

2020 年 12 月

# PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit 手册

第 2 版



50 (目录编号 762174)

R4 **MAT** 1122120CN

**REF** 762174

**IVD**

**CE**



PreAnalytiX GmbH  
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon  
由 QIAGEN GmbH 为 PreAnalytiX 生产

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

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

PAXgene Blood RNA Kit 并非在所有国家/地区都可提供：敬请咨询。

#### 限制许可协议

使用本产品表示 PAXgene Blood RNA Kit 的购买者或使用者遵循如下协议条款：

1. PAXgene Blood RNA Kit 的使用必须遵守 *PAXgene Blood RNA Kit 手册* 的相关内容，并且只能和试剂盒内包含的组件配合使用。PreAnalytiX 并未授权他人使用其知识产权，也禁止将套装产品部件与非套装产品部件混合使用，除非 *PAXgene Blood RNA Kit 手册* 或者 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) 网站另有说明。
2. 除非相关许可明确说明，否则 PreAnalytiX 并不保证本试剂盒和/或其使用不会侵犯第三方的权利。
3. 本试剂盒及其组件为一次性用品，不可重复使用、翻新或转卖。
4. 除了明确陈述的许可外，PreAnalytiX 否认提供任何其他明示或暗示许可。
5. 本试剂盒的购买者和使用者同意不采取、也不允许其他人采取任何步骤来实施或推动实施以上禁止的任何行为。
6. 为行使本“限制许可协议”条款的规定内容或者保护本试剂盒和/或其组件的知识产权，PreAnalytiX 可能会在法庭上执行本协议的相关禁令，并追讨所有调查和诉讼费用（包括律师费）。

如需获得更新的许可条款，请访问 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)。

#### 有条件销售

本产品附带根据 US-7,270,953 和 US-7,682,790 以及 EP-1820793 B1 的某些权利要求和这些专利权利要求的外国等效标准的许可，以使用本产品处理在 PAXgene Blood RNA Tube 内采集样本过程中形成的核酸复合物。

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005 - 2020 PreAnalytiX GmbH，保留所有权利。

PreAnalytiX GmbH  
Feldbachstrasse  
CH - 8634 Hombrechtikon  
Switzerland  
[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

#### PreAnalytiX 经销商

PreAnalytiX 产品由 QIAGEN 或 BD 为 PreAnalytiX 生产和经销。无法直接从 PreAnalytiX GmbH 订购产品。

请参阅最后一页以获取本地 PreAnalytiX 经销商的联系信息。

# 目录

试剂盒内容物.....	5
符号.....	6
存储条件.....	7
预期用途.....	8
产品使用限制.....	8
质量控制.....	9
技术协助.....	9
安全信息.....	9
简介.....	12
原理和步骤.....	12
样本采集与稳定.....	13
RNA 浓缩和纯化.....	18
手动 RNA 纯化.....	18
自动 RNA 纯化.....	28
由使用者提供的设备和试剂.....	37
重要事项.....	39
使用 QIAcube 仪器.....	39
在 QIAcube 仪器上安装操作方案.....	42
加载 QIAcube 仪器.....	43
操作方案：从 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集的人体全血中手动纯化总 RNA.....	53
操作方案：从 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集的人体全血中自动纯化总 RNA.....	58
故障排除向导.....	64

附录 A: 有关 RNA 处理的一般说明 .....	66
附录 B: 总 RNA 的定量和质量测定 .....	67
附录 C: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的处理 .....	69
订购信息 .....	70
手册修订历史 .....	72

# 试剂盒内容物

<b>PAXgene Blood RNA Kit</b>			<b>(50)</b>
<b>目录编号</b>			<b>762174</b>
<b>制备数</b>			<b>50</b>
BR1	Resuspension Buffer (重悬缓冲液)	<b>RES BUF</b>	20 ml
BR2	Binding Buffer (结合缓冲液) *	<b>BIND BUF</b>	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (洗涤缓冲液 1) *	<b>WASH BUF 1</b>	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (洗涤缓冲液 2) (浓缩液) †	<b>WASH BUF 2 CONC</b>	11 ml
BR5	Elution Buffer (洗脱缓冲液)	<b>ELU BUF</b>	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (不含 RNase 的水) (瓶装)	<b>PEL WASH</b>	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (蛋白酶 K) (绿色盖)	<b>PROTK</b>	2 × 1.4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Column (PAXgene RNA 离心柱) (红色)	<b>PAXgene RNA COL</b>	5 × 10
PT	Processing Tube (处理管) (2 ml)	<b>PROC TUBE</b>	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closure (辅助 BD Hemogard™ 瓶盖)	<b>SEC CLOS</b>	50
MCT	Microcentrifuge Tube (微量离心管) (1.5 ml)	<b>MIC TUBE</b>	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (不含 RNase 的 DNase I) (冻干)	<b>DNA REM</b>	1500 孔尼兹单位 ‡
RDD	DNA Digestion Buffer (DNA 消化缓冲液) (白色盖)	<b>DNA DIG BUF</b>	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (DNase 重悬缓冲液) (试管, 淡紫色盖)	<b>DNase RES BUF</b>	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Column (PAXgene Shredder 离心柱) (淡紫色)	<b>PAXgene SHRED COL</b>	5 × 10
手册	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (PAXgene Blood RNA Kit 手册) (第 2 版)		1

\* 与含有漂白剂的消毒剂不相容。含有胍盐。请参阅第 9 页以获取安全信息。

† 洗涤缓冲液 2 (BR4) 以浓缩液形式提供。首次使用前, 按瓶身上说明添加 4 倍体积的乙醇 (96 - 100% 纯度等级 p.a.) 制备工作溶液。

‡ 孔尼兹单位是用于测量 DNase I 的常用单位, 定义为在 25°C、pH 5.0 并且以高度聚合 DNA 作为底物的情况下, 导致每毫升样本每分钟 A<sub>260</sub> 增加 0.001 的 DNase I 含量 [Kunitz, M. (1950) J. Gen.Physiol. **33**, 349 和 363]。

# 符号



包含足够进行 <N> 次测试的试剂



参考使用说明



使用截止日期



体外诊断医疗器械



目录编号



批号



材料编号



组件



数量



使用辐照灭菌方法



孔尼兹单位



添加



包含



重组



脱氧核糖核酸酶 I



乙醇

**GITC**

异硫氰酸胍

**RNase-Free DNase Set**

不含 RNase 的 Dnase 套件

**GTIN**

全球贸易项目代码



请勿重复使用



温度限制



温度上限



制造商



重要事项

## 存储条件

PAXgene RNA 离心柱 (PRC)、PAXgene Shredder 离心柱 (PSC)、蛋白酶 K (PK) 以及各种缓冲液 (BR1、BR2、BR3、BR4 和 BR5) 应在试剂盒标签上标明的温度下干燥保存。

不含 Rnase 的 Dnase 套件, 包括 Dnase I (RNFD)、DNA 消化缓冲液 (RDD) 和 Dnase 重悬缓冲液 (DRB), 可在常温下运输。收到不含 Rnase 的 Dnase 套件后, 应立即在标签上标明的温度下存放所有组分。如果存放得当, 试剂盒可在试剂盒箱上的失效日期前保持稳定。

## 预期用途

PAXgene Blood RNA System 由血液采样管 (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) 和核酸纯化试剂盒 (PAXgene Blood RNA Kit) 组成。它旨在用于在封闭的试管中进行血液的采样、存储和运送以及细胞内 RNA 的稳定化，然后从全血中分离和纯化宿主 RNA，以用于在分子诊断测试中进行 RT-PCR。

仅使用 **FOS** 和 **IL1B** 基因转录物建立了 **PAXgene Blood RNA System** 的性能特点。用户需负责为其他目标转录物建立适当的 **PAXgene Blood RNA System** 性能特点。

## 使用说明

PAXgene Blood RNA Kit 用于从 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 内采集的全血中纯化细胞内 RNA。当试剂盒与 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 配套使用时，该系统能够从全血中提纯细胞内 RNA 用于在分子诊断测试中进行 RT-PCR。

## 产品使用限制

PAXgene Blood RNA Kit 旨在从人体全血 ( $4.8 \times 10^6 - 1.1 \times 10^7$  个白细胞/ml) 中纯化细胞内 RNA 用于体外诊断应用。它并非用于从人体全血中纯化基因组 DNA 或病毒核酸。因为用于验证稳定规格的转录物数量有限 (FOS 和 IL1B 基因转录物)，所以尚未建立针对所有转录物的性能特点。用户应查看制造商的数据和自己的数据，以确定是否需要对其他转录物进行验证。

该产品旨在供专业用户使用，例如在体外诊断程序方面经过培训的技术人员和医师。

有关 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的使用信息，请参阅 *PAXgene Blood RNA Tube 手册*。

# 质量控制

QIAGEN 利用经 ISO 认证的质量管理系统，对每批 PAXgene Blood RNA Kit 试剂盒的预定规格进行测试，以确保始终如一的产品品质。

# 技术协助

QIAGEN 员工均为公司技术支持的品质和效率而自豪。我们技术服务部门的员工均为经验丰富的专家，他们在分子生物学和 PreAnalytiX 产品使用方面具备广泛的实践和理论知识。如果您对 PAXgene Blood RNA Kit 有任何疑问，请随时与我们联系。

有关技术协助和详细信息，请联系 QIAGEN 技术服务部门。

# 安全信息

欧盟 – 用户应将与其器械相关的任何严重事故报告给制造商以及国家主管部门。欧盟以外地区 – 对于与其器械相关的任何事故或查询，请联系当地 QIAGEN 代表。

工作中如接触化学品，则必须穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。

为避免使用生物和化学材料时受到感染（例如，HIV 或乙型肝炎病毒感染）或出现损伤，必须始终穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息，请参阅相关安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)。这些表格在 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) 网页上以 PDF 压缩文件形式提供，您可以在该网页上查找、浏览和打印本试剂盒的 SDS。

**警示**

不得将漂白剂或酸性溶液直接添加到样本制备产生的废弃物中。



结合缓冲液 (BR2) 和洗涤缓冲液 1 (BR3) 中含有硫氰酸胍，与漂白剂混合时会形成高活性化合物。如果结合缓冲液 (BR2) 和洗涤缓冲液 1 (BR3) 泼洒出来，请使用合适的实验室洗涤剂和水进行清理。如果含有潜在传染性病原体的液体泼洒出来，请首先使用实验室洗涤剂和水清洁受影响区域，然后使用 1% (v/v) 次氯酸钠（漂白剂）进行清洁。

可以每 9 倍体积的 RNA 稳定溶液和血液混合物使用 1 倍体积的商业漂白溶液（5% 次氯酸钠）对来自 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 的 RNA 稳定溶液和血液混合物进行消毒。

样本制备产生的废弃物，例如 RNA 纯化程序中离心步骤产生的上清液，被视为具有潜在传染性。在处置之前，必须对废弃物进行高压灭菌或焚烧，以销毁任何传染性材料。必须按照官方规定进行处置。

以下危险和预防声明适用于 PAXgene Blood RNA Kit 的组件。有关 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的安全信息，请参阅 *PAXgene Blood RNA Tube 手册*。

### 缓冲液 BR2



含有：硫氰酸胍。危险！吞食有害。接触皮肤或吸入可能造成伤害。导致严重眼部损伤。对水生生物有持久伤害。与酸接触会释放高毒性的气体。使用防护手套/防护服/护目镜/面部护具。如果入眼：用水小心地冲洗几分钟。摘下隐形眼镜（如果有且容易摘下），继续冲洗。立即呼叫毒物中心或者医生/内科医师。

### 缓冲液 BR3



含有：乙醇；硫氰酸胍。危险！易燃液体和蒸汽。导致严重眼部损伤。与酸接触会释放高毒性的气体。远离热源/火花/明火/热表面。禁止吸烟。使用防护手套/防护服/护目镜/面部护具。如果入眼：用水小心地冲洗几分钟。摘下隐形眼镜（如果有且容易摘下），继续冲洗。立即呼叫毒物中心或者医生/内科医师。

## DNase I



包含：DNase。危险！可能引发过敏性皮肤反应。如果吸入，可能导致过敏、哮喘症状或者呼吸困难。避免吸入灰尘/烟尘/煤气/雾气/蒸汽/喷雾。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。佩戴呼吸防护用具。如果已接触或担心接触：请呼叫毒物中心或者医生/内科医师。请将受害者移到空气新鲜的地方，以呼吸舒适的姿势休息。

## 蛋白酶 K



含有：蛋白酶 K。危险！导致轻度皮肤瘙痒。如果吸入，可能导致过敏、哮喘症状或者呼吸困难。避免吸入灰尘/烟尘/煤气/雾气/蒸汽/喷雾。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。佩戴呼吸防护用具。如果已接触或担心接触：请呼叫毒物中心或者医生/内科医师。请将受害者移到空气新鲜的地方，以呼吸舒适的姿势休息。

# 简介

采集全血是用于研究细胞 RNA 的许多分子测定的第一步。但是，此类实验中的一个主要问题是细胞 RNA 表达谱在体外的不稳定性。在 PreAnalytiX 进行的研究表明，在室温下储存或运送期间，全血中单个 mRNA 种类的拷贝数变化可以超过 1000 倍。<sup>\*</sup>这是由于采血后 RNA 快速降解以及某些基因的诱导表达所致。RNA 表达谱中的此类变化使得无法进行可靠的基因表达研究。因此，在采血期间和之后用于维持 RNA 表达谱的方法对于准确分析人体全血中的基因表达至关重要。

## 原理和步骤

PreAnalytiX 开发出一种能够采集、稳定、存储和运送人体全血标本的系统，同时配备快速和有效的细胞内 RNA 纯化方案。该系统需要使用 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 美国专利 6,602,718 和 6,617,170) 进行血液采样和 RNA 稳定，然后使用 PAXgene Blood RNA Kit 进行手动或自动 RNA 纯化。手动和自动化方案能够提供在 RNA 质量和产量方面基本等同的性能。本手册包含手动方案 (第 21 - 28 页) 和自动化方案 (第 30 - 34 页) 的性能数据。



QIAGEN QIAcube Connect MDx 并非在所有国家/地区都可用。如需更多详细信息，请联系 QIAGEN 技术服务部门。

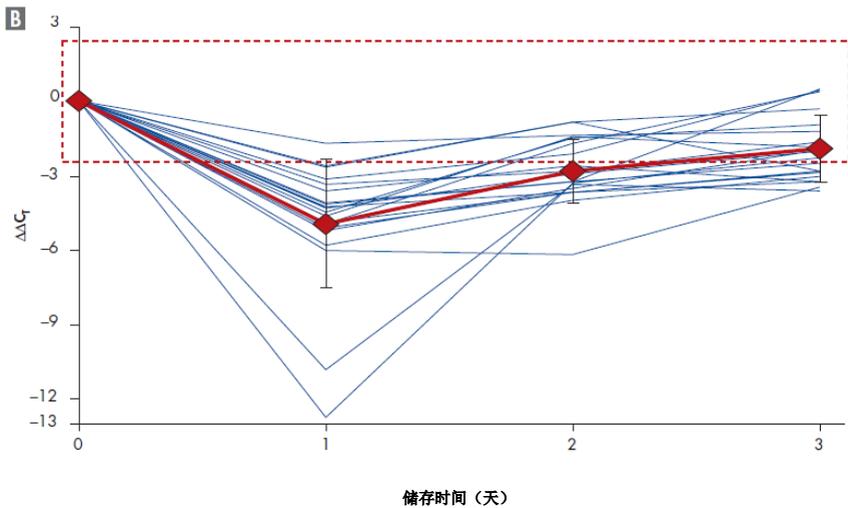
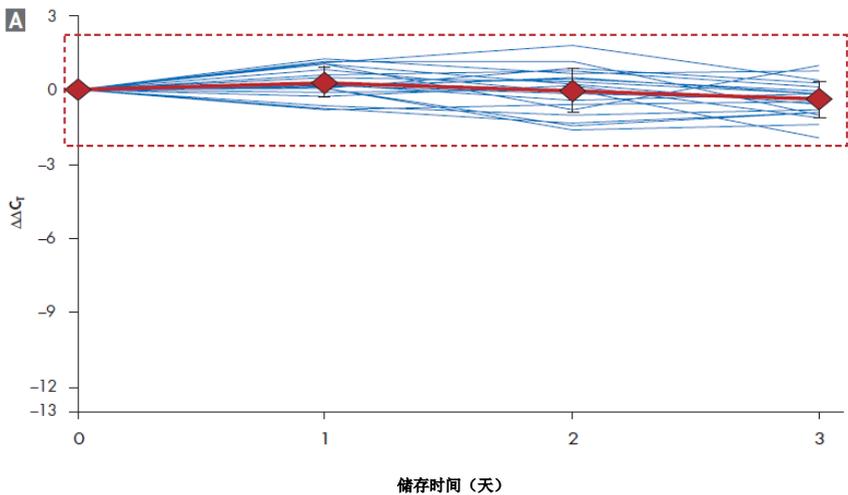
<sup>\*</sup> Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

