PAXgene Blood RNA System. Aanvullende onderzoeken werden uitgevoerd om de invloed van verschillende partijen van de PAXgene Blood RNA Kit en verschillende operators op de reproduceerbaarheid van RNA-opbrengst en realtime RT-PCR-prestaties te tonen. Aangezien voor deze onderzoeken gepoolde bloedmonsters werden gebruikt in plaats van individuele PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), weerspiegelen de resultaten niet de herhaalbaarheid van het systeem, inclusief schommelingen tussen individuele bloedafnames, maar alleen de herhaalbaarheid van de monsterbereiding (zie afbeelding 7, pagina 23)

* De totale looptijd van het protocol, inclusief de voorafgaande verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugaties, pelletwassing en pelletresuspensie).



Afbeelding 6. Reproduceerbare en herhaalbare RNA-zuivering. Viervoudige bloedmonsters van 14 donoren werden handmatig verwerkt door elk van de 3 technici (A, B, C). Er zijn drie sets van apparatuur gebruikt en alle monsters die door een enkele technicus werden voorbereid, werden verwerkt met behulp van dezelfde apparatuur. **[A]** Gemiddelden en standaarddeviaties van RNA-opbrengst per replicaatmonsters van dezelfde donoren en verschillende technici worden getoond. **[B]** Twaalf replicaatbloedmonsters van alle 14 donoren werden verwerkt door de 3 verschillende technici. Gemiddelden en standaarddeviaties van RNA-opbrengst per monster van dezelfde donoren en alle technici worden getoond. Voor alle RNA-monsters varieerden de A_{260}/A_{280} -verhoudingen van 1,8 tot 2,2.



Afbeelding 7. Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van RNA-opbrengst voor verschillende operators en PAXgene Blood RNA Kit-partijen met behulp van gepoolde bloedmonsters. Bloedmonsters van 30 verschillende donoren werden afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 buisjes per donor, 360 buisjes in totaal). De inhoud van de buisjes van 3 donoren werden gepoold en vervolgens opnieuw verdeeld in 36 monsters. Deze 36 monsters per pool van 3 donoren werden handmatig verwerkt door 3 verschillende operators. Elke operator gebruikte 3 verschillende PAXgene Blood RNA Kit-partijen voor de extractie en verwerkte viervoudige monsters van elk van de 10 donorpools. **[A]** RNA-opbrengst en standaarddeviatie voor elke combinatie van operator en partij. Viervoudige bloedmonsters van 10 donorpools werden verwerkt door 3 verschillende operators (A, B, C) met elk 3 partijen kits (1, 2, 3). De gemiddelde opbrengst (kolommen) en standaarddeviatie (foutbalken) worden weergegeven per viervoudig monster van dezelfde donorpool voor een andere operator en een andere kit. **[B]** CV van de RNA-opbrengst per donorpool voor alle combinaties van operator en partij (A, B, C; 1, 2, 3) zoals berekend van de gemiddelde opbrengst en de standaarddeviatie van de opbrengst zoals getoond in afbeelding 7A.

Tabel 1A. Reproduceerbaarheid binnen elke partij en binnen elke gebruiker voor de geselecteerde donorpoolen (1, 6, 9, 10)

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

Tabel 1B. Reproduceerbaarheid binnen elke gebruiker en tussen alle partijen voor geselecteerde donorpoolen (1, 6, 9, 10)

Combineren van gegevens	Donorpool 1 5,1 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 6 6,5 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Gebruiker A, alle partijen	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Gebruiker B, alle partijen	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Gebruiker C, alle partijen	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Combineren van gegevens	Donorpool 9 8,4 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 10 10,2 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Gebruiker A, alle partijen	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Gebruiker B, alle partijen	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Gebruiker C, alle partijen	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tabel 1C. Reproduceerbaarheid binnen elke partij en tussen alle gebruikers voor de geselecteerde donorpoolen (1, 6, 9, 10).

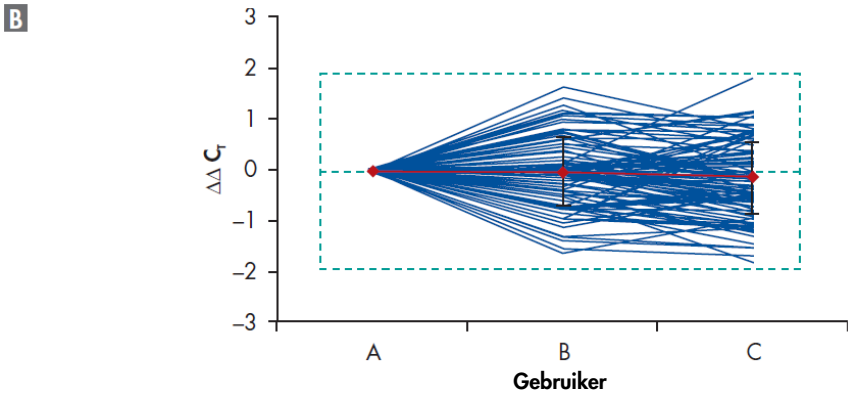
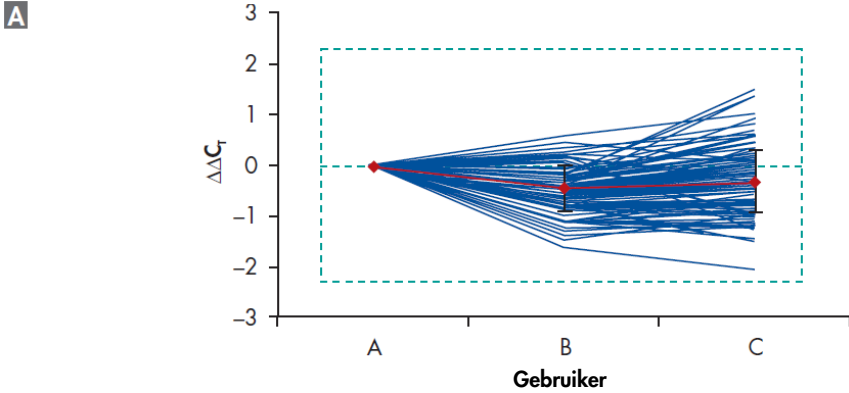
Combineren van gegevens	Donorpool 1 5,1 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 6 6,5 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Partij 1, alle gebruikers	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Partij 2, alle gebruikers	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Partij 3, alle gebruikers	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Combineren van gegevens	Donorpool 9 8,4 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 10 10,2 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Partij 1, alle gebruikers	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Partij 2, alle gebruikers	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Partij 3, alle gebruikers	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabel 1D. Reproduceerbaarheid tussen alle partijen en alle gebruikers voor de geselecteerde donorpoolen (1, 6, 9, 10).

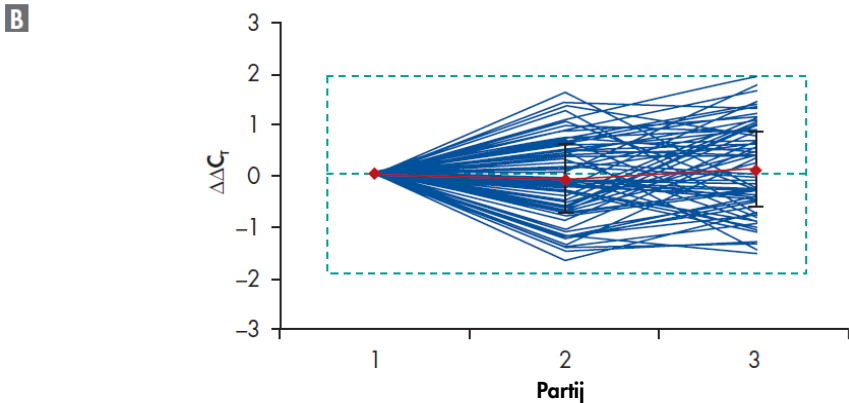
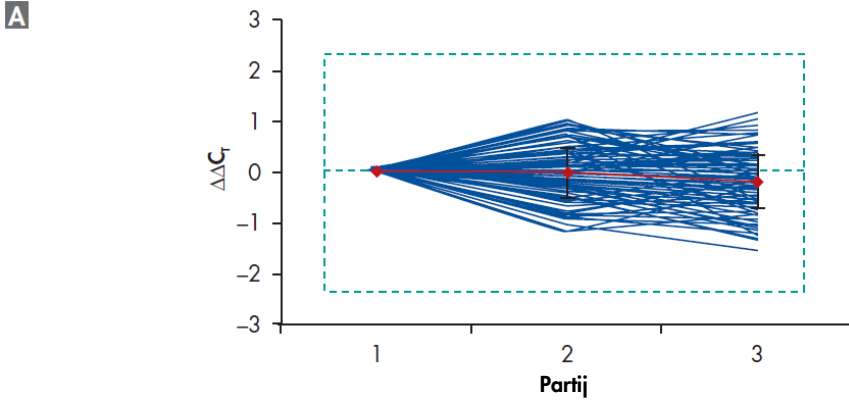
Combineren van gegevens	Donorpool 1 5,1 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 6 6,5 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Partij 1, alle gebruikers	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

Combineren van gegevens	Donorpool 9 8,4 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 10 10,2 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Partij 1, alle gebruikers	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Gedetailleerde analyse van 4 representatieve donorpoolen. De donorpoolen zijn geselecteerd aan de hand van het aantal witte bloedcellen en weerspiegelen de bovenste, middelste en onderste waarden van het normale bereik van het aantal witte bloedcellen (4,8 x 10⁶ – 1,1 x 10⁷ leukocyten/ml). Het aantal witte bloedcellen geeft de gemiddelde waarde van de aantallen witte bloedcellen van de 3 donoren per donorpool weer.



Afbeelding 8. Reproduceerbaarheid van RT-PCR — tussen gebruikers. RNA gezuiverd in het in afbeelding 7 beschreven experiment is gebruikt voor realtime RT-PCR. Relatieve transcriptniveaus van **[A]** FOS en **[B]** IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als internationale standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, in vergelijking met de waarden voor gebruiker A (10 donorpools x 3 kitpartijen x 4 replica's = 120 sets met gegevens voor elk gen), met gemiddelden (rode lijnen) en standaarddeviaties (zwarte balken) voor alle getoonde monsters. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3x$ totale precisie van de assays (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Afbeelding 9. Reproduceerbaarheid van RT-PCR — tussen kitpartijen. RNA gezuiverd in het in afbeelding 7 beschreven experiment is gebruikt voor realtime RT-PCR. Relatieve transcriptniveaus van **[A]** FOS en **[B]** IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als internationale standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, in vergelijking met de waarden voor kitpartij 1 (10 donorpools x 3 gebruikers x 4 replica's = 120 sets met gegevens voor elk gen), met gemiddelden (rode lijnen) en standaarddeviaties (zwarte balken) voor alle getoonde monsters. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3\times$ totale precisie van de assays (FOS: $2,34 C_t$; IL1B: $1,93 C_t$).

Tabel 2. Samenvatting van de RT-PCR-gegevens uit afbeelding 8 en 9

Testsysteem	FOS/18S rRNA-assay		IL1B/18S rRNA-assay	
	Gemiddelde ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Gemiddelde ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reproduceerbaarheid binnen elke gebruiker en tussen alle partijen				
Alle gebruikers, partij 1–partij 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle gebruikers, partij 1–partij 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Alle gebruikers, partij 1–partij 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproduceerbaarheid binnen elke gebruiker en tussen alle partijen				
Alle partijen, gebruiker A–gebruiker A	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle partijen, gebruiker A–gebruiker B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Alle partijen, gebruiker A–gebruiker C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Gebruiker: Technicus, heeft het onderzoek uitgevoerd.

Partij: Nummer van de in het onderzoek gebruikte kit.

SD: Standaarddeviatie.

Gemiddelde $\Delta\Delta C_T$ -waarden (N = 120) en standaarddeviaties worden getoond voor de gegevens weergegeven in afbeelding 8 en 9.

