

Dezembro de 2020

Manual do PAXgene[®] Blood RNA Kit

Versão 2



50 (n° de referência 762174)

R4 **MAT** 1122120BR

REF 762174

IVD

CE



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Produzido por QIAGEN GmbH para PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

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

Os PAXgene Blood RNA Kits não estão disponíveis em todos os países; solicite informações quanto à disponibilidade.

Acordo de licença limitada

O uso deste produto significa a concordância de qualquer comprador ou usuário do PAXgene Blood RNA Kit com os seguintes termos:

1. O PAXgene Blood RNA Kit deverá ser usado exclusivamente de acordo com o *Manual do PAXgene Blood RNA Kit* e apenas com os componentes contidos no kit. A PreAnalytiX não concede qualquer licença das respectivas propriedades intelectuais para incorporar ou usar os componentes incluídos neste kit com quaisquer componentes não incluídos no mesmo, exceto conforme descrito no *Manual do PAXgene Blood RNA Kit* e nos protocolos adicionais disponíveis em www.preanalytix.com.
2. Além das licenças expressamente declaradas, a PreAnalytiX não garante que este kit e/ou seu(s) uso(s) não viole(m) os direitos de terceiros.
3. Este kit e seus componentes são licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconicionados ou revendidos.
4. A PreAnalytiX especificamente se isenta de quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, além daquelas expressamente declaradas.
5. O comprador e o usuário do kit concordam em não tomar ou permitir que qualquer outra pessoa tome medidas que possam facilitar ou levar a qualquer um dos atos acima proibidos.
6. A PreAnalytiX pode fazer cumprir as proibições deste Acordo de licença limitada em qualquer Tribunal e irá recuperar todos os seus custos de investigação e de Tribunal, incluindo honorários de advogados, em qualquer ação destinada a fazer cumprir este Acordo de licença limitada ou qualquer um de seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, consulte www.preanalytix.com.

Venda condicional

O presente produto vem com uma licença sob certas reivindicações de US-7,270,953 e US-7,682,790, bem como EP-1820793 B1 e equivalentes estrangeiros dessas reivindicações de patente no sentido de usar o produto para processar o complexo de ácido nucleico formado no curso da coleção da amostra em um PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, todos os direitos reservados.

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

Distribuidores PreAnalytiX

Os produtos PreAnalytiX são produzidos e distribuídos pela QIAGEN ou BD para a PreAnalytiX. Os produtos não podem ser encomendados na PreAnalytiX GmbH.


Consulte a última página para obter informações de contato do seu distribuidor PreAnalytiX local.

Índice

Conteúdo do kit.....	5
Símbolos	6
Condições de armazenamento.....	7
Uso previsto	8
Limitações de uso do produto.....	8
Controle de qualidade	9
Assistência técnica.....	9
Informações de segurança.....	10
Introdução	13
Princípio e procedimento.....	13
Coleta e estabilização de amostras	14
Concentração e purificação de RNA	19
Purificação manual de RNA	19
Purificação de RNA automatizada	29
Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo usuário	38
Notas importantes	41
Usando instrumentos QIAcube	41
Instalando protocolos nos instrumentos QIAcube.....	44
Carregando os instrumentos QIAcube.....	45
Protocolo: purificação manual de RNA total de sangue total humano coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	55

Protocolo: purificação automatizada de RNA total de sangue total humano coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	62
Guia de solução de problemas	69
Anexo A: Observações gerais sobre o manuseio de RNA	71
Anexo B: Quantificação e determinação da qualidade de RNA total	72
Anexo C: Manuseando PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	74
Informações para pedidos	75
Histórico de revisões do manual	77

Conteúdo do kit

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Nº de referência			762174
Número de preparações			50
BR1	Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Tampão de ligação) *	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Tampão de lavagem 1) *	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (Tampão de lavagem 2) (concentrado) †	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Coletando tampão de eluição)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (Água sem RNase) (frasco)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (Proteinase K) (tampa verde)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (Colunas de centrifugação PAXgene RNA) (vermelho)	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Tubos de processamento) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Fechos secundários BD Hemogard™)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Tubos da microcentrifuga) (1,5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNase I, sem RNase) (líofilizado)	DNA REM	1500 unidades Kunitz ‡
RDD	DNA Digestion Buffer (Tampão de digestão de DNA) (tampa branca)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão de DNase) (tubo, tampa lilás)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (Colunas de centrifugação PAXgene Shredder) (lilás)	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Manual	Manual do PAXgene Blood RNA Kit (Versão 2)		1

*Não compatível com reagentes desinfetantes que contenham água sanitária. Contém um sal de guanidina. Consulte a página 10 para obter informações de segurança.

† O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido como um concentrado. Antes de usar pela primeira vez, adicione 4 volumes de etanol (96–100%, grau de pureza p.a.), conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.

‡ As unidades Kunitz são as unidades comumente usadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que causa um aumento em A_{260} de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH de 5,0, com DNA altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

Símbolos



Contém reagentes suficientes para <N> testes



Consulte as instruções de uso



Data de validade



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Número de referência



Número de lote



Número de material



Componentes



Número



Método de esterilização usando irradiação



Unidades Kunitz



Adição



Contém



Reconstituído



Desoxirribonuclease I



Etanol

GITC

Isotiocianato de guanidina

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Número global de item comercial



Não reutilizar



Limites de temperatura



Limite superior de temperatura



Fabricante



Nota importante

Condições de armazenamento

As colunas de centrifugação PAXgene RNA (PRC), colunas de centrifugação PAXgene Shredder (PSC), a proteinase K (PK) e os tampões (BR1, BR2, BR3, BR4 e BR5) devem ser armazenados a seco à temperatura indicada no rótulo do kit.

O RNase-Free DNase Set, que contém DNase I (RNFD), tampão de digestão de DNA (RDD) e tampão de ressuspensão de DNase (DRB), é enviado à temperatura ambiente. Armazene todos os componentes do RNase-Free DNase Set imediatamente após o recebimento, à temperatura indicada no rótulo. Quando armazenado devidamente, o kit permanece estável até o fim do prazo de validade indicado na caixa do kit.

Uso previsto

O PAXgene Blood RNA System consiste em um tubo de coleta de sangue (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) e um kit de purificação de ácido nucleico (PAXgene Blood RNA Kit). Ele se destina à coleta, armazenamento e transporte de sangue e estabilização de RNA intracelular em um tubo fechado e subsequente isolamento e purificação do RNA hospedeiro do sangue total para RT-PCR usado em testes de diagnóstico molecular.

As características de desempenho do PAXgene Blood RNA System foram estabelecidas apenas com transcritos dos genes FOS e IL1B. O usuário é responsável por estabelecer as características de desempenho adequadas do PAXgene Blood RNA System para outros transcritos-alvo.

Indicações de uso

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se à purificação do RNA intracelular a partir do sangue total coletado no PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Quando o kit é usado em conjunto com o PAXgene Blood RNA Tube (BRT), o sistema fornece RNA intracelular purificado de sangue total para RT-PCR usado em testes de diagnóstico molecular.

Limitações de uso do produto

O PAXgene Blood RNA Kit se destina à purificação de RNA intracelular de sangue total humano ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leucócitos/ml) para aplicações de diagnóstico in vitro. Não se destina à purificação do DNA genômico ou ácidos nucleicos virais de sangue total humano. Devido ao número limitado de transcritos validados para as especificações de estabilização (transcritos dos genes FOS e IL1B), as características de desempenho não foram estabelecidas para todos os transcritos. Os usuários devem revisar os dados do fabricante e seus próprios dados para determinar se a validação é necessária para outros transcritos.

O produto destina-se a ser usado por usuários profissionais, por exemplo, técnicos e médicos com formação em procedimentos de diagnóstico in vitro.

Consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube* para obter informações sobre o uso de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Controle de qualidade

De acordo com o sistema de gestão da qualidade com certificação ISO da QIAGEN, cada lote do PAXgene Blood RNA Kit é testado de acordo com especificações predeterminadas para garantir a qualidade consistente do produto.

Assistência técnica

Na QIAGEN, temos orgulho da qualidade e da disponibilidade do nosso suporte técnico. Nossos Departamentos de Assistência Técnica são compostos por cientistas experientes com ampla experiência prática e teórica em biologia molecular e no uso de produtos da PreAnalytiX. Se você tiver alguma dúvida sobre o PAXgene Blood RNA Kit, não hesite em nos contatar.

Para obter assistência técnica e mais informações, ligue para a Assistência Técnica da QIAGEN.

Informações de segurança

UE – Os usuários devem relatar qualquer incidente grave relacionado ao dispositivo ao fabricante e à autoridade nacional competente. Fora da UE – Entre em contato com o representante local da QIAGEN para comunicar qualquer incidente ou consulta relacionada ao dispositivo.

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção.

Para evitar o risco de infecção (por exemplo, de vírus HIV ou hepatite B) ou de lesões ao trabalhar com materiais biológicos e químicos, use sempre um jaleco de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) aplicáveis. Elas estão disponíveis online, em formato PDF conveniente e compacto, em www.preanalytix.com, onde você pode encontrar, visualizar e imprimir as SDSs deste kit.

CUIDADO



NÃO adicione água sanitária ou soluções ácidas diretamente nos resíduos resultantes da preparação da amostra.

O tampão de ligação (BR2) e o tampão de lavagem 1 (BR3) contêm tiocianato de guanidina, que pode formar compostos altamente reativos quando misturado com água sanitária. Em caso de derrame de tampão de ligação (BR2) ou tampão de lavagem 1 (BR3), limpe com detergente laboratorial adequado e água. Se o líquido derramado contiver agentes potencialmente infecciosos, limpe primeiro a área afetada com água e detergente de laboratório e, em seguida, com hipoclorito de sódio a 1% (v/v) (água sanitária).

A solução estabilizadora de RNA e a mistura de sangue do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) podem ser desinfetadas usando 1 volume de solução de água sanitária comercial (hipoclorito de sódio a 5%) por cada 9 volumes da solução estabilizadora de RNA e mistura de sangue.

Resíduos de preparação de amostras, como sobrenadantes das etapas de centrifugação no procedimento de purificação de RNA, devem ser considerados potencialmente infecciosos. Antes de descartar, os resíduos devem ser autoclavados ou incinerados para destruir qualquer material infeccioso. O descarte deve ser feito de acordo com os regulamentos oficiais.

As advertências de perigo e precaução a seguir se aplicam aos componentes do PAXgene Blood RNA Kit. Consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube* para obter informações de segurança sobre os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Tampão BR2



Contém: tiocianato de guanidina. Perigo! Nocivo, se engolido. Pode ser nocivo em contato com a pele ou se inalado. Causa lesões graves nos olhos. Nocivo para a vida aquática, com efeitos duradouros. Em contato com ácidos, libera gases muito tóxicos. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. **EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS:** Enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e fáceis de remover. Continue enxaguando. Ligue imediatamente para um CENTRO DE ENVENENAMENTO ou médico.

Tampão BR3



Contém: etanol; tiocianato de guanidina. Perigo! Líquidos e vapores inflamáveis. Causa lesões graves nos olhos. Em contato com ácidos, libera gases muito tóxicos. Mantenha distância de calor/faíscas/chamas abertas/superfícies quentes. Não fume. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. **EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS:** Enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e fáceis de remover. Continue enxaguando. Ligue imediatamente para um CENTRO DE ENVENENAMENTO ou médico.

DNase I



Contém: DNase. Perigo! Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Se inalado, pode causar sintomas de asma ou alergia ou dificuldades respiratórias. Evite respirar poeira/fumaça/gás/neblina/vapores/spray. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Use proteção respiratória. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Entre em contato com um CENTRO DE ENVENENAMENTO ou médico. Leve a vítima para um local ao ar livre e deixe-a em repouso em uma posição confortável para respirar.

Proteinase K



Contém: proteinase K. Perigo! Causa irritação leve da pele. Se inalado, pode causar sintomas de asma ou alergia ou dificuldades respiratórias. Evite respirar poeira/fumaça/gás/neblina/vapores/spray. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Use proteção respiratória. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Entre em contato com um CENTRO DE ENVENENAMENTO ou médico. Leve a vítima para um local ao ar livre e deixe-a em repouso em uma posição confortável para respirar.

Introdução

A coleta de sangue total é o primeiro passo em muitos ensaios moleculares usados para estudar o RNA celular. No entanto, um problema importante em tais experimentos é a instabilidade do perfil de RNA celular *in vitro*. Estudos na PreAnalytiX mostraram que os números de cópias de espécies individuais de mRNA em sangue total podem mudar mais de 1000 vezes durante o armazenamento ou transporte à temperatura ambiente.* Isso é causado tanto pela rápida degradação do RNA como pela expressão induzida de certos genes após a coleta do sangue. Tais mudanças no perfil de expressão de RNA impossibilitam estudos confiáveis de expressão gênica. Um método que preserva o perfil de expressão do RNA durante e após a flebotomia é, portanto, essencial para uma análise precisa da expressão gênica em sangue total humano.

Princípio e procedimento

A PreAnalytiX desenvolveu um sistema que permite a coleta, a estabilização, o armazenamento e o transporte de amostras de sangue total humano, juntamente com um protocolo rápido e eficiente para a purificação de RNA intracelular. O sistema requer o uso de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; patentes dos EUA 6.602.718 e 6.617.170) para coleta de sangue e estabilização de RNA, seguido por purificação de RNA manual ou automatizada usando o PAXgene Blood RNA Kit. Os protocolos manuais e automatizados apresentam um desempenho substancialmente equivalente em termos de qualidade e rendimento do RNA. Dados de desempenho do protocolo manual (páginas 22–29) e do protocolo automatizado (páginas 31–35) estão incluídos neste manual.



O QIAGEN QIAcube Connect MDx não está disponível em todos os países. Para obter mais detalhes, entre em contato com a assistência técnica da QIAGEN.

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

Coleta e estabilização de amostras

Os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contêm uma composição reagente proprietária que é baseada em uma tecnologia patenteada de estabilização de RNA. Esta composição reagente protege as moléculas de RNA da degradação por RNases e minimiza as mudanças *ex vivo* na expressão gênica. Os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) se destinam à coleta de sangue total humano e à estabilização de RNA celular por até 3 dias a 18–25 °C (Figuras 1 e 2, páginas 15 e 16) ou até 5 dias a 2–8 °C (Figuras 3 e 4, páginas 17 e 18). Dados atualmente disponíveis mostram estabilização de RNA celular por, pelo menos, 11 anos a –20 °C ou –70 °C*. Para obter mais informações de estudos em andamento que avaliem a estabilidade por períodos mais longos, entre em contato com a Assistência Técnica da QIAGEN.

A duração real da estabilização de RNA pode variar de acordo com as espécies de RNA celular e com a aplicação a jusante usada. Devido ao número limitado de transcritos validados para as especificações de estabilização (transcritos dos genes FOS e IL1B), as características de desempenho não foram estabelecidas para todos os transcritos. Os usuários devem revisar os dados do fabricante e seus próprios dados para determinar se a validação é necessária para outros transcritos.

* Um estudo de longo prazo sobre armazenamento de sangue em PAXgene Blood RNA Tubes está em andamento.

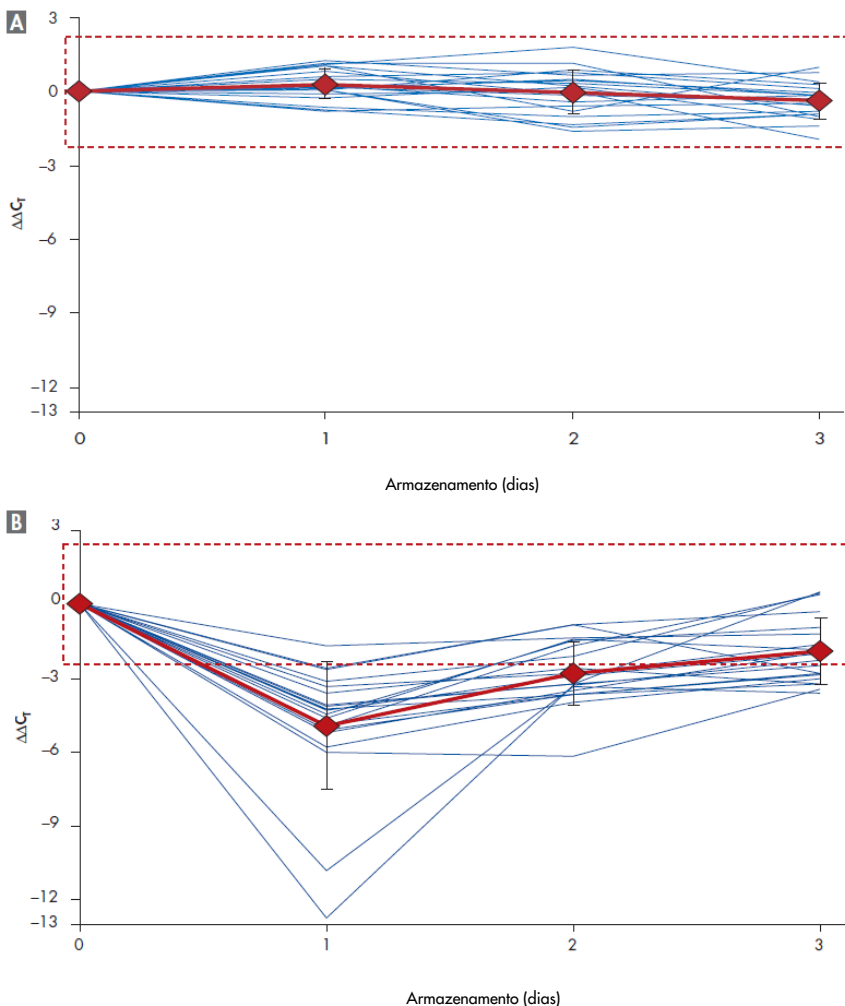


Figura 1. Estabilidade do RNA em amostras de sangue a 18–25 °C: FOS. O sangue foi extraído de 10 doadores, com amostras duplicadas, e armazenado a 18–25 °C durante o número indicado de dias, seguido de purificação de RNA total. **[A]** O sangue foi coletado e armazenado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e o RNA total foi purificado usando o PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** O sangue foi coletado e armazenado em tubos de coleta de sangue padrão, com EDTA como anticoagulante, e o RNA total foi purificado usando um método padrão de extração orgânica com limpeza de RNA baseada em membrana de sílica. Os níveis de transcritos relativos de FOS foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Os valores de todas as amostras encontram-se representados graficamente, com médias e desvios padrão de todas as amostras apresentadas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de $\pm 3x$ do ensaio (2,34 C_t).

