

Diciembre de 2020

Manual de uso de PAXgene[®] Blood RNA Kit

Versión 2



50 (n.º de catálogo 762174)

R4 **MAT** 1122120ES

REF 762174



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



A QIAGEN / BD Company

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

Los PAXgene Blood RNA Kits no están disponibles en todos los países; solicite información al respecto.

Acuerdo de licencia limitada

El uso de este producto implica por parte del comprador o usuario de PAXgene Blood RNA Kit la aceptación de los siguientes términos:

1. El PAXgene Blood RNA Kit debe usarse exclusivamente conforme a las instrucciones del Manual de uso del PAXgene Blood RNA Kit y solamente con los componentes contenidos en el kit. PreAnalytiX no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en el Manual de uso del PAXgene Blood RNA Kit y en protocolos adicionales disponibles en www.preanalytix.com.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, PreAnalytiX no garantiza que este kit ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. PreAnalytiX niega específicamente cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas.
6. PreAnalytiX se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.preanalytix.com.

Venta condicionada

El presente producto viene con una licencia bajo ciertas reivindicaciones de patentes (US-7,270,953, US-7,682,790 y EP-1820793 B1 y sus equivalentes internacionales) para usar el producto para procesar el complejo de ácidos nucleicos formado en el curso de la recogida de muestras en un tubo PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005-2020 PreAnalytiX GmbH, todos los derechos reservados.

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

Distribuidores de PreAnalytiX

Los productos de PreAnalytiX los fabrica y distribuye QIAGEN o BD para PreAnalytiX. Los productos no se pueden solicitar directamente a PreAnalytiX GmbH.

Consulte la contraportada si desea ver la información de contacto de su distribuidor local de PreAnalytiX.

Contenido

Contenido del kit	5
Símbolos	6
Condiciones de almacenamiento	7
Uso previsto	8
Limitaciones del uso del producto	8
Control de calidad.....	9
Asistencia técnica	9
Información de seguridad.....	10
Introducción	13
Principio y procedimiento.....	13
Obtención y estabilización de las muestras	14
Concentración y purificación del ARN	19
Purificación manual del ARN	19
Purificación automatizada del ARN	29
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario.....	38
Notas importantes	41
Uso de los instrumentos QIAcube	41
Instalación de protocolos en los instrumentos QIAcube	44
Carga de los instrumentos QIAcube	45
Protocolo: Purificación manual de ARN total a partir de sangre total humana recogida en PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	55

Protocolo: Purificación automatizada de ARN total a partir de sangre total humana recogida en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	63
Guía para la resolución de problemas	71
Apéndice A: Consideraciones generales sobre la manipulación del ARN	73
Apéndice B: Cuantificación y determinación de la calidad del ARN total.....	74
Apéndice C: Manipulación de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	76
Información para pedidos	77
Historial de revisiones del manual	79

Contenido del kit

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
N.º de catálogo			762174
Número de preparaciones			50
BR1	Resuspension Buffer (tampón de resuspensión)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer* (tampón de unión)	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1* (tampón de lavado 1)	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 [†] (concentrate) (tampón de lavado 2, [concentrado])	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (tampón de elución)	ELU BUF	6 ml
RNFW	Agua sin ADNasa (botella)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteina K (green lid) (proteína K [tapa verde])	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (columnas de centrifugación PAXgene RNA [rojas])	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (tubos de procesamiento) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (cierres secundarios BD Hemogard™)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (tubos de microcentrifugadora) (1,5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (ADNasa I libre de ARNasa [liofilizada])	DNA REM	1.500 unidades Kunitz*
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (tampón de digestión de ADN [tapa blanca])	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tampón de resuspensión de ADNasa) (tube, lilac lid [tubo, tapa lila])	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (columnas de centrifugación PAXgene Shredder [lila])	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Manual	Manual de uso de PAXgene Blood RNA Kit (versión 2)		1

*No compatible con reactivos desinfectantes que contengan lejía. Contiene una sal de guanidina. Consulte la página 10 si desea obtener información relativa a la seguridad.

[†] El tampón de lavado 2 (BR4) se suministra concentrado. Antes de usarlo por primera vez, añada 4 volúmenes de etanol (grado de pureza del 96-100%, p.a.) según se indica en el frasco para obtener una solución de trabajo.

Símbolos



Contiene suficientes reactivos para <N> pruebas



Consulte las instrucciones de uso



Fecha de caducidad



Producto sanitario para diagnóstico in vitro



Número de catálogo



Número de lote



Número de material



Componentes



Número



Método de esterilización utilizando irradiación



Unidades Kunitz



Adición



Contiene



Reconstituido



Desoxirribonucleasa I

* La actividad de la ADNasa I se mide habitualmente en unidades Kunitz, que se definen como la cantidad de ADNasa I que provoca un aumento de A_{260} de 0,001 por minuto y por mililitro a 25 °C y pH 5,0, utilizando ADN altamente polimerizado como sustrato (Kunitz, M. [1950] J. Gen. Physiol. **33**, 349 y 363).

	Etanol
	Isotiocianato de guanidina
	RNase-Free DNase Set
	Número mundial de artículo comercial
	No reutilizar
	Limitación de temperatura
	Límite superior de temperatura
	Fabricante
	Nota importante

Condiciones de almacenamiento

Las columnas de centrifugación PAXgene RNA (PRC), las columnas de centrifugación PAXgene Shredder (PSC), la proteinasa K (PK) y los tampones (BR1, BR2, BR3, BR4 y BR5) se deben conservar en seco a la temperatura indicada en la etiqueta del kit.

RNase-Free DNase Set, que contiene ADNasa I (RNFD), tampón de digestión de ADN (RDD) y tampón de resuspensión de ADNasa (DRB), se envía a temperatura ambiente. Tras la recepción, conserve inmediatamente todos los componentes de RNase-Free DNase Set a la temperatura indicada en la etiqueta. Cuando se conserva en las condiciones correctas, el kit es estable hasta la fecha de caducidad que figura en su caja.

Uso previsto

El PAXgene Blood RNA System se compone de un tubo de recogida de sangre (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) y de un kit de purificación de ácidos nucleicos (PAXgene Blood RNA Kit). Está previsto para la recogida, el almacenaje y el transporte de sangre y la estabilización de ARN intracelular en un tubo cerrado y el posterior aislamiento y purificación del ARN anfitrión a partir de sangre total para RT-PCR que se utiliza en pruebas de diagnóstico molecular.

Las características de rendimiento del PAXgene Blood RNA System solamente se han establecido con los transcritos de los genes FOS e IL1B. El usuario es responsable de establecer las características de rendimiento correspondientes del PAXgene Blood RNA System para otros transcritos de interés.

Indicaciones de uso

El PAXgene Blood RNA Kit está indicado para purificar ARN intracelular a partir de sangre total obtenida en un tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Mediante el uso del kit con el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT), el sistema proporciona ARN intracelular purificado a partir de sangre total para RT-PCR utilizada en pruebas de diagnóstico molecular.

Limitaciones del uso del producto

El PAXgene Blood RNA Kit está indicado para purificar ARN intracelular a partir de sangre total humana ($4,8 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^7$ leucocitos/ml) para aplicaciones de diagnóstico in vitro. No está indicado para la purificación de ADN genómico o ácidos nucleicos virales a partir de sangre total humana. No se han establecido las características de rendimiento para todos los transcritos debido al escaso número de estos que han sido validados para especificaciones de estabilización (transcritos de los genes FOS e IL1B). Los usuarios deben revisar los datos del fabricante y sus propios datos para determinar si es necesario validar el sistema para otros transcritos.

Este producto está concebido para que lo utilicen usuarios profesionales, como técnicos y médicos que han recibido formación en procedimientos de diagnóstico in vitro.

Consulte el *manual de PAXgene Blood RNA Tube* si desea obtener información acerca del uso de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote de PAXgene Blood RNA Kit se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

Asistencia técnica

En QIAGEN, nos enorgullecemos de la calidad y disponibilidad de nuestra asistencia técnica. Nuestros departamentos de servicio técnico cuentan con científicos expertos con amplia experiencia en los aspectos prácticos y teóricos de la biología molecular y en el uso de los productos de PreAnalytiX. Si tiene alguna duda sobre PAXgene Blood RNA Kit, no dude en ponerse en contacto con nosotros.

Si desea recibir asistencia técnica y más información, llame al servicio técnico de QIAGEN.

Información de seguridad

En la UE: los usuarios deben notificar cualquier incidente grave relacionado con el dispositivo al fabricante y a la autoridad nacional competente. Fuera de la UE: póngase en contacto con el representante local de QIAGEN si se produce algún incidente o tiene alguna consulta relacionada con el dispositivo.

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados.

Para evitar el riesgo de infección (p. ej., por el VIH o por el virus de la hepatitis B) o lesiones cuando se trabaja con muestras biológicas y químicas, use siempre una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes. Dichas hojas están disponibles en un formato PDF cómodo y compacto en línea, en www.preanalytix.com, donde podrá encontrar, ver e imprimir las hojas de datos sobre seguridad correspondientes a este kit.

PRECAUCIÓN



NO añada lejía ni soluciones ácidas directamente a los residuos de la preparación de muestras.

El tampón de unión (BR2) y el tampón de lavado 1 (BR3) contienen tiocianato de guanidina, que puede formar compuestos de alta reactividad cuando se combina con lejía. Si se derrama tampón de unión (BR2) o tampón de lavado 1 (BR3), limpie la superficie con un detergente de laboratorio adecuado y agua. Si se derrama un líquido que contenga agentes potencialmente infecciosos, limpie primero la zona afectada con agua y un detergente de laboratorio y, a continuación, con hipoclorito sódico al 1% (v/v) (lejía).

La solución estabilizadora de ARN y la mezcla de sangre del tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pueden desinfectarse usando 1 volumen de una solución comercial de lejía (hipoclorito sódico al 5%) por 9 volúmenes de mezcla de sangre y solución estabilizadora de ARN.

Los residuos obtenidos durante la preparación de las muestras, como los sobrenadantes de los pasos de centrifugación del procedimiento de purificación del ARN, deben considerarse potencialmente infecciosos. Antes de su eliminación, los residuos deben procesarse en autoclave o incinerarse para destruir todo material infeccioso. La eliminación debe realizarse conforme a la normativa vigente.

Las siguientes frases relativas a los riesgos y a las medidas de precaución son aplicables a PAXgene Blood RNA Kit. Consulte el *manual de PAXgene Blood RNA Tube* si desea obtener información de seguridad sobre los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Tampón BR2



Contiene: tiocianato de guanidina. ¡Peligro! Nocivo en caso de ingestión. Puede ser nocivo en contacto con la piel y por inhalación. Provoca lesiones oculares graves. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos a largo plazo. En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llámese inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.

Tampón BR3



Contiene: etanol, tiocianato de guanidina. ¡Peligro! Líquido y vapor inflamables. Provoca lesiones oculares graves. En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. Conservar alejado del calor, chispas, llamas abiertas y superficies calientes. No fumar. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llámese inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.

ADNasa I



Contiene: ADNasa. ¡Peligro! Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Evítese respirar polvo/humo/gas/nebulizaciones/vapores/pulverizaciones. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Llevar equipo de protección respiratoria. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar.

Proteinasa K



Contiene: proteinasa K. ¡Peligro! Causa irritación leve de la piel. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Evítese respirar polvo/humo/gas/nebulizaciones/vapores/pulverizaciones. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Llevar equipo de protección respiratoria. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar.

Introducción

La obtención de sangre total es el primer paso en muchos procedimientos moleculares que se usan para analizar el ARN celular. No obstante, el principal problema de estos experimentos es la inestabilidad del perfil de ARN celular *in vitro*. Los estudios de PreAnalytiX han demostrado que el número de copias de cada especie de ARNm presente en la sangre total puede experimentar cambios de una magnitud superior a 1.000 veces durante el almacenamiento o el transporte a temperatura ambiente*. Esto se debe a la rápida degradación del ARN y a la expresión inducida de ciertos genes una vez extraída la sangre. Estos cambios del perfil de expresión del ARN hacen que sea imposible llevar a cabo estudios de expresión génica fiables. Por consiguiente, es esencial disponer de un método que conserve el perfil de expresión del ARN durante y después de la flebotomía para poder realizar un análisis exacto de la expresión génica en sangre total humana.

Principio y procedimiento

PreAnalytiX ha desarrollado un sistema que permite obtener, estabilizar, conservar y transportar muestras de sangre total humana, junto con un protocolo rápido y eficaz para la purificación de ARN intracelular. El sistema requiere el uso de tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; patentes de Estados Unidos 6,602,718 y 6,617,170) para la obtención de sangre y la estabilización del ARN, seguido de la purificación manual o automatizada del ARN por medio del PAXgene Blood RNA Kit. Tanto el protocolo automatizado como el manual proporcionan una obtención de ARN de cantidad y calidad prácticamente idénticas. En este manual, se incluyen datos de rendimiento del protocolo manual (páginas 22-29) y del protocolo automatizado (páginas 31-35).



El QIAcube Connect MDx de QIAGEN no se encuentra disponible en todos los países. Si desea obtener más información, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN.

