

2020 m. gruodis

„PAXgene[®] Blood RNA Kit“ vadovas

2 versija



50 (katalogo nr. 762174)

R4 **MAT** 1122120LT

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Pagamino „QIAGEN GmbH“ pagal „PreAnalytiX“ užsakymą

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

Prekių ženklai: „PAXgene[®]“, „PreAnalytiX[®]“ („PreAnalytiX GmbH“); QIAGEN[®], „QIAcube[®]“ („QIAGEN Group“); „BD Vacutaine[®]“, „BD Hemogard™“, „Safety-Lok™“ („Becton, Dickinson and Company“); „Eppendorf[®]“ („Eppendorf AG“).

„PAXgene Blood RNA Kit“ tiekiami ne į visas šalis. Prašome teirautis.

Ribotoji licencinė sutartis

Šio produkto naudojimas reiškia, kad „PAXgene Blood RNA Kit“ pirkejas arba naudotojas sutinka su šiomis sąlygomis:

1. „PAXgene Blood RNA Kit“ galima naudoti tik vadovaujantis „PAXgene Blood RNA Kit“ vadovu ir tik su rinkinyje esančiais komponentais. „PreAnalytiX“ nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtų šio rinkinio komponentų su j šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus „PAXgene Blood RNA Kit“ vadove ir papildomuose protokoluose, pateiktuose www.preanalytix.com.
2. Jei aiškiai nenurodyta licencijoje, „PreAnalytiX“ nesuteikia garantijos, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Rinkiniui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. „PreAnalytiX“ aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Rinkinio pirkejas ir naudotojas sutinka nesimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti čia nurodytus draudžiamus veiksmus.
6. „PreAnalytiX“ gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo rinkiniu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Atnaujintas licencijos sąlygas žr. www.preanalytix.com.

Sąlyginis pardavimas

Šis produktas pateikiamas su licencija pagal US-7,270,953 ir US-7,682,790 tam tikras paraiškas, taip pat EP-1820793 B1 ir šių patentų užsienio ekvivalentų paraiškas naudoti produktą nukleorūgščių kompleksui, suformuotam paėmus mėginius į „PAXgene Blood RNA Tube“, apdoroti.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 „PreAnalytiX GmbH“. Visos teisės saugomos.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Šveicarija

www.preanalytix.com

„PreAnalytiX“ platintojai

„PreAnalytiX“ produktus platina QIAGEN arba BD įmonės, atstovaudamos „PreAnalytiX“. Produktų negalima užsisakyti iš „PreAnalytiX GmbH“.


Vietos „PreAnalytiX“ platintojo kontaktinę informaciją žr. paskutiniame puslapyje.

Turinys

Rinkinio turinys	5
Simboliai	6
Laikymo sąlygos	7
Numatytoji paskirtis	8
Produkto naudojimo apribojimai	8
Kokybės kontrolė	9
Techninė pagalba	9
Saugos informacija	10
Įvadas	14
Principas ir procedūra	14
Mėginio paėmimas ir stabilizavimas	15
RNR koncentravimas ir gryninimas	20
Rankinis RNR gryninimas	20
Automatinis RNR gryninimas	30
Įranga ir reagentai, tiekiami naudotojo	39
Svarbios pastabos	42
„QIAcube“ instrumentų naudojimas	42
Protokolų diegimas „QIAcube“ instrumentuose	45
Įkėlimas į „QIAcube“ instrumentą	46
Protokolas. Rankinis bendros RNR gryninimas iš žmogaus viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT)	56

Protokolas. Automatizuotas bendros RNR gryninimas iš žmogaus viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT)	64
Trikčių šalinimo vadovas	71
A priedas. Bendrosios RNR tvarkymo pastabos.....	74
B priedas. Bendrosios RNR kiekybinis įvertinimas ir kokybės nustatymas.....	75
C priedas. „PAXgene Blood RNA Tubes“ tvarkymas (BRT)	77
Užsakymo informacija	78
Vadovo peržiūros istorija	80

Rinkinio turinys

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalogo nr.			762174
Paruošimų skaičius			50
BR1	„Resuspension Buffer“ (resuspensijos buferinis tirpalas)	RES BUF	20 ml
BR2	„Binding Buffer“* (rišamasis buferinis tirpalas)	BIND BUF	18 ml
BR3	„Wash Buffer 1“* (1 plovimo buferinis tirpalas)	WASH BUF 1	45 ml
BR4	„Wash Buffer 2 (concentrate)“† (2 plovimo buferinis tirpalas (koncentratas))	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	„Elution Buffer“ (eliavimo buferinis tirpalas)	ELU BUF	6 ml
RNFW	„RNase-Free Water (bottle)“ (vanduo be RNazės, buteliukas)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	„Proteinase K (green lid)“ (proteinazė K (žalias dangtelis))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	„PAXgene RNA Spin Columns (red)“ („PAXgene RNA“ Spin Columns (raudonos))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	„Processing Tubes (2 ml)“ (apdorojimo mėgintuvėliai (2 ml))	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	„Secondary BD Hemogard™ Closures“ (antriniai „BD Hemogard™“ dangteliai)	SEC CLOS	50
MCT	„Microcentrifuge Tubes (1.5 ml)“ (mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai (1,5 ml))	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	„DNase I, RNase-free (lyophilized)“ (DNazė I, be RNazės (liofilizuota))	DNA REM	1500 Kunitz vienety†
RDD	„DNA Digestion Buffer (white lid)“ (DNR skaidymo buferinis tirpalas (baltas dangtelis))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	„DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid)“ (DNazės resuspensijos buferinis tirpalas (mėgintuvėlis, alyvų spalvos dangtelis))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	„PAXgene Shredder Spin Columns (lilac)“ („PAXgene Shredder“ centrifuginės kolonėlės (alyvų spalvos))	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Vadovas	PAXgene Blood RNA Kit* vadovas (2 versija)		1

* Nesuderinama su dezinfekavimo medžiagomis, kurių sudėtyje yra baliklio. Sudėtyje yra guanidino druskos. Saugos informaciją žr. 10 psl.

† 2 plovimo buferinis tirpalas (BR4) teikiamas kaip koncentratas. Prieš naudodami pirmą kartą, įpilkite 4 dalis etanolio (96–100 %, p.a. švarumo klasės), kaip nurodyta ant buteliuko, kad gautumėte darbinį tirpalą.

‡ Kunitz vienetai – dažniausiai naudojami vienetai matuojant I DNazę, apibrėžiami kaip DNazės I kiekis, dėl kurio A_{260} padidėja 0,001 per minutę mililitre, esant 25 °C, pH 5,0, kaip substratą naudojant stipriai polimerizuotą DNR (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ir 363).

Simboliai



Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> tyrimams (-ų) atlikti



Žr. naudojimo instrukcijas



Tinka naudoti iki



In vitro diagnostikos medicinos prietaisas



Katalogo numeris



Partijos numeris



Medžiagos numeris



Komponentai



Numeris



Sterilizavimo metodas švitinant



Kunitz vienetai



Papildymas



Sudėtyje yra



Atkurta



Deoksiribonukleazė I



Etanolis

GITC

Guanidino izotiocianatas

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Visuotinis prekės numeris



Nenaudoti pakartotinai



Temperatūros apribojimai



Viršutinė temperatūros riba



Gamintojas



Svarbi pastaba

Laikymo sąlygos

„PAXgene RNA“ centrifugines kolonėles (PRC), „PAXgene Shredder“ centrifugines kolonėles (PSC), proteinazę K (PK) ir buferinius tirpalus (BR1, BR2, BR3, BR4 ir BR5) reikia laikyti sausiai, rinkinio etiketėje nurodytoje temperatūroje.

„RNase-Free DNase Set“, kurio sudėtyje yra DNazės I (RNFD), DNR skaidymo buferinio tirpalo (RDD) ir DNazės resuspensijos buferinio tirpalo (DRB), siunčiamas aplinkos temperatūroje. Gavę visus „RNase-Free DNase Set“ komponentus nedelsdami padėkite etiketėje nurodytoje temperatūroje. Tinkamai laikomas rinkinys yra stabilus iki galiojimo termino, nurodyto ant rinkinio dėžutės.

Numatytoji paskirtis

„PAXgene Blood RNA System“ sudaro kraujo surinkimo mėgintuvėlis („PAXgene Blood RNA Tube“, BRT) ir nukleorūgšties gryninimo rinkinys („PAXgene Blood RNA Kit“). Jis yra skirtas kraujui surinkti, laikyti ir gabenti bei ląstelių RNR stabilizuoti uždarytame mėgintuvėlyje, be to, vėlesniam šeimininko RNR atskyrimui ir gryninimui iš viso kraujo, atliekant AT-PGR, kuri naudojama molekuliniais diagnostiniams tyrimams.

„PAXgene Blood RNA System“ efektyvumo charakteristikos buvo nustatytos naudojant FOS ir IL1B genų transkriptus. Naudojant kitus objekto transkriptus, už tinkamo „PAXgene Blood RNA System“ efektyvumo charakteristikų užtikrinimą atsako naudotojas.

Naudojimo indikacijos

„PAXgene Blood RNA Kit“ skirtas ląstelių RNR gryninti iš viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT). Kai rinkinys naudojamas kartu su „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT), sistema pateikia iš viso kraujo išgrynintą ląstelių RNR, skirtą AT-PGR, kuri naudojama molekulinės diagnostikos tyrimuose.

Produkto naudojimo apribojimai

„PAXgene Blood RNA Kit“ skirtas ląstelių RNR gryninti iš žmogaus viso kraujo ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leukocitų/ml), atliekant *in vitro* diagnostinius tyrimus. Jis nėra skirtas genominiams DNR ar virusiniams nukleorūgštims gryninti iš žmogaus viso kraujo. Dėl riboto skaičiaus patvirtintų stabilizavimo specifikacijų transkriptų (FOS ir IL1B genų transkriptai), nebuvo nustatytos visų transkriptų efektyvumo charakteristikos. Naudotojai turėtų peržiūrėti gamintojo duomenis ir savo duomenis, kad nustatytų, ar būtina patvirtinti kitus transkriptus.

Šis gaminys skirtas naudoti profesionaliems naudotojams, pvz., technikams ir gydytojams, paruoštiems atlikti *in vitro* diagnostikos procedūras.

Daugiau informacijos apie „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) naudojimą žr. „PAXgene Blood RNA Tube“ vadove (PAXgene Blood RNA Tube Handbook).

Kokybės kontrolė

Vadovaujantis QIAGEN ISO sertifikuota kokybės valdymo sistema, kiekviena „PAXgene Blood RNA Kit“ partija išbandoma pagal nustatytas specifikacijas, siekiant nuolat išlaikyti produktų kokybę.

Techninė pagalba

Įmonė QIAGEN didžiuojasi savo techninės pagalbos kokybe ir prieinamumu. Mūsų techninės priežiūros skyriuose dirba patyrę mokslininkai, turintys daug praktinės ir teorinės molekulinės biologijos bei „PreAnalytiX“ produktų naudojimo patirties. Jei turite klausimų apie „PAXgene Blood RNA Kit“, nedvejodami su mumis susisiekite.

Jei reikia techninės pagalbos ar daugiau informacijos, kreipkitės į QIAGEN techninio klientų aptarnavimo tarnybą.

Saugos informacija

ES – apie visus rimtus incidentus, susijusius su prietaisu, naudotojai turi pranešti gamintojui ir nacionalinei kompetetingai institucijai. Ne ES – įvykus bet kokiam incidentui arba jei turite su prietaisu susijusį klausimą, kreipkitės į vietinį QIAGEN atstovą.

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius.

Siekiant išvengti infekcijos rizikos (pvz., ŽIV ar hepatito B virusų) ar sužeidimo dirbant su biologinėmis ir cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, vienkartinės pirštines ir apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (Safety Data Sheets, SDS). Jie pateikiami patogiu ir kompaktišku PDF formatu internete www.preanalytix.com – čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti šio rinkinio SDS.

DĖMESIO

NEPILKITE baliklio ar rūgštinių tirpalų tiesiai į mėginių ruošimo atliekas.



Rišamojo buferinio tirpalo (BR2) ir 1 plovimo buferinio tirpalo (BR3) sudėtyje yra guanidino tiocianato, kuris jungdamasis su balikliu gali sudaryti labai reaktyvius junginius. Išlieję rišamąjį buferinį tirpalą (BR2) arba 1 plovimo buferinį tirpalą (BR3), išvalykite tinkamu laboratoriniu plovikliu ir vandeniu. Jei skystyje yra galinčių užkrėsti medžiagų, atitinkamą vietą iš pradžių nuvalykite laboratoriniu plovikliu ir vandeniu, o tada 1 % (v/v) natrio hipochloritu (tirpalu).

RNR stabilizavimo tirpalo ir kraujo mišinį iš „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) galima dezinfekuoti naudojant 1 dalį rinkoje parduodamo balinimo tirpalo (5 % natrio hipochlorito) 9 dalims RNR stabilizavimo tirpalo ir kraujo mišinio.

Mėginio paruošimo atliekas, pvz., supernatantus po RNR gryninimo procedūros centrifugavimo žingsnio, reikia tvarkyti kaip galinčias užkrėsti medžiagas. Prieš išmetant, atliekas reikia sterilizuoti autoklave arba sudeginti, kad pavojingos medžiagos būtų sunaikintos. Išmesti reikia laikantis oficialių taisyklių.

„PAXgene Blood RNA Kit“ komponentams taikomi toliau nurodyti pavojingumo ir atsargumo teiginiai. „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) saugos informaciją žr. „PAXgene Blood RNA Tube“ vadove.

„Buffer BR2“



Sudėtyje yra guanidino tiocianato. Pavojinga! Kenksminga prarijus. Gali būti kenksminga susilietus su oda arba įkvėpus. Sukelia smarkų akių pažeidimą. Toksiška vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus. Kontaktuojama su rūgštimis išskiria labai toksiškas dujas. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. PATEKUS Į AKIS: atsargiai plauti vandeniu kelias minutes. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. Nedelsiant skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją.

„Buffer BR3“



Sudėtyje yra: etanolio, guanidino tiocianato. Pavojinga! Degūs skystis ir garai. Sukelia smarkų akių pažeidimą. Kontaktuojama su rūgštimis išskiria labai toksiškas dujas. Laikyti atokiau nuo šilumos šaltinių / žiežirbų / atviros liepsnos / karštų paviršių. Nerūkyti. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. PATEKUS Į AKIS: atsargiai plauti vandeniu kelias minutes. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. Nedelsiant skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją.

DNazė I



Sudėtyje yra: DNazės. Pavojinga! Gali sukelti alerginę odos reakciją. Įkvėpus gali sukelti alerginę reakciją, astmos simptomus arba apsunkinti kvėpavimą. Stengtis neįkvėpti dulkių / dūmų / dujų / rūko / garų / aerozolio. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. Naudoti kvėpavimo takų apsaugos priemones. Esant sąlyčiui arba jeigu numanomas sąlytis: skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. Išneškite nukentėjusį į gryną orą; jam būtina ramybė ir padėtis, leidžianti laisvai kvėpuoti.

Proteinazė K



Sudėtyje yra: proteinazės K. Pavojus! Nestipriai dirgina odą. Įkvėpus gali sukelti alerginę reakciją, astmos simptomus arba apsunkinti kvėpavimą. Stengtis neįkvėpti dulkių / dūmų / dujų / rūko / garų / aerosolio. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. Naudoti kvėpavimo takų apsaugos priemones. Esant sąlyčiui arba jeigu numanomas sąlytis: skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. Išneškite nukentėjusį į gryną orą; jam būtina ramybė ir padėtis, leidžianti laisvai kvėpuoti.

Ivadas

Viso kraujo paėmimas yra daugelio molekulinų tyrimų, skirtų tirti ląstelių RNR, pirmasis žingsnis. Tačiau pagrindinė tokių eksperimentų problema – ląstelių RNR profilio *in vitro* nestabilumas. „PreAnalytiX“ atlikti tyrimai parodė, kad atskirtų mRNR rūšių kopijų skaičius visame kraujyje, laikant arba transportuojant kambario temperatūroje, gali pasikeisti daugiau nei 1000 kartų.* Taip atsitinka dėl greito RNR skilimo ir paėmus kraują sukelta tam tikrų genų ekspresija. Tokie RNR ekspresijos profilio pasikeitimai neleidžia atlikti patikimų genų ekspresijos tyrimų. Todėl metodas, kuriuo išlaikomas RNR ekspresijos profilis flebotomijos metu ir po jos, yra labai svarbus siekiant tiksliai iširti geno ekspresiją žmogaus visame kraujyje.

Principas ir procedūra

„PreAnalytiX“ sukūrė sistemą, leidžiančią paimti, stabilizuoti, laikyti ir transportuoti žmogaus viso kraujo mėginius, ir greitą bei efektyvų ląstelių RNR gryninimo protokolą. Sistemoje naudojami „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT; JAV patentai 6,602,718 ir 6,617,170), skirti kraujui paimti ir RNR stabilizuoti, po to rankiniu arba automatiniu būdu gryninti RNR, naudojant „PAXgene Blood RNA Kit“. Tiek rankinio, tiek automatizuoto protokolų efektyvumas RNR kokybės ir išėigos atžvilgiu iš esmės yra lygiavertis. Šiame vadove pateikti rankinio protokolo (23–30 psl.) ir automatizuoto protokolo (32–36 psl.) efektyvumo duomenys.



„QIAGEN QIAcube Connect MDx“ parduodamas ne visose šalyse. Norėdami gauti daugiau informacijos, susisiekite su QIAGEN techninės pagalbos skyriumi.

