

Prosinec 2020

Příručka pro sadu PAXgene[®] Blood RNA Kit

Verze 2



50 (kat. čís. 762174)

R4 **MAT** 1122120CZ

REF 762174

IVD

CE



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Vyrobeno QIAGEN GmbH pro PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

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

Sady PAXgene Blood RNA Kit nejsou dostupné ve všech zemích; prosím informujte se.

Omezená licenční smlouva

Použitím produktu vyjadřuje kupující nebo uživatel sady PAXgene Blood RNA Kit souhlas s následujícími podmínkami:

1. Sada PAXgene Blood RNA Kit smí být používána výhradně v souladu s *Příručkou pro sadu PAXgene Blood RNA Kit* a pouze s komponenty obsaženými v sadě. Společnost PreAnalytiX neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo k začlenění příložených komponent sady s komponenty, které nejsou v této sadě zahrnuty, s výjimkou případů uvedených v *příručce pro sadu PAXgene Blood RNA Kit* a dodatečných protokolech dostupných na www.preanalytix.com.
2. Mimo výslovně uvedenou licenci společnost PreAnalytiX neposkytuje žádnou záruku, že tato sada a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost PreAnalytiX zvláště vylučuje odpovědnost za jakékoliv jiné licence, vyjádřené či implikované, než výslovně uvedené.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakémukoli shora zakázané činnosti nebo ji usnadnit.
6. Společnost PreAnalytiX může základy této omezené licenční smlouvy uplatnit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, včetně poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv žaloby k prosazení této omezené licenční smlouvy nebo jakýchkoliv svých práv k duševnímu vlastnictví, která se vztahují na tuto sadu a/nebo její komponenty.

Aktualizované licenční podmínky viz www.preanalytix.com.

Podmíněný prodej

Tento produkt je dodáván s licenci na základě patentových nároků US-7,270,953 a US-7,682,790 a dále EP-1820793 B1, případně zahraničních variant těchto patentových nároků, které se vztahují na používání produktu ke zpracování komplexu nukleových kyselin vzniklého v průběhu odběru vzorku do zkumavky pro odběr RNA z krve (PAXgene Blood RNA Tube).

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

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Švýcarsko

www.preanalytix.com

Distributoři společnosti PreAnalytiX

Produkty PreAnalytiX vyrábějí nebo distribuují společnosti QIAGEN nebo BD pro společnost PreAnalytiX. Produkty nelze objednat u společnosti PreAnalytiX GmbH.


Kontaktní informace vašeho regionálního distributora PreAnalytiX naleznete na poslední straně.

Obsah

| | |
|--|----|
| Obsah sady | 5 |
| Symboly..... | 6 |
| Podmínky skladování | 7 |
| Účel použití..... | 8 |
| Omezení použití produktu | 8 |
| Kontrola kvality | 9 |
| Technická podpora | 9 |
| Informace o bezpečnosti | 9 |
| Úvod | 13 |
| Princip a popis postupu..... | 13 |
| Odběr a stabilizace vzorku | 14 |
| Koncentrace a purifikace RNA | 19 |
| Manuální purifikace RNA..... | 19 |
| Automatizovaná purifikace RNA..... | 29 |
| Vybavení a reagenty, které má zajistit uživatel..... | 38 |
| Důležité poznámky | 40 |
| Používání přístrojů QIAcube | 40 |
| Instalace protokolů na přístrojích QIAcube..... | 43 |
| Plnění přístrojů QIAcube | 44 |
| Protokol: Manuální purifikace celkové RNA z plně lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) | 54 |

| | |
|---|----|
| Protokol: Automatizovaná purifikace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) | 62 |
| Návod na řešení potíží | 69 |
| Příloha A: Obecné pokyny pro manipulaci s RNA | 72 |
| Příloha B: Kvantifikace a stanovení kvality celkové RNA | 73 |
| Příloha C: Manipulace se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) | 75 |
| Informace pro objednání..... | 76 |
| Historie revizí příručky | 78 |

Obsah sady

| PAXgene Blood RNA Kit | | | (50) |
|------------------------------|---|---|-----------------------|
| Katalogové č. | | | 762174 |
| Počet prep. | | | 50 |
| BR1 | Resuspension Buffer (Pufr k resuspenzi) | RES BUF | 20 ml |
| BR2 | Binding Buffer (Vazebný pufr)* | BIND BUF | 18 ml |
| BR3 | Wash Buffer 1 (Promývací pufr 1)* | WASH BUF 1 | 45 ml |
| BR4 | Wash Buffer 2 (concentrate) (Promývací pufr 2 (koncentrát))† | WASH BUF 2 CONC | 11 ml |
| BR5 | Elution Buffer (Eluční pufr) | ELU BUF | 6 ml |
| RNFW | RNase-Free Water (bottle) (Voda bez obsahu RNázy (lahev)) | PEL WASH | 2 × 125 ml |
| PK | Proteinase K (green lid) (Proteináza K (zelené víčko)) | PROTK | 2 × 1,4 ml |
| PRC | PAXgene RNA Spin Columns (red) (Kolonky PAXgene k odstředění RNA (červené)) | PAXgene RNA COL | 5 × 10 |
| PT | Processing Tubes (2 ml) (Zkumavky na zpracování vzorku (2 ml)) | PROC TUBE | 6 × 50 |
| Hemogard | Secondary BD Hemogard™ Closures (Sekundární uzávěry BD Hemogard™) | SEC CLOS | 50 |
| MCT | Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Mikrocentrifugační zkumavky (1,5 ml)) | MIC TUBE | 3 × 50, 1 × 10 |
| RNFD | DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNáza I bez obsahu RNázy (lyofilizovaná)) | DNA REM | 1500 jednotek Kunitz* |
| RDD | DNA Digestion Buffer (Pufr k digesci DNA; bílé víčko) | DNA DIG BUF | 2 × 2 ml |
| DRB | DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Pufr k resuspenzi DNázy (zkumavka, fialové víčko)) | DNase RES BUF | 2 ml |
| PSC | PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Kolonky PAXgene Shredder k rozmělnění a odstředění vzorku (fialové)) | PAXgene SHRED COL | 5 × 10 |
| Příručka | PAXgene Blood RNA Kit Handbook (Version 2) (Příručka pro sadu PAXgene Blood RNA Kit (verze 2)) |  | 1 |

* Nesmí přijít do kontaktu s desinfekčními prostředky, které obsahují bělidla. Obsahuje sůl guanidinu. Viz informace o bezpečnosti na straně 10.

† Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Před prvním použitím přidejte do lahvičky 4násobný objem ethanolu (96–100 %, stupeň čistoty p.a.), jak je popsáno na štítku, abyste vytvořili pracovní roztok.

Symboly



Obsahuje reagentie pro <N> testů



Viz návod k použití



Použijte do



Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Součásti



Počet



Sterilizační metoda ozařováním



Jednotky Kunitz



Přidání



Obsahuje












Rekonstituováno



Deoxyribonukleáza I

* Jednotka Kunitz je běžně užívaná jednotka pro měření enzymatické aktivity DNázy I; je definovaná jako množství DNázy I způsobující nárůst absorbance při 260 nm (A_{260}) o 0,001 za minutu na mililitr při 25 °C a pH 5,0, přičemž je jako substrát použita vysoce polymerní DNA (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 a 363).

| | |
|--|---------------------------------|
|  | Ethanol |
|  | Guanidin isothiokyanát |
|  | Sada RNase-Free DNase Set |
|  | Globální číslo obchodní položky |
|  | Nepoužívejte opakovaně |
|  | Teplotní omezení |
|  | Horní teplotní limit |
|  | Výrobce |
|  | Důležitá poznámka |

Podmínky skladování

Kolonky PAXgene k odstředění RNA (PRC), kolonky PAXgene Shredder k rozmělnění a odstředění vzorku (PSC), proteináza K (PK) a pufrы (BR1, BR2, BR3, BR4 a BR5) mají být skladovány v suchu při teplotě uvedené na štítku sady.

Sada RNase-Free DNase Set, která obsahuje DNázu I (RNFD), pufr k digesci DNA (RDD) a pufr k resuspenzi DNázy (DRB), je přepravována při teplotě okolního prostředí. Všechny komponenty sady RNase-Free DNase Set ihned po dodání uskladněte při teplotě uvedené na štítku. Při správném uchování je sada stabilní až do konce doby použitelnosti uvedeného na krabici sady.

Účel použití

Systém PAXgene Blood RNA System se skládá ze zkumavky pro odběr krve (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) a sady pro purifikaci kyseliny nukleové (PAXgene Blood RNA Kit). Je určen pro odběr, skladování a přepravu krve a stabilizaci intracelulární RNA v uzavřené zkumavce a následnou izolaci a purifikaci hostitelské RNA ze vzorků plné krve pro reakci RT-PCR používanou v molekulárních diagnostických testech.

Charakteristika funkčních vlastností systému PAXgene Blood RNA System platí pouze pro transkripty genů FOS a IL1B. Za stanovení odpovídající charakteristiky funkčních vlastností systému PAXgene Blood RNA System pro jiné transkripty je odpovědný uživatel.

Indikace k použití

Sada PAXgene Blood RNA Kit slouží k purifikaci intracelulární RNA z plné krve, která byla odebrána do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pokud sadu použijete ve spojení se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tube (BRT), získáte ze vzorků plné krve purifikovanou intracelulární RNA, která může být použita v molekulárních diagnostických testech založených na reakci RT-PCR.

Omezení použití produktu

Sada PAXgene Blood RNA Kit je koncipována jako prostředek k purifikaci intracelulární RNA z plné lidské krve ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leukocytů/ml) pro diagnostické použití in vitro. Není určena k purifikaci genomové DNA nebo virových nukleových kyselin z plné lidské krve. Vzhledem k tomu, že byl pro stabilizační podmínky validován jen omezený počet transkriptů (transkripty genů FOS a IL1B), charakteristika funkčních vlastností nebyla stanovena pro všechny transkripty. Uživatelé sady by měli zhodnotit vlastní data a údaje výrobce, aby určili, zda je validace nezbytná i pro jiné transkripty.

Tento produkt je určen pro použití profesionálními uživateli, např. techniky a lékaři vyškolenými v postupech diagnostiky in vitro.

Pokyny k použití zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) naleznete v *příručce ke zkumavce PAXgene Blood RNA Tube*.

Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže sady PAXgene Blood RNA Kit testována podle předem stanovených kritérií, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

Technická podpora

Ve společnosti QIAGEN jsme hrdi na kvalitu a dostupnost naší technické podpory. V našich odděleních technické podpory pracují zkušení vědci s rozsáhlými praktickými a teoretickými zkušenostmi v oblasti molekulární biologie a využívání produktů PreAnalytiX. Pokud máte otázky ohledně sady PAXgene Blood RNA Kit, neváhejte a kontaktujte nás.

Pro technickou asistenci a další informace kontaktujte prosím technický servis společnosti QIAGEN.

Informace o bezpečnosti

EU – Uživatelé by měli jakoukoli závažnou nežádoucí příhodu související s prostředkem oznámit výrobci a příslušnému orgánu členského státu. Mimo EU – V případě jakékoli nežádoucí příhody či dotazu souvisejícího s prostředkem kontaktujte místního zástupce společnosti QIAGEN.

Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle.

Aby se vyloučilo riziko infekce (např. virem HIV nebo hepatitidy B) nebo zranění, noste při manipulaci s biologickými a chemickými materiály vždy vhodný laboratorní oděv, jednorázové ochranné rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na stránkách www.preanalytix.com, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro tuto sadu.

UPOZORNĚNÍ



NEPŘIDÁVEJTE roztoky bělicích prostředků nebo kyselin přímo do odpadních materiálů z přípravy vzorků.

Vazebný pufr (BR2) a promývací pufr 1 (BR3) obsahují guanidin isothiokyanát, který může při kontaktu s bělidly vytvářet vysoce reaktivní sloučeniny. Pokud se rozlije kapalina obsahující vazebný pufr (BR2) nebo promývací pufr 1 (BR3), vyčistěte zasažené místo vhodným laboratorním detergentem a vodou. Obsahuje-li rozlitá kapalina potenciálně infekční látky, vyčistěte zasažené místo nejprve laboratorním detergentem a vodou a potom roztokem 1 % (obj.) chlornanu sodného (bělidla).

Stabilizační roztok RNA a směs krve ze zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mohou být dezinfikovány pomocí 1 jednotky objemu roztoku bělidla (5% chlornan sodný) na 9 jednotek objemu stabilizačního roztoku RNA a směsi krve.

Odpad vznikající při přípravě vzorku, např. supernatanty po centrifugaci v rámci purifikace RNA, by měl být vždy považován za potenciálně infekční. Proto by měl být odpad před likvidací autoklávován nebo spálen, aby byl infekční materiál zničen. Postupujte v každém případě podle platných předpisů a směrnic pro likvidaci.

Pro jednotlivé komponenty sady PAXgene Blood RNA Kit platí následující pokyny týkající se rizika a bezpečnostních opatření. Informace o bezpečnosti týkající se zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) naleznete v *příručce PAXgene Blood RNA Tube*.

Pufr BR2



Obsahuje guanidin isothiokyanát. Nebezpečí! Zdraví škodlivý při požití. Může být škodlivý při kontaktu s kůží nebo při vdechnutí. Způsobuje vážné poškození očí. Škodlivý pro život ve vodním prostředí s dlouhodobými nepříznivými účinky. Při kontaktu s kyselinami uvolňuje velmi toxický plyn. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. **PŘI ZASAŽENÍ OČÍ:** Opatrně oplachujte vodou po dobu několika minut. Pokud zasažená osoba používá kontaktní čočky, vyjměte je (pokud je to možné). Pokračujte v oplachování. Ihned kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře.

Pufr BR3



Obsahuje: ethanol, guanidin isothiokyanát. Nebezpečí! Hořlavá kapalina a výpary. Způsobuje vážné poškození očí. Při kontaktu s kyselinami uvolňuje velmi toxický plyn. Chraňte před teplem / jiskrami / otevřeným plamenem / horkými povrchy. Zákaz kouření. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. **PŘI ZASAŽENÍ OČÍ:** Opatrně oplachujte vodou po dobu několika minut. Pokud zasažená osoba používá kontaktní čočky, vyjměte je (pokud je to možné). Pokračujte v oplachování. Ihned kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře.

DNáza I



Obsahuje: DNázu. Nebezpečí! Může vyvolat alergickou kožní reakci. Při vdechnutí může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu, případně dechové obtíže. Vyvarujte se vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/výparů/aerosolů. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Používejte ochranný respirátor. POKUD dojde k zasažení nebo důvodné obavě, že došlo k zasažení: Kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře. Přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte ho v klidu v poloze usnadňující dýchání.

Proteináza K



Obsahuje: proteinázu K. Nebezpečí! Způsobuje mírné podráždění kůže. Při vdechnutí může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu, případně dechové obtíže. Vyvarujte se vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/výparů/aerosolů. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Používejte ochranný respirátor. POKUD dojde k zasažení nebo důvodné obavě, že došlo k zasažení: Kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře. Přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte ho v klidu v poloze usnadňující dýchání.

Úvod

Odběr vzorku plné krve je u mnoha molekulárně biologických analýzy celulórní RNA prvním krokem. Hlavním problémem v těchto testech je však nestabilita profilu celulórní RNA *in vitro*. Výzkumy prováděné ve společnosti PreAnalytiX ukázaly, že se počet kopií jednotlivých druhů mRNA v plné krvi může během přepravy nebo skladování při pokojové teplotě změnit více než 1000násobně.* Příčinou je rychlá degradace RNA a indukovaná exprese určitých genů po odběru krve. Takové změny profilu RNA znemožňují spolehlivé studie genové exprese. Metoda zachování profilu exprese RNA během odběru krve a po něm je tedy pro přesné analýzy genové exprese v plné lidské krvi nezbytná.

Princip a popis postupu

Společnost PreAnalytiX vyvinula systém, který umožňuje odběr, stabilizaci, skladování a přepravu vzorků plné lidské krve, společně s rychlým a efektivním protokolem pro purifikaci intracelulórní RNA. Systém vyžaduje použití zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; patenty USA 6,602,718 a 6,617,170) k odběru krve a současné stabilizaci RNA, po které následuje manuální nebo automatizovaná purifikace RNA pomocí sady PAXgene Blood RNA Kit. Manuální i automatizovaný protokol poskytují v podstatě rovnocennou účinnost vzhledem ke kvalitě a výtěžku RNA. Údaje o účinnosti pro manuální (str. 22–29) a automatizovaný (str. 31–35) protokol jsou obsaženy v této příručce.



Produkt QIAGEN QIAcube Connect MDx není dostupný ve všech zemích. Další podrobnosti poskytnete technický servis společnosti QIAGEN.

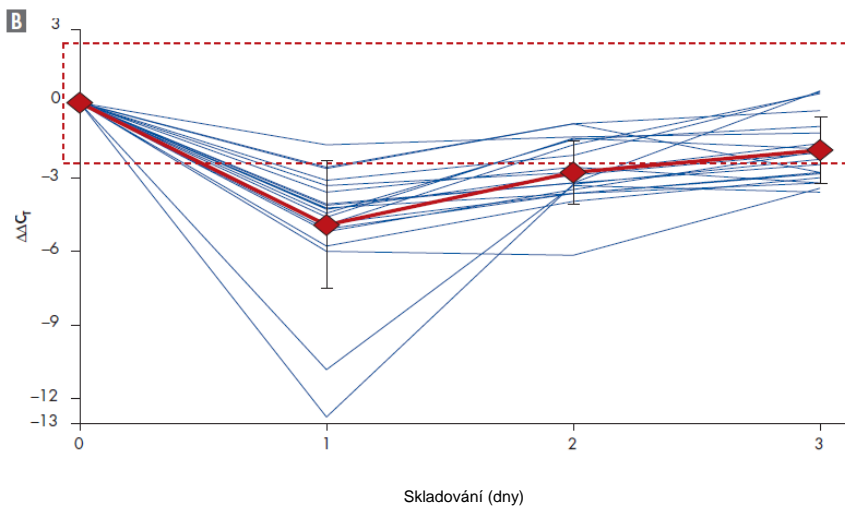
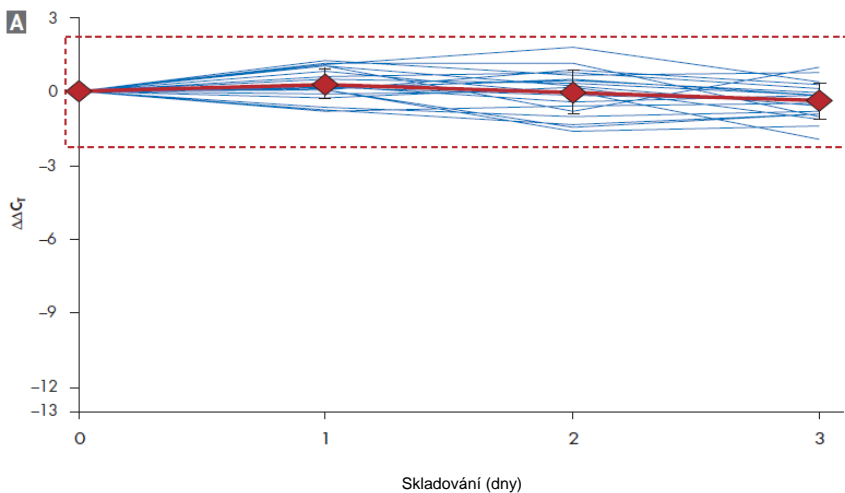
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin. Chem.* **48**, 1883.