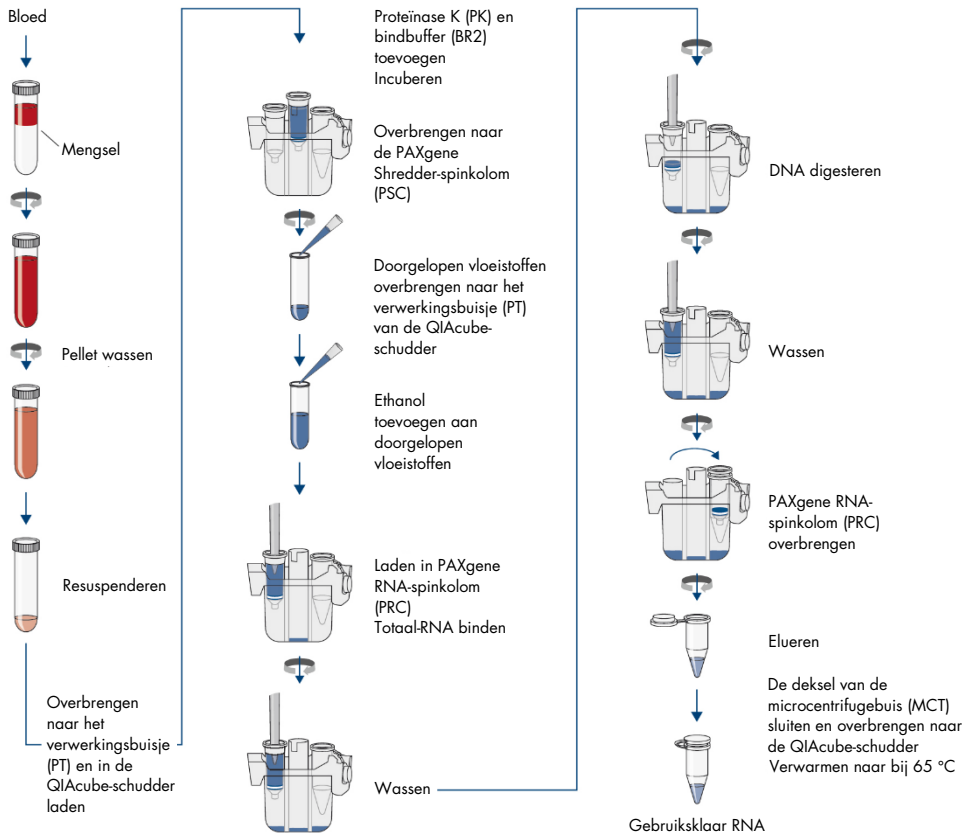
Geautomatiseerde RNA-zuivering

Zuivering van bloed-RNA wordt geautomatiseerd op de QIAGEN QIAcube Connect MDx of de klassieke QIAGEN QIAcube (hierna QIAcube genoemd). De innovatieve QIAcube-instrumenten maken gebruik van geavanceerde technologie voor het verwerken van QIAGEN-spinkolommen, en zorgen daarmee voor een naadloze integratie van geautomatiseerde monsterbereiding met lage verwerkingssnelheid in de workflow van uw laboratorium. Bij monsterbereiding met QIAcube-instrumenten worden dezelfde stappen gevolgd als bij de handmatige procedure (d.w.z. lyseren, binden, wassen en elueren), zodat u verder kunt gaan met het zuiveren van hoogwaardig RNA met de PAXgene Blood RNA Kit.



Afbeelding 10. QIAcube Connect MDx.

Het geautomatiseerde RNA-zuiveringsprotocol bestaat uit 2 delen (of protocollen), 'PAXgene Blood RNA Part A' en 'PAXgene Blood RNA Part B', met een korte handmatige interventie tussen de 2 delen (zie afbeelding 11, pagina 31).



Afbeelding 11. De geautomatiseerde PAXgene Blood RNA-procedure.

De gecentrifugeerde, gewassen en geresuspendeerde nucleïnezuurpellet (zie 'RNA-concentratie en zuivering', pagina 19) is overgebracht van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) naar verwerkingsbuisjes (PT) die zijn geplaatst in de thermoschudeenheid op de werktafel van QIAcube-instrumenten. De operator selecteert en start het protocol 'PAXgene Blood RNA Part A' uit het menu. De QIAcube-instrumenten voeren de stappen van het protocol uit tot de elutie van RNA in de elutiebuffer (BR5). De operator brengt de microcentrifugebuisjes (MCT) met het gezuiverde RNA over naar de thermoschudeenheid van de QIAcube-instrumenten. De operator selecteert en start het protocol 'PAXgene Blood RNA Part B' uit het menu en denaturatie door verhitting wordt uitgevoerd door de QIAcube-instrumenten.

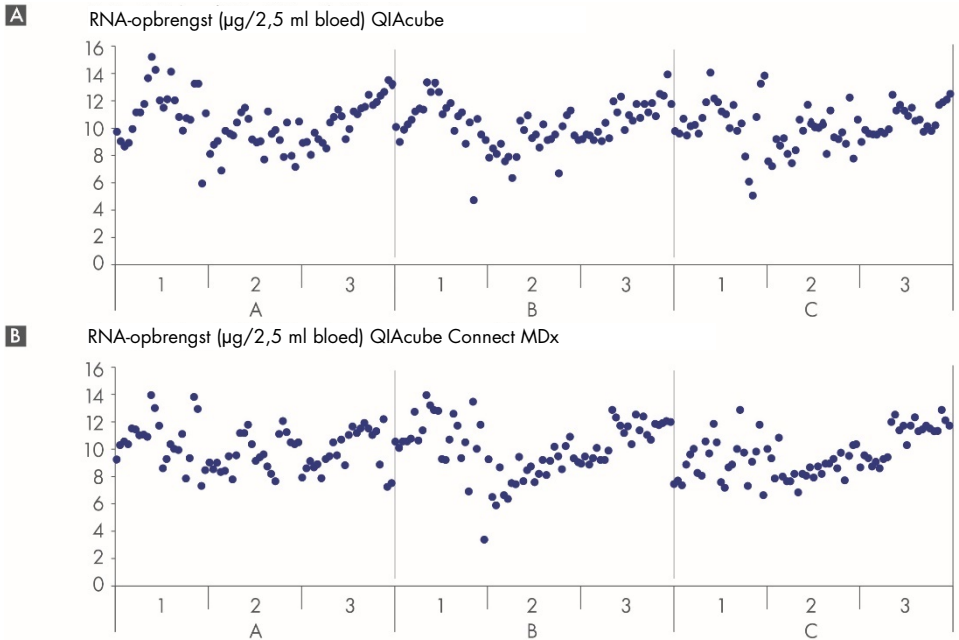
De gemiddelde monsterbereidingstijd (op basis van gegevens uit 12 monsterbereidingsruns) is ongeveer 151 minuten*. Er is aanzienlijk minder tijd nodig voor handelingen van de gebruiker in vergelijking met het handmatige protocol.

RNA-opbrengst van 2,5 ml gezond menselijke volbloed is $\geq 3 \mu\text{g}$ bij $\geq 95\%$ van de verwerkte monsters. Afbeelding 12 (pagina 33) toont de RNA-opbrengsten uit totaal 216 monsters die zijn geprepareerd met behulp van het geautomatiseerde protocol met 3 kitpartijen door 3 operators. Aangezien voor deze onderzoeken gepoolde bloedmonsters werden gebruikt in plaats van individuele PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), weerspiegelen de resultaten niet de RNA-opbrengst die wordt verwacht van enkele monsters van individuele bloedafnames. Aangezien opbrengsten sterk afhankelijk zijn van de donor kunnen individuele opbrengsten variëren (afbeelding 12, pagina 33).

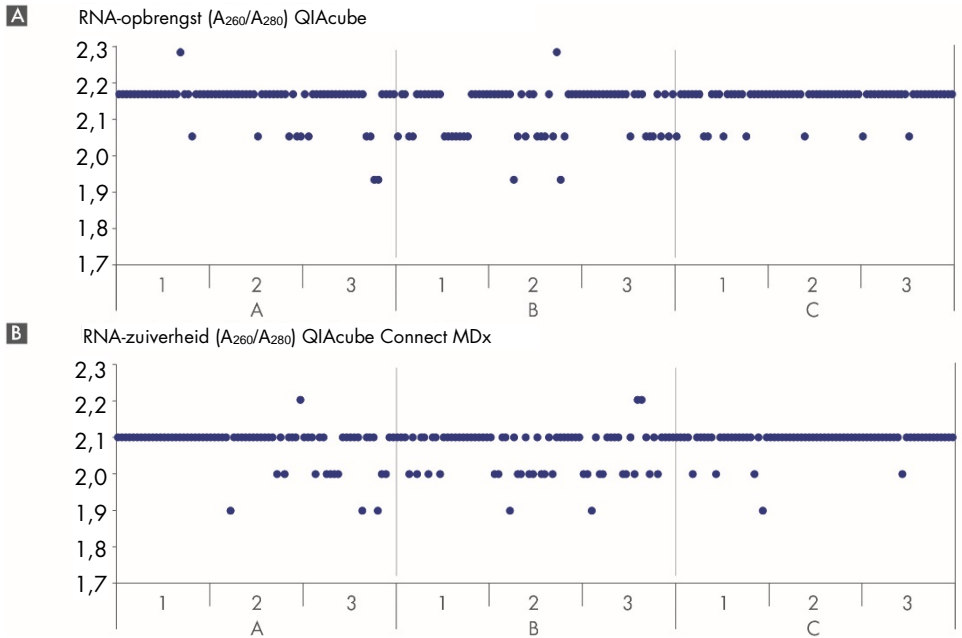
Bij minstens 95% van de monsters werd geen remming van RT-PCR gedetecteerd, wanneer er tot 30% van het eluaat werd gebruikt. Met behulp van het geautomatiseerde protocol is kruiscontaminatie tussen monsters niet detecteerbaar, zoals gemeten door kwantitatieve, realtime RT-PCR van sequenties van de ABL1- en FOS-transcripten in RNA-negatieve monsters (water) gecombineerd met RNA-positieve monsters (menselijk volbloed) in dezelfde run.

RNA geïsoleerd met het PAXgene Blood RNA System en het geautomatiseerde protocol is puur, zoals wordt aangetoond door het gebrek aan remming van RT-PCR en de waarden van A_{260}/A_{280} tussen 1,8 en 2,2. Genomisch DNA van $\leq 1\%$ (w/w) is aanwezig in $\geq 95\%$ van alle monsters, gemeten met behulp van kwantitatieve realtime PCR van een sequentie van het gen voor bèta-actine. Afbeelding 13 en 14 (pagina's 34 en 35) tonen de A_{260}/A_{280} -waarden en relatief genomisch DNA uit totaal 216 monsters die zijn geprepareerd met behulp van het geautomatiseerde protocol met 3 kitpartijen door 3 operators.

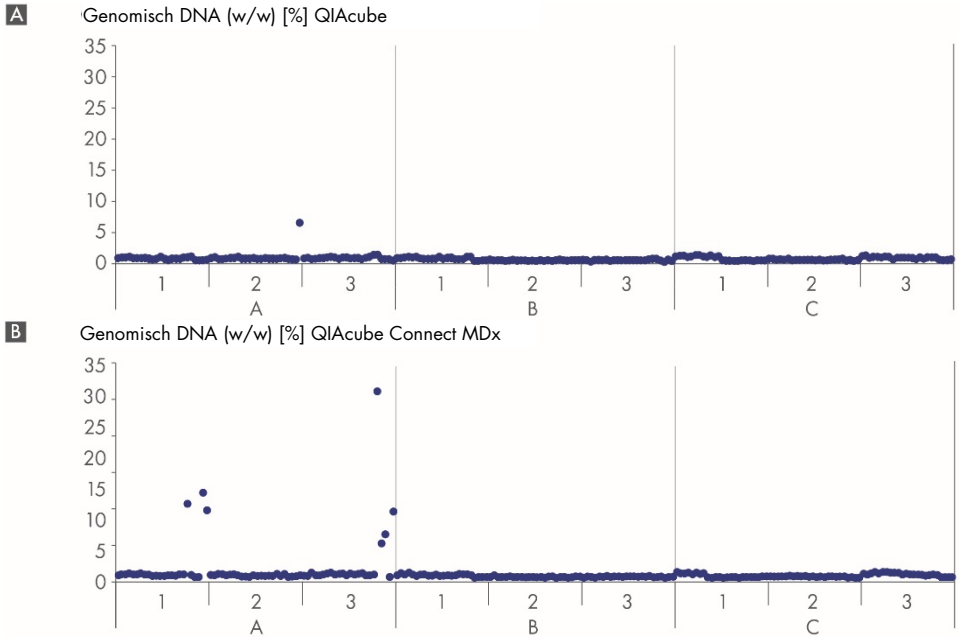
* De totale looptijd van het protocol, inclusief de voorafgaande verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugaties, pelletwassing en pelletresuspensie).



Afbeelding 12. RNA-opbrengst — geautomatiseerde verwerking A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Bloedmonsters van individuele donors werden afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). De inhoud van de buisjes werden gepoold in 6 donorpoolen en vervolgens opnieuw verdeeld. In totaal werden 216 buisjes (d.w.z. 36 per pool) verwerkt door 3 verschillende operators (A, B, C). Elke operator gebruikte 3 verschillende partijen (1, 2, 3) van de PAXgene Blood RNA Kit voor de geautomatiseerde extractie met meerdere QIAcube- en QIAcube Connect MDx-instrumenten en verwerkte viervoudige monsters van elk van de 6 donorpoolen. RNA-opbrengsten van alle individuele monsters worden getoond voor elke combinatie van operator en partij.