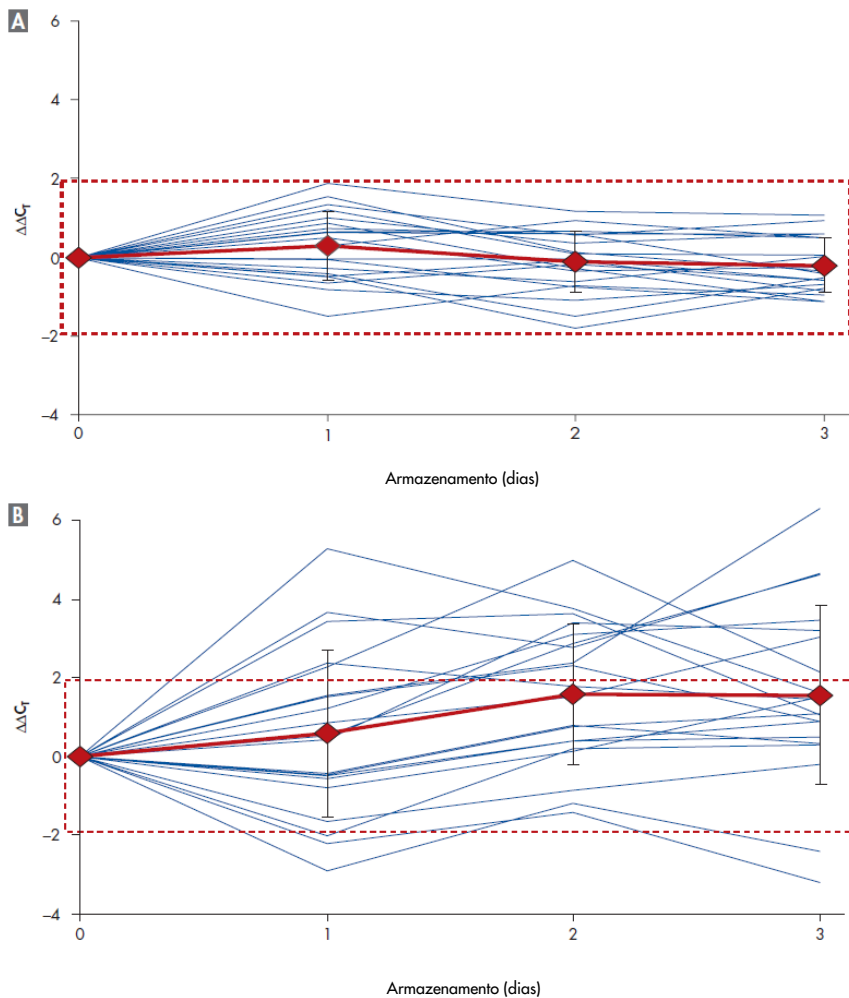


Figura 2. Estabilidade do RNA em amostras de sangue a 18–25 °C: IL1B. O sangue foi extraído e o RNA total purificado, após armazenamento a 18–25 °C, conforme descrito na Figura 1. Os níveis de transcritos relativos de IL1B foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Os valores de todas as amostras encontram-se representados graficamente, com médias e desvios padrão de todas as amostras apresentadas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de $\pm 3x$ do ensaio (1,93 C_t).

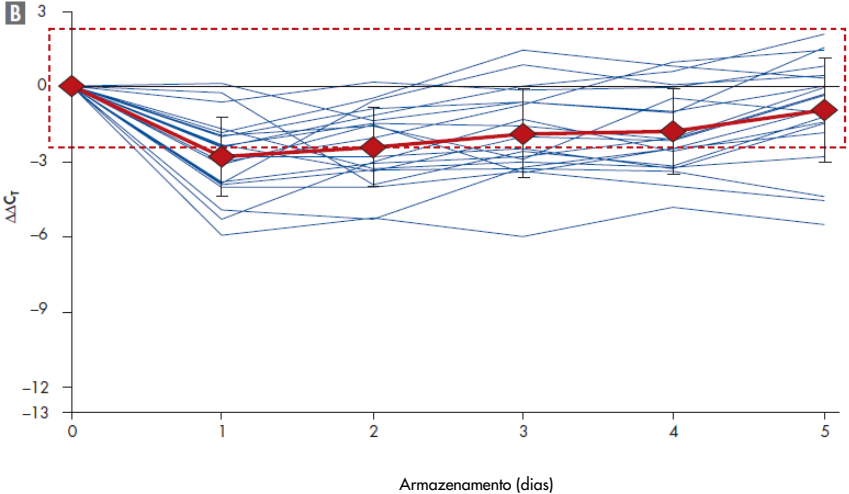
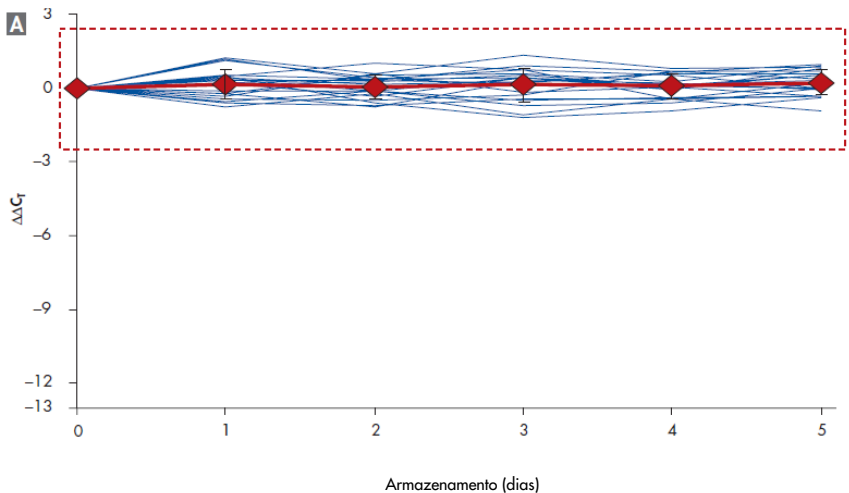


Figura 3. Estabilidade do RNA em amostras de sangue a 2-8°C: FOS. O sangue foi extraído de 10 doadores, com amostras duplicadas, e armazenado a 2-8°C durante o número indicado de dias, seguido de purificação de RNA total. **[A]** O sangue foi coletado e armazenado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e o RNA total foi purificado usando o PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** O sangue foi coletado e armazenado em tubos de coleta de sangue padrão, com EDTA como anticoagulante, e o RNA total foi purificado usando um método padrão de extração orgânica com limpeza de RNA baseada em membrana de sílica. Os níveis de transcritos relativos de FOS foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Os valores de todas as amostras encontram-se representados graficamente, com médias e desvios padrão de todas as amostras apresentadas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de $\pm 3x$ do ensaio (2,34 C_t).

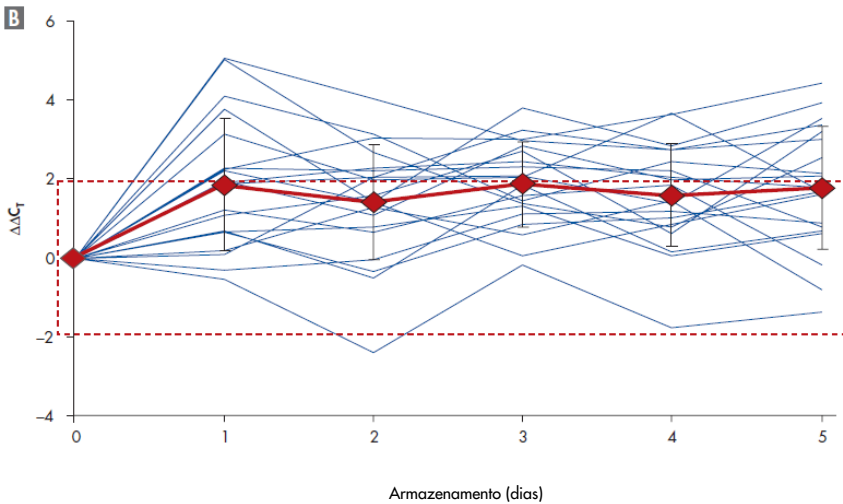
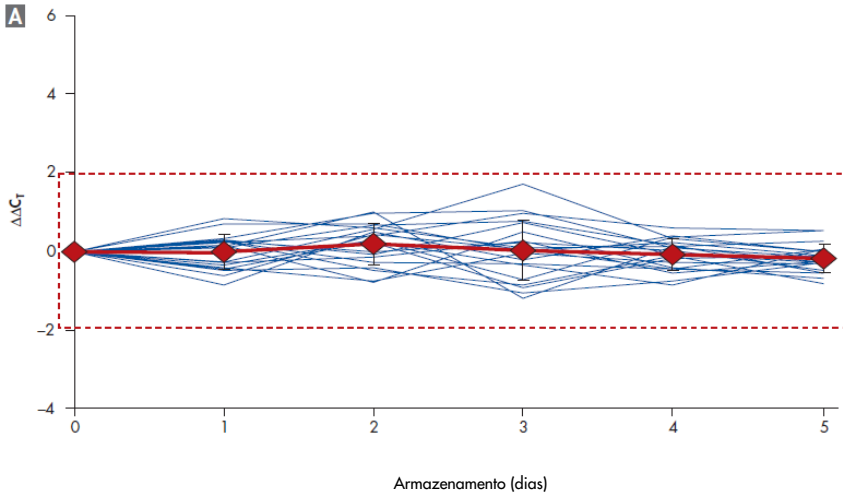


Figura 4. Estabilidade do RNA em amostras de sangue a 2-8°C: IL1B. O sangue foi extraído e o RNA total purificado, após armazenamento a 2-8°C, conforme descrito na Figura 3. Os níveis de transcritos relativos de IL1B foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Os valores de todas as amostras encontram-se representados graficamente, com médias e desvios padrão de todas as amostras apresentadas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de $\pm 3x$ do ensaio (1,93 Ct).

Concentração e purificação de RNA

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se à purificação de RNA total a partir de 2,5 ml de sangue total humano coletado em um PAXgene Blood RNA Tube (BRT). O procedimento é simples e pode ser realizado usando métodos manuais ou automatizados (consulte as Figuras 5 e 10, páginas 20 e 30). Em ambos os protocolos, a purificação começa com uma etapa de centrifugação para peletizar os ácidos nucleicos no PAXgene Blood RNA Tube (BRT). O pellet é lavado e ressuspensão, seguido de purificação manual ou automática de RNA. Em princípio, ambos os protocolos seguem as mesmas etapas protocolares com os mesmos componentes do kit.

Purificação manual de RNA

Em detalhe, o pellet ressuspensão é incubado em tampões otimizados juntamente com proteinase K (PK) para provocar a digestão da proteína. Uma centrifugação adicional através da coluna de centrifugação PAXgene Shredder (PSC) é realizada para homogeneizar o lisado celular e remover resíduos celulares, bem como o sobrenadante da fração de fluxo de passagem é transferido para um tubo da microcentrífuga novo. É adicionado etanol para ajustar as condições de ligação e o lisado é aplicado a uma coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC). Durante uma breve centrifugação, o RNA se liga seletivamente à membrana de sílica PAXgene durante a passagem dos contaminantes. Os contaminantes restantes são removidos em várias etapas eficientes de lavagem. Entre a primeira e a segunda etapas de lavagem, a membrana é tratada com DNase I (RNFD) para remover vestígios de DNA ligado. Após as etapas de lavagem, o RNA é eluído em tampão de eluição (BR5) e desnaturado por calor.

O RNA total isolado usando o PAXgene Blood RNA System é puro. Usando o protocolo manual, os valores de A_{260}/A_{280} ficam entre 1,8 e 2,2, sendo que o DNA genômico $\leq 1\%$ (w/w) se encontra em $\geq 95\%$ de todas as amostras, conforme medido por real-time PCR quantitativa de uma sequência do gene de beta-actina. Pelo menos 95% das amostras não apresentam inibição na RT-PCR, ao usar até 30% do eluato.

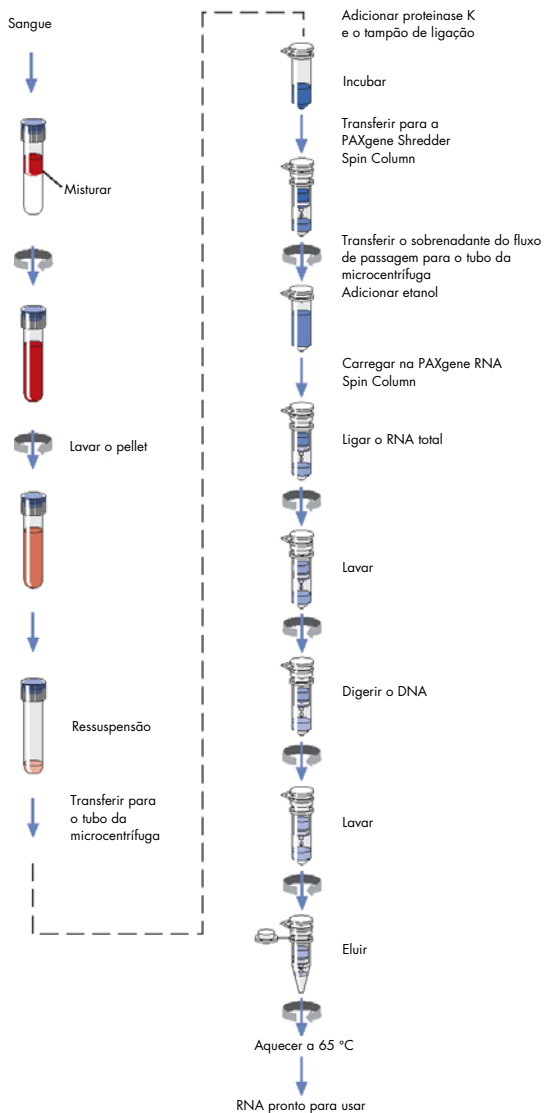


Figura 5. O procedimento manual de PAXgene Blood RNA.

Usando o protocolo manual, o tempo médio de preparação da amostra (com base nos dados das 12 execuções de preparação de amostra) é de aproximadamente 90 minutos*, com apenas 40 minutos de tempo de manipulação. Os rendimentos de RNA de 2,5 ml de sangue total humano saudável são $\geq 3 \mu\text{g}$ para $\geq 95\%$ das amostras processadas. Como os rendimentos são altamente dependentes dos doadores, os rendimentos individuais podem variar. Para doadores individuais, o PAXgene Blood RNA System fornece rendimentos altamente reprodutíveis e repetíveis (Figuras 6 e 7, páginas 22 e 23) e RT-PCR reprodutível e repetível (Figuras 8 e 9, páginas 27 e 28), tornando-o altamente robusto para testes de diagnóstico clínico.

A Figura 6 (página 22) indica a repetibilidade e reprodutibilidade globais do PAXgene Blood RNA System. Estudos adicionais foram conduzidos para mostrar a influência de diferentes lotes do PAXgene Blood RNA Kit e diferentes operadores na reprodutibilidade do rendimento de RNA e no desempenho de RT-PCR em tempo real. Como foram usadas amostras de sangue agrupadas para esses estudos, em vez de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuais, os resultados não refletem a repetibilidade do sistema, incluindo a flutuação entre coletas individuais de sangue, mas apenas a repetibilidade do preparo de amostras (consulte a Figura 7, página 23).

* Tempo de execução total do protocolo, incluindo o manuseio antecipado dos PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugações, lavagem e ressuspensão de pellets).