Odběr a stabilizace vzorku

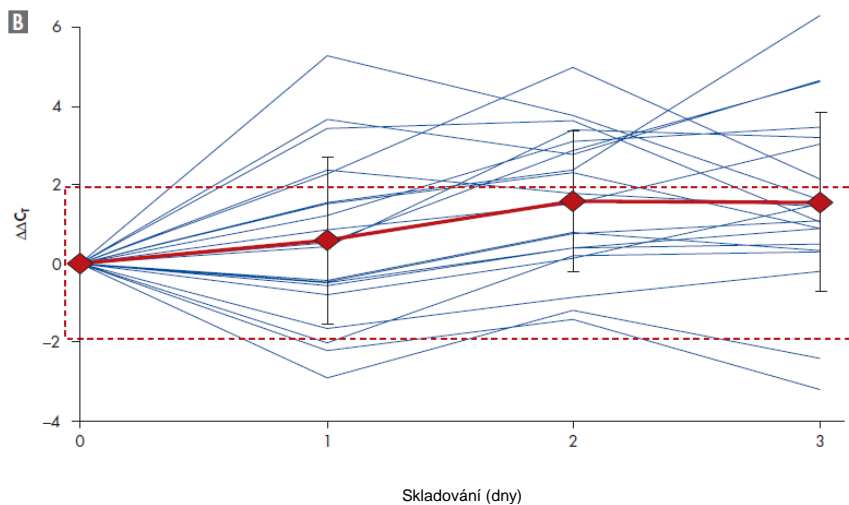
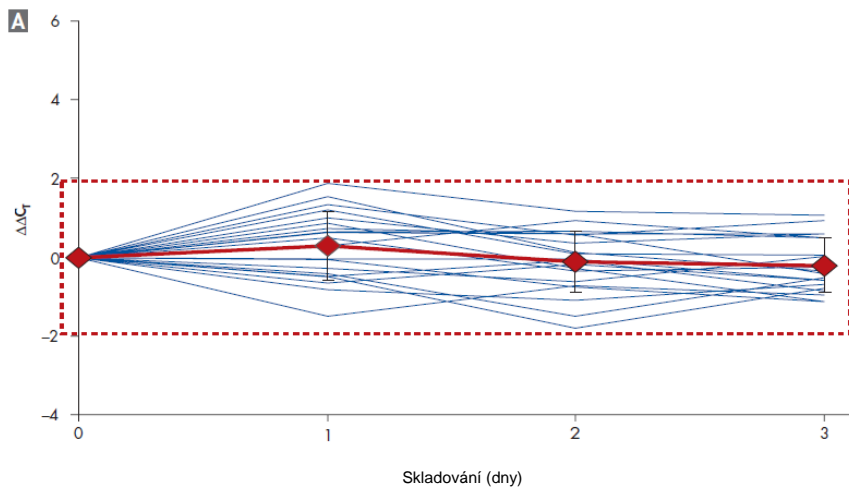
Zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) obsahují originální složení reagensů, které se zakládá na patentované metodě stabilizace RNA. Toto složení reagensů chrání molekuly RNA před degradací RNázou a redukuje změny genové exprese *ex vivo* na minimum. Zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) pro odběr plné lidské krve zaručují stabilizaci celulární RNA až 3 dny při teplotě 18–25 °C (obrázek 1 a 2, strana 15 a 16) nebo až 5 dnů při teplotě 2–8 °C (obrázek 3 a 4, strana 17 a 18). Aktuálně dostupné údaje prokazují stabilitu celulární RNA minimálně 11 let při teplotě -20 °C, případně -70 °C*. Další informace o právě probíhajících studiích, které posuzují stabilitu po ještě delší dobu, získáte u technických služeb společnosti QIAGEN.

Skutečná doba stabilizace RNA se může měnit podle druhu celulární RNA a použité následné aplikace. Vzhledem k tomu, že byl pro stabilizační podmínky validován jen omezený počet transkriptů (transkripty genů FOS a IL1B), charakteristika funkčních vlastností nebyla stanovena pro všechny transkripty. Uživatelé sady by měli zhodnotit vlastní data a údaje výrobce, aby určili, zda je validace nezbytná i pro jiné transkripty.

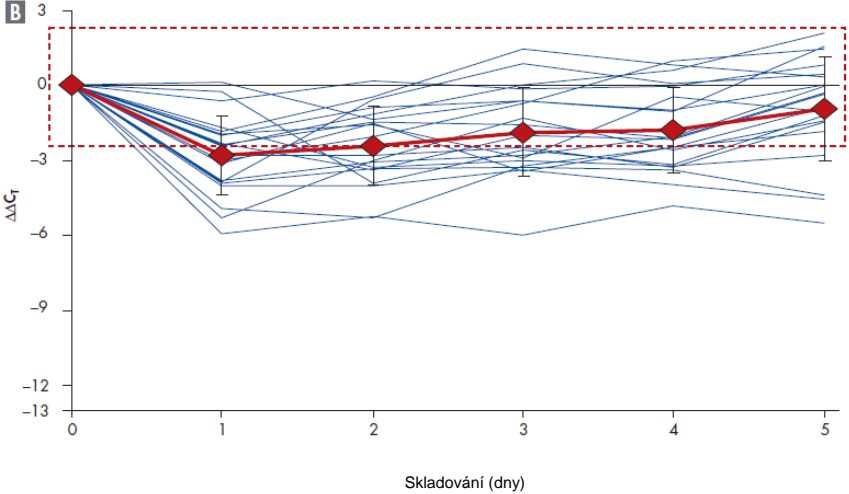
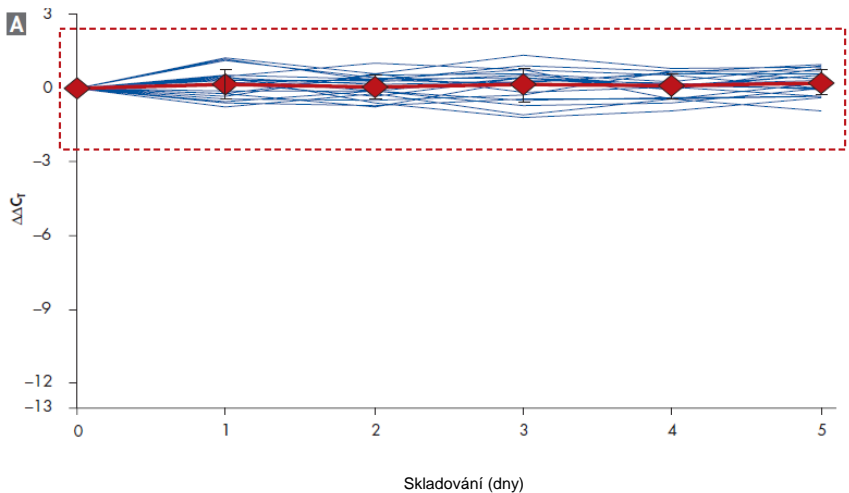
* Právě probíhá dlouhodobá studie uchovávání krve ve zkumavkách PAXgene Blood RNA Tubes.



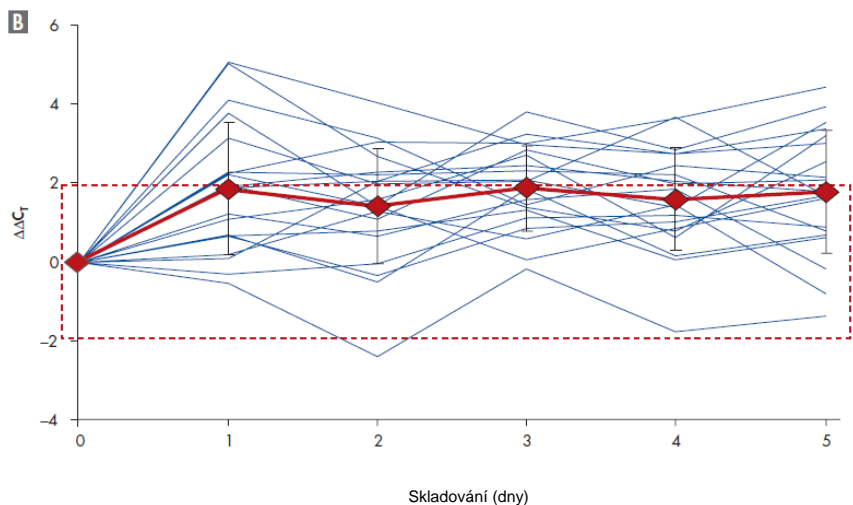
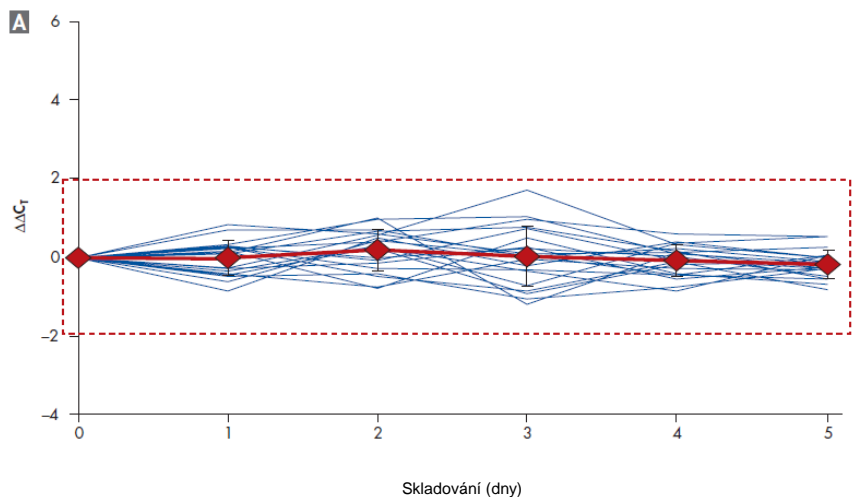
Obrázek 1. Stabilita RNA v krevních vzorcích při teplotě 18–25 °C: FOS. Krev byla odebrána 10 dárčům a před purifikací celkové RNA uskladněna při teplotě 18–25 °C po uvedeném počtu dnů. Všechny vzorky byly odebrány v duplikátech. [A] Odběr a skladování krve ve zkumavkách PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) a purifikace celkové RNA pomocí sady PAXgene Blood RNA Kit. [B] Odběr a skladování krve ve standardních odběrových zkumavkách (EDTA jako antikoagulant), purifikace celkové RNA standardní extrakční metodou (s organickými rozpouštědly) a čištění RNA pomocí silikátové membrány. Relativní koncentrace transkriptů FOS byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za použití 18S-rRNA jako interního standardu. Zaneseny jsou hodnoty všech analyzovaných vzorků s průměrem a směrodatnou odchylkou. Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýzy ($2,34 C_T$).



Obrázek 2. Stabilita RNA v krevních vzorcích při teplotě 18–25 °C: IL1B. Odběr krevních vzorků a purifikace celkové RNA po uskladnění při 18–25 °C proběhly tak, jak je popsáno na obrázku 1. Relativní koncentrace transkriptů IL1B byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za použití 18S-rRNA jako interního standardu. Zaneseny jsou hodnoty všech analyzovaných vzorků s průměrem a směrodatnou odchylkou. Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýzy (1,93 C_T).



Obrazek 3. Stabilita RNA v krevnich vzorcich pri teplotě 2-8°C: FOS. Krev byla odebrána 10 dárcům a před purifikací celkové RNA uskladněna při teplotě 2-8°C po uvedeném počtu dnů. Všechny vzorky byly odebrány v duplikátech. **[A]** Odběr a skladování krve ve zkumavkách PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) a purifikace celkové RNA pomocí sady PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Odběr a skladování krve ve standardních odběrových zkumavkách (EDTA jako antikoagulant), purifikace celkové RNA standardní extrakční metodou (s organickými rozpouštědly) a čištění RNA pomocí silikátové membrány. Relativní koncentrace transkriptů FOS byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za použití 18S-rRNA jako interního standardu. Zaneseny jsou hodnoty všech analyzovaných vzorků s průměrem a směrodatnou odchylkou. Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýzy ($2,34 C_T$).



Obrazek 4. Stabilita RNA v krevních vzorcích při teplotě 2-8°C: IL1B. Odběr krevních vzorků a purifikace celkové RNA po uskladnění při 2–8 °C proběhly tak, jak je popsáno na obrazku 3. Relativní koncentrace transkriptů IL1B byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za použití 18S-rRNA jako interního standardu. Zaneseny jsou hodnoty všech analyzovaných vzorků s průměrem a směrodatnou odchylkou. Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýzy (1,93 C_T).

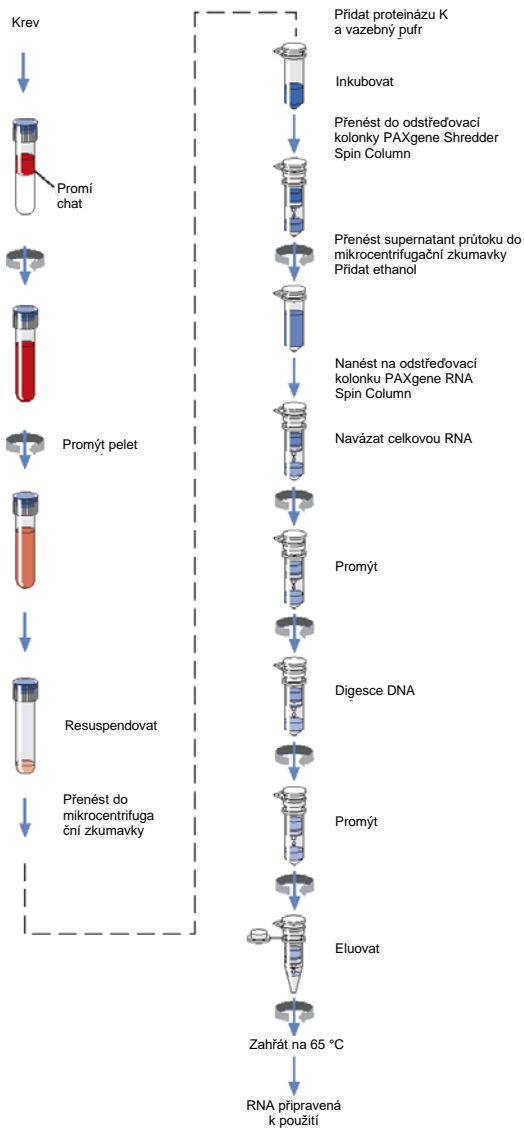
Koncentrace a purifikace RNA

Sada PAXgene Blood RNA Kit je určena k purifikaci celkové RNA z 2,5 ml plné lidské krve, která byla odebrána do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Metoda je jednoduchá a může být provedena za užití manuálního i automatizovaného postupu (viz obrázky 5 a 10, strany 20 a 30). Purifikace začíná v obou protokolech centrifugací, při které nukleové kyseliny ve zkumavce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sedimentují. Pelet se promyje a resuspenduje a následuje manuální nebo automatizovaná purifikace RNA. Oba protokoly v podstatě postupují podle stejných kroků a pracují se stejnými komponenty sady.

Manuální purifikace RNA

Resuspendovaný pelet se inkubuje v optimalizovaných pufrech spolu s proteinázou K (PK), aby se navodila proteinová digesce. Dodatečná centrifugace pomocí odstředovací kolonky PAXgene Shredder (PSC) slouží k homogenizaci buněčného lyzátu a k odstranění zbylého buněčného odpadu. Supernatant průtokem se přenesení do nové mikrocentrifugační zkumavky. Přidáním ethanolu se nastaví optimální vazební podmínky a lyzát se přenesení do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC). Při následné krátké centrifugaci se RNA selektivně naváže na silikagelovou membránu PAXgene, kdežto kontaminanty jí projdou. Zbylé kontaminanty se odstraní několika účinnými promývacími kroky. Mezi prvním a druhým promývacím krokem se membrána inkubuje DNázou I (RNFD), aby se odstranily případné navázané zbytky DNA. Po promývacích krocích se RNA eluuje v elučním pufru (BR5) a denaturuje teplem.

Celková RNA izolovaná pomocí systému PAXgene Blood RNA System je čistá. Při použití manuálního protokolu leží hodnoty A_{260}/A_{280} mezi 1,8 a 2,2; podíl genomové DNA tvoří u $\geq 95\%$ všech vzorků $\leq 1,0\%$ (w/w), jak bylo změřeno pomocí kvantitativní real-time PCR u jedné sekvence genu beta aktinu. Přinejmenším 95 % vzorků nevykazovalo za užití 30 % eluátu žádnou inhibici RT-PCR.

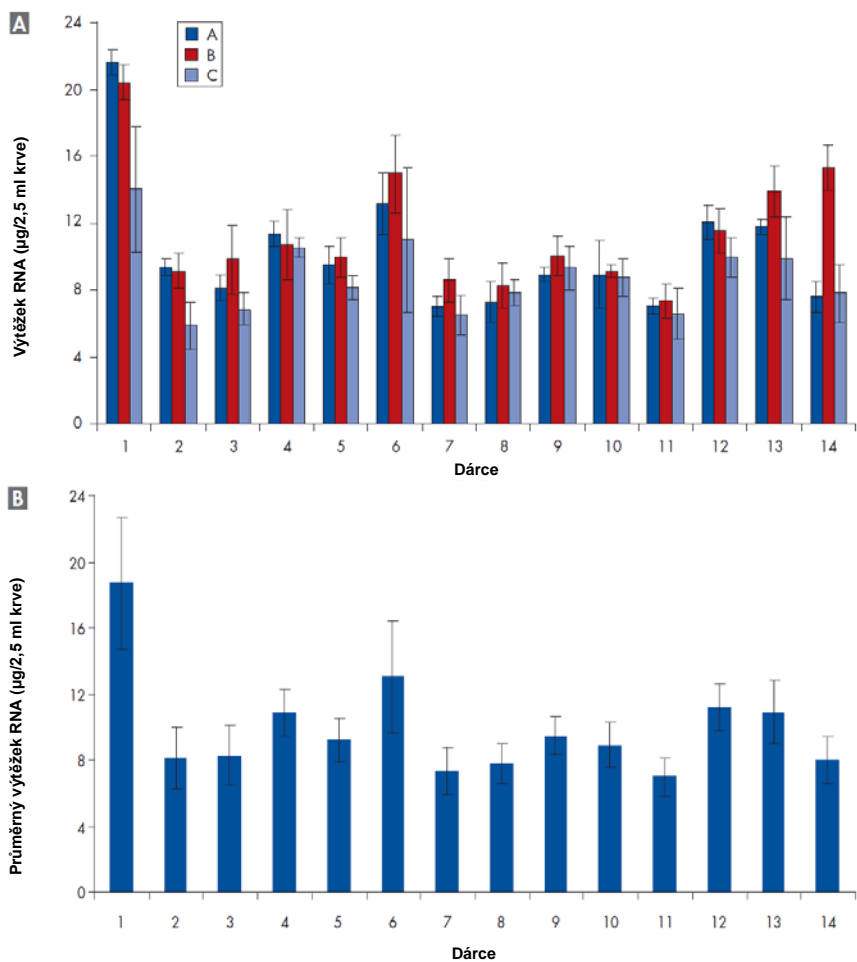


Obrázek 5. Manuální postup PAXgene Blood RNA.

