

Joulukuu 2020

# PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit -käsikirja

Versio 2



50 (tuotenro 762174)

R4 **MAT** 1122120FI

**REF** 762174

**IVD**

**CE**



PreAnalytiX GmbH  
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon  
Tuottanut QIAGEN GmbH PreAnalytiX-yhtiölle

**PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

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

PAXgene Blood RNA Kit -sarjoja ei ole saatavilla kaikissa maissa; kysy saatavuustietoja.

#### **Rajoitettu lisenssisopimus**

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa PAXgene Blood RNA Kit -sarjan ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. PAXgene Blood RNA Kit -sarjaa saa käyttää ainoastaan *PAXgene Blood RNA Kit -sarjan käsikirjan* ohjeiden mukaisesti ja ainoastaan yhdessä sarjan sisältämien komponenttien kanssa. PreAnalytiX ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia komponentteja saa käyttää tai liittää muihin komponentteihin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten *PAXgene Blood RNA Kit -sarjan käsikirjassa* ja lisäprotokollissa mainitaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).
2. PreAnalytiX ei takaa kuin nimenomaisissa lisensseissään, että tämä sarja ja/tai sen käyttäjä(t) eivät loukkaa minkään kolmannen tahon oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. PreAnalytiX kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa.
6. PreAnalytiX voi kääntyä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellot ja saadakseen hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asianajopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Päivitetty lisenssiehdot saa osoitteesta [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

#### **Ehdollinen myynti**

Tämän tuotteen mukana seuraa lisenssi patenttivaatimusten US-7,270,953 ja US-7,682,790 sekä EP-1820793 B1 ja näiden vierasmaalaisten vastineiden osien mukaisesti. Lisenssi koskee tuotteen käyttöä näytteenoton aikana muodostuneiden nukleiinihappokompleksien käsittelyyn PAXgene Blood RNA Tube -putkessa.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, kaikki oikeudet pidätetään.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Switzerland

[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

#### **PreAnalytiX-jälleenmyyjät**

PreAnalytiX-tuotteet ovat QIAGENin tai BD:n PreAnalytiXille tuottamia ja jakelemia. Tuotteita ei voi tilata PreAnalytiX GmbH -yhtiöltä.


Katso viimeiseltä sivulta paikallisen PreAnalytiX-jälleenmyyjän yhteystiedot.

# Sisältö

Sarjan sisältö .....	5
Symbolit .....	6
Säilytysolosuhteet.....	7
Käyttötarkoitus.....	8
Tuotteen käytön rajoitukset.....	8
Laadunvalvonta .....	9
Tekninen apu .....	9
Turvallisuustiedot .....	9
Johdanto.....	13
Periaate ja toimenpide.....	13
Näytteen ottaminen ja stabilointi .....	14
RNA:n pitoisuus ja puhdistus.....	19
Manuaalinen RNA:n puhdistus.....	19
Automaattinen RNA:n puhdistus .....	29
Käyttäjän hankkimat välineet ja reagenssit.....	38
Tärkeitä ilmoituksia .....	41
QIAcube-laitteiden käyttäminen.....	41
Protokollien asentaminen QIAcube-laitteisiin .....	44
QIAcube-laitteiden täyttäminen.....	45
Protokolla: Manuaalinen kokonais-RNA:n puhdistus ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin.....	55

Protokolla: Automaattinen kokonais-RNA:n puhdistus ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin .....	62
Vianmääritys .....	69
Liite A: Yleisiä huomautuksia RNA:n käsittelystä .....	72
Liite B: Kokonais-RNA:n kvantifiointi ja laadun määrittäminen .....	73
Liite C: PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien käsitteleminen .....	75
Tilastiedot .....	76
Käsikirjan muutoshistoria .....	78

# Sarjan sisältö

<b>PAXgene Blood RNA Kit</b>			<b>(50)</b>
<b>Tuotenumero</b>			<b>762174</b>
<b>Preparaatioiden määrä</b>			<b>50</b>
BR1	Resuspension Buffer (Resuspensiopuskuri)	<b>RES BUF</b>	20 ml
BR2	Binding Buffer* (Sidospuskuri)	<b>BIND BUF</b>	18 ml
BR3	Wash Buffer 1* (Pesupuskuri 1*)	<b>WASH BUF 1</b>	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Pesupuskuri 2) (tiiviste) <sup>†</sup>	<b>WASH BUF 2 CONC</b>	11 ml
BR5	Elution Buffer (Eluutiopuskuri)	<b>ELU BUF</b>	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (RNAasiton vesi [pullo])	<b>PEL WASH</b>	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinaasi K) (vihreä korkki)	<b>PROTK</b>	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA Spin Column -putket) (punainen)	<b>PAXgene RNA COL</b>	5 × 10
PT	Processing tubes (2 ml) (Käsittelyputket) (2 ml)	<b>PROC TUBE</b>	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Secondary BD Hemogard™ -sulkimet)	<b>SEC CLOS</b>	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1,5 ml) (Mikrosentrifugiputket) (1,5 ml)	<b>MIC TUBE</b>	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilizs) (DNAasi I, RNAasiton) (kylmäkuivattu)	<b>DNA REM</b>	1500 Kunitz-yksikköä*
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) -hajotuspuskuri (valkoinen korkki)	<b>DNA DIG BUF</b>	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) - uudelleensuspensiopuskuri (putki, violetti kansi)	<b>DNase RES BUF</b>	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Spin Column -putket) (violetti)	<b>PAXgene SHRED COL</b>	5 × 10
KäsiKirja	PAXgene Blood RNA Kit -sarjan käsiKirja (versio 2)		1

\* Ei sovellu käytettäväksi yhdessä valkaisuaineita sisältävien desinfiointiaineiden kanssa. Sisältää guanidiinisulaa. Lue turvallisuustiedot sivulta 10.

<sup>†</sup> Pesupuskuri 2 toimitetaan (BR4) konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa 4 tilavuutta etanolia (96–100 %, puhtausluokka p.a.) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.

# Symbolit



Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> testiin



Katso käyttöohjeet



Viimeinen käyttöpäivämäärä



Diagnostinen in vitro -lääkintälaite



Tuotenumero



Eränumero



Materiaalinumero



Komponentit



Numero



Sterilointimenetelmä: säteily



Kunitz-yksiköt



Lisätty



Sisältö



Rekonstituoitu



Deoksiribonukleasi I

\* Kunitz-yksiköt ovat yleisesti käytettyjä yksiköitä DNAasi I:n mittaamiseen. Yksikön määritelmä on se DNAasi I:n määrä, joka aiheuttaa  $A_{260}$ :n nousun 0,001/ minuutti/millilitra 25 °C:ssa, pH:ssa 5,0, käytettäessä erittäin polymeroitunutta DNA:ta substraattina (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ja 363).

**EtOH**

Etanoli

**GITC**

Guanidiini-isotiosyanaatti

**RNase-Free DNase Set**

RNase-Free DNase Set

**GTIN**

GTIN-numero



Ei saa käyttää uudelleen



Lämpötilarajoitus



Lämpötilan yläraja



Valmistaja



Tärkeä ilmoitus

## Säilytysolosuhteet

PAXgene RNA -pyörityskolonniputkia (PRC), PAXgene Shredder -pyörityskolonniputkia (PSC), proteinaasi K (PK) -liuosta ja puskureita (BR1, BR2, BR3, BR4 ja BR5) on säilytettävä kuivina sarjan etiketissä ilmoitetussa lämpötilassa.

RNase-Free DNase Set -sarja, joka sisältää DNAasi I:ä (RNFD), DNA:n hajotuspuskuri (RDD) ja DNAasi-resuspensiopuskuri (DRB) kuljetetaan ympäristönlämpötilassa. RNase-Free DNase Set -sarjan kaikki osat on säilytettävä heti vastaanoton jälkeen etiketissä ilmoitetussa lämpötilassa. Kun sarjaa säilytetään ohjeiden mukaisesti, se on vakaa laatikossa mainittuun viimeiseen käyttöpäivään asti.

# Käyttötarkoitus

PAXgene Blood RNA System -järjestelmä koostuu verinäyteputkesta (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) ja nukleiinihappojen puhdistussarjasta (PAXgene Blood RNA Kit). Se on tarkoitettu verinäytteen ottamiseen, säilytykseen ja kuljetukseen sekä solunsisäisen RNA:n stabilointiin suljetussa putkessa ja myöhempään isäntä-RNA:n eristämiseen ja puhdistukseen kokoverestä molekyyli diagnostiikkatestauksessa käytettyä RT-PCR-käsittelyä varten.

**PAXgene Blood RNA System -järjestelmän suorituskykyominaisuudet on määritetty vain FOS- ja IL1B-geenitranskriptien kanssa. Käyttäjä on vastuussa asianmukaisten PAXgene Blood RNA System -järjestelmän suorituskykyominaisuuksien määrittämisestä muille kohdetranskripteille.**

## Käyttöaiheet

PAXgene Blood RNA Kit -sarja on tarkoitettu solunsisäisen RNA:n puhdistamiseen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen. Kun sarjaa käytetään yhdessä PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken kanssa, järjestelmä tuottaa puhdistettua solunsisäistä RNA:ta kokoverestä molekyyli diagnostiikkatestauksessa käytettyä RT-PCR:ä varten.

## Tuotteen käytön rajoitukset

PAXgene Blood RNA Kit -sarja on tarkoitettu solunsisäisen RNA:n puhdistamiseen ihmisen kokoverestä ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leukosyyttiä/ml) in vitro -diagnostiikkaa varten. Sitä ei ole tarkoitettu genomisen DNA:n tai virusten nukleiinihappojen puhdistamiseen ihmisen kokoverestä. Koska stabilointimääryiksiä varten on validoitu vain muutama transkripti (FOS- ja IL1B-geenitranskriptit), suorituskykyominaisuuksia ei ole määritetty kaikille transkripteille. Käyttäjien on käytävä läpi valmistajan tiedot ja heidän omat tietonsa, kun he määrittävät, onko muiden transkriptien validointi tarpeen.



Tuote on tarkoitettu ammattihenkilöiden, kuten in vitro -diagnostiikkakoulutuksen saaneiden teknikoiden ja lääkäreiden käyttöön.

Katso *PAXgene Blood RNA Tube -käsikirjasta* lisätietoa PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) -putkien käytöstä.

## Laadunvalvonta

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunhallintajärjestelmän mukaisesti jokainen PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erä testataan määritettyjen spesifikaatioiden mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi.

## Tekninen apu

QIAGEN-yhtiön tarjoama tekninen tuki on huippulaatuista ja helposti saatavilla. Teknisen palvelun osastoillamme on kokeneita asiantuntijoita, joilla on laaja teoreettinen ja käytännöllinen molekyylibiologian osaaminen ja jotka hallitsevat PreAnalytiX-tuotteiden käytön. Jos sinulla on kysyttävää PAXgene Blood RNA Kit -sarjasta, ota meihin yhteyttä. Autamme mielellämme.

Teknistä tukea ja lisätietoja saa ottamalla yhteyttä QIAGENin tekniseen palvelupisteeseen.

## Turvallisuustiedot

EU – Käyttäjien on ilmoitettava kaikista laitteeseen liittyvistä vakavista vaaratilanteista valmistajalle ja kansalliselle toimivaltaiselle viranomaiselle. EU:n ulkopuolella – Ota yhteyttä QIAGENin paikalliseen edustajaan, jos tapahtuu laitteeseen liittyvä vaaratilanne tai sinulla on kysyttävää laitteesta.

Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja.

Infektiovaaran (esim. HIV:n tai hepatiitti B -viruksen tarttumisen) tai loukkaantumisen välttämiseksi työskennellessä biologisten ja kemiallisten materiaalien kanssa on aina käytettävä sopivaa laboratoriotakkia, kertakäyttöisiä käsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista (Safety Data Sheet, SDS). Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com), jossa voidaan tarkastella ja tulostaa tämän sarjan käyttöturvallisuustiedote.

**HUOMIO**



ÄLÄ lisää valkaisuainetta tai happamia liuoksia suoraan näytteen preparointijätteeseen.

Sidontapuskuri (BR2) ja pesupuskuri 1 (BR3) sisältävät guanidiiniytosyanaattia, joka valkaisuaineeseen yhdistettynä voi muodostaa herkästi reagoivia aineita. Jos sidontapuskuri (BR2) tai pesupuskuri 1 (BR3) läikkyvät, puhdista läikynnät sopivalla laboratoriopuhdistusaineella ja vedellä. Jos läikkynyt neste sisältää mahdollisia tartunnanaiheuttajia, puhdista alue ensin laboratorionkäyttöön sopivalla puhdistusaineella ja vedellä ja sen jälkeen 1 %:n (v/v) natriumhypokloriitilla (valkaisuaine).

RNA:n stabilointiliuoksen ja veren seos PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkesta voidaan desinfioida käyttämällä 1 osa valkaisuainetta (5-prosenttinen natriumhypokloriitti) kohti 9 osaa RNA:n stabilointiliuoksen ja veren seosta.

Näytteen valmistelujäte, kuten RNA:n puhdistustoimenpiteen sentrifugointivaiheen tuottamat supernatantit, on katsottava mahdollisesti tartuntavaaralliseksi. Ennen hävittämistä jäte on autoklavoitava tai poltettava tartuntavaarallisen aineen tuhoamiseksi. Hävitys on tehtävä virallisten määräysten mukaisesti.

Seuraavat varoitukset ja varotoimet koskevat PAXgene Blood RNA Kit -sarjan osia. Katso *PAXgene Blood RNA Tube -käsikirjasta* turvallisuustietoja PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkista.

### Buffer BR2



Sisältää: guanidiinitiosyanaattia. Vaara! Terveydelle haitallista nieltynä. Voi olla haitallista ihokosketuksessa tai hengitettynä. Aiheuttaa vakavaa silmien vahingoittumista. Haitallista vesieliöille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia. Kosketus happoihin vapauttaa erittäin myrkyllistä kaasua. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojainta/kasvosuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhtelee huolellisesti vedellä useiden minuuttien ajan. Poista mahdolliset piilolinssit, jos ne ovat helposti poistettavissa. Jatka huuhtelua. Soita heti MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkärille.

### Buffer BR3



Sisältää: etanolia, guanidiinitiosyanaattia. Vaara! Tulenarka neste ja höyry. Aiheuttaa vakavaa silmien vahingoittumista. Kosketus happoihin vapauttaa erittäin myrkyllistä kaasua. Pidettävä poissa lämmönlähteistä/kipinöistä/avotulesta/kuumista pinnoista. Ei tupakointia. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojainta/kasvosuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhtelee huolellisesti vedellä useiden minuuttien ajan. Poista mahdolliset piilolinssit, jos ne ovat helposti poistettavissa. Jatka huuhtelua. Soita heti MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkärille.

## DNaasi I



Sisältää: DNaasia. Vaara! Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion. Voi aiheuttaa hengitettynä allergia- tai astmaoireita tai hengitysvaikeuksia. Vältä pölyn/savun/kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojainta/kasvonsuojainta. Käytä hengityksensuojainta. Altistumistapauksissa tai epävarmoissa tilanteissa: Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin. Siirrä altistunut henkilö raittiiseen ilmaan ja pidä lepoasennossa, jossa on helppo hengittää.

## Proteinaasi K



Sisältää: proteinaasi K:ta. Vaara! Aiheuttaa vähäistä ihoärsytystä. Voi aiheuttaa hengitettynä allergia- tai astmaoireita tai hengitysvaikeuksia. Vältä pölyn/savun/kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojainta/kasvonsuojainta. Käytä hengityksensuojainta. Altistumistapauksissa tai epävarmoissa tilanteissa: Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin. Siirrä altistunut henkilö raittiiseen ilmaan ja pidä lepoasennossa, jossa on helppo hengittää.

# Johdanto

Kokoverinäytteen ottaminen on ensimmäinen vaihe useissa molekyyliäärityksissä, joilla tutkitaan solun RNA:ta. Suuri ongelma näissä testeissä on kuitenkin solun RNA-profiilin epävakaus in vitro. PreAnalytiXin tutkimukset ovat osoittaneet, että yksittäisten mRNA-lajien kopiomäärät kokoveressä voivat vaihdella yli tuhatkertaisesti huoneenlämmössä tapahtuvan säilytyksen tai kuljetuksen aikana.\* Tämän aiheuttaa sekä nopea RNA:n hajoaminen että tiettyjen geenien ekspressoituminen verinäytteen oton jälkeen. Tällaiset muutokset RNA:n ekspressioprofiilissa tekevät luotettavien geeniekspressiotutkimusten tekemisestä mahdotonta. Menetelmä, joka säilyttää RNA:n ekspressioprofiilin laskimopunktion aikana ja sen jälkeen, on siis erittäin tärkeää tarkan geeniekspression analysoimisessa ihmisen kokoverestä.

## Periaate ja toimenpide

PreAnalytiX on kehittänyt järjestelmän, joka mahdollistaa ihmisen kokoverinäytteiden ottamisen, stabiloinnin, säilytyksen ja kuljetuksen sekä nopean ja tehokkaan solunsisäisen RNA:n puhdistusprotokollan. Järjestelmä edellyttää PAXgene Blood RNA Tube -putkien (BRT; Yhdysvaltojen patentit 6,602,718 ja 6,617,170) käyttämistä verinäytteen ottamiseen ja RNA:n stabilointiin, minkä jälkeen RNA puhdistetaan manuaalisesti tai automaattisesti PAXgene Blood RNA Kit -sarjan avulla. Sekä manuaaliset että automaattiset protokollat mahdollistavat olennaisesti vastaavan suorituskyvyn RNA:n laadun ja tuoton osalta. Manuaalisen protokollan (sivut 22–29) ja automaattisen protokollan (sivut 31–35) suorituskykytiedot sisältyvät tähän käsikirjaan.



QIAGEN QIAcube Connect MDx ei ole saatavilla kaikissa maissa. Lisätietoja saat QIAGENIN tekniseltä palvelulta.