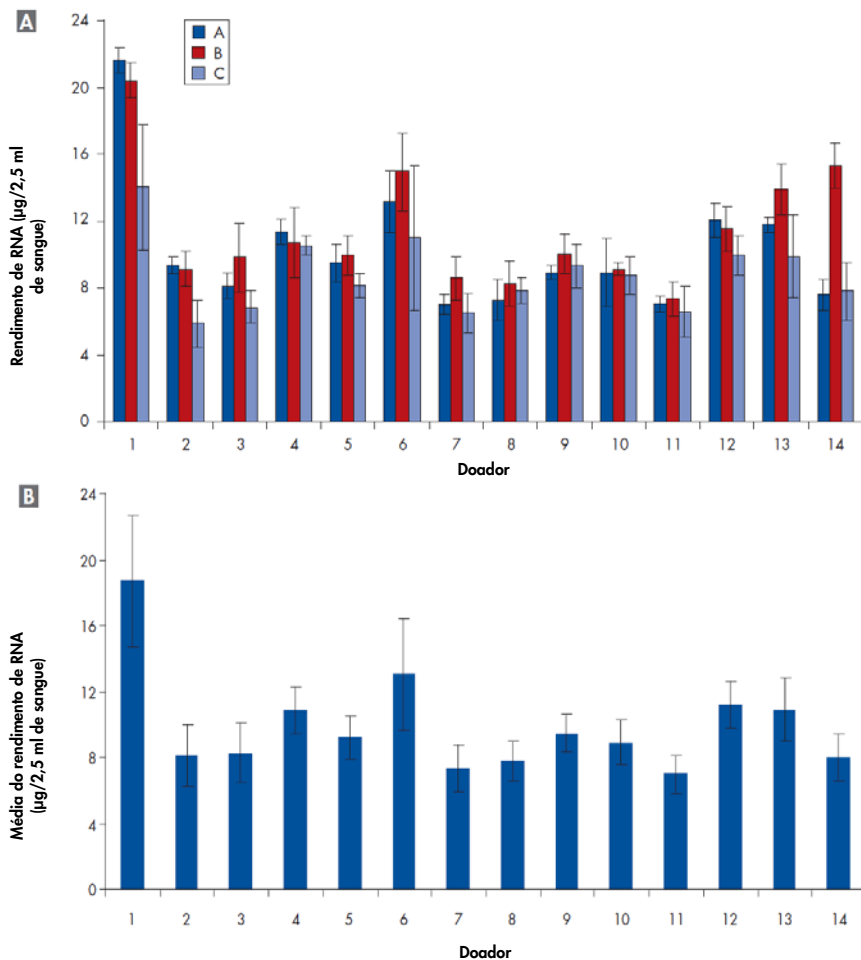


Figura 6. Purificação de RNA reprodutível e repetível. Amostras de sangue quadruplicadas de 14 doadores foram processadas manualmente por cada um dos 3 técnicos (A, B, C). Foram usados três conjuntos de equipamento e todas as amostras preparadas por um único técnico foram processadas usando o mesmo equipamento. **[A]** São exibidos os desvios padrão e as médias de rendimento de RNA por amostras replicadas dos mesmos doadores e de técnicos diferentes. **[B]** Doze amostras de sangue replicadas de cada um dos 14 doadores foram processadas por 3 técnicos diferentes. São apresentados os desvios padrão e as médias de rendimento de RNA por amostras dos mesmos doadores e de todos os técnicos. Para todas as amostras de RNA, as relações de A_{260}/A_{280} variaram de 1,8 a 2,2.

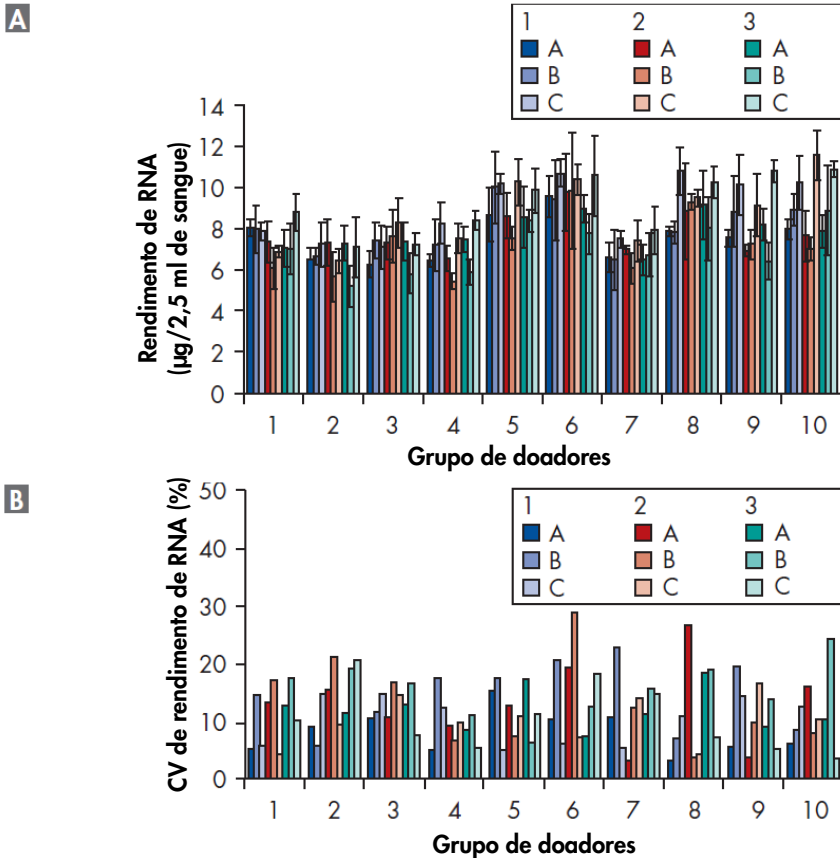


Figura 7. Repetibilidade e reprodutibilidade do rendimento de RNA para diferentes operadores e lotes do PAXgene Blood RNA Kit, usando amostras de sangue agrupadas. Amostras de sangue de 30 doadores diferentes foram coletadas em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 tubos por doador, 360 tubos no total). O conteúdo dos tubos de 3 doadores foi agrupado e subsequentemente dividido em alíquotas para 36 amostras. Essas 36 amostras por grupo de 3 doadores foram processadas manualmente por 3 operadores diferentes. Cada operador usou 3 lotes diferentes do PAXgene Blood RNA Kit para a extração e processou amostras quadruplicadas de cada um dos 10 grupos de doadores. **[A]** Rendimento de RNA e desvio padrão para cada combinação operador-lote. Amostras de sangue quadruplicadas dos 10 grupos de doadores foram processadas por 3 operadores diferentes (A, B, C) com cada um dos 3 lotes do kit (1, 2, 3). São apresentados os rendimentos médios (colunas) e desvios padrão (barras de erro) por amostra quadruplicada do mesmo grupo de doadores para um operador diferente e um lote diferente do kit. **[B]** CV do rendimento de RNA por grupo de doadores para todas as combinações operador-lote (A, B, C; 1, 2, 3), conforme calculado a partir do rendimento médio e desvio padrão do rendimento mostrado na Figura 7A.

Tabela 1A. Reprodutibilidade em cada lote e de cada usuário para os grupos de doadores selecionados (1, 6, 9, 10)

Combinação de dados	Grupo de doadores 1 5,1 x 10 ⁶ células/ml			Grupo de doadores 6 6,5 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Lote 1, usuário A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Lote 1, usuário B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Lote 1, usuário C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Lote 2, usuário A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Lote 2, usuário B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Lote 2, usuário C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Lote 3, usuário A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Lote 3, usuário B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Lote 3, usuário C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Combinação de dados	Grupo de doadores 9 8,4 x 10 ⁶ células/ml			Grupo de doadores 10 10,2 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Lote 1, usuário A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Lote 1, usuário B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lote 1, usuário C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lote 2, usuário A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lote 2, usuário B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lote 2, usuário C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lote 3, usuário A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lote 3, usuário B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lote 3, usuário C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Tabela 1B. Reprodutibilidade de cada usuário e entre todos os lotes dos grupos de doadores selecionados (1, 6, 9, 10)

Combinação de dados	Grupo de doadores 1 5,1 x 10 ⁶ células/ml			Grupo de doadores 6 6,5 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Usuário A, todos os lotes	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Usuário B, todos os lotes	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Usuário C, todos os lotes	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Combinação de dados	Grupo de doadores 9 8,4 x 10 ⁶ células/ml			Grupo de doadores 10 10,2 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Usuário A, todos os lotes	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Usuário B, todos os lotes	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Usuário C, todos os lotes	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tabela 1C. Reprodutibilidade em cada lote e entre todos os usuários dos grupos de doadores selecionados (1, 6, 9, 10)

Combinação de dados	Grupo de doadores 1 5,1 x 10 ⁶ células/ml			Grupo de doadores 6 6,5 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Lote 1, todos os usuários	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lote 2, todos os usuários	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lote 3, todos os usuários	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Combinação de dados	Grupo de doadores 9 8,4 x 10 ⁶ células/ml			Grupo de doadores 10 10,2 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Lote 1, todos os usuários	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lote 2, todos os usuários	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lote 3, todos os usuários	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabela 1D. Reprodutibilidade entre todos os lotes e todos os usuários dos grupos de doadores selecionados (1, 6, 9, 10)

Combinação de dados	Grupo de doadores 1 5,1 x 10 ⁶ células/ml			Grupo de doadores 6 6,5 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Lote 1, todos os usuários	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Combinação de dados	Grupo de doadores 9 8,4 x 10 ⁶ células/ml			Grupo de doadores 10 10,2 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Lote 1, todos os usuários	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Análise detalhada de 4 grupos de doadores representativos. Os grupos foram selecionados de acordo com a contagem de leucócitos e refletem os valores superior, médio e inferior da faixa normal das contagens de leucócitos ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leucócitos/ml). A contagem de glóbulos brancos representa o valor médio das 3 contagens de glóbulos brancos dos 3 doadores por grupo de doadores.

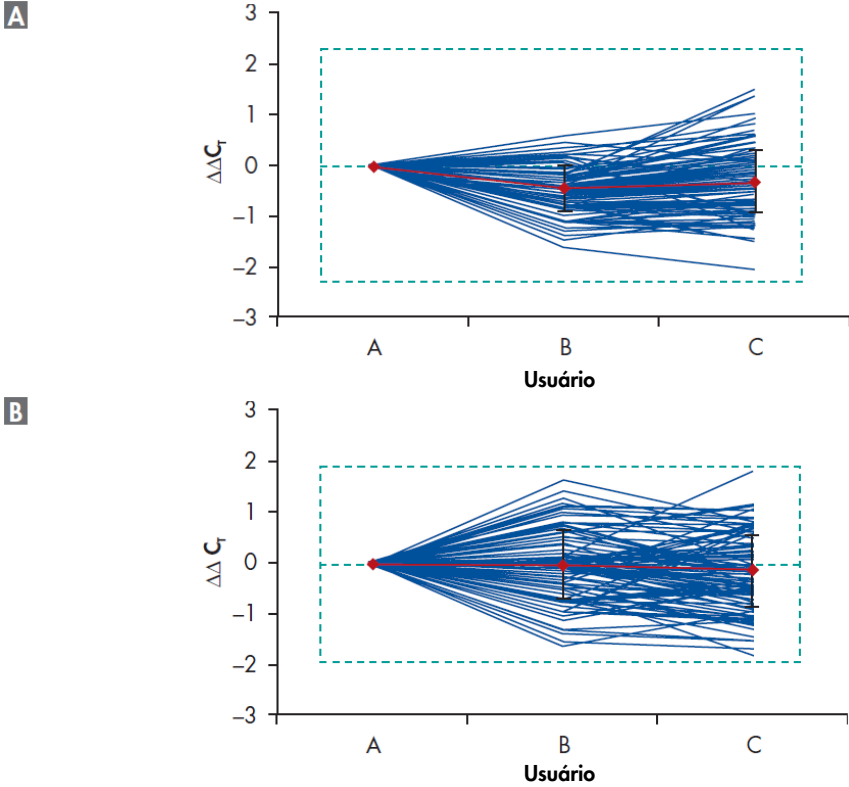


Figura 8. Reprodutibilidade de RT-PCR — entre usuários. O RNA purificado no experimento descrito na Figura 7 foi usado para RT-PCR em tempo real. Os níveis de transcritos relativos de **[A]** FOS e **[B]** IL1B foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Os valores de todas as amostras encontram-se representados graficamente, relativamente aos valores do usuário A (10 grupos de doadores x 3 lotes de kit x 4 réplicas = 120 conjuntos de dados para cada gene), com médias (linhas vermelhas) e desvios padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de $\pm 3\times$ dos ensaios (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

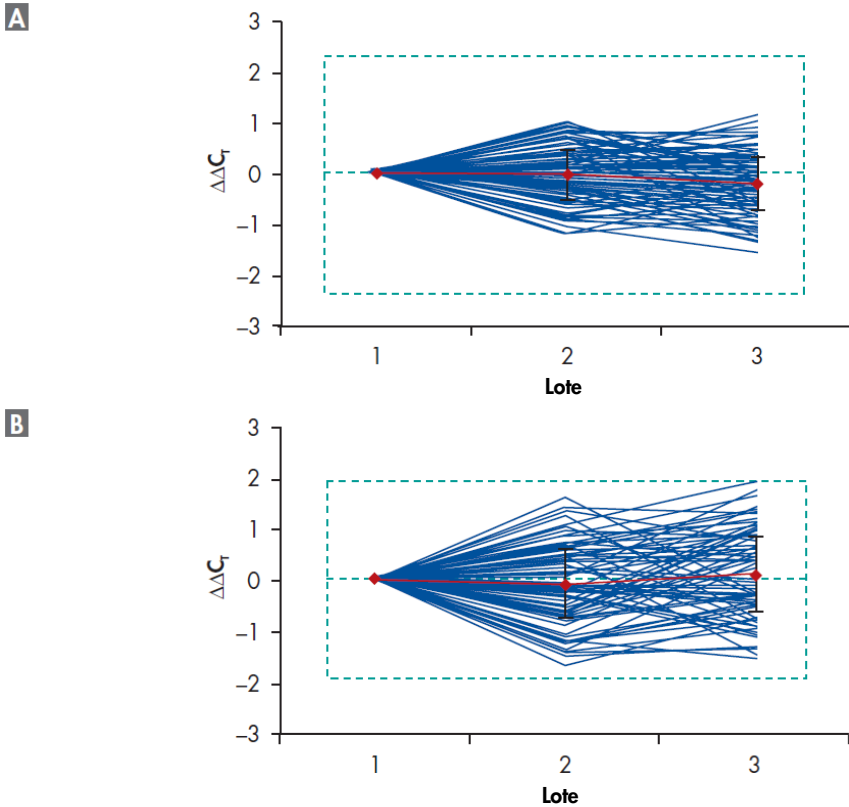


Figura 9. Reprodutibilidade de RT-PCR — entre lotes de kit. O RNA purificado no experimento descrito na Figura 7 foi usado para RT-PCR em tempo real. Os níveis de transcritos relativos de **[A]** FOS e **[B]** IL1B foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Os valores de todas as amostras encontram-se representados graficamente, relativamente aos valores do lote de kit 1 (10 grupos de doadores x 3 usuários x 4 réplicas = 120 conjuntos de dados para cada gene), com desvios médios (linhas vermelhas) e padrão (barras pretas) para todas as amostras exibidas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de $\pm 3x$ dos ensaios (FOS: $2,34 C_T$; IL1B: $1,93 C_T$).

Tabela 2. Resumo dos dados de RT-PCR das Figuras 8 e 9

Sistema de teste	Ensaio FOS/18S rRNA		Ensaio IL1B/18S rRNA	
	Média ($\Delta\Delta C_T$)	\pm DP ($\Delta\Delta C_T$)	Média ($\Delta\Delta C_T$)	\pm DP ($\Delta\Delta C_T$)
Reprodutibilidade de cada usuário e entre todos os lotes				
Todos os usuários, lote 1–lote 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Todos os usuários, lote 1–lote 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Todos os usuários, lote 1–lote 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reprodutibilidade de cada usuário e entre todos os lotes				
Todos os lotes, usuário A–usuário A	0,00	0,00	0,00	0,00
Todos os lotes, usuário A–usuário B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Todos os lotes, usuário A–usuário C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Usuário: técnico, realizou o estudo.

Lote: número do lote de kit usado neste estudo.

DP: desvio padrão.

Os valores de média $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) e desvios padrão são mostrados para os dados apresentados nas Figuras 8 e 9.

Purificação de RNA automatizada

A purificação de RNA do sangue é automatizada no QIAGEN QIAcube Connect MDx ou no clássico QIAGEN QIAcube (doravante denominado QIAcube). Os inovadores instrumentos QIAcube usam tecnologia avançada para processar as colunas de centrifugação QIAGEN, permitindo a integração perfeita do preparo automatizado de amostras de baixo rendimento no fluxo de trabalho do laboratório. O preparo de amostras usando os instrumentos QIAcube segue as mesmas etapas do procedimento manual (isto é, lise, ligação, lavagem e eluição), permitindo continuar usando o PAXgene Blood RNA Kit para a purificação de RNA de alta qualidade.



Figura 10. QIAcube Connect MDx.

O protocolo de purificação de RNA automatizada é composto por 2 partes (ou protocolos), "PAXgene Blood RNA — Parte A" e "PAXgene Blood RNA — Parte B", com uma breve intervenção manual entre ambas as partes (consulte a Figura 11, página 31).