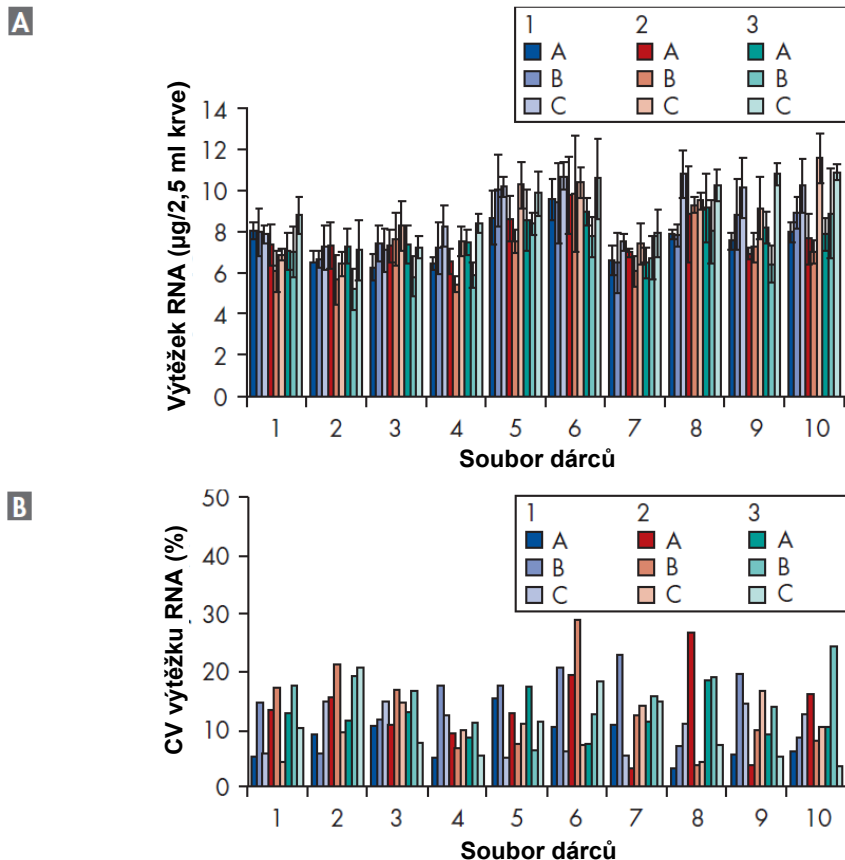
Při použití manuálního protokolu je průměrná doba přípravy vzorku (určeno na základě 12 provedených příprav vzorků) přibližně 90 minut*, přičemž doba manipulace činí pouze 40 minut. U minimálně 95 % zpracovaných vzorků byl dosažen výtěžek RNA $\geq 3 \mu\text{g}$ z 2,5 ml plné lidské krve zdravých dárců. Protože výtěžky silně závisí na dárcích, mohou se jednotlivé výtěžky lišit. Systém PAXgene Blood RNA System poskytuje při testování jednotlivých osob reprodukovatelné a opakovatelné výtěžky (viz obrázek 6 a 7 na straně 22 a 23), stejně jako reprodukovatelné a opakovatelné výsledky RT-PCR (viz obrázek 8 a 9 strana 27 a 28), takže v klinicko-diagnostických testech vykazuje vysokou robustnost.

Obrázek 6 (strana 22) zobrazuje celkovou opakovatelnost a reprodukovatelnost systému PAXgene Blood RNA System. V dalších studiích byl zkoumán vliv různých šarží sady PAXgene Blood RNA Kit, jednak vliv laborantů provádějících testy na reprodukovatelnost výtěžku RNA a výsledků RT-PCR v reálném čase. Protože byly pro tyto testy použity sdružené krevní vzorky, nikoli individuální vzorky odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), výsledky těchto pokusů neodráží opakovatelnost celého systému, která zohledňuje také rozdíly při odběru krve, nýbrž pouze opakovatelnost přípravy vzorku (viz obrázek 7 na straně 23).

* Celkové trvání běhu včetně přímé manipulace se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugace, promývání pelet a resuspendování pelet).



Obrázek 6. Reprodukovatelná a opakovatelná purifikace RNA. Čtyřnásobná stanovení krevních vzorků 14 dárců byla manuálně provedena 3 různými laboranty (A, B, C). Byly použity tři různé soupravy laboratorních přístrojů a jiných pomocných prostředků, přičemž každý laborant používal pro zpracování vzorků vždy jednu a tu samou soupravu přístrojů. **[A]** Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výtěžku RNA pro každý replikát vzorku stejného dárcе zpracovaného různými laboranty. **[B]** Dvanáct replikátů krevních vzorků každého ze 14 dárců byly zpracovány 3 různými laboranty. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výtěžku RNA pro každý vzorek stejného dárcе zpracovaný všemi laboranty. U všech vzorků RNA ležel poměr absorbancí A_{260}/A_{280} v oblasti od 1,8 do 2,2.



Obrázek 7. Opakovatelnost a reprodukovatelnost výtěžku RNA u různých laborantů a různých šarží sady PAXgene Blood RNA Kit za užití sdružených krevních vzorků. Krevní vzorky 30 různých dárců byly odebrány do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 zkumavek na dárce, celkově 360 zkumavek). Obsah všech zkumavek od 3 dárců byl sdružen a následně znovu rozpíjetován na 36 vzorků. Těchto 36 vzorků na jeden soubor 3 dárců bylo manuálně zpracováno 3 různými laboranty. Každý laborant použil pro extrakci 3 různé šarže sady PAXgene Blood RNA Kit a zpracoval čtyři replikáty z každého z 10 souborů dárců. [A] Výtěžek RNA a směrodatná odchylka pro každou kombinaci laborant-šarže. Čtyřikrát opakované zpracování krevních vzorků z 10 souborů dárců bylo provedeno 3 různými laboranty (A, B, C) pomocí každé ze tří šarží sady (1, 2, 3). Zobrazeny jsou průměrné výtěžky (sloupce) a směrodatné odchylky (chybové úsečky) na jedno čtyřnásobné stanovení ze stejného souboru dárců pro různé laboranty a šarže sady. [B] Variační koeficient (CV) výtěžku RNA na jeden soubor dárců pro všechny kombinace laborant-šarže (A, B, C; 1, 2, 3); vypočítáno z průměrných výtěžků a směrodatných odchylek výtěžků zobrazených na obrázku 7A.

Tabulka 1A. Reprodukovatelnost v rámci každé šarže a každého uživatele pro zvolené soubory dárců (1, 6, 9, 10)

| Kombinace dat | Soubor dárců 1 5,1 x 10 ⁶ buněk/ml | | | Soubor dárců 6 6,5 x 10 ⁶ buněk/ml | | |
|---------------------|--|---------|--------|--|---------|--------|
| | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Šarže 1, uživatel A | 8,03 | 0,42 | 5 | 9,55 | 0,99 | 10 |
| Šarže 1, uživatel B | 7,98 | 1,17 | 15 | 9,38 | 1,94 | 21 |
| Šarže 1, uživatel C | 7,87 | 0,45 | 6 | 10,71 | 0,65 | 6 |
| Šarže 2, uživatel A | 7,32 | 0,98 | 13 | 9,78 | 1,89 | 19 |
| Šarže 2, uživatel B | 6,09 | 1,04 | 17 | 9,82 | 2,83 | 29 |
| Šarže 2, uživatel C | 6,87 | 0,31 | 4 | 10,37 | 0,74 | 7 |
| Šarže 3, uživatel A | 7,04 | 0,90 | 13 | 8,96 | 0,68 | 8 |
| Šarže 3, uživatel B | 6,98 | 1,22 | 17 | 7,73 | 0,97 | 13 |
| Šarže 3, uživatel C | 8,78 | 0,89 | 10 | 10,59 | 1,94 | 18 |
| Kombinace dat | Soubor dárců 9 8,4 x 10 ⁶ buněk/ml | | | Soubor dárců 10 10,2 x 10 ⁶ buněk/ml | | |
| | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Šarže 1, uživatel A | 7,52 | 0,41 | 6 | 7,96 | 0,49 | 6 |
| Šarže 1, uživatel B | 8,82 | 1,72 | 19 | 8,90 | 0,76 | 9 |
| Šarže 1, uživatel C | 10,14 | 1,46 | 14 | 10,22 | 1,29 | 13 |
| Šarže 2, uživatel A | 6,92 | 0,27 | 4 | 7,63 | 1,23 | 16 |
| Šarže 2, uživatel B | 7,20 | 0,71 | 10 | 7,00 | 0,56 | 8 |
| Šarže 2, uživatel C | 9,14 | 1,52 | 17 | 11,56 | 1,21 | 10 |
| Šarže 3, uživatel A | 8,18 | 0,76 | 9 | 7,85 | 0,82 | 10 |
| Šarže 3, uživatel B | 6,41 | 0,88 | 14 | 8,88 | 2,17 | 24 |
| Šarže 3, uživatel C | 10,78 | 0,56 | 5 | 10,88 | 0,37 | 3 |

Tabulka 1B. Reprodukovatelnost v rámci každého uživatele a mezi všemi šaržemi pro zvolené soubory dárců (1, 6, 9, 10)

| Kombinace dat | Soubor dárců 1 5,1 x 10 ⁶ buněk/ml | | | Soubor dárců 6 6,5 x 10 ⁶ buněk/ml | | |
|---------------------------|--|---------|--------|--|---------|--------|
| | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Uživatel A, všechny šarže | 7,46 | 0,85 | 11 | 9,43 | 1,22 | 13 |
| Uživatel B, všechny šarže | 7,02 | 1,31 | 19 | 8,98 | 2,09 | 23 |
| Uživatel C, všechny šarže | 7,84 | 0,98 | 13 | 10,56 | 1,15 | 11 |
| Kombinace dat | Soubor dárců 9 8,4 x 10 ⁶ buněk/ml | | | Soubor dárců 10 10,2 x 10 ⁶ buněk/ml | | |
| | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Uživatel A, všechny šarže | 7,54 | 0,72 | 10 | 7,81 | 0,82 | 11 |
| Uživatel B, všechny šarže | 7,48 | 1,50 | 20 | 8,26 | 1,54 | 19 |
| Uživatel C, všechny šarže | 10,02 | 1,34 | 13 | 10,89 | 1,10 | 10 |

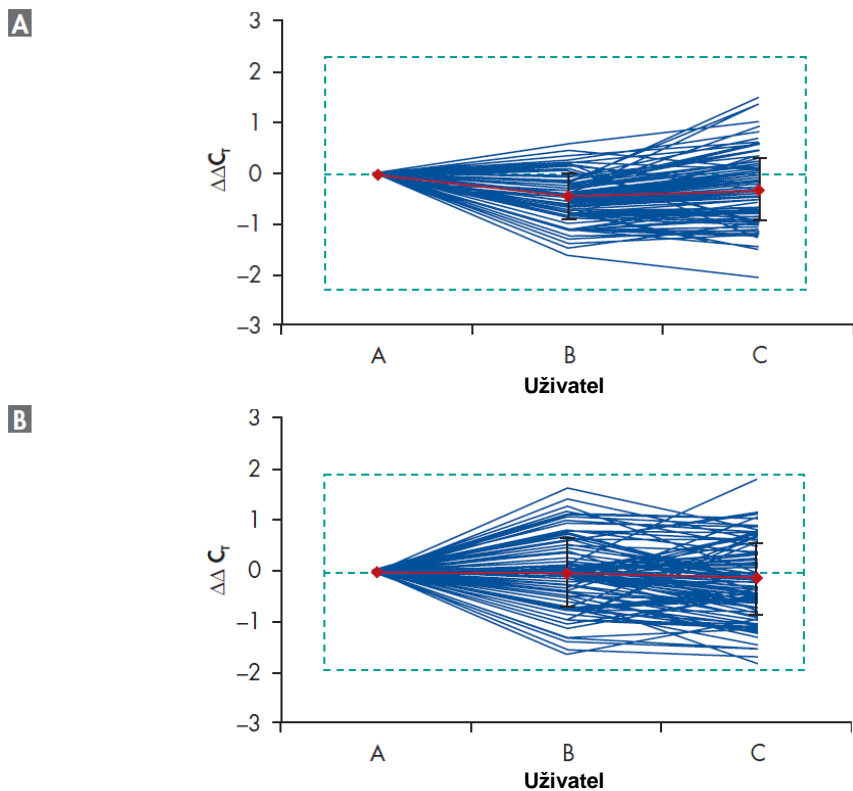
Tabulka 1C. Reprodukovatelnost v rámci každé šarže a mezi všemi uživateli pro zvolené soubory dárců (1, 6, 9, 10)

| Kombinace dat | Soubor dárců 1 5,1 x 10 ⁶ buněk/ml | | | Soubor dárců 6 6,5 x 10 ⁶ buněk/ml | | |
|----------------------------|--|---------|--------|--|---------|--------|
| | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Šarže 1, všichni uživatelé | 7,96 | 0,69 | 9 | 9,88 | 1,34 | 14 |
| Šarže 2, všichni uživatelé | 6,76 | 0,93 | 14 | 9,99 | 1,84 | 18 |
| Šarže 3, všichni uživatelé | 7,60 | 1,27 | 17 | 9,09 | 1,71 | 19 |
| Kombinace dat | Soubor dárců 9 8,4 x 10 ⁶ buněk/ml | | | Soubor dárců 10 10,2 x 10 ⁶ buněk/ml | | |
| | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Šarže 1, všichni uživatelé | 8,83 | 1,63 | 19 | 9,02 | 1,27 | 14 |
| Šarže 2, všichni uživatelé | 7,75 | 1,36 | 18 | 8,73 | 2,31 | 26 |
| Šarže 3, všichni uživatelé | 8,46 | 1,99 | 24 | 9,20 | 1,80 | 20 |

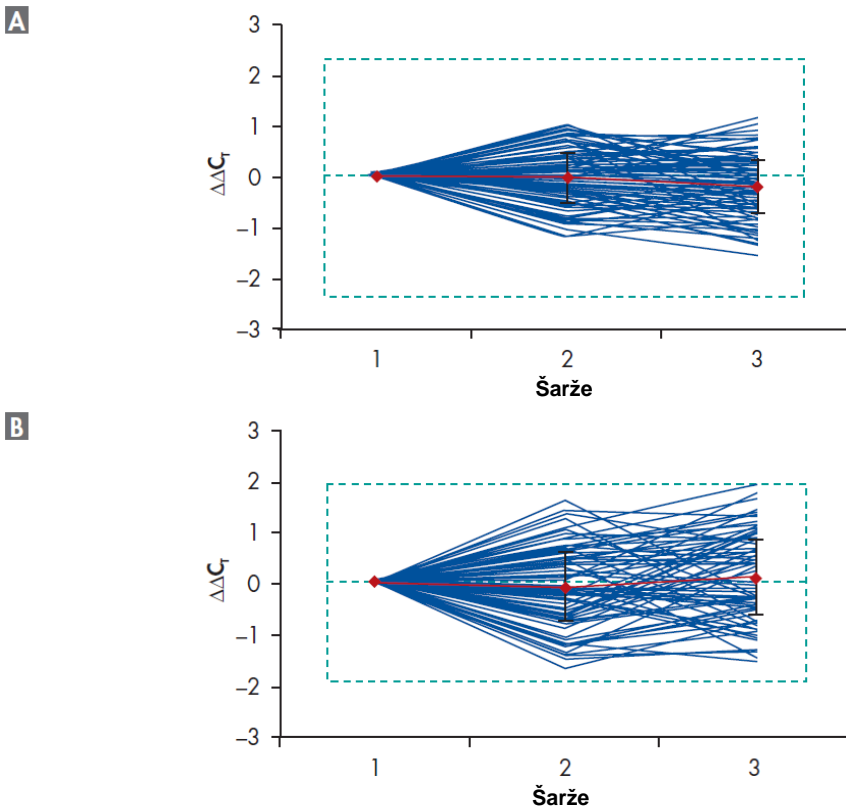
Tabulka 1D. Reprodukovatelnost mezi všemi šaržemi a všemi uživateli pro zvolené soubory dárců (1, 6, 9, 10)

| Kombinace dat | Soubor dárců 1 5,1 x 10 ⁶ buněk/ml | | | Soubor dárců 6 6,5 x 10 ⁶ buněk/ml | | |
|----------------------------|--|---------|--------|--|---------|--------|
| | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Šarže 1, všichni uživatelé | 7,44 | 1,09 | 15 | 9,66 | 1,65 | 17 |
| Kombinace dat | Soubor dárců 9 8,4 x 10 ⁶ buněk/ml | | | Soubor dárců 10 10,2 x 10 ⁶ buněk/ml | | |
| | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) | Průměrný výtěžek (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Šarže 1, všichni uživatelé | 8,35 | 1,70 | 20 | 8,99 | 1,80 | 20 |

Detailní analýza 4 reprezentativních souborů dárců. Soubory byly vybrány podle počtu leukocytů a odrážejí nejvyšší, střední a nejnižší hodnotu normálního rozsahu počtu leukocytů ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytů/ml). Počet leukocytů představuje průměrnou hodnotu 3 testů počtu leukocytů od 3 dárců na jeden soubor dárců.