## 样本采集与稳定

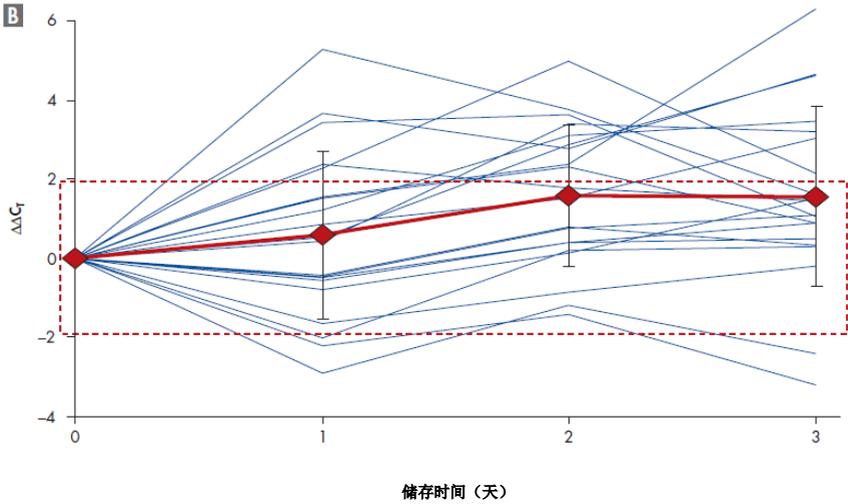
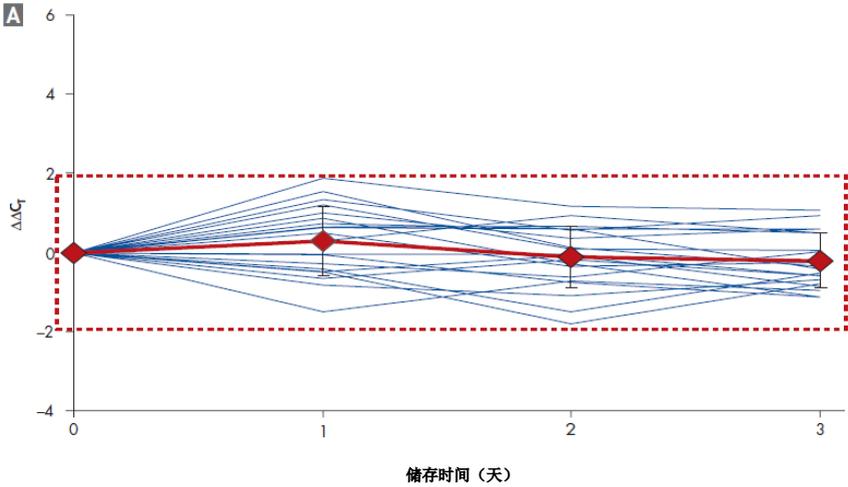
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 包含基于专利 RNA 稳定技术的专有试剂成分。该试剂成分可保护 RNA 分子免于被 RNase 降解，并最大限度减少基因表达的离体变化。PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 用于采集人体全血并且使细胞 RNA 在 18 - 25°C 下稳定长达 3 天（图 1 和图 2，第 14 页和第 15 页）或在 2 - 8°C 下稳定长达 5 天（图 3 和图 4，第 16 页和第 17 页）。现有的数据表明，细胞 RNA 可以在 - 20°C 或 -70°C 下保持稳定至少 11 年\*。有关正在进行的评价更长时间稳定性的研究，请联系 QIAGEN 技术服务部门以获取更多信息。

RNA 保持稳定的实际持续时间可能会因细胞 RNA 的种类以及所使用的下游应用而异。因为用于验证稳定规格的转录物数量有限（FOS 和 IL1B 基因转录物），所以尚未建立针对所有转录物的性能特点。用户应查看制造商的数据和自己的数据，以确定是否需要对其他转录物进行验证。

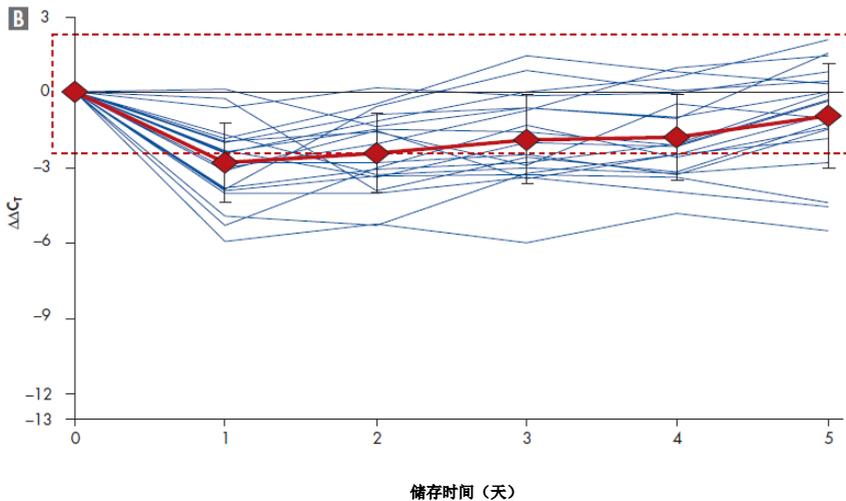
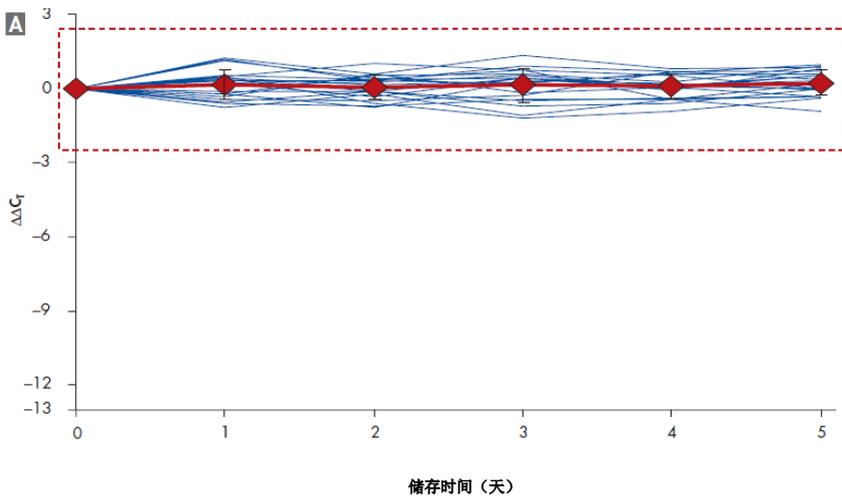
\*一项关于 PAXgene Blood RNA Tubes 中血液存储的长期研究正在进行中。



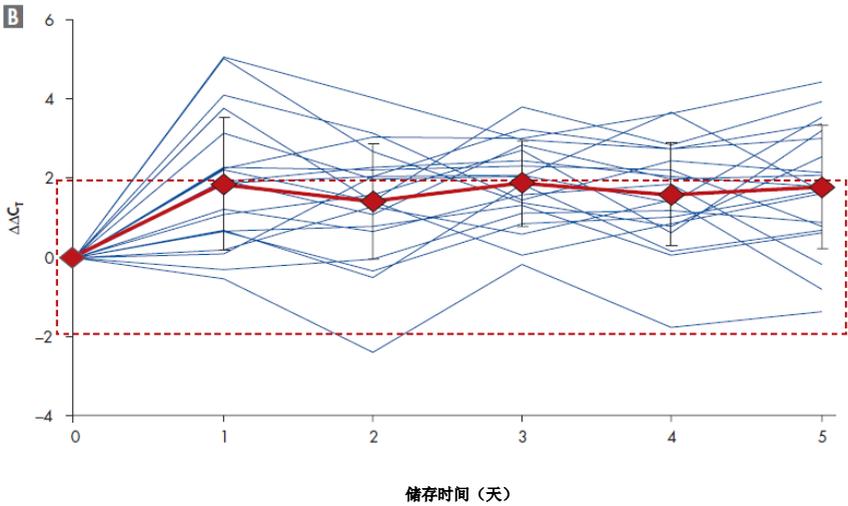
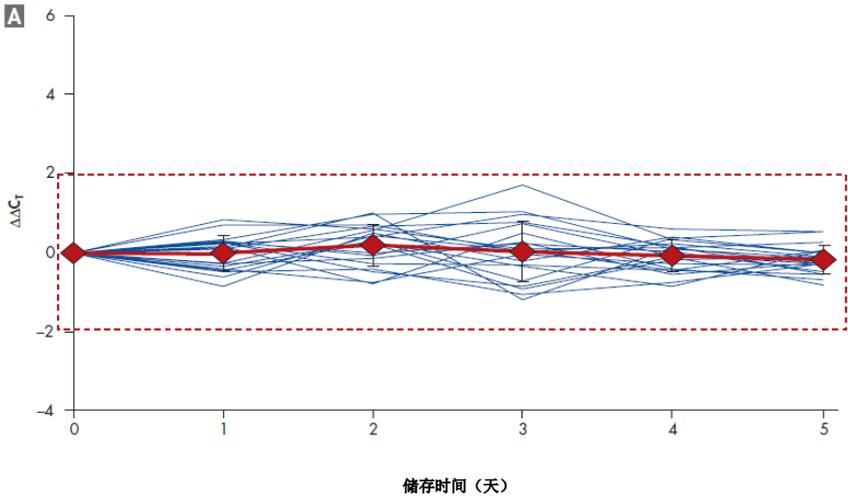
**图 1.18 - 25°C 下血液样本中的 RNA 稳定性: FOS。** 从 10 名供体中抽取血液，将重复样本在 18 - 25°C 下保存指定的天数，然后进行总 RNA 纯化。**[A]** 采集血液并存储在 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 内，然后使用 PAXgene Blood RNA Kit 纯化总 RNA。**[B]** 采集血液并存储在使用 EDTA 作为抗凝剂的标准血液采样管内，然后使用标准有机提取方法和基于硅胶膜的 RNA 提纯来纯化总 RNA。使用 18S rRNA 作为内标，通过实时双通道 RT-PCR 测定 FOS 的相对转录物水平。使用所有样本的测定值绘图，并显示所有样本的均值和标准差。虚线表示所有检测的  $\pm 3$  倍总精度 ( $2.34 C_t$ )。



**图 2.18 - 25°C 下血液样本中的 RNA 稳定性: IL1B.** 如图 1 所示, 抽取血液并在 18 - 25°C 下储存, 然后纯化总 RNA。使用 18S rRNA 作为内标, 通过实时双通道 RT-PCR 测定 IL1B 的相对转录物水平。使用所有样本的测定值绘图, 并显示所有样本的均值和标准差。虚线表示所有检测的  $\pm 3$  倍总精密度 ( $1.93 C_t$ )。



**图 3.2-8°C 下血液样本中的 RNA 稳定性: FOS。** 从 10 名供体中抽取血液, 将重复样本在 2-8°C 下保存指定的天数, 然后进行总 RNA 纯化。**[A]** 采集血液并存储在 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 内, 然后使用 PAXgene Blood RNA Kit 纯化总 RNA。**[B]** 采集血液并存储在使用 EDTA 作为抗凝剂的标准血液采样管内, 然后使用标准有机提取方法和基于硅胶膜的 RNA 提纯来纯化总 RNA。使用 18S rRNA 作为内标, 通过实时双通道 RT-PCR 测定 FOS 的相对转录物水平。使用所有样本的测定值绘图, 并显示所有样本的均值和标准差。虚线表示所有检测的  $\pm 3$  倍总精密度 ( $2.34 C_T$ )。



**图 4.2-8°C 下血液样本中的 RNA 稳定性: IL1B。** 如图 3 所示, 抽取血液并在 2-8°C 下储存, 然后纯化总 RNA。使用 18S rRNA 作为内标, 通过实时双通道 RT-PCR 测定 IL1B 的相对转录物水平。使用所有样本的测定值绘图, 并显示所有样本的均值和标准差。虚线表示所有检测的  $\pm 3$  倍总精密度 ( $1.93 C_t$ )。

## RNA 浓缩和纯化

PAXgene Blood RNA Kit 用于从 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 采集的 2.5 ml 人体全血中纯化总 RNA。操作步骤简单，可使用手动或自动化程序执行（参见图 5 和图 10，第 19 页和第 29 页）。在这两种方案中，纯化都从离心步骤开始，从而在 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 中获得核酸沉淀物。洗涤并重悬沉淀物，然后进行手动或自动 RNA 纯化。从原则上讲，两种方案都使用相同的试剂盒组件并遵循相同的方案步骤。

### 手动 RNA 纯化

具体而言，将重悬的沉淀物与蛋白酶 K (PK) 一起在经过优化的缓冲液中孵育以完成蛋白质消化。使用 PAXgene Shredder 离心柱 (PSC) 再次离心，使细胞裂解物均质化并去除残留细胞碎屑，然后将流经液体的上清液转移至新的微量离心管中。加入乙醇以调节结合条件，并将裂解物加至 PAXgene RNA 离心柱 (PRC)。在短暂离心过程中，RNA 选择性与 PAXgene 硅胶膜结合，而污染物则会通过硅胶膜。通过几个有效的洗涤步骤去除残留的污染物。在第一个和第二个洗涤步骤之间，使用 DNase I (RNFD) 处理硅胶膜以去除痕量的结合 DNA。在这些洗涤步骤后，使用洗脱缓冲液 (BR5) 洗脱 RNA 并进行热变性。

使用 PAXgene Blood RNA System 分离得到的总 RNA 是纯净的。使用手动方案，通过对  $\beta$ -肌动蛋白基因序列进行定量 real-time PCR 测量显示， $A_{260}/A_{280}$  值在 1.8 到 2.2 之间， $\geq 95\%$  的样本的基因组 DNA 含量  $\leq 1\%$  (w/w)。当使用多达 30% 的洗脱液时，至少 95% 的样本在 RT-PCR 中无抑制作用。

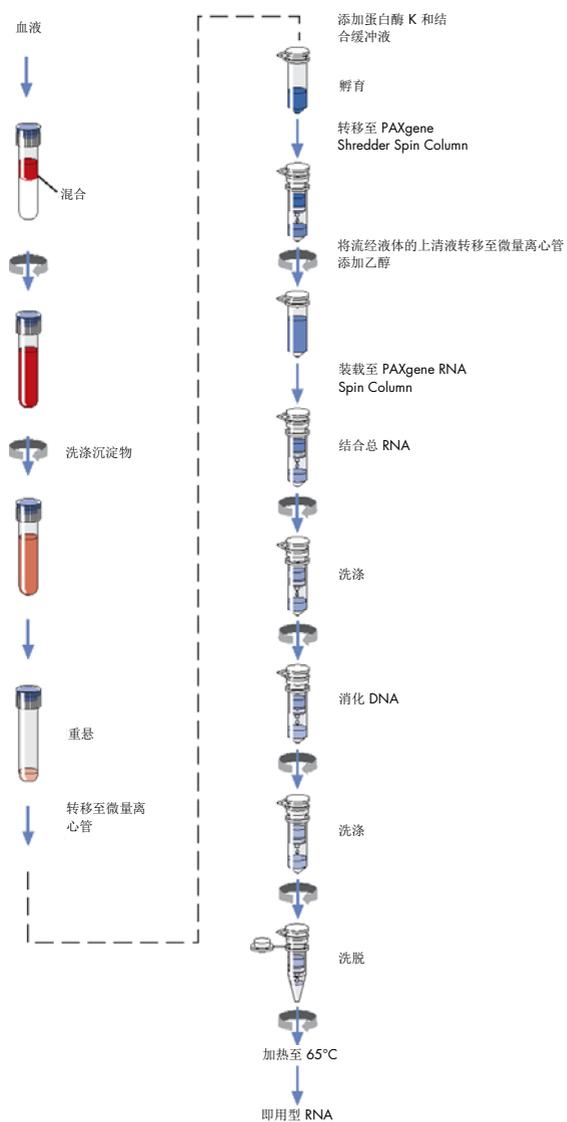
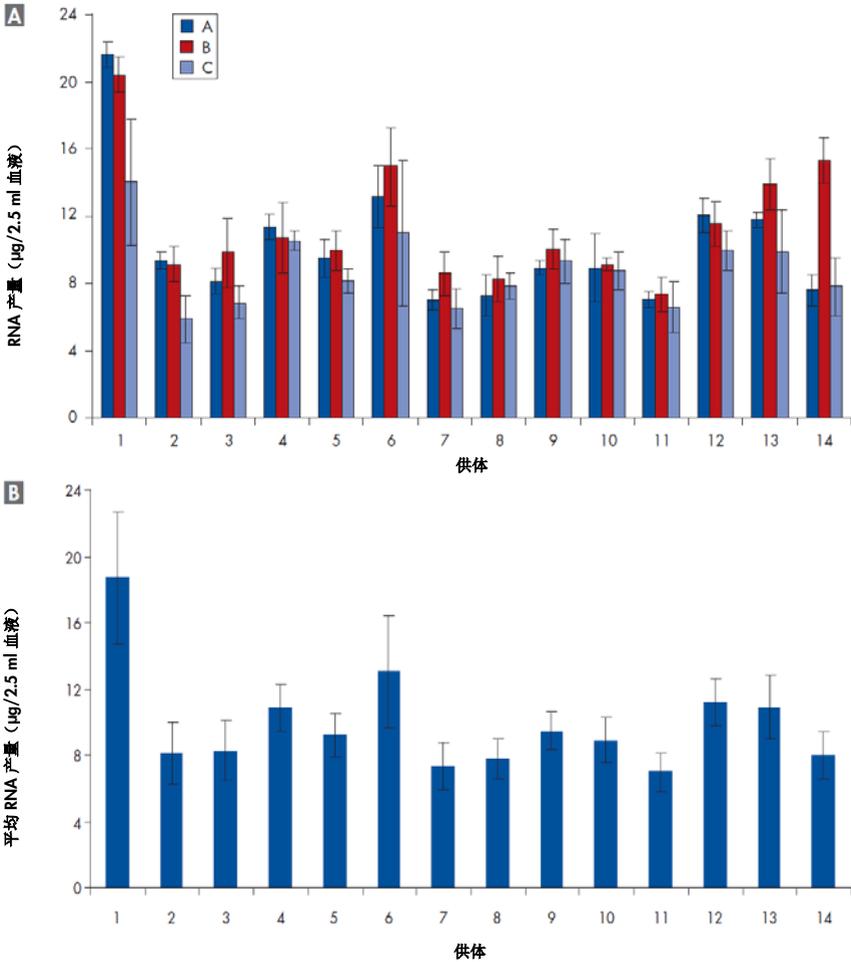