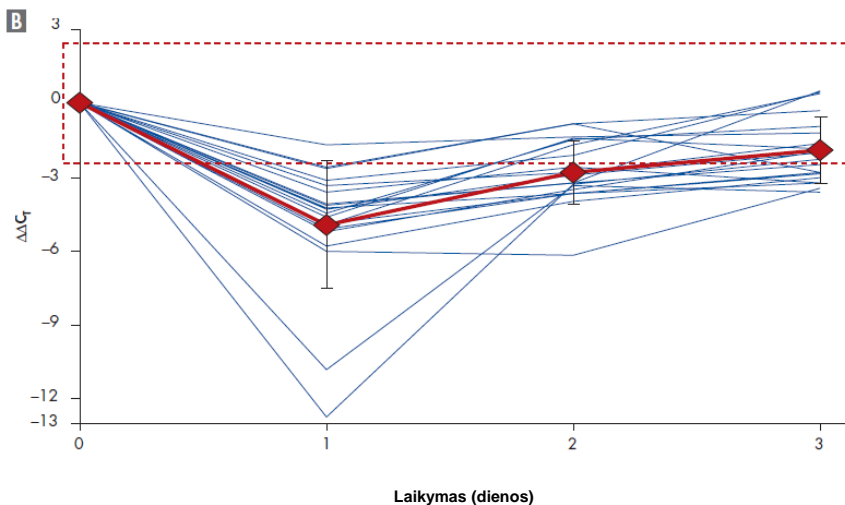
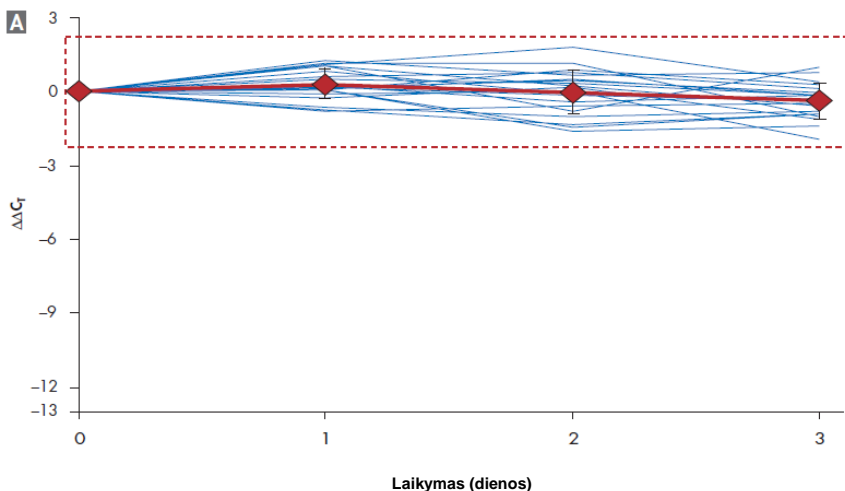
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Mėginio paėmimas ir stabilizavimas

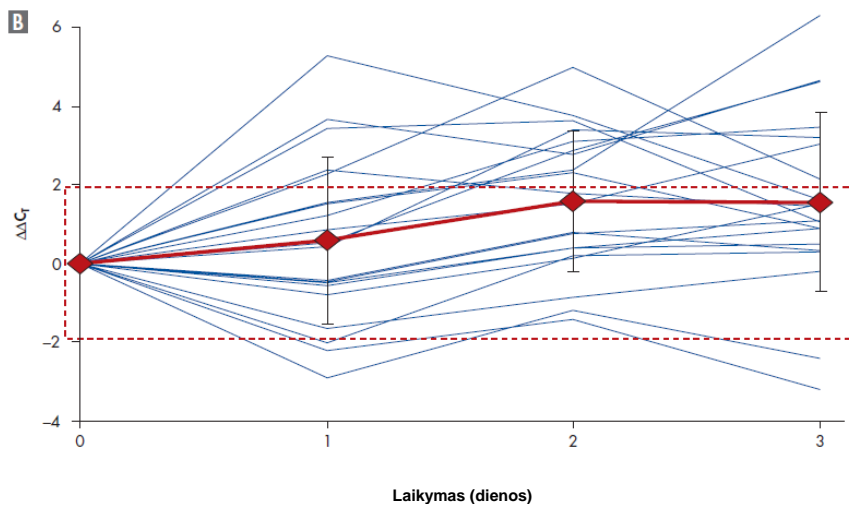
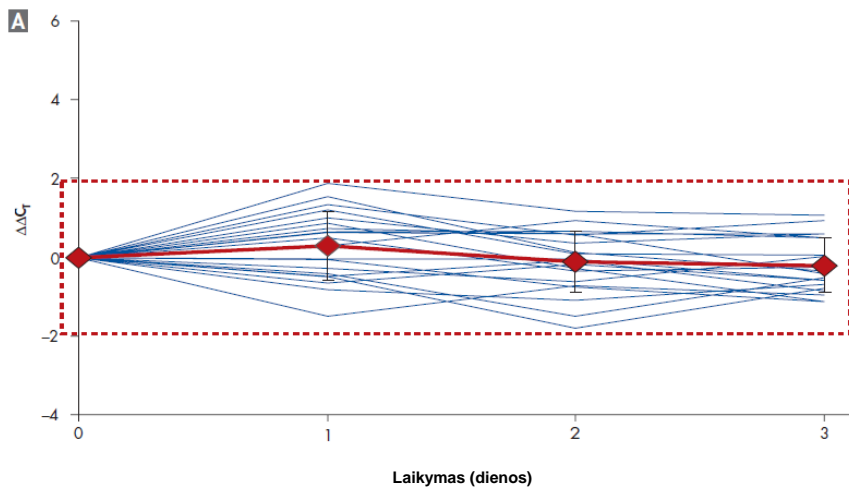
„PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) sudėtyje yra patentuota reagentų kompozicija, pagrįsta patentuota RNR stabilizavimo technologija. Ši reagentų kompozicija apsaugo RNR molekules nuo RNazės skaidymo ir sumažina genų ekspresijos pokyčius *ex vivo*. „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) skirti žmogaus viso kraujo mėginiams paimti ir ląstelių RNR stabilizuoti ne ilgiau nei 3 dienas 18–25 °C (1 ir 2 pav., 16 ir 17 psl.) arba ne ilgiau nei 5 dienas 2–8 °C (3 ir 4 pav., 18 ir 19 psl.). Turimi duomenys rodo ląstelių RNR stabilizavimą mažiausiai 11 metų, esant –20 °C arba –70 °C*. Jei norite gauti daugiau informacijos apie vykdomų stabilumo ilgesniais laikotarpiais vertinimo tyrimus, kreipkitės į QIAGEN techninės pagalbos tarnybą.

Faktinė RNR stabilizavimo trukmė gali skirtis atsižvelgiant į ląstelių RNR rūšis ir vėliau naudojamo metodo. Dėl riboto skaičiaus patvirtintų stabilizavimo specifikacijų transkriptų (FOS ir IL1B genų transkriptai), nebuvo nustatytos visų transkriptų efektyvumo charakteristikos. Naudotojai turėtų peržiūrėti gamintojo duomenis ir savo duomenis, kad nustatytų, ar būtina patvirtinti kitus transkriptus.

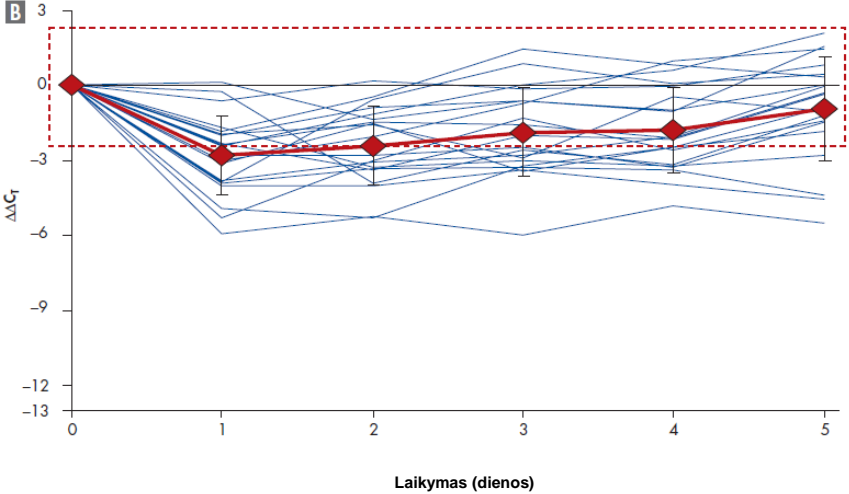
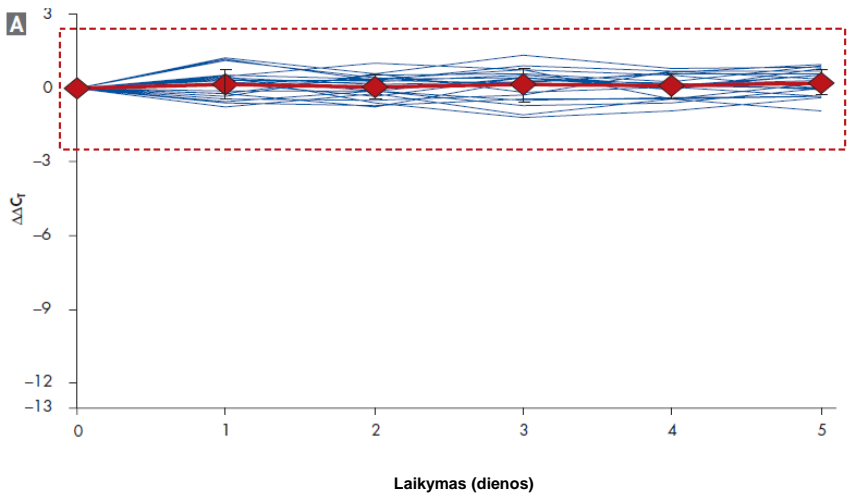
* Šiuo metu vykdomas ilgalaikis kraujo laikymo „PAXgene Blood RNA Tubes“ tyrimas.



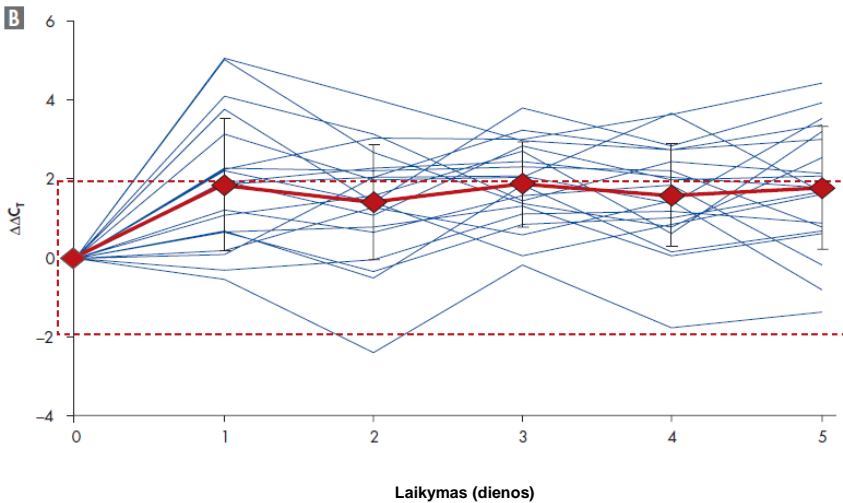
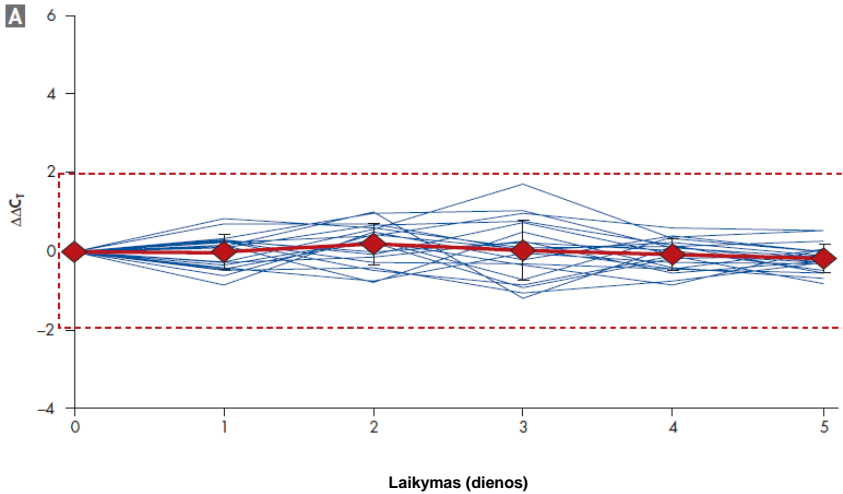
1 pav. RNR stabilumas kraujo mėginiuose, 18–25 °C: FOS. Buvo paimti 10 donorų dubliuoti kraujo mėginiai ir nurodytą dienų skaičių laikomi 18–25 °C, po to buvo atliktas bendrosios RNR išgryninimas. **[A]** Kraujas buvo paimtas ir laikomas „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT), o bendroji RNR išgryninta naudojant „PAXgene Blood RNA Kit“. **[B]** Kraujas buvo paimtas ir laikomas standartiniuose kraujo paėmimo mėgintuvėliuose su antikoaguliantu EDTA, o bendroji RNR buvo išgryninta naudojant standartinį organinės ekstrakcijos metodą, atliekant silicio dioksido membranos pagrindu pagrįstą RNR valymą. Santykiniai FOS transkriptų lygiai buvo nustatyti realiuoju laiku, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Visų mėginių reikšmės perkeltos į diagramą su visų rodomų mėginių vidurkio ir standartinio nuokrypio reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi ± 3 k. bendrą tyrimo tikslumą (2,34 C_T).



2 pav. RNR stabilumas kraujo mėginiuose, 18–25 °C: IL1B. Kraujas buvo paimtas ir bendroji RNR išgryninta po laikymo 18–25 °C, kaip aprašyta 1 pav. Santykiniai IL1B transkripto lygiai buvo nustatyti realiojo laiko, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Visų mėginių reikšmės perkeltos į diagramą su visų rodomų mėginių vidurkio ir standartinio nuokrypio reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi ± 3 k. bendrą tyrimo tikslumą (1,93 C_T).



3 pav. RNR stabilumas kraujo mėginiuose, 2–8°C: FOS. Buvo paimti 10 donorų dubliuoti kraujo mėginiai ir nurodytą dienų skaičių laikomi 2–8°C, po to buvo atliktas bendrosios RNR išgryninimas. **[A]** Kraujas buvo paimtas ir laikomas „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT), o bendroji RNR išgryninta naudojant „PAXgene Blood RNA Kit“. **[B]** Kraujas buvo paimtas ir laikomas standartiniuose kraujo paėmimo mėgintuvėliuose su antikoaguliantu EDTA, o bendroji RNR buvo išgryninta naudojant standartinę organinės ekstrakcijos metodą, atliekant silicio dioksido membranos pagrindu pagrįstą RNR valymą. Santykiniai FOS transkriptų lygiai buvo nustatyti realiuoju laiku, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Visų mėginių reikšmės perkeltos į diagramą su visų rodomų mėginių vidurkio ir standartinio nuokrypio reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi ± 3 k. bendrą tyrimo tikslumą ($2,34 C_T$).



4 pav. RNR stabilumas kraujo mėginiuose, 2–8 °C: IL1B. Kraujas buvo paimtas ir bendroji RNR išgryninta po laikymo 2–8 °C, kaip aprašyta 3 pav. Santykiniai IL1B transkripto lygiai buvo nustatyti realiojo laiko, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Visų mėginių reikšmės perkeltos į diagramą su visų rodomų mėginių vidurkio ir standartinio nuokrypio reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi ± 3 k. bendrą tyrimo tikslumą (1,93 C_T).

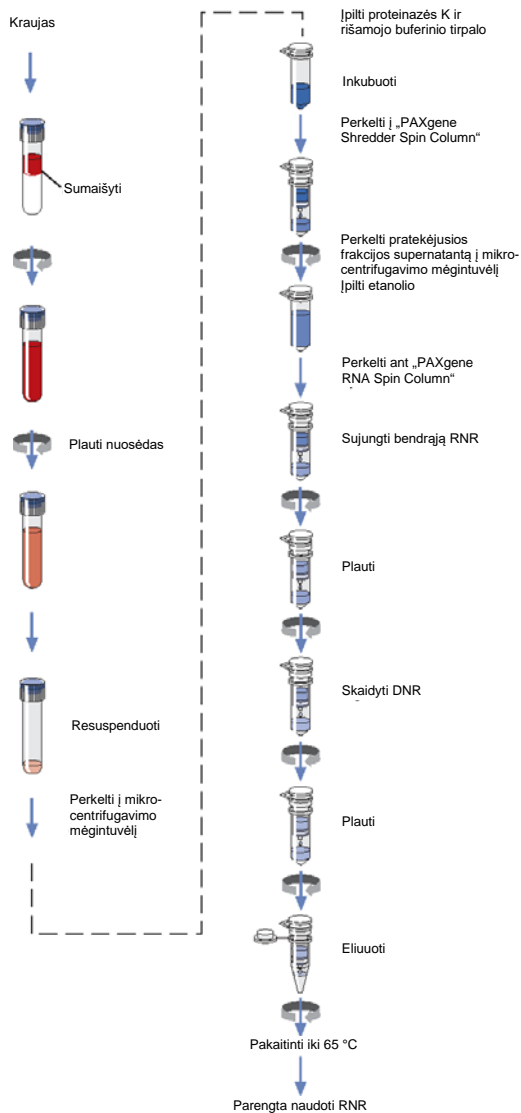
RNR koncentravimas ir gryninimas

„PAXgene Blood RNA Kit“ skirtas bendrajai RNR gryninti iš 2,5 ml žmogaus viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT). Procedūra yra paprasta ir ją galima atlikti rankiniu arba automatinio būdu (žr. 5 ir 10 pav., 21 ir 31 psl.). Abiejuose protokoluose gryninimas pradamas nuo centrifugavimo žingsnio, siekiant granuluoti „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) esančias nukleorūgštis. Nuosėdos išplaunamos ir resuspenduojamos, po to rankiniu arba automatinio būdu gryninama RNR. Iš esmės, į abu protokolus įtraukti tie patys protokolo žingsniai su tais pačiais rinkinio komponentais.

Rankinis RNR gryninimas

Konkrečiai resuspenduotos nuosėdos inkubuojamos optimizuotuose buferiniuose tirpaluose kartu su proteinaze K (PK), siekiant suskaidyti baltymą. Siekiant homogenizuoti ląstelių lizatą ir pašalinti ląstelių atliekas, papildomai centrifuguojama „PAXgene Shredder“ centrifuginėje kolonėlėje (PSC), o pratekėjusios frakcijos supernatantas perkeliamas į šviežią mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį. Siekiant koreguoti surišimo sąlygas, įpilama etanolio, o lizatas perkeliamas į „PAXgene RNA“ centrifuginę kolonėlę (PRC). Po trumpo centrifugavimo RNR selektyviai prisijungia prie „PAXgene“ silicio dioksido membranos, o priemaišos prateka. Likusios priemaišos efektyviai pašalinamos keliais plovimo veiksmis. Tarp pirmojo ir antrojo plovimo veiksmų, norint pašalinti sujungtos DNR pėdsakus, membrana apdorojama DNaze I (RNFD). Atlikus plovimo veiksmus, RNR išplaunama eliuavimo buferiniu tirpalu (BR5) ir denatūruojama karščiu.

Bendroji RNR, atskirta naudojant „PAXgene Blood RNA System“, yra gryna. Naudojant rankinį protokolą, A_{260}/A_{280} reikšmės nuo 1,8 iki 2,2 ir ≤ 1 % (w/w) genominės DNR yra ≥ 95 % visų mėginių, kai matuojama naudojant beta-aktino geno sekos kiekybinę, „real-time PCR“. Mažiausiai 95 % mėginių nebuvo slopinimo AT-PGR, kai buvo naudojama iki 30 % eliuato.

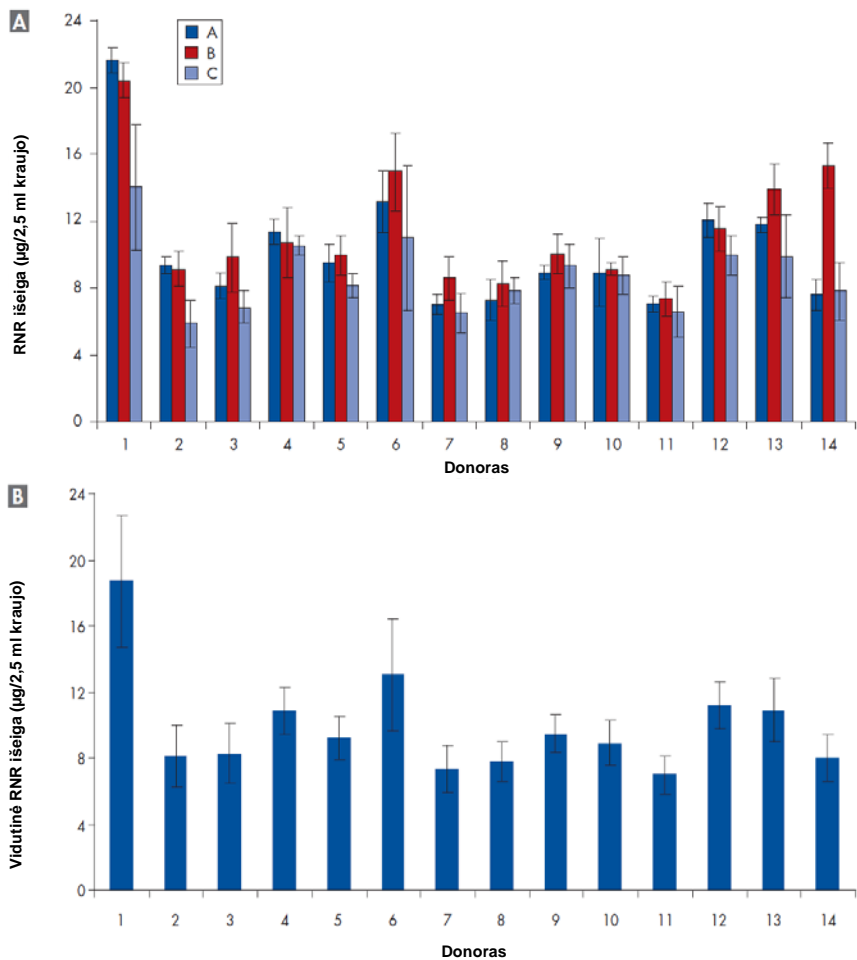


5 pav. Rankinė „PAXgene Blood RNA“ procedūra.