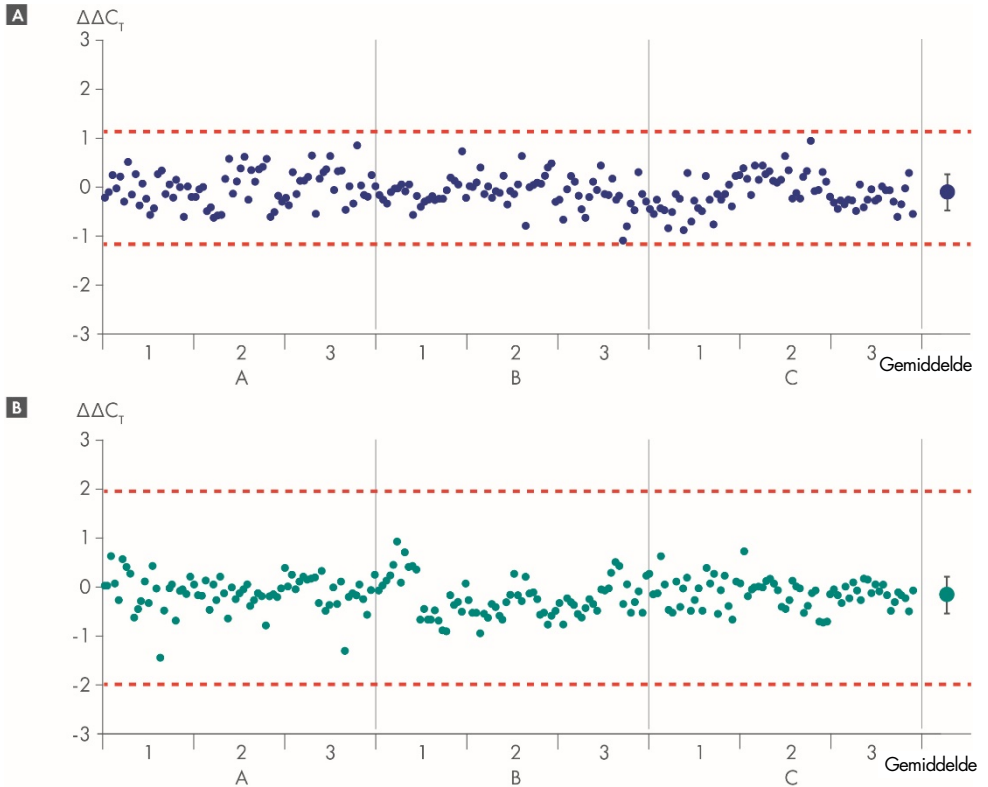


Afbeelding 13. RNA-zuiverheid (A_{260}/A_{280} -waarden) — geautomatiseerde verwerking. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx RNA is gezuiverd door 3 verschillende operators (A, B, C) met behulp van 3 verschillende partijen (1, 2, 3) van de PAXgene Blood RNA Kit met meerdere QIAcube- en QIAcube Connect MDx-instrumenten in het experiment dat wordt beschreven in afbeelding 12. A_{260}/A_{280} -waarden van alle individuele monsters worden getoond voor elke combinatie van operator en partij.

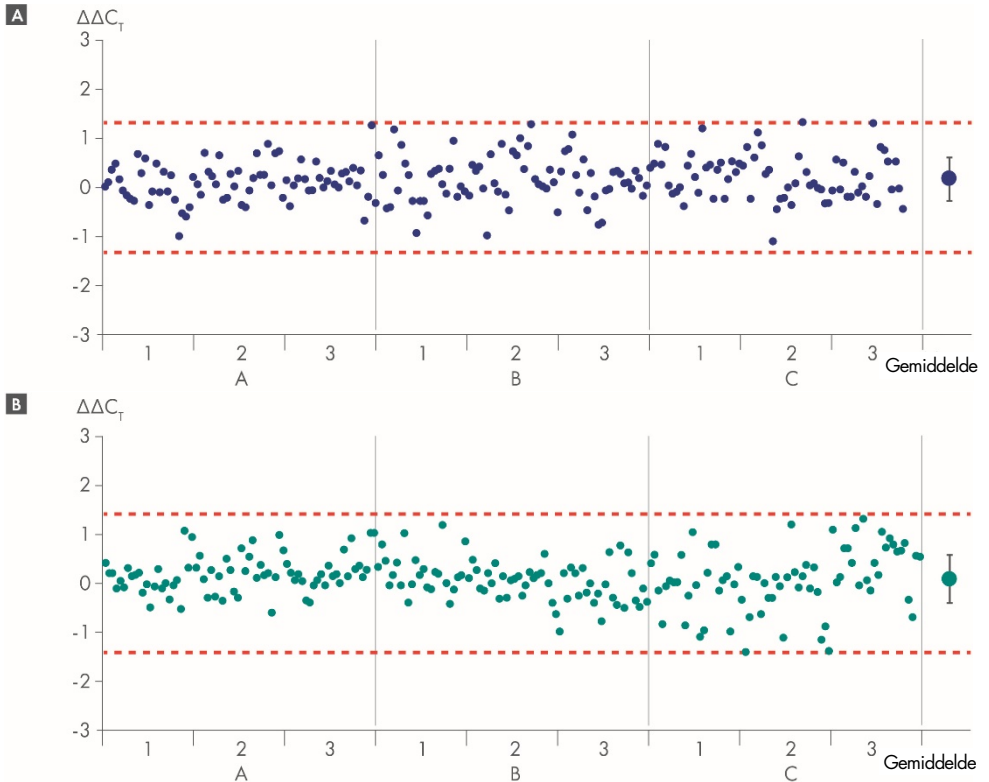


Afbeelding 14. RNA-zuiverheid (% genomisch DNA contaminatie) – geautomatiseerde verwerking, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. RNA is gezuiverd door 3 verschillende operators (A, B, C) met behulp van 3 verschillende partijen (1, 2, 3) van de PAXgene Blood RNA Kit met meerdere QIAcube- en QIAcube Connect MDx-instrumenten in het experiment dat wordt beschreven in afbeelding 12. Hoeveelheden genomisch DNA (w/w) in alle individuele monsters worden getoond voor elke combinatie van operator en partij.

Het geautomatiseerde protocol van RNA-zuivering met behulp van het PAXgene Blood RNA System biedt zeer reproduceerbare en herhaalbare RT-PCR-resultaten, zoals getoond in afbeelding 15 en afbeelding 16 (pagina 36 en 37), waardoor het zeer robuust is voor klinisch diagnostische tests.



Afbeelding 15. Reproduceerbaarheid van RT-PCR — tussen geautomatiseerde (QIAcube) en handmatige protocollen. RNA is gezuiverd door 3 verschillende operators (A, B, C) met behulp van 3 verschillende partijen (1, 2, 3) van de PAXgene Blood RNA Kit met meerdere QIAcube- en QIAcube Connect MDx-instrumenten met het geautomatiseerde protocol in het experiment dat wordt beschreven in afbeelding 12. Parallel werd RNA gezuiverd van de overeenkomstige buizen met replica's met behulp van het handmatige protocol. Relatieve transcriptniveaus van **[A]** FOS en **[B]** IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als internationale standaard. Mogelijke verschillen in transcriptniveaus tussen RNA bereid uit gepoolde bloedmonsters met behulp van beide extractieprotocollen (geautomatiseerd en handmatig protocol) werden berekend met behulp van de $\Delta\Delta C_T$ -methode. Individuele $\Delta\Delta C_T$ -waarden voor alle monsterparen (4 replica's x 6 donorpoolen x 3 kitpartijen x 3 operators = 216 paar voor elk gen) zijn in kaart gebracht als enkele stippen met gemiddelden (grotere stippen) en standaarddeviaties (zwarte balken) voor alle getoonde monsters. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3x$ totale precisie van de assays (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; verschillende assayprecisies in vergelijking met afbeelding 1–4, 8 en 9 verschillende assayversies).



Afbeelding 16. Reproduceerbaarheid van RT-PCR — tussen QIAcube en QIAcube Connect MDx met het geautomatiseerde protocol. RNA is gezuiverd door 3 verschillende operators (A, B, C) met behulp van 3 verschillende partijen (1, 2, 3) van de PAXgene Blood RNA Kit met het geautomatiseerde protocol met meerdere QIAcube- en QIAcube Connect MDx-instrumenten in het experiment dat wordt beschreven in afbeelding 12. Relatieve transcriptniveaus van **[A]** FOS en **[B]** IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als internationale standaard. Mogelijke verschillen in transcriptniveaus tussen RNA bereid uit gepoolde bloedmonsters met behulp van beide instrumenten werden berekend met behulp van de $\Delta\Delta C_T$ -methode. Individuele $\Delta\Delta C_T$ -waarden voor alle monstereparen (4 replica's x 6 donorpoolen x 3 kitpartijen x 3 operators = 216 paar voor elk gen) zijn in kaart gebracht als enkele stippen met gemiddelden (grotere stippen) en standaarddeviaties (zwarte balken) voor alle getoonde monsters. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3x$ totale precisie van de assays (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; verschillende assayprecisies in vergelijking met afbeelding 1–4, 8, 9 en 15 verschillende assayversies).

Apparatuur en reagentia die door de gebruiker moeten worden geleverd

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Voor alle protocollen

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; cat.nr. 762165)
- Ethanol (96–100%, zuiverheidsgraad p.a.)
- Pipetten* (10 µl – 4 ml)
- Steriel, aerosolfilter, RNase-vrije pipetpunten†
- Maatcilinder‡
- Centrifuge* in staat om 3000-5000 x g te bereiken en uitgerust met een uitwaairotor en emmers om de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) te houden
- Vortexmixer*
- Ijsschaafsel
- Permanente pen voor etikettering

Voor het handmatige protocol

- Microcentrifuge met variabele snelheid* in staat om een bereik van minimaal 1000–8000 x g te bereiken, hoewel lagere en hogere g-krachten van toepassing zijn (zie de protocolstappen voor informatie), en uitgerust met een rotor voor 2ml-microcentrifugebuisjes

* Controleer of de hulpmiddelen en instrumenten regelmatig zijn gecontroleerd, onderhouden en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

† Zorg dat u bekend bent met de richtlijnen voor de verwerking van RNA (bijlage A, pagina 71).

‡ Voor de toevoeging van ethanol aan buffer BR4-concentraat.

- Schudincubator* in staat om bij 55 °C en 65 °C te incuberen en schudden met ≥ 400 tpm, maximaal 1400 tpm (zoals de Eppendorf® Thermomixer Compact, of gelijkwaardig)

Voor het geautomatiseerde protocol (met QIAcube of QIAcube Connect MDx)

- Schaar

Verbruiksartikelen QIAcube-instrumenten:

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

Accessoires QIAcube-instrumenten:

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

Voor het geautomatiseerde protocol met QIAcube Connect MDx

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

QIAcube Connect MDx-servicepakketten:

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

* Controleer of de hulpmiddelen en instrumenten regelmatig zijn gecontroleerd, onderhouden en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

† Ook inbegrepen in het Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, cat.nr. 990395)

Voor het geautomatiseerde protocol met QIAcube

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

* Controleer of hulpmiddelen en instrumenten regelmatig zijn gecontroleerd, onderhouden en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

Belangrijke opmerkingen

QIAcube-instrumenten gebruiken

Zorg dat u bekend bent met het bedienen van het QIAcube-instrument. Lees de Gebruikershandleiding bij het QIAcube-instrument en de aanvullende informatie die bij het QIAcube-instrument wordt meegeleverd, schenk hierbij met name aandacht aan de veiligheidsinformatie, voordat de geautomatiseerde PAXgene Blood RNA-protocollen worden gestart.

Indien niet afzonderlijk gespecificeerd, is de volgende paragraaf van toepassing op zowel de QIAcube Connect MDx als de QIAcube.

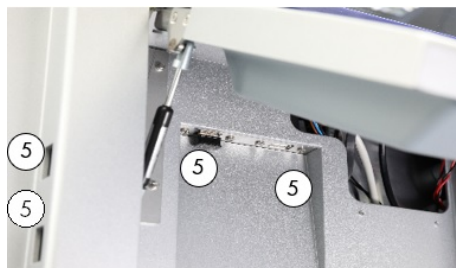
De QIAcube-instrumenten starten

Sluit de kap van het QIAcube-instrument en schakel het QIAcube-instrument uit met de aan-uitschakelaar (QIAcube Connect MDx: zie afbeelding 17, pagina 42; QIAcube: afbeelding 18, pagina 43).