图 5.手动 PAXgene Blood RNA 纯化程序。

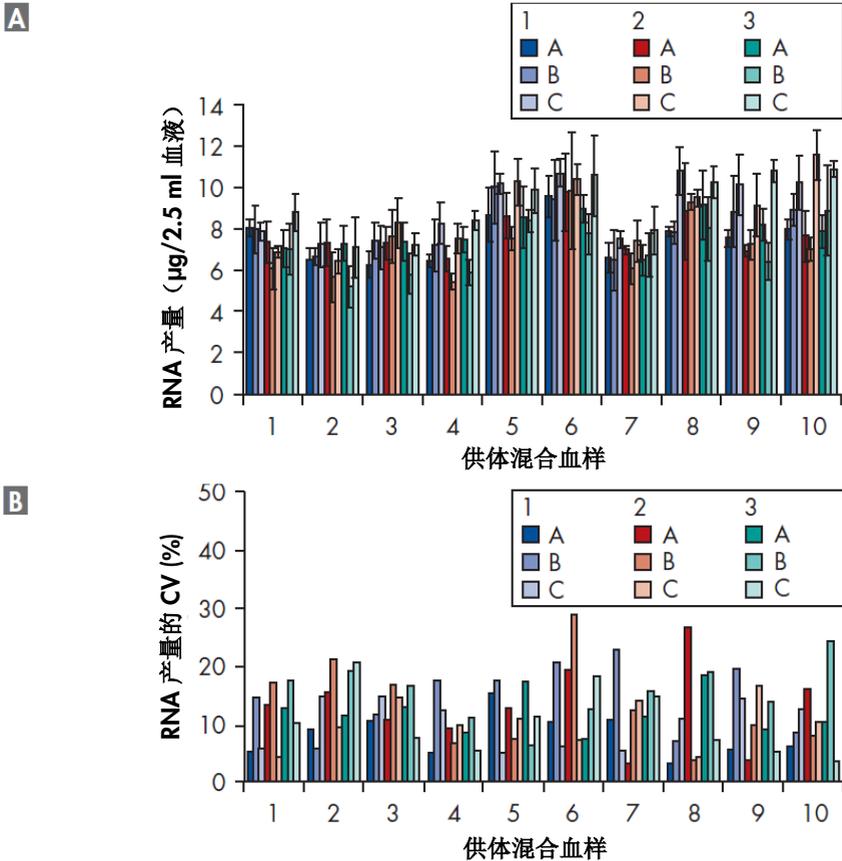
使用手动方案时，平均样本制备时间（基于来自 12 个样本制备运行批次的的数据）约为 90 分钟\*，而动手时间仅为 40 分钟。对于  $\geq 95\%$  的处理后样本而言，2.5 ml 健康人体全血的 RNA 产量均  $\geq 3 \mu\text{g}$ 。由于产量高度依赖于供体，因此个体产量可能会有所不同。对于单个供体，PAXgene Blood RNA System 能够提供高度可再现和可重复的产量（图 6 和图 7，第 21 页和第 22 页）以及可再现和可重复的 RT-PCR 结果（图 8 和图 9，第 26 页和第 27 页），使其对于临床诊断测试具有高度的稳健性。

图 6（第 21 页）显示了 PAXgene Blood RNA System 的总体重复性和再现性。已经进行过其他研究以证明不同的 PAXgene Blood RNA Kit 批次和不同的操作员对 RNA 产量的再现性以及实时 RT-PCR 性能的影响。由于这些研究使用混合血液样本而非单个 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)，因此结果并不能反映系统的重复性（包括个体抽血之间的波动），仅反映出样本制备的重复性（参见图 7，第 22 页）。

\* 整个方案运行时间，包括 PAXgene Blood RNA Tubes 的前期处理（离心、沉淀物洗涤和沉淀物重悬）。



**图 6.可再现和可重复的 RNA 纯化。** 3 名技术人员 (A, B, C) 分别手动处理来自 14 名供体的一式四份血样。使用了三套设备，由一名技术人员使用同一设备处理所有准备好的样本。**[A]** 显示了来自相同供体和不同技术人员的每份重复样本的 RNA 产量的均值和标准差。**[B]** 由 3 名不同技术人员处理每名供体（共 14 名供体）提供的 12 份重复样本。显示了来自相同供体和所有技术人员的每份样本的 RNA 产量的均值和标准差。对于所有 RNA 样本， $A_{260}/A_{280}$  比值的范围为 1.8 至 2.2。



**图 7.不同操作员和 PAXgene Blood RNA Kit 批次使用混合血样时的 RNA 产量的重复性和再现性。**在 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 每名供体 12 管, 总共 360 管) 中采集来自 30 名不同供体的血样。混合来自 3 名供体的所有试管中的内容物, 随后重新等分为 36 份样本。由 3 名不同的操作员对根据每 3 名供体混合血样等分的 36 份样本进行手动处理。每名操作员使用 3 个不同的 PAXgene Blood RNA Kit 批次对每个供体混合血样 (总共 10 个混合血样) 的一式四份样本进行提取和处理。**[A]** 每个操作员-批次组合的 RNA 产量和标准差。由 3 名不同的操作员 (A, B, C) 使用 3 个不同批次的试剂盒 (1, 2, 3) 处理来自 10 个供体混合血样的一式四份样本。显示了不同操作员使用不同试剂盒批次对来自同一供体混合血样的一式四份样本得出的平均产量 (柱) 和标准差 (误差线)。**[B]** 对于所有操作员-批次组合 (A, B, C; 1, 2, 3), 每个供体混合血样 RNA 产量的 CV; 根据图 7A 所示的平均产量和产量的标准差计算得出。

表 1A.对于选定的供体混合血样 (1, 6, 9, 10), 每个批次和每名用户内部的再现性

数据组合	供体混合血样 1 5.1 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml			供体混合血样 6 6.5 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml		
	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
批次 1, 用户 A	8.03	0.42	5	9.55	0.99	10
批次 1, 用户 B	7.98	1.17	15	9.38	1.94	21
批次 1, 用户 C	7.87	0.45	6	10.71	0.65	6
批次 2, 用户 A	7.32	0.98	13	9.78	1.89	19
批次 2, 用户 B	6.09	1.04	17	9.82	2.83	29
批次 2, 用户 C	6.87	0.31	4	10.37	0.74	7
批次 3, 用户 A	7.04	0.90	13	8.96	0.68	8
批次 3, 用户 B	6.98	1.22	17	7.73	0.97	13
批次 3, 用户 C	8.78	0.89	10	10.59	1.94	18
数据组合	供体混合血样 9 8.4 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml			供体混合血样 10 10.2 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml		
	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
批次 1, 用户 A	7.52	0.41	6	7.96	0.49	6
批次 1, 用户 B	8.82	1.72	19	8.90	0.76	9
批次 1, 用户 C	10.14	1.46	14	10.22	1.29	13
批次 2, 用户 A	6.92	0.27	4	7.63	1.23	16
批次 2, 用户 B	7.20	0.71	10	7.00	0.56	8
批次 2, 用户 C	9.14	1.52	17	11.56	1.21	10
批次 3, 用户 A	8.18	0.76	9	7.85	0.82	10
批次 3, 用户 B	6.41	0.88	14	8.88	2.17	24
批次 3, 用户 C	10.78	0.56	5	10.88	0.37	3

表 1B.对于选定的供体混合血样 (1, 6, 9, 10), 每名用户内部和所有批次之间的再现性

数据组合	供体混合血样 1 5.1 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml			供体混合血样 6 6.5 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml		
	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
用户 A, 所有批次	7.46	0.85	11	9.43	1.22	13
用户 B, 所有批次	7.02	1.31	19	8.98	2.09	23
用户 C, 所有批次	7.84	0.98	13	10.56	1.15	11
数据组合	供体混合血样 9 8.4 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml			供体混合血样 10 10.2 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml		
	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
用户 A, 所有批次	7.54	0.72	10	7.81	0.82	11
用户 B, 所有批次	7.48	1.50	20	8.26	1.54	19
用户 C, 所有批次	10.02	1.34	13	10.89	1.10	10

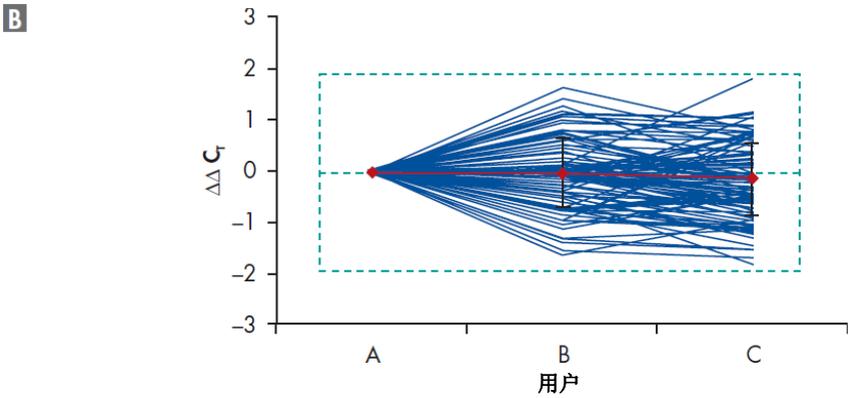
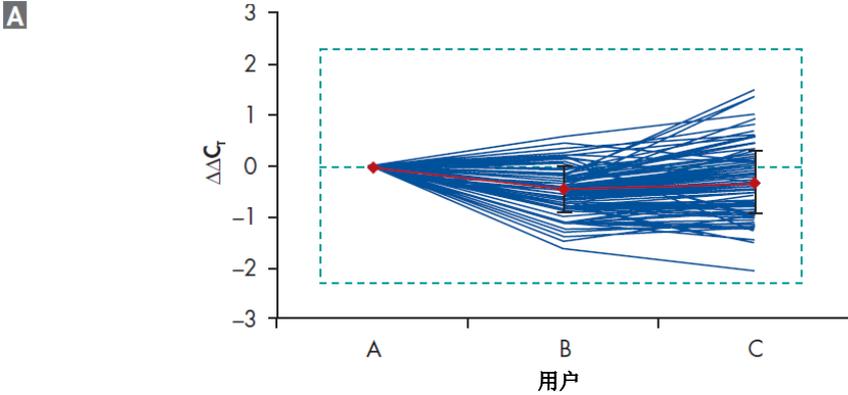
表 1C.对于选定的供体混合血样 (1, 6, 9, 10), 每个批次内部和所有用户之间的再现性

数据组合	供体混合血样 1 5.1 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml			供体混合血样 6 6.5 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml		
	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
批次 1, 所有用户	7.96	0.69	9	9.88	1.34	14
批次 2, 所有用户	6.76	0.93	14	9.99	1.84	18
批次 3, 所有用户	7.60	1.27	17	9.09	1.71	19
数据组合	供体混合血样 9 8.4 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml			供体混合血样 10 10.2 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml		
	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
批次 1, 所有用户	8.83	1.63	19	9.02	1.27	14
批次 2, 所有用户	7.75	1.36	18	8.73	2.31	26
批次 3, 所有用户	8.46	1.99	24	9.20	1.80	20

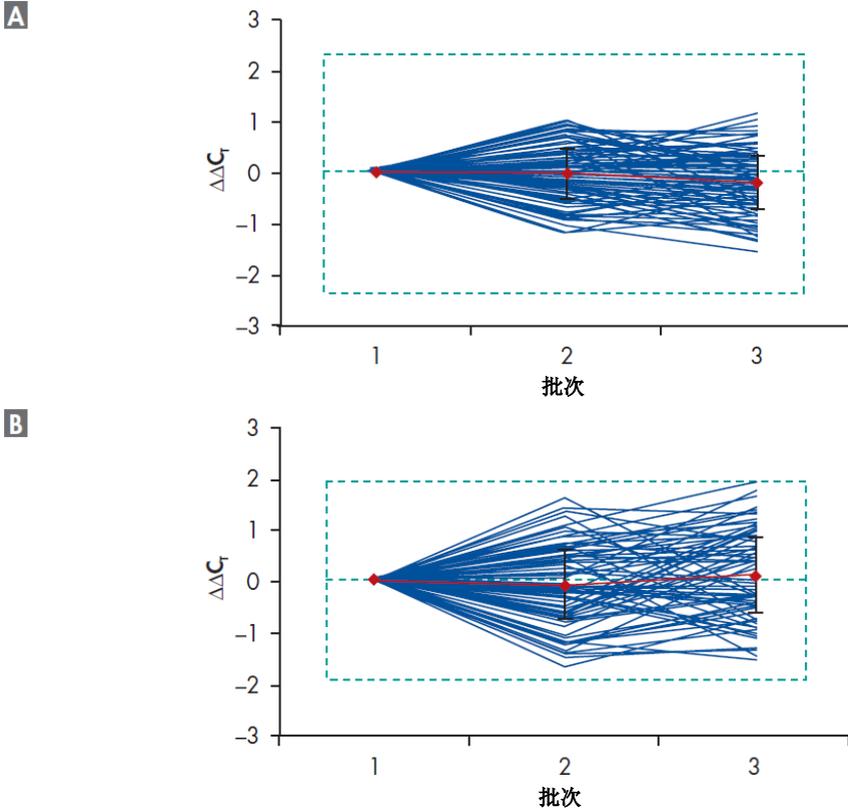
表 1D.对于选定的供体混合血样 (1, 6, 9, 10), 所有批次和所有用户之间的再现性

数据组合	供体混合血样 1 5.1 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml			供体混合血样 6 6.5 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml		
	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
批次 1, 所有用户	7.44	1.09	15	9.66	1.65	17
数据组合	供体混合血样 9 8.4 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml			供体混合血样 10 10.2 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/ml		
	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均产量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
批次 1, 所有用户	8.35	1.70	20	8.99	1.80	20

4 个代表性供体混合血样的详细分析。根据白细胞计数选择混合血样，并反映白细胞计数正常范围（ $4.8 \times 10^6$  -  $1.1 \times 10^7$  个白细胞/ml）的最高值、中位值和最低值。白细胞计数代表来自每个供体混合血样（3 名供体）的 3 个白细胞计数的均值。



**图 8. RT-PCR 的再现性 — 不同用户之间。** 按照图 7 所述实验纯化 RNA 并用于实时 RT-PCR。使用 18S rRNA 作为内标，通过实时双通道 RT-PCR 测定 **[A]** FOS 和 **[B]** IL1B 的相对转录物水平。使用所有样本测定值相对于用户 A 测定值的比值绘图（10 个供体混合血样  $\times$  3 个试剂盒批次  $\times$  4 个重复样本 = 每种基因 120 个数据集），并显示所有样本的均值（红线）和标准差（黑线）。虚线表示所有检测的  $\pm 3$  倍总精密度 (FOS: 2.34  $C_t$ ; IL1B: 1.93  $C_t$ )。



**图 9. RT-PCR 的再现性 — 不同试剂盒批次之间。**按照图 7 所述实验纯化 RNA 并用于实时 RT-PCR。使用 18S rRNA 作为内标，通过实时双通道 RT-PCR 测定 [A] FOS 和 [B] IL1B 的相对转录物水平。使用所有样本测定值相对于试剂盒批次 1 测定值的比值绘图（10 个供体混合血样 × 3 个试剂盒批次 × 4 个重复样本 = 每种基因 120 个数据集），并显示所有样本的均值（红线）和标准差（黑线）。虚线表示所有检测的  $\pm 3$  倍总精密度 (FOS: 2.34  $C_t$ ; IL1B: 1.93  $C_t$ )。

表 2.图 8 和图 9 的 RT-PCR 数据汇总

测试系统 数据比较	FOS/18S rRNA 检测		IL1B/18S rRNA 检测	
	均值 ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )	均值 ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>每个用户内部以及所有批次之间的再现性</b>				
所有用户, 批次 1 - 批次 1	0.00	0.00	0.00	0.00
所有用户, 批次 1 - 批次 2	-0.03	0.48	-0.07	0.66
所有用户, 批次 1 - 批次 3	-0.21	0.52	0.11	0.71
<b>每个用户内部以及所有批次之间的再现性</b>				
所有批次, 用户 A - 用户 A	0.00	0.00	0.00	0.00
所有批次, 用户 A - 用户 B	-0.46	0.44	-0.06	0.69
所有批次, 用户 A - 用户 C	-0.31	0.60	-0.15	0.71