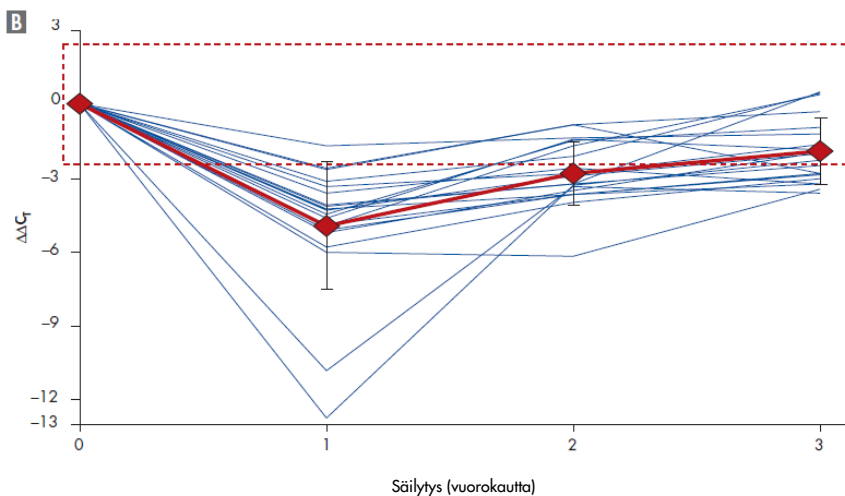
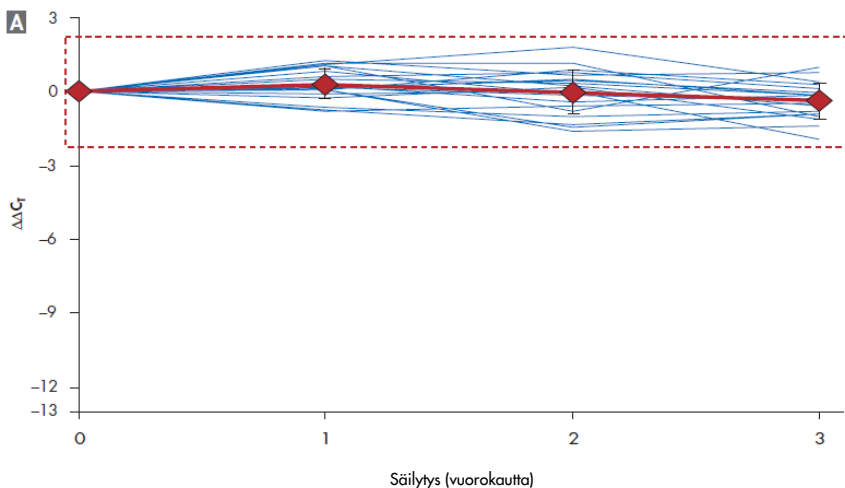
\* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

## Näytteen ottaminen ja stabilointi

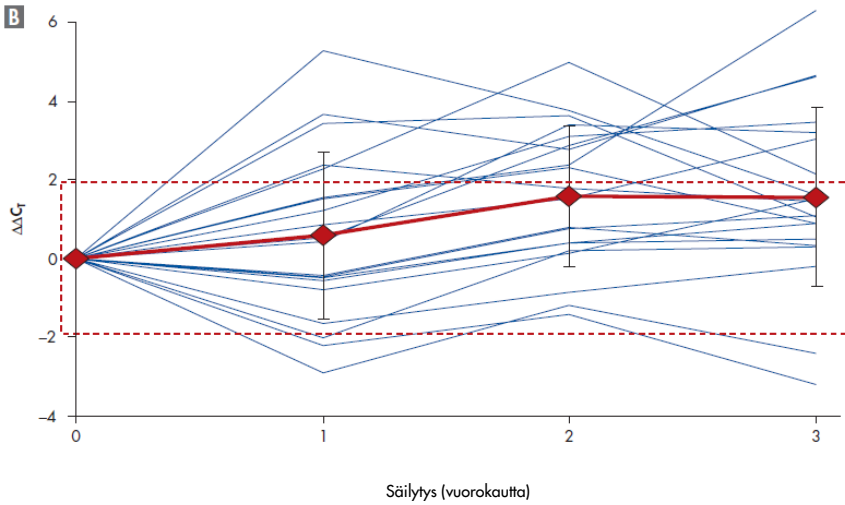
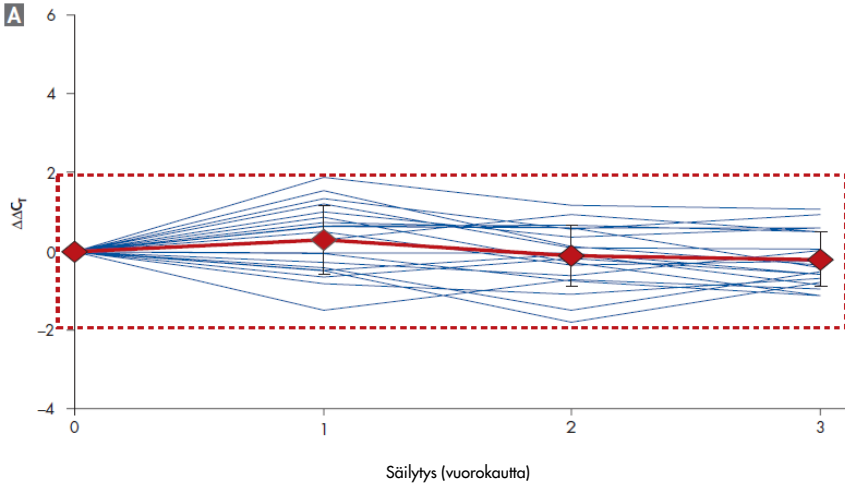
PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkissa on tekijänoikeudella suojattua reagenssiseosta, joka perustuu patentoituun RNA:n stabilointitekniikkaan. Tämä reagenssiseos suojaa RNA-molekyyliä RNAasin hajottavalta vaikutukselta ja minimoi geeniekspression muutokset ex vivo. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putket on tarkoitettu ihmisen kokoverinäytteiden ottamiseen ja solun RNA:n stabiloimiseen enintään kolmen (3) vuorokauden ajan 18–25 °C:ssa (kuvat 1 ja 2, sivut 15 ja 16) tai enintään viiden (5) vuorokauden ajan 2–8 °C:ssa (kuvat 3 ja 4, sivut 17 ja 18). Saatavilla olevat tiedot osoittavat, että solujen RNA pysyy stabiilina vähintään 11 vuotta –20 tai –70 °C:ssa\*. Lisätietoja meneillään olevista tutkimuksista, joissa arvioidaan stabiiliutta pidemmillä ajanjaksoilla, saat ottamalla yhteyden QIAGENin tekniseen palveluun.

RNA:n stabiiliuden todellinen kesto voi vaihdella solun RNA:n lajin ja käytetyn myöhemmän sovelluksen mukaan. Koska stabilointimäärityksiä varten on validoitu vain muutama transkripti (FOS- ja IL1B-geenitranskriptit), suorituskykyominaisuuksia ei ole määritetty kaikille transkripteille. Käyttäjien on käytävä läpi valmistajan tiedot ja heidän omat tietonsa, kun he määrittävät, onko muiden transkriptien validointi tarpeen.

\* Käynnissä on pitkäkestoinen tutkimus veren säilyttämisestä PAXgene Blood RNA Tube -putkissa.

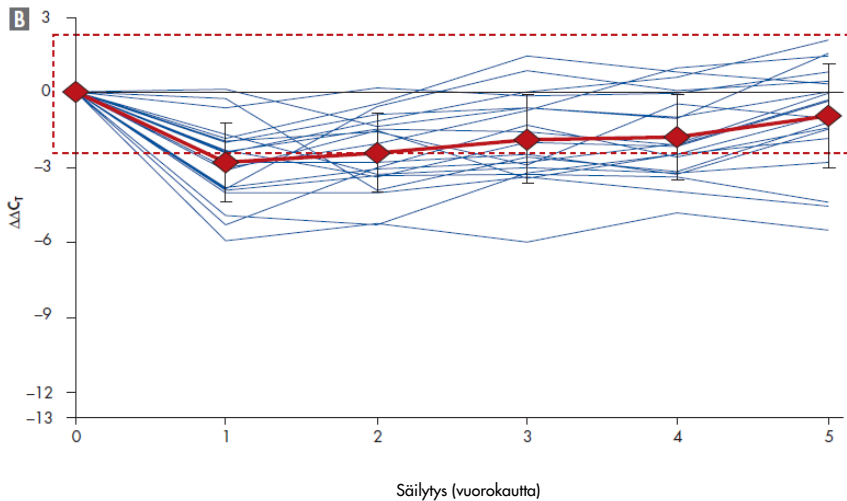
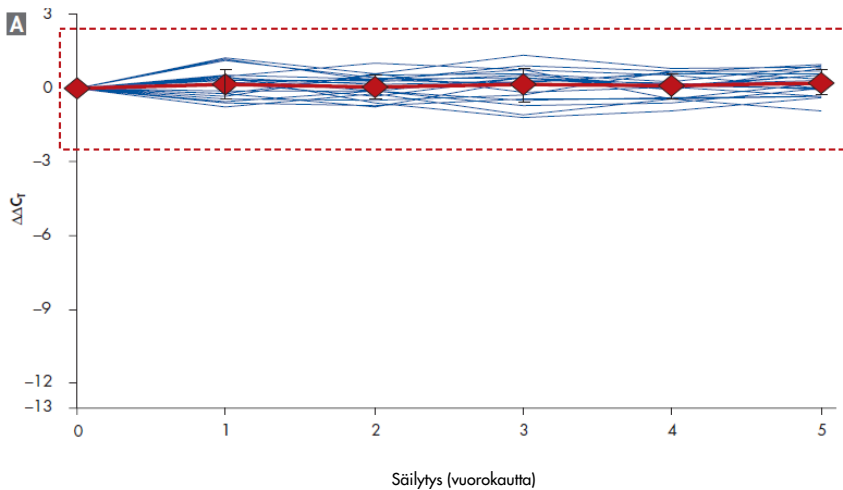


**Kuva 1. RNA:n stabiilius verinäytteissä 18–25 °C:ssa: FOS.** Verta otettiin 10 luovuttajalta tuplanäytteinä, ja sitä säilytettiin 18–25 °C:ssa ilmoitettu määrä päiviä, minkä jälkeen tehtiin kokonais-RNA:n puhdistus. **[A]** Verinäytteet otettiin ja säilytettiin PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkissa ja kokonais-RNA puhdistettiin PAXgene Blood RNA Kit -sarjan avulla. **[B]** Verinäytteet otettiin ja säilytettiin standardeissa verinäyteputkissa, joissa oli EDTA:ta antikoagulanttina, ja kokonais-RNA puhdistettiin käyttämällä standardia orgaanista erotusmenetelmää ja piioksidikalvopohjaista RNA:n puhdistusta. Suhteelliset FOS-transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisesti duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon, kuten myös keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittämisen  $\pm 3\times$  kokonaistarkkuuden ( $2,34 C_T$ ).

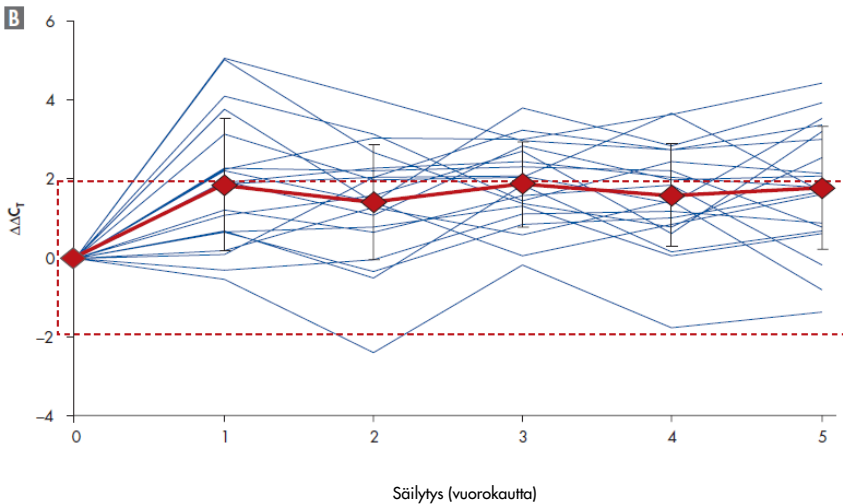
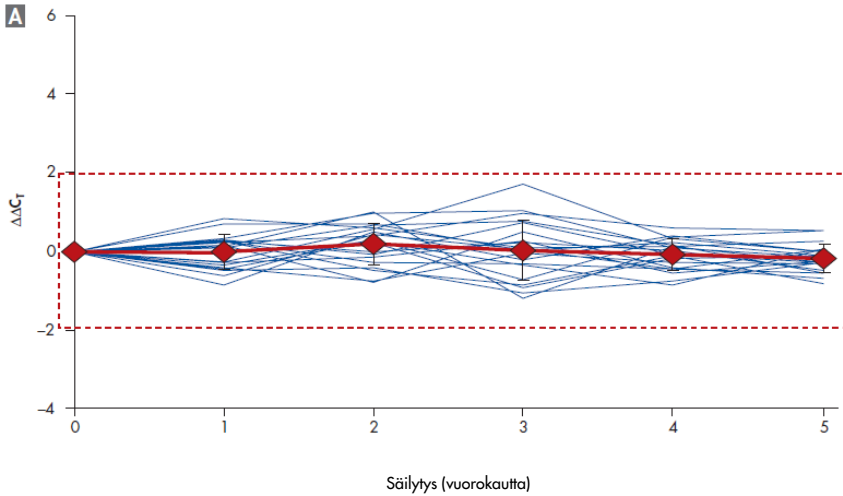


**Kuva 2. RNA:n stabiilius verinäytteissä 18–25 °C:ssa: IL1B.** Verinäyte otettiin ja kokonais-RNA puhdistettiin 18–25 °C:ssa säilyttämisen jälkeen, kuten kuvassa 1 on kuvattu. IL1B-transkriptin suhteelliset tasot määritettiin reaaliajassa duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon, kuten myös keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittelyn  $\pm 3x$  kokonaistarkkuuden (1,93  $C_t$ ).





**Kuva 3. RNA:n stabiilius verinäytteissä 2–8°C:ssa: FOS.** Verta otettiin 10 luovuttajalta tuplanäyteinä, ja sitä säilytettiin 2–8°C:ssa ilmoitettu määrä päiviä, minkä jälkeen tehtiin kokonais-RNA:n puhdistus. **[A]** Verinäytteet otettiin ja säilytettiin PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkissa ja kokonais-RNA puhdistettiin PAXgene Blood RNA Kit -sarjan avulla. **[B]** Verinäytteet otettiin ja säilytettiin standardeissa verinäyteputkissa, joissa oli EDTA:ta antikoagulanttina, ja kokonais-RNA puhdistettiin käyttämällä standardia orgaanista erotusmenetelmää ja piioksidikalvopohjaista RNA:n puhdistusta. Suhteelliset FOS-transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisesti duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon, kuten myös keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittymisen  $\pm 3x$  kokonaistarkkuuden (2,34  $C_t$ ).



**Kuva 4. RNA:n stabiilius verinäytteissä 2–8°C:ssa: IL1B.** Verinäyte otettiin ja kokonais-RNA puhdistettiin 2–8°C:ssa säilyttämisen jälkeen, kuten kuvassa 3 on kuvattu. IL1B-transkriptin suhteelliset tasot määritettiin reaaliajassa duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon, kuten myös keskiarvot ja keskijahonnot kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittelyn  $\pm 3 \times$  kokonaistarkkuuden (1,93  $C_T$ ).

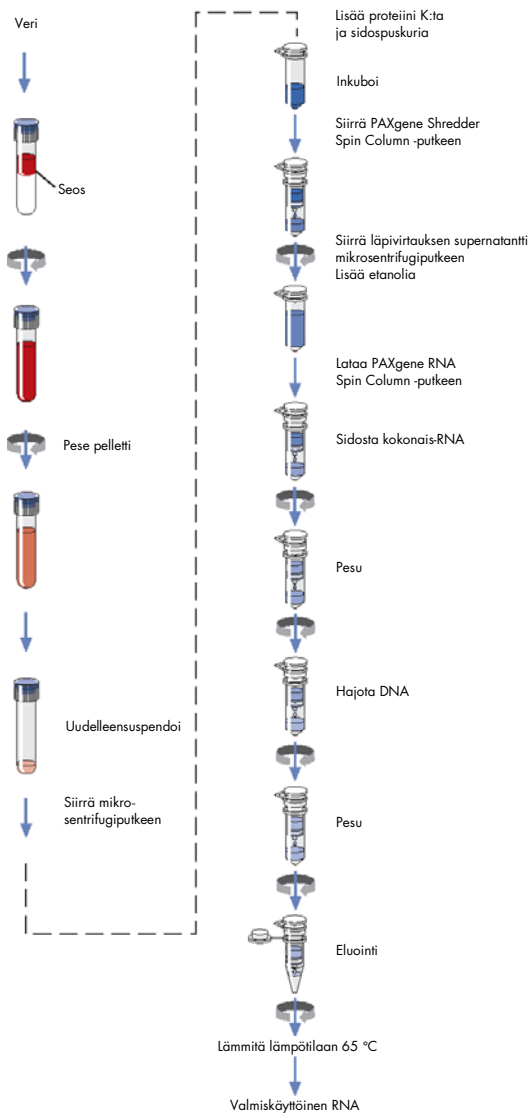
## RNA:n pitoisuus ja puhdistus

PAXgene Blood RNA Kit -sarja on tarkoitettu kokonais-RNA:n puhdistamiseen 2,5 ml:sta ihmisen kokoversta, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen. Toimenpide on yksinkertainen ja voidaan tehdä manuaalisesti tai automaattisesti (katso kuvat 5 ja 10, sivuilla 20 ja 30). Molemmissa protokollissa puhdistus alkaa sentrifugoinnilla, jolla pelletoidaan nukleiinihapot PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkissa. Pelletti pestään ja uudelleensuspendoidaan, minkä jälkeen tehdään manuaalinen tai automaattinen RNA:n puhdistus. Periaatteessa molemmissa protokollissa on samat vaiheet ja niissä käytetään samoja sarjan osia.

## Manuaalinen RNA:n puhdistus

Tarkemmin sanottuna uudelleensuspendoitu pelletti inkuboidaan optimoiduissa puskureissa yhdessä proteinaasi K:n (PK) kanssa, jotta saadaan aikaan proteiinin hajoaminen. Lisäsentrifugointi PAXgene Shredder -pyörityskolonniputkella (PSC) homogeneroi solulysaatin ja irrottaa jääneen soluaineksen, ja läpivirtausfraktion supernatantti siirretään uuteen mikrosentrifugiputkeen. Sidontaolosuhteita säädetään lisäämällä etanolia ja lysaatti siirretään PAXgene RNA -pyörityskolonniputkeen (PRC). Lyhyen sentrifugoinnin aikana RNA sitoutuu selektiivisesti PAXgene-piiksidikalvoon, kun kontaminantit kulkevat sen läpi. Loput kontaminantit poistetaan useilla tehokkailla pesuvaiheilla. Ensimmäisen ja toisen pesuvaiheen välissä kalvoa käsitellään DNAasi I:llä (RNFD), jotta pienet sitoutuneen DNA:n hiukkaset saadaan poistettua. Pesuvaiheiden jälkeen RNA eluoidaan eluutiopuskuriin (BR5) ja denaturoidaan lämmöllä.

PAXgene Blood RNA System -järjestelmällä eristetty kokonais-RNA on puhdasta. Käytettäessä manuaalista protokollaa  $A_{260}/A_{280}$ -arvot ovat välillä 1,8–2,2 ja  $\leq 1\%$ :n (w/w) genomista DNA:ta on läsnä  $\geq 95\%$ :ssa kaikista näytteistä mitattuna beeta-aktiinigeenisekvenssin kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR:llä. Vähintään 95%:ssa näytteistä ei näy inhibitiota RT-PCR:ssä, kun käytetään enintään 30 % eluaatista.

