

Aralık 2020

# PAXgene® Blood RNA Kit El Kitabı

Sürüm 2



50 (katalog no. 762174)

R4 **MAT** 1122120TR

**REF**

762174

**IVD**

**CE**



PreAnalytiX GmbH  
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon  
PreAnalytiX için QIAGEN GmbH tarafından üretilmiştir

**PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

Ticari markalar: 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'ler tüm ülkelerde mevcut değildir; lütfen sorun.

#### **Sınırlı Lisans Anlaşması**

Bu ürünün kullanımı, herhangi bir alıcının veya PAXgene Blood RNA Kit kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. PAXgene Blood RNA Kit, yalnızca *PAXgene Blood RNA Kit El Kitabına* uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca Kit içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. PreAnalytiX, *PAXgene Blood RNA Kit El Kitabı* ve [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) adresinde bulunan ek protokollerde tanımlananlar dışında bu Kite dahil edilmemiş herhangi bir bileşen ile Kit içindeki bileşenleri kullanma veya birleştirme açısından herhangi bir fikri mülkiyet altında bir lisans vermez.
2. Açıkça ifade edilen lisansların haricinde, PreAnalytiX bu Kitin ve/veya kullanımının/kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediğine ilişkin herhangi bir garanti vermez.
3. Bu Kit ve bileşenleri bir kez kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez ya da tekrar satılamaz.
4. PreAnalytiX özellikle açıkça ifade edilenden haricinde açık veya zımni diğer lisansları kabul etmez.
5. Kitin alıcısı ve kullanıcısı, yukarıda yasaklanan herhangi bir eyleme neden olabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atmamayı veya başkasının atmasına izin vermemeyi kabul eder.
6. PreAnalytiX herhangi bir mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşmasının yasaklamalarını uygulattırabilir ve bu Sınırlı Lisans Anlaşmasını veya Kit ve/veya bileşenlerine ilişkin fikri mülkiyet haklarından herhangi birisini uygulamak için herhangi bir davada avukatlık ücretleri dahil soruşturma ve Mahkeme bedellerini geri alacaktır.

Güncelleştirilen lisans şartları için [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) adresine bakın.

#### **Şartlı Satış**

Mevcut ürün, US-7,270,953 ve US-7,682,790'ın belirli patent hakkı taleplerinin yanı sıra EP-1820793 B1 ve ürünün, PAXgene Blood RNA Tube'da örnek toplama sürecinde oluşan nükleik asit kompleksini işleme amacıyla kullanılmasına yönelik olarak bu patent hakkı taleplerinin yabancı eşdeğerleri kapsamında bir lisans ile temin edilir.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005-2020 PreAnalytiX GmbH, tüm hakları saklıdır.

**PreAnalytiX GmbH**

**Feldbachstrasse**

**CH – 8634 Hombrechtikon**

**İsviçre**

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

## **PreAnalytiX Distribütörleri**

PreAnalytiX ürünleri, PreAnalytiX için QIAGEN veya BD tarafından üretilmekte ve dağıtılmaktadır. Ürünler PreAnalytiX GmbH şirketinden sipariş edilemez.


Lütfen yerel PreAnalytiX distribütörünüzün irtibat bilgileri için son sayfaya bakın.

# İçerik

Kit İçeriği.....	5
Semboller .....	6
Saklama Koşulları.....	7
Kullanım Amacı .....	8
Ürün Kullanımı Sınırlamaları .....	8
Kalite Kontrol .....	9
Teknik Yardım .....	9
Güvenlik Bilgileri.....	10
Giriş.....	13
İlke ve prosedür.....	13
Örnek toplama ve stabilizasyonu .....	14
RNA konsantrasyonu ve saflaştırılması.....	19
Manuel RNA saflaştırma .....	19
Otomatik RNA saflaştırma.....	29
Kullanıcı Tarafından Sağlanacak Ekipman ve Reaktifler.....	38
Önemli Notlar .....	41
QIAcube cihazlarını kullanma.....	41
QIAcube cihazlarına protokol yükleme.....	44
QIAcube cihazlarını yükleme.....	45
Protokol: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) İçinde Toplanan İnsan Tam Kanından Total RNA'nın Manuel Saflaştırması.....	55

Protokol: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) İçinde Toplanan İnsan Tam Kanından Total RNA'nın Otomatik Saflaştırması .....	62
Sorun Giderme Kılavuzu .....	69
Ek A: RNA Muamelesiyle İlgili Genel Notlar .....	71
Ek B: Total RNA Kantifikasyonu ve Kalitesinin Belirlenmesi.....	72
Ek C: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) Kullanımı.....	74
Sipariş Bilgileri.....	75
EI Kitabı Revizyon Geçmişi .....	77

# Kit İçeriği

<b>PAXgene Blood RNA Kit</b>			<b>(50)</b>
<b>Katalog no.</b>			<b>762174</b>
<b>Terkip sayısı</b>			<b>50</b>
BR1	Resuspension Buffer (Resüspansiyon Tamponu)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Bağlama Tamponu)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Yıkama Tamponu 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Yıkama Tamponu 2 (konsantre))†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Elüsyon Tamponu)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (bottle) (RNaz İçermeyen Su (şişe))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinaz K (yeşil kapaklı))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA Döndürme Kolonları (kırmızı))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 ml) (İşleme Tüpleri (2 ml))	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Sekonder BD Hemogard™ Kapakları)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Mikrosantrifüj Tüpleri (1,5 ml))	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNaz I, RNaz içermeyen (lyofilize))	DNA REM	1500 Kunitz birimi*
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA Parçalama Tamponu (beyaz kapaklı))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (DNaz Resüspansiyon Tamponu (tüp, eflatun kapaklı))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (PAXgene Shredder Döndürme Kolonları (eflatun))	PAXgene SHRED COL	5 × 10
El Kitabı	PAXgene Blood RNA Kit El Kitabı (Versiyon 2)		1

\* amaşır suyu içeren dezenfektan reaktiflerle uyumlu değildir. Bir guanidin tuzu içerir. Güvenlik bilgileri için bkz. sayfa 10.

† Yıkama Tamponu 2 (BR4) konsantre olarak sağlanır. İlk defa kullanmadan önce bir çalışma solüsyonu oluşturmak için şişede belirtildiği üzere 4 hacim etanol (%96-100, safılık derecesi p.a.) ekleyin.

# Semboller



<N> testleri için yeterli reaktifleri içerir



Kullanma talimatlarına bakın



Son kullanma tarihi



İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz



Katalog numarası



Lot numarası



Materyal numarası



Bileşenler



Numara



Sterilizasyon yöntemi: Radyasyon kullanımı



Kunitz birimleri



Ekleme



İçerik



Sulandırılmış



Deoksiribonükleaz I

\* Kunitz üniteleri yaygın olarak DNaz I ölçümü için kullanılmaktadır. 25°C sıcaklıkta, pH 5,0'da substrat olarak yüksek ölçüde polimerize DNA kullanıldığında  $A_{260}$ 'ta bir mililitre için dakika başına 0,001 artışa yol açan DNaz I miktarı olarak tanımlanmaktadır (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ve 363).

EtOH

Etanol

GITC

Guanidin izotiyosiyanat

**RNase-Free DNase Set**

RNase-Free DNase Set

**GTIN**

Küresel Ticaret Parça Numarası



Tekrar kullanmayın



Sıcaklık sınırlaması



Üst sıcaklık sınırı



Üretici



Önemli not

## Saklama Koşulları

PAXgene RNA döndürme kolonları (PRC), PAXgene Shredder döndürme kolonları (PSC), proteinaz K (PK) ve tamponlar (BR1, BR2, BR3, BR4 ve BR5) kit etiketinde belirtilen sıcaklıkta kuru olarak saklanmalıdır.

DNaz I (RNFD), DNA parçalama tamponu (RDD) ve DNaz resüpsansiyon tamponu (DRB) içeren RNase-Free DNase Set ortam sıcaklığında sevk edilmektedir. RNaz İçermeyen DNaz Setinin tüm bileşenlerini alınız alınmaz etiket üzerinde belirtilen sıcaklıkta saklayın. Uygun şekilde saklandığında kit, kit kutusundaki son kullanma tarihine kadar stabildir.

# Kullanım Amacı

PAXgene Blood RNA System bir kan toplama tüpünden (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) ve nükleik asit saflaştırma kitinden (PAXgene Blood RNA Kit) oluşur. Kanın toplanmasına, saklanmasına ve taşınmasına, intraselüler RNA'nın kapalı bir t p içinde stabilizasyonuna ve bunları takiben moleküler diagnostik testlerde kullanılan RT-PCR için tam kandan konak RNA izolasyonu ve saflaştırılmasına yöneliktir.

**PAXgene Blood RNA System'in performans özellikleri sadece FOS ve IL1B gen transkriptleri ile belirlenmiştir. Diğer hedef transkriptler için uygun PAXgene Blood RNA System performans özelliklerini belirlemekten kullanıcı sorumludur.**

## Kullanım endikasyonları

PAXgene Blood RNA Kit, PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) toplanan tam kandan intraselüler RNA saflaştırılmasına yöneliktir. Kit, PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ile birlikte kullanıldığında sistem, moleküler diagnostik testlerde kullanılan RT-PCR için tam kandan saflaştırılmış intraselüler RNA sağlar.

##  r n Kullanımı Sınırlamaları

PAXgene Blood RNA Kit'in in vitro diagnostik uygulamalar için insan tam kanından ( $4,8 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^7$  lökosit/ml) intraselüler RNA'nın saflaştırılması için kullanılması amaçlanmıştır. İnsan tam kanından genomik DNA'nın veya viral nükleik asitlerin saflaştırılması için değildir. Stabilizasyon spesifikasyonları için doğrulanmış sınırlı sayıda transkript bulunması nedeniyle (FOS ve IL1B gen transkriptleri) performans özellikleri tüm transkriptler için belirlenmemiştir. Kullanıcılar diğer transkriptler için doğrulama gerekip gerekmediğini belirlemek üzere üretici verilerini ve kendi verilerini gözden geçirmelidir.



Ürünün, in vitro diagnostik prosedürler konusunda eğitilmiş teknisyenler ve doktorlar gibi profesyonel kullanıcılar tarafından kullanılması amaçlanmıştır.

PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) kullanımı hakkında bilgi için *PAXgene Blood RNA Tube El Kitabı* (PAXgene Blood RNA Tube Handbook) belgesine bakın.

## Kalite Kontrol

QIAGEN'in ISO Sertifikalı Kalite Yönetim Sistemine uygun olarak, her bir PAXgene Blood RNA Kit lotu, tutarlı ürün kalitesinin temin edilmesi için önceden belirlenmiş spesifikasyonlara göre test edilmiştir.

## Teknik Yardım

QIAGEN'de bizler, sağladığımız teknik desteğin kalitesi ve sürekliliği ile gurur duyuyoruz. Teknik Servis Bölümlerimiz moleküler biyoloji ve PreAnalytiX ürünlerinin kullanımı ile ilgili geniş pratik ve teorik uzmanlığa sahip deneyimli bilim insanlarından oluşmaktadır. PAXgene Blood RNA Kit ile ilgili sorularınız için lütfen bizimle irtibata geçmekten çekinmeyin.

Teknik yardım ve daha fazla bilgi için lütfen QIAGEN Teknik Servislerini arayın.

# Güvenlik Bilgileri

AB - Kullanıcılar cihazla ilişkili tüm ciddi olayları üreticiye ve Ulusal Yetkili Makama raporlamalıdır. AB Dışında - Cihazla ilişkili tüm olaylar veya sorular için yerel QIAGEN temsilcinizle irtibat kurun.

Kimyasallarla çalışırken, daima uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın.

Biyolojik veya kimyasal materyaller ile çalışırken enfeksiyon (örn. HIV veya hepatit B virüsleri nedeniyle) veya yaralanma risklerinden kaçınmak için daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheets, SDS'ler) başvurun. Bunlar, bu kit için SDS'leri bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) sayfasında kullanımı kolay ve kompakt PDF formatında çevrimiçi bulunmaktadır.

## DİKKAT



Örnek hazırlama atık maddesine doğrudan çamaşır suyu veya asit solüsyonları KATMAYIN.

Bağlama tamponu (BR2) veya yıkama tamponu 1 (BR3) çamaşır suyu ile birleştiğinde yüksek derecede reaktif bileşikler oluşturabilen guanidin tiyosiyanat içermektedir. Bağlama tamponu (BR2) ve yıkama tamponu 1 (BR3) dökülürse uygun laboratuvar deterjanı ve suyla temizleyin. Enfeksiyöz olabilecek ajanlar içeren sıvı dökülürse etkilenmiş bölgeyi önce laboratuvar deterjanı ve suyla ve sonra %1 (h/h) sodyum hipokloritle (çamaşır suyu) temizleyin.

PAXgene Blood RNA Tube'dan (BRT) RNA stabilize edici solüsyon ve kan karışımı, 9 hacim RNA stabilize edici solüsyon ve kan karışımı başına 1 hacim ticari çamaşır suyu solüsyonu (%5 sodyum hipoklorit) kullanılarak dezenfekte edilebilir.

RNA saflaştırma işlemindeki santrifüj basamaklarından süpernatantlar gibi örnek hazırlama atıklarının enfeksiyöz olabileceği kabul edilmektedir. Atılmadan önce atık, varsa enfeksiyöz materyali imha etme üzere otoklavlanmalı veya yakılmalıdır. Atma, resmi yönetmeliklere göre yapılmalıdır.

PAXgene Blood RNA Kit'in bileşenleri için aşağıdaki tehlike ve önlem ifadeleri geçerlidir. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) hakkında güvenlik bilgileri için *PAXgene Blood RNA Tube El Kitabı* belgesine bakın.

### Tampon BR2



İçerik: guanidin tiyosiyanat. Tehlike! Yutulursa zararlıdır. Cilde temas ederse veya solunursa zararlı olabilir. Ciddi göz hasarına neden olur. Sudaki organizmalara uzun dönemli etkilerle zararlıdır. Asitlerle temas çok toksik gaz ortaya çıkarır. Koruyucu eldivenler/ koruyucu giysiler/ göz koruması/ yüz koruması kullanın. GÖZE KAÇMIŞSA: Birkaç dakika suyla iyice durulayın. Eğer mevcut ve kolaysa kontak lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin. Hemen bir ZEHİR MERKEZİ veya doktoru arayın.

### Tampon BR3



İçerik: etanol; guanidin tiyosiyanat. Tehlike! Yanıcı sıvı ve buhar. Ciddi göz hasarına neden olur. Asitlerle temas çok toksik gaz ortaya çıkarır. Isı/kıvılcımlar/açık alevler/sıcak yüzeylerden uzak tutun. Sigara içmeyin. Koruyucu eldivenler/ koruyucu giysiler/ göz koruması/ yüz koruması kullanın. GÖZE KAÇMIŞSA: Birkaç dakika suyla iyice durulayın. Eğer mevcut ve kolaysa kontak lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin. Hemen bir ZEHİR MERKEZİ veya doktoru arayın.

## DNaz I



İçerik: DNaz. Tehlike! Alerjik cilt reaksiyonuna neden olabilir. Solunursa alerji veya astım belirtileri ya da solunum zorluklarına neden olabilir. Tozu/ buğuyu/ gazı/ dumanı/ buharı/ spreyi solumaktan kaçının. Koruyucu eldivenler/ koruyucu giysiler/ göz koruması/ yüz koruması kullanın. Solunum koruması kullanın. Maruz kalınması veya endişelenilmesi DURUMUNDA: Bir ZEHİR MERKEZİ veya doktoru arayın. Kişiyi temiz havaya çıkarın ve solunum için rahat bir pozisyonda istirahatte tutun.

## Proteinaz K



İçerik: proteinaz K. Tehlike! Hafif cilt tahrişine neden olur. Solunursa alerji veya astım belirtileri ya da solunum zorluklarına neden olabilir. Tozu/ buğuyu/ gazı/ dumanı/ buharı/ spreyi solumaktan kaçının. Koruyucu eldivenler/ koruyucu giysiler/ göz koruması/ yüz koruması kullanın. Solunum koruması kullanın. Maruz kalınması veya endişelenilmesi DURUMUNDA: Bir ZEHİR MERKEZİ veya doktoru arayın. Kişiyi temiz havaya çıkarın ve solunum için rahat bir pozisyonda istirahatte tutun.

# Giriş

Hücresel RNA'nın incelenmesi için tam kan alımı birçok moleküler tahlilin ilk adımıdır. Bununla birlikte, söz konusu deneylerdeki büyük sorunlardan biri, in vitro hücresel RNA profilinin stabil olmamasıdır. PreAnalytiX çalışmaları, tam kandaki ayrı mRNA türlerinin kopya sayısının oda sıcaklığında saklama veya taşıma sırasında 1000 kattan fazla değişebileceğini göstermiştir.\* Bunun nedeni kan alınmasından sonra hızlı RNA degradasyonu ve belirli genlerin indüklenen ekspresyonudur. RNA ekspresyonu profilindeki bu tür değişiklikler gen ekspresyonunun güvenilir çalışmalarını imkansız hale getirir. Bu nedenle flebotomi sırasında ve sonrasında RNA ekspresyon profilini koruyan bir yöntem insan tam kanında gen ekspresyonunun doğru analizi için şarttır.

## İlke ve prosedür

PreAnalytiX, intraselüler RNA saflaştırma için hızlı ve etkin bir protokolle birlikte insan tam kan numunelerinin toplanması, stabilize edilmesi, saklanması ve taşınmasını mümkün kılan bir sistem geliştirmiştir. Sistem, kan toplama ve RNA stabilizasyonu için PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; ABD Patentleri 6,602,718 ve 6,617,170) kullanılmasını ve sonrasında PAXgene Blood RNA Kit kullanılarak manuel veya otomatik RNA saflaştırmayı gerektirmektedir. RNA kalitesi ve verimi açısından manuel ve otomatik protokoller önemli ölçüde eşdeğer performans sağlar. Manuel protokol (sayfa 22-29) ve otomatik protokol (sayfa 31-35) için performans verileri bu el kitabına dahil edilmiştir.



QIAGEN QIAcube Connect MDx tüm ülkelerde mevcut değildir. Daha fazla ayrıntı için lütfen QIAGEN Teknik Servisi ile irtibat kurun.