用户: 执行研究的技术人员。

批次: 本研究中使用的试剂盒批次编号。

SD: 标准差。

根据图 8 和图 9 提供的数据显示了  $\Delta\Delta C_T$  均值 (N = 120) 和标准差。

## 自动 RNA 纯化

血液 RNA 的纯化可以在 QIAGEN QIAcube Connect MDx 或经典型 QIAGEN QIAcube (以下称 QIAcube) 上自动进行。创新版 QIAcube 仪器采用先进技术对 QIAGEN 离心柱进行处理, 从而将自动化的低通量样本制备工作无缝集成到您实验室的工作流程中。使用 QIAcube 仪器时的样本制备步骤与手动操作程序相同 (即裂解、结合、洗涤和洗脱), 可帮助您继续使用 PAXgene Blood RNA Kit 实现高质量 RNA 纯化。



**图 10.QIAcube Connect MDx。**

自动 RNA 纯化方案由 2 个部分（或方案）组成，即“PAXgene Blood RNA Part A”（A 部分）和“PAXgene Blood RNA Part B”（B 部分），2 个部分之间需要简单的手动干预（参见图 11，第 30 页）。

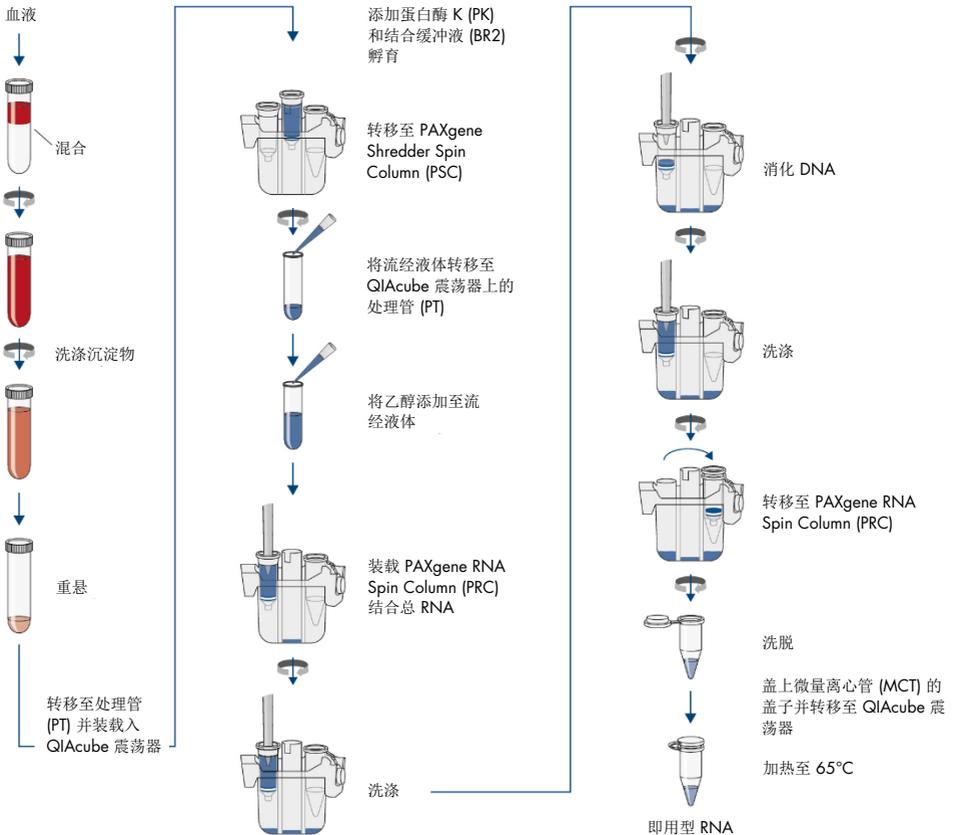


图 11. 自动 PAXgene Blood RNA 纯化程序。

将经过离心、洗涤和重悬的核酸沉淀物（参见第 18 页的“RNA 浓缩和纯化”）从 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 转移到处理管 (PT) 中，然后将其放入 QIAcube 仪器工作台上的恒温振荡器中。操作员从菜单中选择并启动“PAXgene Blood RNA Part A”（A 部分）方案。QIAcube 仪器执行该方案的操作步骤，直至洗脱缓冲液 (BR5) 中洗脱 RNA。操作员将含有纯化后 RNA 的微量离心管 (MCT) 转移入 QIAcube 仪器的恒温振荡器中。操作员从菜单中选择并启动“PAXgene Blood RNA Part B”（B 部分）方案，并通过 QIAcube 仪器进行热变性。

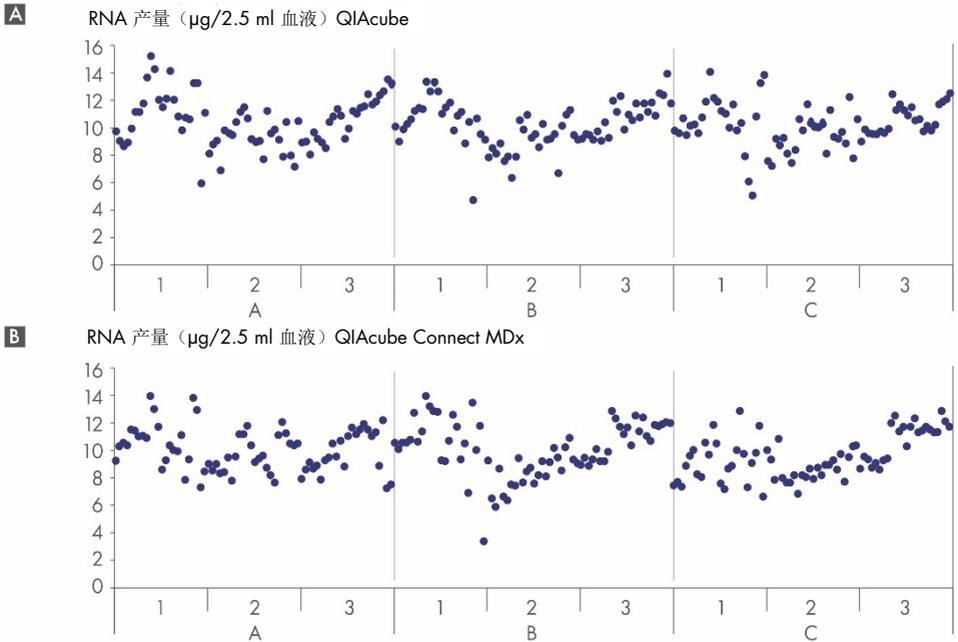
平均样本制备时间（基于来自 12 个样本制备运行批次的数据）为 151 分钟\*，动手时间与手动方案相比大幅缩短。

对于  $\geq 95\%$  的处理后样本而言，2.5 ml 健康人体全血的 RNA 产量均  $\geq 3 \mu\text{g}$ 。图 12（第 32 页）显示了 3 名操作员使用 3 个试剂盒批次通过自动化方案制备的总共 216 份样本的 RNA 产量。由于这些研究使用了混合血样而非单个 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)，因此结果无法反映单次抽血得到的单份样本的预期 RNA 产量。由于产量高度依赖于供体，因此个体产量可能会有所不同（图 12，第 32 页）。

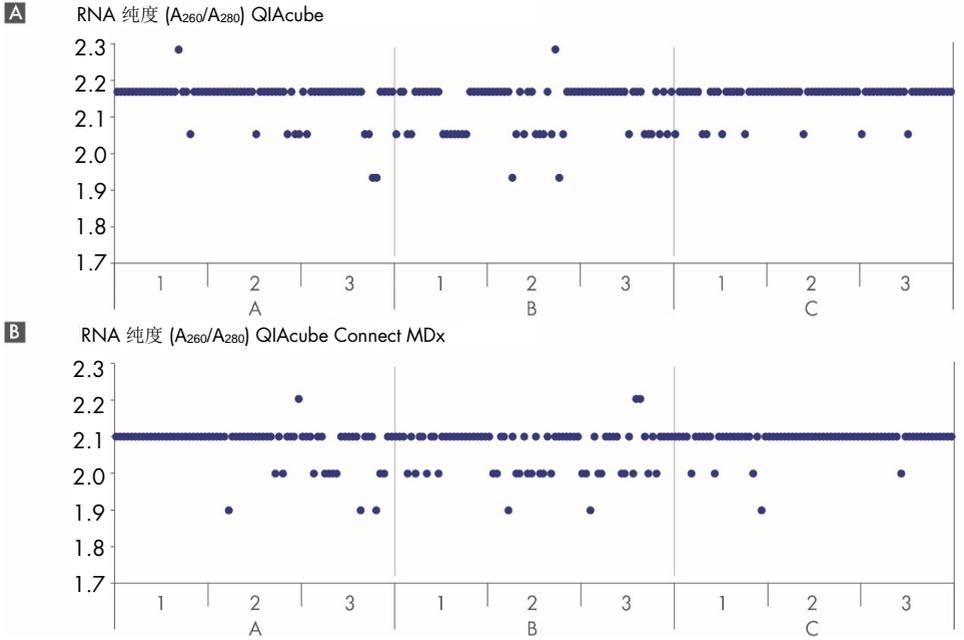
当使用多达 30% 的洗脱液时，至少 95% 的样本在 RT-PCR 中无抑制作用。使用自动化方案，通过定量实时 RT-PCR 对同一运行批次中 RNA 阴性样本（水）与配对 RNA 阳性样本（人体全血）的 ABL1 和 FOS 转录物序列进行检测，结果未检测到不同样本之间存在交叉污染。

不存在 RT-PCR 抑制作用且  $A_{260}/A_{280}$  值在 1.8 至 2.2 之间，从而证明使用 PAXgene Blood RNA System 和自动化方案分离得到的 RNA 是纯净的。通过定量 real-time PCR 对  $\beta$ -肌动蛋白基因序列进行测定显示， $\geq 95\%$  的样本中基因组 DNA 的含量  $\leq 1\%$  (w/w)。图 13 和图 14（第 33 页和第 34 页）显示了 3 名操作员使用 3 个试剂盒批次通过自动化方案制备的总共 216 份样本的  $A_{260}/A_{280}$  值和相对基因组 DNA 含量。

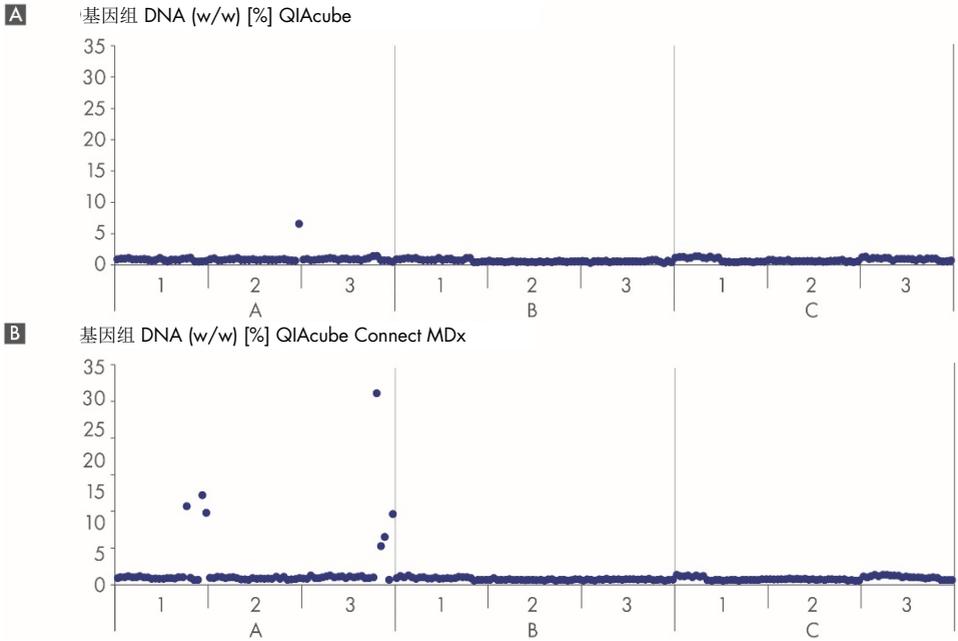
\* 整个方案运行时间，包括 PAXgene Blood RNA Tubes 的前期处理（离心、沉淀物洗涤和沉淀物重悬）。



**图 12.RNA 产量—自动化处理 A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx。**在 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 中采集来自各名供体的血样。将各个试管的内容物混合为 6 个供体混合血样, 然后重新分装。由 3 名不同的操作员 (A, B, C) 对总共 216 支试管 (即, 每个混合血样 36 支) 进行处理。每名操作员使用 3 个不同批次 (1, 2, 3) 的 PAXgene Blood RNA Kit 通过多功能 QIAcube 和 QIAcube Connect MDx 仪器对来自每个供体混合血样 (总共 6 个) 的一式四份样本进行自动提取和处理。显示了每个操作员-批次组合的所有单个样本的 RNA 产量。

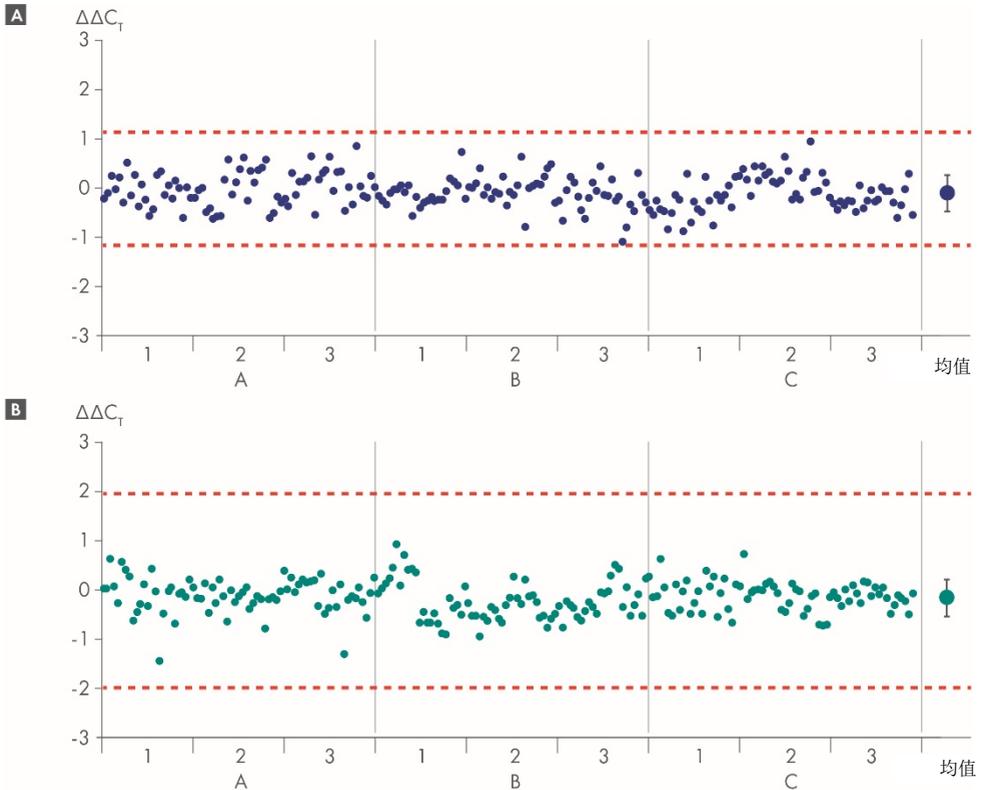


**图 13.** RNA 纯度 ( $A_{260}/A_{280}$  值) — 自动化处理。A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx 由 3 名不同的操作员 (A, B, C) 使用 3 个不同批次 (1, 2, 3) 的 PAXgene Blood RNA Kit 按照图 12 所示的实验方案通过多功能 QIAcube 和 QIAcube Connect MDx 仪器进行 RNA 纯化。显示了每个操作员-批次组合的所有单个样本的  $A_{260}/A_{280}$  值。