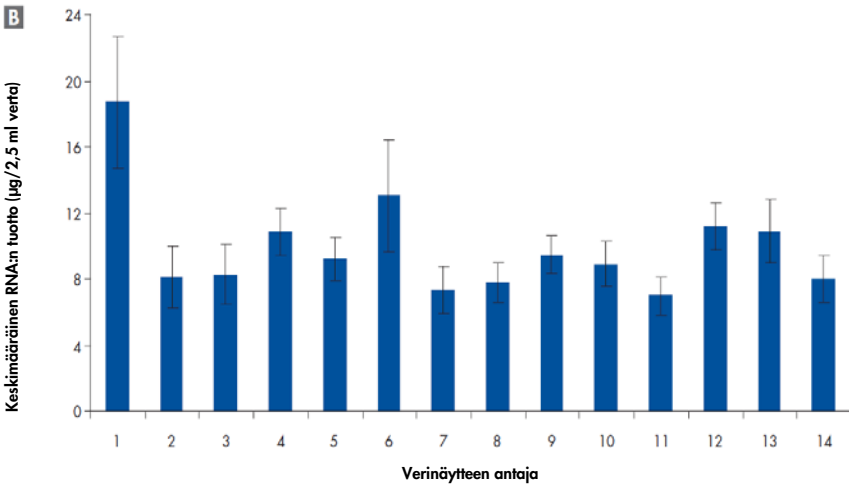
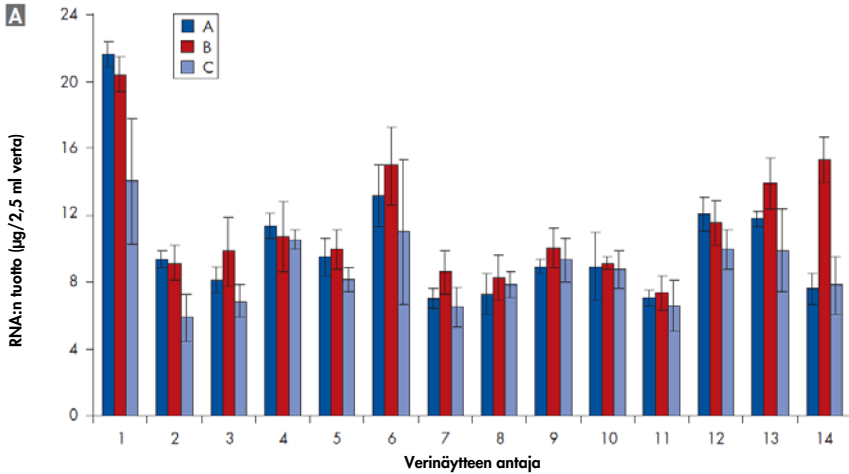


Kuva 5. Manuaalinen PAXgene Blood RNA -protokolla.

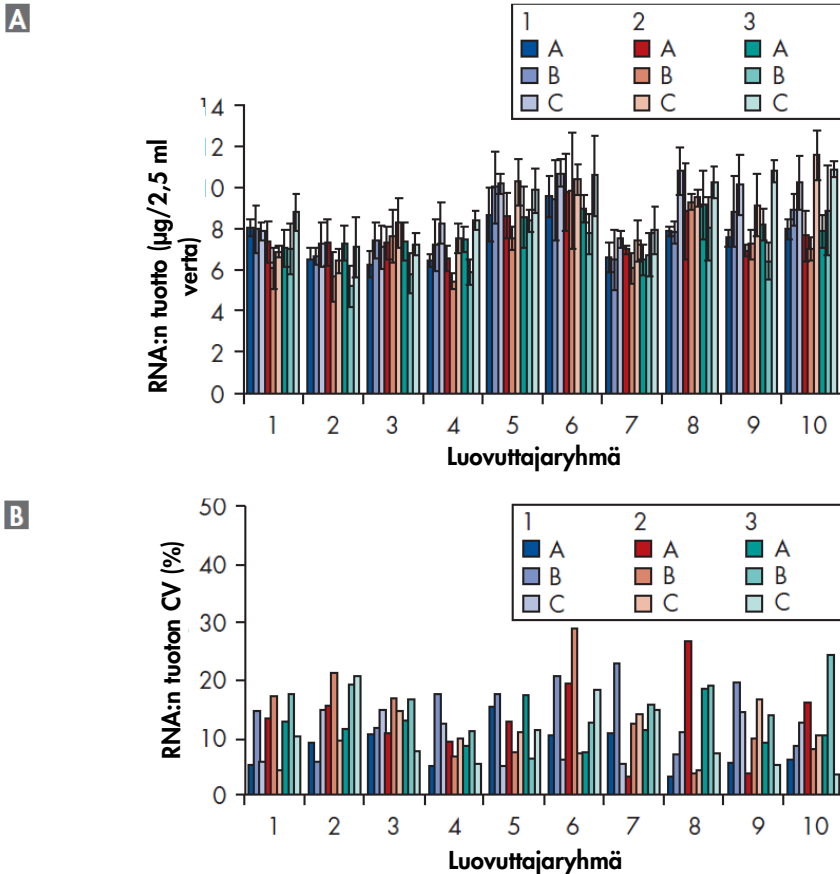
Käytettäessä manuaalista protokollaa näytteen valmistelu-aika (12 näytteen valmistelu-aikoista kerättyjen tietojen perusteella) on keskimäärin noin 90 minuuttia\*, joista vain 40 minuuttia on ihmisen toimia edellyttävää aikaa. RNA:n tuotto 2,5 ml:sta tervettä ihmisen kokoverta on  $\geq 3 \mu\text{g}$   $\geq 95 \%$ :ssa käsitellyistä näytteistä. Koska tuotto on näytteen antajasta riippuvaista, yksilölliset tuotot voivat vaihdella. Yksittäisten näytteen antajien osalta PAXgene Blood RNA System -järjestelmä tuottaa erittäin uusittavia ja toistettavia tuottoja (kuvat 6 ja 7, sivuilla 22 ja 23) ja uusittavia ja toistettavia RT-PCR-tuloksia (kuvat 8 ja 9, sivuilla 27 ja 28), mikä tekee järjestelmästä luotettavan kliinisessä diagnostiikkakäytössä.

Kuva 6 (sivu 22) esittää PAXgene Blood RNA System -järjestelmän yleisen uusittavuuden ja toistettavuuden. Lisätutkimuksilla pyrittiin osoittamaan eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erien ja eri käyttäjien vaikutus RNA-tuoton uusittavuuteen ja reaaliaikaisen RT-PCR:n toimintaan. Koska näissä tutkimuksissa käytettiin yhdistettyjä verinäytteitä yksittäisten PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien sijaan, tulokset eivät osoita järjestelmän toistettavuutta, kuten vaihtelua yksittäisten verinäytteen ottojen välillä, vaan ainoastaan näytteen valmistelun toistettavuuden (katso kuva 7, sivu 23).

\* Protokollan kokonaisaika, mukaan lukien edeltävä PAXgene Blood RNA Tube -putkien käsittely (sentrifugointi, pelletin pesu ja pelletin uudelleensuspendointi).



**Kuva 6. Uusittava ja toistettava RNA:n puhdistus.** 14 verinäytteen antajan nelinkertaiset verinäytteet käsitelti manuaalisesti kolme (3) teknikkaa (A, B, C). Käytössä oli kolme laitesarjaa, ja kaikki saman tekniikan valmistelemat näytteet käsiteltiin samalla laitteella. **[A]** RNA:n tuoton keskiarvot ja keskihajonnat näyttereplikaattia kohti esitetään samoilta luovuttajilta ja eri tekniikoilta. **[B]** Kolme (3) teknikkaa käsitelti 12 verinäyttereplikaattia kullakin 14 luovuttajalta. RNA:n tuoton keskiarvot ja keskihajonnat näytettä kohti esitetään samoilta luovuttajilta ja kaikilta tekniikoilta. Kaikkien RNA-näytteiden osalta  $A_{260}/A_{280}$ -suhteet olivat välillä 1,8–2,2.



**Kuva 7. RNA:n tuoton uusittavuus ja toistettavuus eri käyttäjien PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erien osalta käytettäessä yhdistettyjä verinäytteitä.** 30 eri luovuttajan verinäytteet kerättiin PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin (12 putkea per luovuttaja, yhteensä 360 putkea). Kolmen (3) luovuttajan putkien sisältö yhdistettiin ja sen jälkeen ne jaettiin 36 näytteeksi. Nämä 36 näytettä kolmen luovuttajan sarjasta käsiteltiin manuaalisesti kolmen (3) eri käyttäjän toimesta. Kukin käyttäjä käytti kolmea (3) eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää eristämässä ja käsiteli nelinkertaiset näytteet kustakin 10 näyteryhmästä. **[A]** RNA:n tuotto ja keskihajonta jokaisen käyttäjä-eräyhdistelmän osalta. Kolme (3) eri käyttäjää (A, B, C) käsitelivät nelinkertaiset verinäytteet 10 luovuttajaryhmältä kullakin kolmella sarjan erällä (1, 2, 3). Keskimääräiset tuotot (pylväät) ja keskihajonnat (virhepalkit) nelinkertaista näytettä kohti esitetään samasta luovuttajaryhmästä eri käyttäjiä ja sarjan eri erää kohti. **[B]** RNA:n tuoton CV luovuttajaryhmää kohti kaikkien käyttäjä-eräyhdistelmien (A, B, C; 1, 2, 3) osalta laskettuna keskimääräisestä tuotosta ja tuoton keskihajonnasta on esitetty kuvassa 7A.

Taulukko 1A. Uusittavuus erän sisällä ja käyttäjäkohtaisesti valittujen luovuttajaryhmien osalta (1, 6, 9, 10)

Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> solua/ml			Luovuttajaryhmä 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> solua/ml		
	Keskimääräinen			Keskimääräinen		
	tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)	tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)
Erä 1, käyttäjä A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Erä 1, käyttäjä B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Erä 1, käyttäjä C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Erä 2, käyttäjä A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Erä 2, käyttäjä B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Erä 2, käyttäjä C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Erä 3, käyttäjä A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Erä 3, käyttäjä B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Erä 3, käyttäjä C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> solua/ml			Luovuttajaryhmä 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> solua/ml		
	Keskimääräinen			Keskimääräinen		
	tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)	tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)
Erä 1, käyttäjä A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Erä 1, käyttäjä B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Erä 1, käyttäjä C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Erä 2, käyttäjä A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Erä 2, käyttäjä B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Erä 2, käyttäjä C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Erä 3, käyttäjä A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Erä 3, käyttäjä B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Erä 3, käyttäjä C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3



Taulukko 1B. Käyttäjakohtainen ja kaikkien erien välinen uusittavuus valittujen luovuttajaryhmien osalta (1, 6, 9, 10).

Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> solua/ml			Luovuttajaryhmä 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> solua/ml		
	Keskimääräinen		CV (%)	Keskimääräinen		CV (%)
	tuotto (µg)	SD (µg)		tuotto (µg)	SD (µg)	
Käyttäjä A, kaikki erät	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Käyttäjä B, kaikki erät	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Käyttäjä C, kaikki erät	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> solua/ml			Luovuttajaryhmä 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> solua/ml		
	Keskimääräinen		CV (%)	Keskimääräinen		CV (%)
	tuotto (µg)	SD (µg)		tuotto (µg)	SD (µg)	
Käyttäjä A, kaikki erät	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Käyttäjä B, kaikki erät	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Käyttäjä C, kaikki erät	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Taulukko 1C. Erän sisäinen ja kaikkien käyttäjien välinen uusittavuus valittujen luovuttajaryhmien osalta (1, 6, 9, 10).

Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> solua/ml			Luovuttajaryhmä 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> solua/ml		
	Keskimääräinen		CV (%)	Keskimääräinen		CV (%)
	tuotto (µg)	SD (µg)		tuotto (µg)	SD (µg)	
Erä 1, kaikki käyttäjät	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Erä 2, kaikki käyttäjät	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Erä 3, kaikki käyttäjät	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> solua/ml			Luovuttajaryhmä 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> solua/ml		
	Keskimääräinen		CV (%)	Keskimääräinen		CV (%)
	tuotto (µg)	SD (µg)		tuotto (µg)	SD (µg)	
Erä 1, kaikki käyttäjät	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Erä 2, kaikki käyttäjät	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Erä 3, kaikki käyttäjät	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

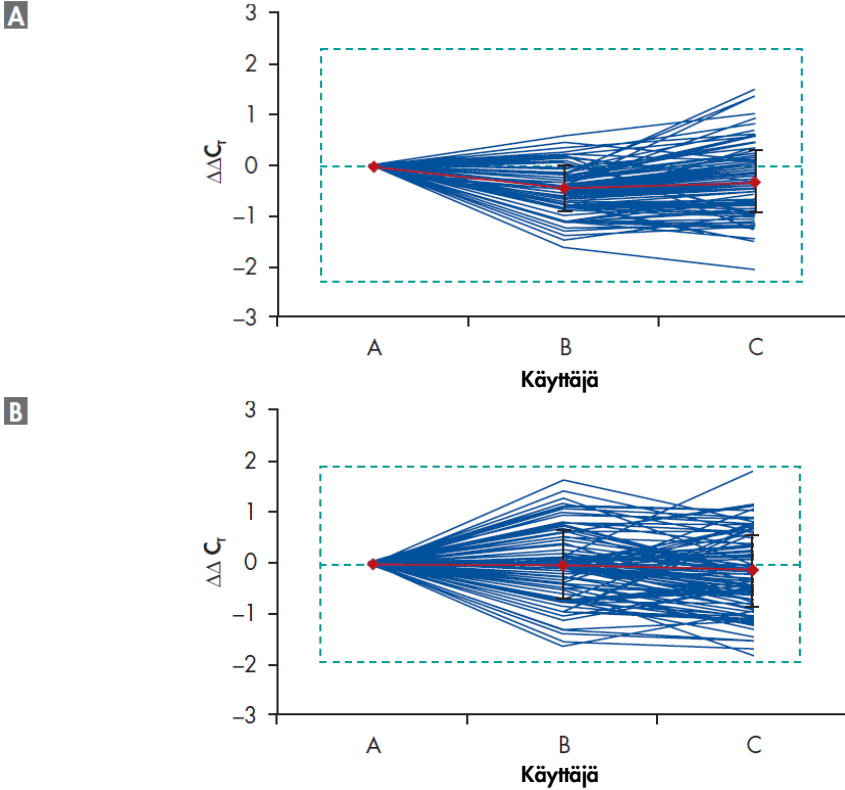
Taulukko 1D. Kaikkien erien ja kaikkien käyttäjien välinen uusittavuus valittujen luovuttajaryhmien osalta (1, 6, 9, 10).

Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> solua/ml			Luovuttajaryhmä 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> solua/ml		
	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)
Erä 1, kaikki käyttäjät	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

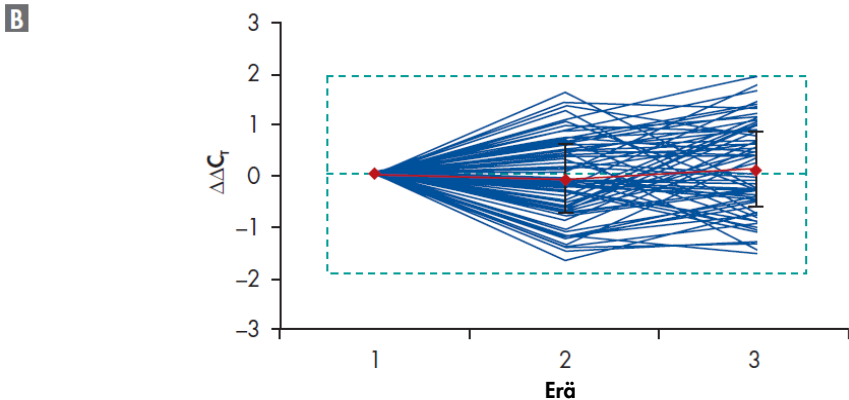
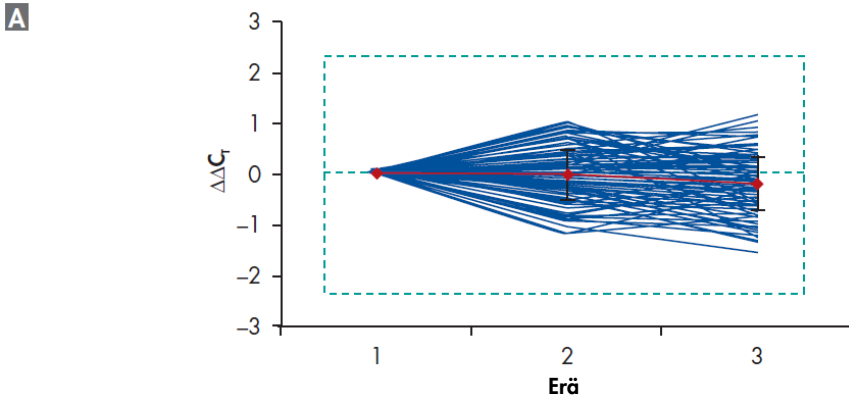
  

Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> solua/ml			Luovuttajaryhmä 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> solua/ml		
	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)
Erä 1, kaikki käyttäjät	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Tarkempi analyysi neljästä (4) edustavasta luovuttajaryhmästä. Ryhmät valittiin valkosolumäärän mukaan, ja ne heijastavat valkosolumäärän normaalin vaihteluvälin ylä-, keski- ja ala-arvoja ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leukosyyttiä/ml). Valkosolumäärä edustaa kolmen (3) valkosolumäärän keskiarvoa kolmelta luovuttajalta per luovuttajaryhmä.



**Kuva 8. RT-PCR:n uusittavuus – käyttäjien välillä.** Kuvassa 7 kuvatussa kokeessa puhdistettua RNA:ta käytettiin reaaliaikaisessa RT-PCR:ssä. **[A]** FOS:n ja **[B]** IL1B:n suhteelliset transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisella duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon suhteessa käyttäjän A arvoihin (10 luovuttajaryhmää x 3 sarjan erää x 4 replikaattia = 120 tietojoukkoa kustakin geenistä), samoin kuin keskiarvot (punaiset viivat) ja keskihajonnat (mustat palkit) kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittelyn  $\pm 3x$  kokonaistarkkuuden (FOS: 2,34  $C_t$ ; IL1B: 1,93  $C_t$ ).



**Kuva 9. RT-PCR:n uusittavuus – sarjan erien välillä.** Kuvassa 7 kuvatussa kokeessa puhdistettua RNA:ta käytettiin reaaliaikaisessa RT-PCR:ssä. **[A]** FOS:n ja **[B]** IL1B:n suhteelliset transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisella duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon suhteessa sarjan erän 1 arvoihin (10 luovuttajaryhmää x 3 käyttäjää x 4 replikaattia = 120 tietojoukkoa kustakin geenistä), samoin kuin keskiarvot (punaiset viivat) ja keskihajonnat (mustat palkit) kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittelyn  $\pm 3x$  kokonaistarkkuuden (FOS: 2,34  $C_t$ ; IL1B: 1,93  $C_t$ ).

**Taulukko 2. Yhteenveto kuvien 8 ja 9 RT-PCR-tiedoista**

Testijärjestelmä	FOS/18S rRNA -määritys		IL1B/18S rRNA -määritys	
	Keskiarvo ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )	Keskiarvo ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>Käyttäjakohtainen ja kaikkien erien välinen uusittavuus</b>				
Kaikki käyttäjät, erä 1 – erä 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Kaikki käyttäjät, erä 1 – erä 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Kaikki käyttäjät, erä 1 – erä 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
<b>Käyttäjakohtainen ja kaikkien erien välinen uusittavuus</b>				
Kaikki erät, käyttäjä A – käyttäjä A	0,00	0,00	0,00	0,00
Kaikki erät, käyttäjä A – käyttäjä B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Kaikki erät, käyttäjä A – käyttäjä C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Käyttäjä: Teknikko, teki tutkimuksen.

Erä: Tässä tutkimuksessa käytetyn sarjan erän numero.

SD: Keskihajonta.

$\Delta\Delta C_T$ -keskiarvot (N = 120) ja keskihajonnat on esitetty kuvissa 8 ja 9 esitetystä tiedoista.