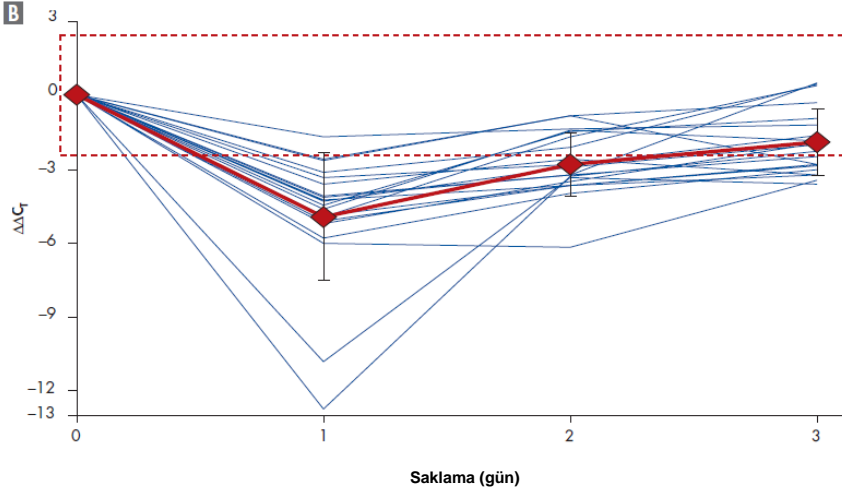
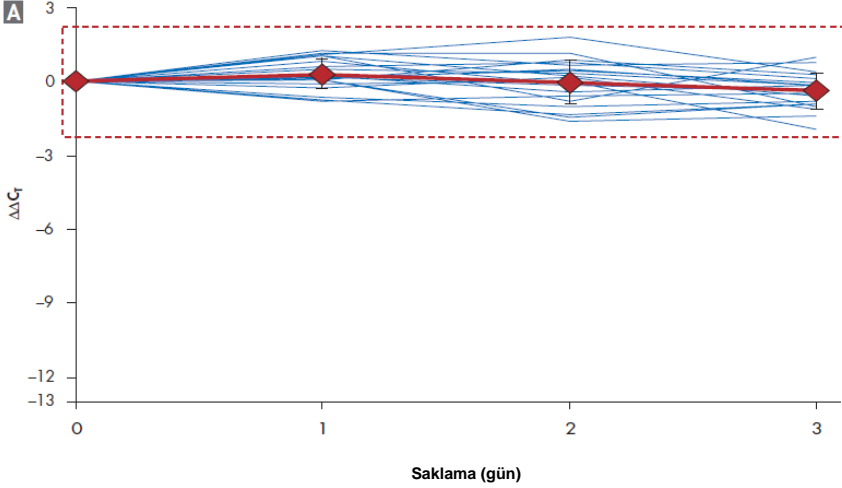
\* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

## Örnek toplama ve stabilizasyonu

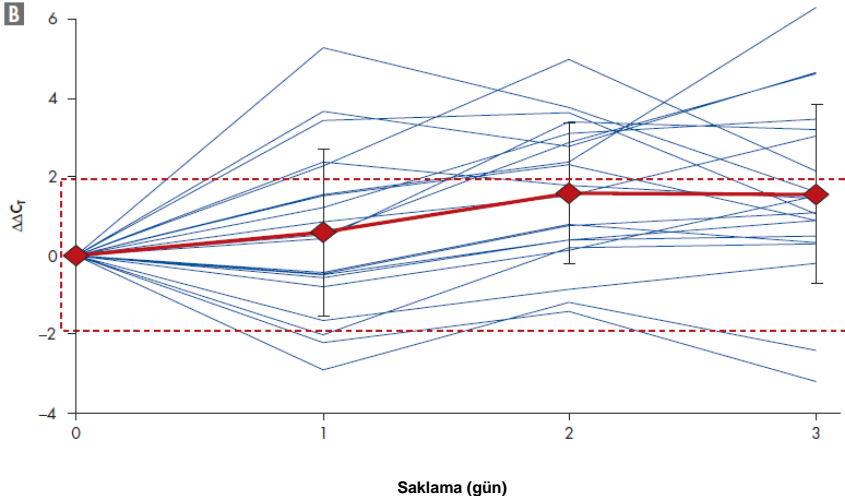
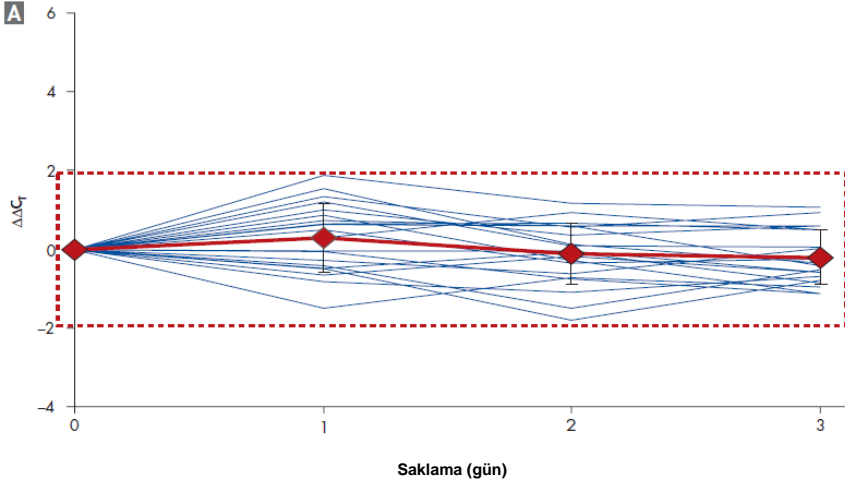
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), patentli RNA stabilizasyon teknolojisi temelinde tescilli bir reaktif bileşimi içerir. Bu reaktif bileşimi, RNA moleküllerini RNazlar tarafından degradasyondan korur ve gen ekspresyonunda ex vivo değişiklikleri minimuma indirir. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), insan tam kanının alınmasına ve 18-25°C'de 3 güne kadar (Şekil 1 ve 2, sayfa 15 ve 16) veya 2-8°C'de 5 güne kadar (Şekil 3 ve 4, sayfa 17 ve 18) hücresel RNA stabilizasyonu için kullanıma yöneliktir. Mevcut veriler, hücresel RNA'nın -20°C veya -70°C'de en az 11 yıl boyunca stabil olduğunu sergilemektedir\*. Daha uzun süreli stabilite değerlendirmesinin yapıldığı devam eden çalışmalar hakkında daha fazla bilgi için lütfen QIAGEN Teknik Servisleri ile iletişime geçin.

RNA stabilizasyonunun fiili süresi hücresel RNA'nın türüne göre ve kullanılan aşağı yönde uygulamaya göre değişebilir. Stabilizasyon spesifikasyonları için doğrulanmış sınırlı sayıda transkript bulunması nedeniyle (FOS ve IL1B gen transkriptleri) performans özellikleri tüm transkriptler için belirlenmemiştir. Kullanıcılar diğer transkriptler için doğrulama gerekip gerekmediğini belirlemek üzere üretici verilerini ve kendi verilerini gözden geçirmelidir.

\* PAXgene Blood RNA Tubes'da kan saklamaya ilişkin uzun dönemli bir çalışma devam etmektedir.

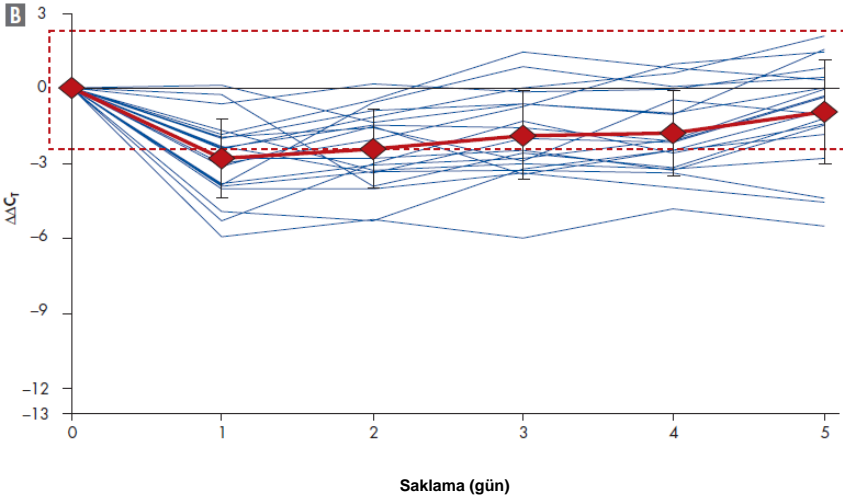
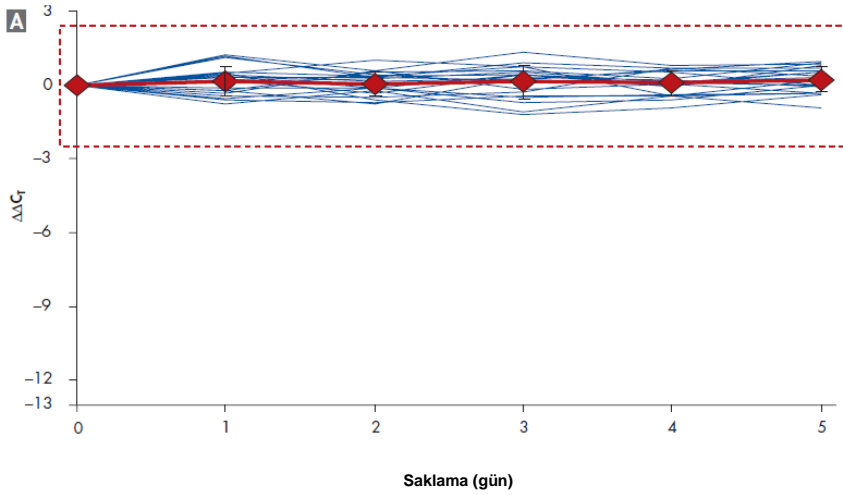


**Şekil 1. 18-25°C'deki kan örneklerinde RNA stabilitesi: FOS.** Kan, ikişer örnek halinde 10 donörden alınmış, belirtilen gün sayısı kadar 18-25°C'de saklanmış ve ardından total RNA saflaştırması gerçekleştirilmiştir. **[A]** Kan, PAXgene Blood RNA Tubes'da (BRT) toplanmış ve saklanmış ve total RNA, PAXgene Blood RNA Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. **[B]** Kan, antikoagülan olarak EDTA içeren standart kan toplama tüplerinde toplanmış ve saklanmış ve total RNA, silika membran bazlı RNA temizlemeyle standart organik ekstraksiyon yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. FOS için relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Tüm örnekler için değerler, gösterilen tüm örneklerin ortalamaları ve standart sapmaları ile grafiğe dökülmüştür. Kesik çizgiler tahlilin  $\pm 3x$  toplam kesinliğine işaret etmektedir ( $2,34 C_T$ ).

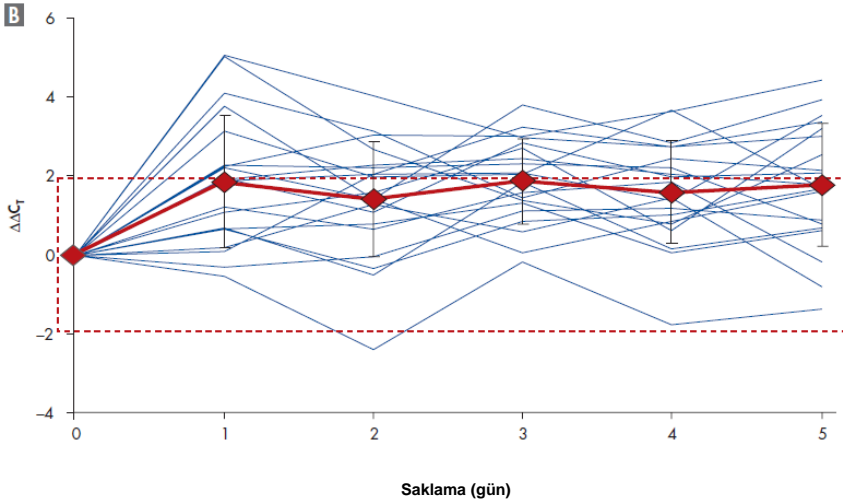
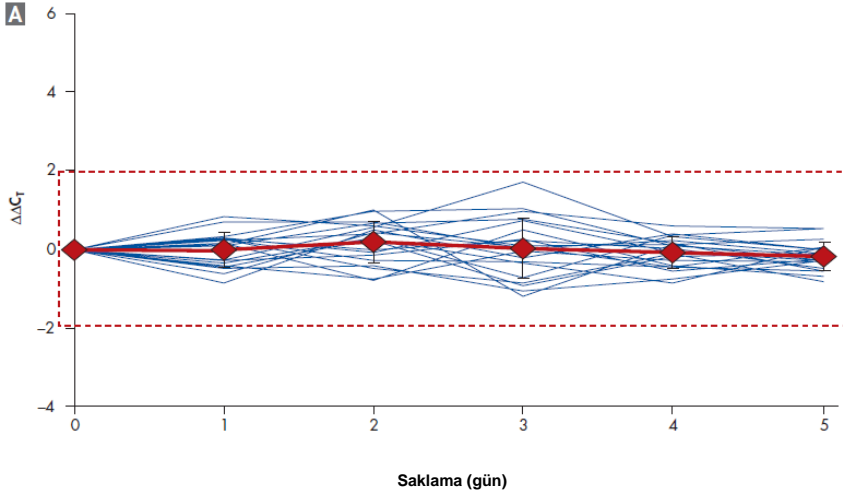


**Şekil 2. 18-25°C'deki kan örneklerinde RNA stabilitesi: IL1B.** Kan alınmış ve Şekil 1'de açıklandığı şekilde 18-25°C'de saklama sonrasında total RNA saflaştırılmıştır. IL1B'nin relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Tüm örnekler için değerler, gösterilen tüm örneklerin ortalamaları ve standart sapmaları ile grafiğe dökülmüştür. Kesik çizgiler tahlilin  $\pm 3x$  toplam kesinliğine işaret etmektedir (1,93  $C_T$ ).





**Şekil 3. 2-8°C'deki kan örneklerinde RNA stabilitesi: FOS.** Kan, ikiyeşer örnek halinde 10 donörden alınmış, belirtilen gün sayısı kadar 2-8°C'de saklanmış ve ardından total RNA saflaştırması gerçekleştirilmiştir. **[A]** Kan, PAXgene Blood RNA Tubes'da (BRT) toplanmış ve saklanmış ve total RNA, PAXgene Blood RNA Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. **[B]** Kan, antikoagülan olarak EDTA içeren standart kan toplama tüplerinde toplanmış ve saklanmış ve total RNA, silika membran bazlı RNA temizlemeyle standart organik ekstraksiyon yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. FOS için relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Tüm örnekler için değerler, gösterilen tüm örneklerin ortalamaları ve standart sapmaları ile grafiğe dökülmüştür. Kesik çizgiler tahlilin  $\pm 3x$  toplam kesinliğine işaret etmektedir (2,34 C<sub>t</sub>).



**Şekil 4. 2-8°C'deki kan örneklerinde RNA stabilitesi: IL1B.** Kan alınmış ve Şekil 3'te açıklandığı şekilde 2-8°C'de saklama sonrasında total RNA saflaştırılmıştır. IL1B'nin relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Tüm örnekler için değerler, gösterilen tüm örneklerin ortalamaları ve standart sapmaları ile grafiğe dökülmüştür. Kesik çizgiler tahilin  $\pm 3x$  toplam kesinliğine işaret etmektedir (1,93 C<sub>T</sub>).

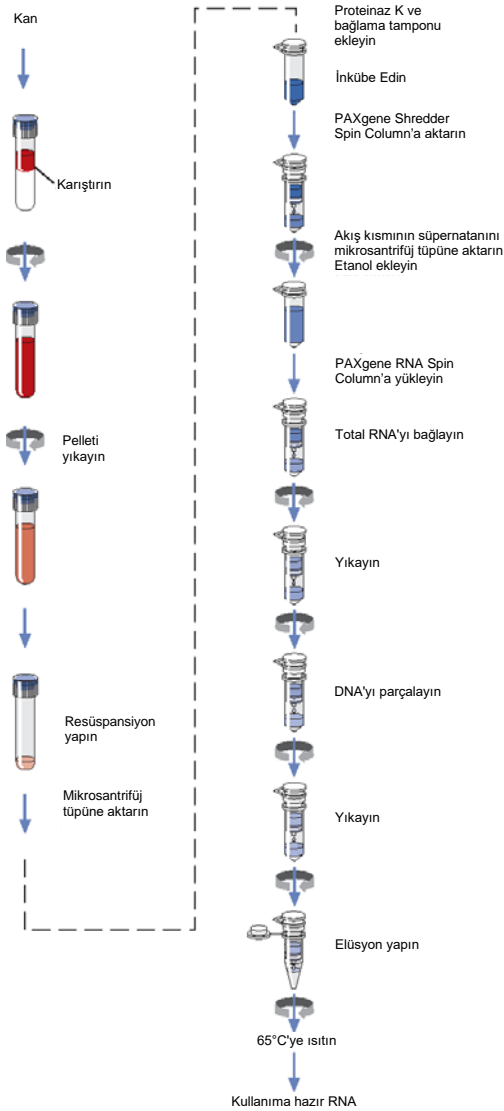
## RNA konsantrasyonu ve saflaştırılması

PAXgene Blood RNA Kit, bir PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) toplanmış 2,5 ml insan tam kanından total RNA'nın saflaştırılmasına yöneliktir. Prosedür basittir ve manuel veya otomatik prosedürler kullanılarak yapılabilir (bkz. Şekil 5 ve 10, sayfa 20 ve 30). Her iki protokolda saflaştırma, nükleik asitleri PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) pellet haline getirmek için bir santrifüjleme adımıyla başlar. Pellet yıkanır, resüspanse edilir ve sonrasında manuel veya otomatik RNA saflaştırma yapılır. Prensipte olarak, her iki protokol aynı kit bileşenleriyle aynı protokol adımlarını izler.

### Manuel RNA saflaştırma

Ayrıntılı olarak, resüspanse edilmiş pellet, protein parçalanmasını sağlamak üzere proteinaz K (PK) ile birlikte optimize edilmiş tamponlarda inkübe edilir. Hücre lizatını homojenleştirmek ve kalan hücre kalıntılarını gidermek üzere PAXgene Shredder döndürme kolonu (PSC) üzerinden ek bir santrifüjleme yapılır ve akış fraksiyonunun süpernatanı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. Bağlama koşullarını ayarlamak için etanol eklenir ve bir PAXgene RNA döndürme kolonuna (PRC) lizat eklenir. Kısa bir santrifüjleme sırasında RNA, kontaminanların içinden geçmesi sırasında PAXgene silika membranına selektif olarak bağlanır. Kalan kontaminanlar birkaç etkin yıkama adımında giderilir. Birinci ve ikinci yıkama adımları arasında membrana, eser miktarda bağlanmış DNA'yı gidermek üzere DNaz I (RNFD) uygulanır. Yıkama adımlarından sonra RNA, elüsyon tamponunda (BR5) elüsyona tabi tutulur ve ısıyla denatüre edilir.

PAXgene Blood RNA System kullanılarak izole edilen total RNA saftır. Manuel protokol kullanılarak, beta aktin geninin bir sekansının kantitatif ve real-time PCR işlemiyle ölçüldüğü şekilde,  $A_{260}/A_{280}$  değerlerinin 1,8 ile 2,2 arasında olduğu ve tüm örneklerin  $\geq 95\%$ 'inde  $\leq 1$  (a/a) genomik DNA bulunduğu belirlenmiştir. Örneklerin en az  $95\%$ 'i, elüatın  $30\%$ 'una kadarı kullanılırken RT-PCR'de inhibisyon göstermez.