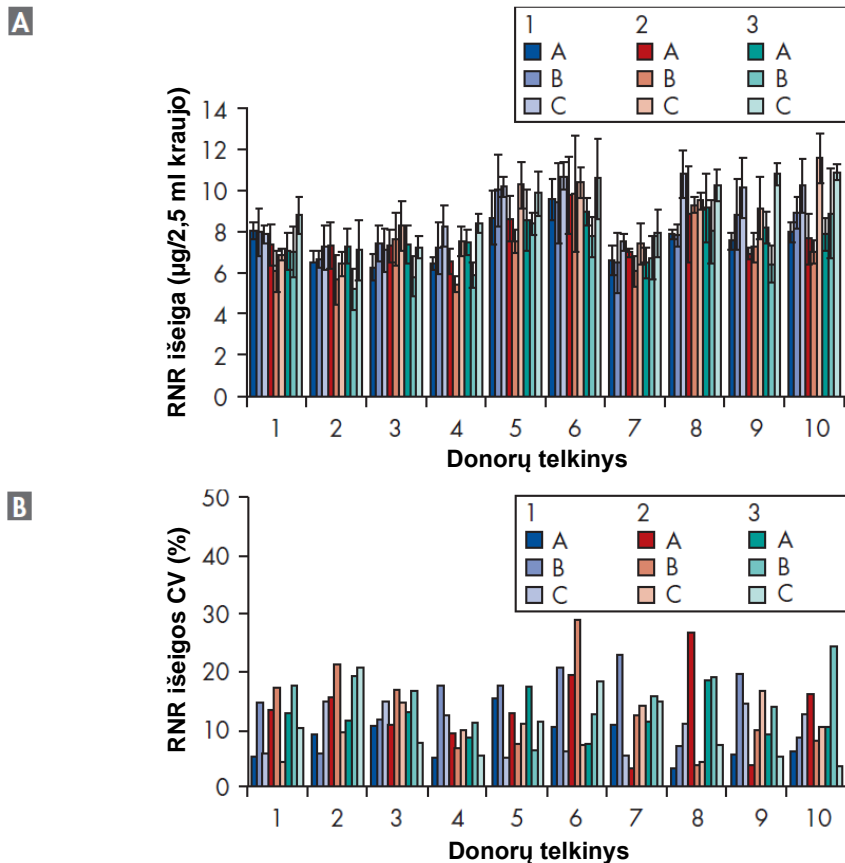
Naudojant rankinį protokolą, vidutinis mėginio paruošimo laikas (remiantis 12 tiriamų mėginio paruošimo duomenimis) yra maždaug 90 minučių*, iš jų tik 40 minučių praktinio darbo. ≥ 95 % apdorotų mėginių RNR išeiga iš 2,5 ml sveiko žmogaus viso kraujo yra ≥ 3 μg . Išeiga labai priklauso nuo donoro, todėl atskiros išeigos gali skirtis. „PAXgene Blood RNA System“ užtikrina didelį atskirų donorų išeigos atkuriamumą ir kartotinumą (6 ir 7 pav., 23 ir 24 psl.) bei AT-PGR atkuriamumą ir kartotinumą (8 ir 9 pav., 28 ir 29 psl.), todėl ji ypač patikima atliekant klinikiškus diagnostinius tyrimus.

6 pav. (23 psl.) parodytas „PAXgene Blood RNA System“ bendras pakartojamumas ir atkuriamumas. Buvo atlikti papildomi tyrimai, norint sužinoti skirtingų „PAXgene Blood RNA Kit“ partijų ir skirtingų operatorių įtaką RNR išeigos atkuriamumui ir realiojo laiko AT-PGR efektyvumui. Atliekant tyrimus buvo naudojami jungtiniai kraujo mėginiai, o ne atskiri „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT), todėl rezultatai atspindi ne sistemos pakartojamumą, įskaitant atskirų kraujo ėmimų svyravimus, o tik viso mėginio paruošimo pakartojamumą (žr. 7 pav., 24 psl.).

* Bendras protokolo vykdymo laikas, įskaitant „PAXgene Blood RNA Tubes“ paruošimą (centrifugavimus, nuosėdų plovimą ir nuosėdų resuspensiją).



6 pav. Atkuriamas ir pakartojamas RNR gryninimas. Keturis kartotinius kraujo mėginius iš 14 donorų rankiniu būdu apdorėjo 3 technikai (A, B, C). Buvo naudojami trys įrangos rinkiniai, o visi mėginiai, kuriuos ruošė vienas technikas, buvo apdoroti naudojant tą pačią įrangą. **[A]** Parodytos kartotinių mėginių iš tų pačių donorų, kuriuos apdorėjo skirtingi technikai, RNR išeigos vidurkio ir standartinio nuokrypio reikšmės. **[B]** Dvylika kartotinių kiekvieno iš 14 donorų mėginių apdorėjo 3 skirtingi technikai. Parodytos mėginių iš tų pačių donorų, kuriuos apdorėjo visi technikai, RNR išeigos vidurkio ir standartinio nuokrypio reikšmės. Visų RNR mėginių A_{260}/A_{280} santykio intervalas yra nuo 1,8 iki 2,2.



7 pav. Skirtingų operatorių ir „PAXgene Blood RNA Kit“ partijų RNR išeigos pakartojamumas ir atkuriamumas, naudojant jungtinius kraujo mėginius. 30 skirtingų donorų kraujo mėginiai buvo paimti į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT; 12 mėgintuvėlių vienam donorui, iš viso 360 mėgintuvėlių). 3 donorų mėgintuvėlių turinys buvo sujungtas ir po to iš naujo padalytas alikvotinėmis dalimis į 36 mėginius. Šiuos 3 donorų telkinio 36 mėginius rankiniu būdu apdoravo 3 skirtingi operatoriai. Kiekvienas operatorius ekstrakcijai naudojo 3 skirtingas „PAXgene Blood RNA Kit“ partijas ir apdoravo kiekvieno iš 10 donorų telkinių keturis kartotinius mėginius. [A] Kiekvieno operatoriaus ir partijos derinio RNR išeiga ir standartinis nuokrypis. Keturis kartotinius kraujo mėginius iš 10 donorų apdoravo 3 skirtingi operatoriai (A, B, C), naudodami kiekvieną iš 3 rinkinių partijų (1, 2, 3). Pateiktos keturių kartotinių mėginių iš to paties donorų telkinio skirtingų operatorių ir skirtingų rinkinių partijų vidutinė išeigos (stulpeliai) ir standartinio nuokrypio (paklaidos brūkšniai) reikšmės. [B] Visų operatorių ir partijų derinių (A, B, C; 1, 2, 3) donorų telkinių RNR išeigos CV, skaičiuojant iš vidutinės išeigos ir standartinio nuokrypio, pavaizduotų 7A pav.

1A lentelė. Kiekvienos partijos ir kiekvieno naudotojo pasirinktų donorų telkinių (1, 6, 9, 10) atkuriamumas

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

1B lentelė. Kiekvieno naudotojo ir visų partijų pasirinktų donorų telkinių (1, 6, 9, 10) atkuriamumas

Duomenų derinys	1 donorų telkinys 5,1 x 10 ⁶ ląstelių/ml			6 donorų telkinys 6,5 x 10 ⁶ ląstelių/ml		
	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)
A naudotojas, visos partijos	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
B naudotojas, visos partijos	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
C naudotojas, visos partijos	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Duomenų derinys	9 donorų telkinys 8,4 x 10 ⁶ ląstelių/ml			10 donorų telkinys 10,2 x 10 ⁶ ląstelių/ml		
	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)
A naudotojas, visos partijos	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
B naudotojas, visos partijos	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
C naudotojas, visos partijos	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

1C lentelė. Kiekvienos partijos ir visų naudotojų pasirinktų donorų telkinių (1, 6, 9, 10) atkuriamumas

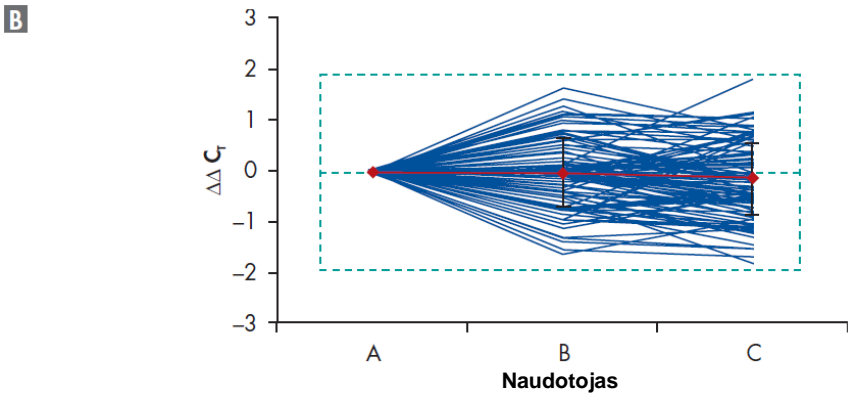
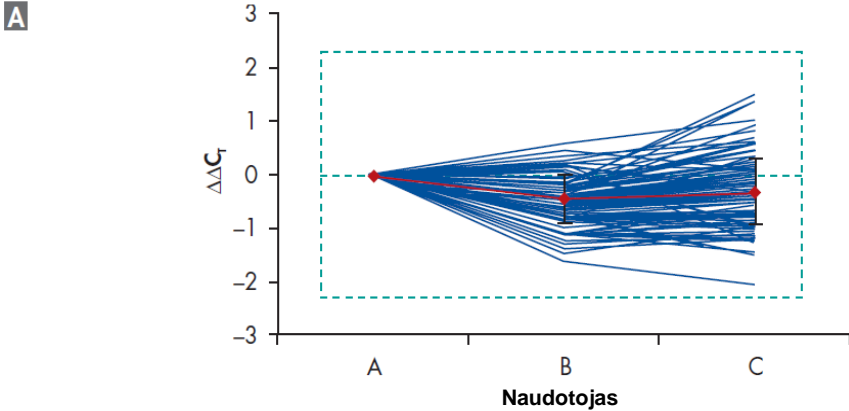
Duomenų derinys	1 donorų telkinys 5,1 x 10 ⁶ ląstelių/ml			6 donorų telkinys 6,5 x 10 ⁶ ląstelių/ml		
	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)
1 partija, visi naudotojai	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
2 partija, visi naudotojai	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
3 partija, visi naudotojai	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Duomenų derinys	9 donorų telkinys 8,4 x 10 ⁶ ląstelių/ml			10 donorų telkinys 10,2 x 10 ⁶ ląstelių/ml		
	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)
1 partija, visi naudotojai	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
2 partija, visi naudotojai	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
3 partija, visi naudotojai	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

1D lentelė. Visų partijų ir visų naudotojų pasirinktų donorų telkinių (1, 6, 9, 10) atkuriamumas

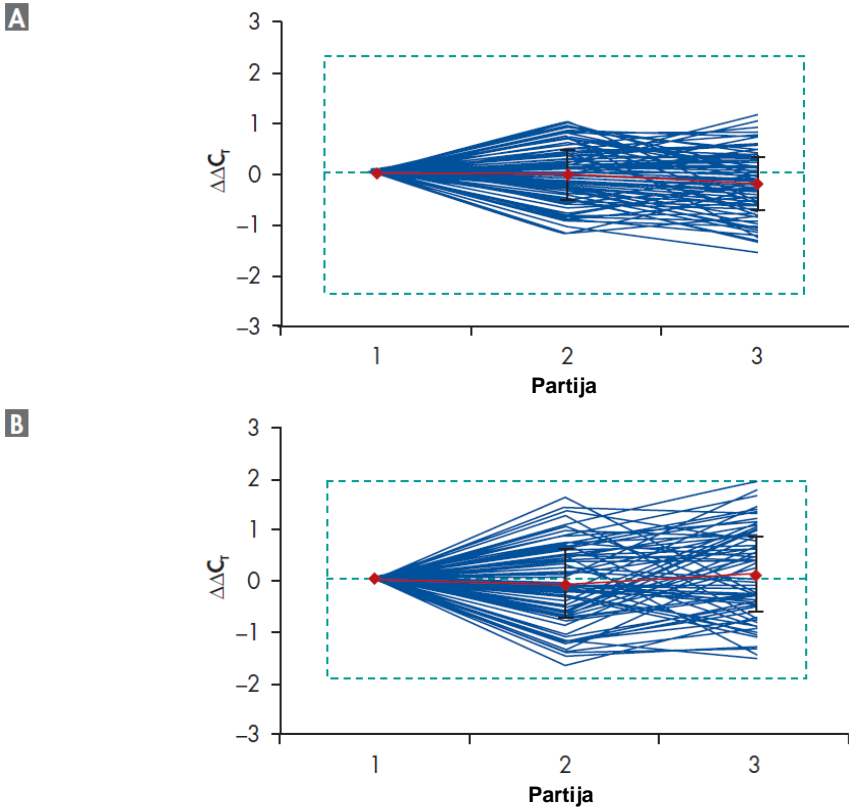
Duomenų derinys	1 donorų telkinys 5,1 x 10 ⁶ ląstelių/ml			6 donorų telkinys 6,5 x 10 ⁶ ląstelių/ml		
	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)
1 partija, visi naudotojai	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

Duomenų derinys	9 donorų telkinys 8,4 x 10 ⁶ ląstelių/ml			10 donorų telkinys 10,2 x 10 ⁶ ląstelių/ml		
	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)
1 partija, visi naudotojai	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Išsami 4 tipinių donorų telkinių analizė. Telkiniai buvo pasirinkti pagal leukocitų skaičių ir atspindi normalaus leukocitų skaičiaus diapazono viršutinę, vidurinę ir apatinę reikšmes ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leukocitų/ml). Leukocitų skaičius rodo 3 donorų iš donorų telkinio 3 leukocitų skaičių vidutinę reikšmę.



8 pav. AT-PGR atkuriamumas tarp skirtingų naudotojų. Atliekant realiojo laiko AT-PGR, buvo naudojama 7 pav. aprašyto eksperimento metu išgryninta RNR. Santykiniai **[A]** FOS ir **[B]** IL1B transkripto lygiai buvo nustatyti realiojo laiko, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Visų mėginių reikšmės perkeltos į diagramą, A naudotojo reikšmių atžvilgiu (10 donorų telkinių x 3 rinkinio partijos x 4 pakartojimai = 120 kiekvieno geno duomenų rinkinių), su visų rodomų mėginių vidurkio (raudonos linijos) ir standartinio nuokrypio (juodos linijos) reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi ± 3 k. bendrą tyrimų tikslumą (FOS: 2,34 Cr; IL1B: 1,93 Cr).



9 pav. AT-PGR atkuriamumas tarp skirtingų rinkinio partijų. Atliekant realiojo laiko AT-PGR, buvo naudojama 7 pav. aprašyto eksperimento metu išgryninta RNR. Santykiniai **[A]** FOS ir **[B]** IL1B transkripto lygiai buvo nustatyti realiojo laiko, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Visų mėginių reikšmės perkeltos į diagramą, 1 rinkinio partijos reikšmių atžvilgiu (10 donorų telkinių x 3 naudotojai x 4 pakartojimai = 120 kiekvieno geno duomenų rinkinių), su visų rodomų mėginių vidurkio (raudonos linijos) ir standartinio nuokrypio (juodos linijos) reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi ± 3 k. bendrą tyrimų tikslumą (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

2 lentelė. AT-PGR duomenų iš 8 ir 9 pav. suvestinė

Tyrimo sistema	FOS/18S rRNR tyrimas		IL1B/18S rRNR tyrimas	
	Vidurkis ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Vidurkis ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Atkuriamumas tarp kiekvieno naudotojo ir visų partijų				
Visi naudotojai, 1 partija–1 partija	0,00	0,00	0,00	0,00
Visi naudotojai, 1 partija–2 partija	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Visi naudotojai, 1 partija–3 partija	-0,21	0,52	0,11	0,71
Atkuriamumas tarp kiekvieno naudotojo ir visų partijų				
Visos partijos, A naudotojas–A naudotojas	0,00	0,00	0,00	0,00
Visos partijos, A naudotojas–B naudotojas	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Visos partijos, A naudotojas–C naudotojas	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Naudotojas: tyrimą atlikęs technikas.

Partija: tyrimo metu naudotos rinkinio partijos numeris.

SD: standartinis nuokrypis.

Rodomos 8 ir 9 pav. pateiktų duomenų vidurkio $\Delta\Delta C_T$ reikšmės (N = 120) ir standartinio nuokrypio reikšmės.

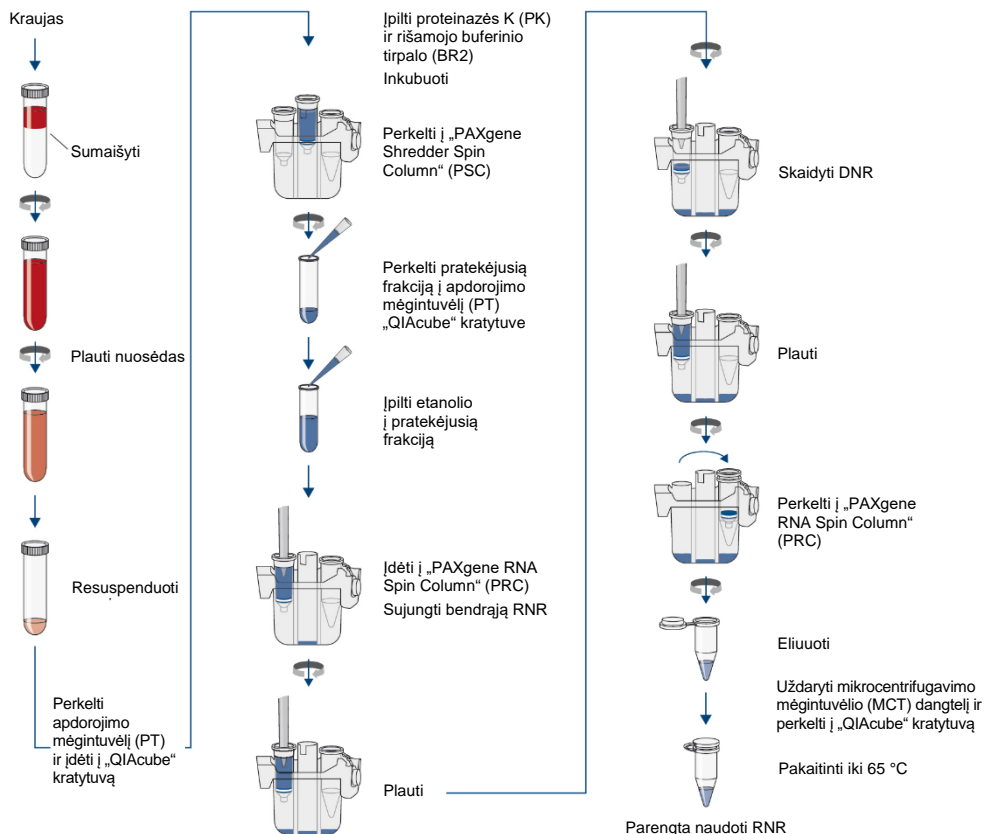
Automatinis RNR gryninimas

RNR gryninimas „QIAGEN QIAcube Connect MDx“ arba klasikiniame „QIAGEN QIAcube“ (toliau vadinamame „QIAcube“) atliekamas automatiškai. Inovatyviuose „QIAcube“ instrumentuose taikoma pažangi QIAGEN centrifuginių kolonėlių apdorojimo technologija, leidžianti į laboratorijos darbo eigą integruoti sklandų automatinį nedidelio našumo mėginių ruošimo procesą. Kai mėginiai ruošiami naudojant „QIAcube“ instrumentus, atliekami veiksmai yra tokie patys kaip ir procedūrą atliekant rankiniu būdu (t. y. lizė, surišimas, plovimas ir eliuavimas), o jūs galite tęsti darbą naudodami „PAXgene Blood RNA Kit“, skirtą aukštos kokybės RNR gryninti.