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

Obtención y estabilización de las muestras

Los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contienen una combinación de reactivos registrada basada en una tecnología patentada para la estabilización del ARN. Esta combinación de reactivos protege a las moléculas de ARN de la degradación por ARNasas y reduce al mínimo los cambios ex vivo de la expresión génica. Los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) están indicados para la obtención de sangre total humana y la estabilización del ARN celular durante un máximo de 3 días a 18-25 °C (figuras 1 y 2, páginas 15 y 16) o durante un máximo de 5 días a 2-8 °C (figuras 3 y 4, páginas 17 y 18). Los datos actualmente disponibles muestran la estabilización del ARN celular durante al menos 11 años a -20 °C o -70 °C*. Si desea obtener más información sobre los estudios en curso que evalúan la estabilidad durante periodos de tiempo más largos, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN.

La duración real de la estabilización del ARN puede variar dependiendo de la especie de ARN celular y de la posterior aplicación que se utilice. No se han establecido las características de rendimiento para todos los transcritos debido al escaso número de estos que han sido validados para especificaciones de estabilización (transcritos de los genes FOS e IL1B). Los usuarios deben revisar los datos del fabricante y sus propios datos para determinar si es necesario validar el sistema para otros transcritos.

* Actualmente se está llevando a cabo un estudio a largo plazo de conservación de sangre en tubos PAXgene Blood RNA Tubes.

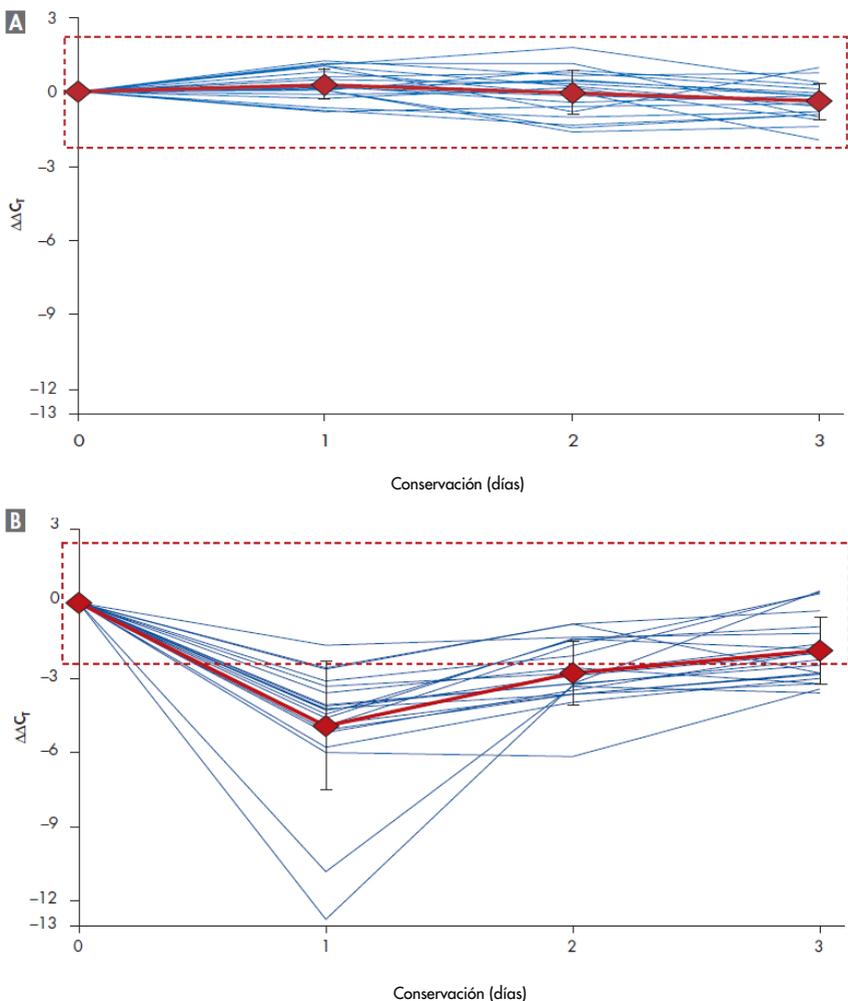


Figura 1. Estabilidad del ARN en muestras de sangre a 18-25 °C: FOS Se extrajo sangre de 10 donantes, obteniéndose muestras duplicadas que se conservaron a 18-25 °C durante el número indicado de días; a continuación se llevó a cabo una purificación del ARN total. **[A]** La sangre se extrajo y conservó en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) y el ARN total se purificó con PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** La sangre se extrajo y se conservó en tubos estándar para recogida de sangre con EDTA como anticoagulante y el ARN total se purificó con un método estándar de extracción orgánica con purificación de ARN con membrana de sílice. Las concentraciones relativas del transcrito de FOS se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Se representan los valores de todas las muestras, indicándose las medias y las desviaciones estándar. Las líneas discontinuas indican el intervalo ± 3 x de precisión total del ensayo (2,34 C_t).

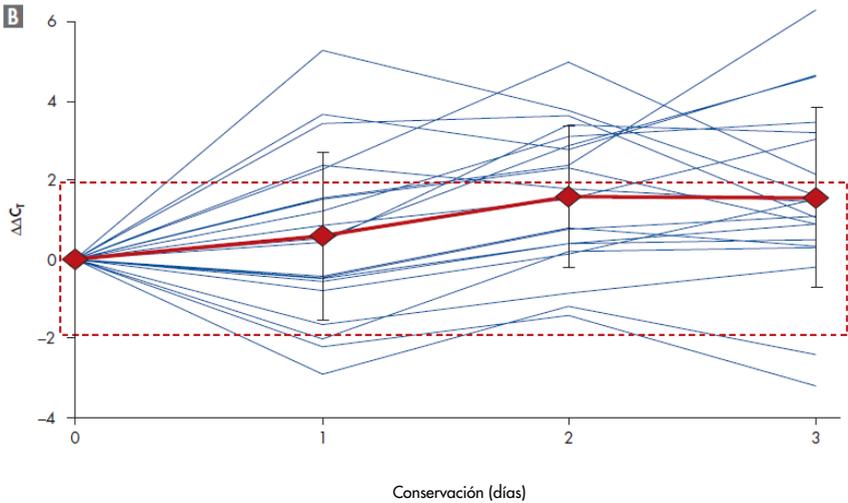
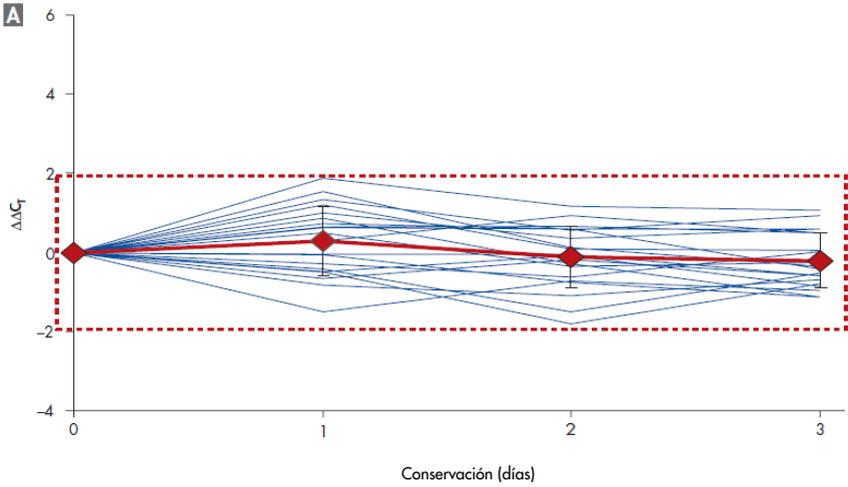


Figura 2. Estabilidad del ARN en muestras de sangre a 18-25 °C: IL1B Se extrajo la sangre y se purificó el ARN total, después de conservarla a 18-25 °C, tal como se describe en la figura 1. Las concentraciones relativas del transcrito de IL1B se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Se representan los valores de todas las muestras, indicándose las medias y las desviaciones estándar. Las líneas discontinuas indican el intervalo ± 3 x de precisión total del ensayo (1,93 C_t).

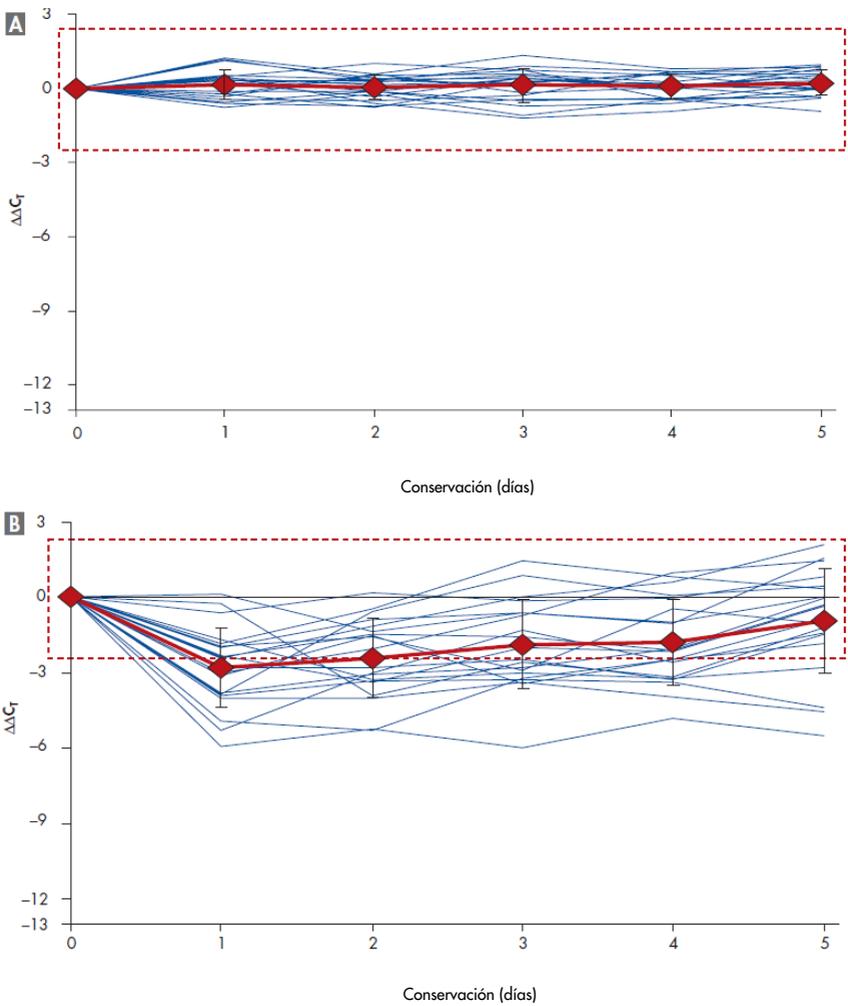


Figura 3. Estabilidad del ARN en muestras de sangre a 2-8°C: FOS Se extrajo sangre de 10 donantes, obteniéndose muestras duplicadas que se conservaron a 2-8°C durante el número indicado de días; a continuación se llevó a cabo una purificación del ARN total. **[A]** La sangre se extrajo y conservó en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) y el ARN total se purificó con PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** La sangre se extrajo y se conservó en tubos estándar para recogida de sangre con EDTA como anticoagulante y el ARN total se purificó con un método estándar de extracción orgánica con purificación de ARN con membrana de sílice. Las concentraciones relativas del transcrito de FOS se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Se representan los valores de todas las muestras, indicándose las medias y las desviaciones estándar. Las líneas discontinuas indican el intervalo ± 3 x de precisión total del ensayo (2,34 C_t).

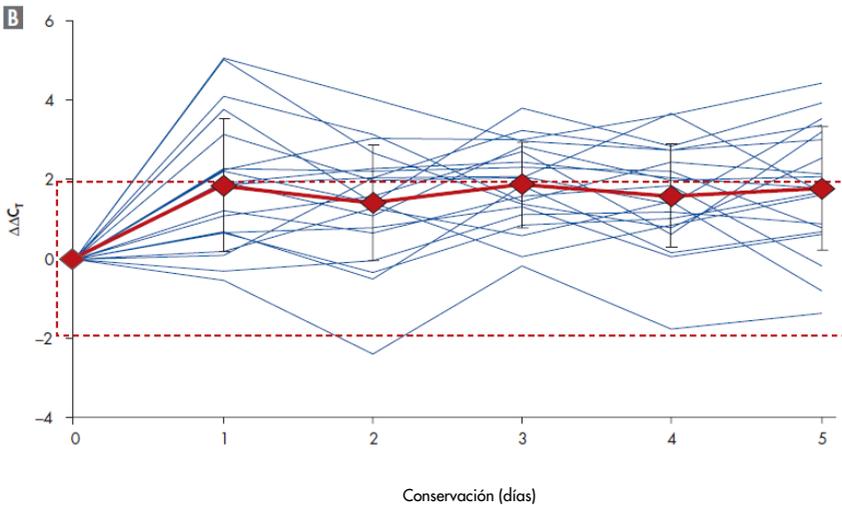
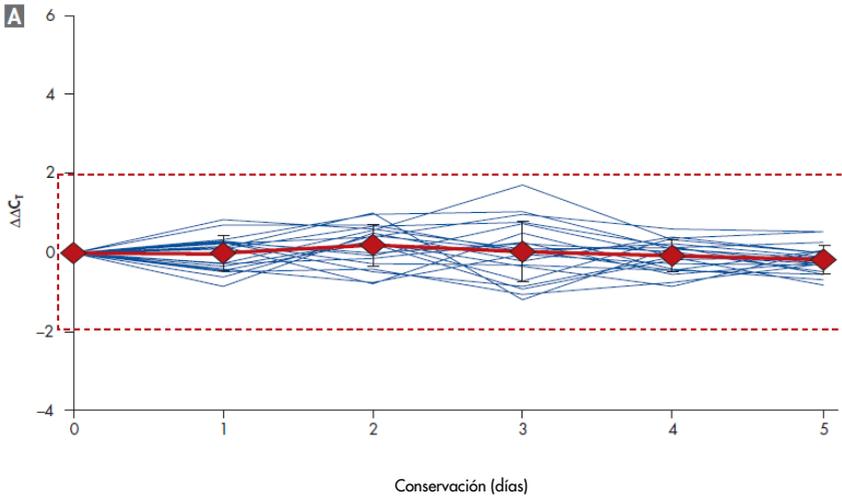


Figura 4. Estabilidad del ARN en muestras de sangre a 2-8°C: IL1B Se extrajo la sangre y se purificó el ARN total, después de conservarla a 2-8°C, tal como se describe en la figura 3. Las concentraciones relativas del transcrito de IL1B se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Se representan los valores de todas las muestras, indicándose las medias y las desviaciones estándar. Las líneas discontinuas indican el intervalo $\pm 3 \times$ de precisión total del ensayo (1,93 C_t).