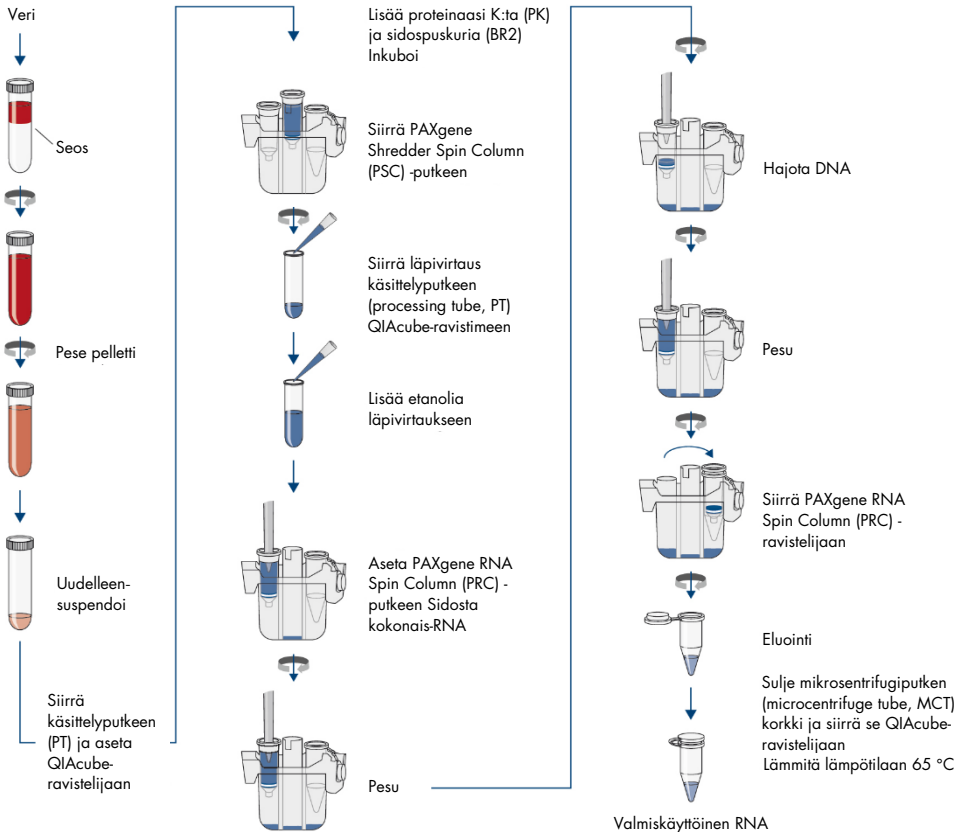
## Automaattinen RNA:n puhdistus

Veren RNA:n puhdistus on automaattista QIAGEN QIAcube Connect MDx- tai klassisella QIAGEN QIAcube -laitteella (tästä eteenpäin QIAcube). Innovatiiviset QIAcube-laitteet käyttävät edistynyttä tekniikkaa QIAGEN-pyörityskolonniputkien käsittelyyn, mikä mahdollistaa automaattisen, alhaisen tuotantotehon näytteen valmistelun ottamisen osaksi laboratorion työnkulkua vaivattomasti. Näytteen valmistelu QIAcube-laitteilla tapahtuu samalla tavoin kuin manuaalisessa toimenpiteessä (ts. lyysaus, sitoutuminen, pesu ja eluointi), joten voit jatkaa PAXgene Blood RNA Kit -sarjan käyttämistä korkealaatuisen RNA:n puhdistamiseen.



**Kuva 10. QIAcube Connect MDx.**

Automaattinen RNA:n puhdistusprotokolla sisältää kaksi osaa (tai protokollaa): PAXgene Blood RNA Part A -osan ja PAXgene Blood RNA Part B -osan, ja näiden kahden osan välissä on lyhyt manuaalinen toimenpide (katso kuva 11, sivu 31).



**Kuva 11. Automaattinen PAXgene Blood RNA -protokolla.**

Sentrifugoitu, pesty ja uudelleensuspendoitu nukleinihappopelletti (katso RNA:n pitoisuus ja puhdistus, sivu 19) siirretään PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkesta käsittelyputkiin (PT), jotka asetetaan lämpöravistelijään QIAcube-laitteen työpöydälle. Käyttäjä valitsee ja käynnistää PAXgene Blood RNA Part A -protokollan valikosta. QIAcube-laitteet suorittavat protokollan vaiheet RNA:n eluutiopuskuriin (BR5) eluomiseen asti. Käyttäjä siirtää puhdistetun RNA:n sisältävät mikrosentrifugiputket (MCT) QIAcube-laitteiden lämpöravistinyksikköön.

Käyttäjä valitsee ja käynnistää PAXgene Blood RNA Part B -protokollan valikosta, ja QIAcube-laitteet tekevät lämpödenaturoinnin.

Keskimääräinen näytteen valmistelu-aika (12 näytteen valmisteluajon tietojen perusteella) on 151 minuuttia\*, mihin sisältyy merkittävästi vähemmän ihmiseltä edellytettäviä toimia kuin manuaalisessa protokollassa.

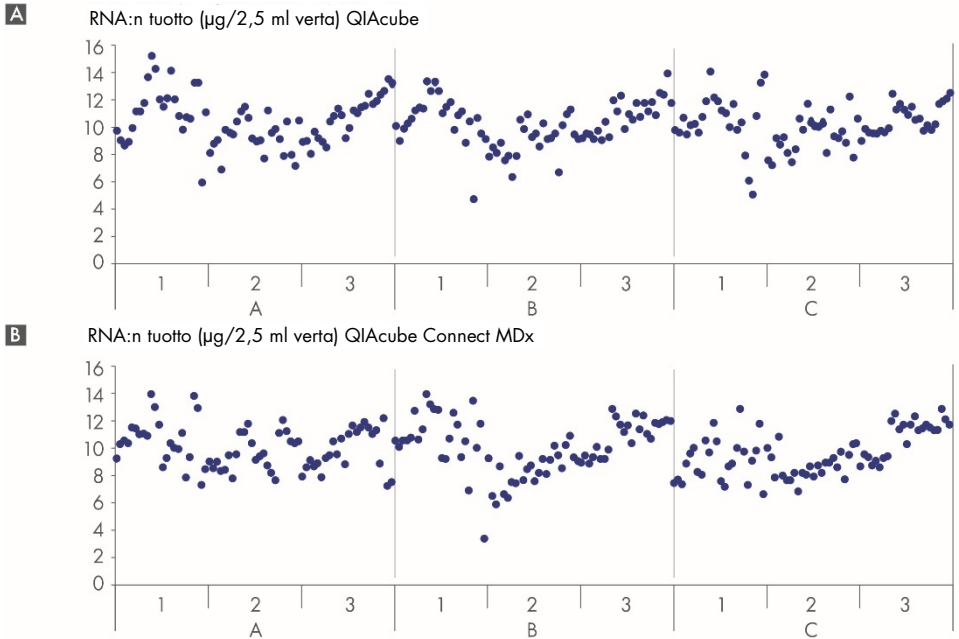
RNA:n tuotto 2,5 ml:sta tervettä ihmisen kokoverta on  $\geq 3 \mu\text{g}$   $\geq 95\%$ :ssa käsitellyistä näytteistä. Kuvassa 12 (sivu 33) on esitetty RNA:n tuotot yhteensä 216 näytteestä, jotka on valmisteltu automaattisella protokollalla käyttämällä kolmea (3) sarjan erää ja kolmea (3) käyttäjää. Koska näissä tutkimuksissa käytettiin yhdistettyjä verinäytteitä eikä yksittäisiä PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkia, tulokset eivät heijasta yksittäisten verinäytteiden osalta odotettua RNA-tuottoa. Koska tuotto on näytteen antajasta riippuvaista, yksilölliset tuotot voivat vaihdella (kuva 12, sivu 33).

Vähintään 95 %:ssa näytteistä ei näy inhibitiota RT-PCR:ssä, kun käytetään enintään 30 % eluaatista. Käytettäessä automaattista protokollaa, näytteiden välistä ristikontaminaatiota ei havaita mitattuna ABL1- ja FOS-transkriptisekvensien kvantitatiivisella reaaliaikaisella RT-PCR:llä RNA-negatiivisista näytteistä (vesi), jotka on paritettu RNA-positiivisten näytteiden (ihmisen kokoveri) kanssa samassa ajossa.

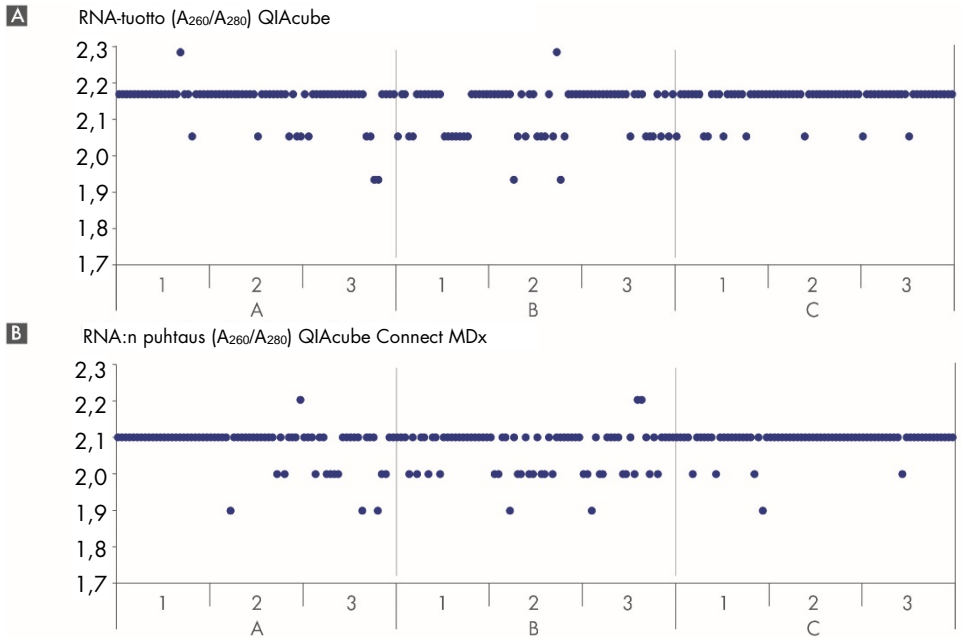
PAXgene Blood RNA System -järjestelmällä ja automaattisella protokollalla eristetty RNA on puhdasta, minkä osoittavat RT-PCR:n inhibition puute ja  $A_{260}/A_{280}$ -arvot välillä 1,8–2,2. Genomista DNA:ta on läsnä  $\leq 1\%$  (w/w)  $\geq 95\%$ :ssa kaikista näytteistä mitattuna beeta-aktiinigeenisekvenssin kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR:llä. Kuvissa 13 ja 14 (sivuilla 34 ja 35) on esitetty  $A_{260}/A_{280}$ -arvot ja suhteellinen genomisen DNA yhteensä 216 näytteestä, jotka valmisteltiin automaattisella protokollalla käyttämällä kolmea (3) sarjan erää ja kolmea (3) käyttäjää.

\* Protokollan kokonaisaika, mukaan lukien edeltävä PAXgene Blood RNA Tube -putkien käsittely (sentrifugointi, pelletin pesu ja pelletin uudelleensuspensiointi).

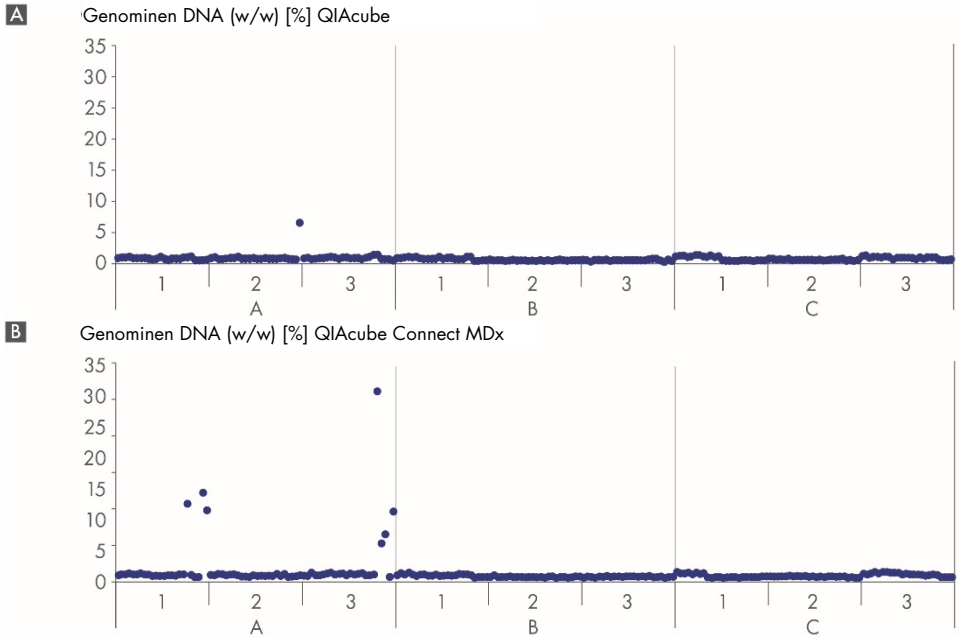




**Kuva 12. RNA:n tuotto – automaattinen käsittely A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx.** Yksittäisten luovuttajien verinäytteet otettiin PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) -näyteputkiin. Putkien sisältö yhdistettiin kuuteen luovuttajaryhmään ja sen jälkeen siitä otettiin uusi alikvootti. Yhteensä 216 näyteputkea (ts. 36 per ryhmä) käsiteltiin kolmen (3) eri käyttäjän (A, B, C) toimesta. Kukaan käyttäjä käytti kolmea (3) eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää (1, 2, 3) automaattisessa eristämässä useilla QIAcube- ja QIAcube Connect MDx -laitteilla ja käsitelti nelinkertaiset näytteet kustakin 6 luovuttajaryhmästä. Kaikkien yksittäisten näytteiden RNA:n tuotot on esitetty jokaisen käyttäjä-erä-yhdistelmän osalta.

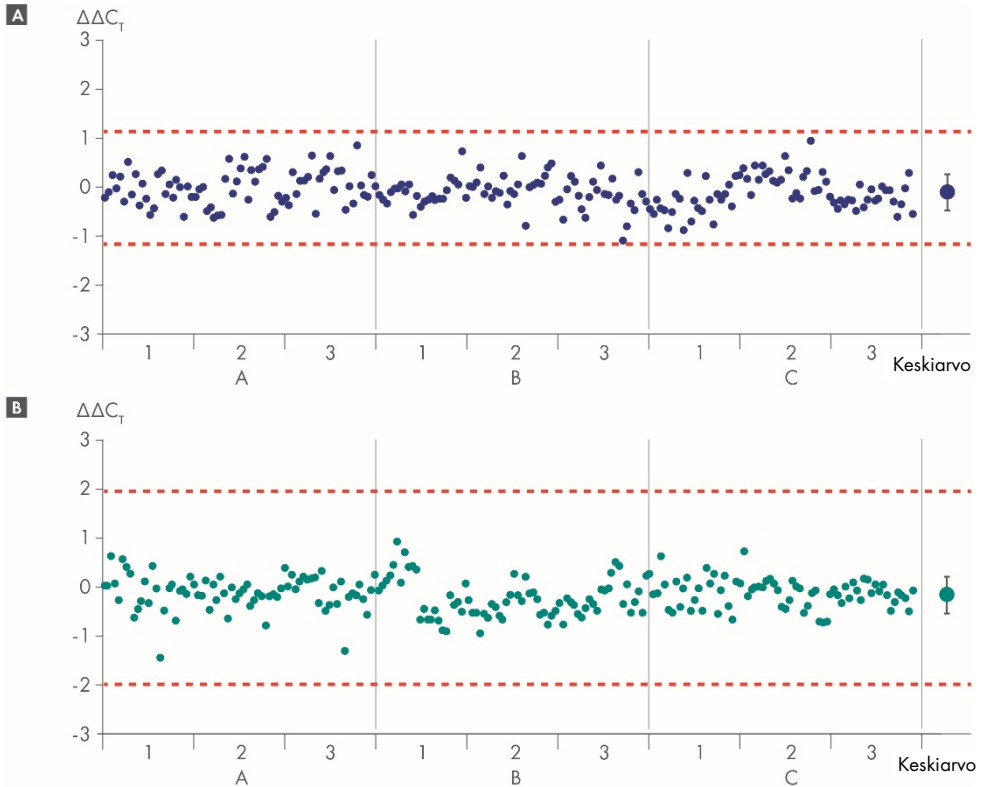


**Kuva 13. RNA:n puhtaus ( $A_{260}/A_{280}$ -arvot) – automaattinen käsittely. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx** Kuvassa 12 kuvatussa kokeessa kolme (3) eri käyttäjää (A, B, C) puhdisti RNA:n käyttämällä kolmea eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää (1, 2, 3) ja useita QIAcube- ja QIAcube Connect MDx -laitteita. Kaikkien yksittäisten näytteiden  $A_{260}/A_{280}$ -arvot on esitetty jokaisen käyttäjä-erä-yhdistelmän osalta.

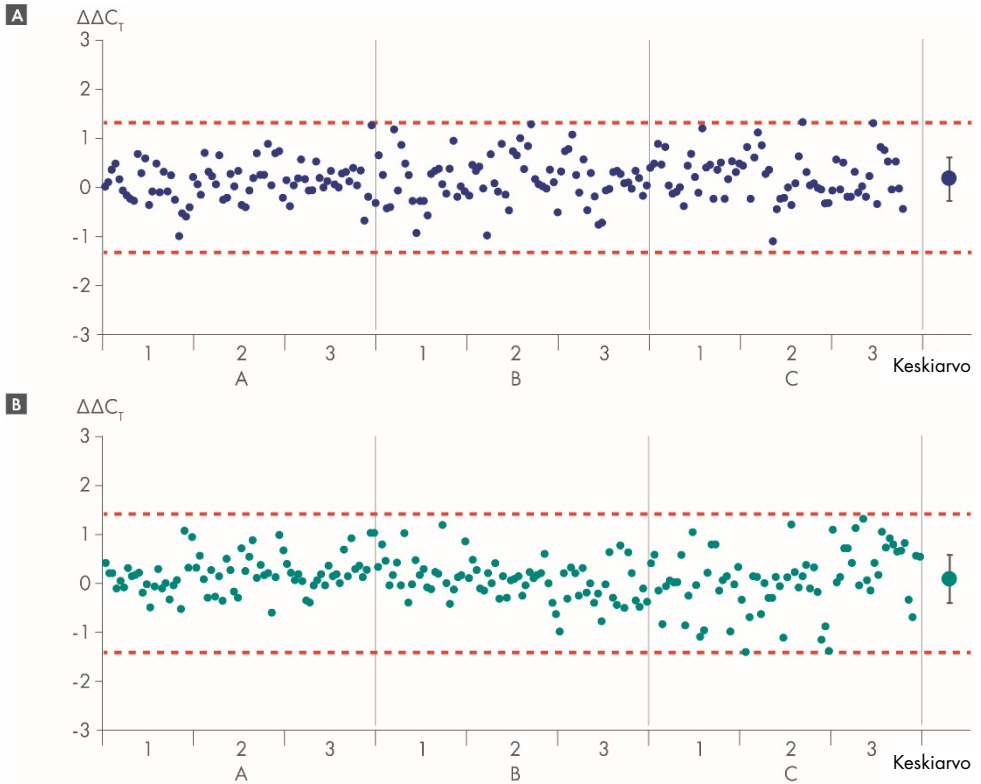


**Kuva 14. RNA:n puhtaus (% genomisen DNA:n kontaminaatio) – automaattinen käsittely, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx.** Kuvassa 12 kuvatussa kokeessa kolme (3) eri käyttäjää (A, B, C) puhdisti RNA:n käyttämällä kolmea eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää (1, 2, 3) ja useita QIAcube- ja QIAcube Connect MDx -laitteita. Kaikkien yksittäisten näytteiden genomisen DNA:n määrä (w/w) on esitetty jokaisen käyttäjä-erä-yhdistelmän osalta.