10 pav. „QIAcube Connect MDx“.

Automatizuotą RNR gryninimo protokolą sudaro 2 dalys (arba protokolai): „PAXgene Blood RNA Part A“ ir „PAXgene Blood RNA Part B“, tarp šių 2 dalių reikalingas trumpas rankinis įsikišimas (žr. 11 pav., 32 psl.).



11 pav. Automatinė „PAXgene Blood RNA“ procedūra.

Centrifuguotos, išplautos ir resuspenduotos nukleorūgšties nuosėdos (žr. „RNR koncentravimas ir gryninimas“ 20 psl.) perkeliama iš „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) į apdoravimo mėgintuvėlius (PT), kurie įdedami į termostatinį kratytuvą ant „QIACube“ darbatalio. Operatorius meniu pasirenka ir paleidžia „PAXgene Blood RNA Part A“ protokolą. „QIACube“ instrumentai atlieka protokolo veiksmus iki RNR eliuavimo naudojant eliuavimo buferinį tirpalą (BR5). Operatorius perkelia mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius

(MCT) su išgryninta RNR į „QIAcube“ instrumentų termostatinį kratytuvą. Operatorius meniu pasirenka ir paleidžia „PAXgene Blood RNA Part B“ protokolą ir „QIAcube“ instrumentuose atliekamas denatūravimas karščiu.

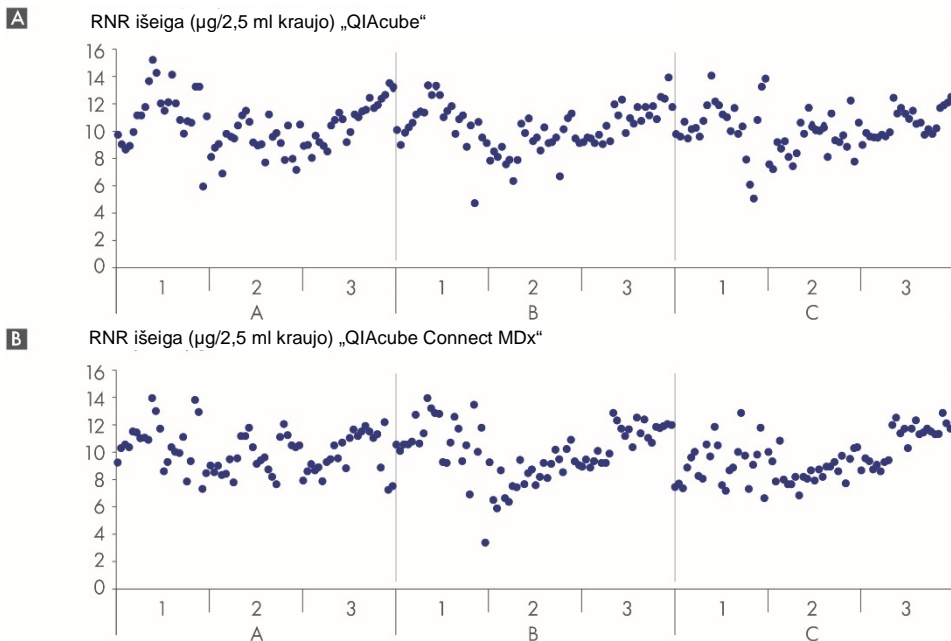
Vidutinė mėginio paruošimo trukmė (remiantis 12 mėginių paruošimo duomenimis) yra 151 minutė*, pastebimai mažiau praktinio darbo, palyginti su rankiniu protokolu.

≥95 % apdorotų mėginių RNR išeiga iš 2,5 ml sveiko žmogaus viso kraujo yra ≥3 μg. 12 pav. (34 psl.) nurodyta RNR išeigos iš viso iš 216 mėginių, kuriuos 3 operatoriai paruošė naudodami 3 rinkinių partijas ir automatizuotą protokolą. Šiuose tyrimuose buvo naudoti jungtiniai kraujo mėginiai, o ne atskiri „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT), todėl rezultatai neatspindi RNR išeigos, lauktos iš atskirų kraujo ėmimų atskirų mėginių. Išeiga labai priklauso nuo donoro, todėl atskiros išeigos gali skirtis (12 pav., 34 psl.).

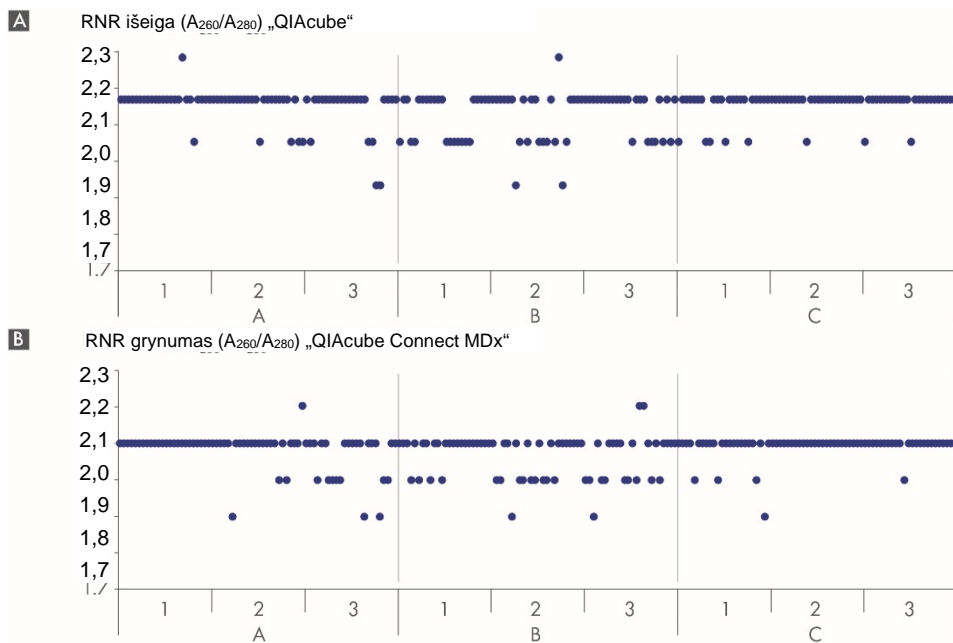
Mažiausiai 95 % mėginių nebuvo slopinimo AT-PGR, kai buvo naudojama iki 30 % eliuato. Naudojant automatizuotą protokolą, kryžminis užteršimas tarp mėginių neaptiktas, kai tame pačiame vykdyme buvo matuojama kiekybine, realiojo laiko AT-PGR ABL1 ir FOS transkriptų sekos RNR neigiamuose mėginiuose (vanduo) suporuotuose su RNR teigiamais mėginiais (žmogaus viso kraujo).

RNR, atskirta naudojant „PAXgene Blood RNA System“ ir automatizuotą protokolą, yra gryna, kaip rodo AT-PGR inhibicijos nebuvimas, o A_{260}/A_{280} reikšmės yra nuo 1,8 iki 2,2. Genominės DNR yra ≤1 % (w/w) ≥95 % visų mėginių, kai matuojama naudojant beta-aktino geno sekos kiekybinę, „real-time PCR“. 13 ir 14 pav. (35 ir 36 psl.) pateiktos iš viso 216 mėginių, kuriuos paruošė 3 operatoriai naudodami automatizuotą protokolą su 3 rinkinių partijomis, A_{260}/A_{280} reikšmės ir santykinė genominė DNR.

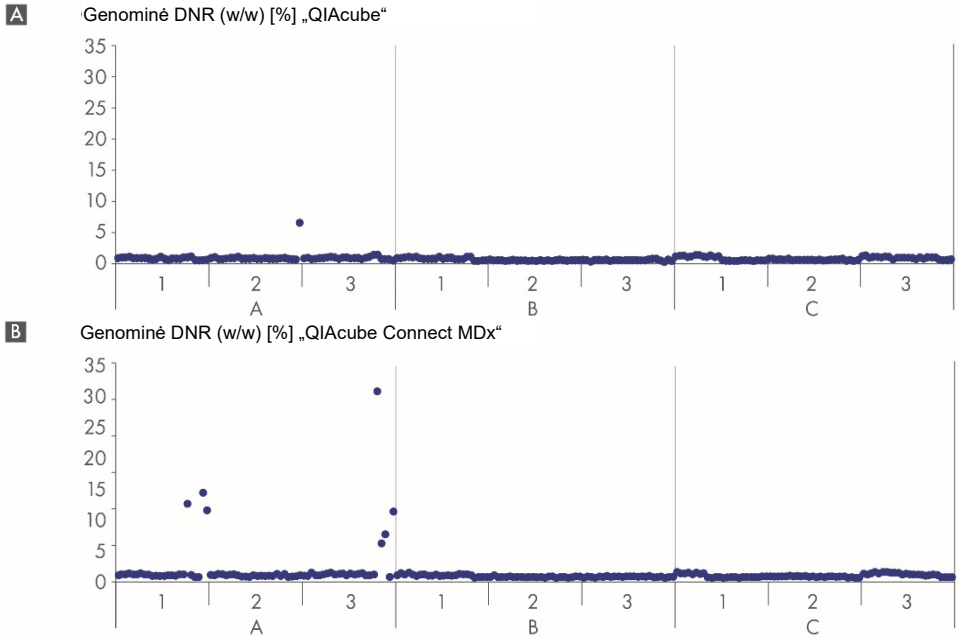
* Bendras protokolo vykdymo laikas, įskaitant „PAXgene Blood RNA Tubes“ paruošimą (centrifugavimus, nuosėdų plovimą ir nuosėdų resusensiją).



12 pav. RNR išeiga – automatizuotas apdorojimas A: „QIACube“, B: „QIACube Connect MDx“. Atskirų donorų kraujo mėginiai buvo surinkti naudojant „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT). Mėgintuvėlių turinys buvo sukauptas į 6 donorų telkinius, o tada suskirstytas į alyvotines dalis. Iš viso 3 skirtingi operatoriai (A, B, C) apdorojo 216 mėgintuvėlius (t. y. po 36 telkinyje). Kiekvienas operatorius automatizuotai ekstrakcijai su įvairiais „QIACube and QIACube Connect MDx“ instrumentais naudojo 3 skirtingas „PAXgene Blood RNA Kit“ partijas (1, 2, 3) ir apdorojo kiekvieno iš 6 donorų telkinių keturis kartotinius mėginius. Visų atskirų mėginių RNR išeiga pateikta kaip kiekvieno operatoriaus ir partijos derinys.

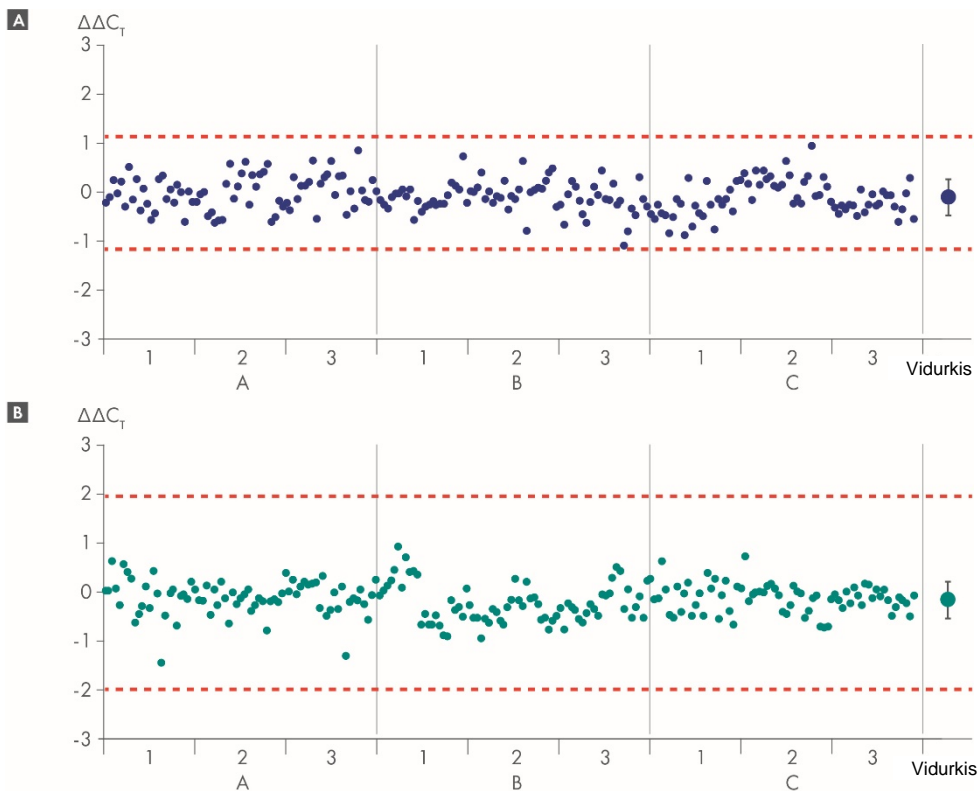


13 pav. RNR grynumas (A_{260}/A_{280} reikšmės) – automatizuotas apdorojimas. A: „QIACube“, B: „QIACube Connect MDx“ RNR išgrynino 3 skirtingi operatoriai (A, B, C), naudodami 3 skirtingas „PAXgene Blood RNA Kit“ partijas (1, 2 ir 3) su įvairiais „QIACube“ ir „QIACube Connect MDx“ instrumentais ir atlikdami eksperimentą, aprašytą 12 pav. Visų atskirų mėginių A_{260}/A_{280} reikšmės pateiktos kaip kiekvieno operatoriaus ir partijos derinys.

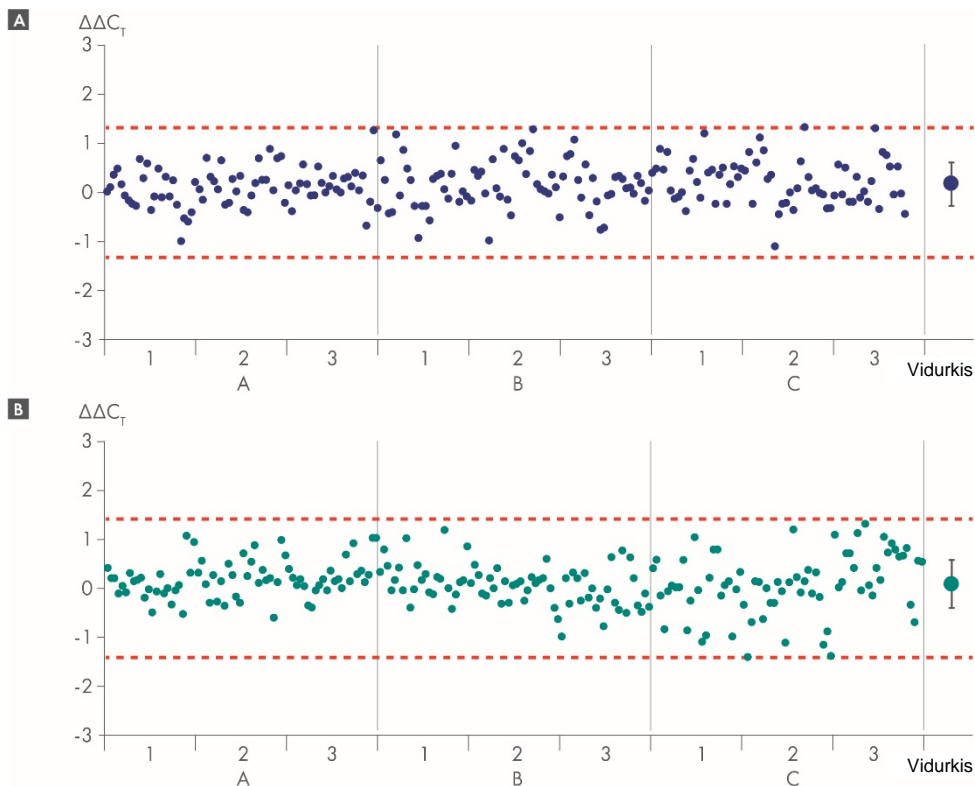


14 pav. RNR grynumas (genominės DNR užterštumo %) – automatizuotas apdorojimas, A: „QIAcube“, B: „QIAcube Connect MDx“. RNR išgrynino 3 skirtingi operatoriai (A, B, C), naudodami 3 skirtingas „PAXgene Blood RNA Kit“ partijas (1, 2, 3) su įvairiais „QIAcube“ ir „QIAcube Connect MDx“ instrumentais ir atlikdami eksperimentą, aprašytą 12 pav. Visų atskirų mėginių genominės DNR kiekiai (w/w) pateikti kaip kiekvieno operatoriaus ir partijos derinys.

Automatizuotas RNR gryninimo protokolas, naudojant „PAXgene Blood RNA System“, užtikrina gerai atkuriamus ir kartotinius AT-PGR rezultatus, kaip pavaizduota 15 pav. Ir 16 pav. (37 ir 38 psl.), todėl yra ypač patikimas atliekant klinikinius diagnostinius tyrimus.



15 pav. AT-PGR atkuriamumas tarp automatizuoto („QIAcube“) ir rankinio protokolų. RNR išgrynino 3 skirtingi operatoriai (A, B, C), naudodami 3 skirtingas „PAXgene Blood RNA Kit“ partijas (1, 2, 3) su įvairiais „QIAcube“ ir „QIAcube Connect MDx“ instrumentais ir naudodami automatizuotą protokolą 12 pav. aprašyto eksperimento metu. Lygiagrečiai, iš atitinkamų pakartojimų mėgintuvėlių, RNR buvo išgryninta naudojant rankinį protokolą. Santykiniai [A] FOS ir [B] IL1B transkripto lygiai buvo nustatyti realiojo laiko, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Galimi transkripto lygių skirtumai tarp RNR paruoštos iš suporuotų kraujo mėginių, naudojant ekstrakcijos protokolus (automatizuotą ir rankinį protokolus), buvo suskaičiuoti $\Delta\Delta C_T$ metodu. Atskiros visų mėginių porų $\Delta\Delta C_T$ reikšmės (4 pakartojimai x 6 donorų telkiniai x 3 rinkinių partijos x 3 operatoriai = 216 kiekvieno geno porų) perkeltos į diagramą kaip atskiri taškai su visų rodomų reikšmių vidurkio (dideli taškai) ir standartinio nuokrypio (juodi brūkšniai) reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi ± 3 k. bendrą tyrimų tikslumą (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; skirtingas tyrimo tikslumas, palyginti su 1–4, 8 ir 9 pav. dėl skirtingų tyrimo versijų).



16 pav. AT-PGR atkuriamumas tarp „QIAcube“ ir „QIAcube Connect MDx“ naudojant automatizuotą protokolą. RNR išgrynino 3 skirtingi operatoriai (A, B, C), naudodami 3 skirtingas „PAXgene Blood RNA Kit“ partijas (1, 2, 3), naudodami automatizuotą protokolą su įvairiais „QIAcube“ ir „QIAcube Connect MDx“ 12 pav. aprašyto eksperimento metu. Santykiniai [A] FOS ir [B] IL1B transkripto lygiai buvo nustatyti realiojo laiko, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Galimi transkripto lygių skirtumai tarp RNR, paruoštos iš suporuotų kraujo mėginių, naudojant abu instrumentus, buvo suskaičiuoti $\Delta\Delta C_T$ metodu. Atskiros visų mėginių porų $\Delta\Delta C_T$ reikšmės (4 pakartojimai x 6 donorų telkiniai x 3 rinkinių partijos x 3 operatoriai = 216 kiekvieno geno porų) perkeltos į diagramą kaip atskiri taškai su visų rodomų reikšmių vidurkio (dideli taškai) ir standartinio nuokrypio (juodi brūkšniai) reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi ± 3 k. bendrą tyrimų tikslumą (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; skirtingas tyrimo tikslumas, palyginti su 1–4, 8, 9 ir 15 pav. dėl skirtingų tyrimo versijų).