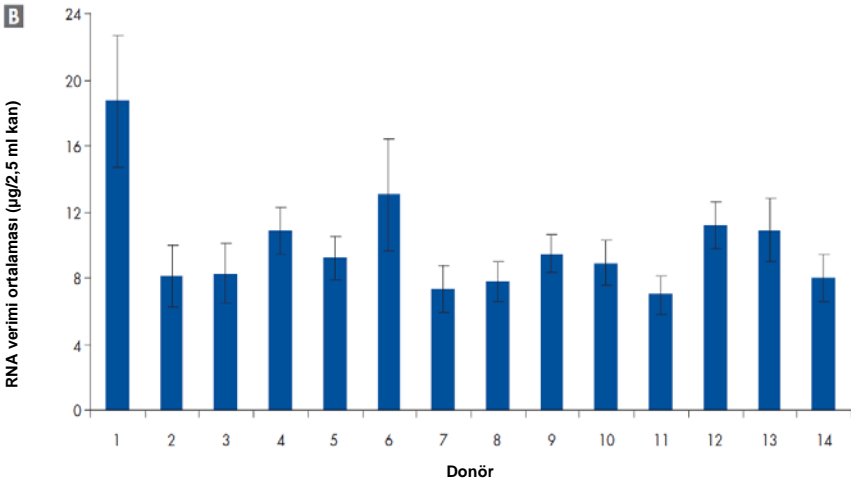
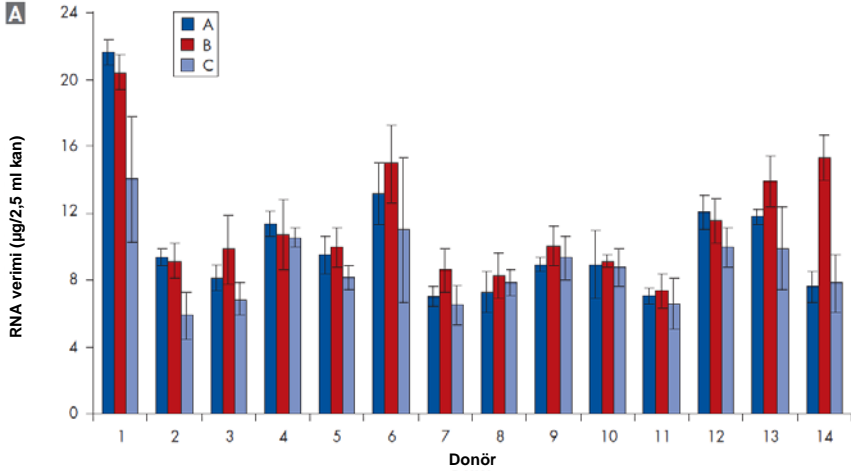


**Şekil 5. Manuel PAXgene Blood RNA prosedürü.**

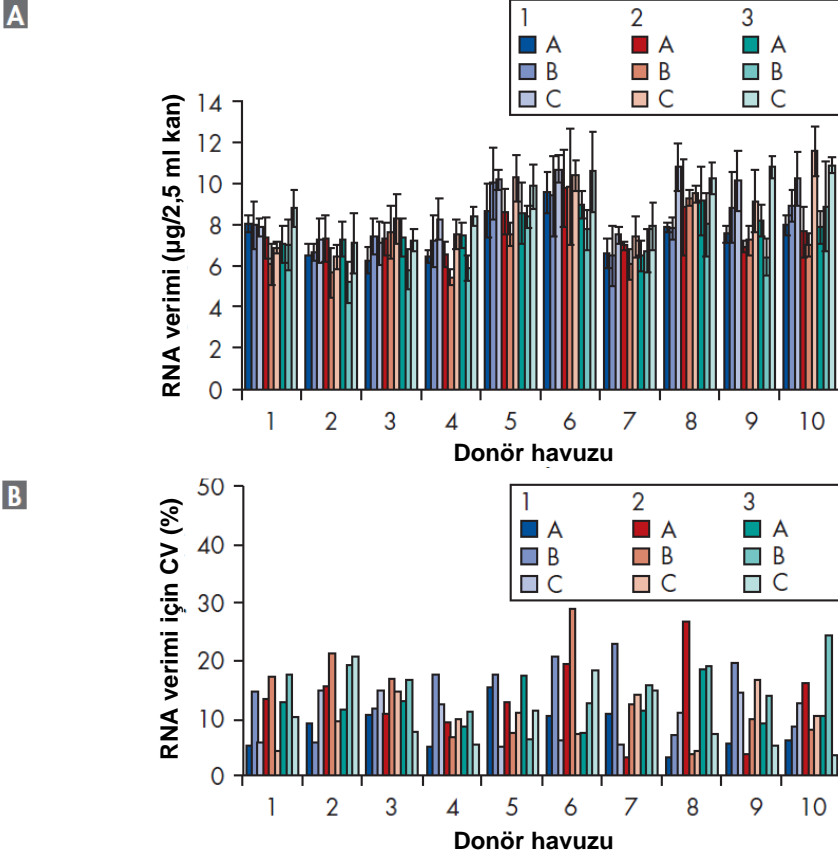
Manuel protokol kullanılarak, ortalama örnek hazırlama süresi (12 örnek hazırlama çalışmasından verilere dayalı olarak) yaklaşık 90 dakika olmaktadır\* ve bunun sadece 40 dakikası orada bulunmayı gerektirir. 2,5 ml sağlıklı insan tam kanından RNA verimi, işlenen örneklerin  $\geq 95$ 'i için  $\geq 3$   $\mu\text{g}$  değerindedir. Verimler donöre yüksek ölçüde bağımlı olduğundan bireysel verimler farklılık gösterebilir. Bireysel donörler için PAXgene Blood RNA System yüksek ölçüde yeniden üretilebilir ve tekrarlanabilir verimler (Şekil 6 ve 7, sayfa 22 ve 23) ve yeniden üretilebilir ve tekrarlanabilir RT-PCR (Şekil 8 ve 9, sayfa 27 ve 28) verir ve böylece klinik diagnostik testler için yüksek ölçüde güçlüdür.

Şekil 6 (sayfa 22), PAXgene Blood RNA System'in genel tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirliğini göstermektedir. Farklı PAXgene Blood RNA kiti lotları ve farklı kullanıcıların RNA veriminin ve gerçek zamanlı RT-PCR performansının yeniden üretilebilirliği üzerine etkisini göstermek üzere ek çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar için ayrı PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) yerine birleştirilmiş kan örnekleri kullanıldığından sonuçlar, sistemin ayrı kan alımları arasındaki oynama dahil olmak üzere tekrarlanabilirliğini yansıtmaz ve sadece örnek hazırlamanın tekrarlanabilirliğini yansıtır (bkz. Şekil 7, sayfa 23).

\* PAXgene Blood RNA Tubes başlangıç işlemleri (santrifüjleme işlemleri, pellet yıkama ve pellet resüspansiyonu) dahil olmak üzere toplam protokol çalışma süresi.



**Şekil 6. Yeniden üretilebilir ve tekrarlanabilir RNA saflaştırma.** 14 donörden dörtlü kan örnekleri, 3 teknisyenin (A, B, C) her biri tarafından manuel olarak işlenmiştir. Üç ekipman seti kullanılmış ve tek bir teknisyen tarafından hazırlanan tüm örnekler aynı ekipman kullanılarak işlenmiştir. **[A]** Aynı donörlerden ve farklı teknisyenlerle replikat örnek başına RNA veriminin ortalaması ve standart sapmaları gösterilmiştir. **[B]** 14 donörün her birinden on iki replikat kan örneği, 3 farklı teknisyen tarafından işlenmiştir. Aynı donörlerden ve tüm teknisyenlerin işlediği örneklerin RNA veriminin ortalamaları ve standart sapmaları sunulmaktadır. Tüm RNA örnekleri için  $A_{260}/A_{280}$  oranları 1,8 ile 2,2 arasında değişmiştir.



**Şekil 7. Birleştirilmiş kan örnekleri kullanılarak farklı operatörler ve PAXgene Blood RNA Kiti lotları için RNA veriminin tekrarlanabilirliği ve yeniden üretilebilirliği.** 30 farklı donörden kan örnekleri, PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, donör başına 12 tüp, toplamda 360 tüp) içinde toplanmıştır. 3 donörden tüplerin içeriği birleştirilmiş ve sonra 36 örneğe tekrar bölünmüştür. 3 donör havuzu başına bu 36 örnek, 3 farklı operatör tarafından manuel olarak işlenmiştir. Her bir operatör, ekstraksiyon için 3 farklı PAXgene Blood RNA Kit lotu kullanmış ve 10 donör havuzunun her birinden dörtlü örnekleri işlemiştir. **[A]** Her operatör-lot kombinasyonu için RNA verimi ve standart sapma. 10 donör havuzundan dörtlü kan örnekleri, 3 farklı operatör (A, B, C) tarafından 3 kit lotunun (1, 2, 3) her biri ile işlemiştir. Aynı donör havuzundan farklı operatör ve farklı kit lotu için dörtlü örnek başına ortalama verimler (kolonlar) ve standart sapmalar (hata çubukları) sunulmaktadır. **[B]** Tüm operatör-lot kombinasyonları (A, B, C; 1, 2, 3) için ortalama verim ile verimin standart sapmasından hesaplandığı şekilde donör havuzu başına RNA veriminin CV'si Şekil 7A'da gösterilmiştir.

**Tablo 1A. Seçilen donör havuzları için her lot içinde ve kullanıcı içinde yeniden üretilebilirlik (1, 6, 9, 10)**

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



**Tablo 1B. Seçilen donör havuzlarından (1, 6, 9, 10) her kullanıcı içinde ve tüm lotlar arasında yeniden üretilebilirlik**

Verilerin kombinasyonu	Donör havuzu 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> hücre/ml			Donör havuzu 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> hücre/ml		
	Ortalama verim (µg)	SS (µg)	CV (%)	Ortalama verim (µg)	SS (µg)	CV (%)
Kullanıcı A, tüm lotlar	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Kullanıcı B, tüm lotlar	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Kullanıcı C, tüm lotlar	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Verilerin kombinasyonu	Donör havuzu 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> hücre/ml			Donör havuzu 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> hücre/ml		
	Ortalama verim (µg)	SS (µg)	CV (%)	Ortalama verim (µg)	SS (µg)	CV (%)
Kullanıcı A, tüm lotlar	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Kullanıcı B, tüm lotlar	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Kullanıcı C, tüm lotlar	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

**Tablo 1C. Seçilen donör havuzlarından (1, 6, 9, 10) her lot içinde ve tüm kullanıcılar arasında yeniden üretilebilirlik**

Verilerin kombinasyonu	Donör havuzu 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> hücre/ml			Donör havuzu 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> hücre/ml		
	Ortalama verim (µg)	SS (µg)	CV (%)	Ortalama verim (µg)	SS (µg)	CV (%)
Lot 1, tüm kullanıcılar	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lot 2, tüm kullanıcılar	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lot 3, tüm kullanıcılar	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Verilerin kombinasyonu	Donör havuzu 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> hücre/ml			Donör havuzu 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> hücre/ml		
	Ortalama verim (µg)	SS (µg)	CV (%)	Ortalama verim (µg)	SS (µg)	CV (%)
Lot 1, tüm kullanıcılar	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lot 2, tüm kullanıcılar	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lot 3, tüm kullanıcılar	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

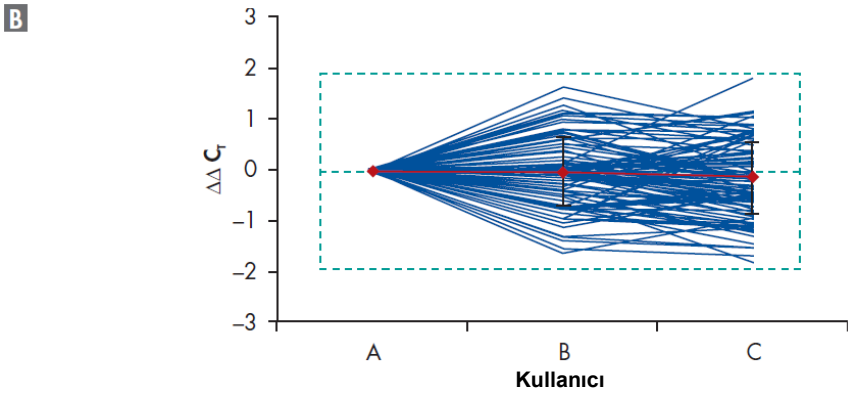
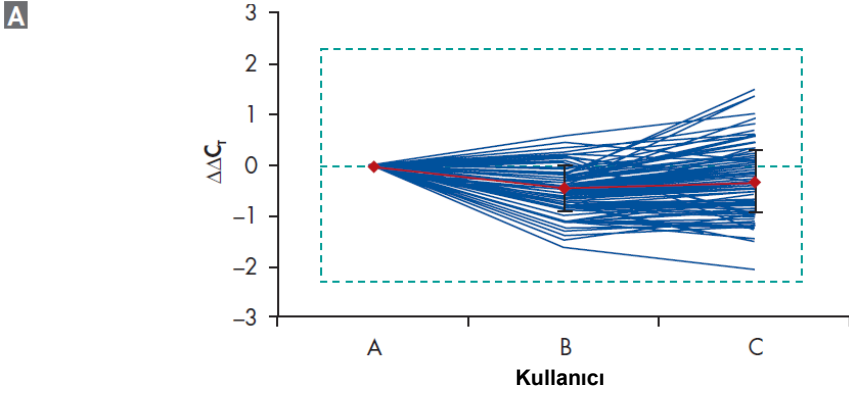
**Tablo 1D. Seçilen donör havuzlarından (1, 6, 9, 10) tüm lotlar ve tüm kullanıcılar arasında yeniden üretilebilirlik**

Verilerin kombinasyonu	Donör havuzu 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> hücre/ml			Donör havuzu 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> hücre/ml		
	Ortalama verim (µg)	SS (µg)	CV (%)	Ortalama verim (µg)	SS (µg)	CV (%)
Lot 1, tüm kullanıcılar	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

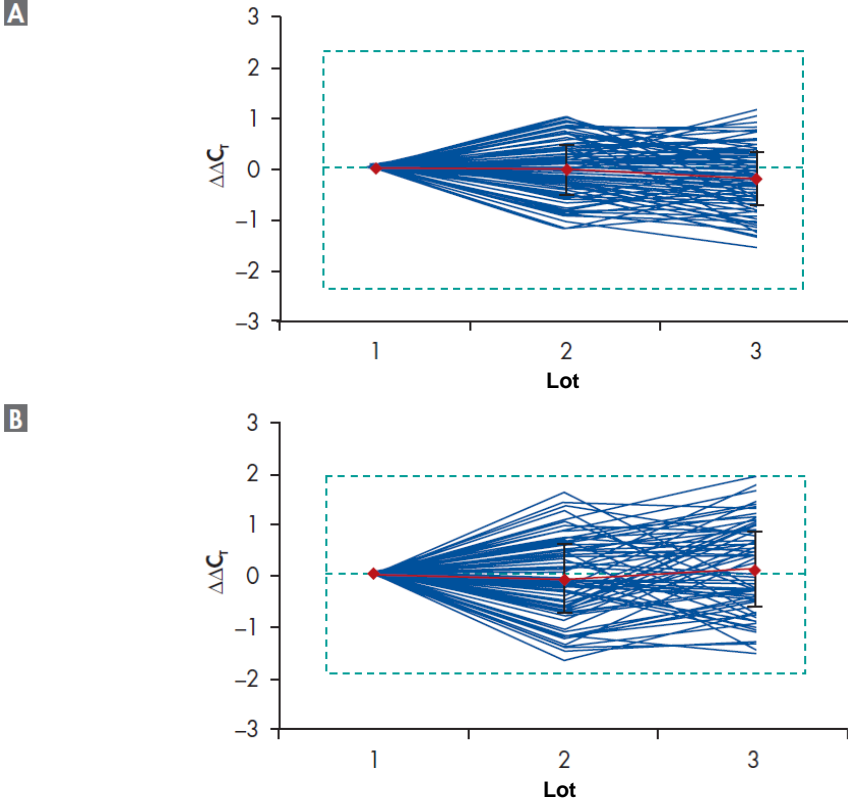
  

Verilerin kombinasyonu	Donör havuzu 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> hücre/ml			Donör havuzu 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> hücre/ml		
	Ortalama verim (µg)	SS (µg)	CV (%)	Ortalama verim (µg)	SS (µg)	CV (%)
Lot 1, tüm kullanıcılar	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

4 temsili donör havuzunun ayrıntılı analizi. Havuzlar lökosit sayımına göre seçilmiştir ve normal lökosit sayımı aralığının ( $4,8 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^7$  lökosit/ml) üst, orta ve alt değerlerini yansıtmaktadır. Lökosit sayımı, donör havuzu başına 3 donörden 3 lökosit sayımının ortalama değerini temsil etmektedir.



**Şekil 8. Kullanıcılar arasında RT-PCR yeniden üretilebilirliği.** Gerçek zamanlı RT-PCR için Şekil 7'de tanımlanan deneyde saflaştırılmış RNA kullanılmıştır. **[A]** FOS ve **[B]** IL1B relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Tüm örnekler için değerler, kullanıcı A değerlerine relatif olarak (10 donör havuzu x 3 kit lotu x 4 replikat = her gen için 120 veri seti) grafiğe dökülmüş ve ortalamalar (kırmızı çizgiler) ile standart sapmalar (siyah çubuklar) tüm örnekler için gösterilmiştir. Kesik çizgiler tahlillerin  $\pm 3x$  total kesinliğine işaret etmektedir (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).



**Şekil 9. Kit lotları arasında RT-PCR yeniden üretilebilirliği.** Gerçek zamanlı RT-PCR için Şekil 7’de tanımlanan deneyde saflaştırılmış RNA kullanılmıştır. **[A]** FOS ve **[B]** IL1B relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Tüm örnekler için değerler, kit lotu 1 değerlerine relatif olarak (10 donör havuzu x 3 kullanıcı x 4 replikat = her gen için 120 veri seti) grafiğe dökülmüş ve ortalamalar (kırmızı çizgiler) ile standart sapmalar (siyah çubuklar) tüm örnekler için gösterilmiştir. Kesik çizgiler tahlillerin  $\pm 3x$  total kesinliğine işaret etmektedir (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).

Tablo 2. Şekil 8 ve 9'dan RT-PCR verilerinin özeti

Test sistemi	FOS/18S rRNA tahlili		IL1B/18S rRNA tahlili	
	Ortalama ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SS ( $\Delta\Delta C_T$ )	Ortalama ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SS ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>Her kullanıcı içinde ve tüm lotlar arasında yeniden üretilebilirlik</b>				
Tüm kullanıcılar, lot 1 – lot 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Tüm kullanıcılar, lot 1 – lot 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Tüm kullanıcılar, lot 1 – lot 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
<b>Her kullanıcı içinde ve tüm lotlar arasında yeniden üretilebilirlik</b>				
Tüm lotlar, kullanıcı A – kullanıcı A	0,00	0,00	0,00	0,00
Tüm lotlar, kullanıcı A – kullanıcı B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Tüm lotlar, kullanıcı A – kullanıcı C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Kullanıcı: Çalışmayı yapan teknisyen.

Lot: Çalışmada kullanılan kit lotu sayısı.

SS: Standart sapma.

Ortalama  $\Delta\Delta C_T$  değerleri (N = 120) ve standart sapmalar Şekil 8 ve 9'da sunulan veriler için gösterilmektedir.