Concentración y purificación del ARN

El PAXgene Blood RNA Kit está indicado para la purificación de ARN total a partir de 2,5 ml de sangre total humana recogida en un tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT). El procedimiento es sencillo y puede realizarse por medio de los métodos manual o automatizado (consulte las figuras 5 y 10, páginas 20 y 30). En ambos protocolos la purificación empieza con un paso de centrifugación para provocar el precipitado de los ácidos nucleicos en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT). El precipitado se lava y se pone de nuevo en suspensión y, a continuación, se realiza la purificación manual o automatizada del ARN. En principio, ambos protocolos siguen los mismos pasos con los mismos componentes del kit.

Purificación manual del ARN

El precipitado puesto de nuevo en suspensión se incuba con proteinasa K (PK) en tampones optimizados para digerir las proteínas. Se centrifuga de nuevo a través de la columna de centrifugación PAXgene Shredder (PSC) para homogeneizar el lisado celular y eliminar los restos celulares residuales y se transfiere el sobrenadante de la fracción de filtrado a un tubo de microcentrifugadora nuevo. Se añade etanol para ajustar las condiciones de unión y se deposita el lisado en una columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC). Durante una breve centrifugación, el ARN se une selectivamente a la membrana de sílice PAXgene mientras los contaminantes la atraviesan. El resto de contaminantes se eliminan en varios pasos eficaces de lavado. Entre el primer y el segundo pasos de lavado, la membrana se trata con ADNasa I (RNFD) para eliminar los restos de ADN unido. Después de los pasos de lavado, el ARN se eluye en tampón de elución (BR5) y se desnaturaliza por calor.

El ARN total aislado con el PAXgene Blood RNA System es puro. Usando el protocolo manual, se obtienen valores A_{260}/A_{280} entre 1,8 y 2,2 con una presencia de ADN genómico $\leq 1\%$ (p/p) en $\geq 95\%$ de todas las muestras mediante PCR cuantitativa en tiempo real de una secuencia del gen de la actina beta. Al menos el 95% de las muestras no presentan inhibición de la RT-PCR cuando se usa hasta el 30% del eluido.

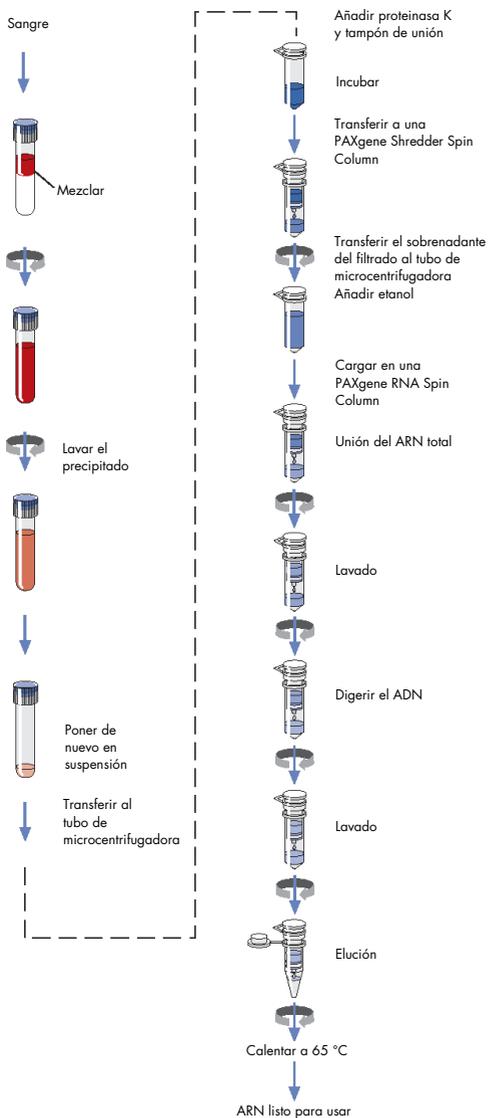


Figura 5. Procedimiento manual del sistema PAXgene Blood RNA

Al usar el protocolo manual, el tiempo medio de preparación de las muestras (según los datos de 12 series de preparación de muestras) es de unos 90 minutos*, y solamente hay 40 minutos de manipulación. La cantidad de ARN obtenida a partir de 2,5 ml de sangre total humana de un sujeto sano es $\geq 3 \mu\text{g}$ para $\geq 95\%$ de las muestras procesadas. Dado que las cantidades obtenidas dependen en gran medida del donante, las cantidades obtenidas individuales pueden variar. En cuanto a los donantes individuales, el PAXgene Blood RNA System proporciona cantidades obtenidas altamente reproducibles y repetibles (figuras 6 y 7, páginas 22 y 23) y resultados reproducibles y repetibles en la RT-PCR (figuras 8 y 9, páginas 27 y 28), lo cual lo convierte en un método muy sólido para pruebas de diagnóstico clínico.

En la figura 6 (página 22) se muestran los datos globales de repetibilidad y reproducibilidad del PAXgene Blood RNA System. Se llevaron a cabo estudios adicionales para mostrar la influencia de distintos lotes del kit PAXgene Blood RNA y distintos usuarios en la reproducibilidad de la cantidad obtenida del ARN y del rendimiento de la RT-PCR en tiempo real. Dado que en estos estudios se usaron muestras mezcladas en lugar de muestras individuales obtenidas en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), los resultados no reflejan la repetibilidad del sistema, incluida la fluctuación entre extracciones individuales de sangre, sino solamente la repetibilidad de la preparación de las muestras (consulte la figura 7, página 23).

* Tiempo de ejecución total del protocolo, incluida la manipulación previa de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugaciones, lavado del precipitado y resuspensión del precipitado).

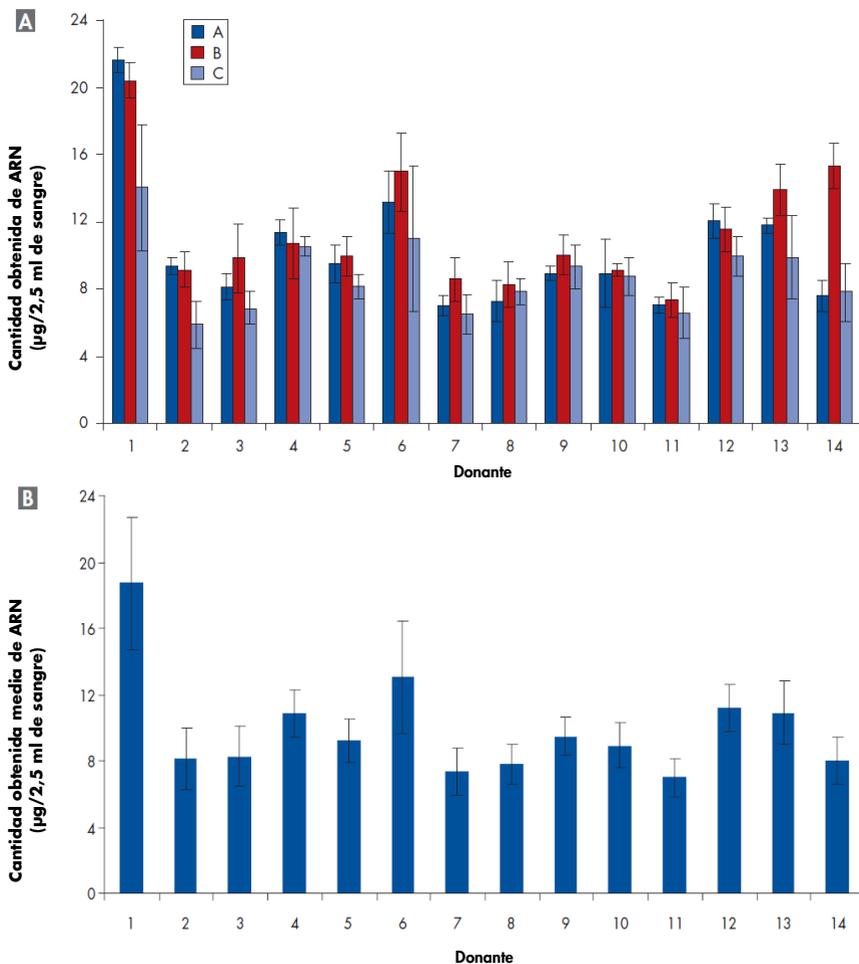


Figura 6. Purificación reproducible y repetible del ARN Tres técnicos distintos (A, B y, C) procesaron manualmente las muestras de sangre por cuadruplicado de 14 donantes. Se usaron tres juegos de equipos, y todas las muestras preparadas por un determinado técnico se procesaron usando el mismo equipo. **[A]** Se presentan las medias y desviaciones estándar de la cantidad obtenida de ARN de las muestras duplicadas de cada donante procesadas por los distintos técnicos. **[B]** Los tres técnicos procesaron cada uno de ellos 12 muestras duplicadas de sangre de 14 donantes. Se presentan las medias y desviaciones estándar de la cantidad obtenida de ARN de las muestras de cada donante procesadas por todos los técnicos. En todas las muestras de ARN, los cocientes A_{260}/A_{280} variaron entre 1,8 y 2,2.

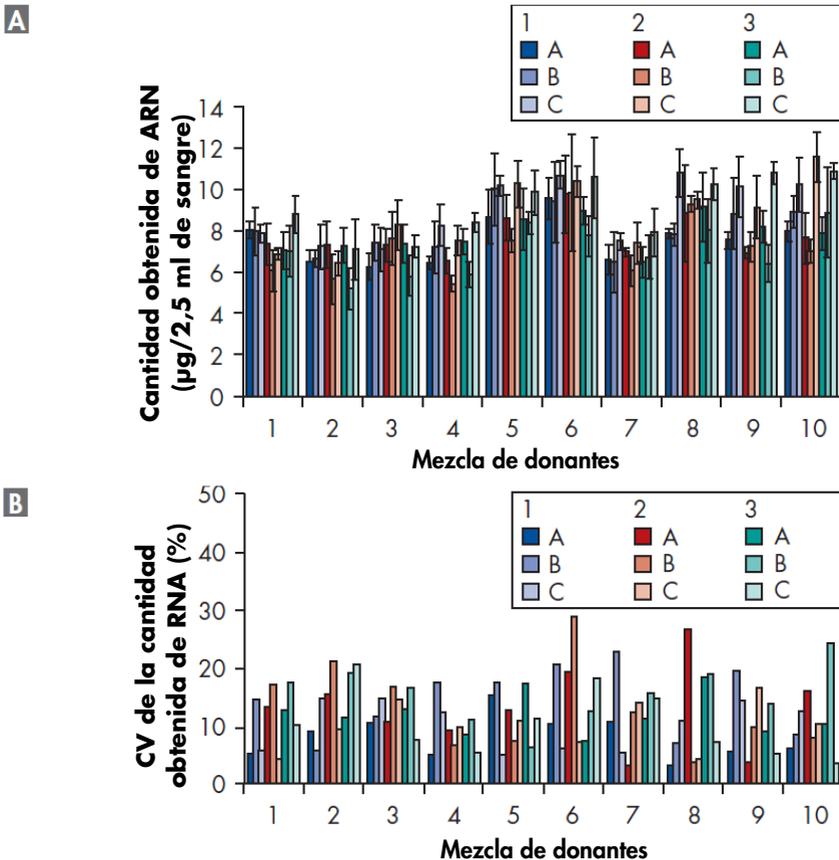


Figura 7. Repetibilidad y reproducibilidad de la cantidad obtenida de ARN para diferentes usuarios y lotes de PAXgene Blood RNA Kit usando muestras de sangre mezcladas Se recogieron muestras de sangre de 30 donantes diferentes en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, 12 tubos por donante, 360 tubos en total). Se mezcló el contenido de los tubos de tres donantes y posteriormente se volvió a dividir el contenido mezclado en 36 muestras. Estas 36 muestras de una mezcla de tres donantes fueron procesadas manualmente por tres usuarios distintos. Cada usuario usó para la extracción tres lotes diferentes de PAXgene Blood RNA Kit y procesó las muestras por cuadruplicado a partir de cada una de las diez mezclas de donantes. **[A]** Cantidad obtenida de ARN y desviación estándar de la cantidad obtenida para cada combinación usuario-lote. Tres usuarios distintos (A, B y C) procesaron muestras de sangre por cuadruplicado de 10 mezclas de donantes con cada uno de los tres lotes del kit (1, 2 y 3). Se presentan las medias de la cantidad obtenida (columnas) y las desviaciones estándar (barras de error) por muestra cuadruplicada de cada mezcla de donantes para cada usuario y cada lote del kit. **[B]** Coeficiente de variación (CV) de la cantidad obtenida de ARN por mezcla de donantes para todas las combinaciones usuario-lote (A, B, C; 1, 2, 3), calculado a partir de la media de la cantidad obtenida y de la desviación estándar de la cantidad obtenida que se muestra en la figura 7A.