RNA:n puhdistuksen automaattinen protokolla PAXgene Blood RNA System -järjestelmällä tuottaa erittäin uusittavia ja toistettavia RT-PCR-tuloksia, kuten kuvassa 15 ja 16 (sivut 36 ja 37) on esitetty, mikä tekee siitä erittäin hyvän kliiniseen diagnostiikkaan.



**Kuva 15. RT-PCR:n uusittavuus automaattisen (QIACube) ja manuaalisen protokollan välillä.** Kuvassa 12 kuvatussa kokeessa kolme (3) eri käyttäjää (A, B, C) puhdisti RNA:n käyttämällä kolmea eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää (1, 2, 3) ja useita QIACube- ja QIACube Connect MDx -laitteita käytettäessä automaattista protokollaa. Samanaikaisesti RNA puhdistettiin vastaavista replikaattiputkista manuaalisella protokollalla. [A] FOS:n ja [B] IL1B:n suhteelliset transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisella duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Paritetuista verinäytteistä kummallakin eristysprotokollalla (automaattisella ja manuaalisella) valmistellun RNA:n mahdollisia transkriptitasojen eroja laskettiin  $\Delta\Delta C_T$ -menetelmällä. Kaikkien näyteparien (4 replikaattia x 6 luovuttajaryhmää x 3 sarjan erää x 3 käyttäjää = 216 paria jokaisen geenin osalta) yksittäiset  $\Delta\Delta C_T$ -arvot on esitetty yksittäisinä pisteinä yhdessä keskiarvojen (suuremmat pisteet) ja keskihajontojen (mustat palkit) kanssa kaikista näytetyistä näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittämisen  $\pm 3x$  kokonaistarkkuuden (FOS: 1,16  $C_T$ ; IL1B: 1,98  $C_T$ ; eri määrittystarkkuus verrattuna kuviin 1–4, 8 ja 9 eri määrittäjäversioiden takia).



**Kuva 16. RT-PCR:n uusittavuus QIAcube- ja QIAcube Connect MDx -laitteiden välillä käytettäessä automaattista protokollaa.** Kuvassa 12 kuvatussa kokeessa kolme (3) eri käyttäjää (A, B, C) puhdisti RNA:n käyttämällä kolme eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää (1, 2, 3) ja automaattista protokollaa useilla QIAcube- ja QIAcube Connect MDx -laitteilla. **[A]** FOS:n ja **[B]** IL1B:n suhteelliset transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisella duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Pariteutista verinäytteistä molemmilla laitteilla valmistellun RNA:n mahdollisia transkriptitasojen eroja laskettiin  $\Delta\Delta C_T$ -menetelmällä. Kaikkien näyteparien (4 replikaattia x 6 luovuttajaryhmää x 3 sarjan erää x 3 käyttäjää = 216 paria jokaisen geenin osalta) yksittäiset  $\Delta\Delta C_T$ -arvot on esitetty yksittäisinä pisteinä yhdessä keskiarvojen (suuremmat pisteet) ja keskihajontojen (mustat palkit) kanssa kaikista näytetyistä näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittymisen  $\pm 3x$  kokonaistarkkuuden (FOS: 1,30  $C_T$ ; IL1B: 1,42  $C_T$ ; eri määrittymistarkkuus verrattuna kuviin 1–4, 8, 9 ja 15 eri määrittymisversioiden takia).

# Käyttäjän hankkimat välineet ja reagenssit

Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

## Kaikkiin protokoliin

- PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putket, PreAnalytiX, (tuotenro 762165)
- Etanoli (96–100 %, puhtausaste p.a.)
- Pipetit\* (10 µl – 4 ml)
- Steriilit, aerosoliesteen sisältävät RNAasittomat pipettikärjet†
- Asteikollinen mittalasi‡
- Sentrifugi\*, joka saavuttaa nopeuden 3000–5000 x g ja jossa on ulos kääntyvä roottori ja kotelot PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkille
- Vortex-sekoitin\*
- Jäämurskaa
- Permanent-kynä etikettejä varten

## Manuaaliseen protokollaan

- Vaihtelevanopeuksinen mikrosentrifugi\*, joka saavuttaa vähintään nopeuden 1000–8000 x g, vaikka pienemmät ja suuremmat g-voimat ovat sovellettavia (katso protokollan vaiheista lisätietoja), ja jossa on roottori 2 ml:n mikrosentrifugiputkille

\* Varmista, että laitteet on tarkastettu, huollettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan suositusten mukaan.

† Varmista, että olet tutustunut RNA:n käsittelyohjeisiin (liite A, sivu 72).

‡ Etanolin lisäämiseen BR4-puskuritiivisteeseen.

- Ravistininkubaattori,\* joka voi inkuboida lämpötilassa 55–65 °C ja ravistaa nopeudella ≥ 400 r/min, mutta ei yli 1400 r/min (esim. Eppendorf® Thermomixer Compact tai vastaava)

### **Automaattiseen protokollaan (käyttämällä QIAcube- tai QIAcube Connect MDx -laitetta)**

- Sakset

QIAcube-laitteiden kulutustarvikkeet:

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, tuotenro 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, tuotenro 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, tuotenro 990394)†

QIAcube-laitteiden lisävarusteet:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, tuotenro 990392)†

### **Automaattiseen protokollaan käyttämällä QIAcube Connect MDx -laitetta**

- QIAcube Connect MDx\* (QIAGEN, tuotenro 9003070)

QIAcube Connect MDx -palvelupaketit:

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

\* Varmista, että laitteet on tarkastettu, huollettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan suositusten mukaan.

† Sisältyvät myös pakkaukseen Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, tuotenro 990395).

## **Automaattiseen protokollaan käyttämällä QIAcube-laitetta**

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

\* Varmista, että laitteet on tarkastettu, huollettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan suositusten mukaan.



# Tärkeitä ilmoituksia

## QIAcube-laitteiden käyttäminen

Varmista, että tiedät, miten QIAcube-laitetta käytetään. Lue asianomainen QIAcube-käyttöopas ja QIAcube-laitteen mukana tulleet lisätiedot ja kiinnitä erityistä huomiota turvallisuustietoihin, ennen kuin aloitat automaattisen PAXgene Blood RNA -protokollan.

Tämän osan ohjeet koskevat QIAcube Connect MDx -laitetta sekä QIAcube-laitetta, kun laitetta ei ole erikseen määritetty.

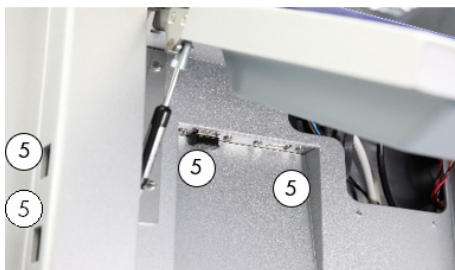
## QIAcube-laitteen käynnistäminen

Sulje QIAcube-laitteen suojus ja kytke laitteeseen virta virtakytkimestä (QIAcube Connect MDx: katso kuva 17, sivu 42; QIAcube: kuva 18, sivu 43).

Äänimerkki kuuluu ja käynnistysnäyttö tulee näkyviin. Laite tekee käynnistykseen liittyvät testit automaattisesti.



QIAcube Connect MDx edestä



Ulosvedetty kosketusnäyttö



QIAcube Connect MDx takaa



QIAcube Connect MDx takaa

Kuva 17. QIAcube Connect MDx -laitteen ulkoiset ominaisuudet.

- |  |   |
|--|---|
| <p>① Kosketusnäyttö</p> <p>② Suojus</p> <p>③ Jätelokero</p> <p>④ Virtakytkin</p> | <p>⑤ 2 USB-porttia kosketusnäytön vasemmassa reunassa; 2 USB-porttia kosketusnäytön takana (Wi-Fi-moduuli kytketty yhteen USB-porttiin)</p> <p>⑥ RJ-45-Ethernet-portti</p> <p>⑦ Virtajohdon liitäntä</p> <p>⑧ Jäähdytysilman ulostulo</p> |
|--|---|



Kuva 18. QIAcube edestä.

- |   |   |   |                                 |
|---|---|---|---------------------------------|
| 1 | Kosketusnäyttö  | 4 | USB-portti suojapaneelin takana |
| 2 | Suojus  | 5 | Virtakytkin                     |
| 3 | RS232-sarjaportti suojapaneelin takana (vain QIAGEN-laitteiden huoltoasiantuntijoiden käyttöön) | 6 | Jätelokero                      |

## Kosketusnäyttö

QIAcube-laitteita käytetään kosketusnäytön avulla. Kosketusnäytön avulla käyttäjä voi käyttää laitetta, ja laite ohjaa käyttäjiä työpöydän valmistelussa. Näytteen käsittelyn aikana kosketusnäytössä näkyy protokollan tila ja jäljellä oleva aika.



Kuva 19. QIAcube Connect MDx -laitteen ulosvedetty kosketusnäyttö

## Protokollien asentaminen QIAcube-laitteisiin

Protokollan alkuasennus voi olla tarpeen, ennen kuin ensimmäinen RNA:n valmisteluajo voidaan tehdä QIAcube-laitteella. Asenna sekä PAXgene Blood RNA Part A- että PAXgene Blood RNA Part B -protokollat.

QIAcube Connect MDx -laitteen protokollat ovat osoitteessa [www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources](http://www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources) ([www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube) QIAcube-laitteen osalta), ja ne on ladattava QIAcube-laitteiden mukana tulleelle USB-muistitikulle. Nämä protokollat siirretään laitteeseen USB-portin kautta.

USB-portti (QIAcube Connect MDx: kosketusnäytön sivussa, katso kuva 17, sivu 42; QIAcube: suoja-paneelin takana, katso kuva 18, sivu 43) mahdollistaa USB-muistitikun liittämisen QIAcube-laitteisiin. Datatiedostot, kuten lokitiedostot tai raporttitiedostot, voidaan myös siirtää USB-portin kautta QIAcube-laitteista USB-muistitikulle.



USB-portti on tarkoitettu käytettäväksi vain QIAGENin toimittaman USB-muistitikun kanssa. Älä liitä muita laitteita tähän porttiin.



Älä irrota USB-muistitikkuja, kun lataat protokollia tai siirrät datatiedostoja tai kun protokolla-ajo on kesken.

Lisätietoja protokollien lataamisesta QIAcube-laitteisiin on käytettävän laitteen käsikirjassa.

## QIAcube-laitteiden täyttäminen

Ajan säästämiseksi täyttäminen voidaan tehdä toisen tai molempien 10 minuutin sentrifugointivaiheen (vaiheet 3 ja 5) aikana. Katso Protokolla: Automaattinen kokonais-RNA:n puhdistus ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin, sivu 62.

### Reagenssipullot

Ennen jokaista QIAcube-laitteen ajoa laitteen neljä (4) reagenssipulloa on täytettävä huolellisesti taulukossa 3 (sivu 46) luetelluilla reagensseilla osoitettuun enimmäistasoon asti, tai jos se ei ole mahdollista, PAXgene Blood RNA Kit -sarjan puskurimäärien sallimaan tasoon. Merkitse pulloihin ja korkkeihin selkeästi puskurien nimet ja aseta täytetyt reagenssipullot reagenssipullotelineen asianmukaisiin paikkoihin. Aseta teline QIAcube-laitteen työpöydälle kuvan mukaisesti (kuvat 20–22, sivut 46–48).



Buffer BR2 -puskurin toimitettu määrä ei täytä reagenssipulloa osoitettuun tasoon asti. Buffer BR3- ja Buffer BR4 -puskurit eivät ehkä täytä pulloa osoitettuun tasoon asti, kun useita näytteitä on käsitelty edellisissä ajoissa.



Muista poistaa pullojen korkit, ennen kuin asetat ne työpöydälle.



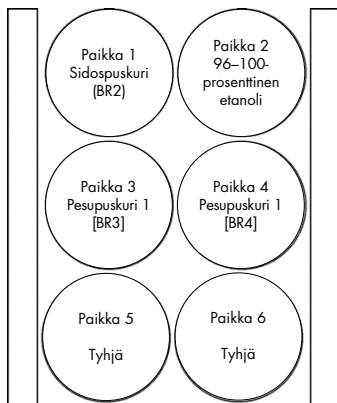
PAXgene Blood RNA Kit -sarjan mukana tulevat puskurimäärät (50) riittävät enintään seitsemään (7) RNA-valmisteluajoon QIAcube-laitteessa, jolloin näytteen numerot ovat 2–12 per ajo. Yleisesti ottaen ajoja, joissa on pienemmät näytteen numerot, on vältettävä, jotta voidaan käsitellä yhteensä 50 näytettä per sarja ja tehdä enintään 7 RNA-valmisteluajoa. Jos RNA-valmisteluajoja tehdään enemmän kuin 7, puskurimäärä ei ehkä riitä viimeisten näytteiden käsittelyyn.

**Taulukko 3. Sijainnit reagenssipullotelineessä**

Paikka	Reagenssi
1	Sidospuskuri (BR2)
2	96–100-prosenttinen etanoli
3	Pesupuskuri 1 [BR3]
4	Pesupuskuri 2 [BR4] *
5	– (jätä tyhjäksi)
6	– (jätä tyhjäksi)

\* Pesupuskuri 2 (BR4) toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa 4 tilavuutta etanolia (96–100 %, puhtausluokka p.a.) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.

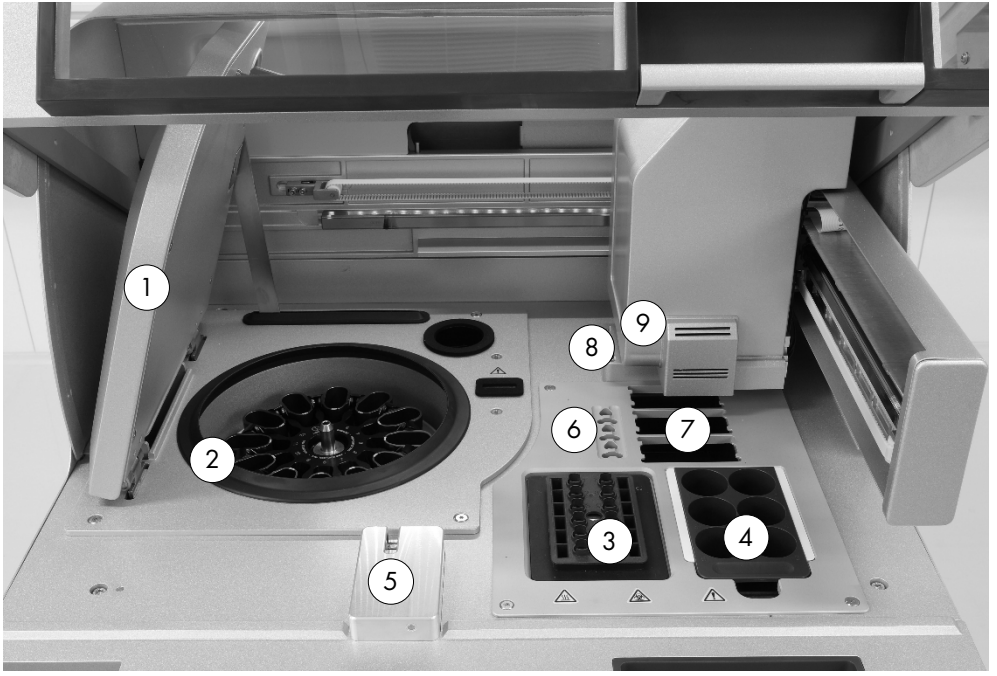
**A**



**B**

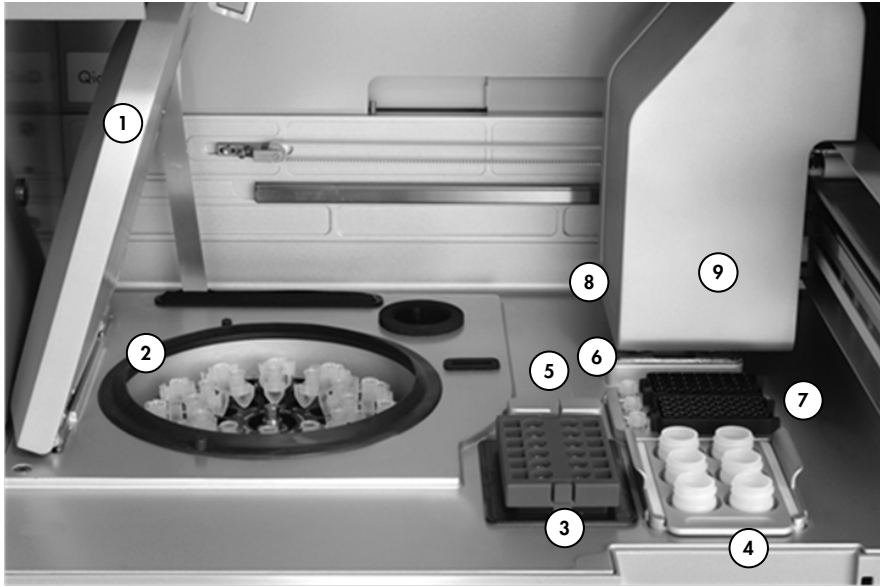


**Kuva 20. Reagenssipullotelineen asettaminen. [A]** Kaaviokuva pullojen sijainneista ja sisällöistä reagenssipullotelineessä. **[B]** Telineen asettaminen QIAcube-laitteeseen (QIAcube esitetty esimerkkinä).



**Kuva 21. QIAcube Connect MDx sisältä.**

- |  |   |
|--|---|
| <p>① Sentrifugin kansi</p> <p>② Sentrifugi</p> <p>③ Ravistin</p> <p>④ Reagenssipulloteline</p> <p>⑤ Kärkianturi ja suojuksen lukitus</p> | <p>⑥ Mikrosentrifugiputkien aukot</p> <p>⑦ 3 paikkaa kärkitelinoille</p> <p>⑧ Hävitysaukot kärjille ja putkille</p> <p>⑨ Robottivarsi (sisältää 1 kanavapipetin, tartuntalaitteen, ultraäänianturin, optisen anturin ja UV-merkkivalon)</p> |
|--|---|




Kuva 22. QIAcube-laite sisältä.