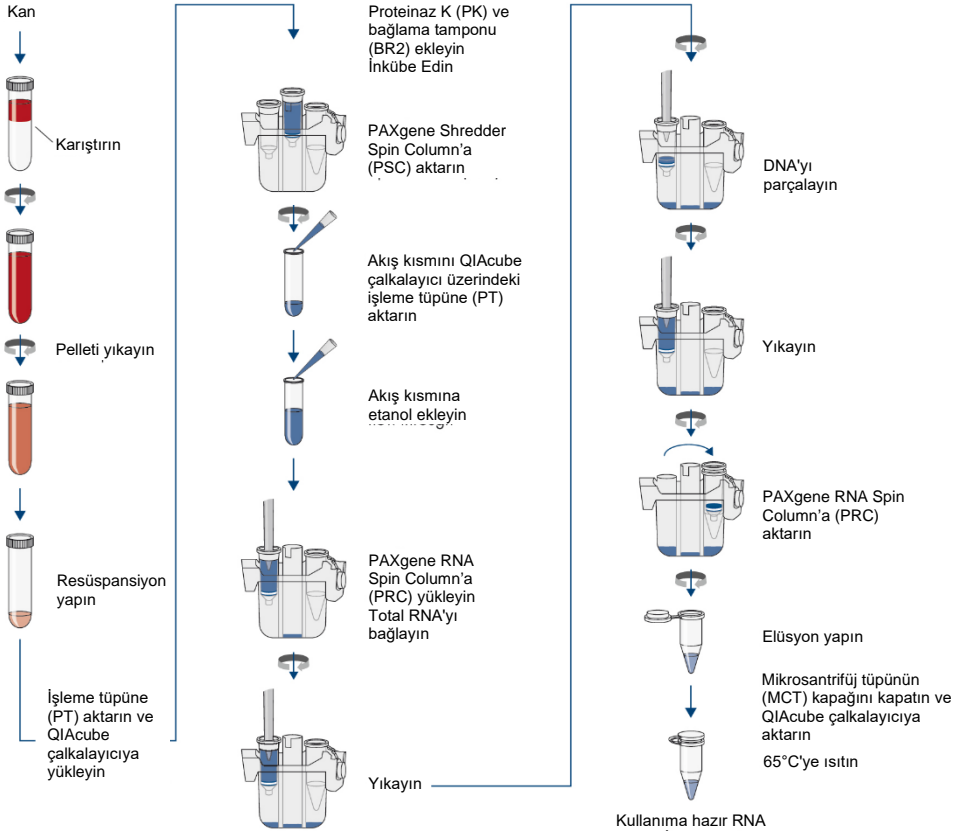
## Otomatik RNA saflaştırma

Kan RNA'sını saflaştırma, QIAGEN QIAcube Connect MDx veya klasik QIAGEN QIAcube (buradan itibaren QIAcube olarak anılırlar) üzerinde otomatiktir. Yenilikçi QIAcube cihazlarında, QIAGEN döndürme kolonlarının işlenmesi amacıyla gelişmiş teknoloji kullanılır ve böylece, otomatik ve düşük çıktılı örnek hazırlama işleminin laboratuvarınızın iş akışına kusursuz bir şekilde entegre olması sağlanır. QIAcube cihazları kullanılarak örnek hazırlama işleminde, manuel prosedür ile aynı adımlar (parçalama, bağlama, yıkama ve ayrıştırma) izlenir. Böylece, yüksek kaliteli RNA saflaştırması için PAXgene Blood RNA Kit kullanmaya devam edebilirsiniz.



**Şekil 10. QIAcube Connect MDx.**

Otomatik RNA saflaştırma protokolü 2 bölümden (veya protokolden) oluşur: "PAXgene Blood RNA Part A" ve "PAXgene Blood RNA Part B". 2 bölüm arasında kısa süreli bir manuel müdahalede bulunulur (bkz. Şekil 11, sayfa 31).



**Şekil 11. Otomatik PAXgene Blood RNA prosedürü.**

Santrifüjlenmiş, yıkanmış ve resüspanse edilmiş nükleik asit pelleti (bkz. "RNA konsantrasyonu ve saflaştırılması", sayfa 19), PAXgene Blood RNA Tube'dan (BRT) QIAcube cihazlarının çalışma tablası üzerindeki termoçalkalayıcı ünitesine yerleştirilen işleme tüplerine (PT) aktarılır. Operatör menüden "PAXgene Blood RNA Part A" protokolünü seçer ve başlatır. QIAcube cihazları protokolün elüsyon tamponunda (BR5) RNA elüsyonuna

kadar olan adımlarını gerçekleştirir. Operatör, saflaştırılmış RNA'yı içeren mikrosantrifüj tüplerini (MCT) QIAcube cihazlarının termoçalkalayıcı ünitesi içine aktarır. Operatör menüden "PAXgene Blood RNA Part B" protokolünü seçip başlatır ve QIAcube cihazları tarafından ısı denatürasyonu gerçekleştirilir.

Ortalama örnek hazırlama süresi (12 örnek hazırlama çalışmasından verilere dayalı olarak) 151 dakika olup\* sistem başında durulması gereken süre, manuel protokole göre önemli ölçüde kısadır.

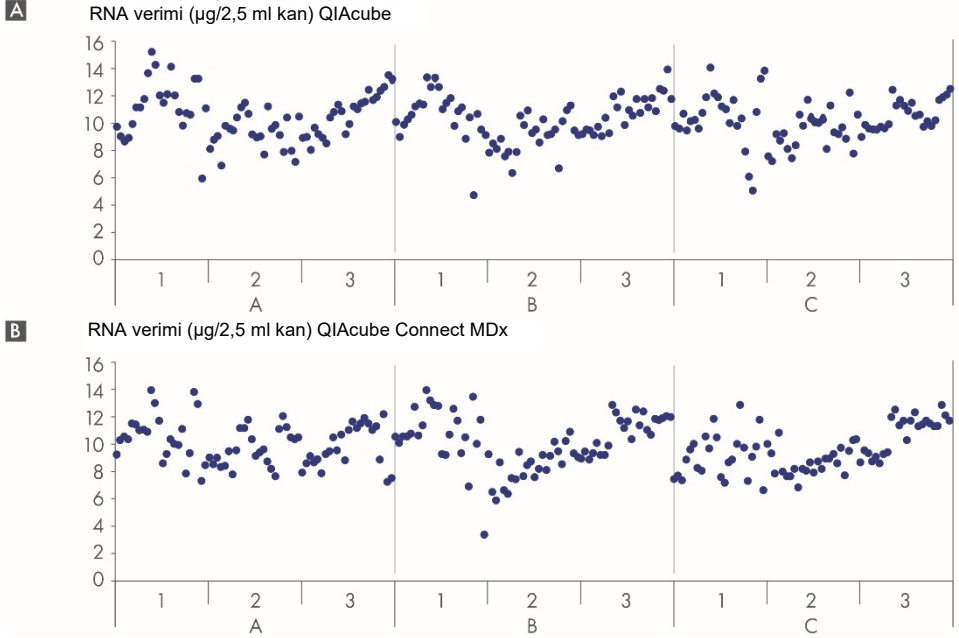
2,5 ml sağlıklı insan tam kanından RNA verimi, işlenen örneklerin  $\geq 95\%$ 'i için  $\geq 3 \mu\text{g}$  değerindedir. Şekil 12 (sayfa 33) 3 operatör tarafından 3 kit lotunda otomatik protokol kullanılarak hazırlanan toplam 216 örnekten RNA verimlerini göstermektedir. Bu çalışmalar için ayrı PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) yerine birleştirilmiş kan örnekleri kullanıldığından sonuçlar, ayrı kan alımlarına ait tekli örneklerden beklenen RNA verimini yansıtmaz. Verimler donöre yüksek ölçüde bağımlı olduğundan ayrı verimler farklılık gösterebilir (Şekil 12, sayfa 33).

Örneklerin en az  $95\%$ 'i, elüatın  $30\%$ 'una kadarı kullanılırken RT-PCR'de inhibisyon göstermez. Otomatik protokol kullanıldığında örnekler arasında çapraz kontaminasyon, aynı çalışmada RNA pozitif örneklerle (insan tam kanı) eşleştirilmiş RNA negatif örneklerde (su) ABL1 ve FOS transkriptlerinin sekanslarının kantitatif, gerçek zamanlı RT-PCR işlemiyle ölçüldüğü şekilde saptanamaz.

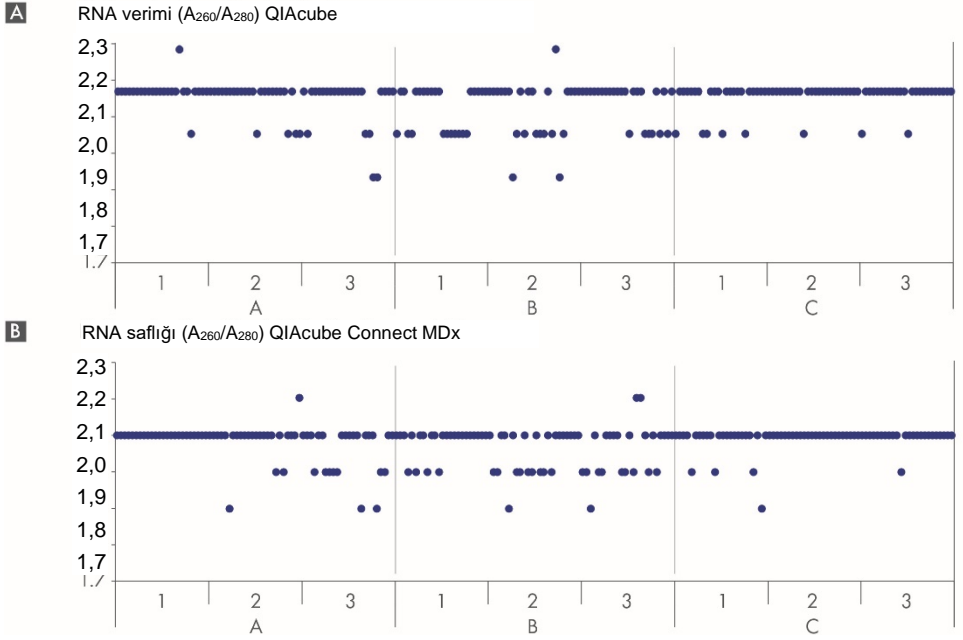
PAXgene Blood RNA System ve otomatik protokol ile izole edilen RNA, RT-PCR inhibisyonu görülmemesinden anlaşıldığı şekilde saftır ve  $A_{260}/A_{280}$  değerleri 1,8 ile 2,2 arasındadır. Genomik DNA, beta aktin geninin bir sekansının kantitatif, real-time PCR işlemiyle ölçüldüğü şekilde, tüm örneklerin  $\geq 95\%$ 'inde  $\leq 1$  (a/a) seviyesinde bulunmaktadır. Şekil 13 ve 14 (sayfa 34 ve 35), 3 operatör tarafından 3 kit lotuyla otomatik protokol kullanılarak hazırlanan toplam 216 örneğin relatif genomik DNA'sı ve  $A_{260}/A_{280}$  değerlerini göstermektedir.

\* PAXgene Blood RNA Tubes başlangıç işlemleri (santrifüjleme işlemleri, pellet yıkama ve pellet resüspansiyonu) dahil olmak üzere toplam protokol çalışma süresi.

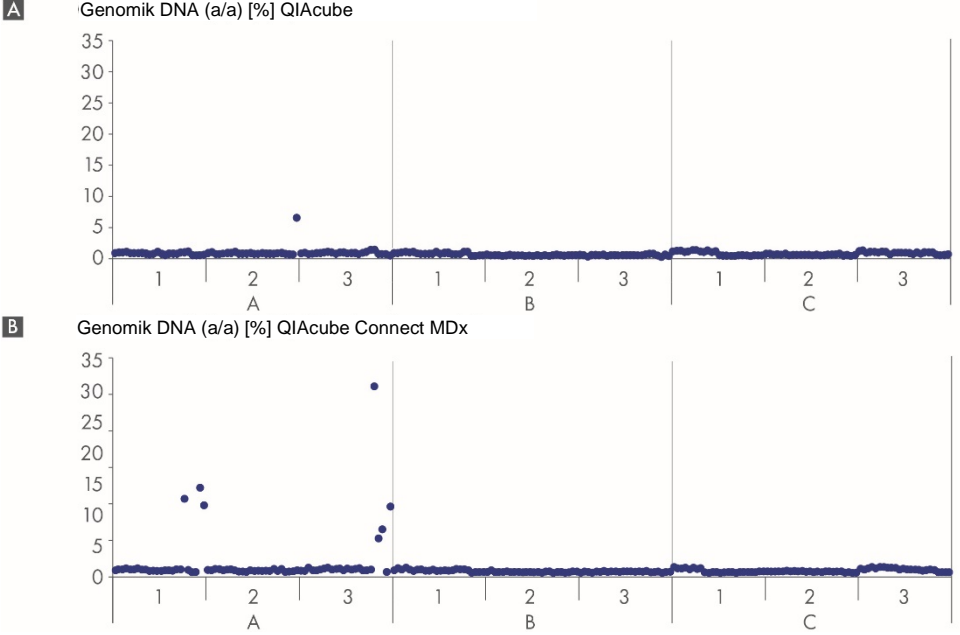




**Şekil 12. RNA verimi — otomatik işleme A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx.** Bireysel donörlerden kan örnekleri PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) içerisinde toplanmıştır. Tüplerin içeriği 6 donör havuzu olacak şekilde havuzlanmış ve ardından tekrar alikotlanmıştır. 3 farklı operatör (A, B, C) tarafından toplam 216 tüp (yani havuz başına 36) işlenmiştir. Her bir operatör, birden fazla QIAcube ve QIAcube Connect MDx cihazıyla otomatik ekstraksiyon için PAXgene Blood RNA Kit'in 3 farklı lotunu (1, 2, 3) kullanmış ve 6 donör havuzunun her birinden dörtü örnekleri işlemiştir. Tüm ayrı örneklerin RNA verimleri her operatör-lot kombinasyonu için gösterilmiştir.

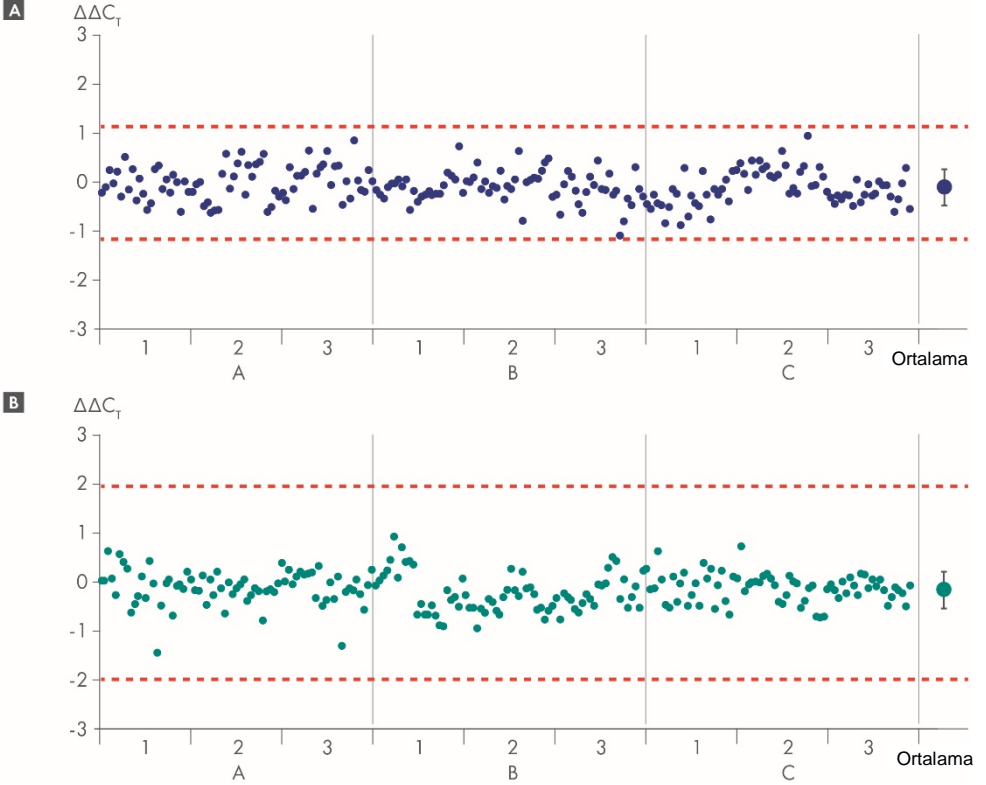


**Şekil 13. RNA saflığı ( $A_{260}/A_{280}$  değerleri) — otomatik işleme. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx RNA, Şekil 12'de açıklanan deneyde, 3 farklı operatör (A, B, C) tarafından, PAXgene Blood RNA Kit'in 3 farklı lotu (1, 2, 3) birden fazla QIAcube ve QIAcube Connect MDx cihazıyla kullanılarak saflaştırılmıştır. Tüm ayrı örneklerin  $A_{260}/A_{280}$  değerleri her operatör-lot kombinasyonu için gösterilmiştir.**

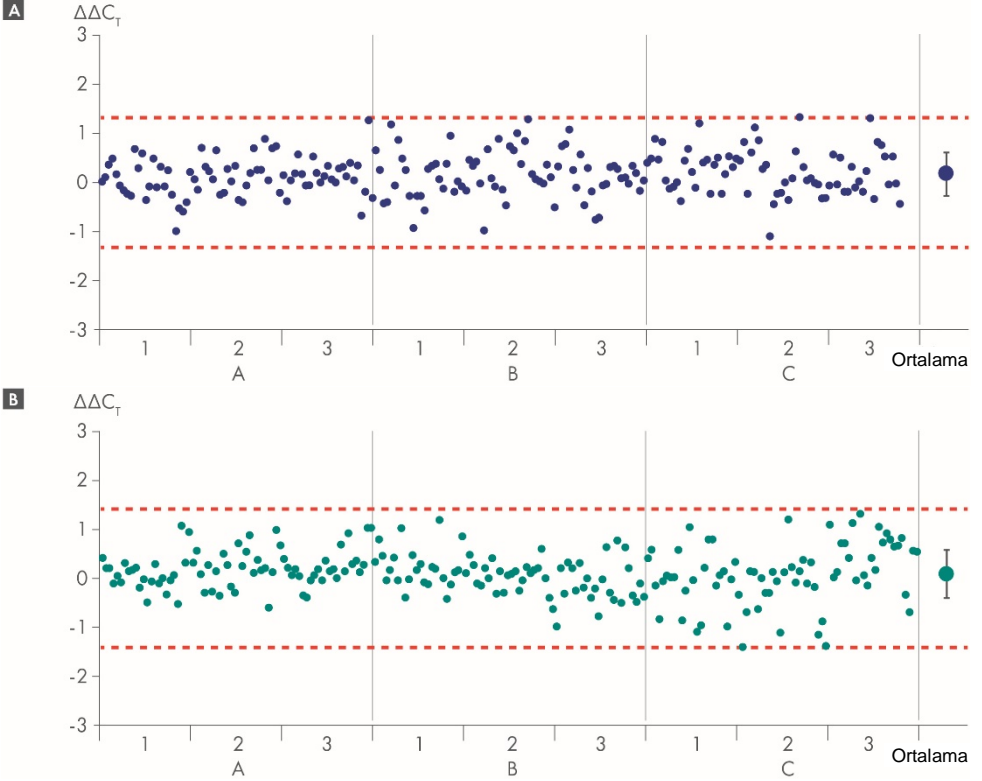


**Şekil 14. RNA saflığı (% genomik DNA kontaminasyonu) — otomatik işleme, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx.** RNA, Şekil 12'de açıklanan deneyde, 3 farklı operatör (A, B, C) tarafından, PAXgene Blood RNA Kit'in 3 farklı lotu (1, 2, 3) birden fazla QIAcube ve QIAcube Connect MDx cihazıyla kullanılarak saflaştırılmıştır. Her ayrı örnekteki genomik DNA miktarları (a/a) her operatör lot kombinasyonu için gösterilmiştir.

PAXgene Blood RNA System'in kullanıldığı otomatik RNA saflaştırma protokolü, Şekil 15 ve Şekil 16'da gösterildiği şekilde (sayfa 36 ve 37) yüksek ölçüde yeniden üretilebilir ve tekrarlanabilir RT-PCR sonuçları verir ve böylece klinik diagnostik testler için oldukça güçlüdür.