Tabla 1A. Reproducibilidad para cada lote y para cada usuario para determinadas mezclas de donantes (1, 6, 9, 10).

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

Tabla 1B. Reproducibilidad para cada usuario y entre todos los lotes para determinadas mezclas de donantes (1, 6, 9, 10).

Combinación de datos	Mezcla de donantes 1 5,1 × 10 ⁶ células/ml			Mezcla de donantes 6 6,5 × 10 ⁶ células/ml		
	Cantidad obtenida media (µg)	SD (µg)	CV (%)	Cantidad obtenida media (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Usuario A, todos los lotes	7,46	0,85	11	9,43	1,22
Usuario B, todos los lotes	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Usuario C, todos los lotes	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Combinación de datos	Mezcla de donantes 9 8,4 × 10 ⁶ células/ml			Mezcla de donantes 10 10,2 × 10 ⁶ células/ml		
	Cantidad obtenida media (µg)	SD (µg)	CV (%)	Cantidad obtenida media (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Usuario A, todos los lotes	7,54	0,72	10	7,81	0,82
Usuario B, todos los lotes	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Usuario C, todos los lotes	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tabla 1C. Reproducibilidad para cada lote y entre todos los usuarios para determinadas mezclas de donantes (1, 6, 9, 10).

Combinación de datos	Mezcla de donantes 1 5,1 × 10 ⁶ células/ml			Mezcla de donantes 6 6,5 × 10 ⁶ células/ml		
	Cantidad obtenida media (µg)	SD (µg)	CV (%)	Cantidad obtenida media (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Lote 1, todos los usuarios	7,96	0,69	9	9,88	1,34
Lote 2, todos los usuarios	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lote 3, todos los usuarios	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Combinación de datos	Mezcla de donantes 9 8,4 × 10 ⁶ células/ml			Mezcla de donantes 10 10,2 × 10 ⁶ células/ml		
	Cantidad obtenida media (µg)	SD (µg)	CV (%)	Cantidad obtenida media (µg)	SD (µg)	CV (%)
	Lote 1, todos los usuarios	8,83	1,63	19	9,02	1,27
Lote 2, todos los usuarios	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lote 3, todos los usuarios	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabla 1D. Reproducibilidad entre todos los lotes y entre todos los usuarios para determinadas mezclas de donantes (1, 6, 9, 10).

Combinación de datos	Mezcla de donantes 1 5,1 x 10 ⁶ células/ml			Mezcla de donantes 6 6,5 x 10 ⁶ células/ml		
	Cantidad obtenida media (µg)	SD (µg)	CV (%)	Cantidad obtenida media (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lote 1, todos los usuarios	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

Combinación de datos	Mezcla de donantes 9 8,4 x 10 ⁶ células/ml			Mezcla de donantes 10 10,2 x 10 ⁶ células/ml		
	Cantidad obtenida media (µg)	SD (µg)	CV (%)	Cantidad obtenida media (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lote 1, todos los usuarios	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Análisis detallado de cuatro mezclas de donantes representativas. Las mezclas se eligieron en función del recuento de leucocitos y reflejan los valores máximo, intermedio y mínimo del intervalo normal de los recuentos de leucocitos ($4,8 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^7$ leucocitos/ml). El recuento de leucocitos representa la media de los tres recuentos de leucocitos de los tres donantes por mezcla de donantes.

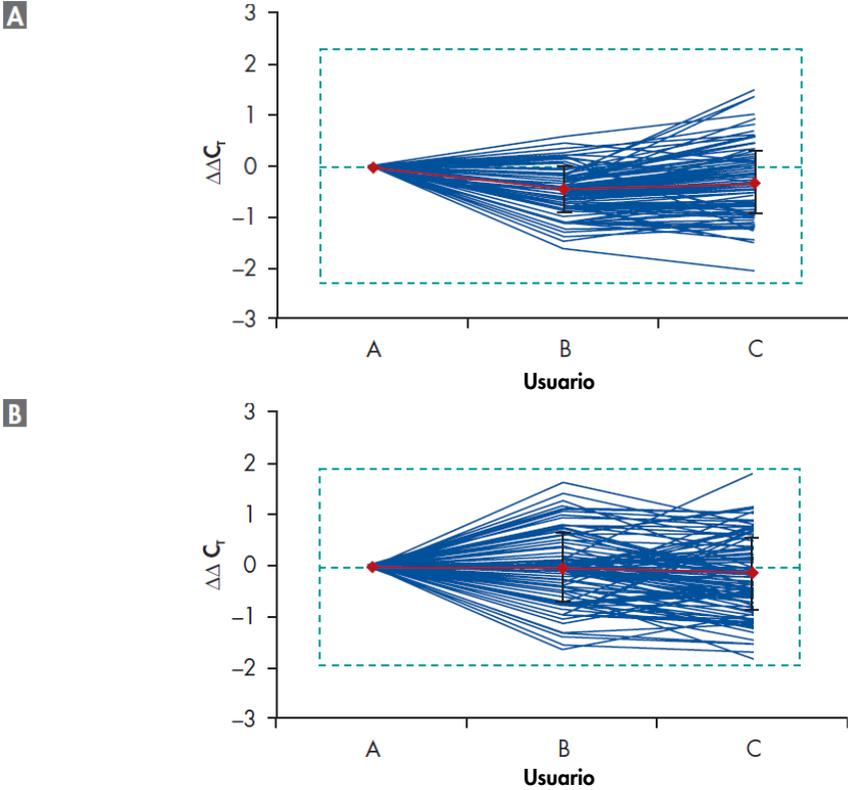


Figura 8. Reproducibilidad de la RT-PCR: entre usuarios El ARN purificado en el experimento descrito en la figura 7 se utilizó para una RT-PCR en tiempo real. Las concentraciones relativas del transcrito de **[A]** FOS y **[B]** IL1B se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Se representan los valores de todas las muestras en relación con los valores del usuario A (10 mezclas de donantes x 3 lotes del kit x 4 duplicados = 120 conjuntos de datos para cada gen), junto con las medias (líneas rojas) y las desviaciones estándar (barras negras) para todas las muestras. Las líneas discontinuas indican el intervalo ± 3 x precisión total de los ensayos (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

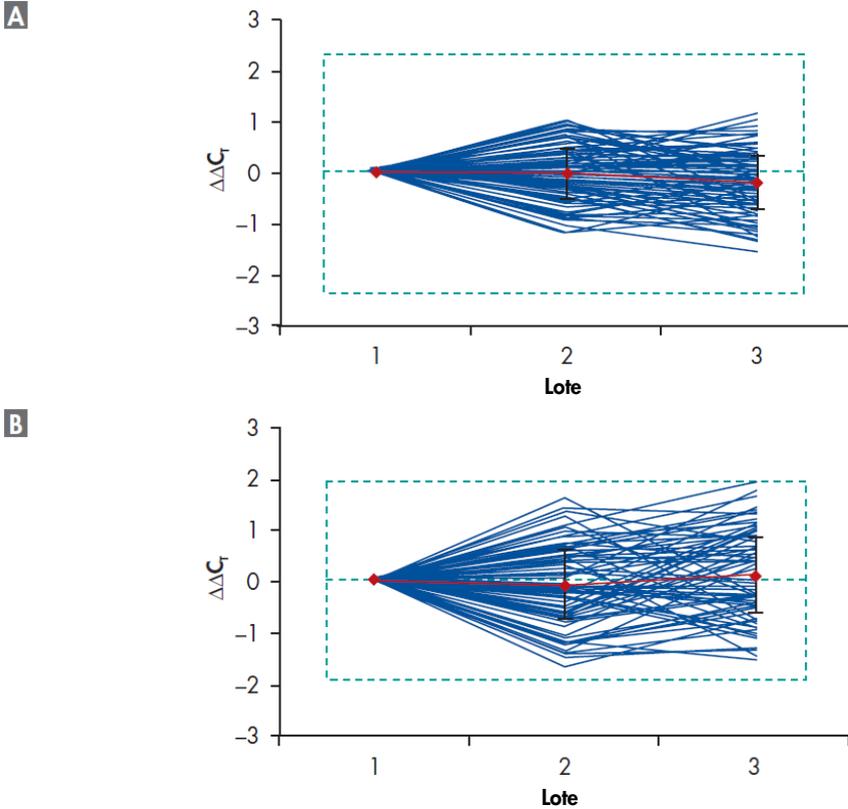


Figura 9. Reproducibilidad de la RT-PCR: entre lotes del kit El ARN purificado en el experimento descrito en la figura 7 se utilizó para una RT-PCR en tiempo real. Las concentraciones relativas del transcrito de **[A]** FOS y **[B]** IL1B se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Se representan los valores de todas las muestras en relación con los valores del lote del kit 1 (10 mezclas de donantes x 3 usuarios x 4 duplicados = 120 conjuntos de datos para cada gen), con las medias (líneas rojas) y las desviaciones estándar (barras negras) para todas las muestras. Las líneas discontinuas indican el intervalo $\pm 3 \times$ precisión total de los ensayos (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Tabla 2. Resumen de los datos de RT-PCR mostrados en las figuras 8 y 9.

Sistema de análisis	Ensayo FOS/ARNr 18S		Ensayo IL1B/ARNr 18S	
	Media ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Media ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reproducibilidad para cada usuario y entre todos los lotes				
Todos los usuarios, lote 1-lote 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Todos los usuarios, lote 1-lote 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Todos los usuarios, lote 1-lote 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproducibilidad para cada usuario y entre todos los lotes				
Todos los lotes, usuario A-usuario A	0,00	0,00	0,00	0,00
Todos los lotes, usuario A-usuario B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Todos los lotes, usuario A-usuario C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Usuario: técnico, persona que lleva a cabo el estudio.

Lote: número de lote del kit utilizado en este estudio.

SD: desviación estándar.

Se presentan las medias de $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) y las desviaciones estándar de los datos presentados en las figuras 8 y 9.

Purificación automatizada del ARN

La purificación del ARN de la sangre está automatizada en el QIAcube Connect MDx de QIAGEN o en el clásico QIAcube de QIAGEN (en adelante, denominado QIAcube). Los innovadores instrumentos QIAcube utilizan tecnología avanzada para procesar las columnas de centrifugado de QIAGEN, lo que permite una integración perfecta de la preparación automatizada de muestras de bajo volumen en el flujo de trabajo del laboratorio. La preparación de muestras con los instrumentos QIAcube se realiza siguiendo los mismos pasos que en el procedimiento manual (es decir, lisis, unión, lavado y elución), por lo que es posible utilizar el PAXgene Blood RNA Kit para la purificación de ADN de alta calidad.



Figura 10. QIAcube Connect MDx.

El protocolo automatizado de purificación de ARN consta de dos partes (o protocolos), «PAXgene Blood RNA Part A» (Parte A de PAXgene Blood RNA) y «PAXgene Blood RNA Part B» (Parte B de PAXgene Blood RNA), con una breve intervención manual entre las dos partes (consulte la figura 11, página 31).

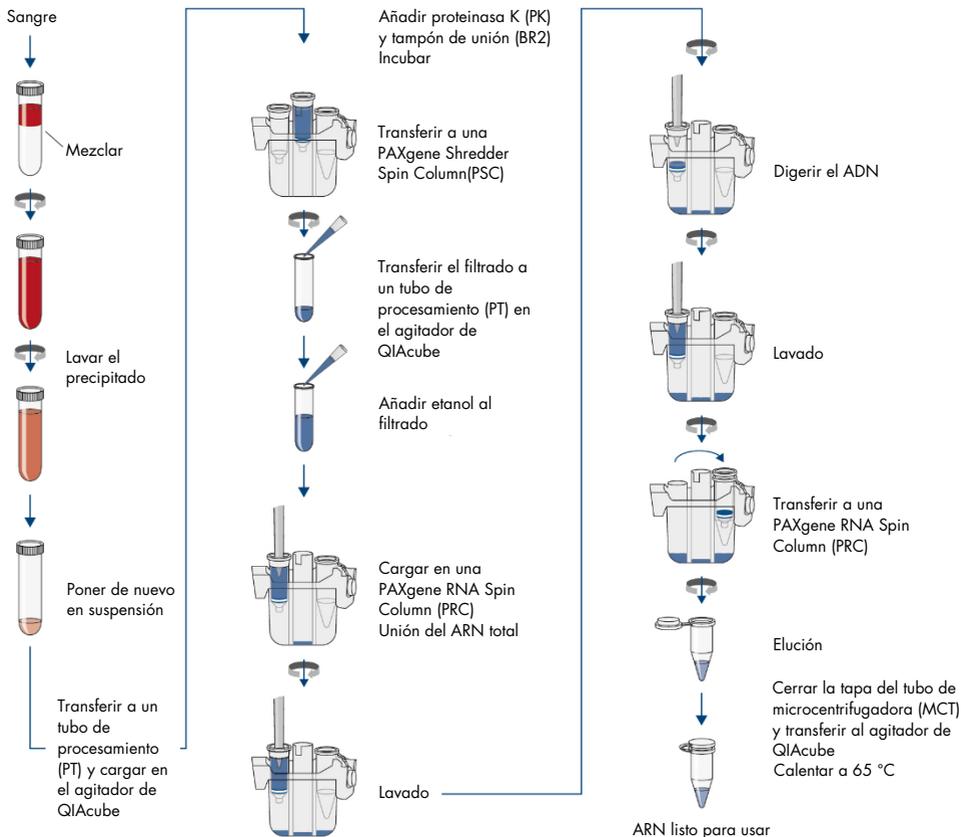


Figura 11. Procedimiento automatizado del sistema PAXgene Blood RNA.