Įranga ir reagentai, tiekiami naudotojo

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

Visi protokolai

- „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT, „PreAnalytiX“; kat. nr. 762165)
- Etanolis (96–100 %, p.a. švarumo klasė)
- Pipetės* (10 µl–4 ml)
- Sterilūs pipetės antgaliai, su aerolio barjeru, be RNazės†
- Graduotas cilindras‡
- Centrifuga*, galinti pasiekti 3000–5000 x g, su kintamo kampo rotoriumi ir indeliais, skirtais laikyti „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT)
- Sūkurinis maišytuvas*
- Skaldytas ledas
- Žymėti skirtas ilgalaikis rašiklis

Rankinis protokolas

- Kintamo greičio mikrocentrifuga*, galinti veikti bent 1000–8000 x g intervale, nors naudojama mažesnė ir didesnė g jėga (išsamią informaciją žr. protokolo veiksmuose), su rotoriumi, skirtu 2 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėliams

* Užtikrinkite, kad visi prietaisai ir instrumentai būtų reguliariai tikrinami, prižiūrimi ir kalibruojami pagal gamintojo rekomendacijas.

† Būtinai susipažinkite su RNR tvarkymo rekomendacijomis (A priedas, 74 psl.).

‡ Etanoliumi į BR4 buferinio tirpalo koncentratą įpilti.

- Inkubuojamas kratytuvas*, galintis inkubuoti 55 °C ir 65 °C ir kratantis ≥ 400 aps./min., neviršijant 1400 aps./min. (pvz., „Eppendorf® Thermomixer Compact“ arba atitinkamas)

Automatizuotam protokolui (naudojant „QIAcube“ arba „QIAcube Connect MDx“)

- Žirklys

„QIAcube“ instrumentų eksploataciniai reikmenys:

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

„QIAcube“ instrumentų priedai:

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

Automatizuotam protokolui naudojant „QIAcube Connect MDx“

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

„QIAcube Connect MDx“ priežiūros rinkiniai:

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

* Užtikrinkite, kad visi prietaisai ir instrumentai būtų reguliariai tikrinami, prižiūrimi ir kalibruojami pagal gamintojo rekomendacijas.

† Taip pat pridama prie „Starter Pack, QIAcube“ (QIAGEN, kat. nr. 990395).

Automatizuotam protokolui naudojant „QIAcube“

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

* Užtikrinkite, kad visi prietaisai ir instrumentai būtų reguliariai tikrinami, prižiūrimi ir kalibruojami pagal gamintojo rekomendacijas.

Svarbios pastabos

„QIAcube“ instrumentų naudojimas

Būtinai susipažinkite su „QIAcube“ instrumento naudojimu. Prieš pradėdami automatizuotus „PAXgene Blood RNA“ protokolus, perskaitykite atitinkamą „QIAcube“ instrumento naudotojo vadovą ir visą su „QIAcube“ pateiktą papildomą informaciją, ypatingą dėmesį atkreipdami į saugos informaciją.

Šiame skyriuje pateiktos instrukcijos taikomos tiek „QIAcube Connect MDx“, tiek „QIAcube“, jei nenurodyta kitaip.

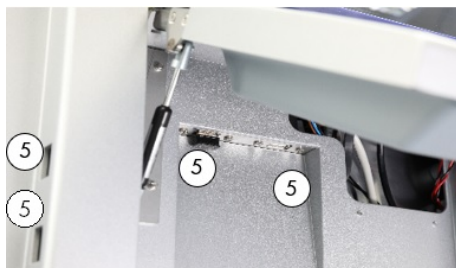
„QIAcube“ instrumentų paleidimas

Uždarykite „QIAcube“ instrumento gaubtą ir įjunkite „QIAcube“ instrumentą maitinimo jungikliu („QIAcube Connect MDx“ – žr. 17 pav., 43 psl.); „QIAcube“: 18 pav., 44 psl.).

Pasigirsta pyptelėjimas ir įsijungia pradžios ekranas. Instrumentas automatiškai atlieka inicijavimo patikras.



„QIAcube Connect MDx“ vaizdas iš priekio



Ištrauktas jutiklinis ekranas



„QIAcube Connect MDx“ vaizdas iš galo



„QIAcube Connect MDx“ vaizdas iš galo

17 pav. „QIAcube Connect MDx“ išorės elementai.

- | | |
|---|---|
| <p>1 Jutiklinis ekranas</p> <p>2 Gaubtas</p> <p>3 Atliekų stalčius</p> <p>4 Maitinimo jungiklis</p> | <p>5 2 USB prievadaai kairiojoje jutiklinio ekrano pusėje; 2 USB prievadaai už jutiklinio ekrano (į 1 USB prievadą įjungtas „Wi-Fi“ modulis)</p> <p>6 RJ-45 eterneto prievadas</p> <p>7 Maitinimo laido lizdas</p> <p>8 Aušinimo oro išėjimas</p> |
|---|---|



18 pav. „QIAcube“ vaizdas iš priekio.

- | | | | |
|---|---|---|--------------------------------------|
| 1 | Jutiklinis ekranas | 4 | USB prievadas už apsauginio skydelio |
| 2 | Gaubtas | 5 | Maitinimo jungiklis |
| 3 | RS232 nuoseklusis prievadas už apsauginio skydelio (skirtas naudoti tik QIAGEN instrumento techninio aptarnavimo specialistams) | 6 | Atliekų stalčius |

Jutiklinis ekranas

„QIAcube“ instrumentai yra valdomi jutikliniu ekranu. Jutiklinis ekranas leidžia naudotojui valdyti instrumentą ir padeda naudotojams paruošti darbo stalą. Apdorojant mėginius, jutikliniame ekrane matoma protokolo būseną ir likęs laikas.



19 pav. Ištrauktas „QIAcube Connect MDx“ jutiklinis ekranas

Protokolų diegimas „QIAcube“ instrumentuose

Norint „QIAcube“ instrumentuose atlikti pirmąjį RNR paruošimą, gali reikėti įdiegti pradinį protokolą. Įdiekite ir „PAXgene Blood RNA Part A“, ir „PAXgene Blood RNA Part B“ protokolus.

„QIAcube Connect MDx“ protokolai pasiekiami www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources (www.qiagen.com/MyQIAcube, jei naudojate „QIAcube“); juos reikia atsisiųsti į USB atmintinę, pateiktą su „QIAcube“ instrumentais. Naudojant USB prievadą šiuos protokolus reikia perkelti į instrumentą.

USB prievadas („QIAcube Connect MDx“ – kairiojoje jutiklinio ekrano pusėje, žr. 17 pav., 43 psl.; „QIAcube – už apsauginio skydelio, žr. 18 pav., 44 psl.) leidžia prijungti „QIAcube“ instrumentus prie USB atmintinės, pateiktos su „QIAcube“ instrumentais. Duomenų failus,

pvz., sistemos žurnalo failus arba ataskaitų failus, taip pat galima perkelti per USB prievadą iš „QIAcube“ instrumentų į USB atmintinę.



USB prievadas skirtas naudoti tik su QIAGEN pateikta USB atmintine. Nejunkite prie šio prievado kitų prietaisų.



Neištraukite USB atmintinės, kai atsisiunčiami protokolai, perkeliama duomenų failai arba vykdomas protokolas.

Daugiau informacijos apie protokolų atsisiuntimą į „QIAcube“ instrumentus ieškokite naudojamo instrumento vadove.

Įkėlimas į „QIAcube“ instrumentą

Taupant laiką, įkelti galima vieno arba abiejų 10 minučių centrifugavimo žingsnių metu (3 ir 5 žingsniai), kaip aprašyta „Protokolas. Automatizuotas bendros RNR gryninimas iš žmogaus viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT)“, 64 psl.

Reagentų buteliukai

Prieš kiekvieną vykdymą naudojant „QIAcube“ instrumentą, kruopščiai užpildykite 4 reagentų butelius 3 lentelėje (47 psl.) išvardytais reagentais iki maksimalaus lygio indikatorius arba, jei tai įmanoma, iki „PAXgene Blood RNA Kit“ pateiktų buferinių tirpalų leistino tūrio lygio. Aiškiai pažymėkite buferinių tirpalų pavadinimus ant butelių ir dangtelių, įdėkite užpildytus reagentų butelius į atitinkamas vietas reagentų butelių stovė. Įstatykite stovą į „QIAcube“ darbatalą, kaip pavaizduota (20–22 pav., 47–49 psl.).



Pateiktu buferinio tirpalo BR2 neužpildysite reagentų buteliuko iki lygio indikatorius. BR3 ir BR4 buferiniais tirpalais galite neužpildyti buteliuko iki lygio indikatorius, po to kai bus apdoroti keli mėginiai ankstesnių vykdymų metu.



Prieš įstatydami į darbastalį, būtinai nuimkite nuo buteliukų dangtelius.



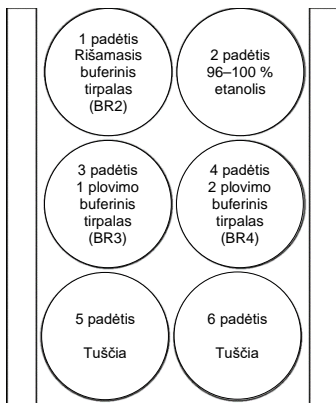
„PAXgene Blood RNA Kit“ (50) pateikiamų buferinių tirpalų tūrio pakanka daugiausiai 7 RNR paruošimo vykdymams „QIACube“ instrumente, kai vykdymo metu apdorojama 2–12 mėginių. Bendrai, norint apdoroti su rinkiniu iš viso 50 mėginių, daugiausia vykdant 7 RNR paruošimus, reikėtų vengti vykdyti mažiau mėginių. Vykiant daugiau nei 7 RNR paruošimus, gali pritrūkti buferinių tirpalų paskutiniams mėginiams apdoroti.

3 lentelė. Padėtys reagentų buteliukų stove

Padėtis	Reagentas
1	Rišamasis buferinis tirpalas (BR2)
2	96-100% etanolis
3	1 plovimo buferinis tirpalas (BR3)
4	2 plovimo buferinis tirpalas (BR4)*
5	– (palikite tuščią)
6	– (palikite tuščią)

* 2 plovimo buferinis tirpalas (BR4) teikiamas kaip koncentratas. Prieš naudodami pirmą kartą, įpilkite 4 dalis etanolio (96–100 %, p.a. švarumo klasės), kaip nurodyta ant buteliuko, kad gautumėte darbinį tirpalą.

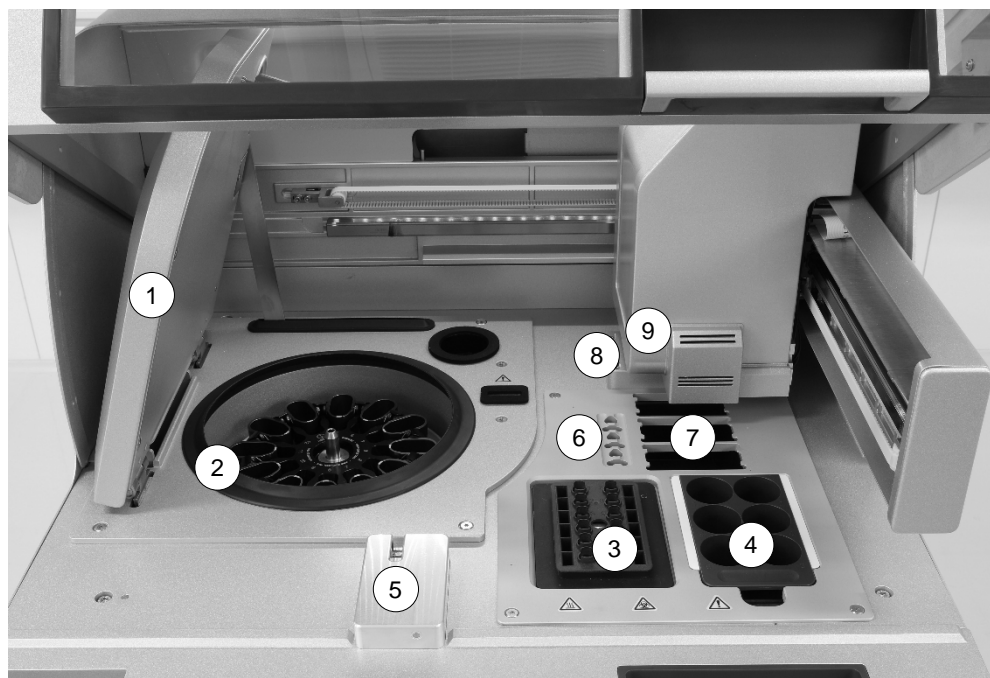
A



B

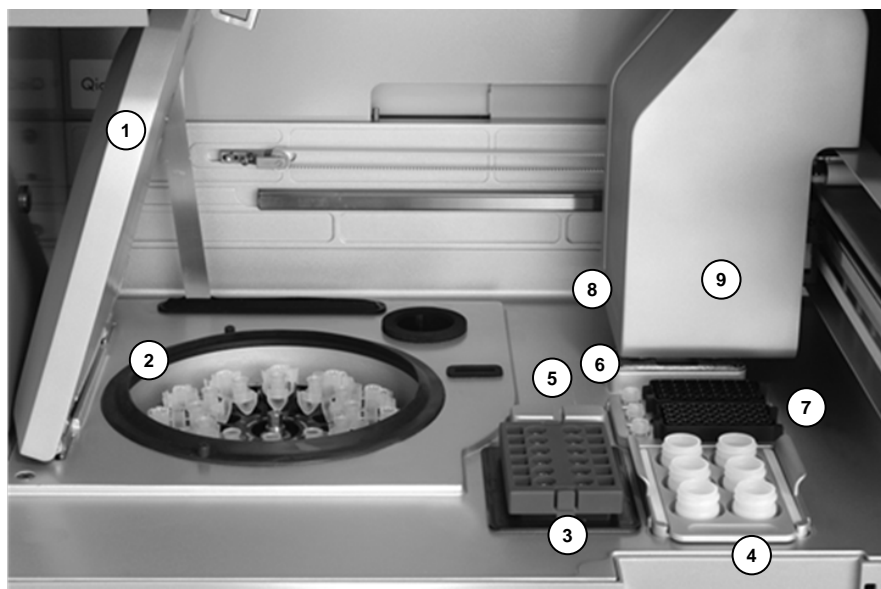


20 pav. Reagentų buteliukų įdėjimas į stovą. [A] Buteliukų padėčių reagentų buteliukų stove ir turinio schema. **[B]** Stovo įdėjimas į „QIACube“ instrumentą (kaip pavyzdys naudojamas „QIACube“).



21 pav. „QIAcube Connect MDx“ vaizdas iš vidaus.

- | | |
|---|---|
| <p>1 Centrifugos dangtelis</p> <p>2 Centrifuga</p> <p>3 Kratytuvas</p> <p>4 Reagentų buteliukų stovas</p> <p>5 Antgalio jutiklis ir gaubto užraktas</p> | <p>6 Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizdai</p> <p>7 3 lizdai antgalių stoveliams</p> <p>8 Antgalių ir stulpelių išmetimo angos</p> <p>9 Robotinė ranka (su 1 kanalo pipete, griebtuvu, ultragarso ir optiniu jutikliu bei UV šviesos diodu)</p> |
|---|---|



22 pav. „QIAcube“ vaizdas viduje.

- | | | | |
|---|---------------------------|---|---|
| 1 | Centrifugos dangtelis | 6 | Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizdai |
| 2 | Centrifuga | 7 | Antgalių stoveliai |
| 3 | Kratytuvas | 8 | Antgalių ir stulpelių išmetimo angos |
| 4 | Reagentų buteliukų stovas | 9 | Roboto ranka |
| 5 | Antgalio jutiklis | | |

Centrifuginės kolonėlės (PRC, PSC), mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai (MCT) ir „QIAcube“ instrumentų plastikinės priemonės

Įdėkite 2 antgalių stovelius, užpildytus filtrų antgaliais (1000 µl), į „QIAcube“ instrumentą (žr. 21 ir 22 pav., 48 ir 49 psl.). Jei reikia, papildykite stovelius.



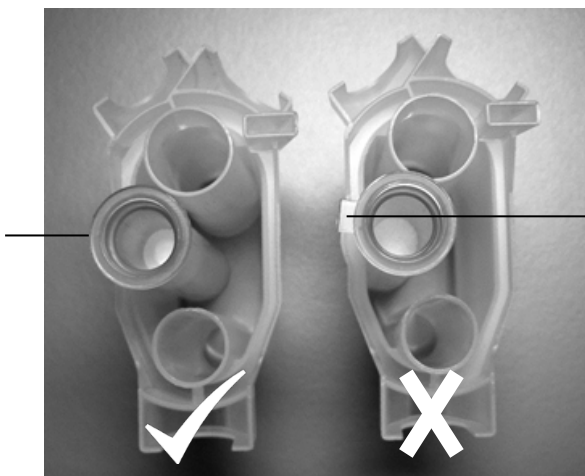
Naudokite tik 1000 µl filtrų antgalius, skirtus naudoti su „QIAcube“ instrumentais.

Pažymėkite kiekvieno mėginio rotoriaus adapterius ir mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius (MCT) ilgalaikiu rašikliu. Atidarykite „PAXgene Shredder“ centrifuginės kolonėlės (PSC), kurias naudosite, ir žirkklėmis visiškai nukirpkite jų dangtelius (žr. 23 pav., 50 psl.).



Kad „QIAcube“ instrumentų robotizuotas griebtuvas tinkamai veiktų, visiškai nuimkite (nupjaukite) dangtelius ir visas plastikinės dalis, jungiančias dangtelį su „PAXgene Shredder“ centrifuginėmis kolonėlėmis (PSC; žr. 23 pav.). Kitu atveju robotizuotas griebtuvas gali tinkamai nepagriebti centrifuginių kolonėlių (PSC, PRC).

Tinkamai
nuimtas
kolonėlės
dangtelis



Netinkamai
nuimtas
kolonėlės
dangtelis;
nepašalinta
dalis dangtelio

23 pav. „PAXgene Shredder“ centrifuginės kolonėlės (PSC) įdėjimas. „PAXgene Shredder“ centrifuginė kolonėlė (PSC) dedama į vidurinę rotoriaus adapterio vietą. Prieš dėdami kolonėlę, dangtelį nukirpkite.

Įdėkite „PAXgene RNA“ centrifuginę kolonėlę (PRC), „PAXgene Shredder“ centrifuginę kolonėlę (PSC, be dangtelio, žr. 23 pav., 50 psl.) ir pažymėtą mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį į atitinkamas vietas kiekvieno pažymėto rotoriaus adapteryje, kaip pavaizduota 4 lentelėje ir 24 pav.

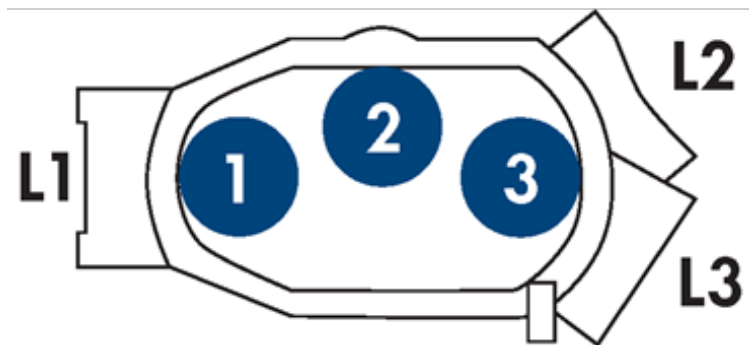


Įsitikinkite, kad centrifuginės kolonėlės (PRC) ir mikrocentrifugavimo mėgintuvėlio (MCT) dangteliai yra rotoriaus adapterio krašte visiškai įstumti į lizdų dugną, priešingu atveju centrifuguojant dangteliai sulūš.