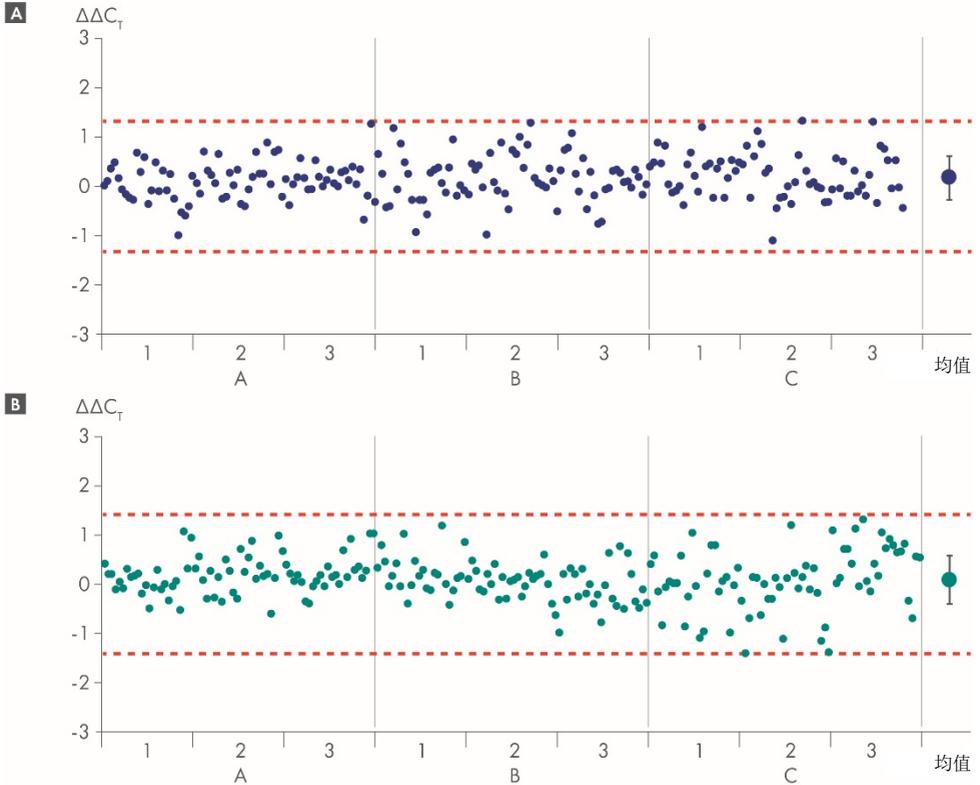


**图 14. RNA 纯度（基因组 DNA 污染百分比）—自动化处理，A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx。** 由 3 名不同的操作员 (A, B, C) 使用 3 个不同批次 (1, 2, 3) 的 PAXgene Blood RNA Kit 按照图 12 所示的实验方案通过多功能 QIAcube 和 QIAcube Connect MDx 仪器进行 RNA 纯化。显示了每个操作员-批次组合的所有单个样本的基因组 DNA 含量 (w/w)。

使用 PAXgene Blood RNA System 进行的自动化 RNA 纯化方案可提供高度可再现和可重复的 RT-PCR 结果，如图 15 和图 16（第 35 页和第 36 页）所示，使其对于临床诊断测试具有很高的稳健性。



**图 15. RT-PCR 的再现性 — 自动化 (QIAcube) 和手动方案之间。** 由 3 名不同的操作员 (A, B, C) 使用 3 个不同批次 (1, 2, 3) 的 PAXgene Blood RNA Kit 按照图 12 所示的自动化实验方案通过多功能 QIAcube 和 QIAcube Connect MDx 仪器进行 RNA 纯化。与此同时, 使用手动方案对相应的重复样本管进行 RNA 纯化。使用 18S rRNA 作为内标, 通过实时双通道 RT-PCR 测定 [A] FOS 和 [B] IL1B 的相对转录物水平。使用  $\Delta\Delta C_T$  方法计算通过两种提取方案 (自动化方案和手动方案) 利用配对血样制备的 RNA 之间可能存在的转录物水平差异。使用所有配对样本的单个  $\Delta\Delta C_T$  值 (4 个重复样本  $\times$  6 个供体混合血样  $\times$  3 个试剂盒批次  $\times$  3 名操作员 = 每种基因 216 对样本) 绘图, 显示了所有样本的均值 (大圆点) 和标准差 (黑线)。虚线表示所有检测的  $\pm 3$  倍总精密度 (FOS: 1.16  $C_T$ ; IL1B: 1.98  $C_T$ ) (由于检测版本不同, 与图 1-4、图 8 和图 9 相比具有不同的检测精密度)。



**图 16. RT-PCR 的再现性 — 使用自动化方案在 QIAcube 和 QIAcube Connect MDx 之间。** 由 3 名不同的操作员 (A, B, C) 使用 3 个不同批次 (1, 2, 3) 的 PAXgene Blood RNA Kiti 按照图 12 所示的自动化实验方案通过多功能 QIAcube 和 QIAcube Connect MDx 仪器进行 RNA 纯化。使用 18S rRNA 作为内标, 通过实时双通道 RT-PCR 测定 [A] FOS 和 [B] IL1B 的相对转录物水平。使用  $\Delta\Delta C_T$  方法计算通过两种仪器利用配对血样制备的 RNA 之间可能存在的转录物水平差异。使用所有配对样本的单个  $\Delta\Delta C_T$  值 (4 个重复样本  $\times$  6 个供体混合血样  $\times$  3 个试剂盒批次  $\times$  3 名操作员 = 每种基因 216 对样本) 绘图, 显示了所有样本的均值 (大圆点) 和标准差 (黑线)。虚线表示所有检测的  $\pm 3$  倍总精密密度 (FOS: 1.30  $C_T$ ; IL1B: 1.42  $C_T$ ) (由于检测版本不同, 与图 1-4、图 8、图 9 和图 15 相比具有不同的检测精密密度)。

# 由使用者提供的设备和试剂

工作中如接触化学品，则必须穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息，请参考相关的安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)，该表可从产品供应商处获得。

## 所有操作方案用材

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; 目录编号 762165)
- 乙醇 (96 - 100%, 纯度等级 p.a.)
- 移液器 \* (10  $\mu$ l - 4 ml)
- 无菌且不含 RNase 的气溶胶屏障吸头 †
- 量筒 ‡
- 离心机 \*, 离心力能够达到 3000 - 5000  $\times$  g, 并且配有外摆式转子和桶以容纳 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- 涡旋混合器 \*
- 碎冰
- 记号笔

## 手动操作方案用材

- 变速微型离心机 \*, 能够达到至少 1000 - 8000  $\times$  g 的离心力范围, 但可以使用更低和更高的离心力 (详细信息参见操作方案步骤), 并且配有用于 2 ml 微量离心管的转子
- 震荡孵育箱 §, 能够在 55°C 和 65°C 下孵育并且能够以  $\geq$ 400 rpm 但不超过 1400 rpm 的转速震荡 (例如 Eppendorf® Thermomixer Compact 或同等产品)

\* 确保已根据制造商的建议定期对设备和仪器进行了检查、维护和校准。

† 确保熟悉 RNA 处理指导原则 (附录 A, 第 66 页)。

‡ 用于向缓冲液 BR4 浓缩液中添加乙醇。

§ 确保已根据制造商的建议定期对设备和仪器进行了检查、维护和校准。

## 自动化操作方案用材（使用 QIAcube 或 QIAcube Connect MDx）

- 剪刀

### QIAcube 仪器耗材：

- Filter-Tips, 1000  $\mu$ l (1024) (QIAGEN, 目录编号 990352) \*
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, 目录编号 990393) †
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, 目录编号 990394) †

### QIAcube 仪器配件：

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, 目录编号 990392) †

## 使用 QIAcube Connect MDx 时的自动化操作方案用材

- QIAcube Connect MDx\* (QIAGEN, 目录编号 9003070)

### QIAcube Connect MDx 服务包：

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

## 使用 QIAcube 时的自动化操作方案用材

- QIAcube<sup>†</sup> (QIAGEN, 目录编号 9001882 [110 V])

\* 还包括在 Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, 目录编号 990395) 中。

† 确保已根据制造商的建议定期对设备和仪器进行了检查、维护和校准。

# 重要事项

## 使用 QIAcube 仪器

确保熟悉 QIAcube 仪器的操作。在开始自动化 PAXgene Blood RNA 操作方案之前，请阅读适当的 QIAcube 仪器用户手册以及 QIAcube 仪器随附的任何其他信息，并特别留意安全信息。

除非单独说明，否则本节中的说明同时适用于 QIAcube Connect MDx 和 QIAcube。

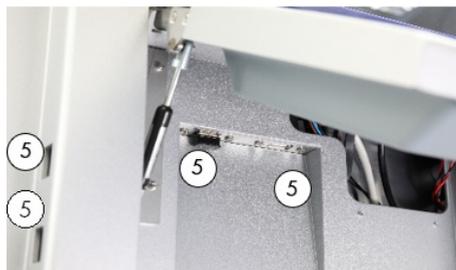
### 启动 QIAcube 仪器

关闭 QIAcube 仪器机罩，然后使用电源开关打开 QIAcube 仪器（QIAcube Connect MDx：参见图 17，第 40 页；QIAcube：图 18，第 41 页）。

蜂鸣器会发出声音，并显示启动屏幕。仪器将自动进行初始化测试。



QIAcube Connect MDx 的前视图



拉出式触摸屏



QIAcube Connect MDx 的后视图



QIAcube Connect MDx 的后视图

图 17. QIAcube Connect MDx 的外部特征。

- |   |  |
|---|--|
| <p>① 触摸屏</p> <p>② 机罩</p> <p>③ 废弃物抽屉</p> <p>④ 电源开关</p> | <p>⑤ 位于触摸屏左侧的 2 个 USB 端口；位于触摸屏后面的 2 个 USB 端口（Wi-Fi 模块已插入 1 个 USB 端口）</p> <p>⑥ RJ-45 以太网端口</p> <p>⑦ 电源线插座</p> <p>⑧ 冷却空气出口</p> |
|---|--|



图 18.QIAcube 的前视图。

- |   |                                      |   |                |
|---|--------------------------------------|---|----------------|
| ① | 触摸屏                                  | ④ | 位于防护板后的 USB 端口 |
| ② | 机罩                                   | ⑤ | 电源开关           |
| ③ | 位于防护板后的 RS232 串口（仅供 QIAGEN 仪器维修专家使用） | ⑥ | 废弃物抽屉          |

## 触摸屏

QIAcube 仪器使用触摸屏进行控制。触摸屏允许用户操作仪器并指导用户完成工作台设置。样本处理期间，触摸屏会显示操作方案状态和剩余时间。



图 19. QIAcube Connect MDx 的拉出式触摸屏

## 在 QIAcube 仪器上安装操作方案

在 QIAcube 仪器上进行首次 RNA 制备之前，可能需要进行初始操作方案安装。需要安装的操作方案包括“PAXgene Blood RNA Part A”（A 部分）和“PAXgene Blood RNA Part B”（B 部分）。

对于 QIAcube Connect MDx，操作方案的下载地址为 [www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources](http://www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources)（对于 QIAcube，下载地址为 [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube)），需要下载到 QIAcube 仪器随附的 U 盘中。这些操作方案将通过 USB 端口传输至仪器。

USB 端口（QIAcube Connect MDx：位于触摸屏侧面，参见图 17，第 40 页；QIAcube：位于防护板后面，参见图 18，第 41 页）可用于连接 QIAcube 仪器与 QIAcube 仪器随附的 U 盘。此外，也可通过 USB 端口将日志文件或报告文件等数据文件从 QIAcube 仪器传输至 U 盘。



USB 端口只能用于 QIAGEN 提供的 U 盘。请勿将其他设备连接到此端口。



请勿在下载操作方案、传输数据文件或操作方案运行期间拔出 U 盘。

有关将操作方案上传至 QIAcube 仪器过程的更多详细信息，请参阅所用仪器的相关手册。

## 加载 QIAcube 仪器

为了节省时间，可以在第 58 页“操作方案：从 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集的人体全血中自动纯化总 RNA”中的一个或两个 10 分钟离心步骤（第 3 步和第 5 步）期间执行加载。

### 试剂瓶

在 QIAcube 仪器上进行每个运行批次之前，请小心地向 4 个试剂瓶中装入表 3（第 44 页）中列出的试剂，直至达到最高指示液位，如果这不可行，则达到 PAXgene Blood RNA Kit 随附的缓冲液体积所允许的液位。使用缓冲液名称明确标识试剂瓶和瓶盖，并将装满的试剂瓶放入试剂瓶架的适当位置。如图所示（图 20 - 22，第 44 - 46 页）将试剂瓶架装载至 QIAcube 仪器工作台。



随附的缓冲液 BR2 的体积不会使试剂瓶填充到指示液位。在前几个运行批次中处理多个样本后，缓冲液 BR3 和 BR4 可能无法将试剂瓶填充到指示液位。



放入工作台之前，确保取下瓶盖。



PAXgene Blood RNA Kit (50) 随附的缓冲液体积足以在 QIAcube 仪器上进行最多 7 个 RNA 制备运行批次（每个运行批次 2 至 12 份样本）。一般而言，应该避免以较低的样本数量运行，以便每个试剂盒能够在最多 7 个 RNA 制备运行批次中总共处理 50 份样本。超过 7 个 RNA 制备运行批次可能会导致缓冲液体积不足以处理最后的样本。

表 3. 在试剂瓶架中的位置

位置	试剂
1	结合缓冲液 (BR2)
2	96 - 100% 乙醇
3	洗涤缓冲液 1 (BR3)
4	洗涤缓冲液 2 (BR4)*
5	- (留空)
6	- (留空)

\* 洗涤缓冲液 2 (BR4) 以浓缩液形式提供。首次使用前，按瓶身上说明添加 4 倍体积的乙醇（96 - 100%，纯度等级 p.a.）制备工作溶液。

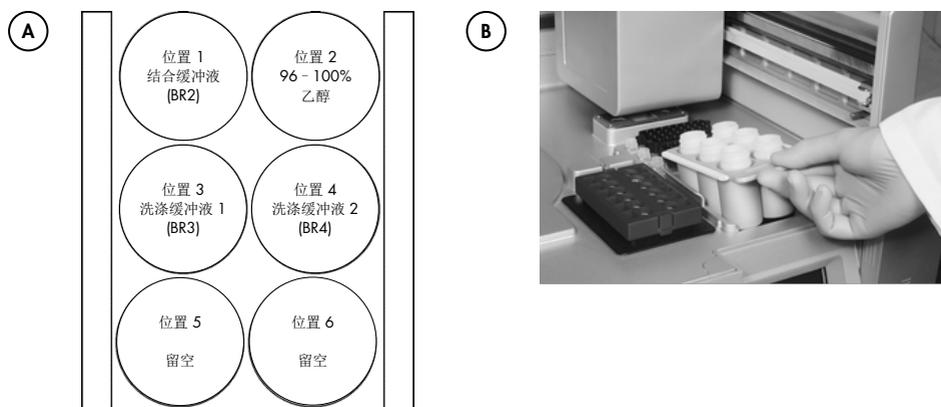


图 20. 装载试剂瓶架。[A] 试剂瓶在试剂瓶架中的位置以及内容的示意图。[B] 将试剂瓶架装载至 QIAcube 仪器（以 QIAcube 为例）。

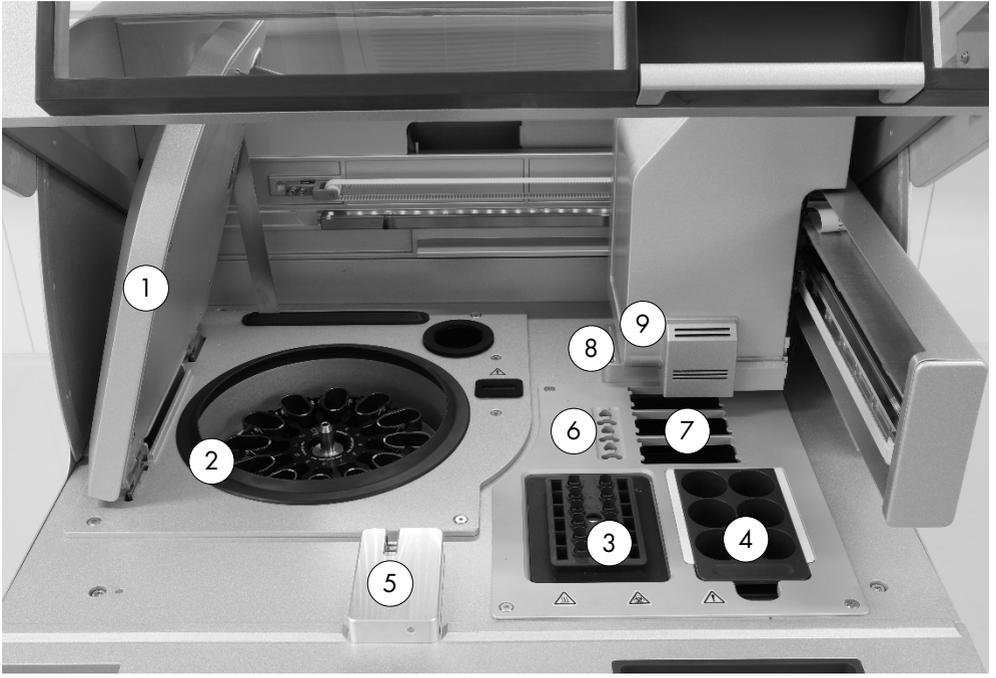


图 21. QIAcube Connect MDx 的内部视图。

- |   |  |
|---|--|
| <p>① 离心机盖子</p> <p>② 离心机</p> <p>③ 震荡器</p> <p>④ 试剂瓶架</p> <p>⑤ 吸头传感器和机罩锁</p> | <p>⑥ 微量离心管插槽</p> <p>⑦ 3 个吸头架插槽</p> <p>⑧ 吸头和柱处理槽</p> <p>⑨ 机械臂（包括 1 个通道移液器、机械爪、超声和光学传感器以及紫外 LED 灯）</p> |
|---|--|