El precipitado de ácidos nucleicos centrifugado, lavado y puesto de nuevo en suspensión (consulte el apartado «Concentración y purificación del ARN», página 19) se transfiere del tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) a tubos de procesamiento (PT) que se colocan en el agitador térmico de la plataforma de trabajo de los instrumentos QIAcube. El usuario selecciona e inicia el protocolo «PAXgene Blood RNA Part A» desde el menú. Los instrumentos QIAcube realizan los pasos del protocolo hasta la elución de ARN en tampón de elución (BR5). El usuario transfiere los tubos de microcentrifugadora (MCT), que contienen el ARN purificado, al agitador térmico de los instrumentos QIAcube. El usuario selecciona e inicia el protocolo «PAXgene Blood RNA Part B» desde el menú y los instrumentos QIAcube realizan una desnaturalización por calor.

El tiempo medio de preparación de muestras (basado en datos de 12 series de preparación de muestras) es de 151 minutos*, y hay mucho menos tiempo de manipulación que con el protocolo manual.

La cantidad de ARN obtenida a partir de 2,5 ml de sangre total humana de un sujeto sano es $\geq 3 \mu\text{g}$ para $\geq 95\%$ de las muestras procesadas. La figura 12 (página 33) indica las cantidades obtenidas de ARN a partir de un total de 216 muestras preparadas por medio del protocolo automatizado con tres lotes del kit y por tres usuarios. Dado que en estos estudios se usaron muestras de sangre mezcladas en lugar de muestras de tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuales, los resultados no reflejan la cantidad obtenida de ARN prevista a partir de muestras únicas de extracciones individuales de sangre. Puesto que las cantidades obtenidas dependen en gran medida del donante, las cantidades obtenidas individuales pueden variar (figura 12, página 33).

Al menos el 95% de las muestras no presentan inhibición de la RT-PCR cuando se usa hasta el 30% del eluido. Al usar el protocolo automatizado, la contaminación cruzada entre muestras es indetectable, tal como se determinó mediante una RT-PCR cuantitativa en tiempo real de secuencias de los transcritos de ABL1 y de FOS en muestras negativas para ARN (agua) emparejadas con muestras positivas para ARN (sangre total humana) en la misma serie.

El ARN aislado con el PAXgene Blood RNA System y el protocolo automatizado es puro, como demuestran la falta de inhibición de la RT-PCR y los valores A_{260}/A_{280} de entre 1,8 y 2,2. Hay ADN genómico en valores $\leq 1\%$ (p/p) en $\geq 95\%$ de todas las muestras, medido mediante una PCR cuantitativa en tiempo real de una secuencia del gen de la actina beta. Las figuras 13 y 14 (páginas 34 y 35) muestran los valores A_{260}/A_{280} y la cantidad relativa de ADN genómico de un total de 216 muestras preparadas por medio del protocolo automatizado con 3 lotes del kit y por 3 usuarios.

* Tiempo de ejecución total del protocolo, incluida la manipulación previa de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugaciones, lavado del precipitado y resuspensión del precipitado).

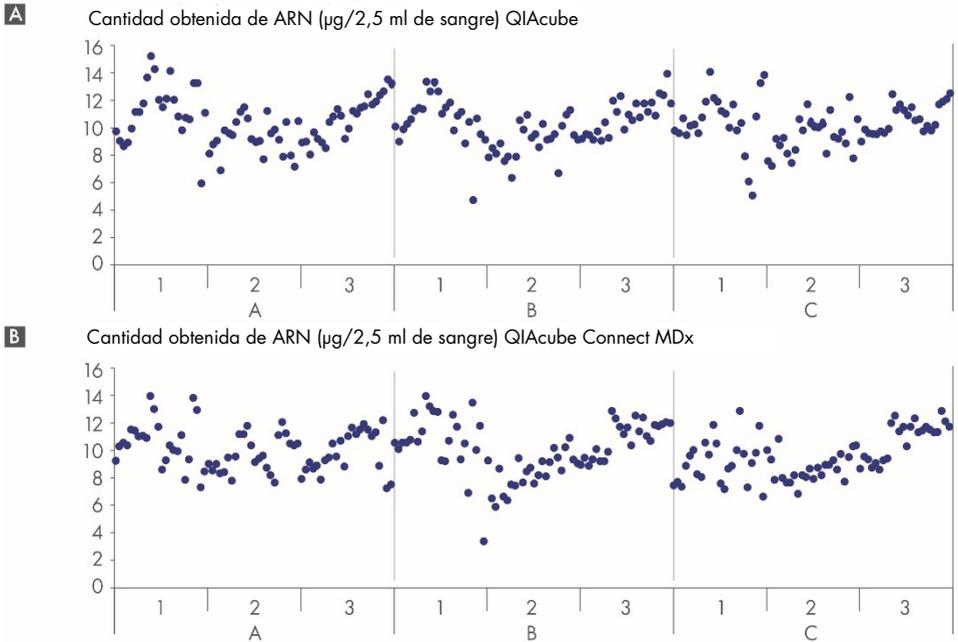


Figura 12. Cantidad obtenida de ARN: procesamiento automatizado A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Las muestras de sangre de donantes individuales se recogieron en PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). El contenido de los tubos se agrupó en 6 mezclas de donantes y, posteriormente, se volvió a dividir. Se procesaron un total de 216 tubos (es decir, 36 de cada muestra) por tres usuarios distintos (A, B y C). Cada usuario usó para la extracción automatizada 3 lotes diferentes (1, 2, y 3) de PAXgene Blood RNA Kit con varios instrumentos QIAcube y QIAcube Connect MDx y procesó las muestras cuadruplicadas a partir de cada una de las 6 mezclas de donantes. Se presentan las cantidades obtenidas de ARN de todas las muestras individuales para cada combinación usuario-lote.

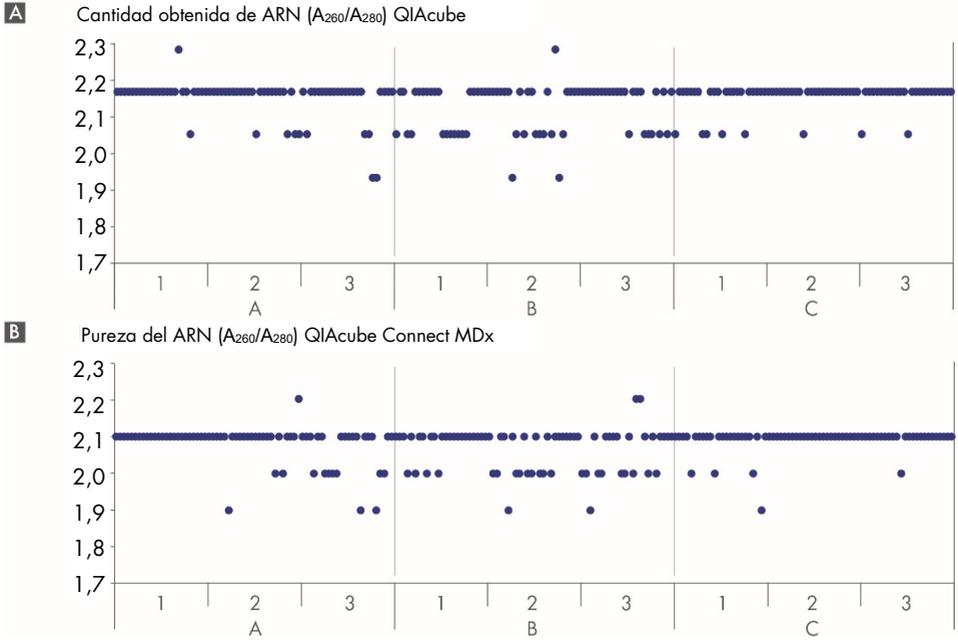


Figura 13. Pureza del ARN (valores A_{260}/A_{280}): procesamiento automatizado. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx
 Tres usuarios diferentes (A, B y C) purificaron el ARN usando tres lotes distintos (1, 2 y 3) de PAXgene Blood RNA Kit con varios instrumentos QIAcube y QIAcube Connect MDx en el experimento descrito en la figura 12. Se presentan los valores A_{260}/A_{280} de todas las muestras individuales para cada combinación usuario-lote.

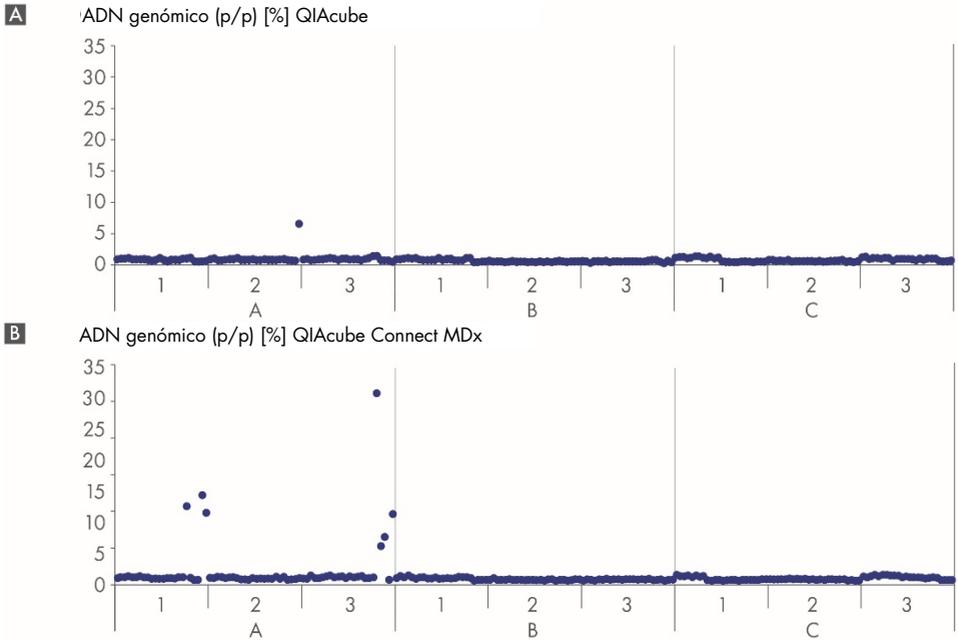


Figura 14. Pureza del ARN (% de contaminación del ADN genómico): procesamiento automatizado, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Tres usuarios diferentes (A, B y C) purificaron el ARN usando tres lotes distintos (1, 2 y 3) de PAXgene Blood RNA Kit con varios instrumentos QIAcube y QIAcube Connect MDx en el experimento descrito en la figura 12. Se presentan las cantidades de ADN genómico (p/p) en todas las muestras individuales para cada combinación usuario-lote.

El protocolo automatizado de purificación de ARN usando el PAXgene Blood RNA System proporciona resultados de RT-PCR altamente reproducibles y repetibles, como se muestra en la figura 15 y la figura 16 (páginas 36 y 37), lo cual hace de él un sistema altamente sólido para pruebas de diagnóstico clínico.