Er klinkt een piep en het startscherm verschijnt. Het instrument voert automatisch de initialisatietests uit.



Vooraanzicht van de QIAcube Connect MDx



Uitgetrokken aanraakscherm



Achteraanzicht van QIAcube Connect MDx



Achteraanzicht van QIAcube Connect MDx

Afbeelding 17. Externe eigenschappen van de QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ① Aanraakscherm ② Kap ③ Afvallade ④ Aan-uitschakelaar | <ul style="list-style-type: none"> ⑤ 2 USB-poorten aan de linkerkzijde van het aanraakscherm; 2 USB-poorten achter het aanraakscherm (wifi-module in 1 USB-poort geplaatst) ⑥ RJ-45-ethernetpoort ⑦ Netsnoeraansluiting ⑧ Ventilatieopening |
|--|---|



Afbeelding 18. Vooraanzicht van de QIAcube.

- | | | | |
|---|--|---|---------------------------------|
| ① | Aanraakscherm | ④ | USB-poort achter beschermpaneel |
| ② | Kap | ⑤ | Aan-uitschakelaar |
| ③ | RS232-seriële poort achter beschermpaneel
(alleen voor gebruik door QIAGEN-
instrumentonderhoudspecialisten) | ⑥ | Afvallade |

Aanraakscherm

QIAcube-instrumenten worden bediend via een aanraakscherm. Met het aanraakscherm kan de gebruiker het instrument bedienen en de gebruikers via een werktafel-opstelling begeleiden. Tijdens het verwerken van monsters, wordt op het aanraakscherm de protocolstatus en resterende tijd weergegeven.



Afbeelding 19. Uitgetrokken aanraakscherm van QIAcube Connect MDx

Protocollen installeren op de QIAcube -instrumenten

Een initiële installatie van protocollen kan vereist zijn voordat de eerste RNA-bereidingsrun op de QIAcube-instrumenten kan worden uitgevoerd. Installeer de protocollen van zowel 'PAXgene Blood RNA Part A' als 'PAXgene Blood RNA Part B'.

Protocollen voor de QIAcube Connect MDx zijn beschikbaar via www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources (www.qiagen.com/MyQIAcube voor QIAcube) en moeten worden gedownload naar de USB-stick die bij de QIAcube-instrumenten wordt meegeleverd. Deze protocollen worden overgedragen naar het instrument via de USB-poort.

De USB-poort (QIAcube Connect MDx: aan de zijkant van het aanraakscherm, zie afbeelding 17, pagina 42; QIAcube: achter het beschermingspaneel, zie afbeelding 18, pagina 43) biedt de mogelijkheid om QIAcube-instrumenten te verbinden met de USB-stick die bij QIAcube-instrumenten wordt meegeleverd. Gegevensbestanden, zoals logbestanden of rapporten, kunnen ook via de USB-poort van de QIAcube-instrumenten naar de USB-stick worden overgezet.



Gebruik de USB-poort alleen voor de USB-stick die door QIAGEN wordt geleverd. Sluit geen andere apparatuur aan op deze poort.



Verwijder de USB-stick niet tijdens het downloaden van protocollen of tijdens het overzetten van gegevensbestanden of tijdens het uitvoeren van een protocol.

Raadpleeg de gerelateerde handleiding van het gebruikte instrument voor meer informatie over het uploaden van protocollen naar de QIAcube-instrumenten.

De QIAcube-instrumenten laden

Om tijd te besparen, kan het laden worden uitgevoerd tijdens een of beide van de 10-minuten centrifugatiestappen (stap 3 en 5) in 'Protocol: Geautomatiseerde zuivering van totaal RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)', pagina 62.

Reagensflessen

Vul voor elke run op het QIAcube-instrument de 4 reagensflessen voorzichtig met de reagentia uit tabel 3 (pagina 46). Vul ze tot het maximale indicatieniveau of, wanneer dit niet mogelijk is, tot het niveau dat is toegestaan door de buffervolumes die worden geleverd met de PAXgene Blood RNA Kit. Voorzie de flessen en deksels duidelijk van een etiket met buffernamen en plaats de gevulde reagensflessen op de juiste posities in het reagensflessenrek. Laad het rek in de QIAcube-instrumentwerktafel zoals getoond (afbeelding 20 t/m 22, pagina 46 t/m 48).



Het geleverde volume van buffer BR2 vult de reagensfles niet tot het indicatieniveau. Buffers BR3 en BR4 vullen de fles mogelijk niet tot het indicatieniveau na het verwerken van meerdere monsters in eerdere runs.



Verwijder de deksels van de flessen voordat u deze in de werktafel plaatst.



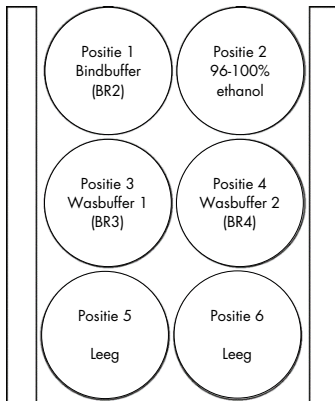
Buffervolumes die zijn geleverd in de PAXgene Blood RNA Kit (50) zijn voldoende voor maximaal 7 RNA-bereidingsruns met het QIAcube-instrument, met monsteraantallen van 2 tot 12 per run. In het algemeen dienen runs met lage monsteraantallen te worden vermeden om in totaal 50 monsters per kit te verwerken, met maximaal 7 RNA-bereidingsruns. Meer dan 7 RNA-bereidingsruns kan zorgen voor onvoldoende buffervolumes voor het verwerken van de laatste monsters.

Tabel 3. Posities in het reagensflessenrek

Positie	Reagens
1	Bindbuffer (BR2)
2	96–100% ethanol
3	Wasbuffer 1 (BR3)
4	Wasbuffer 2 (BR4)*
5	– (leeg laten)
6	– (leeg laten)

* Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Voeg 4 volumes ethanol (96–100%, zuiverheidsgraad p.a.) toe volgens de instructies op de fles om een werkoplossing te verkrijgen voordat u het concentraat voor de eerste keer gebruikt.

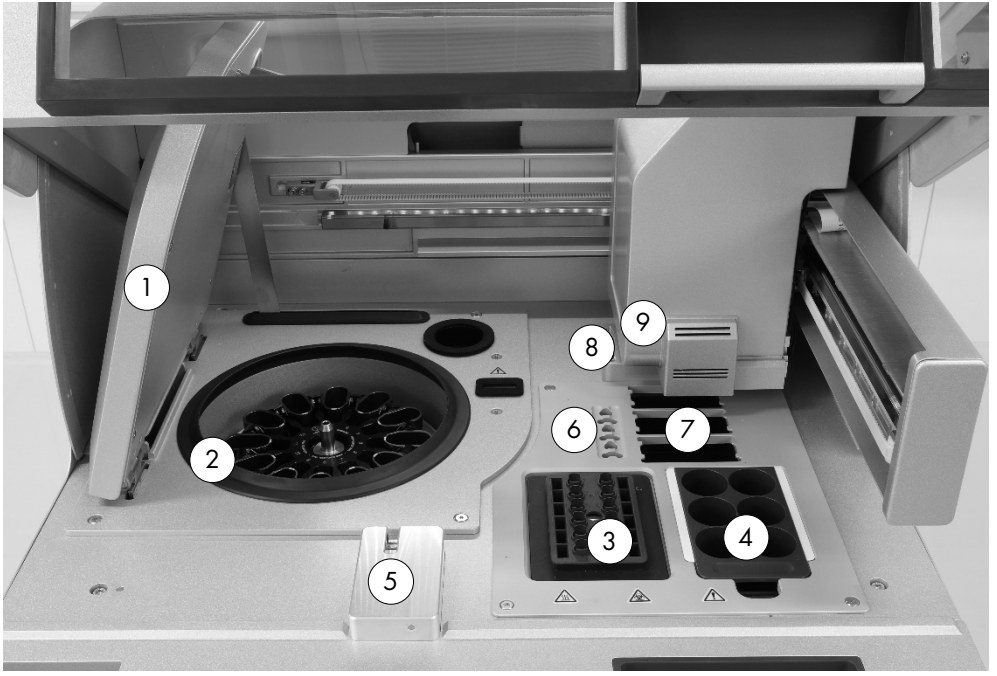
A



B

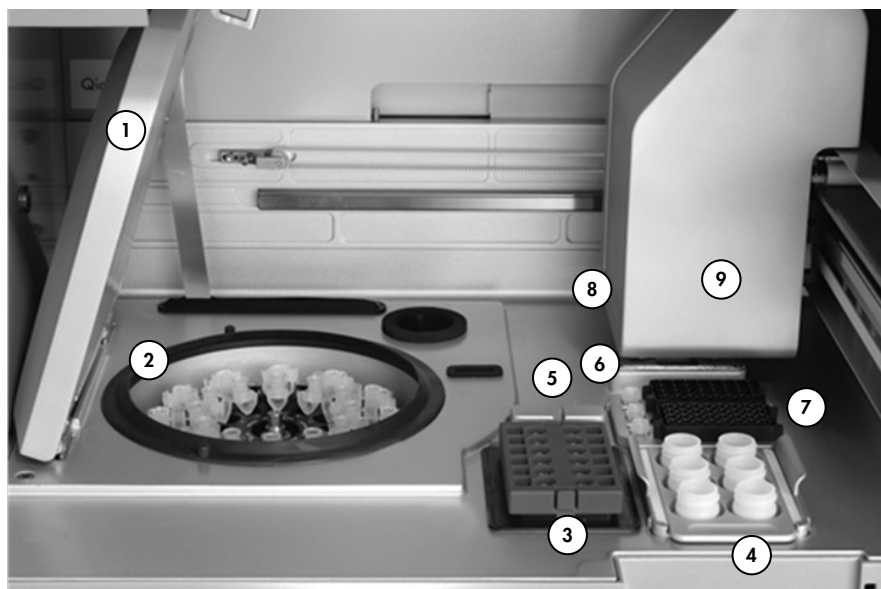


Afbeelding 20. Het reagensflessenrek laden. [A] Schematische weergave van de posities en inhoud van de flessen in het reagensflessenrek. [B] Het rek op het QIAcube-instrument laden (QIAcube weergegeven als voorbeeld).



Afbeelding 21. Binnenkant van de QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ① Centrifugedeksel ② Centrifuge ③ Schudder ④ Reagensflessenrek ⑤ Tipsensor en kapvergrendeling | <ul style="list-style-type: none"> ⑥ Slots voor microcentrifugebuisjes ⑦ 3 slots voor tiprekken ⑧ Afvoerslots voor tips en kolommen ⑨ Robotarm (omvat 1 kanaalpipet, gripper, ultrasonische en optische sensor en uv-led) |
|--|---|




Afbeelding 22. Binnenkant van de QIAcube.


- | | | | |
|---|-------------------|---|-----------------------------------|
| 1 | Centrifugedeksel | 6 | Slots voor microcentrifugebuisjes |
| 2 | Centrifuge | 7 | Tiprekken |
| 3 | Schudder | 8 | Afvoerslots voor tips en kolommen |
| 4 | Reagensflessenrek | 9 | Robotarm |
| 5 | Tipsensor | | |

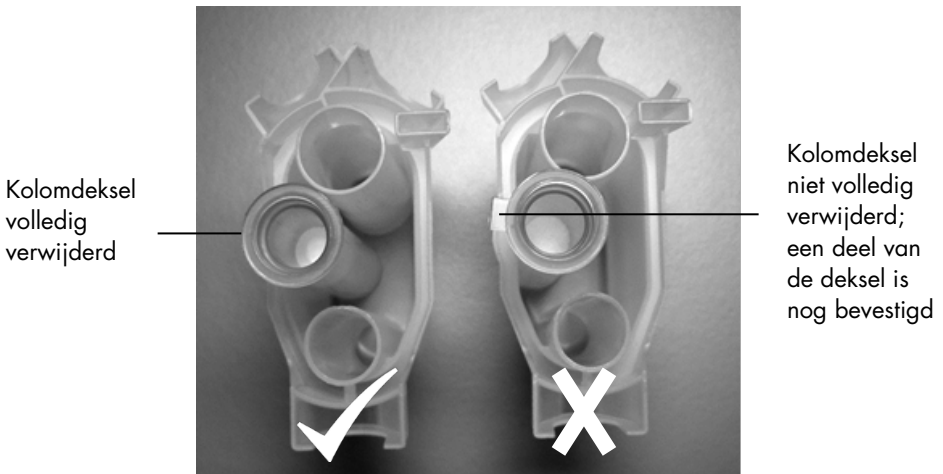
Spinkolommen (PRC, PSC), microcentrifugebuisjes (MCT) en kunststof artikelen van QIAcube-instrumenten

Plaats 2 tiprekken gevuld met Filter-Tips 1000 µl op het QIAcube-instrument (zie afbeelding 21 en 22, pagina 47 en 48). Vul de rekken zo nodig bij met tips.