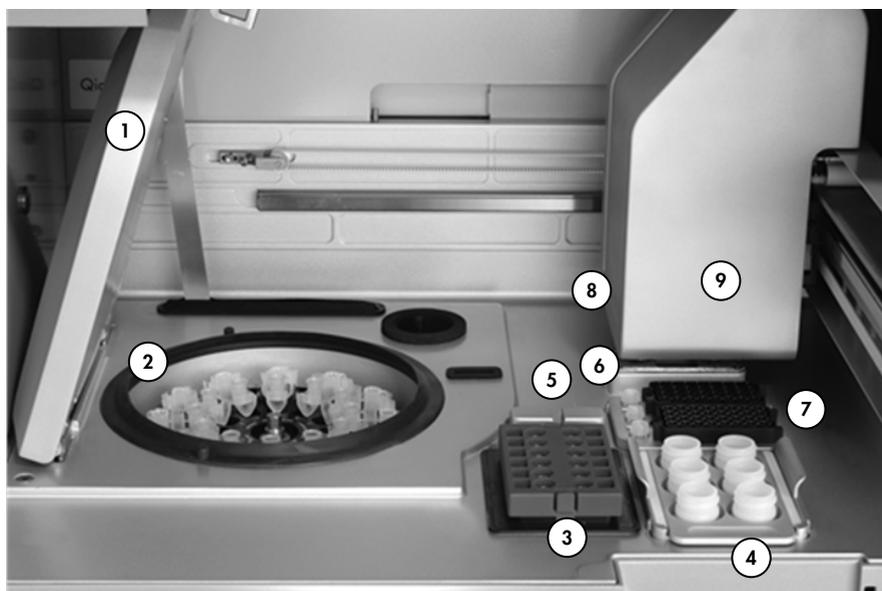


图 22.QIAcube 的内部视图。

- ① 离心机盖子
- ② 离心机
- ③ 震荡器
- ④ 试剂瓶架
- ⑤ 吸头传感器

- ⑥ 微量离心管插槽
- ⑦ 吸头架
- ⑧ 吸头和柱处理槽
- ⑨ 机械臂

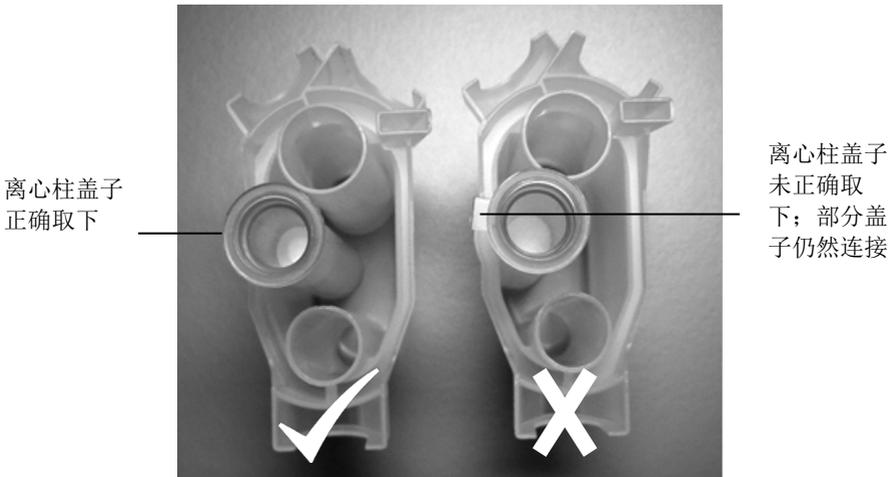
离心柱 (PRC, PSC)、微量离心管 (MCT) 和 QIAcube 仪器塑料器具

将 2 个装满 Filter-Tips 1000  $\mu$ l 的吸头架放在 QIAcube 仪器上（参见图 21 和图 22，第 45 页和第 46 页）。必要时，在吸头架上重新加装吸头。

 仅使用设计用于 QIAcube 仪器的 1000  $\mu$ l 过滤吸头。

使用记号笔标记每份样本的转子适配器和微量离心管 (MCT)。打开要使用的 PAXgene Shredder 离心柱 (PSC)，并用剪刀将盖子完全剪掉（参见图 23，第 47 页）。

 为了使 QIAcube 仪器机械爪正确操作，请完全去除（剪掉）PAXgene Shredder 离心柱 (PSC) 的盖子以及与盖子连接的所有塑料部件（参见图 23）。否则，机械爪将无法正确抓住离心柱 (PSC, PRC)。



**图 23. 装载 PAXgene Shredder 离心柱 (PSC)。** 将 PAXgene Shredder 离心柱 (PSC) 装载至转子适配器的中间位置。装载离心柱之前，请先剪掉盖子。

将 PAXgene RNA 离心柱 (PRC)、PAXgene Shredder 离心柱 (PSC；无盖，参见图 23，第 47 页) 以及标记好的微量离心管装载入每个标记好的转子适配器的适当位置，如表 4 和图 24 所示。



确保将离心柱 (PRC) 和微量离心管 (MCT) 的盖子沿转子适配器边缘完全向下推至插槽底部, 否则, 盖子在离心过程中会折断。

表 4. 转子适配器中的实验器具

位置	试剂	盖子的位置
1	PAXgene RNA 离心柱 (红色, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder 离心柱 (淡紫色, PSC) (在放入转子适配器之前先剪掉盖子)	-
3	微量离心管 (MCT)*	L3

\*使用 PAXgene Blood RNA Kit 中随附的微量离心管 (MCT; 1.5 ml)。

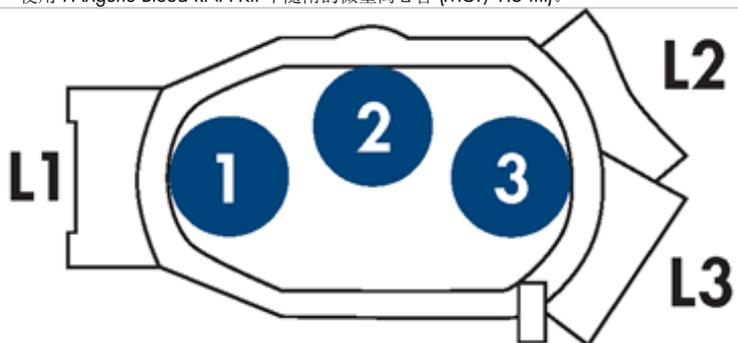


图 24. 在转子适配器中的位置。转子适配器具有三个试管位置 (1 - 3) 和三个盖子位置 (L1 - L3)。

## 加载离心机

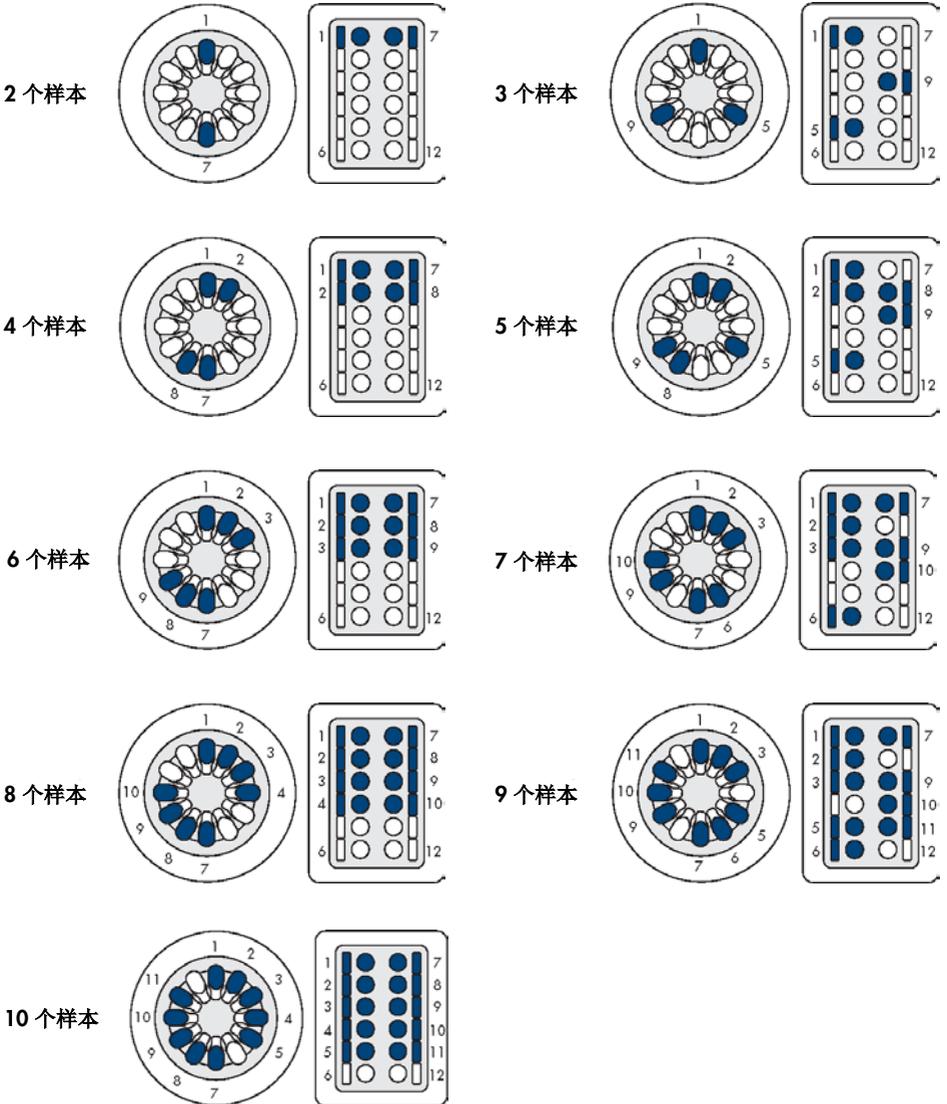
如下面的图 25 所示，将组装好的转子适配器装入离心机桶中。



如果处理的样本少于 12 个，请确保径向平衡加载离心机转子（参见图 26，第 50 页）。即便处理的样本少于 12 个，也必须在开始操作方案运行前安装所有离心机桶。无法处理 1 个样本或 11 个样本。



**图 25.加载 QIAcube 仪器上的离心机。** 将组装好的转子适配器装入离心机桶中（以 QIAcube Connect MDx 为例）。



**图 26. 加载离心机和震荡器。** 显示了用于处理 2 个到 10 个样本的离心机和震荡器的位置。无法处理 1 个样本或 11 个样本。在处理 12 个样本时，将加载所有离心机位置（图片未显示）。

## 处理管 (PT)

取出微量离心管插槽中先前运行批次剩余的所有处理管 (PT) (QIAcube Connect MDx: 参见图 21, 第 45 页; QIAcube: 参见图 22, 第 46 页)。根据运行批次中的样本数量, 使用表 5 中列出的试剂体积填充 3 个处理管 (PT)。

对于 DNase I 孵育混合物, 将指定体积的 DNA 消化缓冲液 (RDD) 移入处理管 (PT) 中, 然后添加指定体积的 DNase I (RNFD) 储备液。通过使用 1000  $\mu$ l 移液器吸头轻轻上下吹打 3 次使混合物完全混合。

使用 PAXgene Blood RNA Kit 中随附的 2 ml 处理管 (PT)。如表 6 (第 52 页) 所示, 在处理管上清楚地标明试剂名称, 然后将其放置在微量离心管插槽中的适当位置。



DNase I (RNFD) 对物理变性特别敏感。只能通过吹打进行混合, 使用大孔径移液器吸头可减少剪切力。请勿以旋涡方式混合。



确保仅吸取所需的体积, 如下面的表 5 所示。

表 5. 微量离心管插槽的处理管中所需的试剂体积。

样本数量	用于指定样本数量的试剂体积 ( $\mu$ l)		
	蛋白酶 K (PK)	DNase I 孵育混合物	洗脱缓冲液 (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 缓冲液 RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 缓冲液 RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 缓冲液 RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 缓冲液 RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 缓冲液 RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 缓冲液 RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 缓冲液 RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 缓冲液 RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 缓冲液 RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 缓冲液 RDD)	1177

**表 6. 微量离心管插槽**

	位置		
	A	B	C
内容物	蛋白酶 K	DNase I 孵育混合物	洗脱缓冲液 (BR5)
容器	处理管 (PT)*	处理管 (PT)*	处理管 (PT)*

\* 使用 PAXgene Blood RNA Kit 中随附的 2 ml 处理管。

# 操作方案：从 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集的人体全血中手动纯化总 RNA

## 实验开始前重要注意事项

- 确保试剂盒包装箱完好无损，并且缓冲液没有渗漏。请勿使用已损坏的试剂盒。
- 使用移液器时，请确保将其设置为正确的体积，然后小心且完全地吸取和分配液体。
- 为避免将样本转移至错误的试管或离心柱，请确保使用记号笔正确标记所有试管和离心柱。标记每个试管 (PT, MCT) 的盖子和管身。对于离心柱，请标记其处理管 (PT) 的管身。在转移液体后盖上每个试管或离心柱。
- 样本和缓冲液在操作过程中溅出可能会降低 RNA 的产量和纯度。
- 除非另有说明，否则该操作方案的所有步骤（包括离心步骤）均应在室温 (15 - 25°C) 下进行。

由于核酸扩增技术的敏感性，在处理样本时需要采取以下预防措施以避免交叉污染：

- 小心地将样本移入离心柱 (PRC, PSC) 中，不要弄湿离心柱的边缘。
- 两次液体转移之间，请务必更换移液器吸头。使用气溶胶屏障吸头。
- 避免移液器吸头碰到离心柱 (PRC, PSC) 薄膜。
- 涡旋混合或加热微量离心管 (MCT) 后，进行短暂离心以除去盖子内部的液滴。
- 在整个程序期间戴手套。如果手套接触到样本，立即更换手套。
- 在盖上盖子之后再把离心柱 (PRC, PSC) 放入微型离心机中。按照操作步骤中所述进行离心。
- 一次只打开一个离心柱 (PRC, PSC)，并注意避免产生气溶胶。
- 为了同时有效处理多个样本，将处理管 (PT) 装满架子，离心后可以将离心柱 (PRC, PSC) 转移到处理管上。丢弃使用过的含有流经液体的处理管 (PT)，然后将含有离心柱 (PRC, PSC) 的新处理管 (PT) 直接放入微型离心机中。

## 实验开始之前的准备事项

- 必须根据 *PAXgene Blood RNA Tube 手册* 中的说明使用 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集血液。如有必要，请参阅附录 C（第 69 页）以获取有关 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的操作建议。
- 确保采血后将 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 在室温下孵育至少 2 小时以确保血细胞完全裂解。将 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 孵育过夜可提高产量。如果采血后在 2 - 8°C、-20°C 或 -70°C 下储存 PAXgene Blood RNA Tube (BRT)，请先将其平衡至室温，然后在室温下放置 2 小时，然后再开始操作程序。
- 请阅读第 9 页上的安全信息。
- 请阅读有关处理 RNA 的指导原则（附录 A，第 66 页）。
- 确保已按照制造商的建议对仪器（例如移液器和震荡孵育箱）进行定期检查和校准。
- 在第 5 步和第 20 步中需要一个震荡孵育箱。将震荡孵育箱的温度设置为 55°C。
- 结合缓冲液 (BR2) 在储存期间可能形成沉淀。如有必要，加热至 37°C 以溶解沉淀。
- 洗涤缓冲液 2 (BR4) 以浓缩液形式提供。首次使用前，按瓶身上说明添加 4 倍体积的乙醇（96 - 100%，纯度等级 p.a.）制备工作溶液。
- 如果是首次使用不含 RNase 的 DNase 套件，请制备 DNase I 储备液。将固态 DNase I (RNFD; 1500 孔尼兹单位) \*溶解于套件随附的 550  $\mu$ l DNase 重悬缓冲液 (DRB)。开瓶时注意不要损失 DNase I (RNFD)。请勿涡旋混合复溶的 DNase I (RNFD)。DNase I 对物理变性非常敏感。仅应以轻轻倒置玻璃瓶的方式混合。
- 当前数据显示，复溶的 DNase I (RNFD) 可以在 2 - 8°C 下保存长达 6 周。为了长期保存 DNase I (RNFD)，请从玻璃瓶中取出储备液，将其分装为一次性使用的等分试样（使用试剂盒随附的 1.5 ml 微量离心管 [MCT]；足以分装为 5 份等分试样），可在 -20°C 下保存最长 9 个月。解冻后的等分试样可在 2 - 8°C 下最多储存 6 个月。请勿在解冻后重新冷冻等分试样。
- 复溶和分装 DNase I (RNFD) 时，请确保遵循处理 RNA 的指导原则（附录 A，第 66 页）。

\*孔尼兹单位是用于测量 DNase I 的常用单位，定义为在 25°C、pH 5.0 并且以高度聚合 DNA 作为底物的情况下，导致每毫升样本每分钟  $A_{260}$  增加 0.001 的 DNase I 含量 (Kunitz, M. (1950) *J. Gen.Physiol.* **33**, 349 和 363)。

## 操作步骤

1. 使用外摆式转子以 3000 – 5000 x g 的离心力将 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 离心 10 分钟。



确保 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 内的血样已在室温 (15 – 25°C) 下孵育至少 2 小时以实现血细胞的完全裂解。