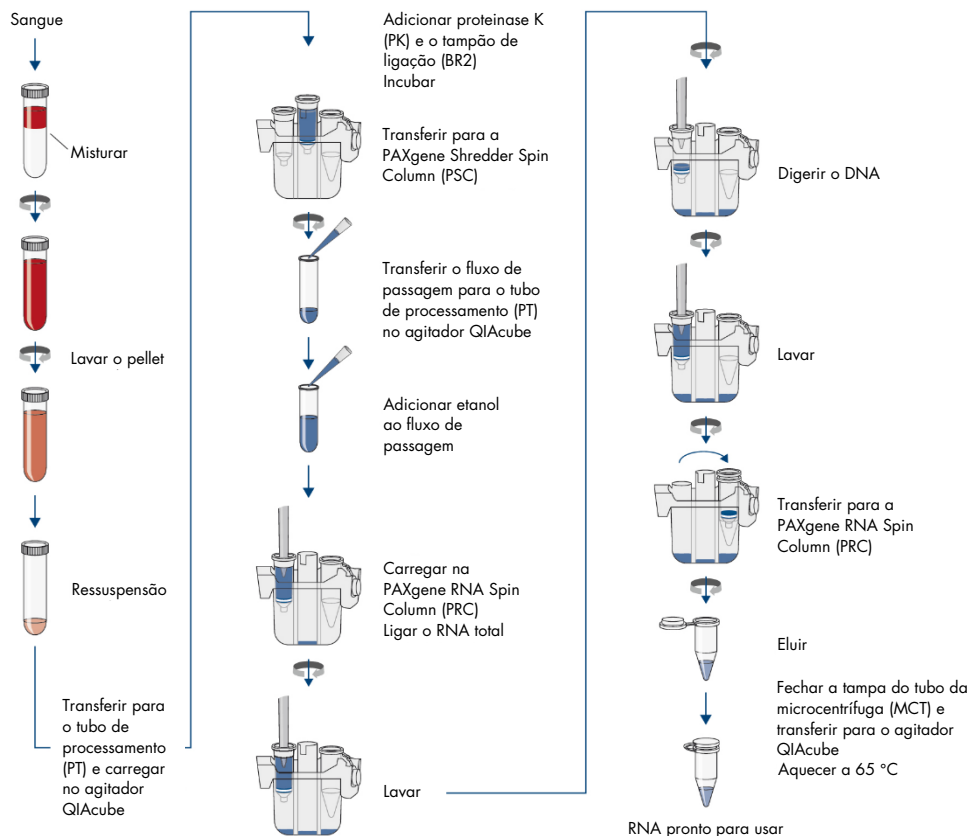


Figura 11. O procedimento automatizado do PAXgene Blood RNA.

O pellet de ácido nucleico centrifugado, lavado e ressuspensão (consulte "Concentração e purificação de RNA", página 19) é transferido do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) para tubos de processamento (PT), que são colocados na unidade do agitador térmico na mesa de trabalho dos instrumentos QIAcube. O operador seleciona e inicia o protocolo "PAXgene Blood RNA — Parte A" a partir do menu. Os instrumentos QIAcube realizam as etapas do protocolo através da eluição de RNA em tampão de eluição (BR5). O operador transfere os tubos da microcentrifuga (MCT)

contendo o RNA purificado para a unidade do agitador térmico dos instrumentos QIAcube. O operador seleciona e inicia o protocolo "PAXgene Blood RNA — Parte B" a partir do menu e a desnaturação por calor é realizada pelos instrumentos QIAcube.

O tempo médio de preparo de amostras (com base nos dados das 12 execuções de preparo da amostra) é de 151 minutos*, com muito menos tempo de manipulação em comparação com o protocolo manual.

Os rendimentos de RNA de 2,5 ml de sangue total humano saudável são ≥ 3 μg para $\geq 95\%$ das amostras processadas. A Figura 12 (página 33) indica os rendimentos de RNA de um total de 216 amostras preparadas usando o protocolo automatizado com 3 lotes de kit por 3 operadores. Como foram usadas amostras de sangue agrupadas em vez de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuais para estes estudos, os resultados não refletem o rendimento de RNA esperado de amostras únicas de coletas de sangue individuais. Uma vez que os rendimentos são altamente dependentes dos dados, os rendimentos individuais podem variar (Figura 12, página 33).

Pelo menos 95% das amostras não apresentam inibição na RT-PCR, ao usar até 30% do eluato. Usando o protocolo automatizado, a contaminação cruzada entre amostras é indetectável, conforme medido pela RT-PCR quantitativa e em tempo real de sequências dos transcritos de ABL1 e FOS em amostras negativas para RNA (água) pareadas com amostras positivas para RNA (sangue total humano) na mesma execução.

O RNA isolado com o PAXgene Blood RNA System e o protocolo automatizado é puro, conforme mostrado pela falta de inibição de RT-PCR e valores de A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,2. O DNA genômico está presente a $\leq 1\%$ (w/w) em $\geq 95\%$ de todas as amostras, conforme medição por real-time PCR quantitativa de uma sequência do gene de beta-actina. As Figuras 13 e 14 (páginas 34 e 35) mostram os valores de A_{260}/A_{280} e DNA genômico relativo de um total de 216 amostras preparadas usando o protocolo automatizado com 3 lotes de kit por 3 operadores.

* Tempo de execução total do protocolo, incluindo o manuseio antecipado dos PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugações, lavagem e ressuspensão de pellets).

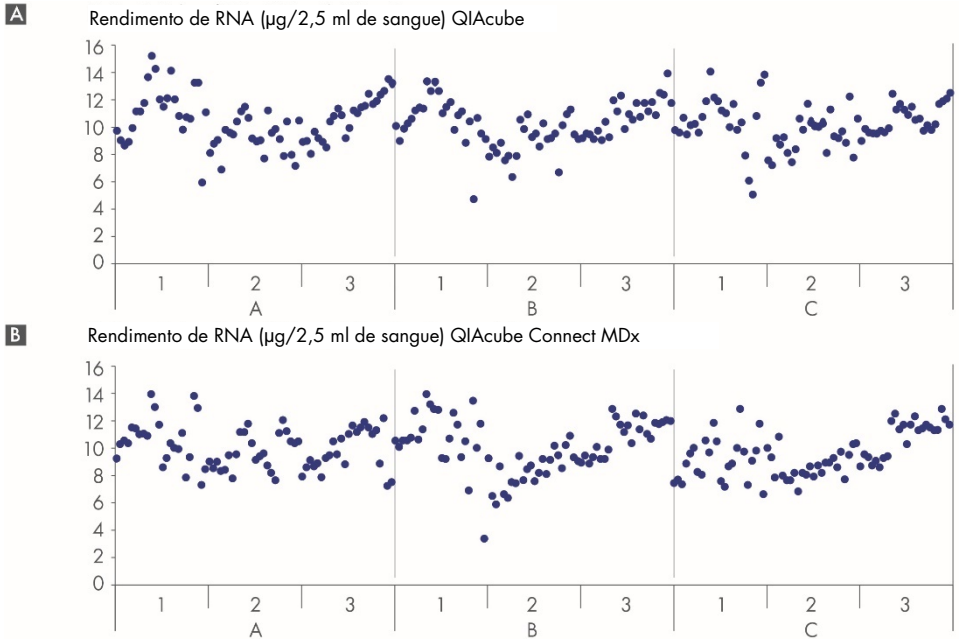


Figura 12. Rendimento de RNA — processamento automatizado A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Amostras de sangue de doadores individuais foram coletadas em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). O conteúdo dos tubos foi agrupado em 6 grupos de doadores e subsequentemente dividido em alíquotas. Um total de 216 tubos (ou seja, 36 tubos por grupo) foi processado por 3 operadores diferentes (A, B, C). Cada operador usou 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit para a extração automatizada com diversos instrumentos QIAcube and QIAcube Connect MDx e processou amostras quadruplicadas de cada um dos 6 grupos de doadores. Os rendimentos de RNA de todas as amostras individuais são mostrados para cada combinação operador-lote.

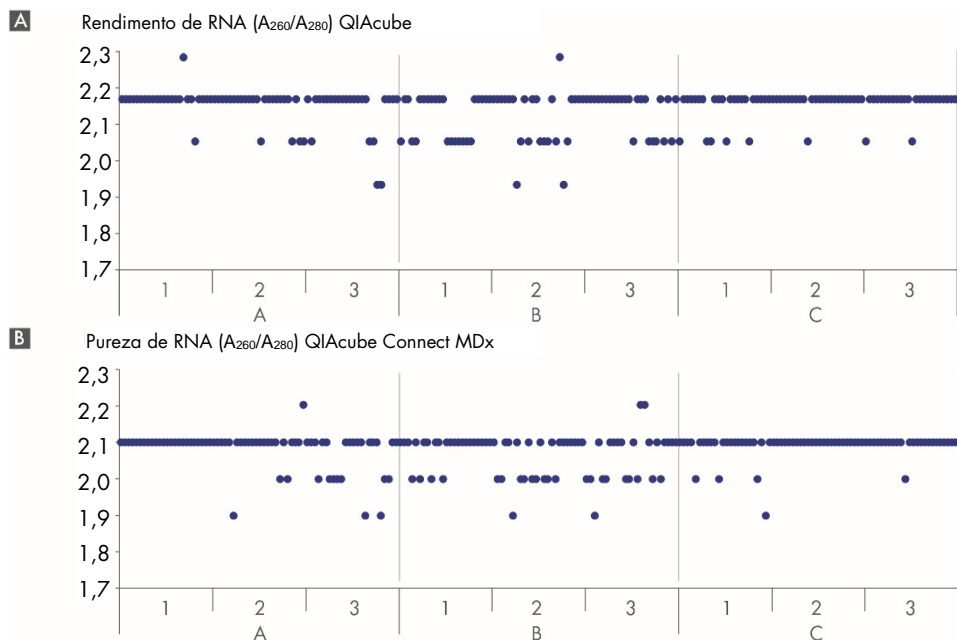


Figura 13. Pureza de RNA (valores A_{260}/A_{280}) — processamento automatizado. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx
 O RNA foi purificado por 3 operadores diferentes (A, B, C) usando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit com diversos instrumentos QIAcube e QIAcube Connect MDx no experimento descrito na Figura 12. Os valores A_{260}/A_{280} de todas as amostras individuais são mostrados para cada combinação operador-lote.

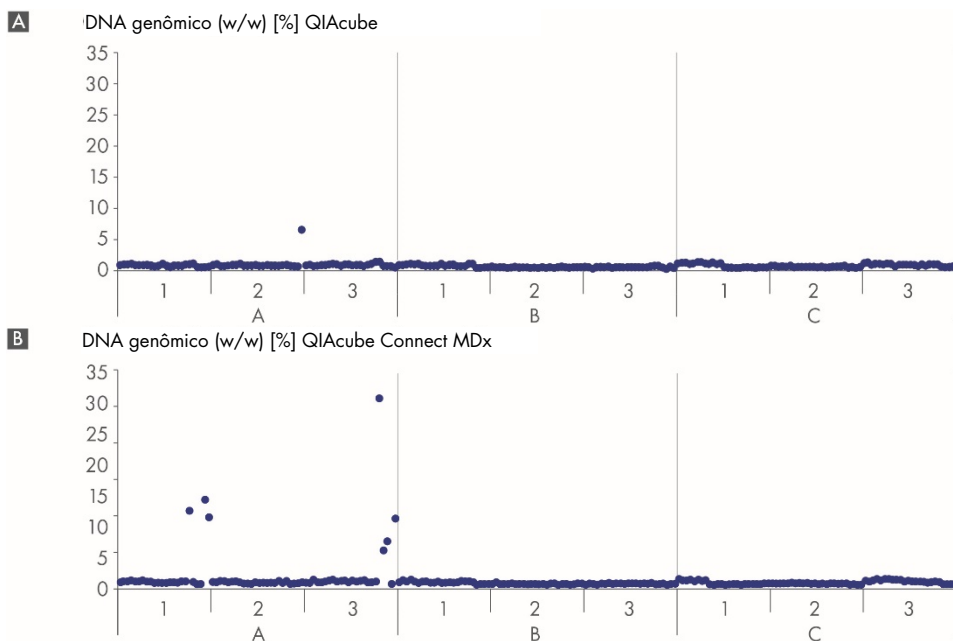


Figura 14. Pureza de RNA (% de contaminação do DNA genômico) — processamento automatizado, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. O RNA foi purificado por 3 operadores diferentes (A, B, C) usando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit com diversos instrumentos QIAcube e QIAcube Connect MDx no experimento descrito na Figura 12. As quantidades de DNA genômico (w/w) em todas as amostras individuais são mostradas para cada combinação operador-lote.

O protocolo automatizado de purificação de RNA usando o PAXgene Blood RNA System fornece resultados de RT-PCR altamente reprodutíveis e repetíveis, conforme mostrado nas Figuras 15 e 16 (páginas 36 e 37), tornando-o altamente robusto para testes de diagnóstico clínico.

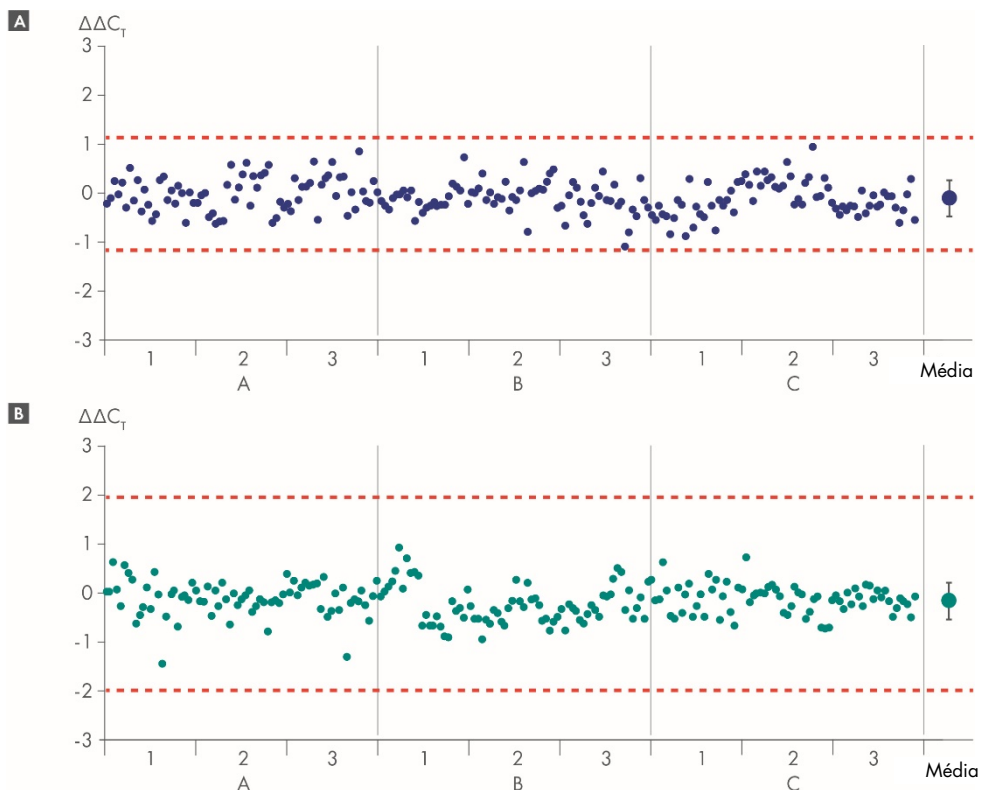


Figura 15. Reprodutibilidade de RT-PCR — entre protocolos automatizados (QIAcube) e manuais. O RNA foi purificado por 3 operadores diferentes (A, B, C) usando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit com os diversos instrumentos QIAcube e QIAcube Connect MDx usando o protocolo automatizado no experimento descrito na Figura 12. Em paralelo, o RNA foi purificado a partir dos tubos replicados correspondentes usando o protocolo manual. Os níveis de transcritos relativos de **[A]** FOS e **[B]** IL1B foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Possíveis diferenças dos níveis de transcrito entre RNA preparado a partir de amostras de sangue pareadas usando ambos os protocolos de extração (protocolo automatizado e manual) foram calculadas pelo método $\Delta\Delta C_T$. Os valores individuais de $\Delta\Delta C_T$ de todos os pares de amostras (4 réplicas x 6 grupos de doadores x 3 lotes de kit x 3 operadores = 216 pares para cada gene) são representados graficamente como pontos únicos com médias (pontos maiores) e desvios padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de $\pm 3x$ dos ensaios (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; diferentes precisões de ensaio, em comparação com as Figuras 1–4, 8 e 9 devido às diferentes versões de ensaio).