 Gebruik alleen 1000µl-filtertips die zijn ontworpen voor gebruik met het QIAcube-instrument.


Voorzie voor elk monster de rotoradapters en microcentrifugebuisjes (MCT) van etikettering met een permanente pen. Open de te gebruiken PAXgene Shredder-spinkolommen (PSC) en knip de deksels volledig af met behulp van een schaar (zie afbeelding 23, pagina 49).

 Voor de juiste bediening van de robotgrijper van het QIAcube-instrument, verwijdert u de deksels volledig (knip deze af) en verwijdert u ook alle plastic onderdelen waarmee de deksels vastzitten aan de PAXgene Shredder-spinkolommen (PSC; zie afbeelding 23). Anders kan de robotgrijper de spinkolommen niet correct vastgrijpen (PSC, PRC).



Afbeelding 23. De PAXgene Shredder-spinkolommen (PSC) laden. De PAXgene Shredder-spinkolom (PSC) wordt in de middelste positie van de rotoradapter geladen. Knip de deksel af voor het laden van de kolom.

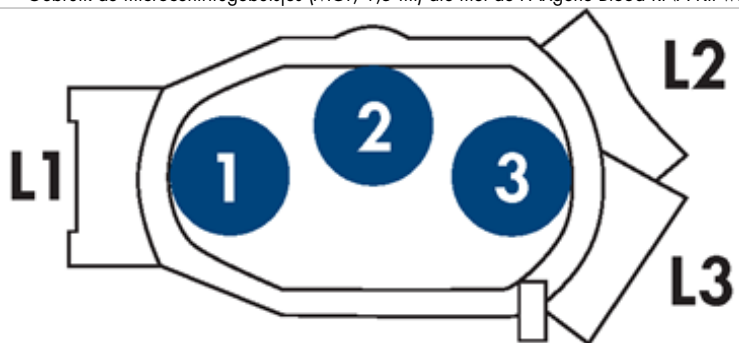
Laad de PAXgene RNA-spinkolom (PRC), PAXgene Shredder-spinkolom (PSC; zonder deksel, zie afbeelding 23, pagina 49), en het geëtiketeerde microcentrifugebuisje in de juiste posities in elke gelabelde rotoradapter, zoals getoond in tabel 4 en afbeelding 24.

 Controleer of de deksels van de spinkolom (PRC) en de microcentrifugebuis (MCT) volledig naar beneden in de slots gedrukt zijn aan de rand van de rotoradapter, anders breken de deksels af tijdens de centrifugatie.

Tabel 4. Laboratoriummateriaal in de rotoradapter

Positie	Reagens	Positie van de deksel
1	PAXgene RNA-spinkolom (rood, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder-spinkolom (lila, PSC) (knip de deksel vóór het plaatsen in de rotoradapter af)	–
3	Microcentrifugebuisje (MCT)*	L3

* Gebruik de microcentrifugebuisjes (MCT; 1,5 ml) die met de PAXgene Blood RNA Kit worden meegeleverd.



Afbeelding 24. Posities in de rotoradapter. De rotoradapter heeft drie posities voor buisjes (1–3) en drie posities voor de deksel (L1–L3).

De centrifuge laden

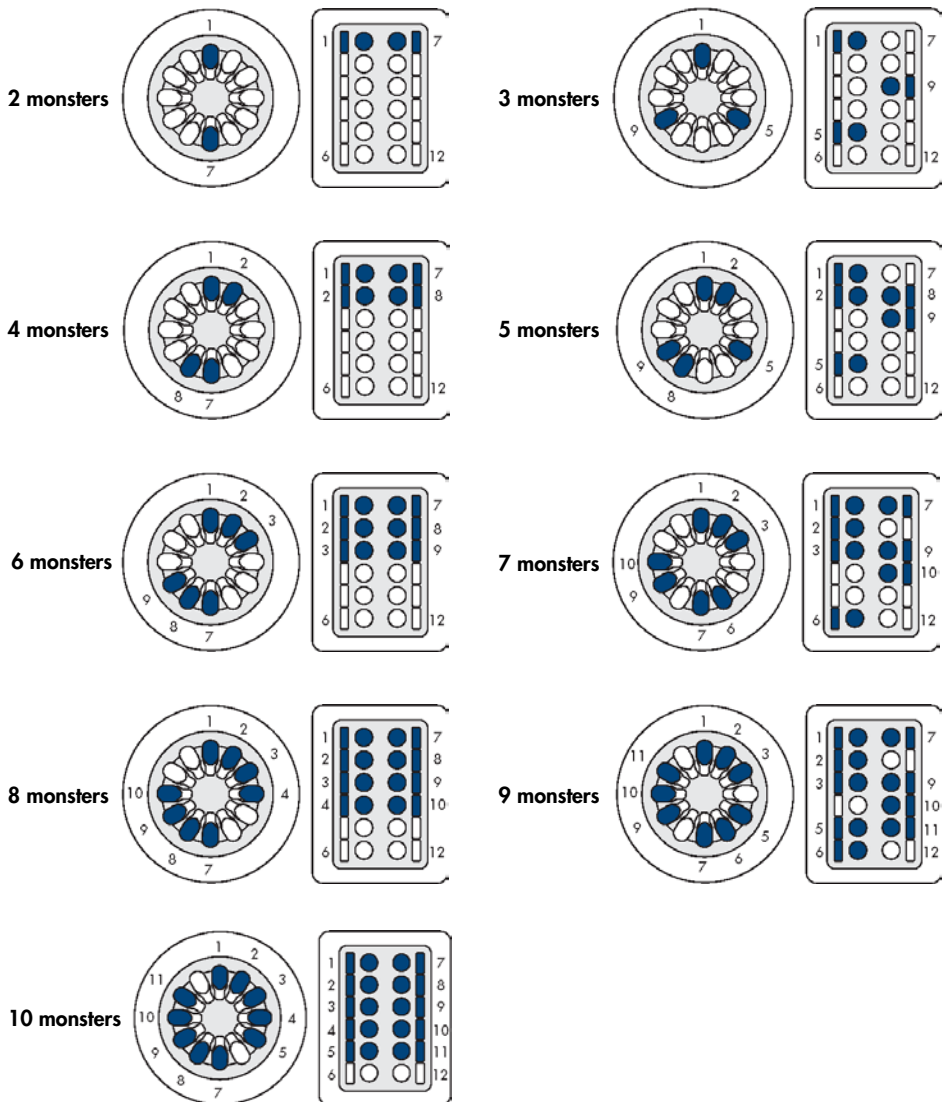
Laad de samengestelde rotoradapters in de centrifuge-emmers zoals hieronder getoond in afbeelding 25.



Zorg er bij het laden voor dat de centrifuge-rotor radiaal wordt gebalanceerd wanneer er minder dan 12 monsters worden verwerkt (zie afbeelding 26, pagina 52). Alle centrifuge-emmers moeten worden bevestigd voordat een protocolrun wordt gestart, ook al worden er minder dan 12 monsters verwerkt. Eén monster of 11 monsters kunnen niet worden verwerkt.



Afbeelding 25. De centrifuge op de QIAcube-instrumenten laden. Laad de samengestelde rotoradapters in de centrifuge-emmers (QIAcube Connect MDx weergegeven als voorbeeld).



Afbeelding 26. De centrifuge en de schudder laden. De posities van de centrifuge en de schudder worden getoond van twee (2) tot tien (10) monsters. Eén (1) of 11 monsters kunnen niet worden verwerkt. Voor het verwerken van 12 monsters zijn alle centrifuge- en schudderposities geladen (afbeelding niet weergegeven).

Verwerkingsbuisjes (PT)

Verwijder de verwerkingsbuisjes (PT) van de eerdere runs aan de linkerzijde in de slots voor de microcentrifugebuisjes (QIAcube Connect MDx: zie afbeelding 21, pagina 47, QIAcube: zie afbeelding 22, pagina 48). Vul 3 verwerkingsbuisjes (PT) met de hoeveelheid reagentia zoals aangegeven in tabel 5, overeenkomstig met het aantal monsters in de run.

Pipetteer het aangegeven volume DNA-digestiebuffer (RDD) in een verwerkingsbuisje (PT) voor het DNase I-incubatiemengsel en voeg het aangegeven volume van voorraad DNase I (RNFD)-oplossing toe. Pipetteer het volledige mengsel 3 maal voorzichtig op en neer met behulp van een 1000µl-pipetpunt om te mengen.

Gebruik de 2ml-verwerkingsbuisjes (PT) die met de PAXgene Blood RNA Kit worden geleverd. Voorzie de busjes duidelijk van etikettering met reagensnamen en plaats ze in de juiste positie in de slots voor microcentrifugebuisjes, zoals weergegeven in tabel 6 (pagina 54).



DNase I (RNFD) is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. Meng alleen door te pipetteren en gebruik pipetpunten met een wijde opening om afbraak te voorkomen.

Niet vortexen.



Pipetteer alleen het vereiste volume zoals weergegeven in tabel 5 hieronder.

Tabel 5. Volume van reagentia vereist voor de verwerkingsbuisjes voor in de slots voor microcentrifugebuisjes.

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

Tabel 6. Slots voor microcentrifugebuisjes

	Positie		
	A	B	C
Inhoud	Proteinase K	DNase I-incubatiemengsel	Elutiebuffer (BR5)
Vat	Verwerkingsbuisje (PT)*	Verwerkingsbuisje (PT)*	Verwerkingsbuisje (PT)*

* Gebruik de 2ml-verwerkingsbuisjes die met de PAXgene Blood RNA Kit worden geleverd.

Protocol: Handmatige zuivering van totaal RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Wat u moet weten voor u begint

- Controleer of de doos intact en onbeschadigd is en dat de buffers niet hebben gelekt. Gebruik geen kit die beschadigd is.
- Zorg er bij gebruik van een pipet voor dat het juiste volume is ingesteld en dat vloeistof zorgvuldig en volledig wordt afgezogen en afgegeven.
- Om te voorkomen dat monsters naar de verkeerde buis of spinkolom worden overgebracht, moet u ervoor zorgen dat alle buisjes en spinkolommen op de juiste manier zijn voorzien van een etiket met een permanente pen. Voorzie de deksel en elke fysieke buis (PT, MCT) van een etiket. Voor de spinkolommen voorziet u het fysieke verwerkingsbuisje (PT) van een etiket. Sluit elke buis of spinkolom nadat er vloeistoffen naartoe zijn overgebracht.
- Het morsen van monsters en buffers tijdens de procedure kan de opbrengst en de zuiverheid van RNA beïnvloeden.
- Tenzij anders aangegeven, moeten alle centrifugatiestappen worden gedaan bij kamertemperatuur (15–25 °C).

Technieken waarin gebruik wordt gemaakt van nucleïnezuuramplificatie zijn erg gevoelig; de volgende voorzorgsmaatregelen zijn daarom noodzakelijk om kruiscontaminatie tussen monsterbereidingen te voorkomen:

- Pipetteer het monster voorzichtig in de spinkolom (PRC, PSC) zonder de rand van de kolom te bevochtigen.
- Gebruik iedere keer na het overbrengen van vloeistof een nieuwe pipetpunt. Gebruik pipetpunten met een aerosolfilter.

- Raak het membraan van de spinkolom (PRC, PSC) niet aan met de pipetpunt.
- Centrifugeer het monster kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de deksel te verwijderen, na het vortexen of verhitten van een microcentrifugebuisje (MCT).
- Draag handschoenen tijdens de gehele procedure. Als de handschoenen in aanraking komen met het monster moeten de handschoenen onmiddellijk worden vervangen.
- Sluit de spinkolom (PRC, PSC) voordat u deze in de microcentrifuge plaatst. Centrifugeer zoals beschreven in de procedure.
- Open niet meer dan één spinkolom (PRC, PSC) tegelijk en zorg dat er geen aerosolen kunnen worden gevormd.
- Om meerdere monsters tegelijkertijd efficiënt te kunnen verwerken, vult u een rek met de benodigde verwerkingsbuisjes (PT) zodat spinkolommen (PRC, PSC) na centrifugatie naar de buisjes kunnen worden overgebracht. Gooi de gebruikte verwerkingsbuisjes (PT) die doorgelopen vloeistoffen bevatten weg en plaats nieuwe verwerkingsbuisjes (PT) die spinkolommen (PRC, PSC) bevatten direct in de microcentrifuge.