转子必须包含用于圆底管的试管适配器。如果使用其他类型的试管适配器，试管在离心过程中可能会破裂。

2. 通过倾析或移液除去上清液。将 4 ml 不含 RNase 的水 (RNFW) 添加到沉淀物中，并使用新的辅助 BD Hemogard 瓶盖 (试剂盒随附) 封闭试管。

在倾析上清液时，请注意不要干扰沉淀物，并用干净的纸巾擦干试管边缘。

3. 涡旋混合直至沉淀明显溶解，并使用外摆式转子以 3000 – 5000 x g 的离心力离心 10 分钟。除去并丢弃全部上清液。

涡旋后但离心前残留在上清液中的微小碎屑不会影响操作。



未完全去除上清液会抑制裂解并稀释裂解物，从而影响 RNA 与 PAXgene 薄膜的结合条件。

4. 加入 350 µl 重悬缓冲液 (BR1) 并涡旋混合，直到沉淀物明显溶解为止。
5. 将样本吸取至 1.5 ml 微量离心管 (MCT) 中。加入 300 µl 结合缓冲液 (BR2) 和 40 µl 蛋白酶 K (PK)。涡旋混合 5 秒钟，然后使用震荡孵育箱以 400 – 1400 rpm 的转速在 55°C 下孵育 10 分钟。孵育后，将震荡孵育箱的温度设置为 65°C (第 20 步)。



在样本中加入结合缓冲液 (BR2) 和蛋白酶 K (PK) 之前，请勿将其混合在一起。

6. 将裂解物直接移入置于 2 ml 处理管 (PT) 内的 PAXgene Shredder 离心柱 (PSC; 淡紫色) 中，并以最大速度 (但不要超过 20,000 x g) 离心 3 分钟。



小心地将裂解物移入离心柱 (PSC) 内，并目视检查裂解物是否已完全转移至离心柱 (PSC)。

为防止损坏离心柱 (PSC) 和处理管 (PT)，离心力请勿超过 20,000 x g。



某些样本可能未经离心就流经 PAXgene Shredder 离心柱 (PSC)。这是由于某些样本的粘度偏低，不应将其视为产品故障的迹象。

- 小心地将流经液体的全部上清液转移到新的 1.5 ml 微量离心管 (MCT) 中，而不要干扰处理管中的沉淀物。
- 加入 350  $\mu$ l 乙醇 (96 - 100%，纯度等级 p.a.)。涡旋混合并短暂离心 (500 - 1000  $\times$  g, 1-2 秒) 以除去管盖内部的液滴。



离心时间不得超过 1-2 秒，因为这可能会导致核酸沉淀和降低总 RNA 产量。

- 将 700  $\mu$ l 样本移入置于 2 ml 处理管 (PT) 内的 PAXgene RNA 离心柱 (PRC; 红色) 中，并在 8000 - 20,000  $\times$  g 下离心 1 分钟。将离心柱 (PRC) 放在新的 2 ml 处理管 (PT) 内，并丢弃含有流经液体的旧处理管 (PT)。
- 将剩余的样本移入 PAXgene RNA 离心柱 (PRC) 中，并在 8000 - 20,000  $\times$  g 下离心 1 分钟。将离心柱 (PRC) 放在新的 2 ml 处理管 (PT) 内，并丢弃含有流经液体的旧处理管 (PT)。



小心地将样本移入离心柱 (PRC) 内，并目视检查样本是否已完全转移至离心柱 (PRC)。

- 将 350  $\mu$ l 洗涤缓冲液 1 (BR3) 移入 PAXgene RNA 离心柱 (PRC) 内。在 8000 - 20,000  $\times$  g 下离心 1 分钟。将离心柱 (PRC) 放在新的 2 ml 处理管 (PT) 内，并丢弃含有流经液体的旧处理管 (PT)。
- 将 10  $\mu$ l DNase I (RNFD) 储备液加入放置在 1.5 ml 微量离心管 (MCT) 内的 70  $\mu$ l DNA 消化缓冲液 (RDD) 中。轻弹离心管进行混合，并短暂离心以收集离心管侧壁的残留液体。  
例如，如果要处理 10 个样本，则将 100  $\mu$ l DNase I (RNFD) 储备液添加到 700  $\mu$ l DNA 消化缓冲液 (RDD) 中。使用试剂盒随附的 1.5 ml 微量离心管 (MCT)。



DNase I 对物理变性非常敏感。仅应轻弹试管进行混合。请勿以旋涡方式混合。

- 将 DNase I (RNFD) 孵育混合物 (80  $\mu$ l) 直接移取至 PAXgene RNA 离心柱 (PRC) 薄膜，并在试验台上放置 15 分钟 (20 - 30°C)。



确保将 DNase I (RNFD) 孵育混合物直接置于薄膜上。如果部分混合物接触并保留在离心柱 (PRC) 的壁或 O 形环上，则 DNase 消化将不完全。

- 将 350  $\mu$ l 洗涤缓冲液 1 (BR3) 移入 PAXgene RNA 离心柱 (PRC) 中，并在 8000 - 20,000  $\times$  g 下离心 1 分钟。将离心柱 (PRC) 放在新的 2 ml 处理管 (PT) 内，并丢弃含有流经液体的旧处理管 (PT)。

15. 将 500  $\mu\text{l}$  洗涤缓冲液 2 (BR4) 移入 PAXgene RNA 离心柱 (PRC) 中，并在 8000 - 20,000  $\times g$  下离心 1 分钟。将离心柱 (PRC) 放在新的 2 ml 处理管 (PT) 内，并丢弃含有流经液体的旧处理管 (PT)。



洗涤缓冲液 2 (BR4) 以浓缩液形式提供。使用前，请确保已将乙醇加入洗涤缓冲液 2 (BR4) 中（参见第 54 页的“实验开始之前的准备事项”）。

16. 将另外 500  $\mu\text{l}$  洗涤缓冲液 2 (BR4) 添加至 PAXgene RNA 离心柱 (PRC)。以 8000 - 20,000  $\times g$  的离心力离心 3 分钟。

17. 丢弃含流经液体的处理管 (PT)，并将 PAXgene RNA 离心柱 (PRC) 放入新的 2 ml 处理管 (PT) 中。以 8000 - 20,000  $\times g$  的离心力离心 1 分钟。

18. 丢弃含流经液体的处理管 (PT)。将 PAXgene RNA 离心柱 (PRC) 放入 1.5 ml 微量离心管 (MCT) 内，然后将 40  $\mu\text{l}$  洗脱缓冲液 (BR5) 直接移液至 PAXgene RNA 离心柱 (PRC) 薄膜上。以 8000 - 20,000  $\times g$  的离心力离心 1 分钟以洗脱 RNA。

使用洗脱缓冲液 (BR5) 润湿整个薄膜对于实现最高洗脱效率至关重要。

19. 使用 40  $\mu\text{l}$  洗脱缓冲液 (BR5) 和相同的微量离心管 (MCT)，按照第 18 步所述重复洗脱步骤。

20. 在不进行震荡的情况下，将洗脱液在震荡孵育箱内（来自第 5 步）在 65°C 下孵育 5 分钟。孵育后，立即在冰上冷却。

在 65°C 下孵育会使 RNA 变性以用于下游应用。请勿超过上述孵育时间或温度。

21. 如果 RNA 样本不立即使用，请在 -20°C 或 -70°C 下储存。

由于 RNA 在反复冻融后仍保持变性，因此无需在 65°C 下重复孵育。如果在诊断测定中使用 RNA 样本，请遵循制造商提供的说明。

要根据 260 nm 下的吸光率准确定量 RNA，我们建议使用 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 稀释样本\*。在不含 RNase 的水中稀释样本可能会导致数值不准确（偏低）。

使用与被测样本中相同比例的洗脱缓冲液 (BR5) 和 Tris-HCl 缓冲液组成的空白样本将分光光度计归零。洗脱缓冲液 (BR5) 在 220 nm 下具有高吸光率，如果分光光度计未正确归零，可能导致高背景吸光率水平。



要在 Tris HCl 缓冲液中进行定量，使用关系式  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ 。请参阅第 67 页的附录 B。

\* 工作中如接触化学品，则必须穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息，请参考相关的安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)，该表可从产品供应商处获得。

# 操作方案：从 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集的人体全血中自动纯化总 RNA

## 实验开始前重要注意事项

- 确保试剂盒包装箱完好无损，并且缓冲液没有渗漏。请勿使用已损坏的试剂盒。
- 使用移液器时，请确保将其设置为正确的体积，然后小心且完全地吸取和分配液体。
- 为避免将样本转移至错误的试管和塑料耗材，请确保使用记号笔正确标记所有处理管 (PT)、微量离心管 (MCT) 和转子适配器。标记每个微量离心管 (MCT) 的盖子和管身、每个处理管 (PT) 的管身以及每个转子适配器的外壁。
- 样本和缓冲液在操作过程中溅出可能会降低 RNA 的产量和纯度。
- 除非另有说明，否则该操作方案的所有步骤（包括离心步骤）均应在室温 (15 - 25°C) 下进行。

由于核酸扩增技术的敏感性，在处理样本时需要采取以下预防措施以避免交叉污染：

- 小心地将样本移入处理管 (PT)，注意要移入处理管的底部，而不要弄湿边缘。
- 两次液体转移之间，请务必更换移液器吸头。使用气溶胶屏障吸头。
- 避免移液器吸头碰到离心柱 (PRC, PSC) 薄膜。
- 涡旋混合或加热微量离心管 (MCT) 后，进行短暂离心以除去盖子内部的液滴。
- 在整个程序期间戴手套。如果手套接触到样本，立即更换手套。

## 实验开始之前的准备事项

- 必须根据 *PAXgene Blood RNA Tube 手册* 中的说明使用 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集血液。如有必要，请参阅附录 C（第 69 页）以获取有关 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的操作建议。

- 确保采血后将 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 在室温下孵育至少 2 小时以确保血细胞完全裂解。将 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 孵育过夜可提高产量。如果采血后在 2 - 8°C、-20°C 或 -70°C 下储存 PAXgene Blood RNA Tube (BRT)，请先将其平衡至室温，然后在室温下放置 2 小时，然后再开始操作程序。
- 请阅读第 9 页上的安全信息。
- 请阅读第 39 页的“重要事项”。
- 请阅读有关处理 RNA 的指导原则（附录 A，第 66 页）。
- 请阅读适当的 QIAcube 仪器用户手册以及 QIAcube 仪器随附的任何其他信息，并特别注意安全信息。
- 确保已按照制造商的建议对设备和仪器（例如移液器和 QIAcube 仪器）进行定期检查和校准。
- 结合缓冲液 (BR2) 在储存期间可能形成沉淀。如有必要，加热至 37°C 以溶解沉淀。
- 洗涤缓冲液 2 (BR4) 以浓缩液形式提供。首次使用前，按瓶身上说明添加适当体积的乙醇（96 - 100%，纯度等级 p.a.）制备工作溶液。
- 如果是首次使用不含 RNase 的 DNase I 套件，请制备 DNase I 储备液。将固态 DNase I (RNFD; 1500 孔尼兹单位) \*溶解于套件随附的 550 µl DNase 重悬缓冲液 (DRB)。开瓶时注意不要损失 DNase I (RNFD)。请勿涡旋混合复溶的 DNase I (RNFD)。DNase I 对物理变性非常敏感。仅应以轻轻倒置玻璃瓶的方式混合。
- 当前数据显示，复溶的 DNase I (RNFD) 可以在 2 - 8°C 下保存长达 6 周。为了长期保存 DNase I (RNFD)，请从玻璃瓶中取出储备液，将其分装为一次性使用的等分试样（使用试剂盒随附的 1.5 ml 微量离心管 [MCT]；足以分装为 5 份等分试样），可在 -20°C 下保存最长 9 个月。解冻后的等分试样可在 2 - 8°C 下最多储存 6 个月。请勿在解冻后重新冷冻等分试样。
- 复溶和分装 DNase I (RNFD) 时，请确保遵循处理 RNA 的指导原则（附录 A，第 66 页）。
- 安装正确的震荡器适配器（QIAcube 仪器随附；使用标记为“2”的 2 ml 安全锁定试管的适配器），然后将震荡器架放在适配器顶部。

\* 孔尼兹单位是用于测量 DNase I 的常用单位，定义为在 25°C、pH 5.0 并且以高度聚合 DNA 作为底物的情况下，导致每毫升样本每分钟  $A_{260}$  增加 0.001 的 DNase I 含量 (Kunitz, M. (1950) J. Gen.Physiol.33, 349 和 363)。

- 检查废弃物抽屉，必要时将其清空。
- 如果以前的运行批次尚未完成，请安装相关操作方案。QIAcube Connect MDx 需要安装待下载相关 zip 文件中的所有操作方案。对于经典型 QIAcube，需要安装的操作方案包括“PAXgene Blood RNA Part A”（A 部分）和“PAXgene Blood RNA Part B”（B 部分）。参见第 42 页的“在 QIAcube 仪器上安装操作方案”。

## 操作步骤

1. 关闭 QIAcube 仪器机罩，然后使用电源开关打开 QIAcube 仪器（QIAcube Connect MDx：参见图 17，第 40 页；QIAcube：参见图 18，第 41 页）。  
蜂鸣器会发出声音，并显示启动屏幕。仪器将自动进行初始化测试。
2. 打开 QIAcube 仪器机罩，然后将必要的试剂和塑料器具加载入 QIAcube 仪器。参见第 43 页的“加载 QIAcube 仪器”。  
为了节省时间，可以在随后的一个或两个 10 分钟离心步骤（第 3 步和第 5 步）中进行加载。
3. 使用外摆式转子以 3000 – 5000 x g 的离心力将 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 离心 10 分钟。
  -  确保 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 内的血样已在室温 (15 – 25°C) 下孵育至少 2 小时以实现血细胞的完全裂解。
  -  转子必须包含用于圆底管的试管适配器。如果使用其他类型的试管适配器，试管在离心过程中可能会破裂。
4. 通过倾析或移液除去上清液。将 4 ml 不含 RNase 的水 (RNFw) 添加到沉淀物中，并使用新的辅助 BD Hemogard 瓶盖（试剂盒随附）封闭试管。  
在倾析上清液时，请注意不要干扰沉淀物，并用干净的纸巾擦干试管边缘。
5. 涡旋混合直至沉淀明显溶解，并使用外摆式转子以 3000 – 5000 x g 的离心力离心 10 分钟。除去并丢弃全部上清液。  
涡旋后但离心前残留在上清液中的微小碎屑不会影响操作。
  -  未完全去除上清液会抑制裂解并稀释裂解物，从而影响 RNA 与 PAXgene 薄膜的结合条件。

6. 加入 350  $\mu$ l 重悬缓冲液 (BR1) 并涡旋混合, 直到沉淀物明显溶解为止。

7. 将样本吸取至 2 ml 处理管 (PT) 中。



使用 PAXgene Blood RNA Kit 中随附的 2 ml 处理管 (PT)。

8. 将含有样本并且已经打开的处理管 (PT) 装入 QIAcube 仪器震荡器中 (QIAcube Connect MDx: 参见图 21, 第 45 页; QIAcube: 参见图 22, 第 46 页)。样本位置已经编号, 便于装载。将 QIAcube 仪器随附的震荡器架塞子沿震荡器架边缘紧靠每个处理管插入插槽中。这样可以在装载检查期间检测样本。



确保已经安装正确的震荡器适配器 (Shaker Adapter, 2 ml, 安全锁定试管, 标记为“2”, QIAcube 仪器随附)。



如果处理的样本少于 12 个, 请确保按照第 50 页图 26 所示装载震荡器架。无法处理 1 个样本或 11 个样本。震荡器架内的位置编号与离心机中的位置编号相对应。

9. 关闭 QIAcube 仪表机罩 (QIAcube Connect MDx: 参见图 17, 第 40 页; QIAcube: 参见图 18, 第 41 页)。

10. 选择“PAXgene Blood RNA Part A” (A 部分) 操作方案并启动该方案。

请按照 QIAcube 仪器触摸屏上给出的说明进行操作。



确保两个程序部分 (A 部分和 B 部分) 都已安装在 QIAcube 仪器上 (参见第 42 页的“在 QIAcube 仪器上安装操作方案”)。



QIAcube 仪器将执行样本、吸头、转子适配器和试剂瓶的负载检查。

11. 完成“PAXgene Blood RNA Part A” (A 部分) 操作方案后, 打开 QIAcube 仪器机罩 (QIAcube Connect MDx: 参见图 17, 第 40 页; QIAcube: 参见图 18, 第 41 页)。从转子适配器中取出 PAXgene RNA 离心柱 (PRC) 并从震荡器中取出空的处理管 (PT) 然后丢弃。



在运行期间, 仪器会将离心柱从转子适配器位置 1 (盖子位置 L1) 转移到转子适配器位置 3 (盖子位置 L2) (参见图 24, 第 48 页)。

12. 关闭转子适配器中所有含纯化 RNA 的 1.5 ml 微量离心管 (MCT) 的盖子 (位置 3, 盖子位置 L3, 参见图 24, 第 48 页)。将 1.5 ml 微量离心管 (MCT) 转移到 QIAcube 仪器的振荡器适配器上 (QIAcube Connect MDx: 参见图 21, 第 45 页; QIAcube: 参见图 22, 第 46 页)。
13. 关闭 QIAcube 仪表机罩 (QIAcube Connect MDx: 参见图 17, 第 40 页; QIAcube: 参见图 18, 第 41 页)。
14. 选择 “PAXgene Blood RNA Part B” (B 部分) 操作方案并启动该方案。