4 lentelė. Laboratorinės priemonės rotoriaus adapteryje

Padėtis	Reagentas	Dangtelio padėtis
1	„PAXgene RNA“ centrifuginė kolonėlė (raudona, PRC)	L1
2	„PAXgene Shredder“ centrifuginė kolonėlė (alyvų spalvos, PSC) (prieš įdėdami į rotoriaus adapterį, dangtelį nukirpkite)	–
3	Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlis (MCT)*	L3

* Naudokite „PAXgene Blood RNA Kit“ pateiktus mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius (MCT; 1,5 ml).



24 pav. Vietos rotoriaus adapteryje. Rotoriaus adapteryje yra trys mėgintuvėlių vietos (1–3) ir trys dangtelių vietos (L1–L3).

Centrifugos užpildymas

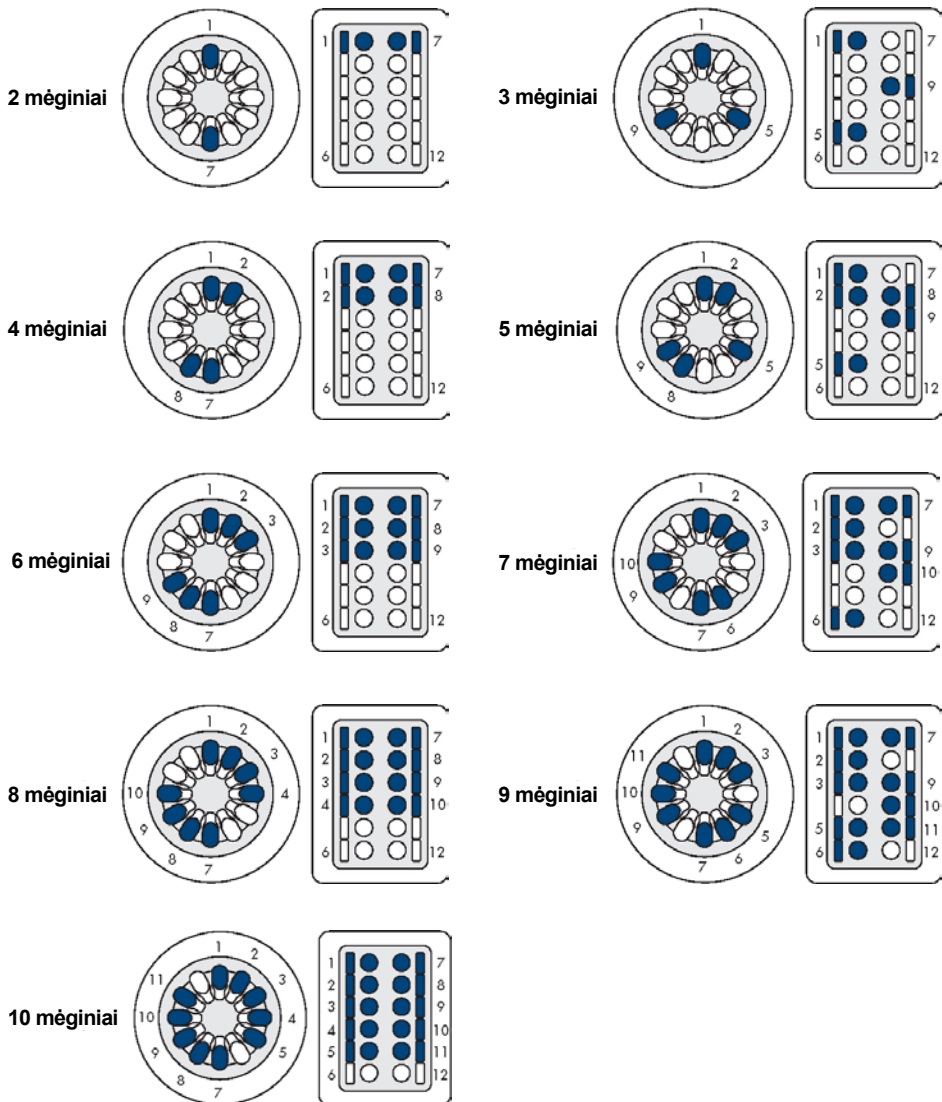
Įstatykite surinktus rotorius adapterius į centrifugavimo indelius, kaip pavaizduota 25 pav. toliau.



Jei apdorojama mažiau nei 12 mėginių, būtina užpildykite centrifugos rotorių išlaikydami spindulinę simetriją (žr. 26 pav., 53 psl.). Visus centrifugavimo indelius reikia pritvirtinti prieš pradėdant vykdyti protokolą, net jei bus apdorojama mažiau nei 12 mėginių. Negalima apdoroti atskiro (vieno) mėginio arba 11 mėginių.



25 pav. Centrifugos įdėjimas į „QIAcube“ instrumentus. Įstatykite surinktus rotorius adapterius į centrifugavimo indelius (kaip pavyzdys vaizduojamas „QIAcube Connect MDx“).



26 pav. Centrifugos ir kratytuvo užpildymas. Vietos centrifugoje ir kratytuve pavaizduotos apdorojant nuo dviejų (2) iki dešimties (10) mėginių. Negalima apdoroti vieno (1) mėginio arba 11 mėginių. Apdorojant 12 mėginių, būna užpildytos visos centrifugos ir kratytuvo vietos (nepavaizduota).

Apdoravimo mėgintuvėliai (PT)

Išimkite po ankstesnių vykdymų mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizduose likusius apdoravimo mėgintuvėlius (PT) („QIAcube Connect MDx“ – žr. 21 pav., 48 psl., „QIAcube“ – žr. 22 pav., 49 psl.). Užpildykite 3 apdoravimo mėgintuvėlius (PT) 5 lentelėje nurodytais reagentų kiekiais atsižvelgdami į vykdymų mėginių skaičių.

Norėdami paruošti DNazės I inkubavimo mišinį, perkelkite su pipete nurodytą tūrį DNR skaidymo buferinio tirpalo (RDD) į apdoravimo mėgintuvėlį (PT) ir įpilkite nurodytą tūrį DNazės I (RNFD) bazinio tirpalo. Švelniai išmaišykite visą mišinį pipete 3 kartus ištraukdami ir išleisdami, naudodami 1000 µl pipetės antgalį.

Naudokite „PAXgene Blood RNA Kit“ pateiktus 2 ml apdoravimo mėgintuvėlius (PT). Aiškiai pažymėkite reagentų pavadinimus ant mėgintuvėlių ir įdėkite juos į atitinkamą vietą mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizduose, kaip nurodyta 6 lentelėje (55 psl.).



DNazė I (RNFD) ypač jautri fizinei denatūracijai. Maišykite tik pipete, naudodami pipečių antgalius plačiomis angomis, kad sumažintumėte fizinį poveikį. Nemaišykite sūkuriniu maišytuvu.



Perkelkite pipete tik reikiamą kiekį, nurodytą toliau esančioje 5 lentelėje.

5 lentelė. Reagentų tūriai, reikalingai apdorėjimo mėgintuvėliuose mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizduose.

Mėginių skaičius	Reagento tūris nurodytam mėginių skaičiui (μl)		
	Proteinazė K (PK)	DNazės I inkubavimo mišinys	Eliavimo buferinis tirpalas (BR5)
2	126	187 (23 DNazės I + 164 „Buffer RDD“)	313
3	170	261 (33 DNazės I + 228 „Buffer RDD“)	399
4	213	334 (42 DNazės I + 292 „Buffer RDD“)	486
5	256	407 (51 DNazės I + 356 „Buffer RDD“)	572
6	299	481 (60 DNazės I + 421 „Buffer RDD“)	658
7	342	554 (69 DNazės I + 485 „Buffer RDD“)	745
8	386	627 (78 DNazės I + 549 „Buffer RDD“)	831
9	429	701 (88 DNazės I + 613 „Buffer RDD“)	918
10	472	775 (97 DNazės I + 678 „Buffer RDD“)	1004
12	558	921 (115 DNazės I + 806 „Buffer RDD“)	1177

6 lentelė. Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizdai

	Padėtis		
	A	B	C
Turinys	Proteinazė K	DNazės I inkubavimo mišinys	Eliavimo buferinis tirpalas (BR5)
Indas	Apdoravimo mėgintuvėlis (PT)*	Apdoravimo mėgintuvėlis (PT)*	Apdoravimo mėgintuvėlis (PT)*

* Naudokite „PAXgene Blood RNA Kit“ pateiktus 2 ml apdoravimo mėgintuvėlius.

Protokolas. Rankinis bendros RNR gryninimas iš žmogaus viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT)

Svarbi informacija prieš pradėdant

- Įsitikinkite, kad rinkinio dėžutė nepaliesta ir nepažeista, o buferiniai tirpalai nepratekėję. Nenaudokite pažeisto rinkinio.
- Naudodami pipetę, įsitikinkite, kad nustatytas tinkamas tūris ir kruopščiai ir visiškai įtraukiamas ir išpilamas visas skystis.
- Norėdami išvengti mėginio perkėlimo ne į reikiamą mėgintuvėlį arba centrifuginę kolonėlę, būtinai tinkamai pažymėkite visus mėgintuvėlius ir centrifugines kolonėles ilgalaikiu rašikliu. Pažymėkite kiekvieno mėgintuvėlio dangtelį ir korpusą (PT, MCT). Pažymėkite apdoravimo mėgintuvėlio (PT) korpusą, jei tai centrifuginė kolonėlė. Perkėlę skystį į mėgintuvėlį arba centrifuginę kolonėlę, uždarykite jį.
- Dėl procedūros metu išsiliejusio mėginio ir buferinių tirpalų gali sumažėti RNR išeiga ir grynumas.
- Jei nenurodyta kitaip, visus šio protokolo žingsnius, įskaitant centrifugavimo žingsnius, reikia atlikti kambario temperatūroje (15–25 °C).

Dėl nukleorūgščių amplifikavimo technologijų jautrumo, siekiant išvengti kryžminės taršos, tvarkant mėginius reikia taikyti šias atsargumo priemones:

- Atsargiai pipete perkelkite mėginį į centrifuginę kolonėlę (PRC, PSC) nešlapindami kolonėlės krašto.
- Perkeldami skirtingus skysčius, visuomet keiskite pipetės antgalius. Naudokite pipetės antgalius su aerozolio barjeru.

- Stenkitės neliesti centrifuginės kolonėlės (PRC, PSC) membranos pipetės antgaliu.
- Išmaišę sūkuriniu maišytuvu arba pakaitinę mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT), trumpai centrifuguokite jį, kad pašalintumėte lašelius nuo vidinio dangtelio paviršiaus.
- Visos procedūros metu mūvėkite pirštines. Mėginio kontakto su pirštinėmis atveju, nedelsdami pasikeiskite pirštines.
- Prieš dėdami centrifuginę kolonėlę (PRC, PSC) į mikrocentrifugą, uždenkite ją. Centrifuga aprašyta procedūroje.
- Vienu metu atidarykite tik vieną centrifuginę kolonėlę (PRC, PSC) ir stenkitės, kad nesusidarytų aerosoliai.
- Jei norite efektyviai vienu metu apdoroti kelis mėginius, užpildykite stovą apdoravimo mėgintuvėliais (PT), į kuriuos po centrifugavimo bus galima perkelti centrifugines kolonėles (PRC, PSC). Išmeskite panaudotus apdoravimo mėgintuvėlius (PT) su pratekėjusia frakcija ir įdėkite naujus apdoravimo mėgintuvėlius (PT) su centrifuginėmis kolonėlėmis (PRC, PSC) tiesiai į mikrocentrifugą.

Ką atlikti prieš pradėdami

- Kraują reikia paimti į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT), laikantis „PAXgene Blood RNA Tube“ vadove pateiktų instrukcijų. Jei reikia, žr. „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) tvarkymo rekomendacijas žr. C priede (77 psl.).
- Užtikrinkite, kad paėmus kraują „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) būtų inkubuojami bent 2 valandas kambario temperatūroje, siekiant užtikrinti visišką kraujo ląstelių lizę. „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) inkubavimas per naktį gali padidinti išeią. Jeigu paėmus kraują „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) buvo laikomas 2–8 °C, –20 °C arba –70 °C, pirmiausia leiskite pasiekti kambario temperatūrą, o tada prieš pradėdami procedūrą palaikykite kambario temperatūroje 2 valandas.
- Perskaitykite saugos informaciją 10 psl.
- Perskaitykite RNR tvarkymo rekomendacijas (A priedas, 74 psl.).
- Užtikrinkite, kad visi instrumentai, pvz., pipetės ir inkubuojantis kratytuvas, būtų reguliariai tikrinami ir kalibruojami pagal gamintojo rekomendacijas.

- Inkubuojantis kratytuvas reikalingas 5 ir 20 žingsniuose. Nustatykite inkubuojančio kratytuvo temperatūrą 55 °C.
- Rišamajame buferiniame tirpale (BR2) laikant gali susidaryti nuosėdos. Jei reikia, pašildykite iki 37 °C, kad ištirtų.
- 2 plovimo buferinis tirpalas (BR4) teikiamas kaip koncentratas. Prieš naudodami pirmą kartą, įpilkite 4 dalis etanolio (96–100 %, p.a. švarumo klasės), kaip nurodyta ant buteliuko, kad gautumėte darbinį tirpalą.
- Jei naudojate „RNase-Free DNase Set“ pirmą kartą, paruoškite DNazės I bazinį tirpalą. Ištirpinkite gryną DNazę I (RNFD; 1500 Kunitz vienetų)* rinkinyje pateiktame 550 µl DNazės resuspensijos buferiniame tirpale (DRB). Elkitės atsargiai, kad nė kiek neprarastumėte DNazės I (RNFD) atidarydami indelį. Nemaišykite atkurtos DNazės I (RNFD) sūkuriniu maišytuvu. DNazė I ypač jautri fizinei denatūracijai. Maišyti reikia tik švelniai apverčiant buteliuką.
- Turimi duomenys rodo, kad atkurtą DNazę I (RNFD) galima laikyti 2–8 °C 6 savaites. Jei DNazę I (RNFD) norite laikyti ilgiau, ištraukite bazinį tirpalą iš stiklinio indelio, padalykite jį per vieną kartą sunaudojamas alikvotines dalis (naudokite rinkinyje pateiktus 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius [MCT]; jų užtenka 5 alikvotinėms dalims) ir laikykite –20 °C ne ilgiau nei 9 mėnesius. Atitirpintas alikvotines dalis galima laikyti 2–8 °C ne ilgiau nei 6 savaites. Atitirpinę, alikvotinių dalių neužšaldykite pakartotinai.
- Atkurdami ir dalydami DNazę I (RNFD) į alikvotines dalis, laikykitės RNR tvarkymo rekomendacijų (A priedas, 74 psl.).

* Kunitz vienetai – dažniausiai naudojami vienetai matuojant I DNazę, apibrėžiami kaip DNazės I kiekis, dėl kurio A_{260} padidėja 0,001 per minutę mililitre, esant 25 °C, pH 5,0, kaip substratą naudojant stipriai polimerizuotą DNR (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ir 363).

Procedūra

1. Centrifuguokite „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) 10 minučių 3000–5000 x g, naudodami kintamojo kampo rotorį.



Siekiant užtikrinti visą kraujo ląstelių lizę, inkubuokite kraujo mėginį „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) mažiausiai 2 valandas kambario temperatūroje (15–25 °C).



Rotoriuje turi būti apvaliadugnių mėgintuvėlių adapteriai. Naudojant kito tipo mėgintuvėlių adapterius, centrifuguojant mėgintuvėliai gali sudūžti.

2. Pašalinkite supernatantą nupildami arba pipete. Įpilkite į mėgintuvėlį su nuosėdomis 4 ml vandens be RNazės (RNFV) ir mėgintuvėlį uždarykite šviežiu antriniu „BD Hemogard“ dangteliu (pateikiamu rinkinyje).

Jeigu supernatantą nupilate, elkitės atsargiai, kad nesudrumstumėte nuosėdų, ir nusauskite mėgintuvėlio kraštą švari popieriniu rankšluosčiu.

3. Maišykite sūkuriniu maišytuvu, kol nuosėdos aiškiai ištirps, ir centrifuguokite 10 minučių 3000–5000 x g, naudodami kintamojo kampo rotorį. Pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą.

Smulkios atliekos likusios supernatante išmaišius jį sūkuriniu maišytuvu, bet prieš centrifuguojant, neturės įtakos procedūrai.



Pašalinus ne visą supernatantą, bus slopinama lizė ir praskiestas lizatas, dėl to pasikeis RNR surišimo su „PAXgene“ membrana sąlygos.

4. Įpilkite 350 µl resuspensijos buferinio tirpalo (BR1) ir maišykite sūkuriniu maišytuvu, kol nuosėdos aiškiai ištirps.
5. Pipete perkelti mėginį į 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT). Įpilkite 300 µl rišamojo buferinio tirpalo (BR2) ir 40 µl proteinizės K (PK). Pamašykite sūkuriniu maišytuvu 5 sekundes ir inkubuokite 10 minučių 55 °C, naudodami inkubuojantį kratytuvą 400–1400 aps./min. Baigę inkubuoti, nustatykite inkubuojančio kratytuvo temperatūrą 65 °C (20 žingsnis).



Nemaišykite rišamojo buferinio tirpalo (BR2) ir proteinazės K (PK) prieš įpildami į mėginį.

6. Pipete perkelkite lizatą tiesiai į „PAXgene Shredder“ centrifuginę kolonėlę (PSC; alyvų spalvos), įdėtą į 2 ml apdoravimo mėgintuvėlį (PT), ir centrifuguokite 3 minutes didžiausiu greičiu (bet neviršykite 20 000 x g).



Atsargiai perkelkite pipete lizatą į centrifuginę kolonėlę (PSC) ir pažiūrėkite, ar lizatas visiškai perkeltas į centrifuginę kolonėlę (PSC).

Neviršykite 20 000 x g, kad nepažeistumėte kolonelių (PSC) ir mėgintuvėlių (PT).



Kai kurie mėginiai gali pratekėti per „PAXgene Shredder“ centrifuginę kolonėlę (PSC) nacentrifuguojant. Taip gali būti dėl mažo kai kurių mėginių klampumo ir tai nėra netinkamo produkto indikacija.

7. Atsargiai perkelkite visą pratekėjusios frakcijos supernatantą į 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT), nesudrumsdami nuosėdų apdoravimo mėgintuvėlyje.
8. Įpilkite 350 µl etanolio (96–100 %, p. a. švarumo klasė). Sumaišykite sūkuriniu maišytuvu ir trumpai centrifuguokite (1–2 sekundes 500–1000 x g), kad pašalintumėte lašelius nuo vidinio dangtelio paviršiaus.



Nereikėtų centrifuguoti ilgiau nei 1–2 sekundes, nes gali pradėti granuluotis nukleorūgštys ir bendrosios RNR išėiga bus mažesnė.

9. Pipete perkelkite 700 µl mėginio į „PAXgene RNA“ centrifuginę kolonėlę (PRC; raudonas), įdėtą į 2 ml apdoravimo mėgintuvėlį (PT), ir centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g. Įdėkite centrifuginę kolonėlę (PRC) į naują 2 ml apdoravimo mėgintuvėlį (PT) ir išmeskite seną apdoravimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija.
10. Pipete perkelkite likusį mėginį į „PAXgene RNA“ centrifuginę kolonėlę (PRC) ir centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g. Įdėkite centrifuginę kolonėlę (PRC) į naują 2 ml apdoravimo mėgintuvėlį (PT) ir išmeskite seną apdoravimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija.



Atsargiai pipete perkelkite mėginį į centrifuginę kolonėlę (PRC) ir pažiūrėkite, ar mėginys visiškai perkeltas į centrifuginę kolonėlę (PRC).