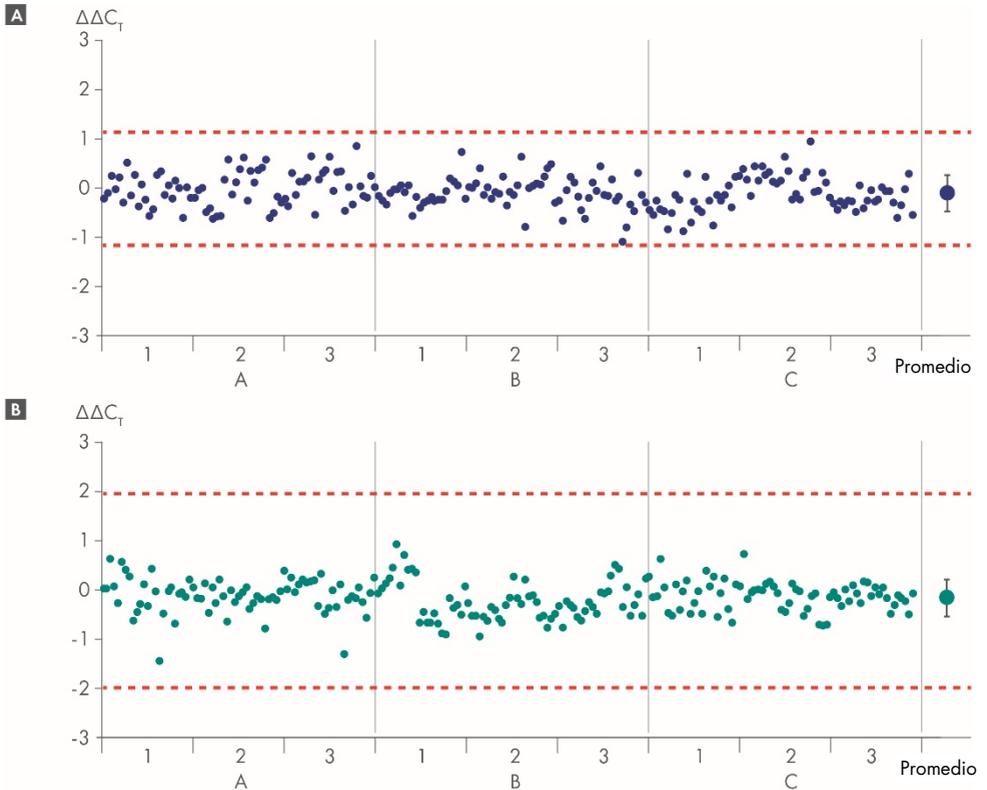


Figura 15. Reproducibilidad de la RT-PCR: entre los protocolos automatizado (QIAcube) y manual. Tres usuarios diferentes (A, B y C) purificaron el ARN usando tres lotes distintos (1, 2 y 3) de PAXgene Blood RNA Kit con varios instrumentos QIAcube y QIAcube Connect MDx por medio del protocolo automatizado en el experimento descrito en la figura 12. De forma paralela, se purificó el ARN a partir de los tubos duplicados correspondientes usando el protocolo manual. Las concentraciones relativas del transcrito de **[A] FOS** y **[B] IL1B** se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Las posibles diferencias de las concentraciones de transcritos entre el ARN preparado a partir de muestras de sangre emparejadas usando ambos protocolos de extracción (automatizado y manual) se calcularon por medio del método $\Delta\Delta C_T$. Los valores individuales de $\Delta\Delta C_T$ para todas las parejas de muestras (4 duplicados \times 6 mezclas de donantes \times 3 lotes del kit \times 3 usuarios = 216 parejas para cada gen) se representan como puntos individuales, junto con las medias (puntos más grandes) y las desviaciones estándar (barras negras) para todas las muestras. Las líneas discontinuas indican el intervalo $\pm 3 \times$ precisión total de los ensayos (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; precisiones diferentes del ensayo en comparación con las figuras 1–4, 8 y 9 debido a distintas versiones del ensayo).

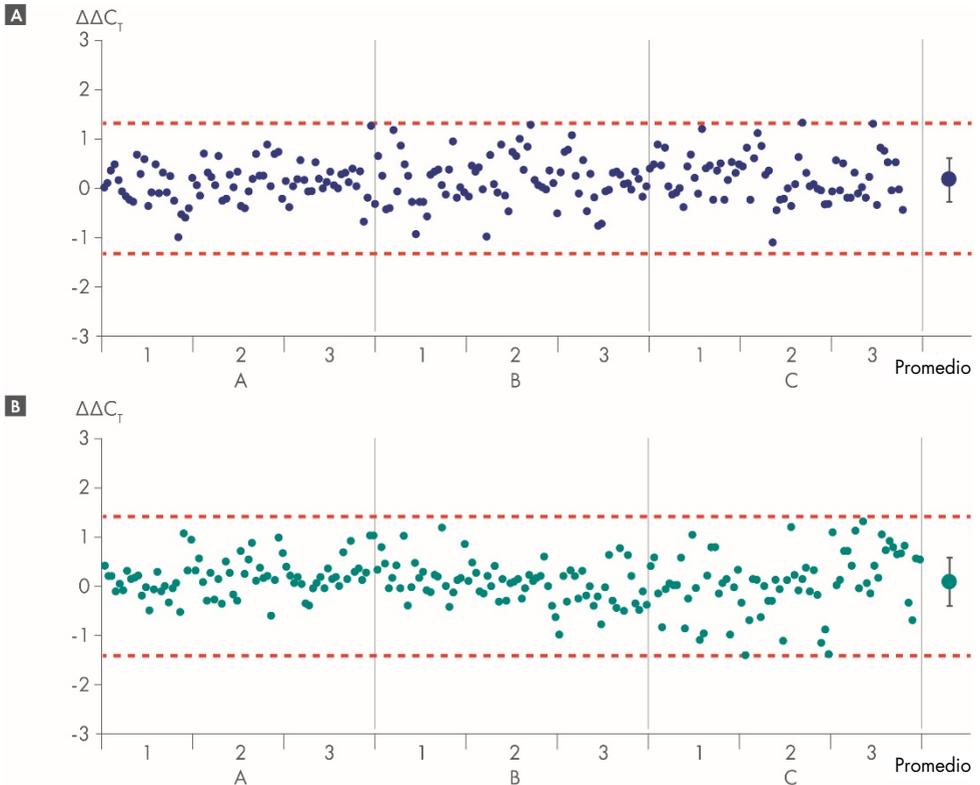


Figura 16. Reproducibilidad de la RT-PCR: entre los instrumentos QIAcube y QIAcube Connect MDx por medio del protocolo automatizado. Tres usuarios diferentes (A, B y C) purificaron el ARN usando tres lotes distintos (1, 2 y 3) de PAXgene Blood RNA Kit por medio del protocolo automatizado en varios instrumentos QIAcube y QIAcube Connect MDx en el experimento descrito en la figura 12. Las concentraciones relativas del transcrito de [A] FOS y [B] IL1B se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Las posibles diferencias de las concentraciones de transcritos entre el ARN preparado a partir de muestras de sangre emparejadas usando ambos instrumentos se calcularon por medio del método $\Delta\Delta C_T$. Los valores individuales de $\Delta\Delta C_T$ para todas las parejas de muestras (4 duplicados x 6 mezclas de donantes x 3 lotes del kit x 3 usuarios = 216 parejas para cada gen) se representan como puntos individuales, junto con las medias (puntos más grandes) y las desviaciones estándar (barras negras) para todas las muestras. Las líneas discontinuas indican el intervalo $\pm 3 \times$ precisión total de los ensayos (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; precisiones diferentes del ensayo en comparación con las figuras 1–4, 8, 9 y 15 debido a distintas versiones del ensayo).

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

Para todos los protocolos

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; n.º de catálogo 762165)
- Etanol (grado de pureza del 96-100% p.a.)
- Pipetas* (10 µl-4 ml)
- Puntas de pipeta con filtro para aerosoles, libres de ARNasa, estériles†
- Probeta graduada‡
- Centrifugadora* capaz de centrifugar a 3.000-5.000 x g y equipada con un rotor oscilante y huecos para colocar los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Agitador vorticial*
- Hielo picado
- Rotulador permanente para marcar

Para el protocolo manual

- Microcentrifugadora de velocidad variable* capaz de centrifugar en un intervalo de al menos 1.000-8.000 x g, aunque pueden obtenerse fuerzas G menores y superiores (consulte los pasos del protocolo para obtener más detalles), y equipada con un rotor para tubos de microcentrifugadora de 2 ml.

* Asegúrese de que los dispositivos e instrumentos se hayan verificado, sometido a mantenimiento y calibrado con regularidad conforme a las recomendaciones del fabricante.

† Asegúrese de que está familiarizado con las instrucciones para la manipulación del ARN (apéndice A, página 71).

‡ Para la adición de etanol al tampón BR4 concentrado.

- Agitador-incubador* capaz de incubar a 55 °C y 65 °C y de agitar a ≥ 400 rpm, sin superar las 1.400 rpm (p. ej., Eppendorf® Thermomixer Compact o equivalente).

Para el protocolo automatizado (mediante QIAcube o QIAcube Connect MDx)

- Tijeras

Consumibles de los instrumentos QIAcube:

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

Accesorios de los instrumentos QIAcube:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, n.º de catálogo 990392)†

Para el protocolo automatizado mediante QIAcube Connect MDx

- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, n.º de catálogo 9003070)

Paquetes de servicios de QIAcube Connect MDx:

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

* Asegúrese de que los dispositivos e instrumentos se hayan verificado, sometido a mantenimiento y calibrado con regularidad conforme a las recomendaciones del fabricante.

† También incluido en el Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, n.º de catálogo 990395).

Para el protocolo automatizado mediante QIAcube

- QIAcube* (QIAGEN, n.º de catálogo 9001882 [110 V])

* Asegúrese de que los dispositivos e instrumentos se hayan verificado, sometido a mantenimiento y calibrado con regularidad conforme a las recomendaciones del fabricante.

Notas importantes

Uso de los instrumentos QIAcube

Asegúrese de que está familiarizado con el uso del instrumento QIAcube. Antes de empezar los protocolos automatizados del sistema PAXgene Blood RNA, lea el Manual del usuario del instrumento QIAcube pertinente y toda información adicional suministrada con el instrumento QIAcube, prestando especial atención a la información sobre seguridad.

Las instrucciones de este apartado se aplican al QIAcube Connect MDx y al QIAcube cuando no se especifiquen por separado.

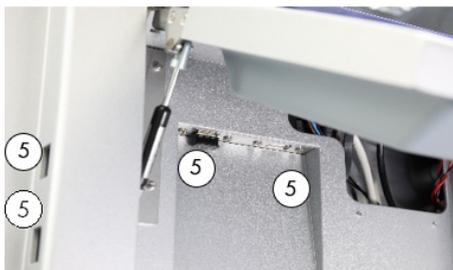
Puesta en marcha de los instrumentos QIAcube

Cierre la tapa del instrumento QIAcube y apague el instrumento QIAcube por medio del interruptor de alimentación (QIAcube Connect MDx: consulte la figura 17, página 42; QIAcube: figura 18, página 43).

Oirá un pitido y aparecerá la pantalla de inicio. El instrumento realiza automáticamente pruebas de inicialización.



Vista frontal del QIAcube Connect MDx



Pantalla táctil extraíble



Vista posterior del QIAcube Connect MDx



Vista posterior del QIAcube Connect MDx

Figura 17. Características externas del QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|--|
| <p>1 Pantalla táctil</p> <p>2 Tapa</p> <p>3 Cajón de residuos</p> <p>4 Interruptor de alimentación</p> | <p>5 2 puertos USB en el lado izquierdo de la pantalla táctil; 2 puertos USB en la parte posterior de la pantalla táctil (módulo Wi-Fi conectado a 1 puerto USB)</p> <p>6 Puerto Ethernet RJ-45</p> <p>7 Conector del cable de alimentación</p> <p>8 Salida de aire para ventilación</p> |
|--|--|



Figura 18. Vista frontal del QIAcube.

- | | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | Pantalla táctil | 4 | Puerto USB detrás del panel de protección |
| 2 | Tapa | 5 | Interruptor de alimentación |
| 3 | Puerto de serie RS232 detrás del panel de protección (para uso exclusivamente por los especialistas del servicio técnico de instrumentos de QIAGEN) | 6 | Cajón de residuos |

Pantalla táctil

Los instrumentos QIAcube se controlan mediante una pantalla táctil. La pantalla táctil permite al usuario utilizar el instrumento y guiar a los usuarios por la configuración de la mesa de trabajo. Durante el procesamiento de las muestras, en la pantalla táctil aparece el estado del protocolo y el tiempo restante.



Figura 19. Pantalla táctil extraíble del QIAcube Connect MDx

Instalación de protocolos en los instrumentos QIAcube

Se requiere una instalación inicial de protocolos antes de poder realizar la primera serie de preparación de ARN en los instrumentos QIAcube. Instale los dos protocolos «PAXgene Blood RNA Part A» y «PAXgene Blood RNA Part B».

Los protocolos de QIAcube Connect MDx se proporcionan en **www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources** (www.qiagen.com/MyQIAcube para QIAcube) y deben descargarse al lápiz USB suministrado con los instrumentos QIAcube. Estos protocolos se transferirán al instrumento a través del puerto USB.

El puerto USB (QIAcube Connect MDx: situado en el lateral de la pantalla táctil; consulte la figura 17, página 42; QIAcube: detrás del panel protector; consulte figura 18, página 43) permite la conexión de los instrumentos QIAcube al lápiz USB suministrado con los instrumentos QIAcube.

También pueden transferirse archivos de datos, tales como archivos de registro o archivos de informe, de los instrumentos QIAcube al lápiz USB a través del puerto USB.



El puerto USB solamente está destinado a utilizarse con el lápiz USB suministrado por QIAGEN. No conecte otros dispositivos en este puerto.



No extraiga el lápiz USB mientras esté descargando protocolos o transfiriendo archivos de datos o durante una serie de un protocolo.

Para obtener más información sobre el proceso de carga de protocolos a los instrumentos QIAcube, consulte el manual relacionado del instrumento utilizado.

Carga de los instrumentos QIAcube

Para ahorrar tiempo, la carga puede realizarse durante uno o los dos pasos de 10 minutos de centrifugación (pasos 3 y 5) descritos en «Protocolo: Purificación automatizada de ARN total a partir de sangre total humana recogida en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)», página 63.