Wat u moet doen voor u begint



- Bloed moet worden verzameld in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) volgens de instructies in de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube*. Zie indien nodig bijlage C (pagina 74) voor aanbevelingen over de verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Zorg ervoor dat de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) minimaal 2 uur geïncubeerd zijn op kamertemperatuur na de bloedafname om volledige lyse van bloedcellen te garanderen. Incubatie van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) gedurende de gehele nacht kan de opbrengst vergroten. Als de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) is opgeslagen bij 2–8 °C, –20 °C of –70 °C na de bloedafname, laat deze dan eerst op kamertemperatuur komen en sla deze daarna 2 uur op bij kamertemperatuur voordat u de procedure start.
- Lees de veiligheidsinformatie op pagina 10.
- Lees de richtlijnen voor de verwerking van RNA (bijlage A, pagina 71).
- Zorg ervoor dat instrumenten, zoals pipetten en de schudincubator, regelmatig worden gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

- Een schudincubator is vereist bij stap 5 en stap 20. Stel de temperatuur van de schudincubator in op 55 °C.
- Er kan in bindbuffer (BR2) tijdens opslag een precipitaat ontstaan. Verwarm, indien nodig, tot 37 °C om deze op te lossen.
- Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Voeg 4 volumes ethanol (96–100%, zuiverheidsgraad p.a.) toe volgens de instructies op de fles om een werkoplossing te verkrijgen voordat u het concentraat voor de eerste keer gebruikt.
- Bereid voorraad DNase I-oplossing wanneer u de RNase-Free DNase Set voor het eerst gebruikt. Los de vaste DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-eenheden)* op in 550 µl DNase-resuspensiebuffer (DRB) die wordt meegeleverd met de set. Let op dat er geen DNase I (RNFD) verloren gaat bij het openen van de flacon. Vortex de gereconstitueerde DNase I (RNFD) niet. DNase I is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. Meng alleen door het buisje voorzichtig om te keren.
- Huidige gegevens tonen aan dat gereconstitueerd DNase I (RNFD) maximaal 6 weken kan worden opgeslagen bij 2–8 °C. Verwijder voor langetermijnopslag van DNase I (RNFD) de voorraadoplossing uit de glazen flacon, verdeel het in aliquots voor eenmalig gebruik (gebruik de 1,5ml-microcentrifugebuisjes [MCT] die met de kit worden geleverd; er zijn genoeg voor 5 aliquots) en sla ze tot 9 maanden op bij –20 °C. Ontdooide aliquots kunnen tot 6 weken worden opgeslagen bij 2–8 °C. Vries de aliquots niet opnieuw in na het ontdooien.
- Zorg er bij het reconstitueren van DNase I (RNFD) en het uitvullen van aliquots voor dat u de richtlijnen voor de verwerking van RNA volgt (bijlage A, pagina 71).

* Kunitz-eenheden worden algemeen gebruikt als eenheden voor het meten van DNase I, gedefinieerd als de hoeveelheid DNase I die een toename veroorzaakt in A_{260} van 0,001 per minuut per milliliter bij 25 °C, pH 5,0, met sterk gepolymeriseerd DNA als het substraat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 en 363).

Procedure

1. Centrifugeer de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minuten met 3000–5000 x g met behulp van een uitzwaairotor.
 -  Zorg ervoor dat het bloedmonster minimaal 2 uur op kamertemperatuur (15–25 °C) is geïncubeerd in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) om volledige lyse van bloedcellen te bereiken.
 -  De rotor moet de buisadapters voor buisjes met een ronde onderkant bevatten. Als er andere buisjes worden gebruikt, kunnen deze breken tijdens het centrifugeren.
2. Verwijder supernatant door te decanteren of pipetteren. Voeg 4 ml RNase-Free Water (RNase-vrij water; RNFV) toe aan de pellet en sluit het buisje met behulp van een nieuwe secundaire BD Hemogard-sluiting (meegeleverd met de kit).

Zorg er na het decanteren van supernatant voor dat de pellet niet verstoord wordt en droog de rand van het buisje met een schone papieren doek.
3. Vortex tot de pellet zichtbaar is opgelost en centrifugeer 10 minuten met 3000–5000 x g met behulp van een uitzwaairotor. Verwijder het volledige supernatant en gooi het weg. Kleine celresten die in het supernatant achterblijven na het vortexen maar voor de centrifugatie hebben geen invloed op de procedure.
 -  Als het supernatant niet volledig is verwijderd, belemmert dit de lyse en verdunt dit het lysaat. Dit heeft invloed op de bindingscondities van het RNA op het PAXgene-membraan.
4. Voeg 350 µl resuspensiebuffer (BR1) toe en vortex tot de pellet zichtbaar is opgelost.
5. Pipetteer het monster in een 1,5ml-microcentrifugebuisje (MCT). Voeg 300 µl bindbuffer (BR2) en 40 µl proteïnase K (PK) toe. Vortex gedurende 5 seconden om te mengen en incubeer gedurende 10 minuten bij 55 °C met behulp van een schudincubator met 400–1400 tpm. Stel na de incubatie de temperatuur van de schudincubator in op 65 °C (voor stap 20).
 -  Meng bindbuffer (BR2) en proteïnase K (PK) niet samen alvorens deze aan het monster toe te voegen.

- Pipetteer het lysaat direct in een PAXgene Shredder-spinkolom (PSC; lila) die is geplaatst in een 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en centrifugeer 3 minuten op maximale snelheid (niet hoger dan 20.000 x g).



Pipetteer het lysaat voorzichtig in de spinkolom (PSC) en controleer visueel of het lysaat volledig is overgebracht naar de spinkolom (PSC).

Om schade aan kolommen (PSC) en buisjes (PT) te voorkomen, mag de snelheid niet hoger dan 20.000 x g zijn.




Sommige monsters kunnen door de PAXgene Shredder-spinkolom (PSC) stromen zonder centrifugatie. Dit komt door de lage viscositeit van sommige monsters en mag niet worden opgevat als een indicatie voor het falen van het product.

- Breng de volledige supernatant van de doorgelopen fractie voorzichtig over naar een nieuwe 1,5ml-microcentrifugebuis (MCT) zonder de pellet in het verwerkingsbuisje te verstoren.
- Voeg 350 µl ethanol (96–100%, zuiverheidsgraad p.a.) toe. Meng door kort te vortexen en centrifugeren (1–2 seconden met 500–1000 x g) om druppels van de binnenkant van de deksel van het buisje te verwijderen.



De centrifugatieduur mag niet meer dan 1–2 seconden zijn, omdat dit kan zorgen voor een pellet van nucleïnezuren en verminderde opbrengsten van totaal RNA.

- Pipetteer 700 µl monster in de PAXgene RNA-spinkolom (PRC; rood) die is geplaatst in een 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g. Plaats de spinkolom (PRC) in een nieuw 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en gooi het oude verwerkingsbuisje (PT) met doorgelopen vloeistoffen weg.
 - Pipetteer overgebleven monster in de PAXgene RNA-spinkolom (PRC) en centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g. Plaats de spinkolom (PRC) in een nieuw 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en gooi het oude verwerkingsbuisje (PT) met doorgelopen vloeistoffen weg.
-  Pipetteer het monster voorzichtig in de spinkolom (PRC) en controleer visueel of het monster volledig is overgebracht naar de spinkolom (PRC).
- Pipetteer 350 µl wasbuffer 1 (BR3) in de PAXgene RNA-spinkolom (PRC). Centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g. Plaats de spinkolom (PRC) in een nieuw 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en gooi het oude verwerkingsbuisje (PT) met doorgelopen vloeistoffen weg.

12. Voeg 10 µl DNase I (RNFD)-voorraadoplossing toe aan 70 µl DNA-digestiebuffer (RDD) in een 1,5ml-microcentrifugebuisje (MCT). Meng door voorzichtig tegen het busje te tikken en centrifugeer kort om achtergebleven vloeistoffen van de zijanten van het busje te verwijderen.

Als er, bijvoorbeeld, 10 monsters worden verwerkt, voegt u 100 µl DNase I (RNFD)-voorraadoplossing toe aan 700 µl DNA-digestiebuffer (RDD). Gebruik de 1,5ml-microcentrifugebuisjes (MCT) die met de kit worden geleverd.



DNase I is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. Meng alleen door voorzichtig tegen het busje te tikken. Niet vortexen.

13. Pipetteer het DNase I (RNFD)-incubatiemengsel (80 µl) direct op het PAXgene RNA-spinkolom (PRC)-membraan en plaats deze 15 minuten op de tafel (20–30 °C).



Zorg ervoor dat het DNase I (RNFD)-incubatiemengsel direct op het membraan is geplaatst. Incomplete digestie van DNase wordt veroorzaakt als het mengsel aan de wanden of de O-ring van de spinkolom (PRC) is aangebracht en het daar blijft zitten.

14. Pipetteer 350 µl wasbuffer 1 (BR3) in de PAXgene RNA-spinkolom (PRC) en centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g. Plaats de spinkolom (PRC) in een nieuw 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en gooi het oude verwerkingsbuisje (PT) met doorgelopen vloeistoffen weg.

15. Pipetteer 500 µl wasbuffer 2 (BR4) in de PAXgene RNA-spinkolom (PRC) en centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g. Plaats de spinkolom (PRC) in een nieuw 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en gooi het oude verwerkingsbuisje (PT) met doorgelopen vloeistoffen weg.



Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Zorg ervoor dat ethanol voor gebruik is toegevoegd aan wasbuffer 2 (BR4) (zie 'Wat u moet doen voor u begint', pagina 56).

16. Voeg nogmaals 500 µl wasbuffer 2 (BR4) aan de PAXgene RNA-spinkolom (PRC). Centrifugeer 3 minuten met 8000–20.000 x g.

17. Gooi het verwerkingsbuisje (PT) met doorgelopen vloeistoffen weg en plaats de PAXgene RNA-spinkolom (PRC) in een nieuw 2ml-verwerkingsbuisje (PT). Centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g.

18. Gooi het verwerkingsbuisje (PT) met de doorgelopen vloeistoffen weg. Plaats de PAXgene RNA-spinkolom (PRC) in een 1,5ml-microcentrifugebuisje (MCT) en pipetteer 40 µl elutiebuffer (BR5) direct op de PAXgene RNA-spinkolom (PRC)-membraan. Centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g om het RNA te elueren.

Het is belangrijk om het hele membraan te bevochtigen met elutiebuffer (BR5) om een maximale elutie-efficiëntie te bereiken.

19. Herhaal de elutiestap (stap 18) zoals die wordt beschreven, met behulp van 40 µl elutiebuffer (BR5) en hetzelfde microcentrifugebuisje (MCT).

20. Incubeer het eluaat 5 minuten bij 65 °C in de schudincubator (uit stap 5) zonder te schudden. Koel onmiddellijk met ijs na incubatie.

Deze incubatie bij 65 °C denatureert het RNA voor vervolgtoeepassingen. Overschrijdt de incubatietijd of -temperatuur niet.

21. Als de RNA-monsters niet onmiddellijk worden gebruikt, slaat u ze op bij –20 °C of –70 °C.

Omdat het RNA na herhaaldelijk invriezen en ontdooien gedenatureerd blijft, is het niet nodig om de incubatie bij 65 °C te herhalen. Als u de RNA-monsters in een diagnostisch assay gebruikt, volg dan de instructies van de fabrikant.

Voor de nauwkeurige kwantificatie van RNA door absorptie bij 260 nm, raden wij aan om monsters te verdunnen met 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. * Het verdunnen van het monster in RNase-Free Water kan leiden tot onnauwkeurig lage waarden.

Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en Tris-HCl-buffer als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld.



Voor kwantificatie in de Tris-HCl-buffer gebruikt u het verband $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Zie bijlage B, pagina 72.

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Protocol: Geautomatiseerde zuivering van totaal RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Wat u moet weten voor u begint

- Controleer of de doos intact en onbeschadigd is en dat de buffers niet hebben gelekt. Gebruik geen kit die beschadigd is.
- Zorg er bij gebruik van een pipet voor dat het juiste volume is ingesteld en dat vloeistof zorgvuldig en volledig wordt afgezogen en afgegeven.
- Om te voorkomen dat monsters naar de verkeerde buisjes of kunststof artikelen worden overgebracht, moet u ervoor zorgen dat alle verwerkingsbuisjes (PT), microcentrifugebuisjes (MCT) en rotoradapters op de juiste manier zijn voorzien van een etiket met een permanente pen. Voorzie de deksel en elke fysieke microcentrifugebuis (MCT), elk fysieke verwerkingsbuisje (PT) en de buitenzijde van elke rotoradapter van een etiket.
- Het morsen van monsters en buffers tijdens de procedure kan de opbrengst en de zuiverheid van RNA beïnvloeden.
- Tenzij anders aangegeven, moeten alle centrifugatiestappen worden gedaan bij kamertemperatuur (15–25 °C).