**Şekil 15. Otomatik (QIAcube) ve manuel protokoller arasında RT-PCR yeniden üretilebilirliği.** RNA, Şekil 12'de açıklanan deneydeki otomatik protokolden yararlanılarak, 3 farklı operatör (A, B, C) tarafından, PAXgene Blood RNA Kit'in 3 farklı lotu (1, 2, 3) birden fazla QIAcube ve QIAcube Connect MDx cihazıyla kullanılarak saflaştırılmıştır. Paralel olarak RNA, manuel protokol kullanılarak karşılık gelen replikat tüplerden saflaştırılmıştır. [A] FOS ve [B] IL1B relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Her iki ekstraksiyon protokolü (otomatik ve manuel protokol) kullanılarak eşleştirilmiş kan örneklerinden hazırlanan RNA arasında transkript seviyelerindeki olası farklılıklar  $\Delta\Delta C_T$  yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm örnek çiftlerinin (4 replikat x 6 donör havuzu x 3 kit lotu x 3 operatör = her gen için 216 çift) ayrı  $\Delta\Delta C_T$  değerleri, ayrı noktalar olarak grafiğe dökülmüş ve tüm örnekler için ortalamalar (daha büyük noktalar) ile standart sapmalar (siyah çubuklar) gösterilmiştir. Kesik çizgiler tahillilerin  $\pm 3x$  total kesinliğine işaret etmektedir (FOS: 1,16  $C_T$ ; IL1B: 1,98  $C_T$ ; Şekil 1-4, 8 ve 9 ile karşılaştırıldığı şekilde, farklı tahlil versiyonları nedeniyle farklı tahlil kesinlikleri).



**Şekil 16. Otomatik protokol kullanımında QIAcube ve QIAcube Connect MDx arasında RT-PCR yeniden üretilebilirliği.** RNA, Şekil 12'de açıklanan deneyde, 3 farklı operatör (A, B, C) tarafından, PAXgene Blood RNA Kit'in 3 farklı lotu (1, 2, 3) birden fazla QIAcube ve QIAcube Connect MDx cihazı üzerinde otomatik protokol kullanılarak saflaştırılmıştır. **[A]** FOS ve **[B]** IL1B relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Her iki cihaz kullanılarak eşleştirilmiş kan örneklerinden hazırlanan RNA arasında transkript seviyelerindeki olası farklılıklar  $\Delta\Delta C_T$  yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm örnek çiftlerinin (4 replikat x 6 donör havuzu x 3 kit lotu x 3 operatör = her gen için 216 çift) ayrı  $\Delta\Delta C_T$  değerleri, ayrı noktalar olarak grafiğe dökülmüş ve tüm örnekler için ortalamalar (daha büyük noktalar) ile standart sapmalar (siyah çubuklar) gösterilmiştir. Kesik çizgiler tahlillerin  $\pm 3x$  total kesinliğine işaret etmektedir (FOS: 1,30  $C_T$ ; IL1B: 1,42  $C_T$ ; Şekil 1-4, 8, 9 ve 15 ile karşılaştırıldığı şekilde, farklı tahlil versiyonları nedeniyle farklı tahlil kesinlikleri).

# Kullanıcı Tarafından Sağlanacak Ekipman ve Reaktifler

Kimyasallarla çalışırken, daima uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (safety data sheets, SDS'ler) başvurun.

## Tüm protokoller için

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; kat. no. 762165)
- Etanol (%96-100, saflık derecesi p.a.)
- Pipetler\* (10 µl – 4 ml)
- Steril, aerosol bariyerli, RNaz içermeyen pipet uçları†
- Dereceli silindir‡
- 3000-5000 x g hıza ulaşabilen ve dışarı doğru açılır rotoru ve PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) için kovaları bulunan santrifüj\*
- Vorteks karıştırıcı\*
- Parçalanmış buz
- Etiketleme için silinmez kalem

## Manuel protokol için

- En az 1000-8000 x g aralığında hıza ulaşabilen (daha düşük ve daha yüksek g kuvvetleri uygulanabilir) (ayrıntılar için protokol adımlarına bakın) ve 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri için bir rotoru bulunan değişken hızlı mikrosantrifüj\*

\* Cihazların ve aygıtların, üreticinin önerilerine göre düzenli olarak kontrol edildiğinden, bakımının yapıldığından ve kalibre edildiğinden emin olun.

† RNA muamelesi ile ilgili kılavuz ilkelere aşına olduğunuzdan emin olun (Ek A, sayfa 71).

‡ Tampon BR4 konsantrisine etanol eklemek için.

- 55°C ve 65°C'de inkübasyon yapabilen ve 1400 rpm hızı geçmemek üzere ≥400 rpm hızda sallayabilen çalkalayıcı-inkübatör\* (örn., Eppendorf® Thermomixer Compact veya eşdeğeri)

### **Otomatik protokol için (QIAcube veya QIAcube Connect MDx kullanımıyla)**

- Makas

QIAcube cihazları sarf malzemeleri:

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, kat. no. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, kat. no. 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, kat. no. 990394)†

QIAcube cihazları aksesuarları:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, kat. no. 990392)†

### **QIAcube Connect MDx kullanımıyla otomatik protokol için**

- QIAcube Connect MDx\* (QIAGEN, kat. no. 9003070)

QIAcube Connect MDx servis paketleri:

- QIAcube Connect MDx System FUL-2 (QIAGEN, kat. no. 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3 (QIAGEN, kat. no. 9003072)
- QIAcube Connect MDx System PRV-1 (QIAGEN, kat. no. 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1 (QIAGEN, kat. no. 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1 (QIAGEN, kat. no. 9003075)

\* Cihazların ve aygıtların, üreticinin önerilerine göre düzenli olarak kontrol edildiğinden, bakımının yapıldığından ve kalibre edildiğinden emin olun.

† Ayrıca Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. no. 990395) içinde bulunmaktadır.

## **QIAcube kullanımıyla otomatik protokol için**

- QIAcube\* (QIAGEN, kat. no. 9001882 [110 V])

\* Cihazların ve aygıtların, üreticinin önerilerine göre düzenli olarak kontrol edildiğinden, bakımının yapıldığından ve kalibre edildiğinden emin olun.



# Önemli Notlar

## QIAcube cihazlarını kullanma

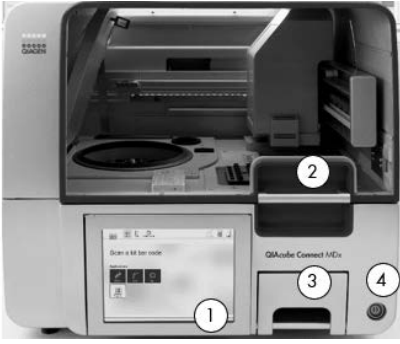
QIAcube cihazı kullanımı hakkında bilgi sahibi olduğunuzdan emin olun. Lütfen otomatik PAXgene Blood RNA protokollerine başlamadan önce, güvenlik bilgilerine özellikle dikkat ederek ilgili QIAcube cihazı Kullanım Kılavuzunu ve QIAcube cihazı ile sağlanan tüm ek bilgileri okuyun.

Bu bölümdeki talimatlar ayrıca belirtilmediği sürece QIAcube cihazının yanı sıra QIAcube Connect MDx cihazı için de geçerlidir.

## QIAcube cihazlarını başlatma

QIAcube cihaz kapağını kapatın ve QIAcube cihazını güç anahtarıyla açın (QIAcube Connect MDx: bkz. Şekil 17, sayfa 42; QIAcube: Şekil 18, sayfa 43).

Bir bip sesi duyulur ve başlangıç ekranı görülür. Cihaz otomatik olarak başlatma testlerini gerçekleştirir.



QIAcube Connect MDx cihazının önden görünümü



Dışarı çekilmiş dokunmatik ekran



QIAcube Connect MDx cihazının arkadan görünümü



QIAcube Connect MDx cihazının arkadan görünümü

Şekil 17. QIAcube Connect MDx cihazının dış özellikleri.

- |   |                  |   |                                                                                                                             |
|---|------------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Dokunmatik ekran | 5 | Dokunmatik ekranın sol tarafında 2 USB portu; dokunmatik ekranın arkasında 2 USB portu (1 USB portuna Wi-Fi modülü takılır) |
| 2 | Kapak            | 6 | RJ-45 Ethernet portu                                                                                                        |
| 3 | Atık çekmececi   | 7 | Güç kablosu soketi                                                                                                          |
| 4 | Güç anahtarı     | 8 | Soğutucu hava çıkışı                                                                                                        |



Şekil 18. QIAcube cihazının önden görünümü.

- |   |                                                                                                                       |   |                                        |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------------------------------------|
| 1 | Dokunmatik ekran                                                                                                      | 4 | Koruyucu panelin arkasındaki USB portu |
| 2 | Kapak                                                                                                                 | 5 | Güç anahtarı                           |
| 3 | Koruyucu panelin arkasındaki RS232 seri portu (sadece QIAGEN Cihaz Servisi Uzmanları tarafından kullanıma yöneliktir) | 6 | Atık çekmecesi                         |

## Dokunmatik ekran

QIAcube cihazları bir dokunmatik ekran kullanılarak kontrol edilir. Dokunmatik ekran kullanıcının cihazı çalıştırmasına izin verir ve kullanıcılara çalışma tablası ayarında rehberlik sağlar. Örnekleme işleme esnasında, dokunmatik ekran protokol durumunu ve kalan süreyi gösterir.



Şekil 19. QIAcube Connect MDx cihazının dışarı çekilmiş dokunmatik ekranı

## QIAcube cihazlarına protokol yükleme

QIAcube cihazları üzerinde ilk RNA hazırlama çalışması yapılmadan önce bir başlangıç protokol yüklemesi gerekebilir. Hem "PAXgene Blood RNA Part A" hem de "PAXgene Blood RNA Part B" protokollerini yükleyin.

QIAcube Connect MDx için protokoller [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) adresinde sunulur (QIAcube için [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube)) ve bunların QIAcube cihazları ile birlikte verilen USB belleğe indirilmesi gerekir. Bu protokoller, USB portu vasıtasıyla cihaza aktarılır.

USB portu (QIAcube Connect MDx: dokunmatik ekranın yan tarafında bulunur, bkz. Şekil 17, sayfa 42; QIAcube: koruyucu panelin arkasındadır, bkz. Şekil 18, sayfa 43), QIAcube cihazlarının QIAcube cihazlarıyla birlikte verilen USB belleğe bağlanmasına izin verir.

Günlük dosyaları veya rapor dosyaları gibi veri dosyaları da USB portu yoluyla QIAcube cihazlarından USB belleğe aktarılabilir.



USB portu yalnızca QIAGEN tarafından sağlanan USB bellek ile kullanıma yöneliktir. Bu porta başka cihazlar bağlamayın.



USB belleği, protokolleri indirirken veya veri dosyalarını aktarırken ya da bir protokol çalışması sırasında çıkarmayın.

QIAcube cihazlarına protokoller yükleme işlemine dair ek ayrıntılar için lütfen kullanılan cihazla ilgili el kitabına bakın.

## QIAcube cihazlarını yükleme

Zamandan tasarruf etmek için yükleme, şuradaki 10 dakikalık santrifüjleme adımlarının (adım 3 ve 5) biri veya her ikisi sırasında yapılabilir: "Protokol: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) İçinde Toplanan İnsan Tam Kanından Total RNA'nın Otomatik Saflaştırması", sayfa 62.

### Reaktif şişeleri

QIAcube cihazı üzerindeki her çalışmadan önce, 4 reaktif şişesini Tablo 3'te (sayfa 46) listelenen reaktifler ile maksimum gösterge seviyesine veya bu mümkün değilse PAXgene Blood RNA Kit'te sağlanan tampon hacimlerinin izin verdiği seviyeye kadar dikkatlice doldurun. Şişeleri ve kapakları tampon adlarıyla dikkatlice etiketleyin ve doldurulmuş reaktif şişelerini reaktif şişesi rafındaki uygun pozisyonlara yerleştirin. Rafı QIAcube cihazı çalışma tablasına gösterildiği şekilde yükleyin (Şekil 20-22, sayfa 46 - 48).



Sağlanan Tampon BR2 hacmi bir reaktif şişesini gösterge seviyesine kadar doldurmayacaktır. Tampon BR3 ve BR4, önceki çalışmalarda çok sayıda örneğin işlenmesinden sonra şişeyi gösterge seviyesine kadar doldurmayabilir.



Çalışma tablasına yerleştirmeden önce kapakları şişelerden çıkardığınızdan emin olun.



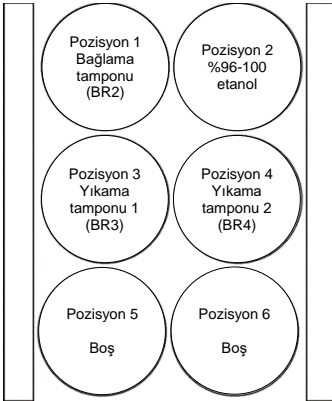
PAXgene Blood RNA Kit'te sağlanan tampon hacimleri (50), çalışma başına 2 ila 12 örnek sayısı ile, QIAcube cihazı üzerinde maksimum 7 RNA hazırlama çalışması için yeterlidir. Genel olarak, maksimum 7 RNA hazırlama çalışması ile kit başına toplam 50 örnek işlemek için daha düşük örnek sayıları ile çalışma yapmaktan kaçınılmalıdır. 7'nin üzerinde RNA hazırlama çalışması yapmak, son örnekleri işlerken tampon hacimlerinin yetersiz kalmasına yola açabilir.

**Tablo 3. Reaktif şişesi rafındaki pozisyonlar**

Pozisyon	Reaktif
1	Bağlama tamponu (BR2)
2	%96-100 etanol
3	Yıkama tamponu 1 (BR3)
4	Yıkama tamponu 2 (BR4)*
5	– (boş bırakın)
6	– (boş bırakın)

\* Yıkama tamponu 2 (BR4) konsantrite olarak sağlanır. İlk defa kullanmadan önce bir çalışma solüsyonu oluşturmak için şişede belirtildiği üzere 4 hacim etanol (%96-100, saflık derecesi p.a.) ekleyin.

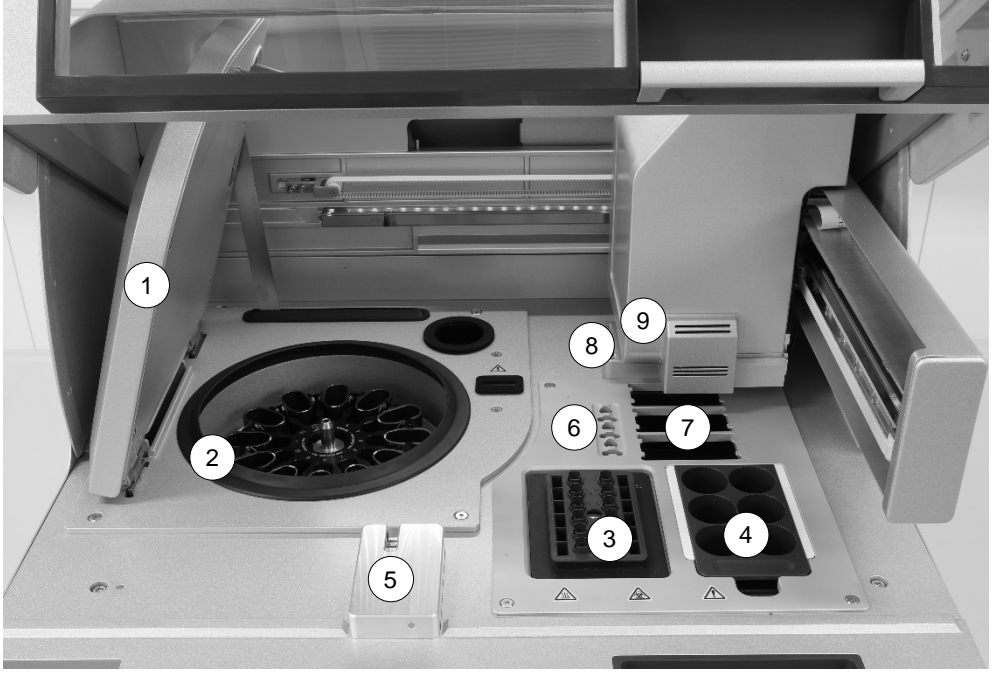
**A**



**B**

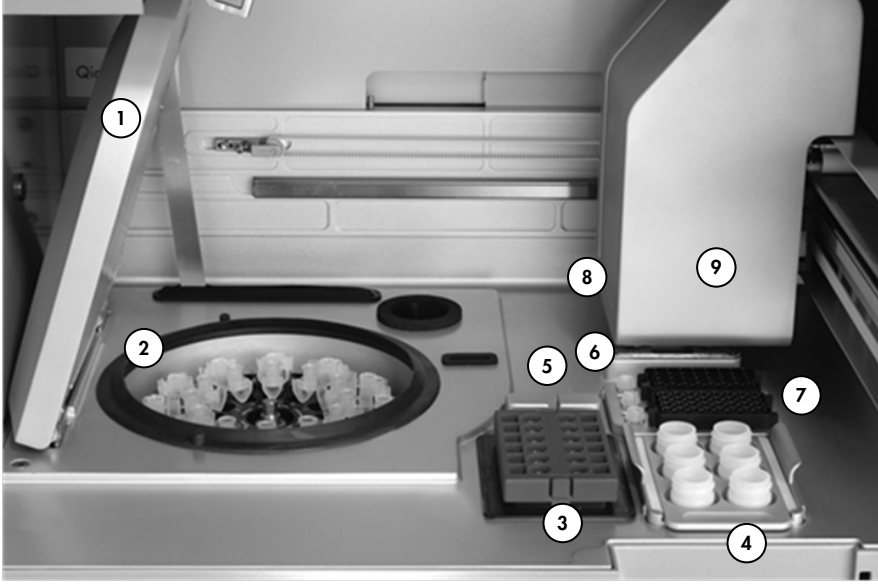


**Şekil 20. Reaktif şişesi rafını yükleme.** [A] Reaktif şişesi rafında şişelerin pozisyonları ve içindekilerin şeması. [B] Rafı QIAcube cihazına yükleme (örnek olarak QIAcube gösterilmektedir).



**Şekil 21. QIAcube Connect MDx cihazının iç görünümü.**

- |   |                            |   |                                                                                            |
|---|----------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Santrifüj kapağı           | 6 | Mikrosantrifüj tüpü yuvaları                                                               |
| 2 | Santrifüj                  | 7 | Uç rafları için 3 yuva                                                                     |
| 3 | Çalkalayıcı                | 8 | Uçlar ve kolonlar için atma yuvaları                                                       |
| 4 | Reaktif şişesi rafı        | 9 | Robotik kol (1 kanallı pipetleyici, tutucu, ultrasonik ve optik sensör ve UV LED dahildir) |
| 5 | Uç sensörü ve kapak kilidi |   |                                                                                            |



Şekil 22. QIAcube cihazının iç görünümü.

- |   |                     |   |                                      |
|---|---------------------|---|--------------------------------------|
| 1 | Santrifüj kapağı    | 6 | Mikrosantrifüj tüpü yuvaları         |
| 2 | Santrifüj           | 7 | Uç rafları                           |
| 3 | Çalkalayıcı         | 8 | Uçlar ve kolonlar için atma yuvaları |
| 4 | Reaktif şişesi rafı | 9 | Robotik kol                          |
| 5 | Uç sensörü          |   |                                      |



Döndürme kolonları (PRC, PSC), mikrosantrifüj tüpleri (MCT) ve QIAcube cihazları plastik malzemesi

QIAcube cihazı üzerine Filter-Tips 1000 µl ile dolu 2 uç rafı yerleştirin (bkz. Şekil 21 ve 22, sayfa 47 ve 48). Rafları gerektiğinde uçlarla tekrar doldurun.