Frascos de reactivo

Antes de cada serie en el instrumento QIAcube, llene con cuidado los cuatro frascos de reactivo con los reactivos indicados en la tabla 3 (página 46) hasta el indicador de nivel máximo o, si eso no es posible, hasta el nivel que permitan los volúmenes de tampón suministrados en el PAXgene Blood RNA Kit. Rotule los frascos de reactivo y las tapas claramente con el nombre de los tampones y coloque los frascos de reactivo llenos en las posiciones adecuadas en la gradilla de frascos de reactivo. Cargue la gradilla en la plataforma de trabajo del instrumento QIAcube tal como se muestra (figuras 20 - 22, páginas 46 - 48).



El volumen suministrado de tampón BR2 no llenará un frasco de reactivo hasta el indicador de nivel. Es posible que los tampones BR3 y BR4 no llenen el frasco hasta el indicador de nivel después de procesar varias muestras en series previas.



Asegúrese de quitar las tapas de los frascos antes de colocarlos en la mesa de trabajo.



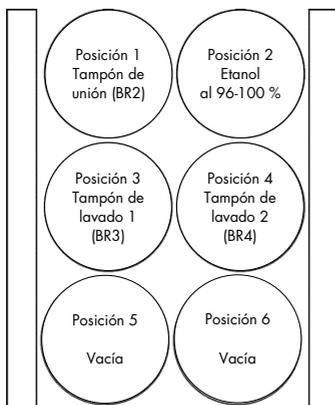
Los volúmenes de tampón suministrados en PAXgene Blood RNA Kit (50) son suficientes para un máximo de 7 series de preparación de ARN en el sistema QIAcube, con números de muestra de 2 a 12 por serie. En general, deben evitarse las series con números de muestra inferiores para procesar un total de 50 muestras por kit con un máximo de 7 series de preparación de ARN. Si se realizan más de 7 series de preparación de ARN, puede no haber suficiente volumen de tampón para procesar las últimas muestras.

Tabla 3. Posiciones en la gradilla de frascos de reactivo

Posición	Reactivo
1	Tampón de unión (BR2)
2	Etanol al 96-100%
3	Tampón de lavado 1 (BR3)
4	Tampón de lavado 2 (BR4)*
5	— (dejar vacía)
6	— (dejar vacía)

* El tampón de lavado 2 (BR4) se suministra concentrado. Antes de usarlo por primera vez, añada 4 volúmenes de etanol (grado de pureza del 96-100%, p.a.) según se indica en el frasco para obtener una solución de trabajo.

A



B



Figura 20. Carga de la gradilla de frascos de reactivo. [A] Esquema de las posiciones y del contenido de los frascos en la gradilla de frascos de reactivo. [B] Carga de la gradilla al instrumento QIAcube (se muestra QIAcube como ejemplo).

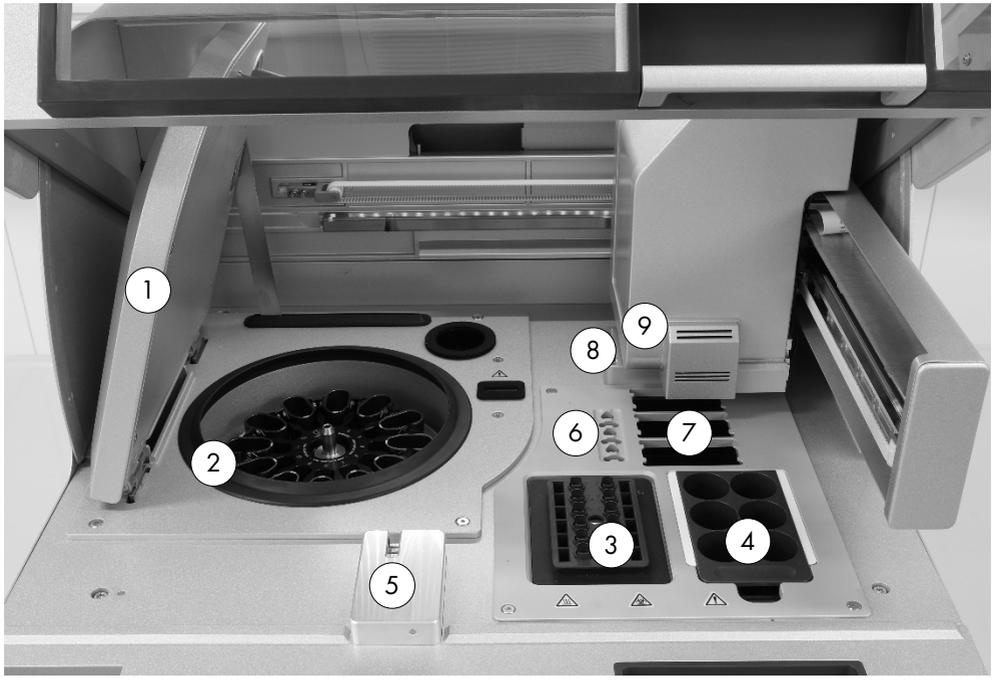


Figura 21. Vista interna del QIAcube Connect MDx.

- | | | | |
|---|--|---|---|
| 1 | Tapa de la centrifugadora | 6 | Ranuras para tubos de microcentrifugadora |
| 2 | Centrifugadora | 7 | 3 ranuras para gradillas de puntas |
| 3 | Agitador | 8 | Ranuras de eliminación de puntas y columnas |
| 4 | Gradilla de frascos de reactivo | 9 | Brazo robótico (incluye pipeta monocanal, agarradora, sensor ultrasónico y óptico y LED UV) |
| 5 | Sensor de puntas y seguro para la tapa | | |

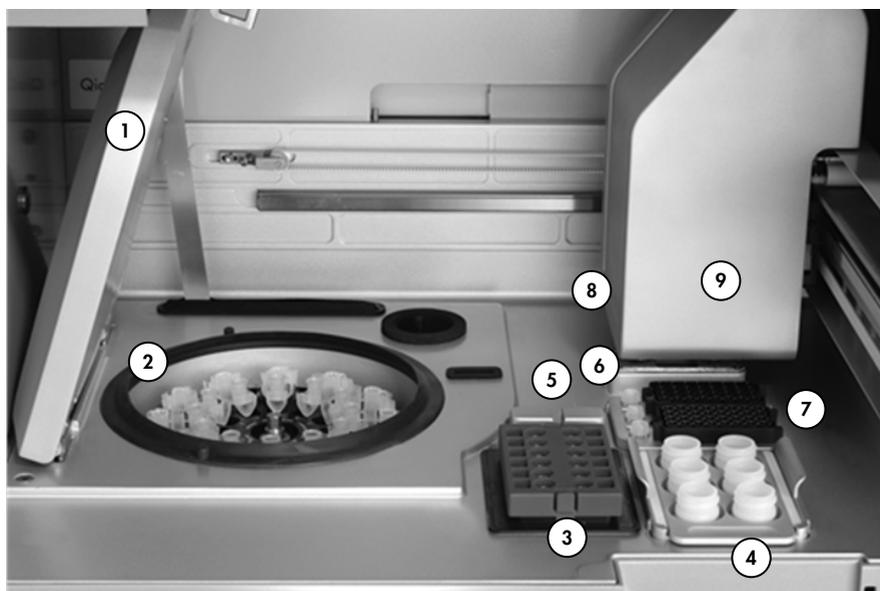


Figura 22. Vista interna del QIAcube.

- | | |
|---|--|
| <p>1 Tapa de la centrifugadora</p> <p>2 Centrifugadora</p> <p>3 Agitador</p> <p>4 Gradilla de frascos de reactivo</p> <p>5 Sensor de puntas</p> | <p>6 Ranuras para tubos de microcentrifugadora</p> <p>7 Gradillas de puntas</p> <p>8 Ranuras de eliminación de puntas y columnas</p> <p>9 Brazo robótico</p> |
|---|--|

Columnas de centrifugación (PRC, PSC), tubos de microcentrifugadora (MCT) y material de plástico para el instrumento QIAcube

Coloque en el instrumento QIAcube 2 gradillas de puntas llenas con puntas con filtro de 1.000 µl (consulte las figuras 21 y 22, páginas 47 y 48). Llene las gradillas con puntas cuando sea necesario.

 Use únicamente puntas con filtro de 1.000 µl diseñadas para su uso con los instrumentos QIAcube.

Rotule los adaptadores de rotor y los tubos de microcentrifugadora (MCT) para cada muestra con un rotulador permanente. Abra las columnas de centrifugación PAXgene Shredder (PSC) que vaya a utilizar y corte las tapas totalmente usando unas tijeras (consulte la figura 23, página 49).

 Para un funcionamiento correcto del brazo robótico de los instrumentos QIAcube, retire (corte) completamente las tapas y todas las partes de plástico que conectan la tapa a las columnas de centrifugación PAXgene Shredder (PSC; consulte la figura 23). De lo contrario, el brazo robótico no puede sujetar las columnas de centrifugación (PSC y PRC) adecuadamente.

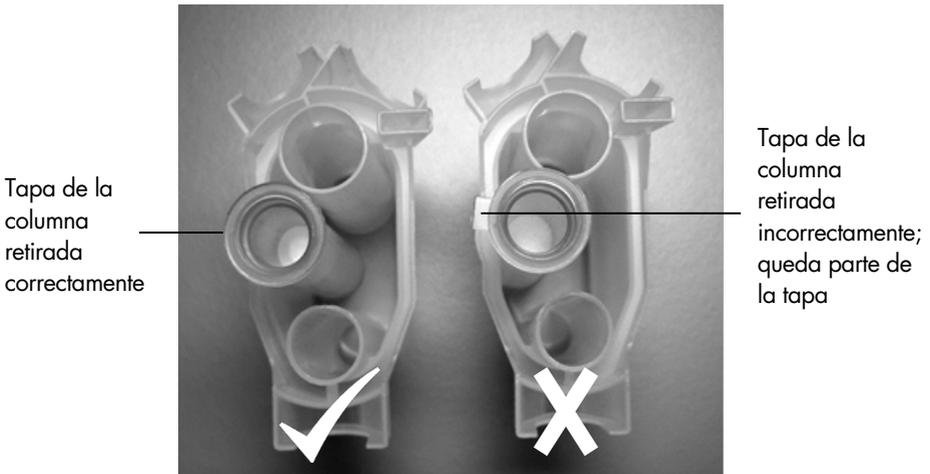


Figura 23. Carga de una columna de centrifugación PAXgene Shredder (PSC). La columna de centrifugación PAXgene Shredder (PSC) se carga en la posición intermedia del adaptador de rotor. Corte la tapa antes de colocar la columna.

Cargue la columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC), la columna de centrifugación PAXgene Shredder (PSC, sin tapa; consulte la figura 23, página 49) y el tubo de microcentrifugadora rotulado en las posiciones adecuadas en cada adaptador de rotor rotulado tal como se muestra en la tabla 4 y en la figura 24.



Asegúrese de que las tapas de la columna de centrifugación (PRC) y del tubo de microcentrifugadora (MCT) han descendido completamente hasta el fondo de las ranuras en el borde del adaptador de rotor, ya que de lo contrario las tapas se romperán durante la centrifugación.

Tabla 4. Material de laboratorio en el adaptador de rotor

Posición	Reactivo	Posición de la tapa
1	Columna de centrifugación PAXgene RNA (roja, PRC)	L1
2	Columna de centrifugación PAXgene Shredder [lila, PSC] (corte la tapa antes de colocar la columna en el adaptador de rotor)	–
3	Tubo de microcentrifugadora (MCT)*	L3

* Use los tubos de microcentrifugadora (MCT; 1,5 ml) incluidos en PAXgene Blood RNA Kit.

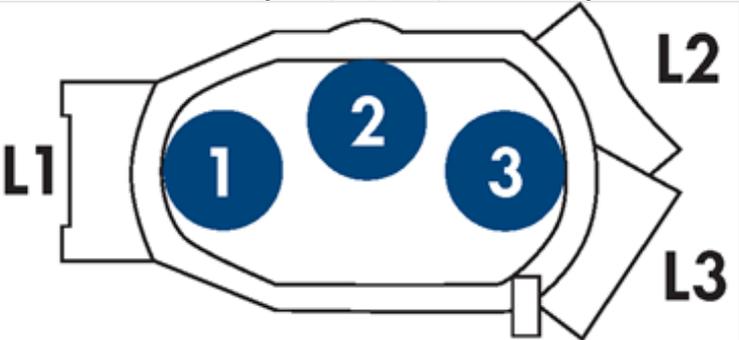


Figura 24. Posiciones en el adaptador de rotor. El adaptador de rotor tiene tres posiciones para tubos (1-3) y tres posiciones para tapas (L1-L3).

Carga de la centrifugadora

Cargue los adaptadores de rotor preparados en los huecos de la centrifugadora tal como se muestra en la figura 25, que aparece a continuación.



Si va a procesar menos de 12 muestras, asegúrese de cargar el rotor de la centrifugadora equilibrado radialmente (consulte la figura 26, página 52). Deben montarse todos los huecos de la centrifugadora antes de empezar una serie de un protocolo, incluso si se van a procesar menos de 12 muestras. No es posible procesar ni una (1) sola muestra ni 11 muestras.



Figura 25. Carga de la centrifugadora en los instrumentos QIAcube. Cargue los adaptadores del rotor preparados en los huecos de la centrifugadora (se muestra QIAcube Connect MDx como ejemplo).