Obrázek 8. Reprodukovatelnost RT-PCR – mezi uživateli. Vzorky RNA purifikované v experimentu popsaném na obr. 7 byly použity pro real-time RT-PCR. Relativní koncentrace transkriptu **[A]** FOS a **[B]** IL1B byly určeny pomocí duplexní real-time RT-PCR za užití 18S-rRNA jako interního standardu. Zobrazeny jsou hodnoty všech vzorků, a sice v poměru k hodnotám pro uživatele A (10 souborů dárců x 3 šarže sady x 4 replikáty = 120 souborů dat pro každý gen) s průměrem (červená čára) a směrodatnou odchylkou (černá úsečka). Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýz (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Obrázek 9. Reprodukovatelnost RT-PCR – mezi šaržemi sady. Vzorky RNA purifikované v experimentu popsaném na obr. 7 byly použity pro real-time RT-PCR. Relativní koncentrace transkriptu **[A]** FOS a **[B]** IL1B byly určeny pomocí duplexní real-time RT-PCR za užití 18S-rRNA jako interního standardu. Zobrazeny jsou hodnoty všech vzorků, a sice v poměru k hodnotám pro šarži sady 1 (10 souborů dárců x 3 šarže sady x 4 replikáty = 120 souborů dat pro každý gen) s průměrem (červená čára) a směrodatnou odchylkou (černá úsečka). Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýz (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Tabulka 2. Souhrn dat RT-PCR z obrázků 8 a 9

| Testovací systém | Rozbor FOS/18S-rRNA | | Rozbor IL1B/18S-rRNA | |
|--|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| | Průměr ($\Delta\Delta C_T$) | \pm SD ($\Delta\Delta C_T$) | Průměr ($\Delta\Delta C_T$) | \pm SD ($\Delta\Delta C_T$) |
| Reprodukovatelnost v rámci každého uživatele a mezi všemi šaržemi | | | | |
| Všichni uživatelé, šarže 1 – šarže 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Všichni uživatelé, šarže 1 – šarže 2 | -0,03 | 0,48 | -0,07 | 0,66 |
| Všichni uživatelé, šarže 1 – šarže 3 | -0,21 | 0,52 | 0,11 | 0,71 |
| Reprodukovatelnost v rámci každého uživatele a mezi všemi šaržemi | | | | |
| Všechny šarže, uživatel A – uživatel A | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Všechny šarže, uživatel A – uživatel B | -0,46 | 0,44 | -0,06 | 0,69 |
| Všechny šarže, uživatel A – uživatel C | -0,31 | 0,60 | -0,15 | 0,71 |

Uživatel: Laboratorní technik, který prováděl experimenty.

Šarže: Číslo šarže použité sady v této studii.

SD: Směrodatná odchylka.

Zobrazeny jsou průměry hodnot $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) a směrodatné odchylky dat znázorněných na obrázcích 8 a 9.

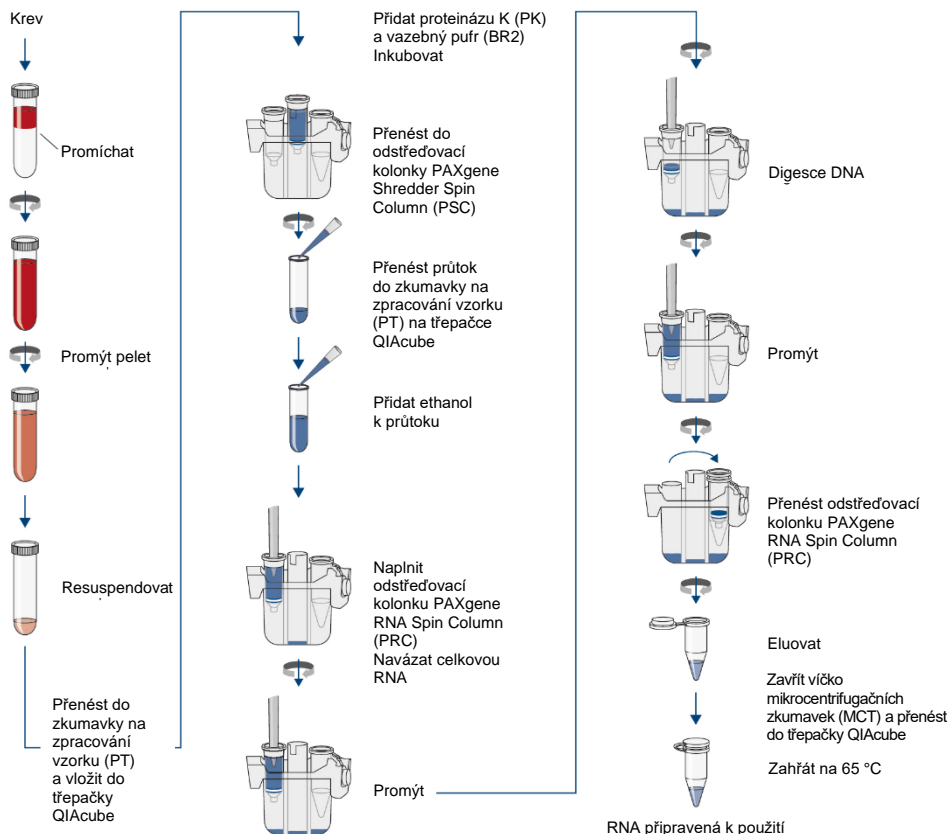
Automatizovaná purifikace RNA

Purifikace RNA z krve na přístroji QIAGEN QIAcube Connect MDx nebo klasickém přístroji QIAGEN QIAcube (dále jako QIAcube). Inovativní přístroje QIAcube využívají pokročilou technologii pro zpracování centrifugačních kolon QIAGEN, které umožňují bezproblémovou integraci automatizované přípravy vzorku s nízkou propustností do pracovního procesu laboratoře. Příprava vzorku pomocí přístrojů QIAcube dodržuje stejný postup jako manuální proces (tj. lýza, vázání, promytí a eluce), což vám umožní použít soupravu PAXgene Blood RNA Kit k purifikaci vysoce kvalitní RNA.



Obrázek 10. QIAcube Connect MDx.

Protokol automatizované purifikace RNA obsahuje 2 části (resp. protokoly) „PAXgene Blood RNA Part A“ a „PAXgene Blood RNA Part B“, mezi nimiž je krátký krok vyžadující manuální zásah (viz obrázek 11, strana 31).



Obrázek 11. Automatizovaný postup PAXgene Blood RNA.

Centrifugovaný, promytý a resuspendovaný pelet nukleové kyseliny (viz „Koncentrace a purifikace RNA“, strana 19) se přeneše ze zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) do zkumavek na zpracování vzorku (PT), které jsou umístěny v termostřepačce na pracovní desce přístrojů QIAcube. Laborant z nabídky vybere a spustí protokol „PAXgene Blood RNA Part A“. Přístroje QIAcube provedou kroky protokolu až po eluci RNA v elučním pufru (BR5). Laborant přeneše mikrocentrifugační zkumavky (MCT) obsahující purifikovanou RNA do termostřepačky přístrojů QIAcube. Z nabídky vybere a spustí protokol „PAXgene Blood RNA Part B“, přičemž tepelná denaturace proběhne v přístrojích QIAcube.

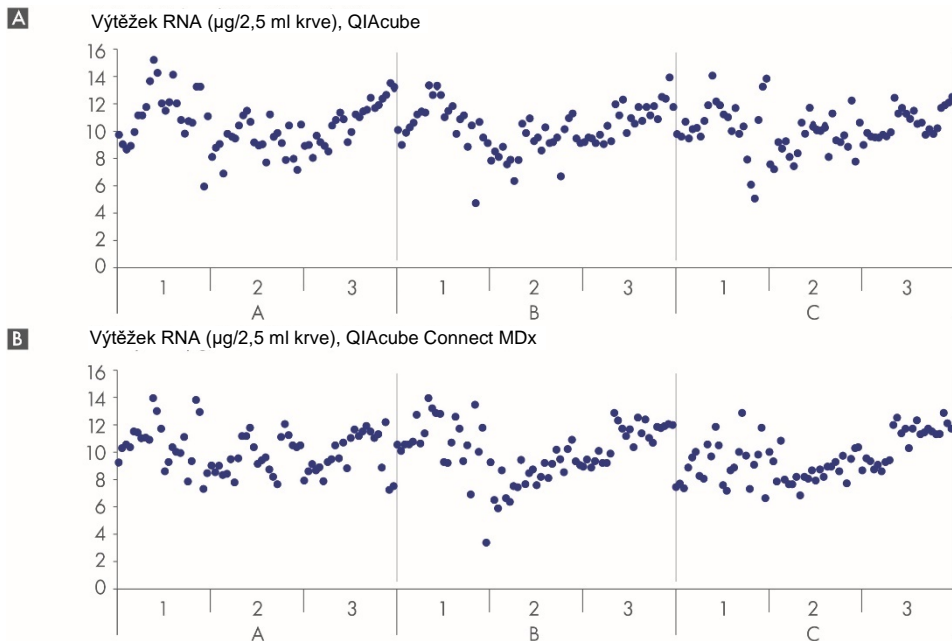
Průměrná doba přípravy vzorku (stanovená na základě příprav 12 vzorků) je 151 minut*, přičemž ve srovnání s manuálním protokolem zahrnuje podstatně méně času přímé práce se systémem.

U minimálně 95 % zpracovaných vzorků byl dosažen výtěžek RNA $\geq 3 \mu\text{g}$ z 2,5 ml plné lidské krve zdravých dárců. Obrázek 12 (strana 33) uvádí výtěžky RNA ze všech 216 vzorků, které byly za užití automatizovaného protokolu zpracovány 3 laboranty se 3 šaržemi sady. Protože byly pro tyto testy použity sdružené krevní vzorky, nikoli individuální vzorky odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), výsledky neodráží výtěžky RNA očekávané u individuálních vzorků z jednotlivých odběrů krve. Protože výtěžky silně závisí na dárcích, mohou se jednotlivé výtěžky lišit (obrázek 12, strana 33).

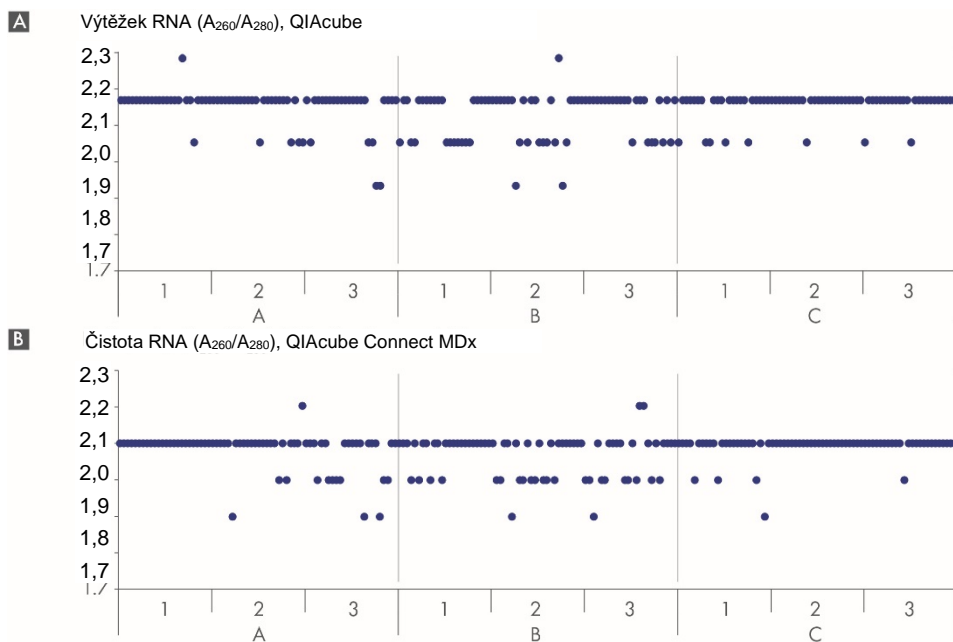
Přinejmenším 95 % vzorků nevykazovalo za užití 30 % eluátu žádnou inhibici RT-PCR. U automatizovaného protokolu nebyly detekovány žádné křížové kontaminace mezi vzorky, jak prokázala kvantitativní RT-PCR v reálném čase u sekvencí transkriptů ABL1 a FOS v RNA negativních vzorcích (voda) spárovaných s RNA pozitivními vzorky (plná lidská krev) ve stejném běhu.

RNA izolovaná pomocí systému PAXgene Blood RNA System a automatizovaného protokolu je vysoce čistá, jak ukazuje nepřítomnost inhibice RT-PCR a hodnoty A_{260}/A_{280} mezi 1,8 a 2,2. Podíl genomové DNA tvoří u $\geq 95 \%$ všech vzorků $\leq 1,0 \%$ (w/w), jak bylo změřeno pomocí kvantitativní real-time PCR u jedné sekvence genu beta aktinu. Obrázky 13 a 14 (strany 34 a 35) znázorňují hodnoty A_{260}/A_{280} a relativní genomovou DNA všech 216 vzorků připravených pomocí automatizovaného protokolu 3 laboranty se 3 šaržemi.

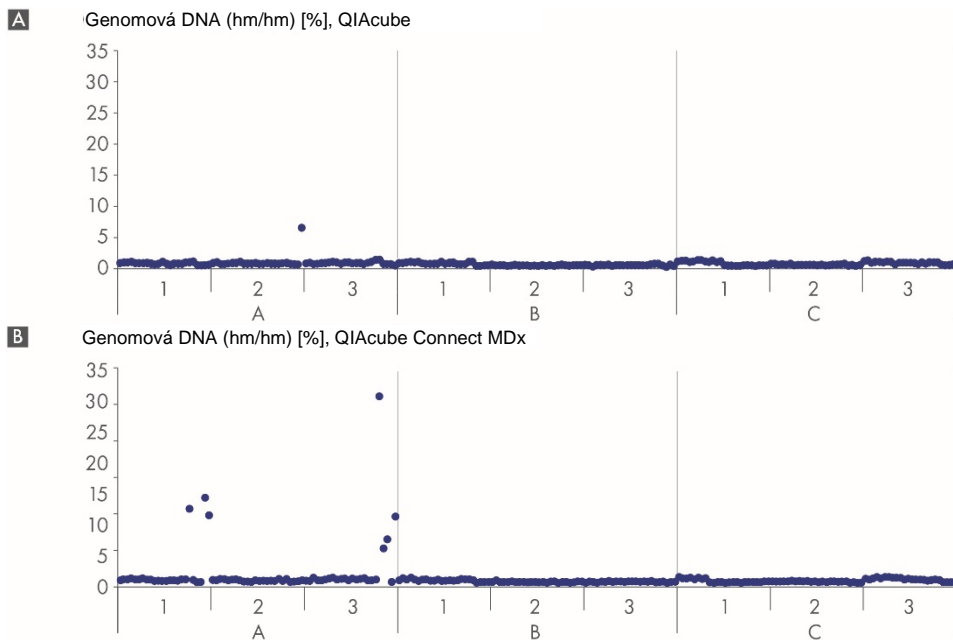
* Celkové trvání běhu včetně přímé manipulace se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugace, promývání pelet a resuspendování pelet).



Obrázek 12. Výtěžek RNA – automatizované zpracování A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Vzorky krve od jednotlivých dárců byly odebrány do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Obsah zkumavek byl sdružen do 6 souborů dárců a následně znovu rozpipetován. Celkem 216 zkumavek (tj. 36 v každém souboru) bylo zpracováno 3 různými laboranty (A, B, C). Každý laborant použil pro automatizovanou extrakci pomocí několika přístrojů QIAcube a QIAcube Connect MDx tři různé šarže (1, 2, 3) sady PAXgene Blood RNA Kit a zpracoval čtyři replikáty z každého z 6 souborů dárců. Zobrazeny jsou výtěžky RNA všech jednotlivých vzorků na každou kombinaci laborant-šarže.

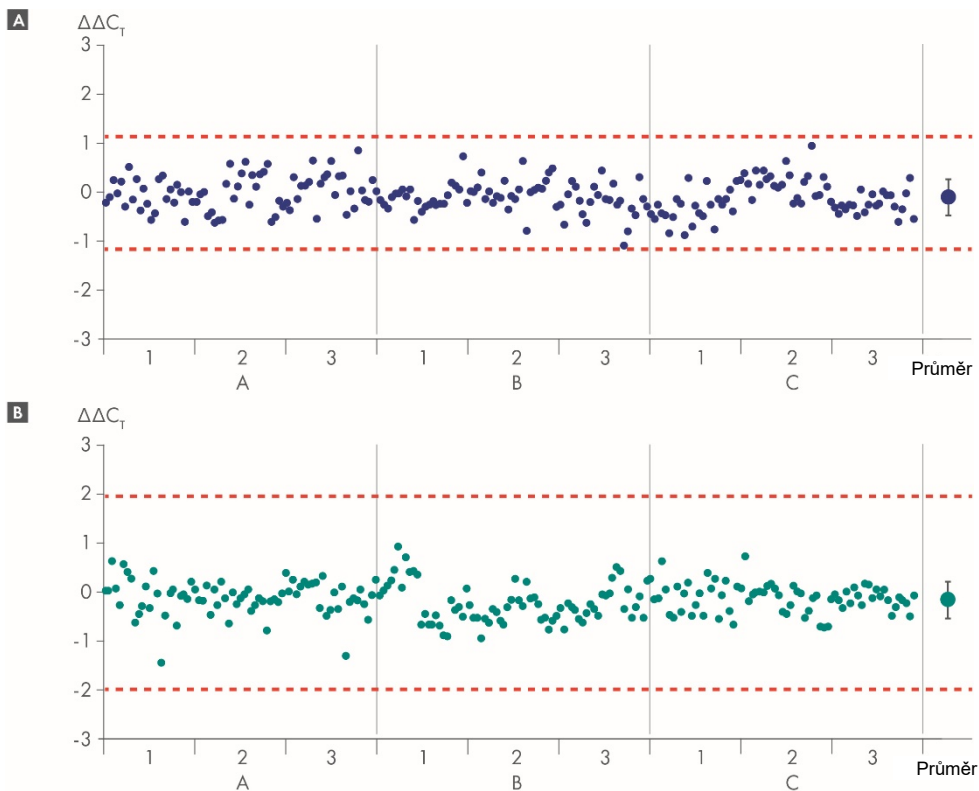


Obrázek 13. Čistota RNA (hodnoty A_{260}/A_{280}) – automatizované zpracování. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx RNA byla v rámci experimentu popsaném na obrázku 12 purifikována 3 různými laboranty (A, B, C) za užití 3 různých šarží (1, 2, 3) sady PAXgene Blood RNA Kit s několika přístroji QIAcube a QIAcube Connect MDx. Zobrazeny jsou hodnoty A_{260}/A_{280} všech jednotlivých vzorků na každou kombinaci laborant-šarže.