- |   |                      |   |                                   |
|---|----------------------|---|-----------------------------------|
| 1 | Sentrifugin kansi    | 6 | Mikrosentrifugiputkien aukot      |
| 2 | Sentrifugi           | 7 | Kärkitelineet                     |
| 3 | Ravistin             | 8 | Hävitysaukot kärjille ja putkille |
| 4 | Reagenssipulloteline | 9 | Robottivarsi                      |
| 5 | Kärkianturi          |   |                                   |




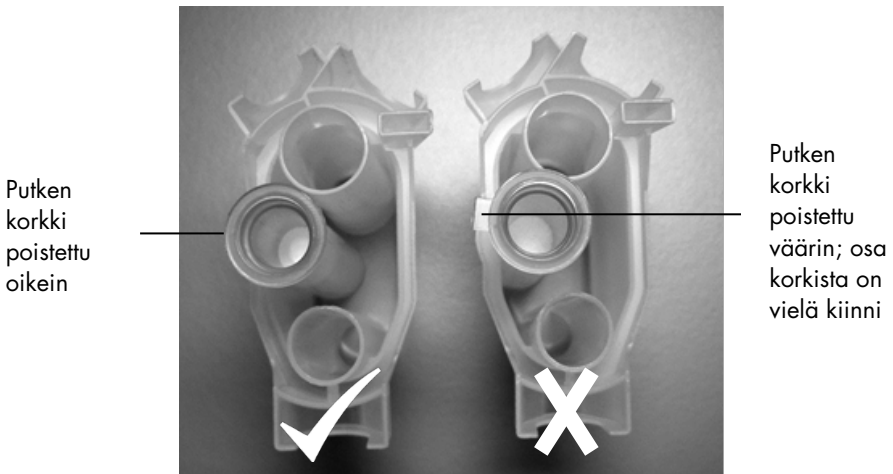
Pyörityskolonniputket (PRC, PSC), mikrosentrifugiputket (MCT) ja QIAcube-laitteiden muovitarvikkeet

Aseta kaksi (2) kärkitelinettä, joissa on 1000 µl:n suodatinkärkiä, QIAcube-laitteeseen (katso kuvat 21 ja 22, sivut 47 ja 48). Täytä telineisiin kärjet tarvittaessa.

 Käytä vain 1000 µl:n suodatinkärkiä, jotka on tarkoitettu käytettäväksi QIAcube-laitteen kanssa.

Merkitse kaikkien näytteiden roottoriadapterit ja mikrosentrifugiputket (MCT) permanentkynällä. Avaa käytettävät PAXgene Shredder -pyörityskolonniputket (PSC) ja leikkaa niiden korkit kokonaan pois saksilla (katso kuva 23, sivu 49).

 Jotta QIAcube-laitteen robottitartuntalaite toimii oikein, poista kokonaan (leikkaa) korkit ja kaikki muoviosat, jotka liittyvät korkin PAXgene Shredder -pyörityskolonniputkiin (PSC) (katso kuva 23). Muuten robottitartuntalaite ei pysty tarttumaan putkiin (PSC, PRC) kunnolla.



**Kuva 23.** PAXgene Shredder -pyörityskolonniputken (PSC) asettaminen PAXgene Shredder -pyörityskolonniputki (PSC) asetetaan roottoriadapterin keskipaikkaan. Leikkaa korkki pois ennen putken asettamista.

Aseta PAXgene RNA -pyörityskolonniputki (PRC), PAXgene Shredder -pyörityskolonniputki (PSC) (ilman korkkia, katso kuva 23, sivu 49) ja merkitty mikrosentrifugiputki asianmukaisiin paikkoihin kuhunkin merkittyyyn roottoriin adapteriin taulukon 4 ja kuvan 24 mukaisesti.

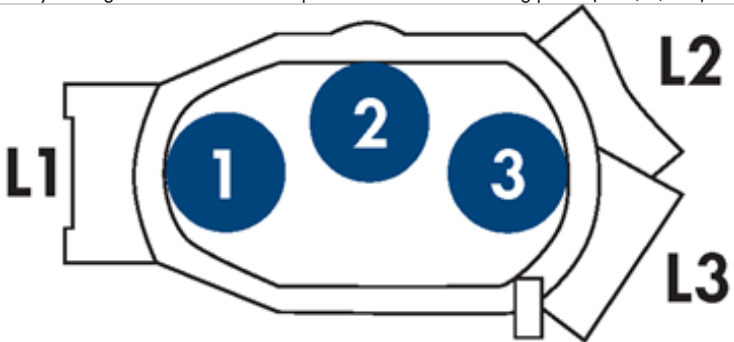


Varmista, että pyörityskolonniputken (PRC) ja mikrosentrifugiputken (MCT) korkit on painettu kokonaan aukkojen pohjalle roottoriadapterin reunalla, koska muutoin korkit irtaavat sentrifugoinnin aikana.

**Taulukko 4. Laboratoriotarvikkeet roottoriadapterissa**

Sijainti	Reagenssi	Korkin paikka
1	PAXgene RNA -pyörityskolonniputki (punainen, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder -pyörityskolonniputki (violetti) (leikkaa korkki pois ennen roottoriadapteriin asettamista)	-
3	Mikrosentrifugiputki (MCT)*	L3

\* Käytä PAXgene Blood RNA Kit -sarjan sisältämiä mikrosentrifugiputkia (MCT; 1,5 ml).



**Kuva 24. Paikat roottoriadapterissa.** Roottoriadapterissa on kolme putken paikkaa (1–3) ja kolme korkin paikkaa (L1–L3).

## Sentrifugin täyttäminen

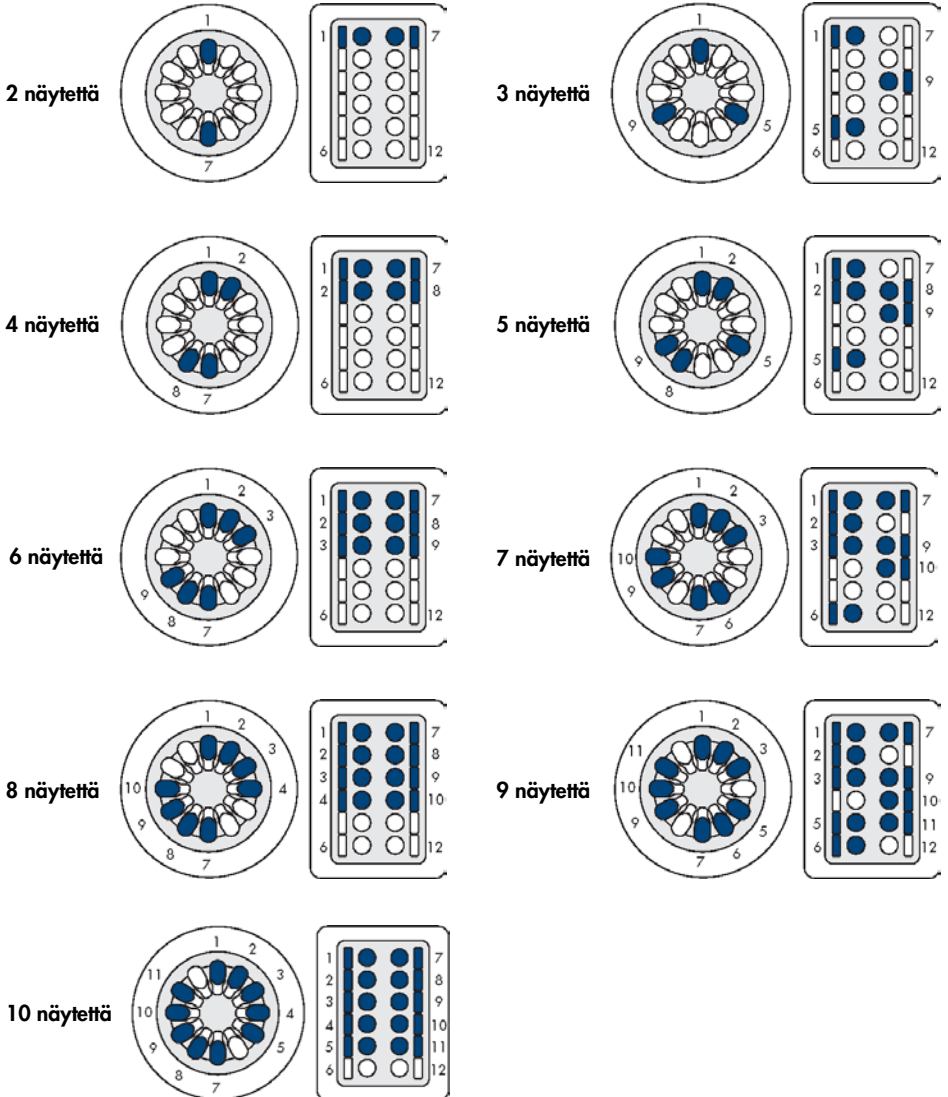
Aseta kootut roottoriadapterit sentrifugin koteloihin kuvan 25 mukaisesti.



Jos käsittelet alle 12 näytettä, lataa sentrifugin roottori säteittäissuunnassa tasapainoisesti (katso kuva 26, sivu 52). Kaikki sentrifugin kotelot on asennettava ennen protokolla-ajon aloittamista, vaikka näytteitä käsiteltäisiin alle 12. Yksittäistä (yhtä) näytettä tai 11 näytettä ei voi käsitellä.



**Kuva 25. QIAcube-laitteiden sentrifugin täyttäminen.** Aseta kootut roottoriadapterit sentrifugin koteloihin (QIAcube Connect MDx esitetty esimerkkinä).



**Kuva 26. Sentrifugin ja ravistimen täyttäminen.** Sentrifugin ja ravistimen paikat 2–10 näytteen käsittelyssä. Yhtä tai 11 näytettä ei voi käsitellä. 12 näytteen käsittelyä varten täytetään kaikki sentrifugin ja ravistimen paikat (kuva ei esitetty).

## Käsittelyputket (PT)

Poista mikrosentrifugiputkien aukkoihin aiemmista ajoista jääneet käsittelyputket (PT) (QIAcube Connect MDx: katso kuva 21, sivu 47; QIAcube: katso kuva 22, sivu 48). Täytä kolme (3) käsittelyputkea (PT) taulukossa 5 ilmoitetulla reagenssimäärällä ajon sisältämän näytemäärän mukaan.

DNaasi I -inkubaatioseosta varten pipetoi ilmoitettu määrä DNA:n hajottamispuskuria (RDD) käsittelyputkeen (PT) ja lisää ilmoitettu määrä DNaasi I (RNFD) -varastoliuosta. Sekoita pipetoimalla varovasti koko seosta ylös ja alas kolme (3) kertaa käyttämällä 1000 µl:n pipettikärkeä.

Käytä PAXgene Blood RNA Kit -sarjan sisältämiä 2 ml:n käsittelyputkia (PT). Merkitse putkiin selvästi reagenssien nimet ja aseta ne asianmukaisesti paikkoihin mikrosentrifugiputkien aukkoihin taulukon 6 (sivu 54) mukaisesti.



DNaasi I (RNFD) on erittäin herkkä fyysiselle denaturoitumiselle. Sekoita vain pipetoimalla käyttämällä suurireikäisiä pipettikärkiä siirroksen vähentämiseksi. Älä vorteksoi.



Pipetoi vain tarvittava määrä taulukon 5 mukaisesti.

**Taulukko 5. Käsittelyputkiin tarvittava reagenssien määrä mikrosentrifugiputkien aukoissa.**

Näytteiden määrä	Ilmoitetulle näytemäärälle tarvittava reagenssin määrä (µl)		
	Proteinaasi K (PK)	DNaasi I -inkubaatioseos	Eluutiopuskuri (BR5)
2	126	187 (23 DNaasi I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNaasi I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNaasi I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNaasi I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNaasi I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNaasi I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNaasi I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNaasi I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNaasi I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNaasi I + 806 Buffer RDD)	1177

**Taulukko 6. Mikrosentrifugiputkien aukot**

	Sijainti		
	A	B	C
<b>Sisältö</b>	Proteinaasi K	DNaasi I -inkubaatioseos	Eluutiopuskuri (BR5)
<b>Astia</b>	Käsittelyputki (PT)*	Käsittelyputki (PT)*	Käsittelyputki (PT)*

\* Käytä PAXgene Blood RNA Kit -sarjan sisältämiä 2 ml:n käsittelyputkia.

# Protokolla: Manuaalinen kokonais-RNA:n puhdistus ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Varmista, että pakkauksen laatikko on ehjä ja vahingoittumaton ja että puskurit eivät ole vuotaneet. Älä käytä sarjaa, joka on vahingoittunut.
- Kun käytät pipettiä, varmista, että se on asetettu oikeaan määrään ja että neste aspiroidaan ja tiputetaan varovasti ja kokonaisuudessaan.
- Jotta näytteitä ei siirretä väärään putkeen tai pyörityskolonniputkeen, on varmistettava, että kaikki putket ja pyörityskolonniputket on merkitty asianmukaisesti permanent-kynällä. Merkitse kunkin putken korkki ja runko (PT, MCT). Merkitse pyörityskolonniputken käsittelyputken (PT) runko. Sulje jokainen putki tai pyörityskolonniputki sen jälkeen, kun siihen on siirretty nestettä.
- Näytteiden ja puskurien läikkyminen toimenpiteen aikana voi vähentää RNA:n tuottoa ja puhtautta.
- Ellei muutoin ilmoiteta, kaikki tämän protokollan vaiheet, mukaan lukien sentrifugointivaiheet, on suoritettava huoneenlämmössä (15–25 °C).

Nukleiinihappojen monistustekniikoiden herkkyyden takia seuraavia varotoimia tarvitaan käsitellessä näytteitä ristikontaminaation välttämiseksi.

- Pipetoi näyte varovasti pyörityskolonniputkeen (PRC, PSC) reunaa kastelematta.
- Vaihda pipetin kärki aina liuoksen siirtojen välillä. Käytä aerosolinestopipettikärkiä.
- Älä kosketa pyörityskolonniputken (PRC, PSC) kalvoa pipetin kärjellä.

- Kun olet vorteksoinut tai lämmittänyt mikrosentrifugiputkea (MCT), sentrifugoi sitä lyhyesti, jotta korkin sisäpuolella olevat pisarat lähtevät pois.
- Käytä käsineitä koko toimenpiteen ajan. Jos käsineet ja näyte joutuvat kosketuksiin toistensa kanssa, vaihda käsineet välittömästi.
- Sulje pyörityskolonniputki (PRC, PSC), ennen kuin asetat sen mikrosentrifugiin. Sentrifugoi toimenpiteen kuvauksen mukaisesti.
- Avaa vain yksi pyörityskolonniputki (PRC, PSC) kerrallaan ja varo huolellisesti tuottamasta aerosoleja.
- Jotta useita näytteitä voidaan käsitellä yhtä aikaa tehokkaasti, täytä teline käsittelyputkilla, joihin pyörityskolonniputki (PRC, PSC) voidaan siirtää sentrifugikäsitelyn jälkeen. Hävitä käytetyt käsittelyputket (PT), joissa on läpivirtausnestettä, ja aseta uudet käsittelyputket (PT) sisältävät pyörityskolonniputki (PRC, PSC) suoraan mikrosentrifugiin.

## Ennen kuin aloitat

- Verinäyte on otettava PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken *PAXgene Blood RNA Tube -putken käsikirjan* ohjeiden mukaisesti. Katso tarvittaessa liitteestä C (sivu 75) suosituksia PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien käsittelemisestä.
- Varmista, että PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkia inkuboidaan vähintään 2 tuntia huoneenlämmössä verinäytteen ottamisen jälkeen, jotta verisolut lysoituvat täydellisesti. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken inkubointi yön yli voi suurentaa tuottoa. Jos PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkea säilytettiin lämpötilassa 2–8 °C, –20 °C tai –70 °C verinäytteen oton jälkeen, tasapainota se ensin huoneenlämpöön ja säilytä sitä sitten huoneenlämmössä kaksi (2) tuntia ennen toimenpiteen aloittamista.
- Lue turvallisuustiedot sivulta 9.
- Lue RNA:n käsittelyohjeet (liite A, sivu 72).
- Varmista, että välineet, kuten pipetit ja ravistininkubaattori, on tarkastettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan ohjeiden mukaan.
- Ravistininkubaattori tarvitaan vaiheissa 5 ja 20. Aseta ravistininkubaattorin lämpötilaksi 55 °C.



- Sidospuskuriin (BR2) voi muodostua saostuma säilytyksen aikana. Lämmitä puskuria tarvittaessa 37 °C:seen, jotta se liukenee.
- Pesupuskuri 2 (BR4) toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa 4 tilavuutta etanolia (96–100 %, puhtausluokka p.a.) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.
- Jos käytät RNase-Free DNase Set -sarjaa ensimmäistä kertaa, valmista DNAasi I -varastoliuos. Liuota kiinteä DNAasi I (RNFD; 1500 Kunitz-yksikköä) \* 550 µl:aan DNAasi-resuspensiopuskuria (DRB), joka sisältyy sarjaan. Varmista, että DNAasi I:ä (RNFD) ei häviä, kun avaat pullon. Älä vorteksoi käyttövalmiiksi saatettua DNAasi I (RNFD) -liuosta. DNAasi I on erittäin herkkä fyysiselle denaturoitumiselle. Sekoittaminen on tehtävä vain kääntelemällä pulloa varovasti ylösalaisin.
- Nykyiset tiedot osoittavat, että käyttövalmiiksi saatettua DNAasi I (RNFD) -liuosta voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa enintään 6 viikkoa. DNAasi I (RNFD) -liuoksen pitkäkestoista varastointia varten varastoliuos on poistettava lasipullosta, jaettava yhden käyttökerran alikvotteihin (käytä sarjan mukana tulevia 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkia [MCT], ne riittävät viiteen alikvottiin) ja asetettava –20 °C:seen enintään 9 kuukaudeksi. Sulatettuja alikvotteja voi säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 6 viikkoa. Alikvotteja ei saa pakastaa uudelleen sulattamisen jälkeen.
- DNAasi I (RNFD) -liuoksen käyttövalmiiksi saattamisessa ja alikvotteihin jakamisessa on varmistettava, että noudatetaan RNA:n käsittelyohjeita (liite A, sivu 72).

\* Kunitz-yksiköt ovat yleisesti käytettyjä yksiköitä DNAasi I:n mittaamiseen. Yksikön määritelmä on se DNAasi I:n määrä, joka aiheuttaa A<sub>260</sub>:n nousun 0,001/minuutti/millilitra 25 °C:ssa, pH:ssa 5,0, käytettäessä erittäin polymeroitunutta DNA:ta substraattina (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ja 363).

## Menetelmä

1. Sentrifugoi PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkea 10 minuuttia nopeudella 3000–5000 x g laitteella, jossa on ulos heilahtava roottori.



Varmista, että verinäytettä on inkuboitu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkessa vähintään 2 tuntia huoneenlämmössä (15–25 °C), jotta verisolut lysoituvat täydellisesti.



Roottorin täytyy sisältää putkiadapterit pyöreäpohjaisille putkille. Jos muuntotyypisiä putkiadaptereita käytetään, putket voivat hajota sentrifugoinnin aikana.

2. Poista supernatantti dekantoimalla tai pipetoimalla. Lisää 4 ml RNAasitonta vettä (RNFW) pellettiin ja sulje putki uudella toissijaisella BD Hemogard -sulkimella (sisältyy sarjaan).

Jos supernatantti dekantoidaan, älä koske pellettiin ja kuivaa putken reuna puhtaalla paperipyyhkeellä.

3. Vorteksoi, kunnes pelletti liukenee näkyvästi, ja sentrifugoi 10 minuuttia nopeudella 3000–5000 x g laitteella, jossa on ulos heilahtava roottori. Poista ja hävitä supernatantti kokonaisuudessaan.

Supernatanttiin vorteksoinnin jälkeen ennen sentrifugointia jääneet pienet epäpuhtaudet eivät vaikuta toimenpiteeseen.



Jos supernatanttia ei poisteta kokonaan, se estää lyyssausta ja laimentaa lyyssaattia, mikä vaikuttaa RNA:n PAXgene-kalvoon kiinnittymisen olosuhteisiin.

4. Lisää 350 µl resuspensiopuskuria (BR1) ja vorteksoi, kunnes pelletti liukenee näkyvästi.
5. Pipetoi näyte 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen (MCT). Lisää 300 µl sidospuskuria (BR2) ja 40 µl proteinaasi K:ta (PK). Sekoita vorteksoimalla 5 sekunnin ajan ja inkuboi 10 minuuttia 55 °C:ssa käyttämällä ravistininkubaattoria nopeudella 400–1400 r/min. Aseta inkubaation jälkeen ravistininkubaattorin lämpötilaksi 65 °C (vaihetta 20 varten).