11. Pipete perkeltkite 350 µl 1 plovimo buferinio tirpalo (BR3) į „PAXgene RNA“ centrifuginę kolonėlę (PRC). Centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g. Įdėkite centrifuginę kolonėlę (PRC) į naują 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT) ir išmeskite seną apdorojimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija.

12. Įpilkite 10 µl DNazės I (RNFD) bazinio tirpalo į 70 µl DNR skaidymo buferinį tirpalą (RDD) 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje (MCT). Išmaišykite švelniai plekšnodami mėgintuvėlį ir trumpai centrifuguokite, kad surinktumėte likusį skystį nuo mėgintuvėlio sienelių.

Pavyzdžiui, jei apdorojate 10 mėginių, įpilkite 100 µl DNazės I (RNFD) bazinio tirpalo į 700 µl DNR skaidymo buferinį tirpalą (RDD). Naudokite rinkinyje pateiktus 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius (MCT).



DNazė I ypač jautri fizinei denatūracijai. Maišyti reikia tik švelniai tapšnojančiomis mėgintuvėlių. Nemašykite sukuriniu maišytuvu.

13. Pipete perkeltkite DNazės I (RNFD) inkubavimo mišinį (80 µl) tiesiai ant „PAXgene RNA“ centrifuginės kolonėlės (PRC) membranos ir padėkite ant darbaltalio (20–30°C) 15 minučių.



Įsitikinkite, kad DNazės I (RNFD) inkubavimo mišinys perkeltas tiesiai ant membranos. Bus suskaidyta ne visa DNazė, jei dalis mišinio bus perkelta ir liks ant centrifuginės kolonėlės (PRC) sienelių arba žiedinio tarpiklio.

14. Pipete perkeltkite 350 µl 1 plovimo buferinio tirpalo (BR3) į „PAXgene RNA“ centrifuginę kolonėlę (PRC) ir centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g. Įdėkite centrifuginę kolonėlę (PRC) į naują 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT) ir išmeskite seną apdorojimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija.

15. Pipete perkeltkite 500 µl 2 plovimo buferinio tirpalo (BR4) į „PAXgene RNA“ centrifuginę kolonėlę (PRC) ir centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g. Įdėkite centrifuginę kolonėlę (PRC) į naują 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT) ir išmeskite seną apdorojimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija.



2 plovimo buferinis tirpalas (BR4) teikiamas kaip koncentratas. Prieš naudodami būtina į 2 plovimo buferinį tirpalą (BR4) įpilkite etanolio (žr. „Ką atlikti prieš pradėdant“, 57 psl.).

16. Įpilkite dar 500 µl 2 plovimo buferinio tirpalo (BR4) į „PAXgene RNA“ centrifuginę kolonėlę (PRC). Centrifuguokite 3 minutes 8000–20 000 x g.
17. Išmeskite apdorojimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija ir įdėkite „PAXgene RNA“ centrifuginę kolonėlę (PRC) į naują 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT). Centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g.
18. Išmeskite apdorojimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija. Įdėkite „PAXgene RNA“ centrifuginę kolonėlę (PRC) į 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT) ir pipete perkelti 40 µl eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) tiesiai ant „PAXgene RNA“ centrifuginės kolonėlės (PRC) membranos. Centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g, kad eliuotumėte RNR.

Norint pasiekti didžiausią eliuavimo efektyvumą, svarbu eliuavimo buferiniu tirpalu (BR5) sudrėkinti visą membraną.

19. Kartokite eliuavimo žingsnį (18 žingsnis) kaip aprašyta, naudodami 40 µl eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) ir tą patį mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT).
20. Inkubuokite eliuatą 5 minutes 65 °C inkubuojamame kratytuve (nuo 5 žingsnio) nekratydami. Baigę inkubuoti, nedelsdami atvėsinkite ant ledo.

Šio inkubavimo 65 °C temperatūroje metu paskesniai panaudojimui denatūruojama RNR. Neviršykite inkubavimo trukmės ir temperatūros.

21. Jeigu RNR mėginiai nebus naudojami iš karto, laikykite –20 °C arba –70 °C temperatūroje.

Pakartotinai užšaldžius ir atitirpinus RNR lieka denatūruota, todėl nebūtina kartoti inkubavimo 65 °C temperatūroje. Jei naudojate RNR mėginius diagnostiniam tyrimui, vykdykite gamintojo pateiktas instrukcijas.

Norint tiksliai kiekybiškai įvertinti RNR pagal absorbciją ties 260 nm, rekomenduojame praskiesti mėginius 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Skiedžiant mėginį vandeniu be RNazės, galima gauti neteisingai mažas reikšmes.

Nustatykite spektrofotometro nulio reikšmę, naudodami tuščią mėginį su tokia pačia dalimi, kaip ir matuojamuose mėginiuose, eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) ir Tris-HCl buferinio tirpalo. Jei netinkamai nustatyta spektrofotometro nulio reikšmė, dėl didelės eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) absorbcijos ties 220 nm gali būti aukštas foninis absorbcijos lygis.



Norėdami kiekybiškai įvertinti Tris-HCl buferiniame tirpale, naudokite šį sąryšį
 $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Žr. B priedą 75 psl.

* Dirbdami su cheminėmis medžiagomis visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (Safety Data Sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

Protokolas. Automatizuotas bendros RNR gryninimas iš žmogaus viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT)

Svarbi informacija prieš pradėdant

- Įsitinkite, kad rinkinio dėžutė nepaliesta ir nepažeista, o buferiniai tirpalai nepratekėję. Nenaudokite pažeisto rinkinio.
- Naudodami pipetę, įsitinkite, kad nustatytas tinkamas tūris ir kruopščiai ir visiškai įtraukiamas ir išpilamas visas skystis.
- Kad apsisaugotumėte nuo mėginio perkėlimo į netinkamą mėgintuvėlį arba plastikines laboratorines priemones, būtinai tinkamai pažymėkite visus apdorojimo mėgintuvėlius (PT), mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius (MCT) ir rotoriaus adapterius ilgalaikiu rašikliu. Pažymėkite kiekvieno mikrocentrifugavimo mėgintuvėlio (MCT) dangtelį ir korpusą, kiekvieno apdorojimo mėgintuvėlio (PT) korpusą ir kiekvieno rotoriaus adapterio išorinę sienelę.
- Dėl procedūros metu išsiliejusio mėginio ir buferinių tirpalų gali sumažėti RNR išeiga ir grynumas.
- Jei nenurodyta kitaip, visus šio protokolo žingsnius, įskaitant centrifugavimo žingsnius, reikia atlikti kambario temperatūroje (15–25 °C).

Dėl nukleorūgščių amplifikavimo technologijų jautrumo, siekiant išvengti kryžminės taršos, tvarkant mėginius reikia taikyti šias atsargumo priemones:

- Pipete atsargiai perkelti mėginį į apdorojimo mėgintuvėlio (PT) dugną, nešlapindami mėgintuvėlio krašto.
- Perkeldami skirtingus skysčius, visuomet keiskite pipetės antgalius. Naudokite pipetės antgalius su aerolio barjeru.

- Stenkitės neliesti centrifuginės kolonėlės (PRC, PSC) membranos pipetės antgaliu.
- Išmaišę sūkuriniu maišytuvu arba pakaitinę mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT), trumpai centrifuguokite jį, kad pašalintumėte lašelius nuo vidinio dangtelio paviršiaus.
- Visos procedūros metu mūvėkite pirštines. Mėginio kontakto su pirštinėmis atveju, nedelsdami pasikeiskite pirštines.

Ką atlikti prieš pradėdant

- Kraują reikia paimti į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT), laikantis „PAXgene Blood RNA Tube“ vadove pateiktų instrukcijų. Jei reikia, žr. „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) tvarkymo rekomendacijas žr. C priede (77 psl.).
- Užtikrinkite, kad paėmus kraują „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) būtų inkubuojami bent 2 valandas kambario temperatūroje, siekiant užtikrinti visišką kraujo ląstelių lizę. „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) inkubavimas per naktį gali padidinti išeią. Jeigu paėmus kraują „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) buvo laikomas 2–8 °C, –20 °C arba –70 °C, pirmiausia leiskite pasiekti kambario temperatūrą, o tada prieš pradėdami procedūrą palaikykite kambario temperatūroje 2 valandas.
- Perskaitykite saugos informaciją 10 psl.
- Perskaitykite „Svarbios pastabos“, 42 psl.
- Perskaitykite RNR tvarkymo rekomendacijas (A priedas, 74 psl.).
- Perskaitykite atitinkamą „QIACube“ instrumento naudotojo vadovą ir visą su „QIACube“ instrumentu pateiktą papildomą informaciją, ypatingą dėmesį atkreipdami į saugos informaciją.
- Užtikrinkite, kad visi prietaisai ir instrumentai, pvz., pipetės ir „QIACube“ instrumentas, būtų reguliariai tikrinami ir kalibruojami pagal gamintojo rekomendacijas.
- Rišamajame buferiniame tirpale (BR2) laikant gali susidaryti nuosėdos. Jei reikia, pašildykite iki 37 °C, kad ištirptų.

- 2 plovimo buferinis tirpalas (BR4) teikiamas kaip koncentratas. Prieš naudodami pirmą kartą, įpilkite atitinkamą etanolio tūrį (96–100 %, p.a. švarumo klasės), kaip nurodyta ant buteliuko, kad gautumėte darbinį tirpalą.
- Jei naudojate „RNase-Free DNase Set“ pirmą kartą, paruoškite DNazės I bazinį tirpalą. Ištirpinkite gryną DNazę I (RNFD; 1500 Kunitz vienetų)* rinkinyje pateiktame 550 µl DNazės resuspensijos buferiniame tirpale (DRB). Elkities atsargiai, kad nė kiek neprarastumėte DNazės I (RNFD) atidarydami indelį. Nemaišykite atkurtos DNazės I (RNFD) sūkuriniu maišytuvu. DNazė I ypač jautri fizinei denatūracijai. Maišyti reikia tik švelniai apverčiant buteliuką.
- Turimi duomenys rodo, kad atkurtą DNazę I (RNFD) galima laikyti 2–8 °C 6 savaites. Jei DNazę I (RNFD) norite laikyti ilgiau, ištraukite bazinį tirpalą iš stiklinio indelio, padalykite jį per vieną kartą sunaudojamas alikvotines dalis (naudokite rinkinyje pateiktus 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius [MCT]; jų užtenka 5 alikvotinėms dalims) ir laikykite –20 °C ne ilgiau nei 9 mėnesius. Atitirpintas alikvotines dalis galima laikyti 2–8 °C ne ilgiau nei 6 savaites. Atitirpinę, alikvotinių dalių neužšaldykite pakartotinai.
- Atkurdami ir dalydami DNazę I (RNFD) į alikvotines dalis, laikykitės RNR tvarkymo rekomendacijų (A priedas, 74 psl.).
- Sumontuokite tinkamą kratytuvo adapterį (pateikiamas su „QIAcube“ instrumentais; naudokite 2 ml „safe-lock“ mėgintuvėliams skirtą adapterį, pažymėtą „2“) ir ant adapterio viršaus uždėkite kratytuvo stovą.
- Patikrinkite ir, jei reikia, ištuštinkite atliekų stalčių.
- Įdiekite susijusius protokolus, jei dar neįdiegėte jų prieš ankstesnius vykdymus. Dirbant su „QIAcube Connect MDX“ būtina atsisiųsti visus susijusiuose ZIP faile esančius protokolus. Dirbdami klasikiniu „QIAcube“, įdiekite ir „PAXgene Blood RNA Part A“, ir „PAXgene Blood RNA Part B“ protokolus. Žr. „Protokolų diegimas „QIAcube“ instrumentuose“, 45 psl.

* Kunitz vienetai – dažniausiai naudojami vienetai matuojant I DNazę, apibrėžiami kaip DNazės I kiekis, dėl kurio A_{260} padidėja 0,001 per minutę mililitre, esant 25 °C, pH 5,0, kaip substratą naudojant stipriai polimerizuotą DNR (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ir 363).

Procedūra

1. Uždarykite „QIACube“ instrumento gaubtą ir įjunkite „QIACube“ instrumentą naudodami maitinimo jungiklį („QIACube Connect MDx“ – žr. 17 pav., 43 psl.; „QIACube“ – žr. 18 pav., 44 psl.).

Pasigirsta pyptelėjimas ir įsijungia pradžios ekranas. Instrumentai automatiškai atlieka inicijavimo patikras.

2. Atidarykite „QIACube“ instrumento gaubtą ir įdėkite į „QIACube“ instrumentą reikiamus reagentus bei plastikines priemonės. Žr. „Įkėlimas į „QIACube“ instrumentą“, 46 psl.

Taupant laiką, įkelti galima vieno arba abiejų 10 minučių centrifugavimo žingsnių metu (3 ir 5 žingsniai).

3. Centrifuguokite „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) 10 minučių 3000–5000 x *g*, naudodami kintamojo kampo rotorį.



Siekiant užtikrinti visą kraujo ląstelių lizę, inkubuokite kraujo mėginį „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) mažiausiai 2 valandas kambario temperatūroje (15–25 °C).



Rotoriuje turi būti apvaliadugnių mėgintuvėlių adapteriai. Naudojant kito tipo mėgintuvėlių adapterius, centrifuguojant mėgintuvėliai gali sudūžti.

4. Pašalinkite supernatantą nupildami arba pipete. Įpilkite į mėgintuvėlį su nuosėdomis 4 ml vandens be RNazės (RNFV) ir mėgintuvėlį uždarykite šviežiu antriniu „BD Hemogard“ dangteliu (pateikiamu rinkinyje).

Jeigu supernatantą nupilate, elkitės atsargiai, kad nesudrumstumėte nuosėdų, ir nusauskite mėgintuvėlio kraštą švari popieriniu rankšluosčiu.

5. Maišykite sūkuriniu maišytuvu, kol nuosėdos aiškiai ištirps, ir centrifuguokite 10 minučių 3000–5000 x *g*, naudodami kintamojo kampo rotorį. Pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą.

Smulkios atliekos likusios supernatante išmaišius jį sūkuriniu maišytuvu, bet prieš centrifuguojant, neturės įtakos procedūrai.



Pašalinus ne visą supernatantą, bus slopinama lizė ir praskiestas lizatas, dėl to pasikeis RNR surišimo su „PAXgene“ membrana sąlygos.

6. Įpilkite 350 µl resuspensijos buferinio tirpalo (BR1) ir maišykite sūkuriniu maišytuvu, kol nuosėdos aiškiai ištirps.

7. Pipete perkeltite mėginį į 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT).



Naudokite „PAXgene Blood RNA Kit“ pateiktus 2 ml apdorojimo mėgintuvėlius (PT).

8. Įstatykite atidarytus apdorojimo mėgintuvėlius (PT) su mėginiumi į „QIAcube“ instrumento kratytuvą („QIAcube Connect MDx“ – žr. 21 pav., 48 psl.; „QIAcube“ – 22 pav., 49 psl.). Mėginių vietos pažymėtos, kad būtų paprasčiau įdėti. Įstatykite kratytuvo stovo kamščius (pateikiami su „QIAcube“ instrumentais) į angas kratytuvo stovo krašte šalia kiekvieno apdorojimo mėgintuvėlio. Tai leidžia aptikti mėginius tikrinant įkrovą.



Įsitikinkite, kad sumontuotas tinkamas kratytuvo adapteris (kratytuvo adapteris, 2 ml, „safe-lock“ mėgintuvėliams, pažymėtas „2“, pateikiamas su „QIAcube“ instrumentais).



Jei apdorojama mažiau nei 12 mėginių, būtinai užpildykite kratytuvo stovą, kaip pavaizduota 26 pav., 53 psl. Negalima apdoroti vieno (1) mėginio arba 11 mėginių. Kratytuvo stove nurodyti vietų numeriai atitinka centrifugos vietų numerius.

9. Uždarykite „QIAcube“ instrumento gaubtą („QIAcube Connect MDx“ – žr. 17 pav., 43 psl.; „QIAcube“ – žr. 18 pav., 44 psl.).

10. Pasirinkite „PAXgene Blood RNA Part A“ protokolą ir jį paleiskite.

Vykdykite „QIAcube“ instrumento jutikliniame ekrane rodomas instrukcijas.



Įsitikinkite, kad „QIAcube“ instrumente įdiegtos abi (A ir B) programos dalys (žr. „Protokolų diegimas „QIAcube“ instrumentuose“ 45 psl.).



„QIAcube“ instrumentais atliks mėginių, antgalių, rotoriaus adapterių ir reagentų buteliukų įkrovos patikras.

11. Kai „PAXgene Blood RNA Part A“ protokolas užbaigiamas, atidarykite „QIAcube“ instrumento gaubtą („QIAcube Connect MDx“ – žr. 17 pav., 43 psl., „QIAcube“ – žr. 18 pav., 44 psl.). Išimkite ir išmeskite „PAXgene RNA“ centrifuginės kolonėles (PRC) iš rotoriaus adapterių ir ištuštinkite kratytuve esančius apdoravimo mėgintuvėlius (PT).



Vykdydami šiuos veiksmus, perkeliama centrifuginės kolonėles iš rotoriaus adapterio 1 padėties (L1 dangtelio padėtis) į rotoriaus adapterio 3 padėties (L2 dangtelio padėtis) (žr. 24 pav., 51 psl.).

12. Uždarykite visų rotoriaus adapteriuose esančių 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių (MCT), kuriuose yra išgryninta RNR, dangtelius (3 padėtis, L3 dangtelio padėtis, žr. 24 pav., 51 psl.). Perkelkite 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlius (MCT) į „QIAcube“ instrumento kratytuvo adapterį („QIAcube Connect MDx“ – žr. 21 pav., 48 psl.; „QIAcube“ – žr. 22 pav., 49 psl.).

13. Uždarykite „QIAcube“ instrumento gaubtą („QIAcube Connect MDx“ – žr. 17 pav., 43 psl.; „QIAcube“ – žr. 18 pav., 44 psl.).

14. Pasirinkite „PAXgene Blood RNA Part B“ protokolą ir jį paleiskite.

Vykdykite „QIAcube“ instrumento jutikliniame ekrane rodomas instrukcijas.



Ši programa inkubuoja mėginius 65 °C temperatūroje ir denatūruoja RNR paskesniajam panaudojimui. Nepraleiskite šio žingsnio, net jei denatūravimo karščiu žingsnis yra paskesniuose taikymuose. Pakankamai denatūruoti RNR būtina, norint užtikrinti didžiausią paskesnio naudojimo efektyvumą.

15. Kai „PAXgene Blood RNA Part B“ programa užbaigiama, atidarykite „QIAcube“ instrumento gaubtą („QIAcube Connect MDx“ – žr. 17 pav., 43 psl., „QIAcube“ – žr. 18 pav., 44 psl.). Nedelsdami padėkite mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius (MCT) su išgryninta RNR ant ledo.



ĮSPĖJIMAS: karštas paviršius. Kratytuvo temperatūra gali pakilti iki 70 °C. Venkite liesti, kol jis karštas.



Nepalikite išgrynintos RNR „QIACube“ instrumente. Neatvėsinus mėginių, išgryninta RNR gali degraduoti. Todėl nerekomenduojama atlikti mėginių paruošimo vykdymų be priežiūros per naktį.

16. Jeigu RNR mėginiai nebus naudojami iš karto, laikykite –20 °C arba –70 °C temperatūroje.

Pakartotinai užšaldžius ir atšildžius RNR lieka denatūruota, todėl nebūtina kartoti karšto inkubavimo protokolo („PAXgene Blood RNA Part B“). Jeigu RNR mėginius naudojate diagnostiniame tyrime, vykdykite gamintojo pateiktas instrukcijas.

Norint tiksliai kiekybiškai įvertinti RNR pagal absorbciją ties 260 nm, rekomenduojame praskiesti mėginius 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Skiedžiant mėginį vandeniu be RNazės, galima gauti neteisingai mažas reikšmes.