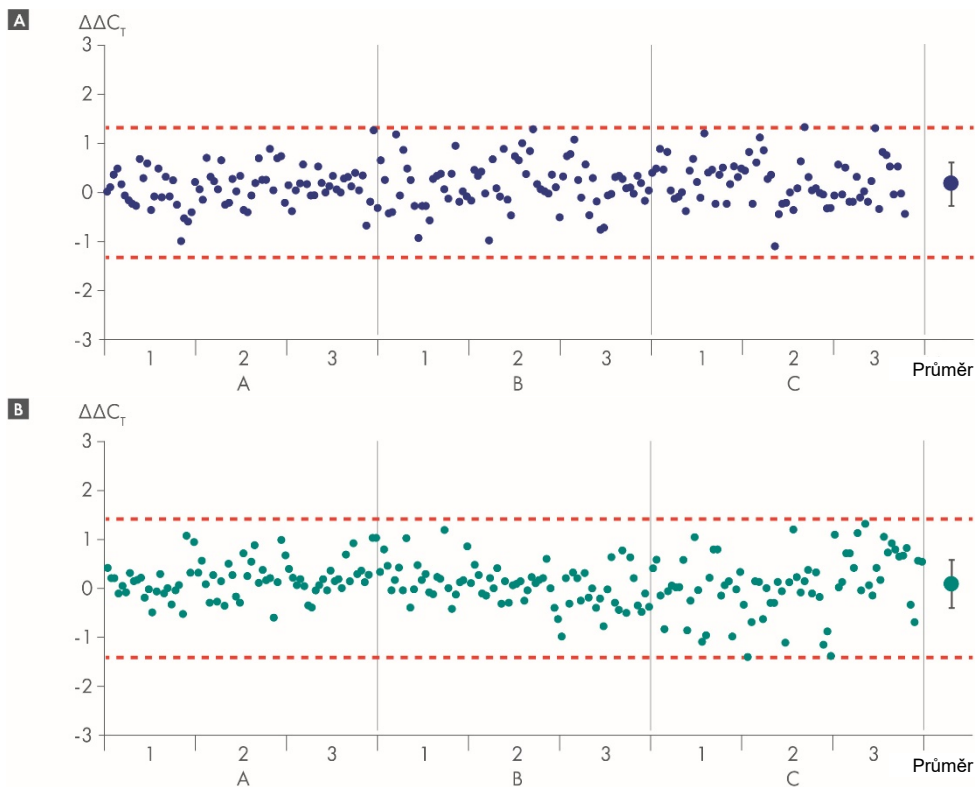


Obrázek 14. Čistota RNA (% kontaminace genomovou DNA) – automatizované zpracování, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. RNA byla v rámci experimentu popsaném na obrázku 12 purifikována 3 různými laboranty (A, B, C) za užití 3 různých šarží (1, 2, 3) sady PAXgene Blood RNA Kit s několika přístroji QIAcube a QIAcube Connect MDx. Zobrazeno je množství genomové DNA (hm/hm) ve všech jednotlivých vzorcích pro každou kombinaci laborant-šarže.

Automatizovaný protokol purifikace RNA za užití systému PAXgene Blood RNA System poskytuje vysoce reprodukovatelné a opakovatelné výsledky RT-PCR, jak je znázorněno na obrázku 15 a obrázku 16 (strana 36 a 37), takže v klinicko-diagnostických testech vykazuje vysokou robustnost.



Obrázek 15. Reprodukovatelnost RT-PCR– mezi automatizovaným (QIACube) a manuálním protokolem. RNA byla v rámci experimentu popsaném na obrázku 12 purifikována 3 různými laboranty (A, B, C) za užití 3 různých šarží (1, 2, 3) sady PAXgene Blood RNA Kit s několika přístroji QIACube a QIACube Connect MDx na základě automatizovaného protokolu. Zároveň byla RNA purifikována z odpovídajících replikátů za užití manuálního protokolu. Relativní koncentrace transkriptu **[A] FOS** a **[B] IL1B** byly určeny pomocí duplexní real-time RT-PCR za užití 18S-rRNA jako interního standardu. Možné rozdíly v koncentraci transkriptů mezi RNA připravenou ze spárovaných krevních vzorků za užití obou extrakčních protokolů (manuální a automatizovaný protokol) byly vypočítány na základě metody $\Delta\Delta C_T$. Jednotlivé hodnoty $\Delta\Delta C_T$ všech párů vzorků (4 replikáty x 6 souborů dárců x 3 šarže sady x 3 laboranti = 216 párů každého genu) jsou pro všechny zobrazené vzorky znázorněny jako jednotlivé body s průměrem (větší body) a směrodatnou odchylkou (černé úsečky). Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýz (FOS: 1,16 Ct; IL1B: 1,98 Ct; jiné přesnosti analýz ve srovnání s obrázky 1–4, 8 a 9 z důvodu jiných verzí analýz).



Obrázek 16. Reprodukovatelnost RT-PCR – mezi přístroji QIAcube a QIAcube Connect MDx za užití automatizovaného protokolu. RNA byla v rámci experimentu popsáném na obrázku 12 purifikována 3 různými laboranty (A, B, C) za užití 3 různých šarží (1, 2, 3) sady PAXgene Blood RNA Kit za užití automatizovaného protokolu na několika přístrojích QIAcube a QIAcube Connect MDx. Relativní koncentrace transkriptu [A] FOS a [B] IL1B byly určeny pomocí duplexní real-time RT-PCR za užití 18S-rRNA jako interního standardu. Možné rozdíly v koncentraci transkriptů mezi RNA připravenou ze spárovaných krevních vzorků za použití obou přístrojů vypočítány na základě metody $\Delta\Delta C_T$. Jednotlivé hodnoty $\Delta\Delta C_T$ všech párů vzorků (4 replikáty x 6 souborů dárců x 3 šarže sady x 3 laboranti = 216 párů každého genu) jsou znázorněny jako jednotlivé body s průměrem (větší body) a směrodatnou odchylkou (černé úsečky). Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýz (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; jiné přesnosti analýz ve srovnání s obrázky 1–4, 8, 9 a 15 z důvodu jiných verzí analýz).

Vybavení a reagensie, které má zajistit uživatel

Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Pro všechny protokoly

- PAXgene Blood RNA Tubes (zkumavky BRT pro odběr RNA z krve, PreAnalytiX; kat. čís. 762165)
- Ethanol (96–100 %, stupeň čistoty p.a.)
- Pipety* (10 µl – 4 ml)
- Sterilní pipetovací špičky bez obsahu RNázy, s aerosolovou bariérou jako ochranou před kontaminací†
- Odměrný váleček‡
- Centrifuga* s výkyvným rotorem a vhodnými adaptéry pro zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) a s rychlostí od 3000–5000 x g
- Vířivý mixér (Vortex)*
- Drcený led
- Permanentní fixa pro popisování

Pro manuální protokol

- Mikrocentrifuga* s rotorem pro 2ml mikrocentrifugační zkumavky a s variabilní rychlostí od 1000–8000 x g, ačkoli se používají nižší a vyšší síly g (podrobnosti najdete v krocích protokolu)

* Ujistěte se, že jsou zařízení a přístroje kontrolovány, udržovány a pravidelně kalibrovány podle doporučení výrobce.

† Zajistěte, abyste byli obeznámeni s pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A, strana 71).

‡ K odměření množství ethanolu, které se přidává ke koncentrátu pufru BR4.

- Třepací inkubátor* pro inkubaci při 55 °C a 65 °C s variabilní rychlostí ≥ 400 ot./min. a nevyšší než 1400 ot./min. (např. Eppendorf® Thermomixer Compact nebo ekvivalent)

Pro automatizovaný protokol (za užití přístrojů QIAcube nebo QIAcube Connect MDx)

- Nůžky

Spotřební materiál pro přístroje QIAcube:

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

Příslušenství pro přístroje QIAcube:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, kat. čís. 990392)[†]

Pro automatizovaný protokol za užití přístrojů QIAcube Connect MDx

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

Balíčky služeb pro QIAcube Connect MDx:

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

Pro automatizovaný protokol za užití přístrojů QIAcube

- QIAcube[‡] (QIAGEN, kat. čís. 9001882 [110 V])

* Ujistěte se, že jsou zařízení a přístroje kontrolovány, udržovány a pravidelně kalibrovány podle doporučení výrobce.

[†] Obsaženo také v úvodním balíčku Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. čís. 990395).

[‡] Ujistěte se, že jsou zařízení a přístroje kontrolovány, udržovány a pravidelně kalibrovány podle doporučení výrobce.

Důležité poznámky

Používání přístrojů QIAcube

Ujistěte se, že jste obeznámeni s manipulací s přístrojem QIAcube. Prostudujte si příslušnou uživatelskou příručku k přístroji QIAcube a veškeré dodatečné informace dodávané s přístrojem QIAcube. Před zahájením automatizovaného protokolu PAXgene Blood RNA věnujte zvláštní pozornost informacím o bezpečnosti.

Není-li to uvedeno samostatně, pokyny v této kapitole se vztahují na přístroj QIAcube Connect MDx i na přístroj QIAcube.

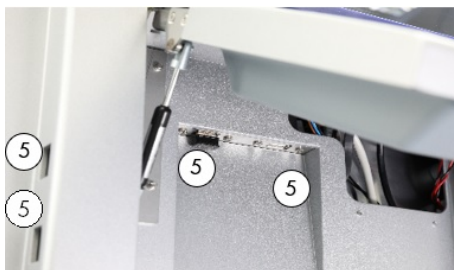
Spuštění přístrojů QIAcube

Zavřete kryt přístroje QIAcube a pomocí síťového vypínače přístroj QIAcube zapněte (QIAcube Connect MDx: viz obrázek 17, strana 41; QIAcube: obrázek 18, strana 42).

Ozve se pípnutí a zobrazí se úvodní obrazovka. Přístroj automaticky provede zahajovací testy.



Přední strana přístroje QIAcube Connect MDx



Vysunutá dotyková obrazovka



Zadní strana přístroje QIAcube Connect MDx



Zadní strana přístroje QIAcube Connect MDx

Obrázek 17. Vnější prvky přístroje QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> 1 Dotyková obrazovka 2 Kryt 3 Odpadní zásuvka 4 Síťový vypínač | <ul style="list-style-type: none"> 5 2 porty USB na levé straně dotykové obrazovky; 2 porty USB za dotykovou obrazovkou (modul Wi-Fi zasunutý do 1 portu USB) 6 Ethernetový port RJ-45 7 Zástrčka pro napájecí kabel 8 Výstup chladicího vzduchu |
|---|--|



Obrázek 18. Přední strana přístroje QIAcube.

- | | | | |
|---|---|---|-------------------------------|
| 1 | Dotyková obrazovka | 4 | Port USB za ochranným panelem |
| 2 | Kryt | 5 | Síťový vypínač |
| 3 | Sériový port RS232 za ochranným panelem (pro použití pouze servisními technikami společnosti QIAGEN) | 6 | Odpadní zásuvka |

Dotyková obrazovka

Přístroje QIAcube se ovládají pomocí dotykové obrazovky. Dotyková obrazovka uživateli umožňuje ovládat přístroj a provést jej nastavením pracovní plochy. Během zpracování vzorku se na dotykové obrazovce zobrazuje stav protokolu a zbývající čas.



Obrázek 19. Vysunutá dotyková obrazovka přístroje QIAcube Connect MDx

Instalace protokolů na přístrojích QIAcube

Před prvním během přípravy RNA na přístrojích QIAcube může být nutné provést úvodní instalaci protokolů. Nainstalujte oba protokoly „PAXgene Blood RNA Part A“ a „PAXgene Blood RNA Part B“.

Protokoly pro přístroj QIAcube Connect MDx jsou k dispozici na www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources (www.qiagen.com/MyQIAcube pro QIAcube) a je nutné je stáhnout na flash disk USB dodávaný s přístroji QIAcube. Tyto protokoly budou do přístroje přeneseny prostřednictvím portu USB.

Port USB (QIAcube Connect MDx: nachází se po straně dotykové obrazovky, viz obrázek 17, strana 41; QIAcube: za ochranným panelem, viz obrázek 18, strana 42) umožňuje připojení přístrojů QIAcube k flash disku USB dodávanému s přístroji QIAcube.

Soubory dat, jako například soubory typu log či report, mohou být také přeneseny přes port USB z přístrojů QIAcube na flash disk USB.



Port USB se smí používat pouze pro flash disk USB dodávaný společností QIAGEN. Do tohoto portu nepřipojujte jiná zařízení.



Nevyjímejte flash disk USB během stahování protokolů, přenosu souborů dat nebo při běhu protokolu.

Další podrobnosti o procesu nahrávání protokolů k přístrojům QIAcube si prosím přečtěte v příslušné příručce k používanému přístroji.

Plnění přístrojů QIAcube

Abyste ušetřili čas, můžete přístroje naplnit během jednoho nebo obou 10minutových centrifugačních kroků (krok 3 a 5), jak uvádí kapitola „Protokol: Automatizovaná purifikace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)“ na straně 62.

Reagenční lahvičky

Před každým během na přístroji QIAcube opatrně naplňte 4 reagenční lahvičky uvedené v tabulce 3 (strana 45) reagenциemi až po vyznačenou rysku pro maximum; pokud to není možné, do úrovně dané objemy pufrů dodávaných v sadě PAXgene Blood RNA Kit. Na naplněné lahvičky a víčka jasně napište názvy pufrů a umístěte je do náležitých pozic na stojanu na reagenční lahvičky. Stojan umístěte na pracovní desku přístroje QIAcube podle obrázků (obrázky 20–22, strany 45–47).



Dodávaný objem pufru BR2 nenaplní reagenční lahvičku po vyznačenou rysku. Pufrы BR3 a BR4 nemusí naplnit lahvičku po vyznačenou rysku, pokud byly použity ke zpracování většího počtu vzorků v předchozích bězích.



Před umístěním lahvíček na pracovní desku se ujistěte, že jste z nich odstranili víčka.



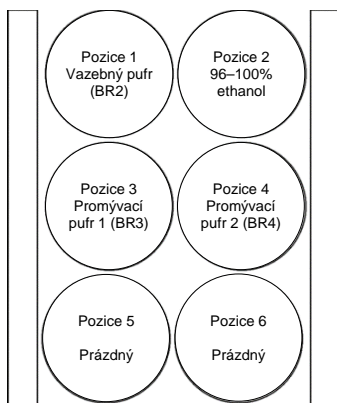
Objem pufrů dodávaných se sadou PAXgene Blood RNA Kit (50) vystačí maximálně na 7 běhů přípravy RNA v přístroji QIAcube, přičemž čísla vzorků v každém běhu jsou označena 2 až 12. Obecně by se běhy s nižšími čísly vzorků neměly používat, aby se v každé sadě zpracovalo celkem 50 vzorků s maximálně 7 běhy přípravy RNA. Více než 7 běhů přípravy RNA může mít za následek nedostatečný objem pufru pro zpracování posledních vzorků.

Tabulka 3. Pozice na stojanu na reagenční lahvíčky

| Pozice | Reagencie |
|--------|-------------------------|
| 1 | Vazebný pufr (BR2) |
| 2 | 96–100% ethanol |
| 3 | Promývací pufr 1 (BR3) |
| 4 | Promývací pufr 2 (BR4)* |
| 5 | – (ponechte prázdnou) |
| 6 | – (ponechte prázdnou) |

* Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Před prvním použitím přidejte do lahvíčky 4násobný objem ethanolu (96–100 %, stupeň čistoty p.a.), jak je popsáno na štítku, abyste vytvořili pracovní roztok.

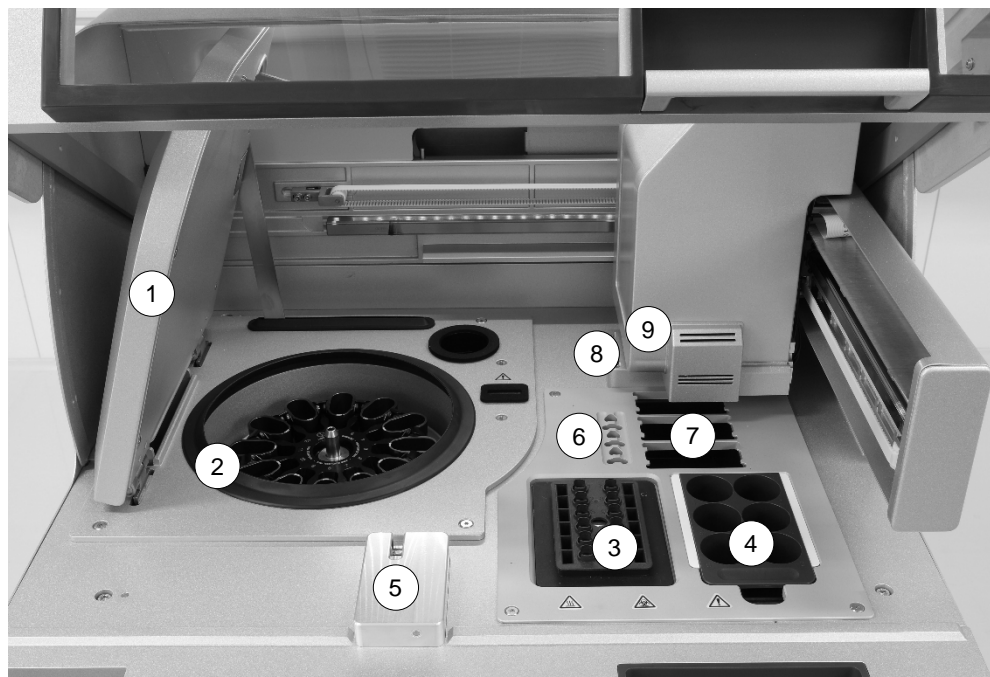
A



B

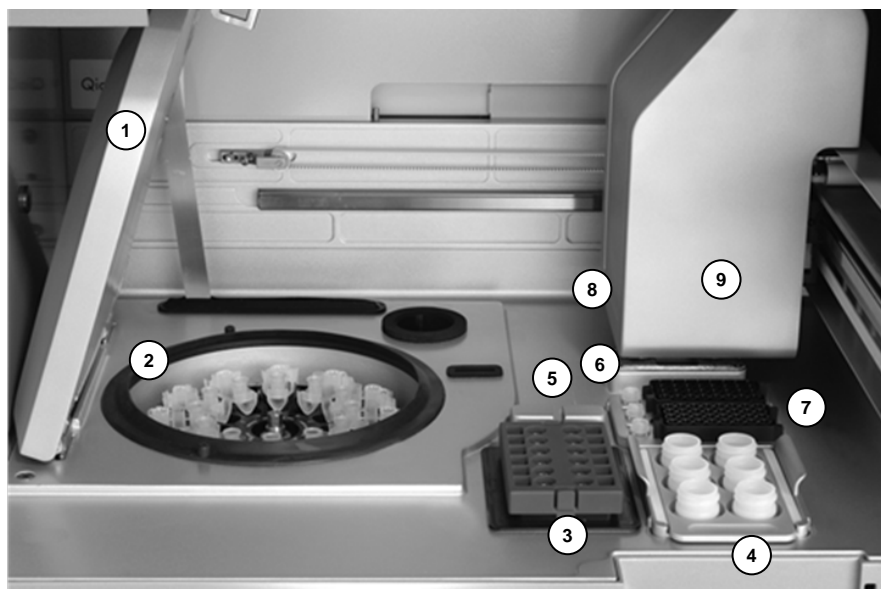


Obrázek 20. Vložení stojanu na reagenční lahvíčky. [A] Schéma pozic a obsahu lahvíček na stojanu pro reagenční lahvíčky. [B] Vložení stojanu do přístroje QIAcube (QIAcube je uveden jako příklad).



Obrázek 21. Pohled do vnitřního prostoru přístroje QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|---|
| <p>① Víko centrifugy</p> <p>② Centrifuga</p> <p>③ Třepačka</p> <p>④ Stojan na reagenční lahvičky</p> <p>⑤ Senzor pro kontrolu špiček a zámek krytu</p> | <p>⑥ Drážky pro mikrocentrifugační zkumavky</p> <p>⑦ 3 drážky pro stojany na špičky</p> <p>⑧ Otvory pro likvidaci špiček a kolonek</p> <p>⑨ Robotické rameno (obsahuje 1kanálový pipetor, unašeč, ultrazvukový a optický senzor a UV LED)</p> |
|--|---|



Obrázek 22. Náhled do vnitřního prostoru přístroje QIAcube.