Älä sekoita sidospuskuria (BR2) ja proteinaasi K:ta (PK) yhteen ennen niiden lisäämistä näytteeseen.

6. Pipetoi lyaattia suoraan PAXgene Shredder -pyörityskolonniputkeen (PSC, violetti), joka on asetettu 2 ml:n käsittelyputkeen (PT), ja sentrifugoi 3 minuuttia maksiminopeudella (mutta ei yli 20 000 x g).



Pipetoi lyaatti varovasti pyörityskolonniputkeen (PSC) ja tarkista visuaalisesti, että lyaatti on täysin siirtynyt pyörityskolonniputkeen (PSC).

Jotta PSC- ja PT-putket eivät vahingoitu, älä ylitä nopeutta 20 000 x g.



Jotkin näytteet voivat virrata PAXgene Shredder -pyörityskolonniputken (PSC) läpi sentrifugoimatta. Tämä johtuu joidenkin näytteiden vähäisestä viskositeetista, eikä sitä pitäisi katsoa tuotteen toimimattomuuden merkiksi.

7. Siirrä läpivirtausfraktion koko supernatantti uuteen 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen (MCT) koskematta käsittelyputkessa olevaa pellettä.

8. Lisää 350 µl etanolia (puhtausaste p.a., 96–100 %). Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi lyhyesti (1–2 sekuntia nopeudella 500–1000 x g), jotta pisarat putken korkin sisäpuolelta lähtevät pois.



Sentrifugoinnin kesto ei saa olla yli 1–2 sekuntia, koska se voi aiheuttaa nukleiinihappojen pelletöitymistä ja vähentää kokonais-RNA:n tuottoa.

9. Pipetoi 700 µl näytettä PAXgene RNA -pyörityskolonniputkeen (PRC, punainen), joka on asetettu 2 ml:n käsittelyputkeen (PT), ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8000–20 000 x g. Aseta pyörityskolonniputki (PRC) uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).

10. Pipetoi jäljelle jäänyt näyte PAXgene RNA -pyörityskolonniputkeen (PRC) ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8000–20 000 x g. Aseta pyörityskolonniputki (PRC) uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).



Pipetoi näyte varovasti pyörityskolonniputkeen (PRC) ja tarkista visuaalisesti, että näyte on täysin siirtynyt pyörityskolonniputkeen (PRC).

11. Pipetoi 350 µl pesupuskuria 1 (BR3) PAXgene RNA -pyörityskolonniputkeen (PRC). Sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8000–20 000 x g. Aseta pyörityskolonniputki (PRC) uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).

12. Lisää 10 µl DNAasi I (RNFD) -varastoliuosta 70 µl:aan DNA:n hajotuspuskuria (RDD), joka on 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkessa (MCT). Sekoita kääntämällä putkea varovasti ja sentrifugoi lyhyesti kerätäksesi jäännösnesteen putken reunoilta.

Jos käsittelet esimerkiksi 10 näytettä, lisää 100 µl DNAasi I (RNFD) -varastoliuosta 700 µl:aan DNA:n hajotuspuskuria (RDD). Käytä sarjan mukana tulleita 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkia (MCT).



DNAasi I on erittäin herkkä fyysiselle denaturoitumiselle. Sekoittaminen on tehtävä vain kääntelemällä putkea varovasti. Älä vorteksoi.

13. Pipetoi DNAasi I (RNFD) -inkubaatioseos (80 µl) suoraan PAXgene RNA -pyörityskolonniputken (PRC) kalvolle ja aseta se työpöydälle (20–30 °C) 15 minuutin ajaksi.



Varmista, että DNAasi I (RNFD) -inkubaatioseos asetetaan suoraan kalvolle. DNAasin hajotus on epätäydellistä, jos osa seoksesta lisätään pyörityskolonniputken (PRC) seinämille tai O-renkaalle ja se pysyy siellä.

14. Pipetoi 350 µl pesupuskuria 1 (BR3) PAXgene RNA -pyörityskolonniputkeen (PRC) ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8000–20 000 x g. Aseta pyörityskolonniputki (PRC) uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).

15. Pipetoi 500 µl pesupuskuria 2 (BR4) PAXgene RNA -pyörityskolonniputkeen (PRC) ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8000–20 000 x g. Aseta pyörityskolonniputki (PRC) uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).



Pesupuskuri 2 (BR4) toimitetaan konsentraattina. Varmista, että etanoli on lisätty pesupuskuriin 2 (BR4) ennen käyttöä (katso Ennen kuin aloitat, sivu 56).

16. Lisää toiset 500 µl pesupuskuria 2 (BR4) PAXgene RNA -pyörityskolonniputkeen (PRC). Käytä sentrifugissa 3 minuuttia nopeudella 8000–20 000 x g

17. Heitä pois läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT) ja aseta PAXgene RNA -pyörityskolonniputki (PRC) uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT). Käytä sentrifugissa 1 minuutti nopeudella 8000–20 000 x g

18. Heitä pois läpivirtauksen sisältävä käsittelyputki (PT). Aseta PAXgene RNA -pyörityskolonniputki (PRC) 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen (MCT) ja pipetoi 40 µl eluutiopuskuria (BR5) suoraan PAXgene RNA -pyörityskolonniputken (PRC) kalvolle. Käytä sentrifugissa 1 minuutti nopeudella 8000–20 000 x g RNA:n eluomista varten.

On tärkeää kastella koko kalvo eluutiopuskurilla (BR5), jotta saavutetaan maksimi eluutiotehokkuus.

19. Toista eluutiovaihe (vaihe 18) kuvauksen mukaisesti käyttämällä 40 µl eluutiopuskuria (BR5) ja samaa mikrosentrifugiputkea (MCT).

20. Inkuboi eluaattia 5 minuuttia 65 °C:ssa ravistininkubaattorissa (vaiheesta 5) ravistamatta. Inkuboinnin jälkeen jäähdytä välittömästi jään avulla.

Tämä inkubaatio 65 °C:ssa denaturoi RNA:n myöhempiä sovelluksia varten. Älä ylitä inkubaatioaikaa tai lämpötilaa.

21. Jos RNA-näytteitä ei käytetä välittömästi, säilytä niitä –20 °C:ssa tai –70 °C:ssa.

Koska RNA pysyy denaturoituneena toistuvan pakastuksen ja sulatuksen jälkeen, inkubointia 65 °C:ssa ei ole tarpeen toistaa. Jos käytät RNA-näytteitä diagnostisessa määrityksessä, noudata valmistajan antamia ohjeita.

Tarkkaa RNA:n kvantifiointia varten 260 nm:n absorbanssilla on suositeltavaa laimentaa näytteet 10 mM:n Tris-HCl:llä, pH 7,5. \* Näytteen laimentaminen RNAsittomalla vedellä voi johtaa epätarkan alhaisiin arvoihin.

Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja Tris-HCl-puskuria kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu.



Tris-HCl-puskurissa kvantifiointiin on käytettävä suhdetta  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ .  
Katso liite B, sivu 73.

\* Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedoista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

# Protokolla: Automaattinen kokonais-RNA:n puhdistus ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Varmista, että pakkauksen laatikko on ehjä ja vahingoittumaton ja että puskurit eivät ole vuotaneet. Älä käytä sarjaa, joka on vahingoittunut.
- Kun käytät pipettiä, varmista, että se on asetettu oikeaan määrään ja että neste aspiroidaan ja tiputetaan varovasti ja kokonaisuudessaan.
- Jotta näytteitä ei siirretä väärään putkeen tai muovitarvikkeeseen, on varmistettava, että kaikki käsittelyputket (PT), mikrosentrifugiputket (MCT) ja roottoriadapterit on merkitty asianmukaisesti permanent-kynällä. Merkitse kunkin mikrosentrifugiputken (MCT) korkki ja runko, kunkin käsittelyputken (PT) runko ja kunkin roottoriadapterin ulkoseinämä.
- Näytteiden ja puskurien läikkyminen toimenpiteen aikana voi vähentää RNA:n tuottoa ja puhtautta.
- Ellei muutoin ilmoiteta, kaikki tämän protokollan vaiheet, mukaan lukien sentrifugointivaiheet, on suoritettava huoneenlämmössä (15–25 °C).

Nukleiinihappojen monistustekniikoiden herkkyuden takia seuraavia varotoimia tarvitaan käsiteltäessä näytteitä ristikontaminaation välttämiseksi.

- Pipetoi näyte varovasti käsittelyputken (PT) pohjalle kastelematta putken reunaan.
- Vaihda pipetin kärki aina liuoksen siirtojen välillä. Käytä aerosolinestopipettikärkiä.
- Älä kosketa pyörityskolonniputken (PRC, PSC) kalvoa pipetin kärjellä.
- Kun olet vorteksoinut tai lämmittänyt mikrosentrifugiputkea (MCT), sentrifugoi sitä lyhyesti, jotta korkin sisäpuolella olevat pisarat lähtevät pois.

- Käytä käsiaineita koko toimenpiteen ajan. Jos käsiaineet ja näyte joutuvat kosketuksiin toistensa kanssa, vaihda käsiaineet välittömästi.

## Ennen kuin aloitat

- Verinäyte on otettava PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen *PAXgene Blood RNA Tube -putken käsikirjan* ohjeiden mukaisesti. Katso tarvittaessa liitteestä C (sivu 75) suosituksia PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien käsittelemisestä.
- Varmista, että PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkia inkuboidaan vähintään 2 tuntia huoneenlämmössä verinäytteen ottamisen jälkeen, jotta verisolut lysoituvat täydellisesti. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken inkubointi yön yli voi suurentaa tuottoa. Jos PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkea säilytettiin lämpötilassa 2–8 °C, –20 °C tai –70 °C verinäytteen oton jälkeen, tasapainota se ensin huoneenlämpöön ja säilytä sitä sitten huoneenlämmössä kaksi (2) tuntia ennen toimenpiteen aloittamista.
- Lue turvallisuustiedot sivulta 9.
- Katso Tärkeitä ilmoituksia, sivu 41.
- Lue RNA:n käsittelyohjeet (liite A, sivu 72).
- Lue asianomaisen QIAcube-laitteen käyttöopas ja QIAcube-laitteen mukana tulleet lisätiedot ja kiinnitä erityistä huomiota turvallisuustietoihin.
- Varmista, että laitteet ja välineet, kuten pipetit ja QIAcube-laite, on tarkastettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan ohjeiden mukaan.
- Sidospuskuriin (BR2) voi muodostua saostuma säilytyksen aikana. Lämmitä puskurit tarvittaessa 37 °C:seen, jotta se liukenee.
- Pesupuskurit 2 (BR4) toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa sopiva määrä etanolia (96–100 %, puhtausluokka p.a.) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.

- Jos käytät RNase-Free DNase Set -sarjaa ensimmäistä kertaa, valmista DNAasi I -varastoliuos. Liuota kiinteä DNAasi I (RNFD; 1500 Kunitz-yksikköä)\* 550 µl:aan DNAasi-resuspensiopuskuria (DRB), joka sisältyy sarjaan. Varmista, että DNAasi I:ä (RNFD) ei häviä, kun avaat pullon. Älä vorteksoi käyttövalmiiksi saatettua DNAasi I (RNFD) -liuosta. DNAasi I on erittäin herkkä fyysiselle denaturoitumiselle. Sekoittaminen on tehtävä vain kääntelemällä pulloa varovasti ylösalaisin.
- Nykyiset tiedot osoittavat, että käyttövalmiiksi saatettua DNAasi I (RNFD) -liuosta voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa enintään 6 viikkoa. DNAasi I (RNFD) -liuoksen pitkäkestoista varastointia varten varastoliuos on poistettava lasipullosta, jaettava yhden käyttökerran alikvootteihin (käytä sarjan mukana tulevia 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkia [MCT], ne riittävät viiteen alikvoottiin) ja asetettava –20 °C:seen enintään 9 kuukaudeksi. Sulatettuja alikvootteja voi säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 6 viikkoa. Alikvootteja ei saa pakastaa uudelleen sulattamisen jälkeen.
- DNAasi I (RNFD) -liuoksen käyttövalmiiksi saattamisessa ja alikvootteihin jakamisessa on varmistettava, että noudatetaan RNA:n käsittelyohjeita (liite A, sivu 72).
- Asenna oikea ravistinadapteri (tulee QIAcube-laitteen mukana; käytä adapteria 2 ml:n turvalukitusputkille, joissa on merkintä 2) ja aseta ravistelijaleteline adapterin päälle.
- Tarkista jätelokero ja tyhjennä se tarvittaessa.
- Asenna liittyvät protokollat, jos sitä ei ole jo tehty edellisten ajojen yhteydessä. QIAcube Connect MDx edellyttää kaikkien asianomaisessa zip-tiedostossa olevien protokollien lataamista. Klassisen QIAcube-laitteen kohdalla asenna sekä PAXgene Blood RNA Part A että PAXgene Blood RNA Part B -protokollat. Katso Protokollien asentaminen QIAcube-laitteisiin, sivu 44.

\* Kunitz-yksiköt ovat yleisesti käytettyjä yksiköitä DNAasi I:n mittaamiseen. Yksikön määritelmä on se DNAasi I:n määrä, joka aiheuttaa  $A_{260}$ :n nousun 0,001/ minuutti/millilitra 25 °C:ssa, pH:ssa 5,0, käytettäessä erittäin polymeroitunutta DNA:ta substraattina (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ja 363).



## Menetelmä

1. Sulje QIAcube-laitteen suojus ja katkaise laitteen virta virtakytkimestä (QIAcube Connect MDx: katso kuva 17, sivu 42; QIAcube: katso kuva 18, sivu 43).

Äänimerkki kuuluu ja käynnistysnäyttö tulee näkyviin. Laitteet tekevät käynnistykseen liittyvät testit automaattisesti.

2. Avaa QIAcube-laitteen suojus ja aseta tarvittavat reagenssit ja muovitarvikkeet QIAcube-laitteeseen. Katso QIAcube-laitteiden täyttäminen, sivu 45.

Ajan säästämiseksi täyttö voidaan tehdä yhden tai molempien 10 minuutin sentrifugointivaiheen (vaiheet 3 ja 5) aikana.

3. Sentrifugoi PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkea 10 minuuttia nopeudella 3000–5000 x g laitteella, jossa on ulos heilahtava roottori.



Varmista, että verinäytettä on inkuboitu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkessa vähintään 2 tuntia huoneenlämmössä (15–25 °C), jotta verisolut lysoituvat täydellisesti.



Roottorin täytyy sisältää putkiadapterit pyöreäpohjaisille putkille. Jos muuntyyppisiä putkiadaptereita käytetään, putket voivat hajota sentrifugoinnin aikana.

4. Poista supernatantti dekantoinnalla tai pipetoimalla. Lisää 4 ml RNAasitonta vettä (RNFW) pellettiin ja sulje putki uudella toissijaisella BD Hemogard -sulkimella (sisältyy sarjaan).

Jos supernatantti dekantoidaan, älä koske pellettiin ja kuivaa putken reuna puhtaalla paperipyyhkeellä.

5. Vorteksoi, kunnes pelletti liukenee näkyvästi, ja sentrifugoi 10 minuuttia nopeudella 3000–5000 x g laitteella, jossa on ulos heilahtava roottori. Poista ja hävitä supernatantti kokonaisuudessaan.

Supernatanttiin vorteksoinnin jälkeen ennen sentrifugointia jääneet pienet epäpuhtaudet eivät vaikuta toimenpiteeseen.



Jos supernatanttia ei poisteta kokonaan, se estää lyyssausta ja laimentaa lyyssaattia, mikä vaikuttaa RNA:n PAXgene-kalvoon kiinnittymisen olosuhteisiin.

6. Lisää 350 µl resuspensiopuskuria (BR1) ja vorteksoi, kunnes pelletti liukenee näkyvästi.

7. Pipetoi näyte 2 ml:n käsittelyputkeen (PT).



Käytä PAXgene Blood RNA Kit -sarjan sisältämiä 2 ml:n käsittelyputkia (PT).

8. Aseta avoimet, näytettä sisältävät käsittelyputket (PT) QIAcube-laitteen ravistelijaan (QIAcube Connect MDx: katso kuva 21, sivu 47; QIAcube: katso kuva 22, sivu 48). Näytepaikat on numeroitu asettamisen helpottamiseksi. Aseta ravistelijatelineen tulpat (tulevat QIAcube-laitteen mukana) ravistelijatelineen reunoilla oleviin aukkoihin kunkin käsittelyputken viereen. Tämä mahdollistaa näytteiden tunnistuksen asetustarkistuksen aikana.



Varmista, että oikea ravistinadapteri (Shaker Adapter, 2 ml, turvalukitusputket, merkitty numerolla 2, tulee QIAcube-laitteen mukana) on asennettu.



Jos käsittelet alle 12 näytettä, aseta ravistinteline kuvan 26, sivu 52, mukaisesti. Yhtä tai 11 näytettä ei voi käsitellä. Ravistelijatelineen paikkanumerot vastaavat sentrifugin paikkanumeroita.

9. Sulje QIAcube-laitteen suojus (QIAcube Connect MDx: katso kuva 17, sivu 42; QIAcube: katso kuva 18, sivu 43).

10. Valitse PAXgene Blood RNA Part A -protokolla ja käynnistä se.

Noudata QIAcube-laitteen kosketusnäytössä annettuja ohjeita.



Varmista, että molemmat ohjelman osat (A ja B) on asennettu QIAcube-laitteeseen (katso Protokollien asentaminen QIAcube-laitteisiin, sivu 44).



QIAcube-laitteet tekevät asetustarkistukset näytteille, kärjille, roottoriadaptereille ja reagenssipulloille.

11. Kun PAXgene Blood RNA Part A -protokolla on valmis, avaa QIAcube-laitteen suojus (QIAcube Connect MDx: katso kuva 17, sivu 42; QIAcube: katso kuva 18, sivu 43). Poista ja heitä pois PAXgene RNA -pyörityskolonniputket (PRC) roottoriadaptereista ja tyhjä käsittelyputket (PT) ravistelijasta.



Ajon aikana laite siirtää pyörityskolonniputket roottoriadapterin paikasta 1 (kannen paikka L1) roottoriadapterin paikkaan 3 (kannen paikka L2) (katso kuva 24, sivu 50).

12. Sulje kaikkien puhdistettua RNA:ta roottoriadaptoreissa (paikka 3, kannen paikka L3, katso kuva 24, sivu 50) sisältävien 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkien (MCT) korkit. Siirrä 1,5 ml:n mikrosentrifugiputket (MCT) QIAcube-laitteen ravistelijaan (QIAcube Connect MDx: katso kuva 21, sivu 47; QIAcube: katso kuva 22, sivu 48).

13. Sulje QIAcube-laitteen suojus (QIAcube Connect MDx: katso kuva 17, sivu 42; QIAcube: katso kuva 18, sivu 43).

14. Valitse PAXgene Blood RNA Part B -protokolla ja käynnistä se.

Noudata QIAcube-laitteen kosketusnäyttöön tulevia ohjeita.



Tämä ohjelma inkuboi näytteitä 65 °C:ssa ja denaturoi RNA:n myöhempiä sovelluksia varten. Vaikka myöhempi sovellus sisältäisi lämpödenaturointivaiheen, älä jätä tätä vaihetta tekemättä. Riittävä RNA:n denaturointi on tärkeää, jotta myöhemmät sovellukset ovat mahdollisimman tehokkaita.