Technieken waarin gebruik wordt gemaakt van nucleïnezuuramplificatie zijn erg gevoelig; de volgende voorzorgsmaatregelen zijn daarom noodzakelijk om kruiscontaminatie tussen monsterbereidingen te voorkomen:

- Pipetteer het monster voorzichtig onderin in het verwerkingsbuisje (PT) zonder de rand van het buisje te bevochtigen.
- Gebruik iedere keer na het overbrengen van vloeistof een nieuwe pipetpunt. Gebruik pipetpunten met een aerosolfilter.

- Raak het membraan van de spinkolom (PRC, PSC) niet aan met de pipetpunt.
- Centrifugeer het monster kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de deksel te verwijderen, na het vortexen of verhitten van een microcentrifugebuisje (MCT).
- Draag handschoenen tijdens de gehele procedure. Als de handschoenen in aanraking komen met het monster moeten de handschoenen onmiddellijk worden vervangen.

Wat u moet doen voor u begint

- Bloed moet worden verzameld in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) volgens de instructies in de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube*. Zie indien nodig bijlage C (pagina 74) voor aanbevelingen over de verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Zorg ervoor dat de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) minimaal 2 uur geïncubeerd zijn op kamertemperatuur na de bloedafname om volledige lyse van bloedcellen te garanderen. Incubatie van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) gedurende de gehele nacht kan de opbrengst vergroten. Als de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) is opgeslagen bij 2–8 °C, –20 °C of –70 °C na de bloedafname, laat deze dan eerst op kamertemperatuur komen en sla deze daarna 2 uur op bij kamertemperatuur voordat u de procedure start.
- Lees de veiligheidsinformatie op pagina 10.
- Lees 'Belangrijke opmerkingen', pagina 41.
- Lees de richtlijnen voor de verwerking van RNA (bijlage A, pagina 71).
- Lees de bijbehorende gebruikershandleiding bij het QIAcube-instrument en aanvullende informatie die bij het QIAcube-instrument wordt meegeleverd, schenk hierbij met name aandacht aan de veiligheidsinformatie.
- Zorg ervoor dat hulpmiddelen en instrumenten, zoals pipetten en het QIAcube-instrument, regelmatig worden gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
- Er kan in bindbuffer (BR2) tijdens opslag een precipitaat ontstaan. Verwarm, indien nodig, tot 37 °C om deze op te lossen.
- Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Voeg de gepaste hoeveelheid ethanol (96–100%, zuiverheidsgraad p.a.) toe volgens de instructies op de fles om een werkoplossing te verkrijgen voordat u het concentraat voor de eerste keer gebruikt.

- Bereid voorraad DNase I-oplossing wanneer u de RNase-Free DNase Set voor het eerst gebruikt. Los de vaste DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-eenheden)* op in 550 µl DNase-resuspensiebuffer (DRB) die wordt meegeleverd met de set. Let op dat er geen DNase I (RNFD) verloren gaat bij het openen van de flacon. Vortex de gereconstitueerde DNase I (RNFD) niet. DNase I is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. Meng alleen door het buisje voorzichtig om te keren.
- Huidige gegevens tonen aan dat gereconstitueerd DNase I (RNFD) maximaal 6 weken kan worden opgeslagen bij 2–8 °C. Verwijder voor langetermijnopslag van DNase I (RNFD) de voorraadoplossing uit de glazen flacon, verdeel het in aliquots voor eenmalig gebruik (gebruik de 1,5ml-microcentrifugebuisjes [MCT] die met de kit worden geleverd; er zijn genoeg voor 5 aliquots) en sla ze tot 9 maanden op bij –20 °C. Ontdooide aliquots kunnen tot 6 weken worden opgeslagen bij 2–8 °C. Vries de aliquots niet opnieuw in na het ontdooien.
- Zorg er bij het reconstitueren van DNase I (RNFD) en het uitvullen van aliquots voor dat u de richtlijnen voor de verwerking van RNA volgt (bijlage A, pagina 71).
- Installeer de juiste schudadapter (met het QIAcube-instrument meegeleverd; gebruik de adapter voor Safe-Lock-buisjes van 2 ml, gemarkeerd met een '2') en plaats het schudrek bovenop de adapter.
- Controleer de afvallade en gooi deze zo nodig leeg.
- Installeer eventuele protocollen als dit nog niet is uitgevoerd voor eerdere runs. Voor de QIAcube Connect MDx moeten alle protocollen in het bijbehorende zip-bestand worden gedownload. Installeer voor de klassieke QIAcube de protocollen van zowel 'PAXgene Blood RNA Part A' als 'PAXgene Blood RNA Part B'. Zie 'Protocollen installeren op de QIAcube -instrumenten', pagina 44.

* Kunitz-eenheden worden algemeen gebruikt als eenheden voor het meten van DNase I, gedefinieerd als de hoeveelheid DNase I die een toename veroorzaakt in A_{260} van 0,001 per minuut per milliliter bij 25 °C, pH 5,0, met sterk gepolymeriseerd DNA als het substraat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 en 363).

Procedure

1. Sluit de kap van het QIAcube-instrument en schakel het QIAcube-instrument uit met de aan-uitschakelaar (QIAcube Connect MDx: zie afbeelding 17, pagina 42; QIAcube: zie afbeelding 18, pagina 43 Afbeelding 15).

Er klinkt een piep en het startscherm verschijnt. De instrumenten voeren automatisch de initialisatietests uit.

2. Open de kap van het QIAcube-instrument en laad de benodigde reagentia en kunststof artikelen in het QIAcube-instrument. Zie 'De QIAcube-instrumenten laden', pagina 45.

Om tijd te besparen kan het laden worden uitgevoerd tijdens een of beide van de volgende centrifugatiestappen van 10 minuten (stap 3 en 5).

3. Centrifugeer de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minuten met 3000–5000 x g met behulp van een uitzwaairotor.



Zorg ervoor dat het bloedmonster minimaal 2 uur op kamertemperatuur (15–25 °C) is geïncubeerd in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) om volledige lyse van bloedcellen te bereiken.



De rotor moet de buisadapters voor buisjes met een ronde onderkant bevatten. Als er andere buisjes worden gebruikt, kunnen deze breken tijdens het centrifugeren.

4. Verwijder supernatant door te decanteren of pipetteren. Voeg 4 ml RNase-Free Water (RNase-vrij water; RNFV) toe aan de pellet en sluit het buisje met behulp van een nieuwe secundaire BD Hemogard-sluiting (meegeleverd met de kit).

Zorg er na het decanteren van supernatant voor dat de pellet niet verstoord wordt en droog de rand van het buisje met een schone papieren doek.

5. Vortex tot de pellet zichtbaar is opgelost en centrifugeer 10 minuten met 3000–5000 x g met behulp van een uitzwaairotor. Verwijder het volledige supernatant en gooi het weg.

Kleine celresten die in het supernatant achterblijven na het vortexen maar voor de centrifugatie hebben geen invloed op de procedure.



Als het supernatant niet volledig is verwijderd, belemmert dit de lyse en verdunt dit het lysaat. Dit heeft invloed op de bindingscondities van het RNA op het PAXgene-membraan.

6. Voeg 350 µl resuspensiebuffer (BR1) toe en vortex tot de pellet zichtbaar is opgelost.

7. Pipetteer het monster in een 2ml-verwerkingsbuisje (PT).



Gebruik de 2ml-verwerkingsbuisjes (PT) die met de PAXgene Blood RNA Kit worden geleverd.

8. Laad de geopende verwerkingsbuisjes (PT) met monster in de QIAcube-schudder (QIAcube Connect MDx: zie afbeelding 21, pagina 47; QIAcube: zie afbeelding 22, pagina 48 Afbeelding 15). De monsterposities zijn genummerd om het laden te vergemakkelijken. Plaats de schudrekplugs (meegeleverd met het QIAcube-instrument) in de slots aan de rand van het schudrek naast elke verwerkingsbuis. Dit maakt de detectie van monsters tijdens de ladingscontrole mogelijk.



Zorg ervoor dat de juiste schudadapter (schudadapter, 2 ml, Safe-Lock-buis, gemarkeerd met een '2', meegeleverd met het QIAcube-instrument) is geïnstalleerd.



Zorg er bij het laden voor dat het schudrek wordt geladen zoals getoond in afbeelding 26, pagina 52 wanneer er minder dan 12 monsters worden verwerkt. Eén (1) of 11 monsters kunnen niet worden verwerkt. De positie nummers in het schudrek komen overeen met de positie nummers in de centrifuge.

9. Sluit de kap van het QIAcube-instrument (QIAcube Connect MDx: zie afbeelding 17, pagina 42; QIAcube: zie afbeelding 18, pagina 43).

10. Selecteer het protocol 'PAXgene Blood RNA Part A' en start het protocol.

Volg de instructies die worden gegeven op het aanraakscherm van het QIAcube-instrument.



Zorg ervoor dat beide programmaonderdelen (deel A en deel B) zijn geïnstalleerd op het QIAcube-instrument (zie 'Protocollen installeren op de QIAcube -instrumenten', pagina 44).



Het QIAcube-instrument voert ladingscontroles uit voor monsters, tips, rotoradapters en reagensflessen.

11. Nadat het protocol 'PAXgene Blood RNA Part A' is voltooid, opent u de kap van het QIAcube-instrument (QIAcube Connect MDx: zie afbeelding 17, pagina 42; QIAcube: zie afbeelding 18, pagina 43). Verwijder en de PAXgene RNA-spinkolommen (PRC) uit de rotoradapters en de lege verwerkingsbuisjes (PT) uit de schudder en gooi ze weg.



Tijdens de run worden spinkolommen overgebracht vanuit rotoradapter positie 1 (dekselpositie L1) naar rotoradapter positie 3 (dekselpositie L2) door het instrument (zie afbeelding 24, pagina 50).

12. Sluit alle deksels van de 1,5ml-microcentrifugebuisjes (MCT) met het gezuiverde RNA in de rotoradapters (positie 3, dekselpositie L3, zie afbeelding 24, pagina 50). Breng de 1,5ml-microcentrifugebuisje (MCT) over naar de adapter van de QIAcube-schudder (QIAcube Connect MDx: zie afbeelding 21, pagina 47; QIAcube: zie afbeelding 22, pagina 48).

13. Sluit de kap van het QIAcube-instrument (QIAcube Connect MDx: zie afbeelding 17, pagina 42; QIAcube: zie afbeelding 18, pagina 43).

14. Selecteer het protocol 'PAXgene Blood RNA Part B' en start het protocol.

Volg de instructies die worden gegeven op het aanraakscherm van het QIAcube-instrument.



Dit programma incubeert de monsters bij 65 °C en denatureert het RNA voor vervolgtoeepassingen. Zelfs als de vervolgtoeepassing een denaturatiestap met hitte bevat mag u deze stap niet overslaan. Voldoende RNA-denaturatie is noodzakelijk voor de maximale efficiëntie voor vervolgtoeepassingen.

15. Nadat het programma 'PAXgene Blood RNA Part B' is voltooid, opent u de kap van het QIAcube-instrument (QIAcube Connect MDx: zie afbeelding 17, pagina 42; QIAcube: zie afbeelding 18, pagina 43). Plaats de microcentrifugebuisjes (MCT) met gezuiverd RNA onmiddellijk op ijs.



WAARSCHUWING: Heet oppervlak. De schudder kan temperaturen tot 70 °C (158 °F). Raak het apparaat niet aan als het heet is.



Laat geen gezuiverd RNA achter in het QIAcube-instrument. Omdat de monsters niet gekoeld worden, kan het gezuiverde RNA worden afgebroken. Daarom worden onbeheerde monsterbereidingsruns gedurende de nacht niet aanbevolen.

16. Als de RNA-monsters niet onmiddellijk worden gebruikt, slaat u ze op bij $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ of $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Omdat het RNA na herhaaldelijk invriezen en ontdooien gedegradueerd blijft, is het niet nodig om de incubatieprotocol met behulp van hitte ('PAXgene Blood RNA Part B') te herhalen. Als u de RNA-monsters in een diagnostisch assay gebruikt, volg dan de instructies van de fabrikant.

Voor de nauwkeurige kwantificatie van RNA door absorptie bij 260 nm, raden wij aan om monsters te verdunnen met 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. * Het verdunnen van het monster in RNase-Free Water kan leiden tot onnauwkeurig lage waarden.

Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en Tris-HCl-buffer als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld.



Voor kwantificatie in de Tris-HCl-buffer gebruikt u het verband

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/ml}$. Zie bijlage B, pagina 72.