- | | |
|--|---|
| <p>1 Víko centrifugy</p> <p>2 Centrifuga</p> <p>3 Třepačka</p> <p>4 Stojan na reagenční lahvičky</p> <p>5 Senzor pro kontrolu špiček</p> | <p>6 Drážky pro mikrocentrifugační zkumavky</p> <p>7 Stojany na špičky</p> <p>8 Otvory pro likvidaci špiček a kolonek</p> <p>9 Robotické rameno</p> |
|--|---|

Kolonky (PRC, PSC), mikrocentrifugační zkumavky (MCT) a umělohmotné části přístrojů QIAcube

Umístěte 2 stojany na špičky naplněné špičkami s filtry o objemu 1000 µl do přístroje QIAcube (viz obrázky 21 a 22, strany 46 a 47). Je-li potřeba, stojany doplňte.



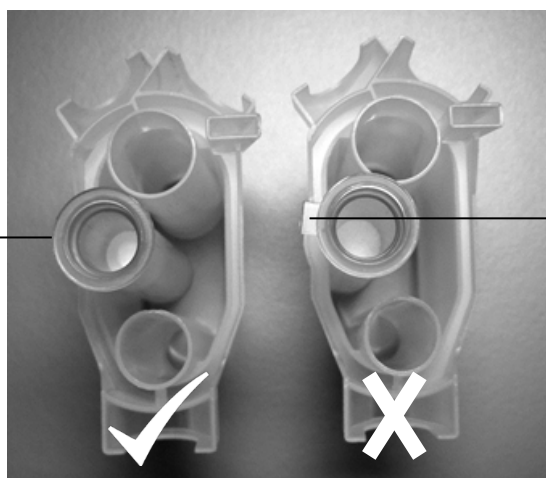
Používejte pouze špičky s filtrem o objemu 1000 µl určené pro použití s přístroji QIAcube.

Popište permanentní fixou adaptéry do rotoru a mikrocentrifugační zkumavky (MCT) pro každý vzorek. Otevřete odstředovací kolonky PAXgene Shredder (PSC) určené k použití a nůžkami zcela odstříhnete víčka (viz obrázek 23, strana 48).



Aby mohla robotická ruka přístrojů QIAcube správně pracovat, zcela odstraňte (odstříhnete) víčka a umělohmotné části spojující víčko a kolonku PAXgene Shredder (PSC; viz obrázek 23). Jinak nemůže robotická ruka kolonky (PSC, PRC) správně uchopit.

Správně
odstraněné
víčko
kolonky



Nesprávně
odstraněné
víčko kolonky;
část víčka
je stále
přichycena

Obrázek 23. Vložení odstředovací kolonky PAXgene Shredder (PSC). Odstředovací kolonka PAXgene Shredder (PSC) je vložena do střední pozice adaptéru do rotoru. Před vložení kolonky odstříhnete víčko.

Vložte odstředovací kolonku PAXgene RNA (PRC), kolonku PAXgene Shredder (PSC, bez víček, viz obrázek 23, strana 48) a popsanou mikrocentrifugační zkumavku do náležitých pozic de každého popsaného adaptéru do rotoru, jak je uvedeno v tabulce 4 a na obrázku 24.

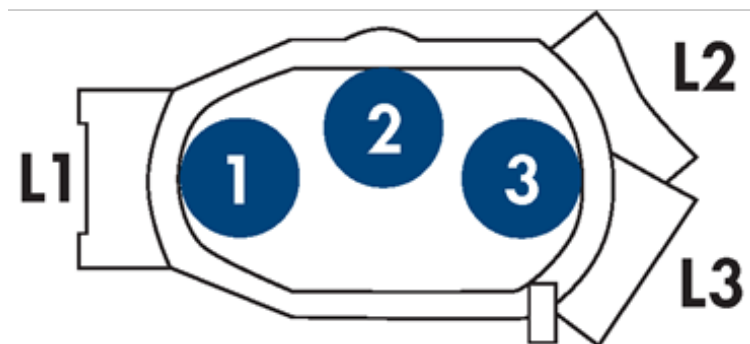


Ujistěte se, že jsou víčka kolonek (PRC) a mikrocentrifugačních zkumavek (MCT) stlačena až na konec drážek na okraji adaptéru do rotoru, jinak se mohou víčka během centrifugace odlomit.

Tabulka 4. Laboratorní materiál v adaptéru do rotoru

| Pozice | Reagencie | Pozice víčka |
|--------|---|--------------|
| 1 | Odstředovací kolonka PAXgene RNA (červená, PRC) | L1 |
| 2 | Odstředovací kolonka PAXgene Shredder (fialová, PSC) (před vložením do adaptéru do rotoru odstříhnete víčko) | – |
| 3 | Mikrocentrifugační zkumavka (MCT)* | L3 |

* Používejte mikrocentrifugační zkumavky (MCT; 1,5 ml) dodávané se sadou PAXgene Blood RNA Kit.



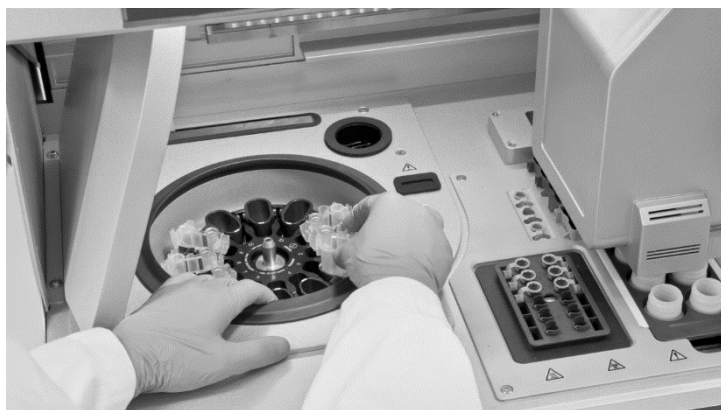
Obrázek 24. Pozice v adaptéru do rotoru. Adaptér do rotoru má tři pozice pro zkumavky (1–3) a tři pozice pro víčka (L1–L3).

Plnění centrifugy

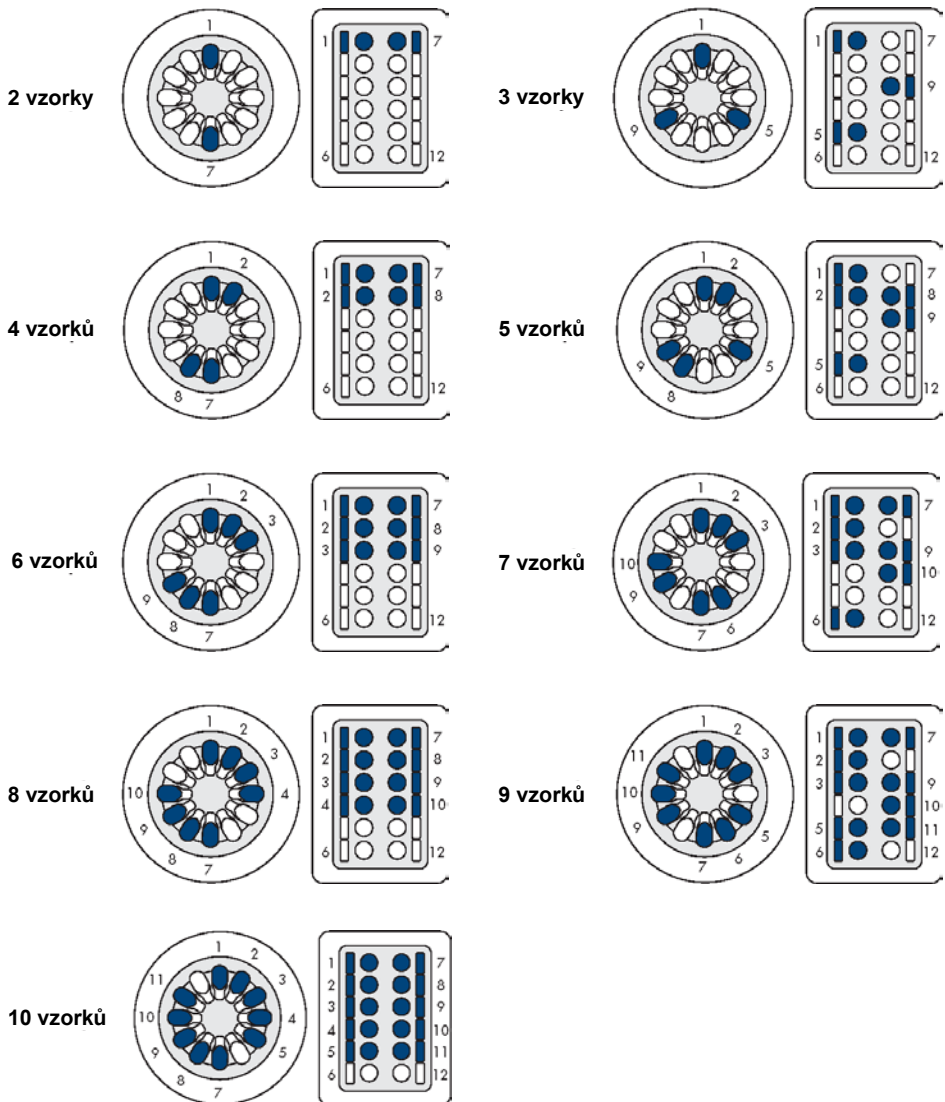
Vložte sestavené adaptéry do rotoru do jamek centrifugy, jak je ukázáno na obrázku 25 níže.



Při zpracování méně než 12 vzorků musí být rotor centrifugy naplněn paprskovitě (viz obrázek 26, strana 51), aby zůstal vyvážen. Před začátkem běhu protokolu musí být nasazeny všechny jamky centrifugy, a to i v případě, že je zpracováváno méně než 12 vzorků. Jediný vzorek nebo 11 vzorků nelze zpracovat.



Obrázek 25. Vkládání centrifugy do přístrojů QIAcube. Vložte sestavené adaptéry do rotoru do jamek centrifugy (přístroj QIAcube Connect MDx je uveden jako příklad).



Obrázek 26. Plnění centrifugy a třepačky. Pozice centrifugy a třepačky jsou zobrazeny pro zpracování dvou (2) až deseti (10) vzorků. Jeden (1) nebo 11 vzorků nelze zpracovat. Při zpracování 12 vzorků jsou zaplněny všechny pozice centrifugy a třepačky.

Zkumavky na zpracování vzorku (PT)

Vyjměte z drážek pro mikrocentrifugační zkumavky všechny zkumavky (PT), které zbyly z předchozích běhů (QIAcube Connect MDx: viz obrázek 21, strana 46, QIAcube: viz obrázek 22, strana 47). Naplňte 3 zkumavky (PT) množstvím reagensií uvedeným v tabulce 5 podle počtu vzorků v daném běhu.

Příprava inkubační směsi z DNázy I: přeneste pipetou uvedený objem pufru k digesci DNA (RDD) do zkumavky (PT) a přidejte uvedený objem základního koncentrovaného roztoku DNázy I (RNFD). Směs jemně promíchejte náběrem a následným vypuštěním pipety (opakujte třikrát za užití pipetovací špičky o objemu 1000 µl).

Používejte 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT) dodávané se sadou PAXgene Blood RNA Kit. Jasně popište zkumavky názvy reagensií a umístěte je do odpovídajících pozic v drážkách pro mikrocentrifugační zkumavky, jak je uvedeno v tabulce 6 (strana 53).



DNáza I (RNFD) je velmi náchylná k fyzikální denaturaci. Míchejte pouze pomocí pipety a používejte pipetovací špičky se širokým průměrem, abyste omezili smykové tření. Nevortexujte.



Ujistěte se, že pipetujete správný objem uvedený v tabulce 5.

Tabulka 5. Požadovaný objem reagentů ve zkumavkách na zpracování vzorku umístěných v drážkách pro mikrocentrifugační zkumavky.

| Počet vzorků | Objem reagentů pro uvedený počet vzorků (μl) | | |
|--------------|--|------------------------------------|-------------------|
| | Proteináza K (PK) | Inkubační směs DNázy I | Eluční pufr (BR5) |
| 2 | 126 | 187 (23 DNázy I + 164 Buffer RDD) | 313 |
| 3 | 170 | 261 (33 DNázy I + 228 Buffer RDD) | 399 |
| 4 | 213 | 334 (42 DNázy I + 292 Buffer RDD) | 486 |
| 5 | 256 | 407 (51 DNázy I + 356 Buffer RDD) | 572 |
| 6 | 299 | 481 (60 DNázy I + 421 Buffer RDD) | 658 |
| 7 | 342 | 554 (69 DNázy I + 485 Buffer RDD) | 745 |
| 8 | 386 | 627 (78 DNázy I + 549 Buffer RDD) | 831 |
| 9 | 429 | 701 (88 DNázy I + 613 Buffer RDD) | 918 |
| 10 | 472 | 775 (97 DNázy I + 678 Buffer RDD) | 1004 |
| 12 | 558 | 921 (115 DNázy I + 806 Buffer RDD) | 1177 |

Tabulka 6. Drážky pro mikrocentrifugační zkumavky

| | Pozice | | |
|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | A | B | C |
| Obsah | Proteináza K | Inkubační směs DNázy I | Eluční pufr (BR5) |
| Nádobka | Zkumavka na zpracování vzorku (PT)* | Zkumavka na zpracování vzorku (PT)* | Zkumavka na zpracování vzorku (PT)* |

* Používejte 2ml zkumavky na zpracování vzorku dodávané se sadou PAXgene Blood RNA Kit.

Protokol: Manuální purifikace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Důležité body, než začnete

- Ujistěte se, že je sada neporušená a nepoškozená a že nedošlo k úniku pufrů. Nepoužívejte sadu, která je poškozena.
- Při užívání pipet zkontrolujte, zda je správně nastaven objem a zda opatrně nasáváte a vypouštíte veškerou tekutinu.
- Abyste zabránili přenesení vzorku do špatné zkumavky či kolonky, měly by být všechny zkumavky a kolonky pečlivě označeny permanentní fixou. Označte víčko a tělo každé zkumavky (PT, MCT). U kolonek nadepište také tělo příslušné zkumavky (PT), ve které se eluuje. Po přidání tekutiny každou zkumavku a kolonku vždy uzavřete.
- Rozlití vzorku nebo pufru během přípravy může snížit výtěžek a čistotu RNA.
- Pokud není uvedeno jinak, měly by být všechny kroky protokolu (včetně centrifugace) provedeny při pokojové teplotě (15–25 °C).

Vzhledem k vysoké senzitivitě metod amplifikace nukleových kyselin by měla být k zamezení křížových kontaminací při manipulaci se vzorky dodržována následující preventivní opatření:

- Vzorek pipetujte do odstředovací kolonky (PRC, PSC) opatrně, abyste nepotřísnilí její horní okraj.
- Před každým přenosem kapalných materiálů vždy vyměňte pipetovací špičky. Používejte špičky s aerosolovou bariérou.
- Dbejte, abyste se pipetovací špičkou nedotkli membrány v kolonce (PRC, PSC).

- Mikrocentrifugační zkumavky (MCT) po vortexování nebo ohřívání krátce centrifugujte, abyste odstranily kapky z vnitřní strany víčka.
- Během celého procesu používejte rukavice. Pokud se dotknete rukavicemi vzorku, rukavice okamžitě vyměňte.
- Kolonky (PRC, PSC) před vložením do mikrocentrifugy vždy uzavřete. Centrifugujte podle údajů v protokolu.
- Otevírejte najednou vždy jen jednu kolonku (PRC, PSC) a zabraňte tvorbě aerosolu.
- Pro efektivní paralelní zpracování více vzorků se doporučuje připravit stojan se zkumavkami na zpracování vzorku (PT), do kterých se po centrifugaci mohou vložit kolonky (PRC, PSC). Použité zkumavky (PT) i s průtokem zlikvidujte a vložte nové zkumavky (PT) s kolonkami (PRC, PSC) přímo do mikrocentrifugy.

Co je třeba udělat, než začnete

- Krev je nutné odebrat do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) podle pokynů v příslušné *příručce PAXgene Blood RNA Tube*. Bude-li třeba, v příloze C (strana 75) naleznete doporučení pro manipulaci se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Po odběru krve zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubujte minimálně 2 hodiny při pokojové teplotě, aby byla zajištěna úplná lýza krevních buněk. Inkubace zkumavek PAXgene Blood RNA Tube (BRT) přes noc může vést k vyšším výtěžkům. Byla-li zkumavka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) po odběru krve skladována při teplotě 2–8 °C, -20 °C nebo -70 °C, před začátkem protokolu ji nejdříve zahřejte na pokojovou teplotu a potom ji nechte při pokojové teplotě 2 hodiny inkubovat.
- Přečtěte si informace o bezpečnosti na straně 9.
- Přečtěte si pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A na straně 72).
- Ujistěte se, že jsou přístroje, např. pipety a třepací inkubátory, pravidelně kontrolovány a kalibrovány podle údajů výrobce.
- Třepací inkubátor je zapotřebí u kroků 5 a 20. Nastavte teplotu třepacího inkubátoru na 55 °C.

- Ve vazebném pufru (BR2) se může po delším skladování vytvořit sraženina. V takovém případě ji rozpustíte ohřátím na 37 °C.
- Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Před prvním použitím přidejte do lahvičky 4násobný objem ethanolu (96–100 %, stupeň čistoty p.a.), jak je popsáno na štítku, abyste vytvořili pracovní roztok.
- Před prvním použitím sady RNase-Free DNase Set připravte základní koncentrovaný roztok DNázy I. Pevnou DNázu I (RNFD; 1500 jednotek Kunitz)* rozpustíte v 550 µl pufru k resuspenzi DNázy (DRB), který je dodáván se sadou. Dbejte na to, aby při otevření nádoby žádná DNáza I (RNFD) neunikla. Rekonstituovaná DNáza I (RNFD) nesmí být vortexována. DNáza I je velmi náchylná k fyzikální denaturaci. Promíchejte pouze jemným převrácením lahvičky.
- Současné údaje ukazují, že rekonstituovanou DNázu I (RNFD) lze skladovat při teplotě 2–8 °C až 6 týdnů. Pro dlouhodobé skladování DNázy I (RNFD) se doporučuje vyjmout základní koncentrovaný roztok ze skleněné nádoby, rozdělit ho na menší alikvoty pro jedno použití (použijte k tomu 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky [MCT] dodávané se sadou, které postačí pro 5 alikvotů) a skladovat při teplotě -20 °C až 9 měsíců. Rozmrazené alikvoty se mohou skladovat při teplotě 2–8 °C až 6 týdnů. Rozmrazené alikvoty znovu nezmrazujte.
- Při rekonstituci a alikvotaci roztoku DNázy I (RNFD) neopomeňte zachovávat pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A na straně 72).