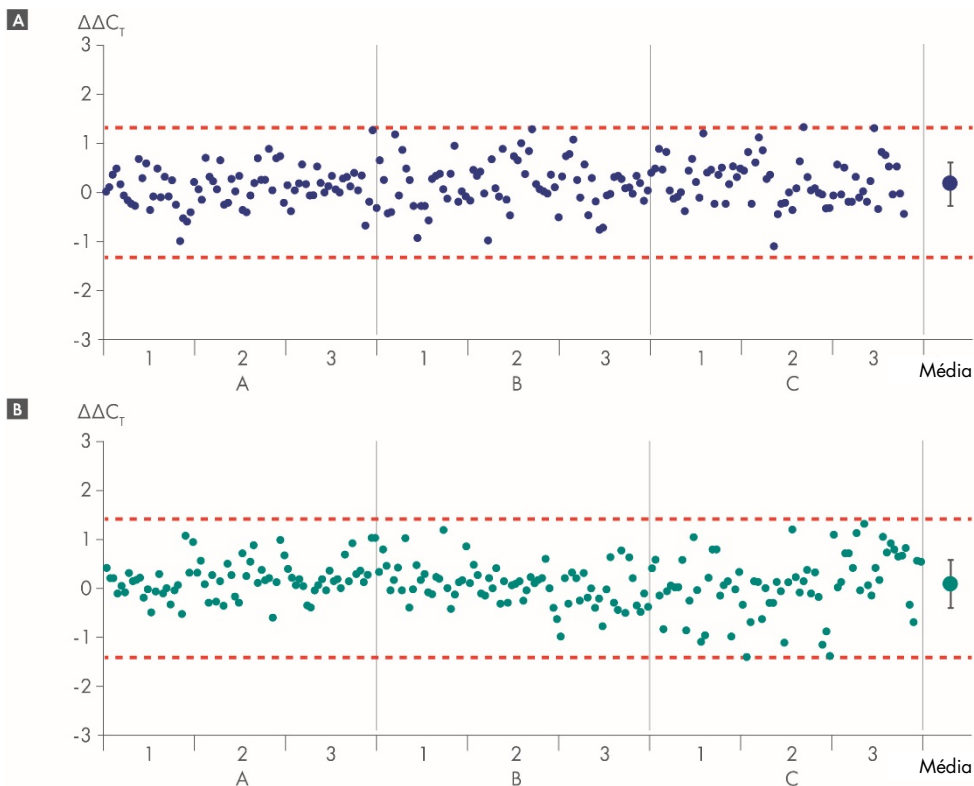


Figura 16. Reprodutibilidade de RT-PCR — entre QIAcube e QIAcube Connect MDx usando o protocolo automatizado.

O RNA foi purificado por 3 operadores diferentes (A, B, C) usando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit por meio do protocolo automatizado em diversos instrumentos QIAcube e QIAcube Connect MDx no experimento descrito na Figura 12. Os níveis de transcritos relativos de **[A] FOS** e **[B] IL1B** foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Possíveis diferenças dos níveis de transcrito entre RNA preparado a partir de amostras de sangue pareadas usando ambos os instrumentos foram calculadas pelo método $\Delta\Delta C_T$. Os valores individuais de $\Delta\Delta C_T$ de todos os pares de amostras (4 réplicas x 6 grupos de doadores x 3 lotes de kit x 3 operadores = 216 pares para cada gene) são representados graficamente como pontos únicos com médias (pontos maiores) e desvios padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de $\pm 3x$ dos ensaios (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; diferentes precisões de ensaio, em comparação com as Figuras 1–4, 8, 9 e 15 devido às diferentes versões de ensaio).

Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo usuário

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Para todos os protocolos

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; n° de ref. 762165)
- Etanol (96–100%, grau de pureza p.a.)
- Pipetas* (10 µl — 4 ml)
- Ponteiras de pipetas esterilizadas, com barreira contra aerossóis e sem RNase†
- Cilindro graduado‡
- Centrífuga* capaz de atingir 3000–5000 x g e equipada com um rotor de movimento horizontal e recipientes para fixar os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Agitador tipo vórtex*
- Gelo triturado
- Caneta permanente para rotulagem

Para o protocolo manual

- Microcentrífuga de velocidade variável* com um alcance de, pelo menos, 1000–8000 x g, embora forças g mais baixas e mais altas sejam aplicáveis (consulte as etapas do protocolo para obter detalhes), e equipada com um rotor para tubos de microcentrífuga de 2 ml

* Certifique-se de que os dispositivos e instrumentos tenham sido verificados, mantidos e calibrados regularmente de acordo com as recomendações do fabricante.

† Certifique-se de que se familiariza com as diretrizes sobre como manusear RNA (Apêndice A, página 71).

‡ Para a adição de etanol ao concentrado de tampão BR4.

- Agitador-incubador* capaz de incubar a 55 °C e 65 °C e agitar a ≥ 400 rpm, não excedendo 1400 rpm (por exemplo, Eppendorf® Thermomixer Compact ou equivalente)

Para o protocolo automatizado (usando QIAcube ou QIAcube Connect MDx)

- Tesoura

Consumíveis de instrumentos QIAcube:

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

Acessórios dos instrumentos QIAcube:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, n° de ref. 990392) †

Para o protocolo automatizado usando QIAcube Connect MDx

- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, n° de ref. 9003070)

Pacotes de serviço QIAcube Connect MDx:

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

* Certifique-se de que os dispositivos e instrumentos tenham sido verificados, mantidos e calibrados regularmente de acordo com as recomendações do fabricante.

† Também incluído no Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, n° de ref. 990395).

Para o protocolo automatizado usando QIAcube

- QIAcube* (QIAGEN, n° de ref. 9001882 [110 V])

* Certifique-se de que os dispositivos e instrumentos tenham sido verificados, mantidos e calibrados regularmente de acordo com as recomendações do fabricante.

Notas importantes

Usando instrumentos QIAcube

Certifique-se de estar familiarizado com o funcionamento do instrumento QIAcube. Leia o Manual do usuário adequado do instrumento QIAcube e qualquer informação adicional fornecida com o instrumento QIAcube, prestando muita atenção às informações de segurança, antes de iniciar os protocolos PAXgene Blood RNA automatizados.

As instruções nesta seção se aplicam ao QIAcube Connect MDx, bem como ao QIAcube, quando não especificado separadamente.

Iniciando os instrumentos QIAcube

Feche a tampa do instrumento QIAcube e ligue o instrumento QIAcube com o interruptor de alimentação (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 42; QIAcube: Figura 18, página 43).

É emitido um sinal sonoro e a tela de inicialização é exibida. O instrumento realiza automaticamente testes de inicialização.



Vista frontal do QIAcube Connect MDx



Tela sensível ao toque levantada



Vista traseira do QIAcube Connect MDx



Vista traseira do QIAcube Connect MDx

Figura 17. Recursos externos do QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|---|
| <p>1 Tela sensível ao toque</p> <p>2 Tampa</p> <p>3 Gaveta "Waste" (Resíduos)</p> <p>4 Interruptor de alimentação</p> | <p>5 2 portas USB no lado esquerdo da tela sensível ao toque; 2 portas USB atrás da tela sensível ao toque (módulo Wi-Fi conectado a 1 porta USB)</p> <p>6 Porta Ethernet RJ-45</p> <p>7 Soquete do cabo de alimentação</p> <p>8 Saída de ar frio</p> |
|---|---|



Figura 18. Vista frontal do QIAcube.

- | | | | |
|---|---|---|---------------------------------------|
| 1 | Tela sensível ao toque | 4 | Porta USB atrás do painel de proteção |
| 2 | Tampa | 5 | Interruptor de alimentação |
| 3 | Porta serial RS232 atrás do painel de proteção (somente para uso por técnicos de assistência de instrumentos da QIAGEN) | 6 | Gaveta "Waste" (Resíduos) |

Tela sensível ao toque

Os instrumentos QIAcube são controlados por meio de uma tela sensível ao toque. Essa tela permite que o usuário opere o instrumento e o oriente durante a configuração da mesa de trabalho. Durante o processamento da amostra, a tela sensível ao toque exibe o status do protocolo e o tempo restante.



Figura 19. Tela sensível ao toque do QIAcube Connect MDx levantada

Instalando protocolos nos instrumentos QIAcube

Poderá ser necessária uma instalação inicial dos protocolos antes de realizar a primeira execução do preparo de RNA nos instrumentos QIAcube. Instale os protocolos "PAXgene Blood RNA — Parte A" e "PAXgene Blood RNA — Parte B".

Os protocolos para o QIAcube Connect MDx são fornecidos em **www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources** (www.qiagen.com/MyQIAcube para QIAcube) e precisam ser baixados para o pen drive fornecido com os instrumentos QIAcube. Esses protocolos serão transferidos para o instrumento por meio da porta USB.

A porta USB (QIAcube Connect MDx: localizada na lateral da tela sensível ao toque, consulte a Figura 17, página 42; QIAcube: atrás do painel de proteção, consulte a Figura 18, página 43) permite a conexão dos instrumentos QIAcube ao pen drive fornecido com os instrumentos

QIAcube. Arquivos de dados, como arquivos de log ou arquivos de relatório, também podem ser transferidos por meio da porta USB dos instrumentos QIAcube para o pen drive.



A porta USB deve ser usada somente com o pen drive fornecido pela QIAGEN. Não conecte outros dispositivos a esta porta.



Não remova o pen drive enquanto estiver baixando protocolos ou transferindo arquivos de dados, nem durante uma execução de protocolo.

Para obter mais detalhes sobre o processo de carregamento de protocolos para instrumentos QIAcube, consulte o manual relacionado ao instrumento usado.

Carregando os instrumentos QIAcube

Para economizar tempo, o carregamento pode ser realizado durante uma ou ambas as etapas de centrifugação de 10 minutos (etapas 3 e 5) em "Protocolo: purificação automatizada de RNA total de sangue total humano coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", página 62.

Frascos de reagente

Antes de cada execução no instrumento QIAcube, encha cuidadosamente os 4 frascos de reagente com os reagentes listados na Tabela 3 (página 46) até o nível indicador máximo ou, se isso não for possível, até o nível permitido pelos volumes de tampão fornecidos no PAXgene Blood RNA Kit. Rotule os frascos e tampas de forma clara com os nomes dos tampões e coloque os frascos de reagente cheios nas posições apropriadas do rack de frascos de reagente. Carregue o rack na mesa de trabalho do QIAcube conforme mostrado (Figuras 20 - 22, páginas 46 - 48).



O volume fornecido de tampão BR2 não encherá um frasco de reagente até o nível indicador. Os tampões BR3 e BR4 podem não encher o frasco até o nível indicador depois de processar várias amostras em execuções anteriores.



Certifique-se de remover as tampas dos frascos antes de colocá-los na mesa de trabalho.



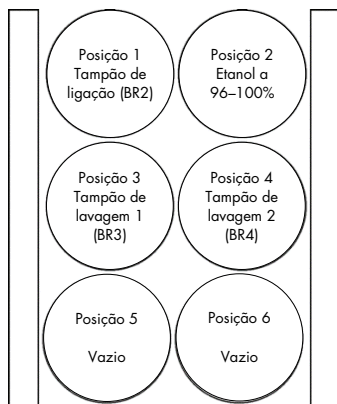
Os volumes de tampão fornecidos no PAXgene Blood RNA Kit (50) são suficientes para um máximo de 7 execuções de preparo de RNA no instrumento QIAcube com a quantidade de 2 a 12 amostras por execução. Em geral, as execuções com números de amostras menores devem ser evitadas para processar um total de 50 amostras por kit com um máximo de 7 execuções de preparo de RNA. Mais de 7 execuções de preparo de RNA podem levar a volumes de tampão insuficientes para processar as últimas amostras.

Tabela 3. Posições no rack de frascos de reagente

Posição	Reagente
1	Tampão de ligação (BR2)
2	Etanol a 96–100%
3	Tampão de lavagem 1 (BR3)
4	Tampão de lavagem 2 (BR4)*
5	– (deixar vazio)
6	– (deixar vazio)

* O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido como um concentrado. Antes de usar pela primeira vez, adicione 4 volumes de etanol (96–100%, grau de pureza p.a.), conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.

A



B



Figura 20. Carregando o rack de frascos de reagente. [A] Esquema das posições e do conteúdo dos frascos no rack de frascos de reagente. [B] Carregando o rack no instrumento QIAcube (QIAcube mostrado como exemplo).

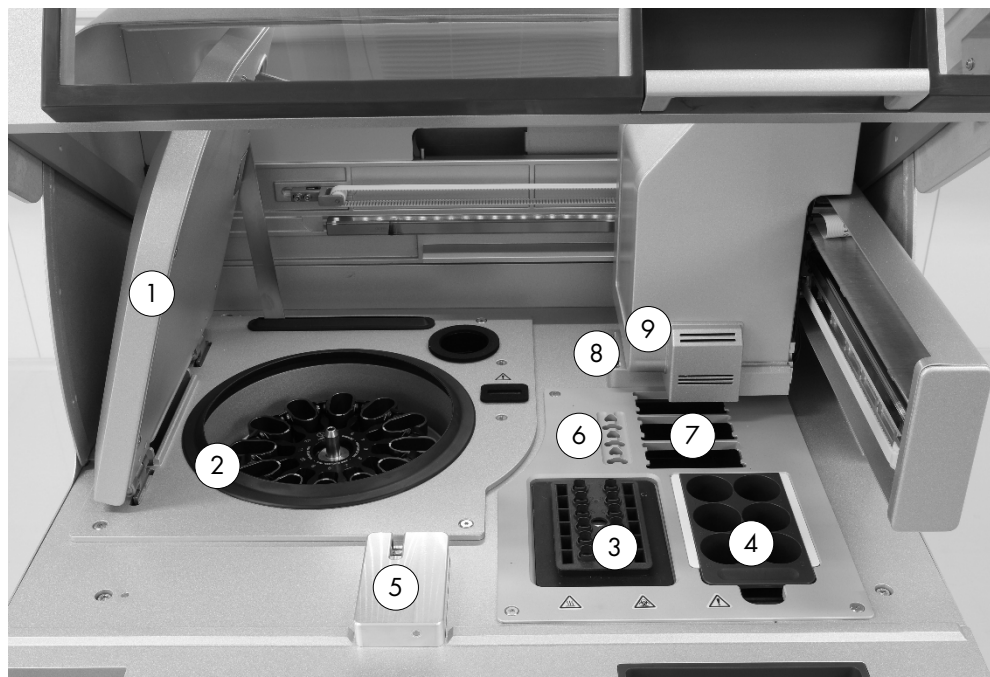


Figura 21. Vista interna do QIAcube Connect MDx.

- | | | | |
|---|--------------------------------------|---|--|
| 1 | Tampa de centrifuga | 6 | Fendas para tubos da microcentrifuga |
| 2 | Centrifuga | 7 | 3 fendas para racks de ponteiras |
| 3 | Agitador | 8 | Fendas para descarte de ponteiras e colunas |
| 4 | Rack de frascos de reagente | 9 | Braço robótico (inclui pipetador de 1 canal, garra, sensor ultrassônico e óptico e LED UV) |
| 5 | Sensor de ponteiras e trava da tampa | | |

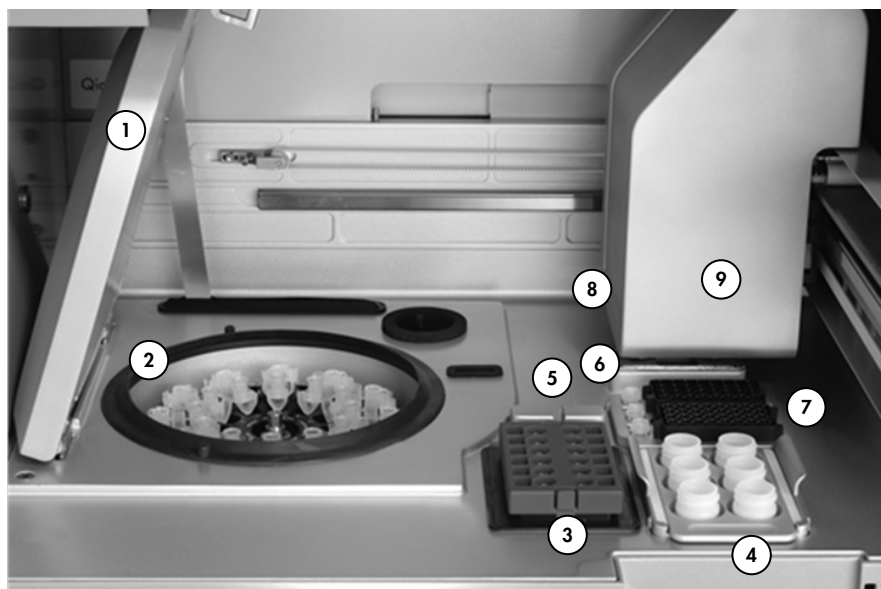


Figura 22. Vista interna do QIAcube.

- | | | | |
|---|-----------------------------|---|---|
| 1 | Tampa de centrífuga | 6 | Fendas para tubos da microcentrifuga |
| 2 | Centrífuga | 7 | Racks de ponteiras |
| 3 | Agitador | 8 | Fendas para descarte de ponteiras e colunas |
| 4 | Rack de frascos de reagente | 9 | Braço robótico |
| 5 | Sensor de ponteiras | | |

Colunas de centrifugação (PRC, PSC), tubos da microcentrífuga (MCT) e material plástico do instrumento QIAcube

Coloque 2 racks de ponteiros preenchidos com ponteiros com filtro de 1000 µl no instrumento QIAcube (consulte as Figuras 21 e 22, páginas 47 e 48). Preencha os racks com ponteiros quando necessário.



Use apenas ponteiros com filtro de 1000 µl projetadas para uso com os instrumentos QIAcube.

Rotule os adaptadores de rotor e os tubos da microcentrífuga (MCT) para cada amostra usando uma caneta permanente. Abra as colunas de centrifugação PAXgene Shredder (PSC) a serem usadas e corte completamente as tampas usando uma tesoura (consulte a Figura 23, página 49).