15. Kun PAXgene Blood RNA Part B -ohjelma on valmis, avaa QIAcube-laitteen suojus (QIAcube Connect MDx: katso kuva 17, sivu 42; QIAcube: katso kuva 18, sivu 43). Aseta puhdistetun RNA:n sisältävät mikrosentrifugiputket (MCT) välittömästi jäähän.



**VAROITUS:** Kuuma pinta. Ravistelija voi lämmetä jopa 70 °C: n lämpötiloihin. Vältä koskemasta sitä, kun se on kuuma.



Älä anna puhdistetun RNA:n jäädä QIAcube-laitteeseen. Koska näytteitä ei ole jäähdytetty, puhdistettu RNA voi hajota. Valvomattomia yöllä tapahtuvia näytteen valmisteluajoja ei tämän vuoksi suositella.

16. Jos RNA-näytteitä ei käytetä välittömästi, säilytä niitä -20 °C:ssa tai -70 °C:ssa.

Koska RNA pysyy denaturoituneena toistuvan pakastuksen ja sulatuksen jälkeen, ei ole tarpeen toistaa lämpöinkubointiprotokollaa (PAXgene Blood RNA Part B). Jos RNA-näytteitä käytetään diagnostisessa määrittämisessä, on noudatettava valmistajan antamia ohjeita.

Tarkkaa RNA:n kvantifiointia varten 260 nm:n absorbanssilla on suositeltavaa laimentaa näytteet 10 mM:n Tris-HCl:llä, pH 7,5. \* Näytteen laimentaminen RNAasittomalla vedellä voi johtaa epätarkan alhaisiin arvoihin.

Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja Tris-HCl-puskuria kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu.



Tris-HCl-puskurissa kvantifiointiin on käytettävä suhdetta

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Katso liite B, sivu 73.

17. Poista reagenssipulloteline QIAcube-laitteen työpöydältä (QIAcube Connect MDx: katso kuva 21, sivu 47; QIAcube: katso kuva 22, sivu 48) ja sulje kaikki pullot asianmukaisesti merkityillä korkeilla. Pulloissa olevaa puskuria voidaan säilyttää huoneenlämmössä (15–25 °C) enintään 3 kuukauden ajan. Poista ja hävitä QIAcube-laitteen mikrosentrifugiputkien aukoissa oleviin käsittelyputkiin (PT) jääneet reagenssit. Poista ja hävitä roottoriadapterit sentrifugista. Tyhjennä QIAcube Connect MDx -laitteen jätelokero (QIAcube Connect MDx: katso kuva 17, sivu 42; QIAcube: katso kuva 18, sivu 43). Sulje QIAcube-laitteen suojus ja katkaise laitteen virta virtakytimestä.

\* Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

# Vianmääritys

Tämä vianmääritysohje voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Lisätietoja on saatavissa teknisen tuen sivustostamme usein kysytyjen kysymysten (Frequently Asked Questions, FAQ) osiosta: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat aina mielellään kysymyksiisi, koskivatpa ne sitten tämän käsikirjan tietoja tai tässä käsikirjassa esiteltyjä protokollia tai näytteisiin ja määrittäisiin liittyviä tekniikoita. (Katso yhteystiedot tämän takakannesta tai osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).)

## Huomautuksia ja ehdotuksia

---

### RNA hajonnut

RNAasi-kontaminaatio



Ole varovainen, ettet vie RNAaseja reagensseihin toimenpiteen tai myöhemmän käsittelyn aikana (katso Liite A, sivu 72).

### Heikko RNA:n tuotto

a) Alle 2,5 ml verta otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen



Varmista, että 2,5 ml verta on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen (katso *PAXgene Blood RNA Tube -käsikirja*).

b) RNA-pitoisuus mitattuna vedessä



RNA on laimennettava 10 mM:n Tris-HCl:llä, pH 7,5, \* tarkkaa kvantifiointia varten (katso Liite B, sivu 73).

c) Solujäte siirretty PAXgene RNA -pyörityskolonniputkeen (PRC) manuaalisen protokollan vaiheissa 9 ja 10





Vältä siirtämästä suuria hiukkasia, kun pipetoit supernatanttia manuaalisen protokollan vaiheissa 7 (pienen solujätämäärän siirtäminen ei vaikuta toimenpiteeseen).



\* Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

## Huomautuksia ja ehdotuksia

---

- d) Supernatanttia ei poistettu täysin vaiheessa 3  Varmista, että supernatantti poistetaan kokonaisuudessaan. Jos supernatantti dekantoidaan, poista pisarat PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken reunasta taputtelemalla sitä paperipyyhkeeseen. Ryhdy tarvittaviin varotoimiin ristikontaminaation estämiseksi.
- e) PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen ottamisen jälkeen verta inkuboidaan alle 2 tuntia.  Inkuboi verta PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkessa vähintään 2 tuntia näytteenoton jälkeen.

### Matala $A_{260}/A_{280}$ -arvo

- a) Vettä käytetty laimentamaan RNA:ta  $A_{260}/A_{280}$ -mittausta varten  Käytä 10 mM:n Tris-HCl:ää, pH 7,5, laimentamaan RNA ennen puhtauden mittaamista\* (katso Liite B, sivu 73).
- b) Spektrofotometriä ei ole nollattu kunnolla  Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja 10 mM:n Tris-HCl-puskuria, pH 7,5, kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu.

\* 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.

## Huomautuksia ja ehdotuksia

---

### Laitteen toimintahäiriö

QIAcube-laitteet eivät toimineet oikein

Lue asianomainen QIAcube-käyttöopas ja kiinnitä huomiota erityisesti Vianmääritys-osioon. Varmista, että QIAcube on huollettu asianmukaisesti käyttöoppaan ohjeiden mukaisesti.

# Liite A: Yleisiä huomautuksia RNA:n käsittelystä

## RNA:n käsitteleminen



Ribonukleasit (RNAasit) ovat erittäin vakaita ja aktiivisia entsyymejä, jotka eivät tavallisesti edellytä kofaktoreita toimiakseen. Koska RNAaseja on vaikea inaktivoida ja jopa pikkuruiset määrät riittävät hajottamaan RNA:ta, mitään muovi- tai lasitarvikkeita ei saa käyttää poistamatta ensin mahdollista RNAasi-kontaminaatiota. On oltava erittäin varovainen, ettei RNAaseja viedä vahingossa RNA-näytteeseen puhdistustoimenpiteen aikana tai sen jälkeen. Jotta voidaan luoda ja ylläpitää RNAasitonta ympäristöä, esikäsittelyn aikana on ryhdyttävä varotoimiin ja käytettävä kertakäyttöisiä ja ei-kertakäyttöisiä astioita ja liuoksia RNA:n kanssa työskennellessä.

## Yleinen käsittely



Asianmukaista mikrobiologista, aseptista tekniikkaa on aina käytettävä työskennellessä RNA:n kanssa. Käsissä ja pölyssä on bakteereita ja homeita, ne ovat yleisiä RNAasi-kontaminaation lähteitä. Estä ihon pinnan tai pölyisten laboratoriovälineiden aiheuttamat RNAasi-kontaminaatiot käyttämällä aina lateksi- tai vinyylikäsiineitä, kun käsittelet reagensseja ja RNA-näytteitä. Vaihda käsiineet usein ja pidä putket suljettuina aina kun mahdollista. Pidä puhdistettu RNA jäässä, kun alikvotteja pipetoidaan myöhempiä käyttötarkoituksia varten.

Protokollia RNAasi-kontaminaation poistamiseen lasitarvikkeista ja liuoksista löytyy yleisistä molekyylibiologian oppaista, kuten Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.



# Liite B: Kokonais-RNA:n kvantifiointi ja laadun määrittäminen

## RNA:n kvantifiointi

RNA:n pitoisuus on määritettävä mittaamalla absorbanssi 260 nm:ssä ( $A_{260}$ ) spektrofotometrillä. Merkittävyyden varmistamiseksi lukemien tulisi olla spektrofotometriä lineaarisella alueella. Yhden yksikön absorbanssi aallonpituudella 260 nm vastaa 44 µg:aa RNA:ta millilitrassa ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ ). Tämä suhde on voimassa vain mittauksissa, jotka tehdään 10 mM:n Tris-HCl-puskurissa, \* pH 7,5,. Siksi jos on tarpeen laimentaa RNA-näytettä, se on tehtävä 10 mM:n Tris-HCl-puskurilla. Kuten jäljempänä on selostettu (katso RNA:n puhtaus, sivu 74), absorbanssiarvojen suhde 260 ja 280 nm:ssä tuottaa arvion RNA:n puhtaudesta. Mitattaessa RNA-näytteitä on varmistettava, että kyvetit ovat RNA:sta vapaita. Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja Tris-HCl-puskuria kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin taustaabsorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu. Esimerkki RNA:n kvantifioinnissa käytetystä laskennasta on esitetty jäljempänä.

RNA-näytteen tilavuus = 80 µl

Laimennus (1/15) = 10 µl RNA-näytettä + 140 µl 10 mM:n Tris-HCl:ä, pH 7,5

Mittaa kyvetissä (RNA:sta vapaita) olevan laimennetun näytteen absorbanssi.

$A_{260}$  = 0,3

Näytteen pitoisuus =  $44 \times A_{260} \times \text{laimennuskertoimen}$   
=  $44 \times 0,3 \times 15$   
= 198 µg/ml

Kokonaistuotto = pitoisuus x näytteen tilavuus millilitroina  
=  $198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$   
= 15,8 µg RNA

\* Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

## RNA:n puhtaus

260 nm:ssä ja 280 nm:ssä ( $A_{260}/A_{280}$ ) mitattujen lukemien suhde antaa arvion RNA:n puhtaudesta suhteessa kontaminantteihin, jotka absorboivat UV-valoa, kuten proteiini. pH kuitenkin vaikuttaa merkittävästi  $A_{260}/A_{280}$ -suhteeseen. Matalampi pH tuottaa matalamman  $A_{260}/A_{280}$ -suhteen ja pienemmän herkkyuden proteiinikontaminaatiolle.\* Tarkkoja arvoja varten on suositeltavaa mitata absorbanssi 10 mM:n Tris-HCl-puskurissa, pH 7,5. Puhtaalla RNA:lla on  $A_{260}/A_{280}$ -suhde 1,8–2,2 10 mM:n Tris-HCl-puskurissa, pH 7,5. Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja Tris-HCl-puskuria kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoisiin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu.

\* 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.

# Liite C: PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien käsitteleminen



Seuraavat BD:n suositukset voivat olla hyödyllisiä käsiteltäessä PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkia. Katso *PAXgene Blood RNA Tube -käsikirjasta* lisätietoja PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkista.

## Ohjeet BD Hemogard -sulkimen poistamiseen

1. Tartu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen toisella kädellä ja aseta peukalo BD Hemogard -sulkimen alle. (Lisää vakautta asettamalla käsivarsi tasaiselle pinnalle.) Väännä BD Hemogard -suljinta toisella kädellä, kun samanaikaisesti painat toisen käden peukalolla ylöspäin VAIN, KUNNES PUTKEN SULJIN ON LÖYSÄLLÄ.
2. Siirrä peukalo pois, ennen kuin nostat sulkimen. ÄLÄ käytä peukaloa painamaan suljinta pois PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkesta. Huomio: Jos PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sisältää verta, on olemassa altistumisvaara. Loukkaantumisen estämiseksi sulkimen poistamisen yhteydessä on tärkeää, että peukalo, jolla suljinta painetaan ylöspäin, ei enää koske PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen välittömästi, kun BD Hemogard -suljin löystyy.
3. Nosta suljin pois PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkesta. Mikäli muovisuojuus irtoaa kumitulpasta, ÄLÄ KOKOAA SULJINTA UUELLEEN. Poista kumisuljin varovasti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkesta.

## Ohjeet toissijaisen BD Hemogard -sulkimen asettamiseen

1. Aseta suljin PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken päähän.
2. Väännä ja paina alaspäin tiukasti, kunnes suljin on asettunut uudelleen kokonaan. Sulkimen täydellinen uudelleenasetus on tarpeen, jotta se pysyy tiukasti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkessa käsittelyn aikana.

# Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Column -putkea, 50 Shredder Spin Column -putkea, käsittelyputkia, RNAasitonta DNAasi I:ä, RNAasittomia reagensseja ja puskureita. Käytettäväksi yhdessä PAXgene Blood RNA Tube -putkien kanssa	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 verinäyteputkea	762165
<b>Liittyvät tuotteet, jotka voi tilata QIAGENiltä</b>		
Starter Pack, QIAcube	Pakkaus sisältää: reagenssipullotelineet (3); telineen merkintätarrat (8); 200 µl:n suodatinkärjet (1024); 1000 µl:n suodatinkärjet (1024); 1000 µl:n suodatinkärjet, leveäaukkoiset (1024); 30 ml:n reagenssipullot (18); roottoriadapterit (240); roottoriadapterin pidike	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Steriilit, kertakäyttöiset suodatinkärjet, telineessä	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Korkilliset reagenssipullot (30 ml), 6 kappaleen pakkaus, käytettäväksi QIAcube-laitteen reagenssipullotelineen kanssa	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	240 preparaatiota varten: 240 kertakäyttöistä roottoriadapteria, käytettäväksi QIAcube-laitteiden kanssa	990394

Reagent Bottle Rack	Teline, johon mahtuu 6 x 30 ml:n reagenssipulloa QIAcube-laitteen työpöydälle	990390
Rotor Adapter Holder	12 kertakäyttöisen roottoriadapterin pidike, käytettäväksi QIAcube-laitteiden kanssa	990392
<b>Liittyvät tuotteet, jotka voi tilata BD:ltä*</b>		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21 G:n, 0,75 tuuman (0,8 x 19 mm:n) neula, 12 tuuman (305 mm:n) letku, jossa luer-sovitin; 50/laatikko, 200/pakkaus	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Pelkkä kotelo 13 mm:n ja 16 mm:n halkaisijalle; 1000/kotelo	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4,0 ml:n näytteenottoputki, jossa punainen BD Hemogard -suljin ja paperietiketti; 100/laatikko, 1000/kotelo	368975

\* Nämä verinäytteen ottovälineet edustavat tyypillisiä tuotteita, joita voidaan käyttää PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien kanssa. Lisätietoja näistä lisävarusteista sekä niiden tilausohjeet ovat osoitteessa [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista PreAnalytiX- tai QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. PreAnalytiX- ja QIAGEN-sarjojen käyttöoppaat ja käsikirjat ovat saatavilla osoitteissa [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) ja [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Ne voi myös pyytää PreAnalytiX-yhtiön tekniseltä palvelulta.

# Käsikirjan muutoshistoria

<b>Asiakirja ja versio</b>	<b>Muutokset</b>	<b>Date (Päivämäärä)</b>
HB-0101-004, R2	Muutoksia koko asiakirjassa GHS-säädösten noudattamiseksi	Kesäkuu 2015
HB-0101-005, R3	Uusi mallipohja; muutoksia automaattiseen protokollaan ja suorituskykytietoihin, turvallisuustietojen päivitys GHS-säädösten noudattamista varten; muutoksia laitteen tietoihin ja tuotteen käyttörajoitusilmoitukseen.	Helmikuu 2019
HB-0101-006, R3	Korjattu sarjan nimi sarjan sisällön taulukossa sivulla 5.	Tammikuu 2020
HB-0101-007, R4	Lisätty QIAcube Connect MDx automaattiseen protokollaan; päivitetty sanamuotoja kaikkialla sisältämään viittaukset QIAcube Connect MDx -laitteeseen; päivitetty taulukkojen, sivujen ja kuvien numerot koko asiakirjassa.	Joulukuu 2020

## PreAnalytiX maailmalla

PreAnalytiX-tuotteita jakelevat QIAGEN- ja BD-yhtiöt

### QIAGEN – asiakaspalvelu

Tilaukset [www.QIAGEN.com/shop](http://www.QIAGEN.com/shop) | Tekninen tuki [support.qiagen.com](mailto:support.qiagen.com) | Verkkosivusto [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

#### BD – asiakaspalvelu

Argentina, Uruguay and Paraguay

Orders: 0800.444.5523

E-mail: [crc\\_argentina@bd.com](mailto:crc_argentina@bd.com)

Australia

Orders: 1.800.656.100

Fax: 1.800.656.110

E-mail: [bd\\_anz@bd.com](mailto:bd_anz@bd.com)

Austria

Orders: 43.1.7063660

Fax: 43.1.706366011

E-mail: [customercare.at@bd.com](mailto:customercare.at@bd.com)

Belgium

Orders: 32.53.720.556

Fax: 32.53.720.549

E-mail: [orders.be@bd.com](mailto:orders.be@bd.com)

Brazil

Orders: 0800.055.56.54

E-mail: [consultoria\\_vacutainer@bd.com](mailto: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](mailto: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](mailto:info_bulgaria@bd.com)

Czech Republic orders: [info\\_czech@bd.com](mailto:info_czech@bd.com)

Croatia orders: [info\\_croatia@bd.com](mailto:info_croatia@bd.com)

Hungary orders: [info\\_hungary@bd.com](mailto:info_hungary@bd.com)

Poland orders: [info\\_poland@bd.com](mailto:info_poland@bd.com)

Romania orders: [info\\_romania@bd.com](mailto:info_romania@bd.com)

Southeast Europe orders: [info\\_balkan@bd.com](mailto:info_balkan@bd.com)

Serbia orders: [info\\_serbia@bd.com](mailto:info_serbia@bd.com)

Slovakia orders: [info\\_slovakia@bd.com](mailto:info_slovakia@bd.com)

Slovenia orders: [info\\_slovenia@bd.com](mailto:info_slovenia@bd.com)

Denmark

Orders: 45.43.43.45.66

Fax: 45.43.96.56.76

Orders: [ordre.dk@bd.com](mailto:ordre.dk@bd.com)

Technical support: [bddenmark@bd.com](mailto:bddenmark@bd.com)

Finland

Orders: 358.9.88.70.780

Fax: 358.9.88.70.7816

Orders: [tilaukset.fi@bd.com](mailto:tilaukset.fi@bd.com)

E-mail: [bdsuomi@bd.com](mailto:bdsuomi@bd.com)

France

Orders: 33.476.68.36.36

Fax: 33.476.68.36.93

E-mail: [serviceclientbdf@bd.com](mailto:serviceclientbdf@bd.com)

Orders: [commandesfr@bd.com](mailto:commandesfr@bd.com)

Technical support: [vacutainerfr@bd.com](mailto:vacutainerfr@bd.com)

Germany

Orders: 49.6221.3050

Fax: 49.6221.305.216

E-mail: [customercare.de@bd.com](mailto:customercare.de@bd.com)

India

Orders: 91.124.3949390

Orders: [bd\\_india@bd.com](mailto: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](mailto:contactus@aquilantscientific.ie)

Israel (Lapidot Medical)

Customer Support: 972.700.70.90.22

E-mail: [cs@lapidot.com](mailto:cs@lapidot.com)

Italy

Orders: 39.02.48240.500

Fax: 39.02.48240.775

Technical support: 39.3450655140

E-mail: [ordini.it@bd.com](mailto:ordini.it@bd.com)

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

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

New Zealand  
Orders: 0800.572.468  
Fax: 0800.572.469  
E-mail: nz\_customerservice@bd.com

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

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

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

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

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

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

UK  
Orders: 0800.917.8776  
E-mail: bduk\_customerservice@bd.com

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





HB-0101-007 1122120FI BD-8945 12/2020  
Valmistettu Saksassa