* Jednotka Kunitz je běžně užívaná jednotka pro měření enzymatické aktivity DNázy I; je definovaná jako množství DNázy I způsobující nárůst absorbance při 260 nm (A_{260}) o 0,001 za minutu na mililitr při 25 °C a pH 5,0, přičemž je jako substrát použita vysoce polymerní DNA (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 a 363).

Postup

1. Centrifugujte zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minut ve výkyvném rotoru při 3000–5000 x g.



Ujistěte se, že byl krevní vzorek inkubován ve zkumavce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) při pokojové teplotě (15–25 °C) minimálně 2 hodiny, aby se dosáhlo úplné lýzy krevních buněk.



Rotor musí být vybaven adaptéry pro zkumavky s kulatým dnem. Při používání jiných typů adaptérů se mohou zkumavky během centrifugace poškodit.

2. Následně odstraňte supernatant dekantací nebo pipetováním. K peletu přidejte 4 ml vody bez obsahu RNázy RNase-Free Water (RNFV) a uzavřete zkumavku novým bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard (dodávaný se sadou).

Během dekantace supernatantu dbejte na to, aby se pelet nerozvířil, a osušte okraj zkumavky čistým papírovým ubrouskem.

3. Pelet vortexujte, dokud není viditelně resuspendován, a pak jej centrifugujte 10 minut ve výkyvném rotoru při 3000–5000 x g. Odeberte a zlikvidujte celý supernatant.

Drobné buněčné zbytky obsažené v supernatantu po vortexování, ale před centrifugací nenarušují další průběh protokolu.



Neúplné odstranění supernatantu inhibuje lýzu a ředí lyzát, a tím narušuje podmínky pro navázání RNA na membránu PAXgene.

4. Přidejte 350 µl pufru k resuspenzi (BR1) a směs vortexujte, dokud se pelet viditelně neresuspenduje.

5. Přeneste vzorek pipetou do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky (MCT). Dále přidejte 300 µl vazebného pufru (BR2) a 40 µl proteinázy K (PK). Promíchejte vortexem po dobu 5 sekund a inkubujte 10 minut při 55 °C v třepacím inkubátoru při rychlosti 400–1400 ot/min. Po inkubaci zvýšte teplotu třepacího inkubátoru na 65 °C (pro krok 20).



Vazebný pufr (BR2) a proteinázu K (PK) nemíchejte před přidáním do vzorku dohromady.

6. Lyzát pipetujte přímo do odstředovací kolonky PAXgene Shredder (PSC, fialová), která je vložena do 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT), a centrifugujte 3 minuty při maximálních otáčkách (max. 20 000 x g).



Lyzát opatrně přeneste pipetou do odstředovací kolonky (PSC) a opticky se přesvědčte, že jste do kolonky přenesli skutečně celý obsah lyzátu.

Abyste předešli poškození kolonek (PSC) a zkumavek (PT), nepřekračujte rychlost 20 000 x g.



Některé vzorky mohou projít kolonkou PAXgene Shredder (PSC) bez centrifugace. Tento jev je způsoben nízkou viskozitou některých vzorků a neměl by být považován za chybu produktu.

7. Opatrně přeneste celý supernatant průtokem do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky (MCT), aniž zvíříte pelet ve zkumavce na zpracování vzorku.
8. Přidejte 350 µl ethanolu (96–100 %, stupeň čistoty p. a.). Promíchejte vortexem a krátce centrifugujte (1–2 sekundy při 500–1000 x g), abyste odstranili kapky z vnitřní strany víčka zkumavky.



Délka centrifugace nesmí překročit 1–2 sekundy, protože by jinak mohlo dojít k sedimentaci nukleových kyselin a tím k redukci celkového výtěžku RNA.

9. 700 µl vzorku přeneste pipetou do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC, červená), která je vložena do 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT), a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 x g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT) a použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte.
10. Zbývající vzorek přeneste pipetou do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC) a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 x g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky (PT) a použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte.



Vzorek přeneste pipetou do odstředovací kolonky (PRC) a opticky se přesvědčte, že jste do kolonky přenesli skutečně celý obsah vzorku.

11. Přeneste pipetou 350 µl promývacího pufru 1 (BR3) do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC). Centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8 000–20 000 x g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky (PT) a použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte.

12. Přidejte 10 µl základního koncentrovaného roztoku DNázy I (RNFD) k 70 µl pufru k digesci DNA (RDD) v 1,5ml mikrocentrifugační zkumavce (MCT). Promíchejte jemným poklepáváním do zkumavky a krátce centrifugujte, abyste skleпали zbylou tekutinu z vnitřních stěn zkumavky.

Pro zpracování například 10 vzorků přidejte 100 µl základního koncentrovaného roztoku DNázy I (RNFD) k 700 µl pufru k digesci DNA (RDD). Používejte 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky (MCT) dodávané se sadou.



DNáza I je velmi náchylná k fyzikální denaturaci. Roztok promíchejte lehkým poklepáváním do zkumavky. Nevortexujte.

13. Inkubační směs DNázy I (RNFD, 80 µl) pipetujte přímo na membránu v kolonce PAXgene RNA (PRC) a ponechte na pracovní ploše 15 minut (při teplotě 20–30 °C).



Ujistěte se, že byla inkubační směs DNázy I (RNFD) umístěna přímo na membránu. Digesce pomocí DNázy by mohla proběhnout neúplně, pokud by část směsi zůstala na vnitřní stěně nebo na O-kroužku kolonky (PRC).

14. Přeneste pipetou 350 µl promývacího pufru 1 (BR3) do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC) a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8 000–20 000 x g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky (PT) a použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte.

15. Přeneste pipetou 500 µl promývacího pufru 2 (BR4) do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC) a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8 000–20 000 x g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky (PT) a použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte.



Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Ujistěte se, že byl před použitím k promývacímu pufru 2 (BR4) přidán ethanol (viz kapitola „Co je třeba udělat, než začnete“ na straně 55).

16. Přidejte dalších 500 µl promývacího pufru 2 (BR4) do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC). Centrifugujte 3 minuty při 8000–20 000 x g.
17. Kolonku PAXgene RNA (PRC) vložte do nové 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT) a použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte. Centrifugujte 1 minutu při 8000–20 000 x g.
18. Použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte. Odstředovací kolonku PAXgene RNA (PRC) vložte do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky (MCT) a 40 µl elučního pufru (BR5) přeneste pipetou přímo na membránu v kolonce PAXgene RNA (PRC). Centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 x g, abyste dosáhli eluce RNA.

Abyste docílili maximální efektivity eluce, je důležité pokrýt celou plochu membrány elučním pufrem (BR5).
19. Zopakujte eluční krok (krok 18) opět se 40 µl elučního pufru (BR5) a stejnou mikrocentrifugační zkumavkou (MCT).
20. Eluát inkubujte 5 minut při 65 °C v třepacím inkubátoru (od kroku 5), ale bez třepání. Vzorky poté ihned zchladte na ledu.

Touto inkubací při 65 °C se RNA denaturuje pro následující aplikace. Nepřekročte přitom dobu ani teplotu inkubace.
21. Pokud vzorky RNA nebudou ihned použity, skladujte je při -20 °C nebo -70 °C.

Jelikož RNA zůstává denaturovaná i po opakovaném zmrazení a rozmrazení, není nutné inkubaci při 65 °C opakovat. Pokud chcete vzorky RNA použít pro diagnostické analýzy, dbejte pokynů výrobce.

Pro co nejpřesnější kvantifikaci RNA měřením absorbance při 260 nm doporučujeme zředit vzorek 10 mM Tris-HCl (pH 7,5).^{*} Naředění vzorku vodou bez obsahu RNázy RNase-Free Water by mohlo vést k nepřesným nízkým hodnotám.

Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru Tris-HCl odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorbance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně.



Pro kvantifikaci v pufru Tris HCl použijte vztah $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Viz příloha B, strana 73.

^{*} Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Protokol: Automatizovaná purifikace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Důležité body, než začnete

- Ujistěte se, že je sada neporušená a nepoškozená a že nedošlo k úniku pufrů. Nepoužívejte sadu, která je poškozena.
- Při užívání pipet zkontrolujte, zda je správně nastaven objem a zda opatrně nasáváte a vypouštíte veškerou tekutinu.
- Abyste zabránili přenesení vzorku do špatné zkumavky či umělohmotných prvků, ujistěte se, že jsou všechny zkumavky na zpracování vzorku (PT), mikrocentrifugační zkumavky (MCT) a adaptéry do rotoru správně označeny permanentní fixou. Označte víčka a tělo všech mikrocentrifugačních zkumavek (MCT), tělo všech zkumavek na zpracování vzorku (PT) a vnější stranu všech adaptérů do rotoru.
- Rozlití vzorku nebo pufru během přípravy může snížit výtěžek a čistotu RNA.
- Pokud není uvedeno jinak, měly by být všechny kroky protokolu (včetně centrifugace) provedeny při pokojové teplotě (15–25 °C).

Vzhledem k vysoké senzitivitě metod amplifikace nukleových kyselin by měla být k zamezení křížových kontaminací při manipulaci se vzorky dodržována následující preventivní opatření:

- Vzorek opatrně napipetujte na dno zkumavky na zpracování vzorku (PT) tak, abyste nepotřísnili její horní okraj.
- Před každým přenosem kapalných materiálů vždy vyměňte pipetovací špičky. Používejte špičky s aerosolovou bariérou.
- Dbejte, abyste se pipetovací špičkou nedotkli membrány v kolonce (PRC, PSC).

- Mikrocentrifugační zkumavky (MCT) po vortexování nebo ohřívání krátce centrifugujte, abyste odstranily kapky z vnitřní strany víčka.
- Během celého procesu používejte rukavice. Pokud se dotknete rukavicemi vzorku, rukavice okamžitě vyměňte.




Co je třeba udělat, než začnete

- Krev je nutné odebrat do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) podle pokynů v příslušné *příručce PAXgene Blood RNA Tube*. Bude-li třeba, v příloze C (strana 75) naleznete doporučení pro manipulaci se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Po odběru krve zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubujte minimálně 2 hodiny při pokojové teplotě, aby byla zajištěna úplná lýza krevních buněk. Inkubace zkumavek PAXgene Blood RNA Tube (BRT) přes noc může vést k vyšším výtěžkům. Byla-li zkumavka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) po odběru krve skladována při teplotě 2–8 °C, -20 °C nebo -70 °C, před začátkem protokolu ji nejdříve zahřejte na pokojovou teplotu a potom ji nechte při pokojové teplotě 2 hodiny inkubovat.
- Přečtěte si informace o bezpečnosti na straně 9.
- Viz „Důležité poznámky“, strana 40.
- Přečtěte si pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A na straně 72).
- Přečtěte si uživatelskou příručku k příslušnému přístroji QIAcube a veškeré další informace, které jsou s přístrojem QIAcube dodávány. Zvláštní pozornost věnujte především informacím o bezpečnosti.
- Ujistěte se, že jsou zařízení a přístroje, např. pipety a přístroj QIAcube, pravidelně kontrolovány a kalibrovány podle údajů výrobce.
- Ve vazebném pufru (BR2) se může po delším skladování vytvořit sraženina. V takovém případě ji rozpusťte ohřátím na 37 °C.
- Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Před prvním použitím přidejte do lahvičky příslušný objem ethanolu (96–100 %, stupeň čistoty p.a.), jak je popsáno na štítku, abyste vytvořili pracovní roztok.

- Před prvním použitím sady RNase-Free DNase Set připravte základní koncentrovaný roztok DNázy I. Pevnou DNázu I (RNFD; 1500 jednotek Kunitz)* rozpusťte v 550 µl pufru k resuspenzi DNázy (DRB), který je dodáván se sadou. Dbejte na to, aby při otevření nádoby žádná DNáza I (RNFD) neunikla. Rekonstituovaná DNáza I (RNFD) nesmí být vortexována. DNáza I je velmi náchylná k fyzikální denaturaci. Promíchejte pouze jemným převrácením lahvičky.
- Současné údaje ukazují, že rekonstituovanou DNázu I (RNFD) lze skladovat při teplotě 2–8 °C až 6 týdnů. Pro dlouhodobé skladování DNázy I (RNFD) se doporučuje vyjmout základní koncentrovaný roztok ze skleněné nádoby, rozdělit ho na menší alikvoty pro jedno použití (použijte k tomu 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky [MCT] dodávané se sadou, které postačí pro 5 alikvotů) a skladovat při teplotě –20 °C až 9 měsíců. Rozmrazené alikvoty se mohou skladovat při teplotě 2–8 °C až 6 týdnů. Rozmrazené alikvoty znovu nezmrazujte.
- Při rekonstituci a alikvotaci roztoku DNázy I (RNFD) neopomeňte zachovávat pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A na straně 72).
- Vložte správný adaptér třepačky (dodávaný s přístroji QIAcube; používejte adaptéry pro 2ml zkumavky s bezpečnostním uzávěrem, označené číslem „2“) a umístěte stojan třepačky na horní část adaptéru.
- Zkontrolujte zásuvku na odpad a v případě potřeby ji vyprázdněte.
- Nainstalujte související protokoly, pokud již nejsou nainstalovány z předešlých běhů. V přístroji QIAcube Connect MDx musí být staženy všechny protokoly, které se nacházejí v souvisejícím souboru zip. V případě přístroje QIAcube nainstalujte oba protokoly „PAXgene Blood RNA Part A“ a „PAXgene Blood RNA Part B“. Viz „Instalace protokolů na přístrojích QIAcube“, strana 43.

* Jednotka Kunitz je běžně užívaná jednotka pro měření enzymatické aktivity DNázy I; je definovaná jako množství DNázy I způsobující nárůst absorbance při 260 nm (A_{260}) o 0,001 za minutu na mililitr při 25 °C a pH 5,0, přičemž je jako substrát použita vysoce polymerní DNA (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 a 363).

Postup

1. Zavřete kryt přístroje QIAcube a pomocí síťového vypínače přístroj QIAcube zapněte (QIAcube Connect MDx: viz obrázek 17, strana 41; QIAcube: viz obrázek 18, strana 42). Ozve se pípnutí a zobrazí se úvodní obrazovka. Přístroje automaticky provedou zahajovací testy.
2. Otevřete kryt přístroje QIAcube a vložte do něj potřebné reagenty a umělohmotné vybavení. Viz „Plnění přístrojů QIAcube“, strana 44.
Abyste ušetřili čas, můžete přístroj naplnit během jednoho nebo obou následujících 10minutových centrifugačních kroků (krok 3 a 5).
3. Centrifugujte zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minut ve výkyvném rotoru při 3000–5000 x g.
 -  Ujistěte se, že byl krevní vzorek inkubován ve zkumavce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) při pokojové teplotě (15–25 °C) minimálně 2 hodiny, aby se dosáhlo úplné lýzy krevních buněk.
 -  Rotor musí být vybaven adaptéry pro zkumavky s kulatým dnem. Při používání jiných typů adaptérů se mohou zkumavky během centrifugace poškodit.
4. Následně odstraňte supernatant dekantací nebo pipetováním. K peletu přidejte 4 ml vody bez obsahu RNázy RNase-Free Water (RNFW) a uzavřete zkumavku novým bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard (dodávaný se sadou).
Během dekantace supernatantu dbejte na to, aby se pelet nerozvířil, a osušte okraj zkumavky čistým papírovým ubrouskem.
5. Pelet vortexujte, dokud není viditelně resuspendován, a pak jej centrifugujte 10 minut ve výkyvném rotoru při 3000–5000 x g. Odeberte a zlikvidujte celý supernatant.
Drobné buněčné zbytky obsažené v supernatantu po vortexování, ale před centrifugací nenarušují další průběh protokolu.
 -  Neúplné odstranění supernatantu inhibuje lýzu a ředí lyzát, a tím narušuje podmínky pro navázání RNA na membránu PAXgene.
6. Přidejte 350 µl pufru k resuspenzi (BR1) a směs vortexujte, dokud se pelet viditelně neresuspenduje.

7. Pipetujte vzorek do 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT).



Používejte 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT) dodávané se sadou PAXgene Blood RNA Kit.

8. Vložte otevřenou zkumavku na zpracování vzorku (PT) obsahující vzorek do třepačky přístroje QIAcube (QIAcube Connect MDx: viz obrázek 21, strana 46; QIAcube: viz obrázek 22, strana 47). Pozice vzorků jsou pro snadnější vkládání do třepačky očíslované. Zasuňte zátky stojanu (dodávané s přístroji QIAcube) do drážek na okraji stojanu třepačky vedle každé zkumavky na zpracování vzorku. To umožní detekci vzorků během kontroly naplnění.



Ujistěte se, že byl vložen správný adaptér třepačky (Shaker Adapter, 2ml zkumavky s bezpečnostním uzávěrem, označené „2“, dodávané s přístroji QIAcube).



Pokud zpracováváte méně než 12 vzorků, ujistěte se, že byl stojan třepačky naplněn, jak ukazuje obrázek 26, strana 51. Jeden (1) nebo 11 vzorků nelze zpracovat. Čísla pozic ve stojanu třepačky odpovídají číslům pozic v centrifuze.

9. Zavřete kryt přístroje QIAcube (QIAcube Connect MDx: viz obrázek 17, strana 41; QIAcube: viz obrázek 18, strana 42).

10. Zvolte a spusťte protokol „PAXgene Blood RNA Part A“.

Postupujte podle pokynů uvedených na dotykové obrazovce přístroje QIAcube.



Ujistěte se, že jsou na přístroji QIAcube nainstalovány obě části programu (část A a B) (viz kapitola „Instalace protokolů na přístrojích QIAcube“, strana 43).



Přístroje QIAcube provedou kontrolu naplnění u vzorků, špiček, adaptérů do rotoru a reagenčních lahvíček.

11. Po ukončení protokolu „PAXgene Blood RNA Part A“ otevřete kryt přístroje QIAcube (QIAcube Connect MDx: viz obrázek 17, strana 41; QIAcube: viz obrázek 18, strana 42). Vyjměte a zlikvidujte odstředivací kolonky PAXgene RNA (PRC) z adaptérů do rotoru a prázdné zkumavky na zpracování vzorku (PT) z třepačky.



Během běhu přístroj převede kolonky z pozice 1 adaptéru do rotoru (pozice víčka L1) do pozice 3 adaptéru do rotoru (pozice víčka L2) (viz obrázek 24, strana 49).

12. Uzavřete víčka všech 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek (MCT) obsahujících purifikovanou RNA v adaptérech do rotoru (pozice 3, pozice víčka L3, viz obrázek 24, strana 49). Přeneste 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky (MCT) do adaptéru třepačky přístroje QIAcube (QIAcube Connect MDx: viz obrázek 21, strana 46; QIAcube: viz obrázek 22, strana 47).
13. Zavřete kryt přístroje QIAcube (QIAcube Connect MDx: viz obrázek 17, strana 41; QIAcube: viz obrázek 18, strana 42).
14. Zvolte a spusťte protokol „PAXgene Blood RNA Part B“.

Postupujte podle pokynů uvedených na dotykové obrazovce přístroje QIAcube.