Para um funcionamento adequado da garra robótica dos instrumentos QIAcube, remova completamente (corte) as tampas e todas as peças plásticas que conectam a tampa às colunas de centrifugação PAXgene Shredder (PSC; consulte a Figura 23). Caso contrário, a garra robótica não consegue segurar as colunas de centrifugação (PSC, PRC) corretamente.

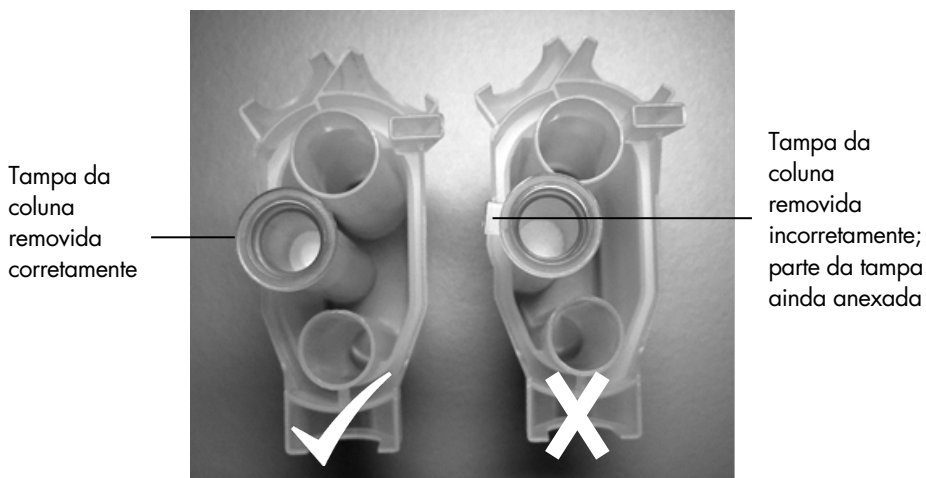


Figura 23. Carregando a coluna de centrifugação PAXgene Shredder (PSC). A coluna de centrifugação PAXgene Shredder (PSC) é carregada na posição central do adaptador de rotor. Corte a tampa antes de carregar a coluna.

Carregue a coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC), a coluna de centrifugação PAXgene Shredder (PSC, sem tampa, consulte a Figura 23, página 49) e o tubo da microcentrífuga rotulado nas posições apropriadas em cada adaptador de rotor rotulado, conforme mostrado na Tabela 4 e na Figura 24.



Certifique-se de que as tampas da coluna de centrifugação (PRC) e do tubo da microcentrífuga (MCT) sejam empurradas até ao fundo das fendas na extremidade do adaptador do rotor. Caso contrário, as tampas se quebrarão durante a centrifugação.

Tabela 4. Material de laboratório no adaptador de rotor

Posição	Reagente	Posição da tampa
1	Coluna de centrifugação PAXgene RNA (vermelho, PRC)	L1
2	Coluna de centrifugação PAXgene Shredder (lilás, PSC) (corte a tampa antes de colocar no adaptador do rotor)	-
3	Tubo da microcentrífuga (MCT)*	L3

* Use os tubos da microcentrífuga (MCT; 1,5 ml) incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.

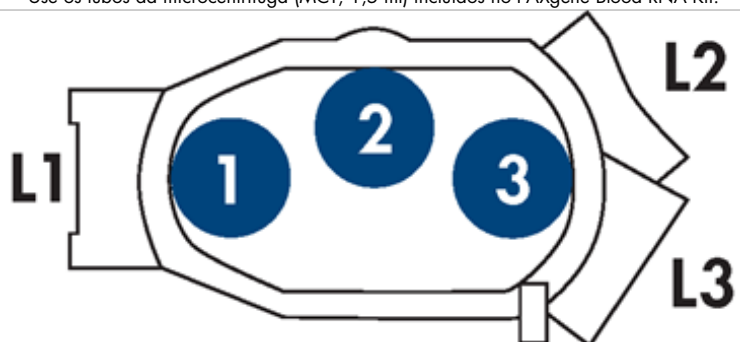


Figura 24. Posições no adaptador de rotor. O adaptador de rotor tem três posições de tubo (1–3) e três posições de tampa (L1–L3).

Carregando a centrífuga

Carregue os adaptadores de rotor montados nos recipientes da centrífuga, conforme mostrado na Figura 25 abaixo.



Se processar menos de 12 amostras, certifique-se de carregar o rotor de centrífuga balanceado radialmente (consulte a Figura 26, página 52). Todos os recipientes da centrífuga devem estar montados antes de iniciar uma execução de protocolo, mesmo que menos de 12 amostras sejam processadas. Não é possível processar uma única amostra ou 11 amostras.



Figura 25. Carregando a centrífuga nos instrumentos QIAcube. Carregue os adaptadores de rotor montados nos recipientes da centrífuga (QIAcube Connect MDx mostrado como exemplo).

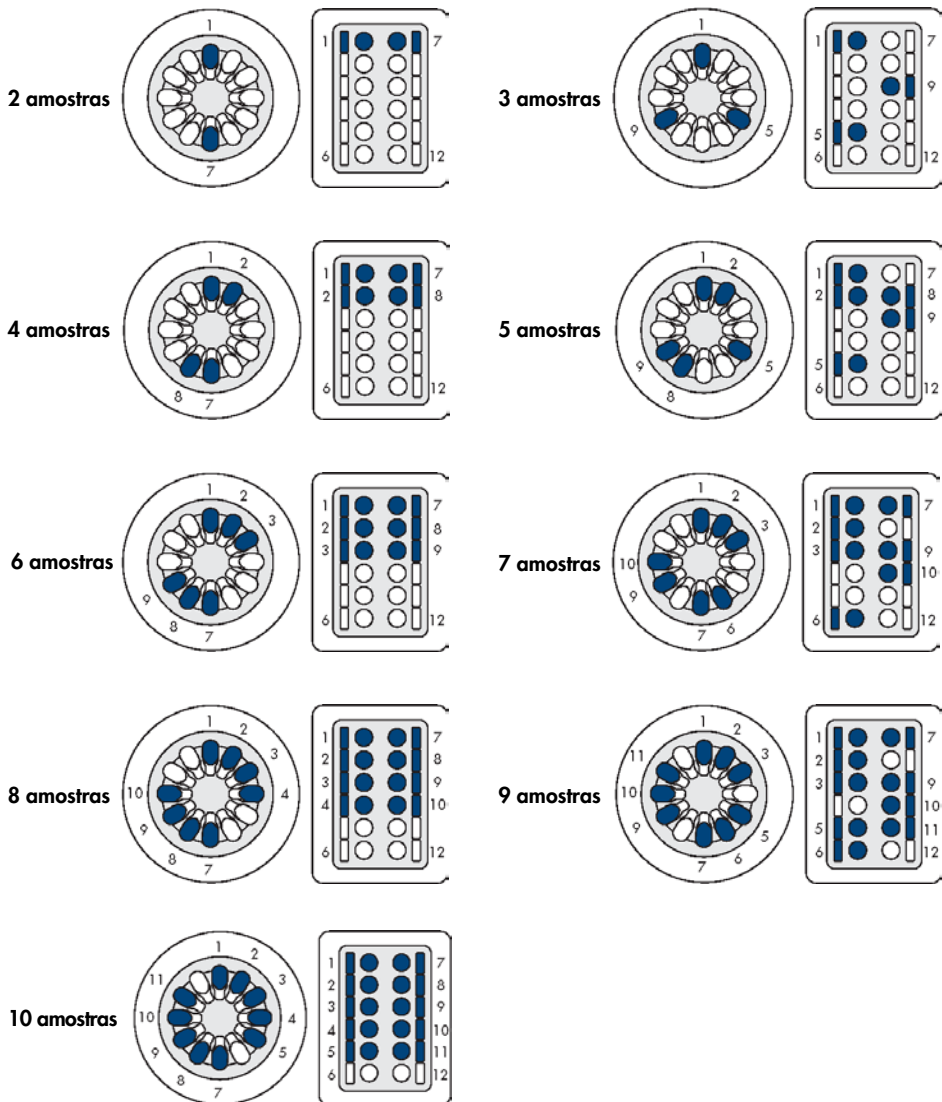


Figura 26. Carregando a centrífuga e o agitador. As posições da centrífuga e do agitador são mostradas para o processamento de duas (2) a dez (10) amostras. Não é possível processar uma (1) amostra ou 11 amostras. Para processar 12 amostras, todas as posições da centrífuga e do agitador devem ser carregadas (imagem não mostrada).

Tubos de processamento (PT)

Remova quaisquer tubos de processamento (PT) deixados nas fendas para tubos da microcentrífuga das execuções anteriores (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 21, página 47, QIAcube: consulte a Figura 22, página 48). Encha 3 tubos de processamento (PT) com a quantidade de reagentes indicada na Tabela 5 de acordo com o número de amostras na execução.

Para a mistura de incubação com DNase I, pipete o volume indicado de tampão de digestão de DNA (RDD) em um tubo de processamento (PT) e adicione o volume indicado de solução de estoque de DNase I (RNFD). Misture pipetando suavemente a mistura completa para cima e para baixo 3 vezes usando uma ponteira de pipeta de 1000 µl.

Use os tubos de processamento de 2 ml (PT) incluídos no PAXgene Blood RNA Kit. Rotule os tubos claramente com os nomes dos reagentes e coloque-os na posição apropriada nas fendas para tubos da microcentrífuga, conforme indicado na Tabela 6 (página 54).



A DNase I (RNFD) é especialmente sensível à desnaturação física. Misture apenas por pipetagem, usando as ponteiras de pipeta com orifício largo para reduzir o cisalhamento. Não agite em vórtex.



Certifique-se de pipetar somente o volume requerido, conforme indicado na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5. Volume de reagente necessário no processamento de tubos das fendas para tubos da microcentrífuga.

Número de amostras	Volume de reagente para o número indicado de amostras (µl)		
	Proteinase K (PK)	Mistura de incubação de DNase I	Tampão de eluição (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1177

Tabela 6. Fendas para tubos da microcentrífuga

	Posição		
	A	B	C
Conteúdo	Proteinase K	Mistura de incubação de DNase I	Tampão de eluição (BR5)
Vaso	Tubo de processamento (PT)*	Tubo de processamento (PT)*	Tubo de processamento (PT)*

*Use os tubos de processamento de 2 ml incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.

Protocolo: purificação manual de RNA total de sangue total humano coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Pontos importantes antes de começar

- Certifique-se de que a caixa do kit esteja intacta e sem danos e que os tampões não vazaram. Não use um kit que tenha sido danificado.
- Ao usar uma pipeta, certifique-se de que esteja ajustada no volume correto e que o líquido seja cuidadosa e completamente aspirado e dispensado.
- Para evitar a transferência de amostras para o tubo ou coluna de centrifugação incorreta, certifique-se de que todos os tubos e colunas de rotação estejam devidamente rotulados usando uma caneta permanente. Rotule a tampa e o corpo de cada tubo (PT, MCT). Para colunas de centrifugação, rotule o corpo do respectivo tubo de processamento (PT). Feche cada tubo ou coluna de centrifugação depois que o líquido seja transferido para ele/ela.
- Derramamento de amostras e tampões durante o procedimento pode reduzir o rendimento e a pureza do RNA.
- Salvo indicação em contrário, todas as etapas deste protocolo, incluindo as de centrifugação, devem ser realizadas à temperatura ambiente (15–25 °C).

Devido à sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácido nucleico, as seguintes precauções são necessárias ao manusear amostras para evitar a contaminação cruzada:

- Pipete cuidadosamente a amostra na coluna de centrifugação (PRC, PSC) sem umedecer a borda da coluna.
- Troque sempre as ponteiros das pipetas entre as transferências de líquidos. Use ponteiros de pipetas com barreira contra aerossóis.

- Evite tocar na membrana da coluna de centrifugação (PRC, PSC) com a ponteira da pipeta.
- Após agitar em vórtex ou aquecer um tubo da microcentrífuga (MCT), centrifugue-o brevemente para remover gotas do interior da tampa.
- Use luvas durante todo o procedimento. Em caso de contato entre as luvas e a amostra, troque as luvas imediatamente.
- Feche a coluna de centrifugação (PRC, PSC) antes de colocá-la na microcentrífuga. Centrifugue conforme descrito no procedimento.
- Abra apenas uma coluna de centrifugação (PRC, PSC) por vez e tenha cuidado para evitar gerar aerossóis.
- Para um processamento paralelo eficiente de múltiplas amostras, preencha um rack com tubos de processamento (PT) para os quais as colunas de centrifugação (PRC, PSC) podem ser transferidas após a centrifugação. Descarte os tubos de processamento (PT) usados que contêm fluxo de passagem e coloque os tubos de processamento (PT) novos que contêm colunas de centrifugação (PRC, PSC) diretamente na microcentrífuga.

○ que fazer antes de começar

- O sangue deve ser coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) de acordo com as instruções do *Manual de PAXgene Blood RNA Tube*. Se necessário, consulte o Apêndice C (página 74) para obter recomendações sobre o manuseio dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Certifique-se de que os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sejam incubados por, pelo menos, 2 horas à temperatura ambiente após a coleta de sangue para garantir a lise completa das células sanguíneas. A incubação do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante a noite pode aumentar os rendimentos. Se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tiver sido armazenado a 2–8 °C, –20 °C ou –70 °C após a coleta de sangue, primeiramente deixe que fique à temperatura ambiente e, em seguida, armazene-o à temperatura ambiente por 2 horas antes de iniciar a procedimento.
- Leia as informações de segurança na página 10.
- Leia as orientações sobre como manusear RNA (Apêndice A, página 71).

- Certifique-se de que os instrumentos, tais como pipetas e o agitador-incubador, tenham sido verificados e calibrados regularmente de acordo com as recomendações do fabricante.
- Um agitador-incubador é necessário nas etapas 5 e 20. Ajuste a temperatura do agitador-incubador para 55 °C.
- O tampão de ligação (BR2) pode formar um precipitado após o armazenamento. Se necessário, aqueça até 37 °C para dissolver.
- O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido como um concentrado. Antes de usar pela primeira vez, adicione 4 volumes de etanol (96–100%, grau de pureza p.a.), conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.
- Se estiver usando o RNase-Free DNase Set pela primeira vez, prepare a solução de estoque de DNase I. Dissolva a DNase I sólida (RNFD; 1500 unidades Kunitz) * em 550 µl do tampão de ressuspensão de DNase (DRB) fornecido com o conjunto. Tome cuidado para que nenhuma DNase I (RNFD) seja perdida ao abrir o frasco. Não agite em vórtex a DNase I reconstituída (RNFD). A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser realizada invertendo cuidadosamente o frasco.
- Os dados atuais mostram que a DNase I reconstituída (RNFD) pode ser armazenada a 2–8 °C por até 6 semanas. Para armazenamento a longo prazo de DNase I (RNFD), remova a solução de estoque do frasco de vidro, divida-a em alíquotas de uso único (use os tubos da microcentrifuga [MCT] de 1,5 ml fornecidos com o kit; há tubos suficientes para 5 alíquotas) e armazene a –20 °C por até 9 meses. As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas entre 2 e 8 °C por até 6 semanas. Depois de descongelar as alíquotas, não volte a congelá-las.
- Ao reconstituir a DNase I (RNFD) e preparar alíquotas da mesma, certifique-se de seguir as diretrizes para o manuseio de RNA (Apêndice A, página 71).

* As unidades Kunitz são as unidades comumente usadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que causa um aumento em A_{260} de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH de 5,0, com DNA altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

Procedimento

1. Centrifugue o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) por 10 minutos a 3000–5000 x g usando um rotor basculante.



Certifique-se de que a amostra de sangue foi incubada no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 horas à temperatura ambiente (15–25 °C) para obter a lise completa das células sanguíneas.



O rotor deve conter adaptadores de tubo para tubos de fundo redondo. Se outros tipos de adaptadores de tubo forem usados, os tubos podem quebrar durante a centrifugação.

2. Remova o sobrenadante por meio de decantação ou pipetagem. Adicione 4 ml de água sem RNase (RNFW) ao pellet e feche o tubo usando um novo fecho secundário BD Hemogard (fornecido com o kit).

Se o sobrenadante for decantado, tome cuidado para não perturbar o pellet e seque a borda do tubo com uma toalha de papel limpa.

3. Agite em vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido e centrifugue por 10 minutos a 3000–5000 x g usando um rotor basculante. Remova e descarte todo o sobrenadante.

Restarão pequenos detritos no sobrenadante após a agitação em vórtex, mas, antes da centrifugação, não afetarão o procedimento.



A remoção incompleta do sobrenadante inibirá a lise e diluirá o lisado, o que afeta as condições de ligação do RNA à membrana PAXgene.

4. Adicione 350 µl de tampão de ressuspensão (BR1) e agite em vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido.

5. Pipete a amostra em um tubo da microcentrifuga (MCT) de 1,5 ml. Adicione 300 µl de tampão de ligação (BR2) e 40 µl de proteinase K (PK). Misture em vórtex por 5 segundos e incube por 10 minutos a 55 °C usando um agitador-incubador a 400–1400 rpm. Após a incubação, ajuste a temperatura do agitador-incubador para 65 °C (para a etapa 20).