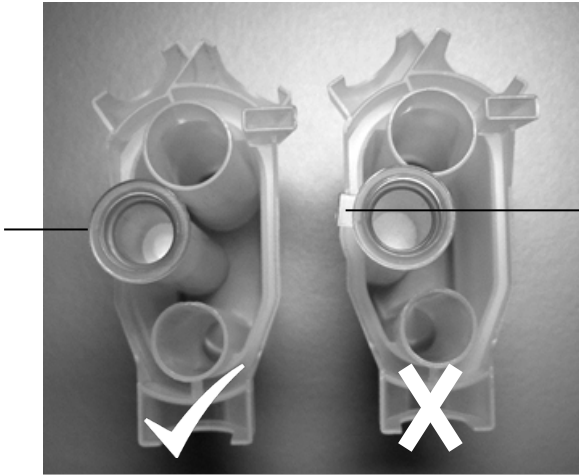
Sadece QIAcube cihazları ile kullanılmak için tasarlanmış 1000 µl filtre uçlarını kullanın.

Her örnek için rotor adaptörleri ve mikrosantrifüj tüplerini (MCT) silinmez bir kalem kullanarak işaretleyin. Kullanılacak PAXgene Shredder döndürme kolonlarını (PSC) açın ve kapakları makas kullanarak tamamen kesip çıkarın (bkz. Şekil 23, sayfa 49).



QIAcube cihazları robotik tutucusunun düzgün çalışması için kapağı PAXgene Shredder döndürme kolonlarına bağlayan kapakları ve tüm plastik kısımları tamamen çıkarın (keserek) (PSC; bkz. Şekil 23). Aksi halde robotik tutucu döndürme kolonlarını (PSC, PRC) uygun şekilde tutamaz.

Kolon  
kapağı  
doğru  
şekilde  
çıkarılmış



Kolon  
kapağı  
yanlış  
şekilde  
çıkarılmış;  
kapağın bir  
kısmı hala  
takılı

**Şekil 23. PAXgene Shredder döndürme kolonunu (PSC) yükleme.** PAXgene Shredder döndürme kolonu (PSC), rotor adaptörünün orta pozisyonuna yüklenir. Kolonu yüklemeden önce kapağı kesip çıkarın.

PAXgene RNA döndürme kolonunu (PRC), PAXgene Shredder döndürme kolonunu (PSC; kapaksız, bkz. Şekil 23, sayfa 49) ve etiketlenmiş mikrosantrifüj tüpünü Tablo 4 ve Şekil 24'te gösterildiği gibi her etiketli rotor adaptöründe uygun konumlara yerleştirin.

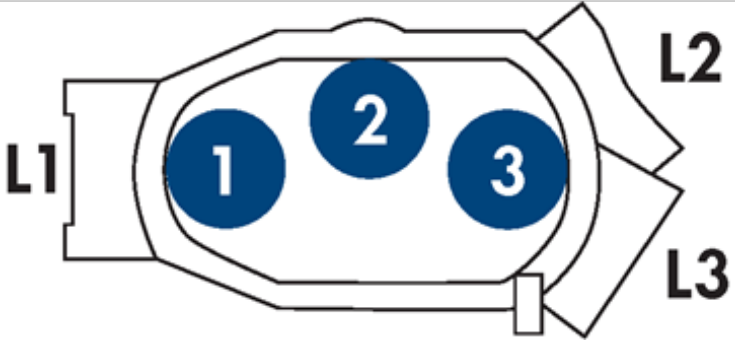


Döndürme kolonu (PRC) ve mikrosantrifüj tüpü (MCT) kapaklarının, rotor adaptörünün kenarında yuvaların altına gidebildiği kadar itildiğinden emin olun. Aksi halde santrifüjleme sırasında kapaklar kopacaktır.

**Tablo 4. Rotor adaptöründe laboratuvar malzemesi**

Pozisyon	Reaktif	Kapak pozisyonu
1	PAXgene RNA döndürme kolonu (kırmızı, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder döndürme kolonu (lila, PSC) (rotor adaptörüne yerleştirmeden önce kapağı kesip çıkarın)	-
3	Mikrosantrifüj tüpü (MCT)*	L3

\* PAXgene Blood RNA Kit ile verilen mikrosantrifüj tüplerini (MCT; 1,5 ml) kullanın.



**Şekil 24. Rotor adaptöründeki pozisyonlar.** Rotor adaptöründe üç tüp pozisyonu (1-3) ve üç kapak pozisyonu (L1-L3) vardır.

## Santrifüjü yükleme

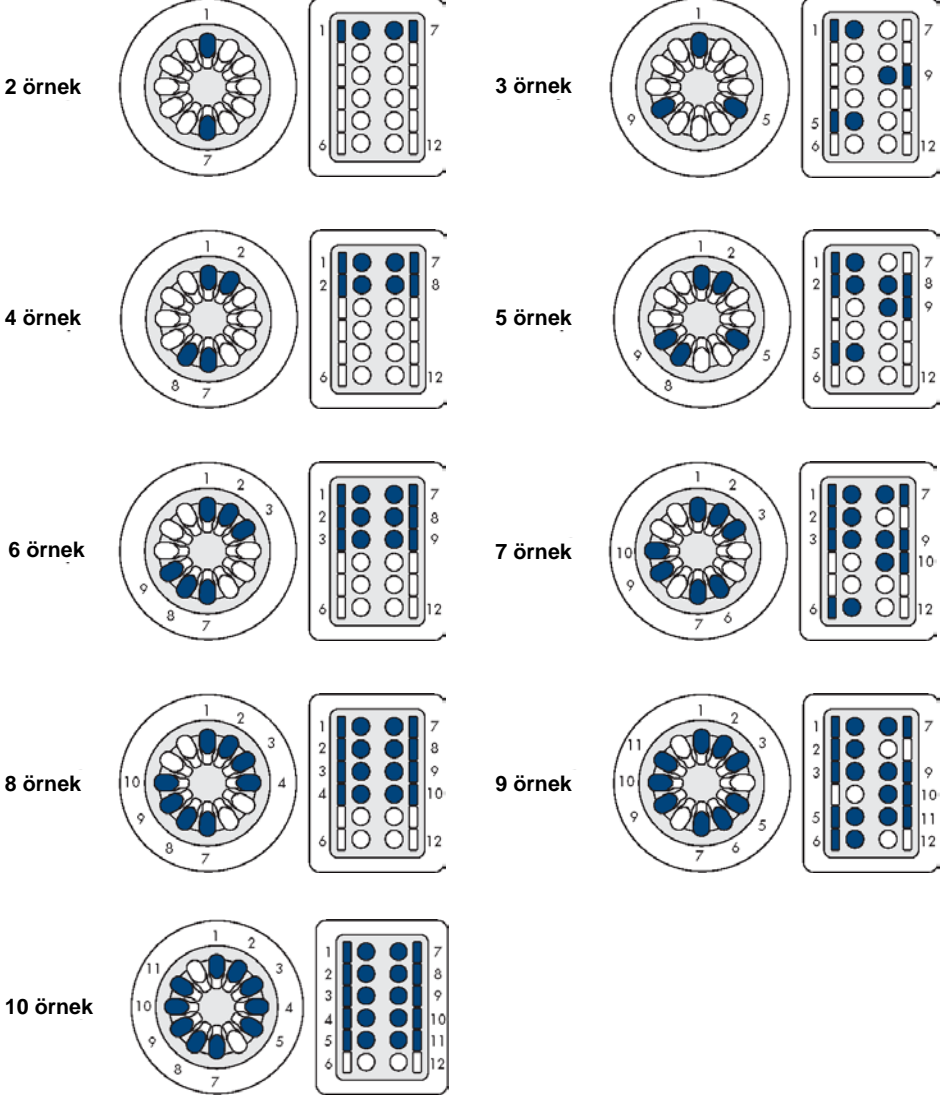
Kurulu rotor adaptörlerini santrifüj kovalarına aşağıda Şekil 25'te gösterildiği gibi yükleyin.



12'den az örnek işleniyorsa santrifüj rotorunu radyal olarak dengelenmiş şekilde yüklediğinizden emin olun (bkz. Şekil 26, sayfa 52). 12'den daha az sayıda örnek işlenecek olsa bile bir protokol çalışmasından önce tüm santrifüj kovaları monte edilmiş olmalıdır. Tek (bir) örnek veya 11 örnek işlenemez.



**Şekil 25. QIAcube cihazları üzerinde santrifüjü yükleme.** Kurulu rotor adaptörlerini santrifüj kovalarına yükleyin (örnek olarak QIAcube Connect MDx gösterilmektedir).



**Şekil 26. Santrifüj ve çalkalayıcıyı yükleme.** Santrifüj ve çalkalayıcı pozisyonları, iki (2) ila on (10) örnek işleme için gösterilmiştir. Bir (1) veya 11 örnek işlenemez. 12 örneğin işlenmesi için tüm santrifüj ve çalkalayıcı pozisyonları yüklenir (görüntü gösterilmemektedir).

## İşleme tüpleri (PT)

Önceki çalışmalardan mikrosantrifüj tüpü yuvalarında bırakılmış tüm işleme tüplerini (PT) çıkarın (QIACube Connect MDx: bkz. Şekil 21, sayfa 47, QIACube: bkz. Şekil 22, sayfa 48). 3 işleme tüpünü (PT) çalışmadaki örnek sayısına göre Tablo 5'te verilen reaktif miktarıyla doldurun.

DNaz I inkübasyon karışımı için belirtilen DNA parçalama tamponu (RDD) hacmini bir işleme tüpüne (PT) pipetleyin ve belirtilen DNaz I (RNFD) stok solüsyonu hacmini ekleyin. Tüm karışımı bir 1000 µl pipet ucu kullanarak yukarı ve aşağı 3 kez yavaşça pipetleyerek karıştırın.

PAXgene Blood RNA Kit ile verilen 2 ml'lik işleme tüplerini (PT) kullanın. Tüpleri reaktif adlarıyla açıkça etiketleyin ve bunları Tablo 6'da (sayfa 54) belirtildiği gibi mikrosantrifüj tüpü yuvalarında uygun pozisyona yerleştirin.



DNaz I (RNFD) fiziksel denatürasyona özellikle duyarlıdır. Kırpmayı azaltmak üzere geniş açıklıklı pipet uçları kullanarak, sadece pipetlemeyle karıştırın. Vortekslemeyin.



Tablo 5'te belirtildiği gibi sadece gereken hacmi pipetlediğinizden emin olun.

**Tablo 5. Mikrosantrifüj tüpü yuvaları için işleme tüplerinde gereken reaktiflerin hacmi.**

Örnek sayısı	Belirtilen örnek sayısı için reaktif hacmi (µl)		
	Proteinaz K (PK)	DNaz I inkübasyon karışımı	Elüsyon tamponu (BR5)
2	126	187 (23 DNaz I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNaz I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNaz I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNaz I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNaz I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNaz I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNaz I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNaz I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNaz I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNaz I + 806 Buffer RDD)	1177

**Tablo 6. Mikrosantrifüj tüpü yuvaları**

	Pozisyon		
	A	B	C
İçerik	Proteinaz K	DNaz I inkübasyon karışımı	Elüsyon tamponu (BR5)
Kap	İşleme tüpü (PT)*	İşleme tüpü (PT)*	İşleme tüpü (PT)*

\* PAXgene Blood RNA Kit ile verilen 2 ml'lik işleme tüplerini kullanın.

# Protokol: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) İçinde Toplanan İnsan Tam Kanından Total RNA'nın Manuel Saflaştırması

## Başlamadan önce önemli noktalar

- Kit kutusunun sağlam ve hasarsız olduğundan ve tamponların sızmamış olduğundan emin olun. Hasarlı bir kiti kullanmayın.
- Bir pipet kullanırken doğru hacme ayarlandığından ve sıvının dikkatli ve tam olarak aspire edilip dağıtıldığından emin olun.
- Örnekleri yanlış tüp veya döndürme kolonuna aktarmaktan kaçınmak için tüm tüpler ve döndürme kolonlarının silinmez bir kalemle uygun şekilde etiketlendiğinden emin olun. Her tüpün (PT, MCT) kapağı ve gövdesini etiketleyin. Döndürme kolonları için işleme tüpünün (PT) gövdesini etiketleyin. Sıvı aktarıldıktan sonra her tüp veya döndürme kolonunu kapatın.
- Prosedür sırasında örnekler veya tamponların dökülmesi RNA verimi ve saflığını azaltabilir.
- Aksi belirtilmediği sürece bu protokolün santrifüj adımları dahil olmak üzere tüm adımları oda sıcaklığında (15-25°C) gerçekleştirilmelidir.

Nükleik asit amplifikasyonu teknolojilerinin duyarlılığı nedeniyle örneklerin muamelesi sırasında çapraz kontaminasyondan kaçınmak için şu önlemler gereklidir:

- Örneği kolon kenarını ıslatmadan dikkatlice döndürme kolonuna (PRC, PSC) pipetleyin.
- Sıvı transferleri arasında daima pipet uçlarını değiştirin. Aerosol bariyerli pipet uçları kullanın.
- Döndürme kolonu (PRC, PSC) membranına pipet ucu ile dokunmaktan kaçının.

- Bir mikrosantrifüj tüpünü (MCT) vorteksledikten veya ısıtıttıktan sonra kapağın içindeki damlaları gidermek için kısa süre santrifüjleyin.
- Tüm prosedür boyunca eldiven kullanın. Eldivenler ile örneğin teması durumunda eldivenleri hemen değiştirin.
- Mikrosantrifüje yerleştirmeden önce döndürme kolonunu (PRC, PSC) kapatın. İşlemden tanımlandığı şekilde santrifüjleyin.
- Her defasında sadece bir döndürme kolonu (PRC, PSC) açın ve aerosol oluşturmaktan kaçının.
- Daha fazla örneğin etkin paralel işlenmesi için santrifügasyondan sonra döndürme kolonlarının (PRC, PSC) aktarılabileceği şekilde bir rafı işleme tüpleriyle (PT) doldurun. Akış kısmını içeren kullanılmış işleme tüplerini (PT) atın ve döndürme kolonlarını (PRC, PSC) içeren yeni işleme tüplerini (PT) doğrudan mikrosantrifüje yerleştirin.

#### Başlamadan önce yapılacaklar

- Kan, *PAXgene Blood RNA Tube El Kitabı* belgesinde yer alan talimatlar doğrultusunda PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) içinde toplanmalıdır. Gerekirse PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) kullanımı hakkında öneriler için Ek C'ye (sayfa 74) bakın.
- Kan hücrelerinin tam lizisini sağlamak için PAXgene Blood RNA Tubes'un (BRT), kan toplandıktan sonra en az 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildiğinden emin olun. PAXgene Blood RNA Tube'un (BRT) bir gece boyunca inkübe edilmesi verimleri artırabilir. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan toplandıktan sonra 2-8°C, -20°C veya -70°C'de saklanmışsa önce oda sıcaklığına dengeleyin ve ardından prosedüre başlamadan önce 2 saat boyunca oda sıcaklığında saklayın.
- Sayfa 10 içindeki güvenlik bilgilerini okuyun.
- RNA kullanımıyla ilgili kılavuz ilkeleri okuyun (Ek A, sayfa 71).
- Pipetler ve çalkalayıcı-inkübatör gibi cihazların üreticinin önerilerine göre düzenli olarak kontrol ve kalibre edildiğinden emin olun.
- Adım 5 ve 20'de bir çalkalayıcı-inkübatör gereklidir. Çalkalayıcı-inkübatör sıcaklığını 55°C'ye ayarlayın.



- Bağlama tamponu (BR2) saklama halinde bir çökelti oluşturabilir. Gerekirse çözmek için 37°C'ye ısıtın.
- Yıkama tamponu 2 (BR4) konsantre olarak sağlanır. İlk defa kullanmadan önce bir çalışma solüsyonu oluşturmak için şişede belirtildiği üzere 4 hacim etanol (%96-100, saflık derecesi p.a.) ekleyin.
- RNase-Free DNase Set ilk kez kullanılacaksa DNaz I stok solüsyonu hazırlayın. Katı DNaz I'yı (RNFD; 1500 Kunitz birimi)\* set ile sağlanan DNaz resüpsansiyon tamponunun (DRB) 550 µl'si içinde çözün. Şişeyi açarken DNaz I (RNFD) kaybedilmediğinden emin olun. Sulandırılmış DNaz I'yı (RNFD) vortekslemeyin. DNaz I fiziksel denatürasyona özellikle duyarlıdır. Karıştırma sadece şişenin yavaşça tersine çevrilmesi ile gerçekleştirilmelidir.
- Mevcut veriler sulandırılmış DNaz I'nın (RNFD) 6 haftaya kadar 2-8°C'de saklanabileceğini göstermektedir. DNaz I'nın (RNFD) daha uzun dönemli saklanması için stok solüsyonunu cam şişeden çıkarın, tek kullanımlık alikotlara bölün (kitle sağlanan 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerini [MCT] kullanın; 5 alikot için yeterlidir) ve 9 aya kadar -20°C'de saklayın. Çözünmüş alikotlar 6 haftaya kadar 2-8°C'de saklanabilir. Alikotları çözdükten sonra tekrar dondurmayın.
- DNaz I (RNFD) sulandırma ve alikot oluşturma sırasında, RNA kullanımına yönelik kılavuz ilkeleri izlediğinizden emin olun (Ek A, sayfa 71).

\* Kunitz üniteleri yaygın olarak DNaz I ölçümü için kullanılmaktadır. 25°C sıcaklıkta, pH 5,0'da substrat olarak yüksek ölçüde polimerize DNA kullanıldığında  $A_{260}$ 'ta bir mililitre için dakika başına 0,001 artışa yol açan DNaz I miktarı olarak tanımlanmaktadır (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ve 363).

## Prosedür

1. PAXgene Blood RNA Tube'u (BRT) dışarı doğru açılır rotor kullanarak 10 dakika boyunca 3000-5000 x g hızda santrifüjleyin.



Kan hücrelerinin tam lizisini sağlamak için kan örneğinin PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) minimum 2 saat boyunca oda sıcaklığında (15-25°C) inkübe edildiğinden emin olun.



Rotor, yuvarlak tabanlı tüpler için tüp adaptörleri içermelidir. Başka tür tüp adaptörü kullanılırsa tüpler santrifügasyon sırasında kırılabilir.

2. Süpernatanı dekantasyon veya pipetleme yoluyla çıkarın. Pellete 4 ml RNaz İçermeyen Su (RNFWS) ekleyin ve tüpü yeni bir sekonder BD Hemogard kapak kullanarak kapatın (kitle sağlanmaktadır).

Süpernatanın dekantasyonu yapılırsa pelleti bozmamaya dikkat edin ve tüpün kenarını temiz bir kağıt havluyla kurulaştırın.

3. Pellet görünür şekilde çözününceye kadar vorteksleyin ve bir dışarı doğru açılır rotor kullanarak 10 dakika boyunca 3000-5000 x g hızda santrifüjleyin. Süpernatanın tamamını çıkarın ve atın.

Vortekslemeden sonra ancak santrifüjleme işleminden önce süpernatanda az miktarda kalıntı kalması işlemi etkilemeyecektir.



Süpernatanın tam olarak giderilmemesi lizisi önleyecek ve lizatı sulandıracaktır. Bu nedenle RNA'nın PAXgene membranına bağlanma koşullarını etkileyecektir.