17. Verwijder het reagensflessenrek van de werktafel van het QIAcube-instrument (QIAcube Connect MDx: zie afbeelding 21, pagina 47; QIAcube: zie afbeelding 22, pagina 48) en sluit alle flessen met de juiste gelabelde deksels. Buffer in flessen kan minstens 3 maanden bij kamertemperatuur ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) worden bewaard. Verwijder de overgebleven reagentia in de verwerkingsbuisjes (PT) in de slots voor de microcentrifugebuisjes van het QIAcube-instrument en gooi ze weg. Verwijder de rotoradapters uit de centrifuge en gooi ze weg. Leeg de lade van de QIAcube Connect MDx (QIAcube Connect MDx: zie afbeelding 17, pagina 42; QIAcube: zie afbeelding 18, pagina 43). Sluit de kap van de QIAcube-instrument en schakel het instrument uit met de aan-uitschakelaar.

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Gids voor problemen oplossen

Deze gids voor probleemoplossing kan helpen bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg de pagina met veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning voor meer informatie: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers bij de technische diensten van QIAGEN beantwoorden altijd graag uw vragen over de informatie en de protocollen in deze handleiding of over monster- en assaytechnologieën (zie de laatste pagina van deze handleiding voor contactgegevens of ga naar www.qiagen.com).

Opmerkingen en suggesties

RNA afgebroken

RNase-contaminatie



Zorg ervoor dat er geen RNasen aan de reagentia wordt toegevoegd tijdens de procedure of latere handelingen (zie bijlage A, pagina 71).

Lage RNA-opbrengst

a) Er is minder dan 2,5 ml bloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tube (BRT).



Zorg ervoor dat er 2,5 ml bloed is afgenomen in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT; zie de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube*).

b) Er is RNA-concentratie gemeten in water.



RNA moet worden verdund met 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* voor de juiste kwantificatie (zie bijlage B, pagina 72).

c) Er zijn celresten overgebracht naar de PAXgene RNA-spinkolom (PRC) in stap 9 en 10 van het handmatige protocol.



Vermijd het overbrengen van grote deeltjes bij het pipetteren van het supernatant in stap 7 van het handmatige protocol (het overbrengen van kleine celresten heeft geen invloed op de procedure).

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Opmerkingen en suggesties

- d) Het supernatant is niet volledig verwijderd in stap 3.



Zorg ervoor dat al het supernatant is verwijderd. Als het supernatant is gedecanteerd, verwijdert u druppels van de rand van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) door te deppen met een papieren doek. Neem de juiste voorzorgsmaatregelen om kruiscontaminatie te voorkomen.

- e) Na de afname in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) is het bloed minder dan 2 uur geïncubeerd.



Incubeer het bloed in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) minimaal 2 uur na afname.

Lage A_{260}/A_{280} -waarde

- a) Er is water gebruikt om RNA te verdunnen voor de A_{260}/A_{280} -meting.



Gebruik 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 om RNA te verdunnen voor de zuiverheidsmeting* (zie bijlage B, pagina 72).

- b) De spectrofotometer is niet goed genuld.



Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld.

Instrumentstoring

QIAcube-instrumenten werken niet naar behoren

Lees de bijbehorende gebruikershandleiding van de QIAcube. Schenk hierbij met name aandacht aan de het hoofdstuk voor probleemoplossing. Zorg ervoor dat het QIAcube-instrument juist is onderhouden, zoals wordt beschreven in de gebruikershandleiding.

* 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.

Bijlage A: Algemene opmerkingen over de verwerking van RNA

Verwerking van RNA



Ribonucleasen (RNasen) zijn zeer stabiele en actieve enzymen die doorgaans geen cofactoren nodig hebben om te functioneren. Gebruik geen kunststof of glazen instrumenten zonder verontreiniging met RNasen uit te sluiten. RNasen kunnen namelijk moeilijk worden geïnactiveerd en zelfs een zeer kleine hoeveelheid is voldoende om RNA af te breken. Let er goed op dat er tijdens of na de zuiveringsprocedure geen RNasen onopzettelijk in het RNA-monster terechtkomen. Neem voorzorgsmaatregelen tijdens de voorbehandeling en het gebruik van wegwerpbare en niet-wegwerpbare houders en oplossingen wanneer u met RNA werkt, zodat de omgeving RNase-vrij is en blijft.

Algemeen werk



Gebruik altijd de juiste microbiologische aseptische techniek wanneer u met RNA werkt. Op de handen en op stofdeeltjes kunnen bacteriën en schimmels aanwezig zijn; dit zijn de meest voorkomende bronnen van contaminatie met RNasen. Draag altijd latex of vinyl handschoenen bij het verwerken van reagentia en RNA-monsters, om contaminatie met RNasen via de huid of stof van laboratoriumapparatuur te voorkomen. Trek regelmatig schone handschoenen aan en houd alle buisjes zo veel mogelijk gesloten. Bewaar gezuiverd RNA op ijs als aliquots gepipetteerd zijn voor vervolgtoeepassingen.

Protocollen om contaminatie met RNase te verwijderen van glazen instrumenten en oplossingen kunnen worden gevonden in algemene richtlijnen voor moleculaire biologie, zoals Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bijlage B: Kwantificatie en bepaling van de kwaliteit van totaal RNA

Kwantificatie van RNA

De RNA-concentratie moet worden bepaald door de absorptie bij 260 nm te meten (A_{260}) in een spectrofotometer. Om de significantie te waarborgen, moeten de waarden in het lineaire bereik van de spectrofotometer liggen. Een absorptie van 1 eenheid bij 260 nm komt overeen met 44 μg RNA per ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Dit verband is alleen geldig voor metingen in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5*. Daarom is het noodzakelijk om het RNA-monster te verdunnen; dit moet worden gedaan met 10 mM Tris-HCl. Zoals hieronder wordt besproken (zie 'Zuiverheid van RNA', pagina 73), geeft de verhouding tussen de absorptiewaarden bij 260 en 280 nm een schatting van de RNA-zuiverheid. Zorg ervoor dat cuvettes RNase-vrij zijn bij het meten van RNA-monsters. Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en Tris-HCl-buffer als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld. Een voorbeeld van een berekening van RNA-kwantificatie wordt hieronder getoond.

Volume van RNA-monster	=	80 μl
Verdunning (1/15)	=	10 μl RNA-monster + 140 μl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Meet de absorptie van het verdunde monster in een cuvette (RNase-vrij).		
A_{260}	=	0,3
Concentratie van het monster	=	$44 \times A_{260} \times \text{verdunningsfactor}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 $\mu\text{g/ml}$
Totale opbrengst	=	concentratie x volume van het monster in milliliters
	=	198 $\mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 μg RNA

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Zuiverheid van RNA

De verhouding van de waarden bij 260 nm en 280 nm (A_{260}/A_{280}) geeft een schatting van de zuiverheid van RNA met betrekking tot verontreinigingen die in het UV absorberen, zoals proteïne. De verhouding A_{260}/A_{280} wordt echter aanzienlijk beïnvloed door pH. Een lagere pH-waarde resulteert in een lagere A_{260}/A_{280} -verhouding en verminderde gevoeligheid voor proteïnecontaminatie.* Voor nauwkeurige waarden raden wij aan om de absorptie te meten in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Zuiver RNA heeft een A_{260}/A_{280} -verhouding van 1,8–2,2 in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en Tris-HCl-buffer als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld.

* 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.

Bijlage C: Verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



De volgende aanbevelingen van BD kunnen helpen bij de verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Raadpleeg de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube* voor meer informatie over de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Instructies voor het verwijderen van de BD Hemogard-sluiting

1. Pak de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) met één hand vast en plaats uw duim onder de BD Hemogard-sluiting. (Plaats uw arm op een stevige ondergrond voor meer stabiliteit.) Draai met uw andere hand de BD Hemogard-sluiting terwijl u tegelijkertijd met uw duim van de andere hand omhoog drukt, ENKEL TOTDAT DE BUISSTOP LOS IS.
2. Haal uw duim weg voordat u de sluiting optilt. Gebruik uw duim NIET om de sluiting van de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) af te drukken. Let op: er bestaat een gevaar voor blootstelling als de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) bloed bevat. Om letsel bij het verwijderen van de sluiting te helpen voorkomen, is het belangrijk dat de duim die wordt gebruikt om de dop naar boven te duwen, geen contact meer maakt met de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) zodra de BD Hemogard-sluiting los is gemaakt.
3. Til de sluiting van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT). In het onwaarschijnlijke geval dat de plastic afscherming zich scheidt van de rubberen stop, DE SLUITING NIET OPNIEUW IN ELKAAR ZETTEN. Verwijder de rubberen stop voorzichtig van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Instructies voor het plaatsen van de secundaire BD Hemogard-sluiting

1. Plaats de sluiting op de PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Draai en duw de stop stevig naar beneden totdat deze volledig is bevestigd. Het opnieuw plaatsen van de stop is noodzakelijk om ervoor te zorgen dat de sluiting stevig op de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) blijft zitten tijdens de verwerking.

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, verwerkingsbuisjes, RNase-vrij DNase I, RNase-vrije reagentia en buffers. Voor gebruik in combinatie met de PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 bloedafnamebuizen	762165
Verwante producten die kunnen worden besteld bij QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Verpakking bevat: reagensflessenrekken (3); strips met reketiketten (8); 200µl-filtertips (1024); 1000µl-filtertips (1024); 1000µl-filtertips, wijde opening (1024); 30ml-reagensflessen (18); rotoradapters (240); rotoradapterhouder	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Steriele, wegwerpfiltertips, in een rek	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagensflessen (30 ml) met deksels; 6 in verpakking; voor gebruik met het reagensflessenrek van het QIAcube-instrument	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Voor 240 bereidingen: 240 wegwerprotoradapters; voor gebruik met QIAcube-instrumenten	990394

Reagent Bottle Rack	Rek geschikt voor 6 x 30ml-reagensflessen op de werktafel van het QIAcube-instrument	990390
Rotor Adapter Holder	Houder voor 12 wegwerprotoradapters; voor gebruik met QIAcube-instrumenten	990392
Verwante producten die kunnen worden besteld bij BD		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,75 inch (0,8 x 19 mm) naald, 12 inch (305 mm) slang met luer-adapter; 50 per box, 200 per kist	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Kist alleen voor een diameter van 13 mm en 16 mm; 1000/kist	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4,0 ml afname met rode BD Hemogard-sluiting en papieren etiket; 100/doos, 1000/kist	368975

* Deze accessoires voor bloedafname zijn typische producten die kunnen worden gebruikt met de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Om meer te weten over deze accessoires en over hoe u ze kunt bestellen, gaat u naar www.preanalytix.com.

Zie de (gebruikers)handleiding van de betreffende PreAnalytiX- en QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. De (gebruikers)handleidingen van PreAnalytiX- en QIAGEN Kits zijn verkrijgbaar via www.preanalytix.com en www.qiagen.com of kunnen bij de afdeling Technische Services van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur worden aangevraagd.

Revisiegeschiedenis van handleiding

Document en herziening	Wijzigingen	Datum
HB-0101-004, R2	Wijzigingen in het hele document om te voldoen aan de GHS-voorschriften	Juni 2015
HB-0101-005, R3	Nieuw sjabloon; herzieningen van geautomatiseerde protocol- en prestatiegegevens; update van veiligheidsinformatie om te voldoen aan de GHS-voorschriften; wijzigingen in instrumentdetails en in de verklaring over de beperkingen van het gebruik van het product.	Februari 2019
HB-0101-006, R3	Correctie in naam van de kit in de tabel Inhoud van de kit op pag. 5.	Januari 2020
HB-0101-007, R4	QIAcube Connect MDx toegevoegd aan geautomatiseerd protocol; taal in het gehele document bijgewerkt om verwijzingen naar QIAcube Connect MDx toe te voegen; tabel, pagina- en afbeeldingsnummers in hele document bijgewerkt.	December 2020

PreAnalytiX Worldwide

Producten van PreAnalytiX worden gedistribueerd door bedrijven van QIAGEN en BD

QIAGEN – Klantenservice

Bestellen www.QIAGEN.com/shop | Technische ondersteuning support.qiagen.com | Website www.qiagen.com

BD – Klantenservice

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

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

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

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

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

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

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

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

Finland
Orders: 358.9.88.70.780
Fax: 358.9.88.70.7816
Orders: tilauksef.fi@bd.com
E-mail: bdsuomi@bd.com

France
Orders: 33.476.68.36.36
Fax: 33.476.68.36.93
E-mail: serviceclientbdf@bd.com
Orders: commandesfr@bd.com
Technical support: vacutainerfr@bd.com

Germany
Orders: 49.6221.3050
Fax: 49.6221.305.216
E-mail: customercare.de@bd.com

India
Orders: 91.124.3949390
Orders: bd_india@bd.com

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



HB-0101-007 1122120 BD-8945 12/2020
Product van Duitsland