Tento program inkubuje vzorky při 65 °C a denaturuje RNA pro následující aplikace. Tento krok nevynechávejte ani v případě, že následující aplikace také obsahují tepelnou denaturaci. Dostatečná denaturace RNA je nezbytná pro maximální efektivitu následných aplikací.

15. Po ukončení programu „PAXgene Blood RNA Part B“ otevřete kryt přístroje QIAcube (QIAcube Connect MDx: viz obrázek 17, strana 41; QIAcube: viz obrázek 18, strana 42). Mikrocentrifugační zkumavky (MCT) obsahující purifikovanou RNA ihned uložte na led.



VAROVÁNÍ: Horký povrch. Třepačka může dosáhnout teploty až 70 °C. Nedotýkejte se jej, dokud je horký.



Nenechávejte purifikovanou RNA v přístroji QIAcube. Jelikož nejsou vzorky chlazeny, může purifikovaná RNA degradovat. Nedoporučují se tedy cykly přípravy vzorku přes noc a bez dozoru.

16. Pokud vzorky RNA nebudou ihned použity, skladujte je při -20 °C nebo -70 °C.

Jelikož RNA zůstává denaturovaná i po opakovaném zmrazení a rozmrazení, není nutné tepelnou inkubaci (protokol „PAXgene Blood RNA Part B“) opakovat. Pokud chcete vzorky RNA použít pro diagnostické analýzy, dbejte pokynů výrobce.

Pro co nejpřesnější kvantifikaci RNA měřením absorbance při 260 nm doporučujeme zředit vzorek v 10 mM Tris-HCl (pH 7,5).^{*} Naředění vzorku vodou bez obsahu RNázy RNase-Free Water by mohlo vést k nepřesným nízkým hodnotám.

Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředicího pufru Tris-HCl odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorbance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně.



Pro kvantifikaci v pufru Tris-HCl, použijte vztah

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Viz příloha B, strana 73.

17. Odeberte stojan na reagenční lahvičky z pracovní desky přístroje QIAcube (QIAcube Connect MDx: viz obrázek 21, strana 46; QIAcube: viz obrázek 22, strana 47) a všechny lahvičky uzavřete správně označenými víčky. Pufry v lahvičkách mohou být skladovány při pokojové teplotě (15–25 °C) až po dobu 3 měsíců. Vyjměte a zlikvidujte zbývající reagentie ve zkumavkách na zpracování vzorku (PT) umístěné v drážkách pro mikrocentrifugační zkumavky přístroje QIAcube. Vyjměte adaptéry do rotoru z centrifugy a zlikvidujte je. Vyprázdněte odpadní zásuvku přístroje QIAcube Connect MDx (QIAcube Connect MDx: viz obrázek 17, strana 41; QIAcube: viz obrázek 18, strana 42). Zavřete kryt přístroje QIAcube a pomocí síťového vypínače přístroj vypněte.

^{*} Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít mezi častými dotazy (Frequently Asked Questions, FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z technické podpory společnosti QIAGEN vždy rádi zodpoví vaše otázky ohledně údajů a protokolů v této příručce i obecně k technologiím pro přípravu vzorků a jejich analýzám (možnosti navázání kontaktu viz poslední strana nebo navštivte www.qiagen.com).

Komentáře a návrhy

Degradace RNA

Kontaminace RNázou



Dbejte na to, aby nebyly do reagensů během přípravy nebo následujících analýz vneseny žádné stopy RNázy (viz příloha A, strana 72).

Nízký výtěžek RNA

a) Odebráno méně než 2,5 ml krve do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Ujistěte se, že bylo při odběru odebráno do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 2,5 ml krve (viz příručka *PAXgene Blood RNA Tube*).




b) Koncentrace RNA byla měřena ve vodě



Pro co nejpřesnější kvantifikaci musí být RNA naředěna v 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* (viz příloha B, strana 73).

* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Komentáře a návrhy

- c) Do kolonky PAXgene RNA (PRC) byly během kroků 9 a 10 manuálního protokolu přeneseny buněčné zbytky  Když pipetujete supernatant v kroku 7 manuálního protokolu, snažte se nepřenášet velké částice (přenos malých úlomků přípravu nenarušuje).
- d) Supernatant nebyl v kroku 3 úplně odstraněn  Ujistěte se, že byl odstraněn veškerý supernatant. Pokud supernatant dekantujete, odstraňte kapky ulpělé na okraji zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pomocí papírového ubrousku. Vykonejte náležitá bezpečnostní opatření, aby se zabránilo křížovým kontaminacím.
- e) Po odběru do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) byla krev inkubována méně než 2 hodiny  Po odběru inkubujte krev ve zkumavce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) nejméně 2 hodiny.

Nízká hodnota A_{260}/A_{280}

- a) Při měření A_{260}/A_{280} byla RNA naředěna vodou  K ředění RNA před měřením čistoty používejte 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* (viz příloha B, strana 73).

* 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.

Komentáře a návrhy

- b) Spektrofotometr nebyl správně vynulován



Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorbance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně.

Porucha přístroje

Přístroje QIAcube nefungují správně

Přečtěte si příslušnou uživatelskou příručku k přístroji QIAcube. Věnujte pozornost části o řešení potíží. Ujistěte se, že je přístroj QIAcube správně udržován, jak je popsáno v uživatelské příručce.

Příloha A: Obecné pokyny pro manipulaci s RNA

Manipulace s RNA



Ribonukleázy (RNázy) jsou velmi stabilní a aktivní enzymy, které obecně nevyžadují ke své funkci přítomnost kofaktorů. RNázy je těžké inaktivovat a k degradaci RNA stačí již velmi malé množství, proto byste neměli používat žádné laboratorní pomůcky ze skla nebo umělé hmoty, které nebyly předtím zbaveny kontaminací RNázou. Během purifikace nukleových kyselin a po ní dbejte důsledně na to, aby se nedopatřením do vzorků RNA nedostala žádná kontaminace RNázou. Abyste vytvořili a udrželi prostředí bez obsahu RNázy, musíte při přípravě a používání roztoků a nádobek k jednorázovému či opakovanému použití při práci s RNA dodržovat příslušná bezpečnostní opatření.

Obecné pokyny k manipulaci



Práce s RNA by měla vždy probíhat podle zásad řádné mikrobiologické a aseptické pracovní techniky. Ruce a prachové částice přenášejí bakterie a plísňe a jsou tedy nejčastější zdroj kontaminace RNázou. Při manipulaci s reagensy a vzorky RNA vždy noste latexové nebo vinylové rukavice, abyste zabránili kontaminaci RNázou z povrchu kůže nebo ze zaprášeného laboratorního vybavení. Jednorázové rukavice často vyměňujte a uzavírejte všechny zkumavky ihned po použití. Pokud chcete purifikovanou RNA pro následující aplikace rozpipetovat, ponechte ji na ledu.

Protokoly k odstranění kontaminací RNázou ze skleněných materiálů a roztoků naleznete ve všeobecných metodických publikacích molekulární biologie, jako např. Sambrook, J. A Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. vydání, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Příloha B: Kvantifikace a stanovení kvality celkové RNA

Kvantifikace RNA

Koncentrace RNA by měla být určena měřením absorbance při 260 nm (A_{260}) ve spektrálním fotometru. Aby bylo dosaženo co nejpřesnějšího měření, měl by záznam ležet v lineární oblasti spektrálního fotometru. Absorbance 1 jednotky při 260 nm odpovídá koncentraci 44 μg RNA na ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Tento vztah platí jen pro měření v pufru 10 mM Tris-HCl, pH 7,5,*. Proto by měl být vzorek RNA v případě potřeby naředěn 10 mM Tris-HCl. Jak je popsáno níže (viz kapitola „Čistota RNA“ na straně 74), poměr hodnot absorbancí při 260 nm a 280 nm je přibližným měřítkem čistoty RNA. Ujistěte se, že jsou kvety použité pro měření vzorků RNA prosté RNázy. Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru Tris-HCl odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorbance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně. Níže je uveden příklad výpočtu kvantifikace RNA.

| | | |
|---|---|--|
| Objem vzorku RNA | = | 80 μl |
| Ředění (1/15) | = | 10 μl vzorku RNA + 140 μl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 |
| Měření absorbance naředěného vzorku v kvetách prostých RNázy. | | |
| A_{260} | = | 0,3 |
| Koncentrace vzorku | = | 44 x A_{260} x faktor ředění |
| | = | 44 x 0,3 x 15 |
| | = | 198 $\mu\text{g/ml}$ |
| Celkový výtěžek | = | koncentrace x objem vzorku v mililitrech |
| | = | 198 $\mu\text{g/ml}$ x 0,08 ml |
| | = | 15,8 μg RNA |

* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Čistota RNA

Poměr hodnot absorbcí při 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) je přibližným měřítkem čistoty RNA s ohledem na kontaminanty, které se absorbují v UV, jako např. proteiny. Poměr A_{260}/A_{280} je značně závislý na hodnotě pH. Nižší hodnoty pH mají za následek nižší poměr A_{260}/A_{280} a redukovanou senzitivitu vůči kontaminacím proteiny.* Pro získání přesných dat doporučujeme určit absorbcanci v 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). Čistá RNA vykazuje v 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) poměr A_{260}/A_{280} mezi 1,8 a 2,2. Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru Tris-HCl odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbcanci, což může vést k vysokým hodnotám absorbcance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně.

* 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.

Příloha C: Manipulace se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Následující doporučení od společnosti BD pro vás mohou být užitečná při manipulaci se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Další informace k použití zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) naleznete v příručce *PAXgene Blood RNA Tube Handbook*.

Instrukce k odstranění bezpečnostního uzávěru BD Hemogard:

1. Uchopte zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) jednou rukou, palec přitom umístěte přímo pod bezpečnostní uzávěr BD Hemogard. (Větší stabilitu získáte, opřete-li ruku o pevnou plochu.) Druhou rukou otáčejte uzávěrem BD Hemogard a zároveň jej tlačte palcem nahoru, JEN DOKUD SE ZÁTKA ZKUMAVKY NEUVOLNÍ.
2. Palec před sejmutím uzávěru oddalte. Uzávěr od zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) NEODSUNUJTE palcem. Upozornění: Krev obsažená ve zkumavkách PAXgene Blood RNA Tube (BRT) představuje potenciální nebezpečí infekce. Abyste se vyvarovali zranění během sejmutí uzávěru, je důležité od zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) oddálit palec, kterým tlačíte uzávěr nahoru, ihned jak se uzávěr BD Hemogard uvolní.
3. Zdvihněte uzávěr ze zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Ve velmi nepravděpodobném případě, kdyby se umělohmotný kryt oddělil od gumové zátky, UZÁVĚR ZNOVU NESESTAVUJTE. Ze zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) opatrně sejmete gumovou zátku.

Instrukce k opětovnému uzavření sekundárním bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard

1. Na zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) znovu nasadte uzávěr.
2. Gumovou zátkou otáčejte za současného tlaku na zkumavku. Zátka musí být úplně zasunuta, aby se uzávěr při manipulaci se zkumavkou PAXgene Blood RNA Tube (BRT) neuvolnil.

Informace pro objednání

| Produkt | Obsah | Kat. č. |
|--|--|----------------|
| PAXgene Blood RNA Kit (50) | 50 odstředovacích kolonek PAXgene Spin Columns, 50 odstředovacích kolonek Shredder Spin Columns, zkumavky na zpracování vzorku, DNÁza I bez obsahu RNÁzy, reagentie a pufrý bez obsahu RNÁzy. K použití ve spojení se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes | 762174 |
| PAXgene Blood RNA Tubes (100) | 100 zkumavek na odběr krve | 762165 |
| Související produkty, které lze objednat u společnosti QIAGEN | | |
| Starter Pack, QIAcube | Balíček zahrnuje: stojany na reagenční lahvičky (3); proužky pro popis stojanu (8); 200µl špičky s filtrem (1024); 1000µl špičky s filtrem (1024); 1000µl špičky s filtrem a širokým otvorem (1024); 30ml reagenční lahvičky (18); adaptéry do rotoru (240); držák na adaptéry do rotoru | 990395 |
| Filter-Tips, 1000 µl (1024) | Sterilní jednorázové špičky s filtrem, ve stojáncích | 990352 |
| Reagent Bottles, 30 ml (6) | Reagenční lahvičky (30 ml) s víčky; balíček po 6 kusech; pro použití se stojanem na reagenční lahvičky přístroje QIAcube | 990393 |

| | | |
|--------------------------|---|--------|
| Rotor Adapters (10 x 24) | Na 240 příprav: 240 jednorázových adaptérů do rotoru; pro použití s přístroji QIAcube | 990394 |
| Reagent Bottle Rack | Stojan pro 6 x 30ml reagenční lahvička na pracovní ploše přístroje QIAcube | 990390 |
| Rotor Adapter Holder | Držák na 12 jednorázových adaptérů do rotoru; pro použití s přístroji QIAcube | 990392 |

Související produkty, které lze objednat u společnosti BD*

| | | |
|--------------------------------|---|--------|
| Blood Collection Set | Sada pro odběr krve BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,75palcová (0,8 x 19 mm) kanyla, 12palcová (305 mm) hadička s adaptérem luer; 50 kusů v krabičce, 200 kusů v kartonu | 367286 |
| BD Vacutainer One-Use Holder | Jednorázový držák pouze na průměry 13 a 16 mm; 1000/karton | 364815 |
| BD Vacutainer Plus Serum Tubes | 13 x 75 mm, 4,0ml odběrové zkumavky s červeným bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard a papírovým štítkem; 100/krabice, 1000/karton | 368975 |

* Zde uvedené produkty jsou typickými doplňky pro odběr krve, které mohou být použity se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Další informace (včetně informací o objednání) k těmto doplňkům naleznete na stránkách www.preanalytix.com.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příslušné příručce pro sadu PreAnalytiX či QIAGEN nebo v uživatelské příručce. Příručky k sadám PreAnalytiX a QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách www.preanalytix.com a www.qiagen.com nebo je lze vyžádat od technické podpory společnosti PreAnalytiX.

Historie revizí příručky

| Dokument a revize | Změny | Datum |
|-------------------|--|---------------|
| HB-0101-004, R2 | Změny v celém dokumentu, aby splňoval požadavky nařízení GHS | Červen 2015 |
| HB-0101-005, R3 | Nová šablona; revize v údajích o automatizovaném protokolu a výkonnosti; aktualizace informací o bezpečnosti, aby splňovaly požadavky nařízení GHS; změny údajů o přístrojích a prohlášení o omezení pro použití produktu. | Únor 2019 |
| HB-0101-006, R3 | Oprava názvu sady v tabulce s obsahem sady, str. 5. | Leden 2020 |
| HB-0101-007, R4 | Doplněny přístroje QIAcube Connect MDx do automatizovaného protokolu; aktualizováno znění dokumentu doplněním odkazů na přístroje QIAcube Connect MDx; aktualizovaná čísla tabulek, stran a obrázků v celém dokumentu. | Prosinec 2020 |

PreAnalytiX ve světě

Produkty PreAnalytiX distribuují společnosti QIAGEN a BD

QIAGEN – zákaznický servis

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

BD – zákaznický servis

Argentina, Uruguay and Paraguay

Orders: 0800.444.5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Australia

Orders: 1.800.656.100

Fax: 1.800.656.110

E-mail: bd_anz@bd.com

Austria

Orders: 43.1.7063660

Fax: 43.1.706366011

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

Belgium

Orders: 32.53.720.556

Fax: 32.53.720.549

E-mail: orders.be@bd.com

Brazil

Orders: 0800.055.56.54

E-mail: consultoria_vacutainer@bd.com

Canada

Technical support: 1.800.631.0174

Orders: 1.866.979.9408

Fax: 1.800.565.0897

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

Central and Eastern Europe

Orders: 48.22.377.11.11

Fax: 48.22.377.11.02

Bulgaria orders: info_bulgaria@bd.com

Czech Republic orders: info_czech@bd.com

Croatia orders: info_croatia@bd.com

Hungary orders: info_hungary@bd.com

Poland orders: info_poland@bd.com

Romania orders: info_romania@bd.com

Southeast Europe orders: info_balkan@bd.com

Serbia orders: info_serbia@bd.com

Slovakia orders: info_slovakia@bd.com

Slovenia orders: info_slovenia@bd.com

Denmark

Orders: 45.43.43.45.66

Fax: 45.43.96.56.76

Orders: ordre.dk@bd.com

Technical support: bd denmark@bd.com

Finland

Orders: 358.9.88.70.780

Fax: 358.9.88.70.7816

Orders: tilaukset.fi@bd.com

E-mail: bd suomi@bd.com

France

Orders: 33.476.68.36.36

Fax: 33.476.68.36.93

E-mail: serviceclientbdf@bd.com

Orders: commandesfr@bd.com

Technical support: vacutainerfr@bd.com

Germany

Orders: 49.6221.3050

Fax: 49.6221.305.216

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

India

Orders: 91.124.3949390

Orders: bd_india@bd.com

Ireland (Aquilant Specialist Healthcare Services)

Customer support: 353.1.404.8350

Fax: 353.1.404.8352

E-mail: contactus@aquilantscientific.ie

Israel (Lapidot Medical)

Customer Support: 972.700.70.90.22

E-mail: cs@lapidot.com

Italy

Orders: 39.02.48240.500

Fax: 39.02.48240.775

Technical support: 39.3450655140

E-mail: ordini.it@bd.com

Middle East & Africa

Orders: 971.45.592.555

Fax: 971.45.592.599

E-mail: EMA_PAS@bd.com

The Netherlands

Orders: 31.20.582.94.20

Fax: 31.20.582.94.21

Orders: orders.nl@bd.com

New Zealand

Orders: 0800.572.468

Fax: 0800.572.469

E-mail: nz_customerservice@bd.com

Norway

Customer Support: 64.00.99.00

E-mail: bdhorge@bd.com

Orders: ordre.no@bd.com

Southeast Asia

E-mail: PAS.SEA@bd.com

Indonesia orders: 622.1577.1920

Malaysia orders: 603.2093.8788

Philippines orders: 63.2478.8881

Singapore orders: 65.6861.0633

Thailand orders: 662.646.1800

Vietnam orders: 848.3822.7409

South Korea

Orders: 02.3404.3706

Fax: 02.3404.3785

Technical: 02.3404.3706

Technical support: Korea_PAS@bd.com

Spain, Portugal and Andorra

Orders: 34.91.848.8174

Customer support: 34.902.27.17.27

Fax: 34.91.848.8115

E-mail: info.spain@bd.com

Sweden

Orders: 46.8.775.51.00

Fax: 46.8.645.08.08

Orders: order.se@bd.com

Technical support: bds sweden@bd.com

Switzerland

Orders: 41.61.485.22.24

Fax: 41.61.485.22.00

E-mail: infoch@bd.com

UK

Orders: 0800.917.8776

E-mail: bduk_customerservice@bd.com

USA

Customer support: 800.631.0174

E-mail: productcomplaints@bd.com



HB-0101-007 1122120CZ BD-8945 12/2020
Vyrobeno v Německu