请按照 QIAcube 仪器触摸屏给出的说明进行操作。



该程序可在 65°C 下孵育样本并使 RNA 变性以用于下游应用。即使下游应用包括热变性步骤, 也不要忽略此步骤。充分的 RNA 变性对于在下游应用中实现最大效率至关重要。

15. 完成 “PAXgene Blood RNA Part B” (B 部分) 程序后, 打开 QIAcube 仪器机罩 (QIAcube Connect MDx: 参见图 17, 第 40 页; QIAcube: 参见图 18, 第 41 页)。立即将装有纯化 RNA 的微量离心管 (MCT) 置于冰上。



警告: 高温表面。振荡器的温度可达 70°C。如果混合器温度很高, 请不要触碰。



请勿让纯化的 RNA 留在 QIAcube 仪器中。由于样本未经冷却, 因此纯化的 RNA 可能会降解。因此, 建议不要进行无人值守的过夜样本制备运行。

16. 如果 RNA 样本不立即使用, 请在 -20°C 或 -70°C 下储存。

由于 RNA 在反复冻融后仍保持变性, 因此无需重复进行加热孵育方案 (“PAXgene Blood RNA Part B”) (B 部分)。如果在诊断测定中使用 RNA 样本, 请遵循制造商提供的说明。

要根据 260 nm 下的吸光率准确定量 RNA, 我们建议在 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 中稀释样本\*。在不含 RNase 的水中稀释样本可能会导致数值不准确 (偏低)。

\* 工作中如接触化学品, 则必须穿着合适的实验工作服, 并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息, 请参考相关的安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS), 该表可从产品供应商处获得。

使用与被测样本中相同比例的洗脱缓冲液 (BR5) 和 Tris-HCl 缓冲液组成的空白样本将分光光度计归零。洗脱缓冲液 (BR5) 在 220 nm 下具有高吸光率，如果分光光度计未正确归零，可能导致高背景吸光率水平。



要在 Tris HCl 缓冲液中进行定量，使用关系式

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ 。请参阅第 67 页的附录 B。

17. 从 QIAcube 仪器工作台上取下试剂瓶架 (QIAcube Connect MDx: 参见图 21, 第 45 页; QIAcube: 参见图 22, 第 46 页)，然后使用带有适当标签的瓶盖封闭所有试剂瓶。试剂瓶中的缓冲液可以在室温 (15 - 25°C) 下最多存放 3 个月。去除 QIAcube 仪器微量离心管插槽内处理管 (PT) 中的剩余试剂并丢弃。从离心机上卸下转子适配器并丢弃。清空 QIAcube Connect MDx 废弃物抽屉 (QIAcube Connect MDx: 参见图 17, 第 40 页; QIAcube: 参见图 18, 第 41 页)。关闭 QIAcube 仪器机罩，并使用电源开关关闭仪器。

# 故障排除向导

故障排除向导能帮助解决可能出现的任何问题。如需更多信息，请参见我们技术支持中心的常见问答网页：[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx)。QIAGEN 技术服务部门的专家始终乐意为您解答有关本手册中的信息和操作步骤或样本和检测技术的问题（联系方式请参见最后一页或访问 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)）。

## 意见和建议

### RNA 被降解

#### RNase 污染



在操作步骤或以后的处理过程中，注意不要将任何 RNase 引入试剂中（参见第 66 页的附录 A）。

### RNA 产量低

a) PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 中采集的血量不足 2.5 ml



确保在 PAXgene Blood RNA Tube (BRT; 参见 *PAXgene Blood RNA Tube 手册*) 中采集 2.5 ml 血液。

b) 在水中测量 RNA 浓度



必须在 10 mM Tris-HCl, pH 7.5\* 中稀释 RNA 以进行准确定量（参见第 67 页的附录 B）。

c) 在手动操作方案的第 9 步和第 10 步中将细胞碎屑转移至 PAXgene RNA 离心柱 (PRC)



在手动操作方案的第 7 步中移取上清液时，避免转移较大的颗粒（转移小碎屑不会影响该操作步骤）。

d) 在第 3 步中未完全除去上清液



确保除去全部上清液。如果倾析上清液，应使用纸巾从 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 边缘拭去液滴。采取适当的预防措施以防止交叉污染。

\* 工作中如接触化学品，则必须穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息，请参考相关的安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)，该表可从产品供应商处获得。

## 意见和建议

- e) 使用 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 采样后，血液孵育不足 2 小时



采样后将血液在 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 中孵育至少 2 小时。

$A_{260}/A_{280}$  值低

- a) 使用水稀释 RNA 后进行  $A_{260}/A_{280}$  测量



在测量纯度之前，使用 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 稀释 RNA\* (参见第 67 页的附录 B)。

- b) 分光光度计未正确归零



使用与被测样本中相同比例的洗脱缓冲液 (BR5) 和 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 组成的空白样本将分光光度计归零。洗脱缓冲液 (BR5) 在 220 nm 下具有高吸光率，如果分光光度计未正确归零，可能导致高背景吸光率水平。

## 仪器故障

QIAcube 仪器无法正常运行

阅读相应 QIAcube 用户手册，特别注意“故障排除”部分。确保按照用户手册中的说明正确维护 QIAcube 仪器。

\* 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.

## 附录 A：有关 RNA 处理的一般说明

### RNA 处理



核糖核酸酶 (RNase) 是一种非常稳定且活跃的酶类，其作用功能的发挥一般不需要辅助因子。由于 RNase 难以灭活，且只需微量便足以降解 RNA，因此，在使用任何塑料制品或玻璃器具之前，请务必先消除可能存在的 RNase 污染。应非常小心地避免在纯化操作流程之中或之后在不经意间将 RNase 引入 RNA 样本。为了形成和保持一个不含 RNase 的环境，处理 RNA 时，在预处理过程中以及在使用一次性和非一次性容器和溶液时，必须采取预防措施。

### 一般处理



处理 RNA 时始终采用正确的微生物无菌操作技术。手和尘粒携带细菌和霉菌，且是最常见的 RNase 污染源。处理试剂和 RNA 样本时始终佩戴乳胶或塑料手套，以避免来自皮肤表面或多尘实验室设备的 RNase 污染。频繁更换手套并尽可能始终保持试管封闭。在为下游应用进行等分试样移液时，应将纯化的 RNA 置于冰上保存。

从玻璃器具和溶液中去 RNase 污染的方案可参见一般分子生物学指南，例如 Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press。

# 附录 B: 总 RNA 的定量和质量测定

## RNA 的定量

应通过使用分光光度计测量 260 nm 下的吸光率 ( $A_{260}$ ) 来确定 RNA 的浓度。为确保测量结果具有意义, 读数应在分光光度计的线性范围内。260 nm 下 1 个单位的吸光率对应每毫升 44  $\mu\text{g}$  的 RNA ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ )。该关系式仅对在 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 中测量时有效\*。因此, 如果有必要稀释 RNA 样本, 应在 10 mM Tris-HCl 中进行。如下所述 (参见第 68 页的“RNA 的纯度”), 260 和 280 nm 下的吸光率比值给出了 RNA 纯度的估计值。测量 RNA 样本时, 应确保比色杯不含 RNase。使用与被测样本中相同比例的洗脱缓冲液 (BR5) 和 Tris-HCl 缓冲液组成的空白样本将分光光度计归零。洗脱缓冲液 (BR5) 在 220 nm 下具有高吸光率, 如果分光光度计未正确归零, 可能导致高背景吸光率水平。RNA 定量所涉及的计算示例如下所示。

RNA 样本体积 = 80  $\mu\text{l}$

稀释度 (1/15) = 10  $\mu\text{l}$  RNA 样本 + 140  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl, pH 7.5

测量比色杯 (不含 RNase) 中稀释样本的吸光率。

$A_{260}$  = 0.3

样本浓度 = 44  $\times A_{260}$   $\times$  稀释因子。

= 44  $\times$  0.3  $\times$  15

= 198  $\mu\text{g/ml}$

总产量 = 浓度  $\times$  样本体积 (毫升)

= 198  $\mu\text{g/ml}$   $\times$  0.08 ml

= 15.8  $\mu\text{g}$  RNA

\* 工作中如接触化学品, 则必须穿着合适的实验工作服, 并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息, 请参考相关的安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS), 该表可从产品供应商处获得。

## RNA 的纯度

260 nm 和 280 nm 下的读数比值 ( $A_{260}/A_{280}$ ) 提供了 RNA 纯度相对于在 UV 中吸收的污染物（例如蛋白质）的估计值。但是， $A_{260}/A_{280}$  比值受 pH 的影响很大。较低的 pH 值会导致较低的  $A_{260}/A_{280}$  比值并降低对蛋白质污染的敏感性。\*为了获得准确的测量值，建议在 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 中测量吸光率。纯 RNA 在 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 中的  $A_{260}/A_{280}$  比值为 1.8 - 2.2。使用与被测样本中相同比例的洗脱缓冲液 (BR5) 和 Tris-HCl 缓冲液组成的空白样本将分光光度计归零。洗脱缓冲液 (BR5) 在 220 nm 下具有高吸光率，如果分光光度计未正确归零，可能导致高背景吸光率水平。

\* 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.

# 附录 C: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的处理



BD 的以下建议在处理 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 时可能会有所帮助。有关 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的更多信息, 请参阅 *PAXgene Blood RNA Tube 手册*。

## 去除 BD Hemogard 瓶盖的说明

1. 用一只手抓住 PAXgene Blood RNA Tube (BRT), 将拇指放在 BD Hemogard 瓶盖下方。(为增加稳定性, 请将手臂靠在坚固的表面上。)用另一只手扭动 BD Hemogard 瓶盖, 同时用拇指向上推动, 在管塞松开时立即收力。
2. 在提起瓶盖前先移开拇指。请勿用拇指推开 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 的瓶盖。警告: 如果 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 装有血液, 则存在暴露危险。为了防止在去除瓶盖过程中造成损伤, 一旦 BD Hemogard 瓶盖松开, 向上推动瓶盖的拇指就必须脱离 PAXgene Blood RNA Tube (BRT), 这一点非常重要。
3. 提起 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 的瓶盖。万一塑料护罩与橡胶塞分离, 请勿重新组装瓶盖。小心地从 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 上取下橡皮塞。

## 插入辅助 BD Hemogard 瓶盖的说明

1. 更换 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 的瓶盖。
2. 扭动并向下推动直到瓶塞完全就位。瓶塞必须完全重新插入, 以便瓶盖能够在处理过程中牢固地保留在 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 上。

# 订购信息

产品名称	内容物	目录编号
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 个 PAXgene Spin Column, 50 个 Shredder Spin Column, 处理管, 不含 RNase 的 DNase I, 不含 RNase 的试剂和缓冲液。与 PAXgene Blood RNA Tubes 配套使用	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 个采血管	762165
<b>可以从 QIAGEN 订购的相关产品</b>		
Starter Pack, QIAcube	试剂包包括: 试剂瓶架 (3); 试剂瓶架标记条 (8); 200 µl 过滤吸头 (1024); 1000 µl 过滤吸头 (1024); 1000 µl 大孔径过滤吸头 (1024); 30 ml 试剂瓶 (18); 转子适配器 (240); 转子适配器固定装置	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	一次性无菌过滤吸头, 镶入	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	带盖子的试剂瓶 (30 ml); 每包 6 个; 用于 QIAcube 仪器试剂瓶架	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	可用于 240 次制备: 240 个一次性转子适配器; 用于 QIAcube 仪器	990394
Reagent Bottle Rack	能够在 QIAcube 仪器工作台上容纳 6 x 30 ml 试剂瓶的架子	990390
Rotor Adapter Holder	适用于 12 个一次性转子适配器的固定装置; 用于 QIAcube 仪器	990392

产品名称	内容物	目录编号
<b>可以从 BD* 订购的相关产品</b>		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0.75 英寸 (0.8 × 19 mm) 针头, 带鲁尔接头的 12 英寸 (305 mm) 导管; 每盒 50 个, 每箱 200 个	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	外壳仅适用于直径 13 mm 和 16 mm; 1000 个/箱	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4.0 ml 采血管, 带有红色 BD Hemogard 瓶盖和纸质标签; 100 个/盒, 1000 个/箱	368975

\* 这些采血配件代表可与 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 配套使用的典型产品。要了解有关这些配件的更多信息, 包括订购方式, 请访问 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)。

有关最新许可信息以及产品特定免责声明, 请参阅相应的 PreAnalytiX 或 QIAGEN 试剂盒手册或用户手册。PreAnalytiX 和 QIAGEN 试剂盒手册及用户手册可从 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) 和 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 获得或向 PreAnalytiX 技术服务部门索取。

## 手册修订历史

文件和修订	更改	日期
HB-0101-004, R2	进行更改以使整个文件符合 GHS 法规	2015 年 6 月
HB-0101-005, R3	新模板；修订自动化操作方案和性能数据；更新安全信息以符合 GHS 法规；更改仪器详细信息和产品使用限制声明。	2019 年 2 月
HB-0101-006, R3	更正试剂盒内容物表 p. 5 中的试剂盒名称。	2020 年 1 月
HB-0101-007, R4	在自动化操作方案中添加 QIAcube Connect MDx；进行全文更新以包括对 QIAcube Connect MDx 的引用；更新全文的表和图编号以及页码。	2020 年 12 月

## PreAnalytiX 全球

PreAnalytiX 产品由 QIAGEN 和 BD 公司经销

### QIAGEN - 客户服务

订购: [www.QIAGEN.com/shop](http://www.QIAGEN.com/shop) | 技术支持: [support.qiagen.com](mailto:support.qiagen.com) | 网站: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

### BD - 客户服务

Argentina, Uruguay and Paraguay  
Orders: 0800.444.5523  
E-mail: [crc\\_argentina@bd.com](mailto:crc_argentina@bd.com)

Australia  
Orders: 1.800.656.100  
Fax: 1.800.656.110  
E-mail: [bd\\_anz@bd.com](mailto:bd_anz@bd.com)

Austria  
Orders: 43.1.7063660  
Fax: 43.1.706366011  
E-mail: [customercare.at@bd.com](mailto:customercare.at@bd.com)

Belgium  
Orders: 32.53.720.556  
Fax: 32.53.720.549  
E-mail: [orders.be@bd.com](mailto:orders.be@bd.com)

Brazil  
Orders: 0800.055.56.54  
E-mail: [consultoria\\_vacutainer@bd.com](mailto:consultoria_vacutainer@bd.com)

Canada  
Technical support: 1.800.631.0174  
Orders: 1.866.979.9408  
Fax: 1.800.565.0897  
E-mail: [customer.service.canada@bd.com](mailto:customer.service.canada@bd.com)

Central and Eastern Europe  
Orders: 48.22.377.11.11  
Fax: 48.22.377.11.02  
Bulgaria orders: [info\\_bulgaria@bd.com](mailto:info_bulgaria@bd.com)  
Czech Republic orders: [info\\_czech@bd.com](mailto:info_czech@bd.com)  
Croatia orders: [info\\_croatia@bd.com](mailto:info_croatia@bd.com)  
Hungary orders: [info\\_hungary@bd.com](mailto:info_hungary@bd.com)  
Poland orders: [info\\_poland@bd.com](mailto:info_poland@bd.com)  
Romania orders: [info\\_romania@bd.com](mailto:info_romania@bd.com)  
Southeast Europe orders: [info\\_balkan@bd.com](mailto:info_balkan@bd.com)  
Serbia orders: [info\\_serbia@bd.com](mailto:info_serbia@bd.com)  
Slovakia orders: [info\\_slovakia@bd.com](mailto:info_slovakia@bd.com)  
Slovenia orders: [info\\_slovenia@bd.com](mailto:info_slovenia@bd.com)

Denmark  
Orders: 45.43.43.45.66  
Fax: 45.43.96.56.76  
Orders: [ordre.dk@bd.com](mailto:ordre.dk@bd.com)  
Technical support: [bddenmark@bd.com](mailto:bddenmark@bd.com)

Finland  
Orders: 358.9.88.70.780  
Fax: 358.9.88.70.7816  
Orders: [tilaukset.fi@bd.com](mailto:tilaukset.fi@bd.com)  
E-mail: [bdsuomi@bd.com](mailto:bdsuomi@bd.com)

France  
Orders: 33.476.68.36.36  
Fax: 33.476.68.36.93  
E-mail: [serviceclientbdf@bd.com](mailto:serviceclientbdf@bd.com)  
Orders: [commandesfr@bd.com](mailto:commandesfr@bd.com)  
Technical support: [vacutainerfr@bd.com](mailto:vacutainerfr@bd.com)

Germany  
Orders: 49.6221.3050  
Fax: 49.6221.305.216  
E-mail: [customercare.de@bd.com](mailto:customercare.de@bd.com)

India  
Orders: 91.124.3949390  
Orders: [bd\\_india@bd.com](mailto:bd_india@bd.com)

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

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

Italy  
Orders: 39.02.48240.500  
Fax: 39.02.48240.775  
Technical support: 39.3450655140  
E-mail: [ordini.it@bd.com](mailto:ordini.it@bd.com)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



HB-0101-007 1122120CN BD-8945 12/2020  
德国产品