4. 350 µl resüspanسیون tamponu (BR1) ekleyin ve pellet görünür şekilde çözününceye kadar vorteksleyin.
5. Örneği 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne (MCT) pipetleyin. 300 µl bağlama tamponu (BR2) ve 40 µl proteinaz K (PK) ekleyin. 5 saniye boyunca vorteksleyerek karıştırın ve çalkalayıcı-inkübatör kullanarak 10 dakika boyunca 55°C'de 400-1400 rpm hızda inkübe edin. İnkübasyondan sonra çalkalayıcı-inkübatör sıcaklığını 65°C'ye ayarlayın (adım 20 için).



Örneğe eklemeyen önce bağlama tamponu (BR2) ve proteinaz K'yı (PK) birbirine ekleyerek karıştırmayın.

6. Lizatı doğrudan, 2 ml'lik bir işleme tüpüne (PT) yerleştirilmiş PAXgene Shredder döndürme kolonuna (PSC; eflatun) pipetleyin ve maksimum hızda (ancak 20.000 x g üzerinde olmayacak şekilde) 3 dakika santrifüjleyin.



Lizatı dikkatli biçimde döndürme kolonuna (PSC) pipetleyin ve lizatın döndürme kolonuna (PSC) tamamen aktarıldığını görsel olarak kontrol edin.

Kolonların (PSC) ve tüplerin (PT) zarar görmesini önlemek için 20.000 x g hızı geçmeyin.



Bazı örnekler santrifüjleme yapılmadan, PAXgene Shredder döndürme kolonu (PSC) içinden akabilir. Bunun nedeni bazı örneklerin düşük viskozitesidir ve ürün başarısızlığının bir göstergesi olarak düşünülmemelidir.

7. Akış fraksiyonu süpernatantının tamamını işleme tüpündeki pelleti bozmadan yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne (MCT) dikkatlice aktarın.
8. 350 µl etanol (%96-100, saflık derecesi p.a.) ekleyin. Vorteksleyerek karıştırın ve tüp kapağının içinden damlaları gidermek için kısa süre santrifüjleyin (500-1000 x g hızda 1-2 saniye).



Santrifüjleme hızı 1-2 saniyeyi geçmemelidir. Aksi takdirde, nükleik asitlerin pellet oluşurması ve total RNA verimlerinin azalmasına neden olabilir.

9. 2 ml'lik işleme tüpüne (PT) yerleştirilmiş PAXgene RNA döndürme kolonuna (PRC, kırmızı) 700 µl örnek pipetleyin ve 8000-20.000 x g hızda 1 dakika boyunca santrifüjleyin. Döndürme kolonunu (PRC) yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne (PT) yerleştirin ve akış kısmını içeren eski işleme tüpünü (PT) atın.

10. PAXgene RNA döndürme kolonuna (PRC) kalan örneği pipetleyin ve 8000-20.000 x g hızda 1 dakika boyunca santrifüjleyin. Döndürme kolonunu (PRC) yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne (PT) yerleştirin ve akış kısmını içeren eski işleme tüpünü (PT) atın.



Örneği dikkatli biçimde döndürme kolonuna (PRC) pipetleyin ve örneğin döndürme kolonuna (PRC) tamamen aktarıldığını görsel olarak kontrol edin.

11. 350 µl yıkama tamponu 1'i (BR3) PAXgene RNA döndürme kolonuna (PRC) pipetleyin. 1 dakika boyunca 8000-20.000 x g hızda santrifüjleyin. Döndürme kolonunu (PRC) yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne (PT) yerleştirin ve akış kısmını içeren eski işleme tüpünü (PT) atın.

12. 10 µl DNaz I (RNFD) stok solüsyonunu 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü (MCT) içerisinde 70 µl DNA parçalama tamponuna (RDD) ekleyin. Tüpe parmağınızla hafifçe vurarak karıştırın ve tüpün yanlarından kalan sıvıyı toplamak için kısa süre santrifüjleyin. Örneğin, 10 örnek işleniyorsa 100 µl DNaz I (RNFD) stok solüsyonunu 700 µl DNA parçalama tamponuna (RDD) ekleyin. Kitle sağlanan 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerini (MCT) kullanın.



DNaz I fiziksel denatürasyona özellikle duyarlıdır. Karıştırma sadece tüpe hafifçe vurarak yapılmalıdır. Vortekslemeyin.

13. DNaz I (RNFD) inkübasyon karışımını (80 µl) doğrudan PAXgene RNA döndürme kolonu (PRC) membranına pipetleyin ve tezgah üzerinde (20-30°C) 15 dakika bekletin.



DNaz I (RNFD) inkübasyon karışımının doğrudan membrana yerleştirilmesini sağlayın. Karışımın bir kısmı döndürme kolonunun (PRC) duvarları veya O halkasına uygulanırsa ve orada kalırsa DNA parçalanması eksik olacaktır.

14. PAXgene RNA döndürme kolonuna (PRC) 350 µl yıkama tamponu 1 (BR3) pipetleyin ve 8000-20.000 x g hızda 1 dakika boyunca santrifüjleyin. Döndürme kolonunu (PRC) yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne (PT) yerleştirin ve akış kısmını içeren eski işleme tüpünü (PT) atın.

15. PAXgene RNA döndürme kolonuna (PRC) 500 µl yıkama tamponu 2 (BR4) pipetleyin ve 8000-20.000 x g hızda 1 dakika boyunca santrifüjleyin. Döndürme kolonunu (PRC) yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne (PT) yerleştirin ve akış kısmını içeren eski işleme tüpünü (PT) atın.



Yıkama tamponu 2 (BR4) konsantre olarak sağlanır. Kullanmadan önce yıkama tamponu 2'ye (BR4) etanol eklendiğinden emin olun (bkz "Başlamadan önce yapılacaklar", sayfa 56).

16. PAXgene RNA döndürme kolonuna (PRC) 500 µl daha yıkama tamponu 2 (BR4) ekleyin. 8000-20.000 x g hızda 3 dakika santrifüjleyin.

17. Akış kısmını içeren işleme tüpünü (PT) atın ve PAXgene RNA döndürme kolonunu (PRC) yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne (PT) yerleştirin. 8000-20.000 x g hızda 1 dakika santrifüjleyin.

18. Akış kısmını içeren işleme tüpünü (PT) atın. PAXgene RNA döndürme kolonunu (PRC) 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne (MCT) yerleştirin ve 40 µl elüsyon tamponunu (BR5) doğrudan PAXgene RNA döndürme kolonu (PRC) membranına pipetleyin. RNA elüsyonu için 1 dakika boyunca 8000-20.000 x g hızda santrifüjleyin.

Maksimum elüsyon etkinliğini elde etmek için tüm membranı elüsyon tamponu (BR5) ile ıslatmak önemlidir.

19. Elüsyon adımını (adım 18) açıklandığı gibi, 40 µl elüsyon tamponu (BR5) ve aynı mikrosantrifüj tüpünü (MCT) kullanarak tekrarlayın.

20. Elüatı çalkalayıcı-inkübatörde (adım 5'ten) 5 dakika boyunca 65°C'de sallamadan inkübe edin. İnkübasyondan sonra hemen buz üzerinde soğutun.

Bu 65°C'deki inkübasyon RNA'yı aşağı yönde uygulamalar için denatüre eder. İnkübasyon süresi veya sıcaklığını geçmeyin.

21. RNA örnekleri hemen kullanılmayacaksa -20°C veya -70°C'de saklayın.

RNA tekrarlanan dondurma veya çözme sonrasında denatüre durumda kaldığından inkübasyonu 65°C'de tekrarlamak gerekmez. RNA örnekleri diagnostik bir teahlilde kullanılıyorsa üreticinin sağladığı talimatı izleyin.

RNA'nın 260 nm'de absorbans ile doğru kantifikasyonu için örneklerin 10 mM Tris-HCl ile pH 7,5'de seyreltilmesini öneririz.\* Örneği RNaz İçermeyen Suda seyreltmek yanlış olarak düşük değerlere neden olabilir.

Spektrofotometreyi ölçülecek örneklerle aynı oranda elüsyon tamponu (BR5) ve Tris-HCl tamponundan oluşan bir kör kullanarak sıfırlayın. Elüsyon tamponunun (BR5) 220 nm'de yüksek absorbansı vardır ve bu durum eğer spektrofotometre uygun şekilde sıfırlanmazsa yüksek arka alan absorbans seviyelerine yol açabilir.



Tris HCl tamponunda kantifikasyon için  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$  ilişkisini kullanın. Bkz. Ek B, sayfa 72.

\* Kimyasallarla çalışırken, daima uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (safety data sheets, SDS'ler) başvurun.

# Protokol: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) İçinde Toplanan İnsan Tam Kanından Total RNA'nın Otomatik Saflaştırması

## Başlamadan önce önemli noktalar

- Kit kutusunun sağlam ve hasarsız olduğundan ve tamponların sızmamış olduğundan emin olun. Hasarlı bir kiti kullanmayın.
- Bir pipet kullanırken doğru hacme ayarlandığından ve sıvının dikkatli ve tam olarak aspire edilip dağıtıldığından emin olun.
- Örneklerin yanlış tüplere ve plastik sarf malzemesine transferini önlemek için tüm işleme tüplerinin (PT), mikrosantrifüj tüplerinin (MCT) ve rotor adaptörlerinin silinmez bir kalemle uygun şekilde etiketlendiğinden emin olun. Her mikrosantrifüj tüpünün (MCT) kapağını ve gövdesini, her işleme tüpünün (PT) gövdesini ve her rotor adaptörünün dış duvarını etiketleyin.
- Prosedür sırasında örnekler veya tamponların dökülmesi RNA verimi ve saflığını azaltabilir.
- Aksi belirtilmediği sürece bu protokolün santrifüj adımları dahil olmak üzere tüm adımları oda sıcaklığında (15-25°C) gerçekleştirilmelidir.

Nükleik asit amplifikasyonu teknolojilerinin duyarlılığı nedeniyle örneklerin muamelesi sırasında çapraz kontaminasyondan kaçınmak için şu önlemler gereklidir:

- Örneği tüp kenarını nemlendirmeden tüpün en altında olacak şekilde işleme tüpünün (PT) içine dikkatle pipetleyin.
- Sıvı transferleri arasında daima pipet uçlarını değiştirin. Aerosol bariyerli pipet uçları kullanın.
- Döndürme kolonu (PRC, PSC) membranına pipet ucu ile dokunmaktan kaçının.

- Bir mikrosantrifüj tüpünü (MCT) vorteksledikten veya ısıttıktan sonra kapağın içindeki damlaları gidermek için kısa süre santrifüjleyin.
- Tüm prosedür boyunca eldiven kullanın. Eldivenler ile örneğin teması durumunda eldivenleri hemen değiştirin.

### Başlamadan önce yapılacaklar




- Kan, *PAXgene Blood RNA Tube El Kitabı* belgesinde yer alan talimatlar doğrultusunda PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) içinde toplanmalıdır. Gerekirse PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) kullanımı hakkında öneriler için Ek C'ye (sayfa 74) bakın.
- Kan hücrelerinin tam lizisini sağlamak için PAXgene Blood RNA Tubes'un (BRT), kan toplandıktan sonra en az 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildiğinden emin olun. PAXgene Blood RNA Tube'un (BRT) bir gece boyunca inkübe edilmesi verimleri artırabilir. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan toplandıktan sonra 2-8°C, -20°C veya -70°C'de saklanmışsa önce oda sıcaklığına dengeleyin ve ardından prosedüre başlamadan önce 2 saat boyunca oda sıcaklığında saklayın.
- Sayfa 10 içindeki güvenlik bilgilerini okuyun.
- "Önemli Notlar", sayfa 41 kısmını okuyun.
- RNA kullanımıyla ilgili kılavuz ilkeleri okuyun (Ek A, sayfa 71).
- İlgili QIAcube cihazı Kullanım Kılavuzunu ve QIAcube cihazı ile sağlanan tüm ek bilgileri güvenlik bilgilerine özellikle dikkat ederek okuyun.
- Pipetler ve QIAcube cihazı gibi cihazların ve aygıtların üreticinin önerilerine göre düzenli olarak kontrol ve kalibre edildiğinden emin olun.
- Bağlama tamponu (BR2) saklama halinde bir çökelti oluşturabilir. Gerekirse çözmek için 37°C'ye ısıtın.
- Yıkama tamponu 2 (BR4) konsantre olarak sağlanır. İlk defa kullanmadan önce bir çalışma solüsyonu oluşturmak için şişede belirtildiği üzere uygun hacimde etanol (%96-100, saflık derecesi p.a.) ekleyin.

- RNase-Free DNase Set ilk kez kullanılacaksa DNaz I stok solüsyonu hazırlayın. Katı DNaz I'yı (RNFD; 1500 Kunitz birimi)\* set ile sağlanan DNaz resüpsansiyon tamponunun (DRB) 550 µl'si içinde çözün. Şişeyi açarken DNaz I (RNFD) kaybedilmediğinden emin olun. Sulandırılmış DNaz I'yı (RNFD) vortekslemeyin. DNaz I fiziksel denatürasyona özellikle duyarlıdır. Karıştırma sadece şişenin yavaşça tersine çevrilmesi ile gerçekleştirilmelidir.
- Mevcut veriler sulandırılmış DNaz I'nın (RNFD) 6 haftaya kadar 2-8°C'de saklanabileceğini göstermektedir. DNaz I'nın (RNFD) daha uzun dönemli saklanması için stok solüsyonunu cam şişeden çıkarın, tek kullanımlık alikotlara bölün (Kitle sağlanan 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerini [MCT] kullanın; 5 alikot için yeterlidir) ve 9 aya kadar -20°C'de saklayın. Çözünmüş alikotlar 6 haftaya kadar 2-8°C'de saklanabilir. Alikotları çözdükten sonra tekrar dondurmayın.
- DNaz I (RNFD) sulandırma ve alikot oluşturma sırasında, RNA kullanımına yönelik kılavuz ilkeleri izlediğinizden emin olun (Ek A, sayfa 71).
- Doğru çalkalayıcı adaptörünü takın (QIACube cihazları ile sağlanır; 2 ml güvenli kilit tüpleri için adaptörü kullanın, "2" ile işaretlenmiştir) ve çalkalayıcı rafı adaptörün üstüne koyun.
- Atık çekmecisini kontrol edin ve gerekirse boşaltın.
- Daha önceki çalışmalar için yapılmadıysa tüm ilgili protokolleri yükleyin. QIACube Connect MDx, ilgili zip dosyasında bulunan tüm protokollerin indirilmesini gerektirir. Klasik QIACube için, Hem "PAXgene Blood RNA Part A" hem de "PAXgene Blood RNA Part B" protokollerini yükleyin. Bkz. "QIACube cihazlarına protokol yükleme", sayfa 44.

\* Kunitz üniteleri yaygın olarak DNaz I ölçümü için kullanılmaktadır. 25°C sıcaklıkta, pH 5,0'da substrat olarak yüksek ölçüde polimerize DNA kullanıldığında  $A_{260}$ 'ta bir mililitre için dakika başına 0,001 artışa yol açan DNaz I miktarı olarak tanımlanmaktadır (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ve 363).



## Prosedür

1. QIACube cihaz kapağını kapatın ve QIACube cihazını güç anahtarıyla açın (QIACube Connect MDx: bkz. Şekil 17, sayfa 42; QIACube: bkz. Şekil 18, sayfa 43 Şekil 15).  
Bir bip sesi duyulur ve başlangıç ekranı görülür. Cihazlar otomatik olarak başlatma testlerini gerçekleştirir.
2. QIACube cihazının kapağını açın ve gerekli reaktifleri ve plastik malzemeleri QIACube cihazına yükleyin. Bkz. "QIACube cihazlarını yükleme", sayfa 45.  
Zamandan tasarruf etme amacı ile yükleme sonraki 10 dakikalık santrifügasyon adımlarının (adım 3 ve 5) biri veya her ikisi sırasında yapılabilir.
3. PAXgene Blood RNA Tube'u (BRT) dışarı doğru açılır rotor kullanarak 10 dakika boyunca 3000-5000 x g hızda santrifüjleyin.
  -  Kan hücrelerinin tam lizisini sağlamak için kan örneğinin PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) minimum 2 saat boyunca oda sıcaklığında (15-25°C) inkübe edildiğinden emin olun.
  -  Rotor, yuvarlak tabanlı tüpler için tüp adaptörleri içermelidir. Başka tür tüp adaptörü kullanılırsa tüpler santrifügasyon sırasında kırılabilir.
4. Süpernatanı dekantasyon veya pipetleme yoluyla çıkarın. Pellete 4 ml RNaz İçermeyen Su (RNFWS) ekleyin ve tüpü yeni bir sekonder BD Hemogard kapak kullanarak kapatın (kitle sağlanmaktadır).  
Süpernatanın dekantasyonu yapılırsa pelleti bozmamaya dikkat edin ve tüpün kenarını temiz bir kağıt havluyla kurulaştırın.
5. Pellet görünür şekilde çözününceye kadar vorteksleyin ve bir dışarı doğru açılır rotor kullanarak 10 dakika boyunca 3000-5000 x g hızda santrifüjleyin. Süpernatanın tamamını çıkarın ve atın.  
Vortekslemeden sonra ancak santrifüjleme işleminden önce süpernatanda az miktarda kalıntı kalması işlemi etkilemeyecektir.
  -  Süpernatanın tam olarak giderilmemesi lizisi önleyecek ve lizati sulandıracaktır. Bu nedenle RNA'nın PAXgene membranına bağlanma koşullarını etkileyecektir.

6. 350 µl resüspanسیون tamponu (BR1) ekleyin ve pellet görünür şekilde çözünönceye kadar vorteksleyin.

7. Örneği bir 2 ml işleme tüpüne (PT) pipetleyin.



PAXgene Blood RNA Kit ile verilen 2 ml'lik işleme tüplerini (PT) kullanın.

8. Örnek içeren açık işleme tüplerini (PT) QIAcube cihazı çalkalayıcısına yükleyin (QIAcube Connect MDx: bkz. Şekil 21, sayfa 47; QIAcube: bkz. Şekil 22, sayfa 48 Şekil 15). Örnek pozisyonları yükleme kolaylığı açısından numaralandırılmıştır. Her işleme tüpünün yanındaki çalkalayıcı rafında kenardaki yuvalar içine çalkalayıcı rafı tıkaçları (QIAcube cihazları ile sağlanmış) yerleştirin. Bunlar örneklerin yükleme kontrolü sırasında saptanmasını mümkün kılar.



Doğru çalkalayıcı adaptörünün (Çalkalayıcı Adaptörü, 2 ml, güvenli kilit tüpleri, "2" ile işaretlenmiştir, QIAcube cihazları ile sağlanır) yüklendiğinden emin olun.



Eğer 12'den az örnek işleniyorsa çalkalayıcı rafını Şekil 26, sayfa 52 içinde gösterildiği gibi yüklediğinizden emin olun. Bir (1) veya 11 örnek işlenemez. Çalkalayıcı rafındaki pozisyon numaraları, santrifüjdeki pozisyon numaralarına karşılık gelir.

9. QIAcube cihazı kapağını kapatın (QIAcube Connect MDx: bkz. Şekil 17, sayfa 42; QIAcube: bkz. Şekil 18, sayfa 43).

10. "PAXgene Blood RNA Part A" protokolünü seçin ve protokolü başlatın.

QIAcube cihazı dokunmatik ekranında verilen talimatları izleyin.