Não misture tampão de ligação (BR2) e proteinase K (PK) antes de adicioná-los à amostra.

- Pipete o lisado diretamente em uma coluna de centrifugação PAXgene Shredder (PSC; lilás) colocada em um tubo de processamento (PT) de 2 ml e centrifugue durante 3 minutos à velocidade máxima (mas não exceda 20.000 x g).



Pipete cuidadosamente o lisado na coluna de centrifugação (PSC) e verifique visualmente se o lisado foi completamente transferido para a coluna de centrifugação (PSC).

Para evitar danos nas colunas (PSC) e nos tubos (PT), não exceda 20.000 x g.



Algumas amostras podem fluir através da coluna de centrifugação PAXgene Shredder (PSC) sem centrifugação. Isso se deve à baixa viscosidade de algumas amostras e não deve ser tomado como uma indicação de falha do produto.

- Transfira cuidadosamente todo o sobrenadante da fração de fluxo de passagem para um novo tubo da microcentrífuga (MCT) de 1,5 ml, sem perturbar o pellet no tubo de processamento.
- Adicione 350 µl de etanol (96–100%, grau de pureza p.a.). Misture agitando em vórtex e centrifugue rapidamente (1–2 segundos a 500–1000 x g) para remover gotas do interior da tampa do tubo.



A duração da centrifugação não deve exceder 1–2 segundos, pois isso pode resultar na peletização de ácidos nucleicos e redução dos rendimentos de RNA total.

- Pipete 700 µl de amostra na coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC; vermelho) colocada em um tubo de processamento (PT) de 2 ml e centrifugue por 1 minuto a 8000–20.000 x g. Coloque a coluna de centrifugação (PRC) em um novo tubo de processamento (PT) de 2 ml e descarte o tubo de processamento (PT) antigo que contém o fluxo de passagem.
- Pipete a amostra restante na coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC) e centrifugue por 1 minuto a 8000–20.000 x g. Coloque a coluna de centrifugação (PRC) em um novo tubo de processamento (PT) de 2 ml e descarte o tubo de processamento (PT) antigo que contém o fluxo de passagem.



Pipete cuidadosamente a amostra na coluna de centrifugação (PRC) e verifique visualmente se a amostra foi completamente transferida para a coluna de centrifugação (PRC).

- Pipete 350 µl de tampão de lavagem 1 (BR3) na coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC). Centrifugue por 1 minuto a 8000–20.000 x g. Coloque a coluna de centrifugação (PRC) em um novo tubo de processamento de 2 ml (PT) e descarte o tubo de processamento (PT) antigo que contém o fluxo de passagem.

12. Adicione 10 µl de solução de estoque de DNase I (RNFD) a 70 µl de tampão de digestão de DNA (RDD) em um tubo da microcentrífuga (MCT) de 1,5 ml. Misture suavemente sacudindo o tubo e centrifugue brevemente para coletar o líquido residual das laterais do tubo.

Se processar, por exemplo, 10 amostras, adicione 100 µl de solução de estoque de DNase I (RNFD) a 700 µl de tampão de digestão de DNA (RDD). Use os tubos da microcentrífuga (MCT) de 1,5 ml fornecidos com o kit.



A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser realizada agitando suavemente o tubo. Não agite em vórtex.

13. Pipete a mistura de incubação de DNase I (RNFD) (80 µl) diretamente sobre a membrana da coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC) e coloque na bancada (20–30 °C) por 15 minutos.



Certifique-se de que a mistura de incubação de DNase I (RNFD) seja colocada diretamente na membrana. A digestão de DNase ficará incompleta se parte da mistura for aplicada e permanecer nas paredes ou no O-ring da coluna de centrifugação (PRC).

14. Pipete 350 µl de tampão de lavagem 1 (BR3) na coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC) e centrifugue durante 1 minuto a 8000–20.000 x g. Coloque a coluna de centrifugação (PRC) em um novo tubo de processamento (PT) de 2 ml e descarte o tubo de processamento (PT) antigo que contém o fluxo de passagem.

15. Pipete 500 µl de tampão de lavagem 2 (BR4) na coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC) e centrifugue durante 1 minuto a 8000–20.000 x g. Coloque a coluna de centrifugação (PRC) em um novo tubo de processamento (PT) de 2 ml e descarte o tubo de processamento (PT) antigo que contém o fluxo de passagem.



O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido como um concentrado. Certifique-se de que o etanol seja adicionado ao tampão de lavagem 2 (BR4) antes do uso (consulte "O que fazer antes de começar", página 56).

16. Adicione mais 500 µl de tampão de lavagem 2 (BR4) à coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC). Centrifugue por 3 minutos a 8000–20.000 x g.

17. Descarte o tubo de processamento (PT) que contém o fluxo de passagem e coloque a coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC) em um novo tubo de processamento (PT) de 2 ml. Centrifugue por 1 minuto a 8000–20.000 x g.

18. Descarte o tubo de processamento (PT) contendo o fluxo de passagem. Coloque a coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC) em um tubo da microcentrífuga (MCT) de 1,5 ml e pipete 40 µl de tampão de eluição (BR5) diretamente sobre a membrana da coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC). Centrifugue por 1 minuto a 8000–20.000 x g para eluir o RNA.

É importante embeber toda a membrana com tampão de eluição (BR5) para obter a máxima eficiência de eluição.

19. Repita a etapa de eluição (etapa 18) conforme descrito, usando 40 µl de tampão de eluição (BR5) e o mesmo tubo da microcentrífuga (MCT).

20. Incube o eluato por 5 minutos a 65 °C no agitador-incubador (da etapa 5), sem agitar. Após a incubação, resfrie imediatamente com gelo.

Esta incubação a 65 °C desnatura o RNA para aplicações a jusante. Não exceda o tempo de incubação ou a temperatura.

21. Se as amostras de RNA não forem usadas imediatamente, armazene a –20 °C ou –70 °C.

Como o RNA permanece desnaturado após repetidos congelamentos e descongelamentos, não é necessário repetir a incubação a 65 °C. Se usar as amostras de RNA em um ensaio de diagnóstico, siga as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para uma quantificação precisa do RNA por medição da absorbância a 260 nm, recomendamos a diluição de amostras com 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. * Diluir a amostra em água sem RNase pode levar a valores imprecisamente baixos.

Zere o espectrofotômetro usando um branco consistindo na mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampão Tris-HCl das amostras a serem medidas. O tampão de eluição (BR5) apresenta uma absorbância alta a 220 nm, o que pode provocar níveis elevados de absorbância em segundo plano, caso o espectrômetro não seja devidamente zerado.



Para quantificação em tampão Tris-HCl, use a relação $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Consulte o Apêndice B, página 72.

* Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Protocolo: purificação automatizada de RNA total de sangue total humano coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Pontos importantes antes de começar

- Certifique-se de que a caixa do kit esteja intacta e sem danos e que os tampões não vazaram. Não use um kit que tenha sido danificado.
- Ao usar uma pipeta, certifique-se de que esteja ajustada no volume correto e que o líquido seja cuidadosa e completamente aspirado e dispensado.
- Para evitar a transferência de amostras para os tubos e consumíveis plásticos incorretos, certifique-se de que todos os tubos de processamento (PT), tubos da microcentrífuga (MCT) e adaptadores de rotor estejam devidamente rotulados usando uma caneta permanente. Rotule a tampa e o corpo de cada tubo da microcentrífuga (MCT), o corpo de cada tubo de processamento (PT) e a parede externa de cada adaptador de rotor.
- Derramamento de amostras e tampões durante o procedimento pode reduzir o rendimento e a pureza do RNA.
- Salvo indicação em contrário, todas as etapas deste protocolo, incluindo as de centrifugação, devem ser realizadas à temperatura ambiente (15–25 °C).

Devido à sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácido nucleico, as seguintes precauções são necessárias ao manusear amostras para evitar a contaminação cruzada:

- Pipete com cuidado a amostra no tubo de processamento (PT), no fundo do tubo, sem umedecer a borda do tubo.
- Troque sempre as ponteiros das pipetas entre as transferências de líquidos. Use ponteiros de pipetas com barreira contra aerossóis.

- Evite tocar na membrana da coluna de centrifugação (PRC, PSC) com a ponteira da pipeta.
- Após agitar em vórtex ou aquecer um tubo da microcentrífuga (MCT), centrifugue-o brevemente para remover gotas do interior da tampa.
- Use luvas durante todo o procedimento. Em caso de contato entre as luvas e a amostra, troque as luvas imediatamente.

○ que fazer antes de começar

- O sangue deve ser coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) de acordo com as instruções do *Manual de PAXgene Blood RNA Tube*. Se necessário, consulte o Apêndice C (página 74) para obter recomendações sobre o manuseio dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Certifique-se de que os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sejam incubados por, pelo menos, 2 horas à temperatura ambiente após a coleta de sangue para garantir a lise completa das células sanguíneas. A incubação do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante a noite pode aumentar os rendimentos. Se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tiver sido armazenado a 2–8 °C, –20 °C ou –70 °C após a coleta de sangue, primeiramente deixe que fique à temperatura ambiente e, em seguida, armazene-o à temperatura ambiente por 2 horas antes de iniciar a procedimento.
- Leia as informações de segurança na página 10.
- Leia "Notas importantes", página 41.
- Leia as orientações sobre como manusear RNA (Apêndice A, página 71).
- Leia o Manual do usuário do instrumento QIAcube apropriado e qualquer informação adicional fornecida com o instrumento QIAcube, prestando muita atenção às informações de segurança.
- Certifique-se de que os dispositivos e instrumentos, tais como pipetas e o instrumento QIAcube, tenham sido verificados e calibrados regularmente de acordo com as recomendações do fabricante.
- O tampão de ligação (BR2) pode formar um precipitado após o armazenamento. Se necessário, aqueça até 37 °C para dissolver.

- O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido como um concentrado. Antes de usar pela primeira vez, adicione o volume apropriado de etanol (96–100%, grau de pureza p.a.), conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.
- Se estiver usando o RNase-Free DNase Set pela primeira vez, prepare a solução de estoque de DNase I. Dissolva a DNase I sólida (RNFD; 1500 unidades Kunitz)* em 550 µl do tampão de ressuspensão de DNase (DRB) fornecido com o conjunto. Tome cuidado para que nenhuma DNase I (RNFD) seja perdida ao abrir o frasco. Não agite em vórtex a DNase I reconstituída (RNFD). A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser realizada invertendo cuidadosamente o frasco.
- Os dados atuais mostram que a DNase I reconstituída (RNFD) pode ser armazenada a 2–8 °C por até 6 semanas. Para armazenamento a longo prazo de DNase I (RNFD), remova a solução de estoque do frasco de vidro, divida-a em alíquotas de uso único (use os tubos da microcentrífuga [MCT] de 1,5 ml fornecidos com o kit; há tubos suficientes para 5 alíquotas) e armazene a –20 °C por até 9 meses. As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas entre 2 e 8 °C por até 6 semanas. Depois de descongelar as alíquotas, não volte a congelá-las.
- Ao reconstituir a DNase I (RNFD) e preparar alíquotas da mesma, certifique-se de seguir as diretrizes para o manuseio de RNA (Apêndice A, página 71).
- Instale o adaptador de agitador correto (incluído com os instrumentos QIAcube; use o adaptador para tubos com trava de segurança de 2 ml, marcado com um "2") e coloque o rack do agitador na parte superior do adaptador.
- Verifique a gaveta "Waste" (Resíduos) e esvazie-a, se necessário.
- Instale os protocolos relacionados, caso isso ainda não tenha sido feito para execuções anteriores. O QIAcube Connect MDx requer que todos os protocolos encontrados no arquivo zip relacionado sejam baixados. Para o QIAcube clássico, instale os protocolos "PAXgene Blood RNA — Parte A" e "PAXgene Blood RNA — Parte B". Consulte "Instalando protocolos nos instrumentos QIAcube ", página 44.

* As unidades Kunitz são as unidades comumente usadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que causa um aumento em A_{260} de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH de 5,0, com DNA altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

Procedimento

1. Feche a tampa do instrumento QIAcube e ligue o instrumento QIAcube com o interruptor de alimentação (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 42; QIAcube: consulte a Figura 18, página 43).

É emitido um sinal sonoro e a tela de inicialização é exibida. Os instrumentos realizam automaticamente testes de inicialização.

2. Abra a porta do instrumento QIAcube e carregue os reagentes e materiais plásticos necessários no instrumento QIAcube. Consulte "Carregando os instrumentos QIAcube", página 45.

Para economizar tempo, o carregamento pode ser realizado durante uma ou ambas as etapas de centrifugação de 10 minutos (etapas 3 e 5) seguintes.

3. Centrifugue o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) por 10 minutos a 3000–5000 x g usando um rotor basculante.



Certifique-se de que a amostra de sangue foi incubada no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 horas à temperatura ambiente (15–25 °C) para obter a lise completa das células sanguíneas.



O rotor deve conter adaptadores de tubo para tubos de fundo redondo. Se outros tipos de adaptadores de tubo forem usados, os tubos podem quebrar durante a centrifugação.

4. Remova o sobrenadante por meio de decantação ou pipetagem. Adicione 4 ml de água sem RNase (RNFW) ao pellet e feche o tubo usando um novo fecho secundário BD Hemogard (fornecido com o kit).




Se o sobrenadante for decantado, tome cuidado para não perturbar o pellet e seque a borda do tubo com uma toalha de papel limpa.

5. Agite em vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido e centrifugue por 10 minutos a 3000–5000 x g usando um rotor basculante. Remova e descarte todo o sobrenadante.



Restarão pequenos detritos no sobrenadante após a agitação em vórtex, mas, antes da centrifugação, não afetarão o procedimento.



A remoção incompleta do sobrenadante inibirá a lise e diluirá o lisado, o que afeta as condições de ligação do RNA à membrana PAXgene.

6. Adicione 350 µl de tampão de ressuspensão (BR1) e agite em vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido.
7. Pipete a amostra em um tubo de processamento (PT) de 2 ml.
 -  Use os tubos de processamento de 2 ml (PT) incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.
8. Carregue os tubos de processamento abertos (PT) contendo a amostra no agitador do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 21, página 47; QIAcube: consulte a Figura 22, página 48). As posições de amostra são numeradas para facilitar o carregamento. Insira os plugues do rack do agitador (incluídos com os instrumentos QIAcube) nas fendas na borda do rack do agitador ao lado de cada tubo de processamento. Isso permite a detecção de amostras durante a verificação de carga.
 -  Certifique-se de que o adaptador de agitador correto (adaptador de agitador, 2 ml, tubos com trava de segurança, marcados com um "2", incluídos com os instrumentos QIAcube) esteja instalado.
 -  Se processar menos de 12 amostras, certifique-se de carregar o rack do agitador conforme mostrado na Figura 26, página 52. Não é possível processar uma (1) amostra ou 11 amostras. Os números das posições no rack do agitador correspondem aos números das posições na centrífuga.
9. Feche a tampa do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 42; QIAcube: consulte a Figura 18, página 43).
10. Selecione o protocolo "PAXgene Blood RNA — Parte A" e inicie o protocolo.

Siga as instruções dadas na tela sensível ao toque do instrumento QIAcube.

 -  Certifique-se de que ambas as partes do programa (parte A e parte B) estejam instaladas no QIAcube (consulte "Instalando protocolos nos instrumentos QIAcube", página 44).
 -  Os instrumentos QIAcube farão verificações de carga para amostras, ponteiros, adaptadores de rotor e frascos de reagentes.
11. Após o término do protocolo "PAXgene Blood RNA — Parte A", abra a tampa do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 42; QIAcube: consulte a Figura 18, página 43). Remova e descarte as colunas de centrifugação PAXgene RNA (PRC) dos adaptadores de rotor e os tubos de processamento (PT) vazios do agitador.



Durante a execução, as colunas de centrifugação são transferidas da posição 1 (posição de tampa L1) para a posição 3 (posição de tampa L2) do adaptador de rotor pelo instrumento (consulte a Figura 24, página 50).

12. Feche as tampas de todos os tubos da microcentrífuga (MCT) de 1,5 ml contendo o RNA purificado nos adaptadores de rotor (posição 3, posição de tampa L3; consulte a Figura 24, página 50). Transfira os tubos da microcentrífuga de 1,5 ml (MCT) para o adaptador do agitador do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 21, página 47; QIAcube: consulte a Figura 22, página 48).

13. Feche a tampa do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 42; QIAcube: consulte a Figura 18, página 43).

14. Selecione o protocolo "PAXgene Blood RNA — Parte B" e inicie o protocolo.

Siga as instruções exibidas na tela sensível ao toque do instrumento QIAcube.



Este programa incuba as amostras a 65 °C e desnatura o RNA para aplicações a jusante. Mesmo que a aplicação a jusante inclua uma etapa de desnaturação por calor, não omita essa etapa. A desnaturação de RNA suficiente é essencial para a máxima eficiência em aplicações a jusante.

15. Após o término do programa "PAXgene Blood RNA — Parte B", abra a tampa do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte Figura 17, página 42; QIAcube: consulte Figura 18, página 43). Coloque imediatamente os tubos da microcentrífuga (MCT) contendo o RNA purificado no gelo.