Nustatykite spektrofotometro nulio reikšmę, naudodami tuščią mėginį su tokia pačia dalimi, kaip ir matuojamuose mėginiuose, eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) ir Tris-HCl buferinio tirpalo. Jei netinkamai nustatyta spektrofotometro nulio reikšmė, dėl didelės eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) absorbcijos ties 220 nm gali būti aukštas foninis absorbcijos lygis.



Norėdami kiekybiškai įvertinti Tris-HCl buferiniame tirpale, naudokite šį sąryšį
 $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Žr. B priedą 75 psl.

17. Išimkite reagentų buteliukų stovą iš „QIACube“ instrumento darbatalio („QIACube Connect MDx“ – žr. 21 pav., 48 psl.; „QIACube“ – žr. 22 pav., 49 psl.) ir uždenkite visus buteliukus atitinkamais pažymėtais dangteliais. Buferinius tirpalus buteliukuose kambario temperatūroje (15–25 °C) galima laikyti ne ilgiau nei 3 mėnesius. Išimkite ir išmeskite „QIACube“ instrumento mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizduose esančiuose apdoravimo mėgintuvėliuose (PT) likusius reagentus. Išimkite iš centrifugos ir išmeskite rotorius adapterius. Ištuštinkite „QIACube Connect MDx“ atliekų stalčių („QIACube Connect MDx“ – žr. 17 pav., 43 pav.; „QIACube“ – žr. 18 pav., 44 psl.). Uždarykite „QIACube“ instrumento gaubtą ir išjunkite instrumentą maitinimo jungikliu.

* Dirbdami su cheminėmis medžiagomis visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirtinės ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali būti naudingas šalinant atsiradusias triktis. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro svetainės dažniausiai užduodamų klausimų puslapyje adresu www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN techninėse tarnybose dirbantys mokslininkai visada mielai atsakys į visus jums kilusius klausimus apie šiame vadove ir protokoluose pateiktą informaciją, mėginius ir tyrimų technologijas (kontaktinę informaciją žr. paskutiniame puslapyje arba apsilankykite www.qiagen.com).

Pastabos ir pasiūlymai

Degradavusi RNR

Tarša RNaze



Elkitės atsargiai, kad procedūros metu ar tvarkant vėliau į reagentus nepatektų RNazių (žr. A priedą, 74 psl.).

Maža RNR išeiga

a) Į „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) paimta mažiau nei 2,5 ml kraujo



Įsitikinkite, kad į „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT; žr. „PAXgene Blood RNA Tube“ vadovą) paimta 2,5 ml kraujo.




b) RNR koncentracija išmatuota vandenyje




Norint tiksliai kiekybiškai įvertinti, RNR reikia skiesti 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* (žr. B priedą, 75 psl.).

* Dirbdami su cheminėmis medžiagomis visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

Pastabos ir pasiūlymai

- c) Vykdamt protokolo 9 ir 10 žingsnius rankiniu būdu, ląstelių atliekos perkeltos į „PAXgene RNA“ centrifuginę kolonėlę (PRC)  Stenkitės neperkelti didelių dalelių pipete perkeldami supernatantą rankinio protokolo 7 žingsnyje (mažų atliekų perkėlimas procedūrai įtakos neturės).
- d) Supernatantas ne visiškai pašalintas 3 žingsnyje  Įsitikinkite, kad pašalintas visas supernatantas. Jeigu supernatantas nupilamas, pašalinkite lašelius nuo „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) krašto švelniai paliesdami popierinį rankšluostį. Imkitės atitinkamų atsargumo priemonių, kad išvengtumėte kryžminės taršos.
- e) Paėmus į „PAXgene Blood RNA Tube (BRT)“, kraujas inkubuotas trumpiau nei 2 valandas  Paėmę, inkubuokite „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) ne mažiau nei 2 valandas.

Maža A_{260}/A_{280} reikšmė

- a) Matuojant A_{260}/A_{280} , RNR buvo skiedžiama vandeniui  Prieš matuodami RNR grynumą, skiesdami naudokite 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 * (žr. B priedą, 75 psl.).

* 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.

Pastabos ir pasiūlymai

- b) Netinkamai nustatyta spektrofotometro nulinio reikšmė



Nustatykite spektrofotometro nulinio reikšmę, naudodami tuščią mėginį su tokia pačia dalimi, kaip ir matuojamuose mėginiuose, eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) ir 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, buferinio tirpalo. Jei netinkamai nustatyta spektrofotometro nulinio reikšmė, dėl didelės eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) absorbcijos ties 220 nm gali būti aukštas foninis absorbcijos lygis.

Instrumento triktis

„QIAcube“ instrumentai veikia netinkamai

Perskaitykite atitinkamą „QIAcube“ naudotojo vadovą, atkreipdami ypatingą dėmesį į trikčių šalinimo skyrių. Įsitinkite, kad „QIAcube“ instrumentas tinkamai prižiūrimas, kaip aprašyta naudotojo vadove.

A priedas. Bendrosios RNR tvarkymo pastabos

RNR naudojimas



Ribonukleazės (RNazės) – tai labai stabilūs ir aktyvūs fermentai, paprastai veikiantys ir be kofaktorių. RNazes labai sunku inaktyvinti, o degraduoti RNR pakanka labai mažo jų kiekio, todėl nenaudokite jokių plastikinių ar stiklinių indų prieš tai nepašalinę galimo jų užteršimo RNaze. Būtina atidžiai saugotis, kad RNazių nenumatytai nepatektų į RNR mėginį atliekant gryninimo procedūrą ar po jos. Siekiant sukurti ir išlaikyti aplinką be RNazės, dirbant su RNR, vienkartinį ir daugkartinio naudojimo indų bei tirpalų pirminio apdorojimo metu ir juos naudojant reikia imtis atsargumo priemonių.

Bendrasis naudojimas



Dirbant su RNR, visada reikia taikyti tinkamus mikrobiologinius, aseptinius metodus. Ant rankų ir dulkių dalelių pernešamos bakterijos ir mielės, kurios yra dažniausi taršos RNaze šaltiniai. Tvarkydami reagentus ir RNR mėginius, visuomet mūvėkite latekso arba vinilo pirštines, kad išvengtumėte užteršimo RNaze nuo odos paviršiaus arba dulkėtos laboratorinės įrangos. Dažnai keiskite pirštines ir, kai tik įmanoma, laikykite mėgintuvėlius uždengtus. Pipete perkeldami alikvotines dalis paskesniai naudojimui, išgrynintą RNR laikykite ant ledo.

Užteršimo RNaze šalinimo iš stiklinių indų ir tirpalų protokolus rasite bendrosiose molekulinės biologijos rekomendacijose, pvz., Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

B priedas. Bendrosios RNR kiekybinis įvertinimas ir kokybės nustatymas

RNR kiekybinis įvertinimas

RNR koncentraciją nustatoma spektrofotometru matuojant absorbciją ties 260 nm (A_{260}). Siekiant užtikrinti reikšmingumą, reikšmės turi būti spektrofotometro tiesiniame diapazone. 1 vieneto absorbcija ties 260 nm atitinka 44 μg RNR/ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Šis santykis galioja tik 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* atliekamiems matavimams. Todėl, jei RNR mėginį būtina skiesti, jį reikia skiesti 10 mM Tris-HCl. Kaip aptarta toliau (žr. „RNR grynumas“ 76 psl.), absorbcijos ties 260 nm ir ties 280 nm reikšmių santykis rodo apskaičiuotą RNR grynumą. Matuodami RNR mėginius, įsitikinkite, kad kiuvetės yra be RNazės. Nustatykite spektrofotometro nulio reikšmę, naudodami tuščią mėginį su tokia pačia dalimi, kaip ir matuojamuose mėginiuose, eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) ir Tris-HCl buferinio tirpalo. Jei netinkamai nustatyta spektrofotometro nulio reikšmė, dėl didelės eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) absorbcijos ties 220 nm gali būti aukštas foninis absorbcijos lygis. Toliau pateiktas RNR kiekybinio įvertinimo skaičiavimo pavyzdys.

RNR mėginio tūris	=	80 μl
Skiedimas (1/15)	=	10 μl RNR mėginio + 140 μl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Išmatuokite praskiesto mėginio absorbciją kiuvetėje (be RNazės).		
A_{260}	=	0.3
Mėginio koncentracija	=	$44 \times A_{260} \times \text{skiedimo koeficientas}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 $\mu\text{g/ml}$
Bendroji išėiga	=	koncentracija x mėginio tūris mililitrais
	=	$198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 μg RNR

* Dirbdami su cheminėmis medžiagomis visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinę pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (Safety Data Sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

RNR grynumas

Ties 260 nm ir 280 nm išmatuotų reikšmių santykis (A_{260}/A_{280}) rodo apskaičiuotą RNR grynumą, atsižvelgiant į priemaišas, kurios absorbuoja UV šviesą, pvz., baltymus. Tačiau A_{260}/A_{280} santykiui didelę įtaką daro pH. Dėl mažesnio pH gaunamas mažesnis A_{260}/A_{280} santykis ir mažesnis jautrumas taršai baltymais.* Norint gauti tikslias reikšmes, absorbciją rekomenduojame matuoti 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Grynos RNR A_{260}/A_{280} santykis yra 1,8–2,2, kai matuojama 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Nustatykite spektrofotometro nulio reikšmę, naudodami tuščią mėginį su tokia pačia dalimi, kaip ir matuojamuose mėginiuose, eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) ir Tris-HCl buferinio tirpalo. Jei netinkamai nustatyta spektrofotometro nulio reikšmė, dėl didelės eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) absorbcijos ties 220 nm gali būti aukštas foninis absorbcijos lygis.

* 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.

C priedas. „PAXgene Blood RNA Tubes“ tvarkymas (BRT)



Toliau pateiktos BD rekomendacijos gali būti naudingos tvarkant „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT). Daugiau informacijos apie „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) žr. „PAXgene Blood RNA Tube“ vadove.

„BD Hemogard Closure“ pašalinimo instrukcijos

1. Viena ranka suimkite „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT), laikydami nykštį po „BD Hemogard“ dangteliu. (Kad būtų stabiliau, ranką laikykite ant kieto paviršiaus.) Kita ranka sukite „BD Hemogard“ dangtelį ir tuo pačiu metu kitos rankos nykščiu stumkite aukštyn, **TIK KOL ATLAISVINSITE MĖGINTUVĖLIO KAMŠTELĮ.**
2. Patraukite nykštį, kol nepakėlėte dangtelio. **NESTUMKITE** nykščiu taip, kad nustumtumėte dangtelį nuo „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT). Dėmesio: jeigu „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) yra kraujo, yra poveikio pavojus. Siekiant išvengti sužeidimų pašalinant dangtelį, svarbu kad nykštys, kuriuo stumiate šalinamą dangtelį aukštyn, neprisiliėtų prie „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT), kai tik atlaisvinsite „BD Hemogard“ dangtelį.
3. Nukelkite „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) dangtelį. Jei mažai tikėtina atveju plastikinis skydelis atsiskirtų nuo guminio kamštelio, **NEBANDYKITE IŠ NAUJO SURINKTI DANGTELIO.** Atsargiai nuimkite guminį kamštelį nuo „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT).

Antrinio „BD Hemogard Closure“ pašalinimo instrukcijos

1. Pakeiskite dangtelį ant „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT).
2. Pasukite ir tvirtai paspauskite, kad gerai įstatytumėte kamštelį. Būtina visiškai įkišti kamštelį, kad „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) dangtelis liktų tvirtai uždarytas tvarkant.

Užsakymo informacija

Produktas	Turinys	Kat. nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 „PAXgene Spin Column“, 50 „Shredder Spin Columns“, apdoravimo mėgintuvėliai, DNazė I be RNazės, reagentai ir buferiniai tirpalai be RNazės. Naudojama kartu su „PAXgene Blood RNA Tubes“	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 kraujo surinkimo mėgintuvėlių	762165
Susiję produktai, kuriuos galima užsakyti iš QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Pakuotėje: reagentų buteliukų stovai (3); stovo žymėjimo juostelės (8); 200 µl filtrų antgaliai (1024); 1000 µl filtrų antgaliai (1024); 1000 µl filtrų antgaliai, plačia anga (1024); 30 ml reagentų buteliukai (18); rotorius adapteriai (240); rotorius adapterio laikiklis	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Sterilūs, vienkartiniai filtrų antgaliai, stovelyje	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagentų buteliukai (30 ml) su dangteliais; 6 vnt. pakuotėje; skirti naudoti „QIAcube“ instrumento reagentų buteliukų stove	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	240 paruošimų: 240 vienkartinių rotorius adapterių; skirtų naudoti su „QIAcube“ instrumentais	990394

Reagent Bottle Rack	Stovas, į kurį telpa 6 x 30 ml reagentų buteliukai, „QIAcube“ instrumento darbастalyje	990390
Rotor Adapter Holder	12 vienkartinį rotoriaus adapterių laikiklis; skirtas naudoti su „QIAcube“ instrumentais	990392
Susiję produktai, kuriuos galima užsakyti iš BD*		
Blood Collection Set	„BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set“: 21G, 0,75 colio (0,8 x 19 mm) adata, 12 colių (305 mm) vamzdelis su Luerio adapteriu; 50 vnt. dėžutėje, 200 vnt. pakuotėje	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Pakuotė tik 13 mm ir 16 mm skersmens; 1000 vnt./pak.	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm, 4,0 ml paimti, su raudonu „BD Hemogard“ dangteliu ir popierine etikete; 100 vnt./dėž., 1000 vnt./pak.	368975

* Šie kraujo paėmimo priedai yra tipiniai produktai, kuriuos galima naudoti su „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT). Jei norite sužinoti daugiau apie šiuos priedus, įskaitant informaciją apie užsakymą, apsilankykite www.preanalytix.com.

Norėdami gauti naujausios informacijos apie licencijavimą ir atsakomybės už produktus apribojimus, žr. atitinkamą „PreAnalytiX“ arba QIAGEN rinkinio vadovą arba naudotojo vadovą. „PreAnalytiX“ ir QIAGEN rinkinio vadovai ir naudotojo vadovai pasiekiami www.preanalytix.com ir www.qiagen.com arba jų galima paprašyti „PreAnalytiX“ techninėse tarnybose.

Vadovo peržiūros istorija

Dokumentas ir pataisymai	Keitimai	Data
HB-0101-004, R2	GHS taisyklių laikymusi susiję pakeitimai visame dokumente	2015 birželis
HB-0101-005, R3	Naujas šablonas; automatizuoto protokolo ir efektyvumo duomenų pataisymai; saugos informacijos, atsižvelgiant į GHS taisykles, naujinimas; instrumento išsamios informacijos pakeitimai ir Produkto naudojimo apribojimų informacija.	2019 vasaris
HB-0101-006, R3	Pataisytas rinkinio pavadinimas 5 psl. pateiktoje rinkinio turinio lentelėje.	2020 sausis
HB-0101-007, R4	Į automatizuotą protokolą įtrauktas „QIAcube Connect MDx“; atnaujintas tekstas įtraukiant nuorodas į „QIAcube Connect MDx“; atnaujinti lentelių, puslapių ir paveikslėlių numeriai.	2020 m. gruodis

„PreAnalytiX“ pasaulyje

„PreAnalytiX“ produktus platina QIAGEN ir BD įmonės

QIAGEN – klientų aptarnavimas

Užsakymas www.QIAGEN.com/shop | Techninė pagalba support.qiagen.com | Website www.qiagen.com

BD – klientų aptarnavimas

Argentina, Urugvajus ir Paragvajus

Užsakymai 0800.444.5523

El. paštas crc_argentina@bd.com

Australija

Užsakymai 1.800.656.100

Faks. 1.800.656.110

El. paštas bd_anz@bd.com

Austrija

Užsakymai 43.1.7063660

Faks. 43.1.706366011

El. paštas customer-care.at@bd.com

Belgija

Užsakymai 32.53.720.556

Faks. 32.53.720.549

El. paštas orders.be@bd.com

Brazilija

Užsakymai 0800.055.56.54

El. paštas consultoria_vacutainer@bd.com

Kanada

Techninė pagalba 1.800.631.0174

Užsakymai 1.866.979.9408

Faks. 1.800.565.0897

El. paštas customer.service.canada@bd.com

Centrinė ir Rytų Europa

Užsakymai 48.22.377.11.11

Faks. 48.22.377.11.02

Užsakymai Bulgarijoje info_bulgaria@bd.com

Užsakymai Čekijos Respublikoje

info_czech@bd.com

Užsakymai Kroatijoje info_croatia@bd.com

Užsakymai Vengrijoje info_hungary@bd.com

Užsakymai Lenkijoje info_poland@bd.com

Užsakymai Rumunijoje info_romania@bd.com

Užsakymai Pietryčių Europoje info_balkan@bd.com

Užsakymai Serbijoje info_serbia@bd.com

Užsakymai Slovakijoje info_slovakia@bd.com

Užsakymai Slovėnijoje info_slovenia@bd.com

Danija

Užsakymai 45.43.43.45.66

Faks. 45.43.96.56.76

Užsakymai ordre.dk@bd.com

Techninė pagalba bddenmark@bd.com

Suomija

Užsakymai 358.9.88.70.780

Faks. 358.9.88.70.7816

Užsakymai tillakset.fi@bd.com

El. paštas bdsuomi@bd.com

Prancūzija

Užsakymai 33.476.68.36.36

Faks. 33.476.68.36.93

El. paštas serviceclientbdf@bd.com

Užsakymai commandesfr@bd.com

Techninė pagalba vacutainerfr@bd.com

Vokietija

Užsakymai 49.6221.3050

Faks. 49.6221.305.216

El. paštas customer-care.de@bd.com

Indija

Užsakymai 91.124.3949390

Užsakymai bd_india@bd.com

Airija („Aquilant Specialist Healthcare Services“)

Klientų aptarnavimas 353.1.404.8350

Faks. 353.1.404.8352

El. paštas contactus@aquilantscientific.ie

Izraelis („Lapidot Medical“)

Klientų aptarnavimas 972.700.70.90.22

El. paštas cs@lapidot.com

Italija

Užsakymai 39.02.48240.500

Faks. 39.02.48240.775

Techninė pagalba 39.3450655140

El. paštas ordini.it@bd.com

Vidurio Rytai ir Afrika

Užsakymai 971.45.592.555

Faks. 971.45.592.599

El. paštas EMA_PAS@bd.com

Nyderlandai

Užsakymai 31.20.582.94.20

Faks. 31.20.582.94.21

Užsakymai orders.nl@bd.com

Naujoji Zelandija

Užsakymai 0800.572.468

Faks. 0800.572.469

El. paštas nz_customerservice@bd.com

Norvegija

Klientų aptarnavimas 64.00.99.00

El. paštas bdnorge@bd.com

Užsakymai ordre.no@bd.com

Pietryčių Azija

El. paštas PAS.SEA@bd.com

Užsakymai Indonezijoje 622.1577.1920

Užsakymai Malaizijoje 603.2093.8788

Užsakymai Filipinuose 63.2478.8881

Užsakymai Singapūre 65.6861.0633

Užsakymai Tailande 662.646.1800

Užsakymai Vietname 848.3822.7409

Pietų Korėja

Užsakymai 02.3404.3706

Faks. 02.3404.3785

Techninė pagalba 02.3404.3706

Techninė pagalba Korea_PAS@bd.com

Ispanija, Portugalija ir Andora

Užsakymai 34.91.848.8174

Klientų aptarnavimas 34.902.27.17.27

Faks. 34.91.848.8115

El. paštas info.spain@bd.com

Švedija

Užsakymai 46.8.775.51.00

Faks. 46.8.645.08.08

Užsakymai order.se@bd.com

Techninė pagalba bds sweden@bd.com

Šveicarija

Užsakymai 41.61.485.22.24

Faks. 41.61.485.22.00

El. paštas infoch@bd.com

UK

Užsakymai 0800.917.8776

El. paštas bduk_customerservice@bd.com

JAV

Klientų aptarnavimas 800.631.0174

El. paštas productcomplaints@bd.com



A QIAGEN / BD Company