Her iki program kısmının (kısım A ve kısım B) QIAcube cihazı üzerinde yüklenmiş olduğundan emin olun (bkz. "QIAcube cihazlarına protokol yükleme", sayfa 44).



QIAcube cihazları örnekler, uçlar, rotor adaptörleri ve reaktif şişeleri için yükleme kontrolü yapacaktır.

11. "PAXgene Blood RNA Part A" protokolü bittikten sonra, QIAcube cihaz kapağını açın (QIAcube Connect MDx: bkz. Şekil 17, sayfa 42; QIAcube: bkz. Şekil 18, sayfa 43).

PAXgene RNA döndürme kolonlarını (PRC) rotor adaptörlerinden ve boş işleme tüplerini (PT) çalkalayıcıdan çıkarın ve atın.



Çalışma sırasında döndürme kolonları, rotor adaptörü pozisyonu 1'den (kapak pozisyonu L1) rotor adaptörü pozisyonu 3'e (kapak pozisyonu L2) cihaz tarafından aktarılır (bkz. Şekil 24, sayfa 50).

12. Rotor adaptörlerinde saflaştırılmış RNA içeren tüm 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerinin (MCT) kapaklarını kapatın (pozisyon 3, kapak pozisyonu L3, bkz. Şekil 24, sayfa 50). 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerini (MCT) QIAcube cihazı çalkalayıcı adaptörüne aktarın (QIAcube Connect MDx: bkz. Şekil 21, sayfa 47; QIAcube: bkz. Şekil 22, sayfa 48).
13. QIAcube cihazı kapağını kapatın (QIAcube Connect MDx: bkz. Şekil 17, sayfa 42; QIAcube: bkz. Şekil 18, sayfa 43).
14. "PAXgene Blood RNA Part B" protokolünü seçin ve protokolü başlatın.

QIAcube cihazı dokunmatik ekranı üzerinde verilen talimatı izleyin.



Bu program örnekleri 65°C'de inkübe eder ve RNA'yı aşağı yönde uygulamalar için denatüre eder. Aşağıya yönde uygulamaya bir ısı denatürasyonu adımı dahil olsa da bu adımı atlamayın. Aşağı yönde uygulamalarda maksimum etkinlik için yeterli RNA denatürasyonu şarttır.

15. "PAXgene Blood RNA Part B" programı bittikten sonra, QIAcube cihaz kapağını açın (QIAcube Connect MDx: bkz. Şekil 17, sayfa 42; QIAcube: bkz. Şekil 18, sayfa 43). Saflaştırılmış RNA içeren mikrosantrifüj tüplerini (MCT) hemen buz üstüne yerleştirin.



**UYARI:** Sıcak yüzey. Çalkalayıcı 70°C'ye kadar sıcaklıklara ulaşabilir. Sıcakken dokunmaktan kaçının.



Saflaştırılmış RNA'nın QIAcube cihazı içinde kalmasına izin vermeyin. Örnekler soğutulmadığından saflaştırılmış RNA degrade olabilir. Bu nedenle başında beklenmeyen gece örnek hazırlama çalışmaları önerilmez.

16. RNA örnekleri hemen kullanılmayacaksa -20°C veya -70°C'de saklayın.

RNA tekrarlanan dondurma ve çözmeden sonra denatüre durumda kaldığından ısı inkübasyonu protokolünü ("PAXgene Blood RNA Part B") tekrarlamak gerekmez. RNA örnekleri diagnostik bir tahlilde kullanılacaksa üretici tarafından sağlanan talimatları izleyin.

RNA'nın 260 nm'de absorbans ile doğru kantifikasyonu için örneklerin 10 mM Tris-HCl ile pH 7,5'de seyreltilmesini öneririz.\* Örneği RNaz İçermeyen Suda seyreltmek yanlış olarak düşük değerlere neden olabilir.

Spektrofotometriyi ölçülecek örneklerle aynı oranda elüsyon tamponu (BR5) ve Tris-HCl tamponundan oluşan bir kör kullanarak sıfırlayın. Elüsyon tamponunun (BR5) 220 nm'de yüksek absorbansı vardır ve bu durum eğer spektrofotometre uygun şekilde sıfırlanmazsa yüksek arka alan absorbans seviyelerine yol açabilir.



Tris-HCl tamponunda kantifikasyon için şu ilişkiyi kullanın:

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Bkz. Ek B, sayfa 72.

17. Reaktif şişesi rafını QIAcube cihazı çalışma tablasından çıkarın (QIAcube Connect MDx: bkz. Şekil 21, sayfa 47; QIAcube: bkz. Şekil 22, sayfa 48) ve tüm şişeleri uygun şekilde etiketlenmiş kapaklarla kapatın. Şişelerdeki tampon 3 aya kadar oda sıcaklığında (15-25°C) saklanabilir. QIAcube cihazının mikrosantrifüj tüpü yuvalarında, işleme tüplerinde (PT) kalan reaktifleri çıkarın ve atın. Rotor adaptörlerini santrifüjden çıkarın ve atın. QIAcube Connect MDx atık çekmecesini boşaltın (QIAcube Connect MDx: bkz. Şekil 17, sayfa 42; QIAcube: bkz. Şekil 18, sayfa 43). QIAcube cihaz kapağını kapatın ve cihazı güç anahtarıyla kapatın.

\* Kimyasallarla çalışırken, daima uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (safety data sheets, SDS'ler) başvurun.

# Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için Teknik Destek Merkezimizdeki Sık Sorulan Sorular sayfasına bakın: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGEN Teknik Servislerindeki bilim insanları bu el kitabındaki bilgi ve protokollerle ya da örnek ve tahlil teknolojileriyle ilgili herhangi bir sorunuzu cevaplandırmaktan daima mutlu olacaktır (irtibat bilgileri için son sayfaya bakın veya [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresini ziyaret edin).

## Yorum ve öneriler

### RNA degradasyonu

RNaz kontaminasyonu



Prosedür veya daha sonraki muamele sırasında reaktiflere herhangi bir RNaz sokmamaya dikkat edin (bkz. Ek A, sayfa 71).

### Düşük RNA verimi

a) PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) 2,5 ml'den az kan toplanmış



PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT, bkz. *PAXgene Blood RNA Tube El Kitabı*) 2,5 ml kan toplandığından emin olun.

b) Suda ölçülen RNA konsantrasyonu



Doğru kantifikasyon için RNA 10 mM Tris-HCl, pH 7,5\* içinde seyreltilmelidir (bkz. Ek B, sayfa 72).

c) Manuel protokolde adım 9 ve 10'da PAXgene RNA döndürme kolonuna (PRC) hücre kalıntıları aktarılmış



Manuel protokolde adım 7'de süpernatanın pipetlenmesi sırasında büyük partikülleri aktarmaktan kaçının (küçük kalıntıların aktarılması işlemi etkilemez).

\* Kimyasallarla çalışırken, daima uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (safety data sheets, SDS'ler) başvurun.

## Yorum ve öneriler

- d) Süpernatant adım 3'te tamamen giderilmemiş



Süpernatantın tamamen giderildiğinden emin olun. Süpernatantın dekantasyonu yapılmışsa PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kenarından damlaları bir kağıt havluyula dokunarak giderin. Çapraz kontaminasyonu önlemek için uygun önlemleri alın.

- e) Kan, PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) toplandıktan sonra 2 saatten kısa süreliğine inkübe edilmiş



PAXgene Blood RNA Tube'daki (BRT) kanı topladıktan sonra en az 2 saat boyunca inkübe edin.

### Düşük $A_{260}/A_{280}$ değeri

- a)  $A_{260}/A_{280}$  ölçümü için RNA seyreltmek üzere su kullanılmış



Saflığı ölçmeden önce RNA'yı seyreltmek için 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 kullanın\* (bkz. Ek B, sayfa 72).

- b) Spektrofotometre uygun olarak sıfırlanmamış



Spektrofotometreyi ölçülecek örneklerle aynı oranda elüsyon tamponu (BR5) ve 10 mM Tris-HCl, pH 7,5'ten oluşan bir kör kullanarak sıfırlayın. Elüsyon tamponunun (BR5) 220 nm'de yüksek absorpsansı vardır ve bu durum eğer spektrofotometre uygun şekilde sıfırlanmazsa yüksek arka alan absorpsans seviyelerine yol açabilir.

### Cihaz arızası

QIACube cihazları doğru şekilde çalışmamış

Sorun Giderme kısmına özellikle dikkat ederek ilgili QIACube kullanım kılavuzu belgesini okuyun. QIACube cihazı bakımının kullanım kılavuzu içinde açıklandığı gibi uygun şekilde yapıldığından emin olun.

\* 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.

# Ek A: RNA Muamelesiyle İlgili Genel Notlar

## RNA Muamelesi



Ribonükleazlar (RNazlar) genel olarak çalışmak için kofaktörler gerektirmeyen çok stabil ve aktif enzimlerdir. RNazların inaktivasyonu zor olduğundan ve RNA'nın degradasyonu için çok az miktarlar bile yeterli olduğundan öncelikle RNaz kontaminasyonu olasılığını ortadan kaldırmadan herhangi bir plastik veya cam malzeme kullanmayın. Saflaştırma işlemi sırasında veya sonrasında RNA örneğine RNazları istemeden sokmamak için çok dikkatli olunmalıdır. RNaz içermeyen bir ortam oluşturmak ve sürdürmek için RNA ile çalışırken tek kullanımlık olan ve olmayan kaplar ve solüsyonların ön muamelesi ve kullanımı sırasında önlemler alınmalıdır.

## Genel muamele



RNA ile çalışırken daima uygun mikrobiyolojik aseptik teknik kullanılmalıdır. Eller ve toz partikülleri bakteri ve küf taşımakta olup RNaz kontaminasyonunun en sık görülen kaynaklarıdır. Cilt yüzeyinden veya tozlu laboratuvar ekipmanından RNaz kontaminasyonunu önlemek için reaktifler ve RNA örneklerinin kullanımı sırasında daima lateks veya vinil eldivenler kullanın. Eldivenleri sık sık değiştirin ve tüpleri mümkün olduğunca kapalı tutun. Alikotlar aşağı yönde uygulamalar için pipetlendiğinde saflaştırılmış RNA'yı buz üzerinde tutun.

Cam malzeme ve solüsyonlardan RNaz kontaminasyonunu giderme protokolleri şunlar gibi genel moleküler biyoloji kılavuzlarında bulunabilir: Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# Ek B: Total RNA Kantifikasyonu ve Kalitesinin Belirlenmesi

## RNA Kantifikasyonu

RNA konsantrasyonu, absorbansı bir spektrofotometrede 260 nm ( $A_{260}$ ) değerinde ölçerek belirlenmelidir. Sonuçların öneminden emin olmak için ölçümler spektrofotometrenin lineer aralığında olmalıdır. 260 nm değerinde 1 birimlik bir absorbans, ml başına 44 µg RNA değerine karşılık gelir ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ ). Bu ilişki sadece 10 mM Tris-HCl, pH 7,5,\* içindeki ölçümler için geçerlidir. Bu nedenle RNA örneğinin seyreltilmesi gerekir ve bu işlem 10 mM Tris-HCl içinde yapılmalıdır. Aşağıda açıklandığı gibi (bkz "RNA Saflığı", sayfa 73), 260 ve 280 nm değerlerinde absorbansın oranı RNA saflığının bir tahminini sağlar. RNA örnekleri ölçülürken kuvvetlerin RNaz içermediğinden emin olun. Spektrofotometriyi ölçülecek örneklerle aynı oranda elüsyon tamponu (BR5) ve Tris-HCl tamponundan oluşan bir kör kullanarak sıfırlayın. Elüsyon tamponunun (BR5) 220 nm'de yüksek absorbansı vardır ve bu durum eğer spektrofotometre uygun şekilde sıfırlanmazsa yüksek arka alan absorbans seviyelerine yol açabilir. RNA kantifikasyonunda yer alan hesaplama bir örnek aşağıda gösterilmiştir.

RNA örneğinin hacmi	=	80 µl
Dilüsyon (1/15)	=	10 µl RNA örneği + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Seyreltilmiş örneğin absorbansını bir kuvvette (RNaz içermeyen) ölçün.		
$A_{260}$	=	0,3
Örneğin konsantrasyonu	=	$44 \times A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 µg/ml
Toplam verim	=	konsantrasyon x mililitre cinsinden örnek hacmi
	=	$198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 µg RNA

\* Kimyasallarla çalışırken, daima uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (safety data sheets, SDS'ler) başvurun.



## RNA Saflığı

260 nm ve 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) değerlerinde ölçümlerin oranı protein gibi UV emen kontaminanlara göre RNA saflığının bir tahminini sağlar. Ancak  $A_{260}/A_{280}$  oranı pH değerinden önemli derecede etkilenmektedir. Daha düşük pH, daha düşük  $A_{260}/A_{280}$  oranı ve protein kontaminasyonuna karşı azalmış duyarlılığa neden olmaktadır.\* Doğru değerlerin elde edilmesi için absorbansın 10 mM Tris-HCl'de, pH 7,5'te ölçülmesini öneririz. Saf RNA için  $A_{260}/A_{280}$  oranı 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 içinde 1,8-2,2 aralığındadır. Spektrofotometreyi ölçülecek örneklerle aynı oranda elüsyon tamponu (BR5) ve Tris-HCl tamponundan oluşan bir kör kullanarak sıfırlayın. Elüsyon tamponunun (BR5) 220 nm'de yüksek absorbansı vardır ve bu durum eğer spektrofotometre uygun şekilde sıfırlanmazsa yüksek arka alan absorbans seviyelerine yol açabilir.

\* 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.

# Ek C: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) Kullanımı



PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) kullanılırken BD'nin aşağıdaki önerileri yardımcı olabilir. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) hakkında daha fazla bilgi için *PAXgene Blood RNA Tube El Kitabı* belgesine bakın.

## **BD Hemogard Kapağının Çıkarılması Talimatı**

1. Başparmağınızı BD Hemogard kapağının altına yerleştirerek PAXgene Blood RNA Tube'u (BRT) bir elinizle kavrayın. (Ek stabilite için kolunuzu sağlam bir yüzeye yerleştirin.) Diğer elinizle, BD Hemogard kapağı çevirirken diğer elin başparmağını SADECE TÜP TAPASI GEVŞEYİNCEYE KADAR aynı anda yukarı itin.
2. Kapağı kaldırmadan önce başparmağınızı uzaklaştırın. Başparmağınızı kapağı PAXgene Blood RNA Tube'dan (BRT) iterek çıkarmak için KULLANMAYIN. Dikkat: PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan içeriyorsa maruz kalma tehlikesi mevcuttur. Kapağın çıkarılması sırasında yaralanmayı önlemek için BD Hemogard kapak gevşer gevşemez, kapağı yukarı itmek için kullanılan başparmağın, PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ile temasının kesilmesi önemlidir.
3. Kapağı PAXgene Blood RNA Tube'dan (BRT) kaldırıp çıkarın. Plastik kalkanın lastik tapadan ayrılması gibi pek olası olmayan bir durumda KAPAĞI YENİDEN MONTE ETMEYİN. Lastik tapayı dikkatlice PAXgene Blood RNA Tube'dan (BRT) çıkarın.

## **İkincil BD Hemogard Kapağını yerleştirme talimatları**

1. Kapağı PAXgene Blood RNA Tube (BRT) üzerine tekrar yerleştirin.
2. Tapa tamamen yerine oturuncaya kadar çevirerek aşağıya doğru sıkıca itin. Kullanım sırasında kapağın PAXgene Blood RNA Tube (BRT) üzerinde sağlam bir şekilde kalması için tapanın tam olarak tekrar yerleştirilmesi gereklidir.

# Sipariş Bilgileri

Ürün	İçerik	Kat. no.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, İşleme Tüpleri, RNaz İçermeyen DNaz I, RNaz İçermeyen Reaktifler ve Tamponlar. PAXgene Blood RNA Tubes ile kullanılacaktır	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 kan toplama tüpü	762165
<b>QIAGEN'den sipariş edilebilecek ilgili ürünler</b>		
Starter Pack, QIAcube	Paket şunları içerir: reaktif şişesi rafları (3); raf etiketleme şeritleri (8); 200 µl filtre uçları (1024); 1000 µl filtre uçları (1024); 1000 µl filtre uçları, geniş açıklıklı (1024); 30 ml reaktif şişeleri (18); rotor adaptörleri (240); rotor adaptör tutucusu	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Steril, Tek Kullanımlık Filtre Uçları, rafta	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reaktif Şişeleri (30 ml), kapaklı; 6'lı paket; QIAcube cihazı reaktif şişesi rafıyla kullanılmak üzere	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	240 hazırlık için: 240 Tek Kullanımlık Rotor Adaptörü; QIAcube cihazları ile kullanılmak üzere	990394
Reagent Bottle Rack	QIAcube cihazı çalışma tablası üzerinde 6 x 30 ml reaktif şişesi tutmak için raf	990390

Rotor Adapter Holder	12 tek kullanımlık rotor adaptörü için tutucu; QIAcube cihazları ile kullanılmak üzere	990392
<b>BD'den sipariş edilebilecek ilgili ürünler*</b>		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21 G, 0,75 inç (0,8 x 19 mm) iğne, luer adaptörü ile 12 inç (305 mm) tüp; kutu başına 50, karton başına 200	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Sadece 13 mm ve 16 mm çap için karton; 1000/karton	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4,0 ml çekmeli, kırmızı BD Hemogard kapaklı ve kağıt etiketli; 100/kutu, 1000/karton	368975

\* Bu kan toplama aksesuarları, PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ile birlikte kullanılacak tipik ürünleri temsil etmektedir. Nasıl sipariş edileceği dahil bu aksesuarlar hakkında daha fazla bilgi için [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) adresine gidin.

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne spesifik ret beyanları için ilgili PreAnalytiX veya QIAGEN kiti el kitabı veya kullanım kılavuzuna bakın. PreAnalytiX ve QIAGEN kiti el kitapları ve kullanım kılavuzları [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) ve [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adreslerinden temin edilebilir veya PreAnalytiX Teknik Servisinden talep edilebilir.

# El Kitabı Revizyon Geçmişi

Belge ve revizyon	Değişiklikler	Tarih
HB-0101-004, R2	Belge genelinde GHS düzenlemeleri ile uyum sağlamaya yönelik değişiklikler	Haziran 2015
HB-0101-005, R3	Yeni şablon; otomatik protokol ve performans verilerinde revizyonlar; GHS düzenlemeleri ile uyum sağlamaya yönelik Güvenlik Bilgileri güncellemesi; cihaz ayrıntılarında ve Ürün Kullanımı Sınırlamaları beyanında değişiklikler.	Şubat 2019
HB-0101-006, R3	Kit içeriği tablosu s.5'te kit adının düzeltilmesi.	Ocak 2020
HB-0101-007, R4	Otomatik protokole QIAcube Connect MDx cihazının eklenmesi; QIAcube Connect MDx için referanslar eklemek amacıyla belge genelinde dilin güncellenmesi; belge genelinde tablo, sayfa ve şekil numaralarının güncellenmesi.	Aralık 2020

## Dünya Geneline PreAnalytiX

PreAnalytiX ürünleri QIAGEN ve BD şirketleri tarafından dağıtılmaktadır

### QIAGEN – Müşteri Hizmetleri

Sipariş [www.QIAGEN.com/shop](http://www.QIAGEN.com/shop) | Teknik Destek [support.qiagen.com](mailto:support.qiagen.com) | Web Sitesi [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

### BD – Müşteri Hizmetleri

#### 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: [customer-care.at@bd.com](mailto:customer-care.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: [customer-care.de@bd.com](mailto:customer-care.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