AVISO: Superfície quente. O agitador pode atingir temperaturas de até 70 °C. Evite tocá-lo enquanto estiver quente.



Não deixe o RNA purificado permanecer no instrumento QIAcube. Como as amostras não são resfriadas, o RNA purificado pode ser degradado. Por conseguinte, não são recomendadas execuções de preparação de amostra não assistidas durante a noite.

16. Se as amostras de RNA não forem usadas imediatamente, armazene a -20 °C ou -70 °C.

Como o RNA permanece desnaturado após congelado e descongelado repetidamente, não é necessário repetir o protocolo de incubação por meio de calor ("PAXgene Blood RNA — Parte B"). Se usar as amostras de RNA em um ensaio de diagnóstico, siga as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para uma quantificação precisa do RNA por medição da absorbância a 260 nm, recomendamos a diluição de amostras em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. * Diluir a amostra em água sem RNase pode levar a valores imprecisamente baixos.

Zere o espectrofotômetro usando um branco consistindo na mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampão Tris-HCl das amostras a serem medidas. O tampão de eluição (BR5) apresenta uma absorbância alta a 220 nm, o que pode provocar níveis elevados de absorbância em segundo plano, caso o espectrômetro não seja devidamente zerado.



Para quantificação em tampão Tris-HCl, use a relação

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Consulte o Apêndice B, página 72.

17. Remova o rack de frascos de reagente da mesa de trabalho do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 21, página 47; QIAcube: consulte a Figura 22, página 48) e feche todos os frascos com as tampas devidamente rotuladas. O tampão em frascos pode ser armazenado à temperatura ambiente (15–25 °C) durante o período máximo de 3 meses. Remova e descarte os reagentes restantes nos tubos de processamento (PT) nas fendas para tubos da microcentrifuga do instrumento QIAcube. Remova e descarte os adaptadores de rotor da centrifuga. Esvazie a gaveta de resíduos do QIAcube Connect MDx (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 42; QIAcube: consulte a Figura 18, página 43). Feche a tampa do instrumento QIAcube e desligue o instrumento com o interruptor de alimentação.

* Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Guia de solução de problemas

Este guia de solução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte a página de perguntas frequentes (Frequently Asked Questions, FAQ) no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre disponíveis para responder a quaisquer questões que você possa ter sobre as informações e os protocolos contidos neste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para obter informações de contato, consulte a última página ou visite www.qiagen.com).

Comentários e sugestões

RNA degradado

Contaminação por RNase



Tenha cuidado para não introduzir quaisquer RNases nos reagentes durante o procedimento ou manuseio posterior (consulte o Apêndice A, página 71).

Baixo rendimento de RNA

a) Menos de 2,5 ml de sangue coletado no PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Certifique-se de que coleta 2,5 ml de sangue no PAXgene Blood RNA Tube (BRT; consulte o *Manual de PAXgene Blood RNA Tube*).

b) Concentração de RNA medida em água



O RNA deve ser diluído em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5*, para uma quantificação precisa (consulte o Apêndice B, página 72).



c) Resíduos celulares transferidos para a coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC) nas etapas 9 e 10 do protocolo manual





Evite a transferência de partículas grandes ao pipetar o sobrenadante na etapa 7 do protocolo manual (a transferência de pequenos detritos não afetará o procedimento).

* Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Comentários e sugestões

- d) Sobrenadante não completamente removido na etapa 3  Assegure-se de que todo o sobrenadante seja removido. Se o sobrenadante for decantado, remova as gotas da borda do PAXgene Blood RNA Tube (BRT), passando por uma toalha de papel. Tome as devidas precauções para evitar a contaminação cruzada.
- e) Após a coleta no PAXgene Blood RNA Tube (BRT), o sangue é incubado por menos de 2 horas  Incube o sangue no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) por, pelo menos, 2 horas após a coleta.

Valor A_{260}/A_{280} baixo

- a) Água usada na diluição de RNA para a medição de A_{260}/A_{280}  Use 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, para diluir o RNA antes de medir a pureza* (consulte o Apêndice B, página 72).
- b) Espectrofotômetro zerado incorretamente  Zere o espectrofotômetro usando um branco consistindo na mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, das amostras a serem medidas. O tampão de eluição (BR5) apresenta uma absorvância alta a 220 nm, o que pode provocar níveis elevados de absorvância em segundo plano, caso o espectrômetro não seja devidamente zerado.

Mau funcionamento do instrumento

Os instrumentos QIAcube não funcionam corretamente

Leia o manual do usuário do QIAcube apropriado, prestando muita atenção à seção de solução de problemas. Certifique-se de que a manutenção do instrumento QIAcube tenha sido devidamente realizada, conforme descrito no manual do usuário.

* 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.

Anexo A: Observações gerais sobre o manuseio de RNA

Manuseio de RNA



As ribonucleases (RNases) são enzimas muito estáveis e ativas que, geralmente, não precisam de cofatores para funcionar. Como as RNases são difíceis de desativar e até uma quantidade mínima é suficiente para degradar o RNA, não use utensílios de plástico ou de vidro sem primeiro eliminar a possível contaminação por RNases. Aconselha-se extrema precaução para evitar introduzir inadvertidamente RNases na amostra de RNA durante ou depois do procedimento de purificação. Para criar e manter um ambiente sem RNase, deverão ser tomadas precauções durante o pré-tratamento e o uso de vasos e soluções descartáveis e não descartáveis ao trabalhar com RNA.

Manuseio geral



Use sempre uma técnica asséptica e microbiológica adequada ao trabalhar com RNA. Partículas das mãos e de pó carregam bactérias e mofo e são as fontes mais comuns de contaminação por RNase. Sempre use luvas de látex ou vinil durante o manuseio de reagentes e amostras de RNA para evitar contaminações por RNase por superfície da pele ou por poeira do equipamento de laboratório. Troque as luvas com frequência e mantenha os tubos fechados, sempre que possível. Mantenha o RNA purificado no gelo, quando as alíquotas forem pipetadas para aplicações descendentes.

Protocolos para a remoção de contaminação por RNase de vidros e soluções podem ser encontrados em guias gerais de biologia molecular, como Sambrook, J. e Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Anexo B: Quantificação e determinação da qualidade de RNA total

Quantificação de RNA

A concentração de RNA deve ser determinada através da medição da absorbância a 260 nm (A_{260}) em um espectrofotômetro. Para garantir a significância, as leituras devem estar no intervalo linear do espectrofotômetro. Uma absorbância de 1 unidade a 260 nm corresponde a 44 µg de RNA por ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Esta relação é válida apenas para medições em 10 mM Tris-HCl, pH 7,5,*. Portanto, se for necessário diluir a amostra de RNA, isso deve ser feito em 10 mM de Tris-HCl. Conforme discutido abaixo (consulte "Pureza do RNA", página 73), a relação entre os valores de absorbância a 260 e 280 nm dá uma estimativa da pureza do RNA. Quando medir amostras de RNA, certifique-se de que as cubetas estejam isentas de RNase. Zere o espectrofotômetro usando um branco consistindo na mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampão Tris-HCl das amostras a serem medidas. O tampão de eluição (BR5) apresenta uma absorbância alta a 220 nm, o que pode provocar níveis elevados de absorbância em segundo plano, caso o espectrômetro não seja devidamente zerado. Um exemplo do cálculo envolvido na quantificação de RNA é mostrado abaixo.

Volume da amostra de RNA = 80 µl

Diluição (1/15) = 10 µl de amostra de RNA + 140 µl de 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5

Meça a absorbância da amostra diluída em uma cubeta (sem RNase).

A_{260} = 0,3

Concentração de amostra = $44 \times A_{260} \times \text{fator de diluição}$

= $44 \times 0,3 \times 15$

= 198 µg/ml

Rendimento total = concentração x volume de amostra em mililitros

= $198 \text{ µg/ml} \times 0,08 \text{ ml}$

= 15,8 µg RNA

* Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Pureza do RNA

A relação das leituras a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) fornece uma estimativa da pureza do RNA em relação aos contaminantes que absorvem em UV, como a proteína. No entanto, a relação de A_{260}/A_{280} é influenciada consideravelmente pelo pH. Um pH mais baixo resulta em uma menor relação de A_{260}/A_{280} e em sensibilidade reduzida à contaminação proteica.* Para valores precisos, recomendamos a medição da absorbância em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. O RNA puro tem uma relação de A_{260}/A_{280} de 1,8–2,2 em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. Zere o espectrofotômetro usando um branco consistindo na mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampão Tris-HCl das amostras a serem medidas. O tampão de eluição (BR5) apresenta uma absorbância alta a 220 nm, o que pode provocar níveis elevados de absorbância em segundo plano, caso o espectrômetro não seja devidamente zerado.

* 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.

Anexo C: Manuseando PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



As seguintes recomendações da BD podem ser úteis ao manusear PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Consulte o *Manual de PAXgene Blood RNA Tube* para obter mais informações sobre PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Instruções para remoção do fecho BD Hemogard

1. Segure o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) com uma mão, colocando o polegar sob o fecho BD Hemogard. (Para maior estabilidade, coloque o braço na superfície sólida.) Com a outra mão, gire o fecho BD Hemogard enquanto empurra simultaneamente para cima com o polegar da outra mão, APENAS ATÉ QUE A ROLHA DO TUBO SE SOLTE.
2. Afaste o polegar antes de levantar o fecho. NÃO use o polegar para empurrar o fecho do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) para fora. Cuidado: se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) contiver sangue, existe um risco de exposição. Para ajudar a evitar ferimentos durante a remoção do fecho, é importante que o polegar usado para empurrar o fecho para cima não esteja em contato com o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) após o fecho BD Hemogard ser solto.
3. Levante o fecho do PAXgene Blood RNA Tube (BRT). No caso improvável de a proteção plástica se separar da rolha de borracha, NÃO RECOLOQUE O FECHO. Remova cuidadosamente a rolha de borracha do PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Instruções para inserção do fecho BD Hemogard secundário

1. Substitua o fecho sobre o PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Gire e pressione firmemente para baixo até que a rolha esteja totalmente recolocada. A reinserção completa da rolha é necessária para que o fecho permaneça seguro no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante o manuseio.

Informações para pedidos

Produto	Conteúdo	Nº de ref.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, tubos de processamento, DNase I sem RNase, reagentes e tampões sem RNase. Para uso em conjunto com PAXgene Blood RNA Tubes.	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 tubos de coleta de sangue	762165
Produtos relacionados que podem ser encomendados à QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	A embalagem inclui: racks de frascos de reagente (3); tiras de rotulagem de rack (8); ponteiras com filtro de 200 µl (1024); ponteiras com filtro de 1000 µl (1024); ponteiras com filtro de 1000 µl de orifício largo (1024); frascos de reagente de 30 ml (18); adaptadores de rotor (240); suporte do adaptador de rotor	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Ponteiras com filtro estéreis descartáveis, com rack	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagent Bottles, 30 ml com tampas; embalagem de 6; para uso com o rack de frascos de reagente do instrumento QIAcube	990393

Rotor Adapters (10 x 24)	Para 240 preparos: 240 adaptadores de rotor descartáveis; para uso com instrumentos QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Rack para acomodação de frascos de reagente, 6 x 30 ml, na mesa de trabalho do instrumento QIAcube	990390
Rotor Adapter Holder	Suporte para 12 adaptadores de rotor descartáveis; para uso com instrumentos QIAcube	990392

Produtos relacionados que podem ser encomendados à BD*

Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: Agulha 21G de 0,75 polegadas (0,8 x 19 mm), tubo de 12 polegadas (305 mm) com adaptador luer; 50 por caixa, 200 por embalagem	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Embalagem apenas para 13 mm e 16 mm de diâmetro; 1000/embalagem	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Sachê de 13 x 75 mm de 4,0 ml com fecho Red BD Hemogard e etiqueta de papel; 100/caixa, 1000/embalagem	368975

* Esses acessórios de coleta de sangue representam produtos típicos que podem ser usados com PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Para saber mais sobre esses acessórios, bem como para encomendá-los, visite www.preanalytix.com.

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do kit PreAnalytiX ou QIAGEN correspondente. Os manuais do usuário e dos kits PreAnalytiX e QIAGEN estão disponíveis em www.preanalytix.com e www.qiagen.com ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da PreAnalytiX.

Histórico de revisões do manual

Documento e revisão	Alterações	Data
HB-0101-004, R2	Alterações para cumprir os regulamentos do GHS em todo o documento	Junho de 2015
HB-0101-005, R3	Novo modelo; revisões dos dados de desempenho e protocolo automatizado; atualização das informações de segurança para cumprimento dos regulamentos do GHS; alterações nos detalhes do instrumento e na declaração de limitações de uso do produto.	Fevereiro de 2019
HB-0101-006, R3	Correção do nome do kit na tabela Conteúdo do kit, pág. 5.	Janeiro de 2020
HB-0101-007, R4	QIAcube Connect MDx adicionado ao protocolo automatizado; linguagem atualizada para incluir referências ao QIAcube Connect MDx; tabela atualizada, página e números das figuras também.	Dezembro de 2020

PreAnalytiX ao redor do mundo

Os produtos PreAnalytiX são distribuídos pelas empresas QIAGEN e BD

QIAGEN – Atendimento ao cliente

Pedidos www.QIAGEN.com/shop | Suporte técnico support.qiagen.com | Site www.qiagen.com

BD – Atendimento ao cliente

Argentina, Uruguay and Paraguay

Orders: 0800.444.5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Australia

Orders: 1.800.656.100

Fax: 1.800.656.110

E-mail: bd_anz@bd.com

Austria

Orders: 43.1.7063660

Fax: 43.1.706366011

E-mail: customercare.at@bd.com

Belgium

Orders: 32.53.720.556

Fax: 32.53.720.549

E-mail: orders.be@bd.com

Brazil

Orders: 0800.055.56.54

E-mail: consultoria_vacutainer@bd.com

Canada

Technical support: 1.800.631.0174

Orders: 1.866.979.9408

Fax: 1.800.565.0897

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

Central and Eastern Europe

Orders: 48.22.377.11.11

Fax: 48.22.377.11.02

Bulgaria orders: info_bulgaria@bd.com

Czech Republic orders: info_czech@bd.com

Croatia orders: info_croatia@bd.com

Hungary orders: info_hungary@bd.com

Poland orders: info_poland@bd.com

Romania orders: info_romania@bd.com

Southeast Europe orders: info_balkan@bd.com

Serbia orders: info_serbia@bd.com

Slovakia orders: info_slovakia@bd.com

Slovenia orders: info_slovenia@bd.com

Denmark

Orders: 45.43.43.45.66

Fax: 45.43.96.56.76

Orders: ordre.dk@bd.com

Technical support: bddenmark@bd.com

Finland

Orders: 358.9.88.70.780

Fax: 358.9.88.70.7816

Orders: tilaukset.fi@bd.com

E-mail: bdsuomi@bd.com

France

Orders: 33.476.68.36.36

Fax: 33.476.68.36.93

E-mail: serviceclientbdf@bd.com

Orders: commandesfr@bd.com

Technical support: vacutainerfr@bd.com

Germany

Orders: 49.6221.3050

Fax: 49.6221.305.216

E-mail: customercare.de@bd.com

India

Orders: 91.124.3949390

Orders: bd_india@bd.com

Ireland (Aquilant Specialist Healthcare Services)

Customer support: 353.1.404.8350

Fax: 353.1.404.8352

E-mail: contactus@aquilantscientific.ie

Israel (Lapidot Medical)

Customer Support: 972.700.70.90.22

E-mail: cs@lapidot.com

Italy

Orders: 39.02.48240.500

Fax: 39.02.48240.775

Technical support: 39.3450655140

E-mail: ordini.it@bd.com

Middle East & Africa

Orders: 971.45.592.555

Fax: 971.45.592.599

E-mail: EMA_PAS@bd.com

The Netherlands

Orders: 31.20.582.94.20

Fax: 31.20.582.94.21

Orders: orders.nl@bd.com

New Zealand

Orders: 0800.572.468

Fax: 0800.572.469

E-mail: nz_customerservice@bd.com

Norway

Customer Support: 64.00.99.00

E-mail: bdnorge@bd.com

Orders: ordre.no@bd.com

Southeast Asia

E-mail: PAS.SEA@bd.com

Indonesia orders: 622.1577.1920

Malaysia orders: 603.2093.8788

Philippines orders: 63.2478.8881

Singapore orders: 65.6861.0633

Thailand orders: 662.646.1800

Vietnam orders: 848.3822.7409

South Korea

Orders: 02.3404.3706

Fax: 02.3404.3785

Technical: 02.3404.3706

Technical support: Korea_PAS@bd.com

Spain, Portugal and Andorra

Orders: 34.91.848.8174

Customer support: 34.902.27.17.27

Fax: 34.91.848.8115

E-mail: info.spain@bd.com

Sweden

Orders: 46.8.775.51.00

Fax: 46.8.645.08.08

Orders: order.se@bd.com

Technical support: bds sweden@bd.com

Switzerland

Orders: 41.61.485.22.24

Fax: 41.61.485.22.00

E-mail: infoch@bd.com

UK

Orders: 0800.917.8776

E-mail: bduk_customerservice@bd.com

USA

Customer support: 800.631.0174

E-mail: productcomplaints@bd.com



HB-0101-007 1122120 BD-8945 12/2020
Produto da Alemanha