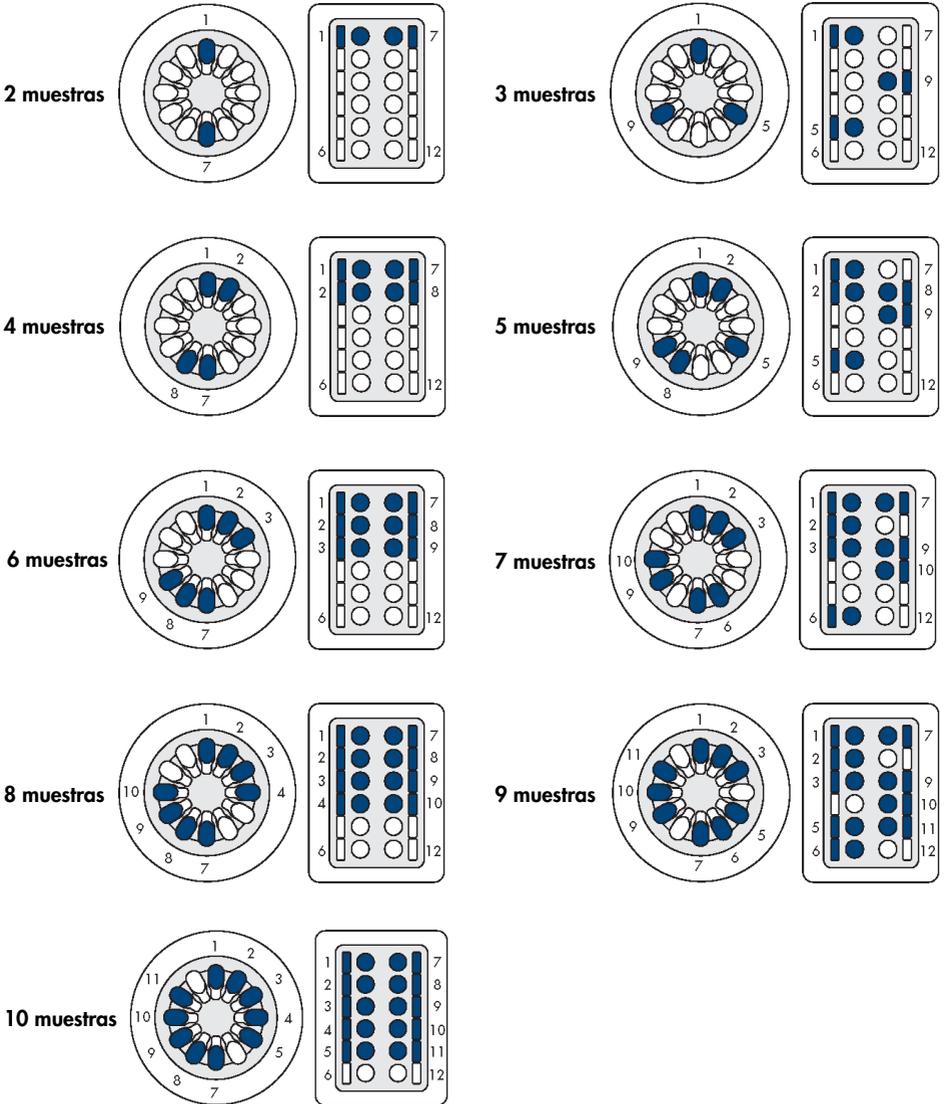


Figura 26. Carga de la centrifugadora y del agitador. Se muestran las posiciones de la centrifugadora y del agitador para procesar entre dos (2) y diez (10) muestras. No es posible procesar ni 1 ni 11 muestras. Para procesar 12 muestras, se cargan todas las posiciones de la centrifugadora y del agitador (no se muestra la imagen).

Tubos de procesamiento (PT)

Retire cualquier tubo de procesamiento (PT) que haya quedado en las ranuras para tubos de microcentrifugadora de series anteriores (QIAcube Connect MDx: consulte la figura 21, página 47; QIAcube: consulte la figura 22, página 48). Llene 3 tubos de procesamiento (PT) con la cantidad de reactivos que se indica en la tabla 5, según el número de muestras de la serie.

Para la mezcla de incubación con ADNasa I, pipetee el volumen indicado de tampón de digestión de ADN (RDD) en un tubo de procesamiento (PT) y añada el volumen indicado de la solución de partida de ADNasa I (RNFD). Pipetee la mezcla completa arriba y abajo suavemente 3 veces para mezclarla usando una punta de pipeta de 1.000 µl.

Utilice los tubos de procesamiento (PT) de 2 ml incluidos en PAXgene Blood RNA Kit. Rotule los tubos (PT) de forma clara con el nombre de los reactivos y colóquelos en la posición adecuada en las ranuras para tubos de microcentrifugadora, tal como se indica en tabla 6 (página 54).



La DNasa I (RNFD) es especialmente sensible a la desnaturalización física. Mezcle únicamente mediante pipeteo, utilizando puntas de pipeta de calibre ancho para reducir el cizallamiento. No la agite en la agitadora vortical.



Asegúrese de pipetear solamente el volumen necesario indicado en la tabla 5 siguiente.

Tabla 5. Volumen de reactivos necesario en los tubos de procesamiento para las ranuras para tubos de microcentrifugadora.

Número de muestras	Volumen de reactivos necesario para el número indicado de muestras (µl)		
	Proteinasa K (PK)	Mezcla de incubación con ADNasa I	Tampón de elución (BR5)
2	126	187 (23 ADNasa I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 ADNasa I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 ADNasa I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 ADNasa I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 ADNasa I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 ADNasa I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 ADNasa I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 ADNasa I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 ADNasa I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 ADNasa I + 806 Buffer RDD)	1177

Tabla 6. Ranuras para tubos de microcentrifugadora

	Posición		
	A	B	C
Contenido	Proteinasa K	Mezcla de incubación con ADNasa I	Tampón de elución (BR5)
Recipiente	Tubo de procesamiento (PT)*	Tubo de procesamiento (PT)*	Tubo de procesamiento (PT)*

* Utilice los tubos de procesamiento de 2 ml incluidos en PAXgene Blood RNA Kit.

Protocolo: Purificación manual de ARN total a partir de sangre total humana recogida en PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Compruebe que la caja del kit está intacta y no ha sufrido daños y que los tampones no presentan fugas. No use un kit que esté dañado.
- Cuando use una pipeta, compruebe que está ajustada en el volumen correcto y aspire y dispense el líquido con cuidado y de manera completa.
- Para evitar transferir las muestras a un tubo o columna de centrifugación equivocados, compruebe que todos los tubos y columnas de centrifugación están correctamente rotulados con un rotulador permanente. Rotule la tapa y el cuerpo de cada tubo (PT y MCT). En el caso de las columnas de centrifugación, rotule el cuerpo de su tubo de procesamiento (PT). Cierre siempre los tubos o columnas de centrifugación después de transferir líquido a ellos.
- El derramamiento de muestras y tampones durante el procedimiento puede reducir la cantidad obtenida y la pureza del ARN.
- A menos que se indique lo contrario, todos los pasos de este protocolo, incluidos los pasos de centrifugación, deben realizarse a temperatura ambiente (15-25 °C).

Debido a la sensibilidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, deben tomarse las siguientes precauciones para evitar la contaminación cruzada al manipular las muestras:

- Pipeteo con cuidado la muestra en la columna de centrifugación (PRC y PSC) sin humedecer el borde de la columna.
- Cambie siempre las puntas de pipeta entre transferencias de líquidos. Use puntas de pipeta con filtro para aerosoles.

- Evite tocar la membrana de la columna de centrifugación (PRC y PSC) con la punta de la pipeta.
- Después de agitar en el agitador vorticial o de calentar un tubo de microcentrifugadora (MCT), centrifúguelo brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa.
- Use guantes durante todo el procedimiento. Si los guantes entran en contacto con la muestra, cámbieselos inmediatamente.
- Cierre la columna de centrifugación (PRC y PSC) antes de colocarla en la microcentrifugadora. Centrifugue según se describe en el procedimiento.
- Abra solamente una columna de centrifugación (PRC y PSC) cada vez y procure evitar que se generen aerosoles.
- Para procesar de manera eficaz varias muestras en paralelo, llene una gradilla con tubos de procesamiento (PT) a los que puedan transferirse las columnas de centrifugación (PRC y PSC) después del centrifugado. Deseche los tubos de procesamiento (PT) usados que contienen el filtrado y ponga los tubos de procesamiento (PT) nuevos que contienen columnas de centrifugación (PRC y PSC) directamente en la microcentrifugadora.

Antes de comenzar

- La sangre debe recogerse en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conforme a las instrucciones presentadas en el *manual de PAXgene Blood RNA Tube*. En caso necesario, consulte en el apéndice C (página 76) las recomendaciones acerca de la manipulación de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Para garantizar una lisis completa de las células sanguíneas después de extraer la sangre, asegúrese de que los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) se incuben a temperatura ambiente durante al menos 2 horas. Si se deja el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) incubando durante toda la noche es posible que aumente la cantidad obtenida. Si después de extraer la sangre el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT), se ha conservado a 2-8 °C, a -20 °C o a -70 °C, deje que se establezca primero a temperatura ambiente y, a continuación, consérvelo a esa temperatura durante 2 horas antes de comenzar el procedimiento.
- Lea la información sobre seguridad en la página 10.

- Lea las instrucciones para la manipulación de ARN (apéndice A, página 73).
- Asegúrese de que instrumentos tales como las pipetas y el agitador-incubador se han revisado y calibrado periódicamente conforme a las recomendaciones del fabricante.
- Se requiere un agitador-incubador en los pasos 5 y 20. Ajuste la temperatura del agitador-incubador a 55 °C.
- El tampón de unión (BR2) puede precipitar durante su almacenamiento. En caso necesario, caliéntelo hasta 37 °C para disolverlo.
- El tampón de lavado 2 (BR4) se suministra concentrado. Antes de usarlo por primera vez, añada 4 volúmenes de etanol (grado de pureza del 96-100%, p.a.) según se indica en el frasco para obtener una solución de trabajo.
- Si utiliza RNase-Free DNase Set por primera vez, prepare la solución de partida de ADNasa I. Disuelva la ADNasa I sólida (RNFD; 1.500 unidades Kunitz)* en 550 µl del tampón de resuspensión de ADNasa (DRB) que se incluye en el kit. Procure no desperdiciar ADNasa I (RNFD) al abrir el vial. No agite en el agitador vorticial la ADNasa I (RNFD) reconstituida. La ADNasa I es especialmente sensible a la desnaturalización física. Debe mezclarse únicamente invirtiendo el vial con suavidad.
- Los datos actuales muestran que la ADNasa I (RNFD) reconstituida puede conservarse a 2-8 °C durante un máximo de 6 semanas. Para conservar la ADNasa I (RNFD) a largo plazo, extraiga la solución de partida del vial de vidrio, divídala en alícuotas para un solo uso (use los tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml [MCT] que se incluyen en el kit; hay una cantidad suficiente para 5 alícuotas) y guárdela a -20 °C durante un máximo de 9 meses. Las alícuotas descongeladas pueden conservarse a 2-8 °C durante un máximo de 6 semanas. No vuelva a congelar las alícuotas una vez descongeladas.
- Al reconstituir y dividir en alícuotas la ADNasa I (RNFD), asegúrese de seguir las instrucciones para la manipulación del ARN (apéndice A, página 73).

* La actividad de la ADNasa I se mide habitualmente en unidades Kunitz, que se definen como la cantidad de ADNasa I que provoca un aumento de A_{260} de 0,001 por minuto y por mililitro a 25 °C y pH 5,0, utilizando ADN altamente polimerizado como sustrato (Kunitz, M. [1950] J. Gen. Physiol. **33**, 349 y 363).

Procedimiento

1. Centrifugue el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante 10 minutos a 3.000-5.000 x g con un rotor oscilante.



Para conseguir una lisis completa de las células sanguíneas, asegúrese de que la muestra de sangre se ha incubado en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) a temperatura ambiente (15-25 °C) durante al menos 2 horas.



El rotor debe contener adaptadores para tubos de fondo redondo. Si se usan otros tipos de adaptador de tubos, los tubos podrían romperse durante la centrifugación.

2. Retire el sobrenadante por decantación o pipeteo. Añada 4 ml de agua libre de ARNasa (RNFW) al precipitado y cierre el tubo con un cierre BD Hemogard secundario nuevo (incluido en el kit).

Si se decanta el sobrenadante, tenga cuidado de no alterar el precipitado y seque el borde del tubo con una hoja de papel absorbente limpia.

3. Agítelo en el agitador vorticial hasta que vea que se ha disuelto el precipitado y centrifugue durante 10 minutos a 3.000-5.000 x g con un rotor oscilante. Retire y deseche todo el sobrenadante.

Los pequeños restos que quedan en el sobrenadante después de la agitación vorticial pero antes de la centrifugación no afectan al procedimiento.



Si queda algo de sobrenadante, inhibirá la lisis y diluirá el lisado, por lo que se verán afectadas las condiciones para la unión del ARN a la membrana PAXgene.

4. Añada 350 µl de tampón de resuspensión (BR1) y agite en el agitador vorticial hasta que vea que el precipitado se ha disuelto.

5. Pipetee la muestra en un tubo de microcentrifugadora (MCT) de 1,5 ml. Añada 300 µl de tampón de unión (BR2) y 40 µl de proteinasa K (PK). Mezcle mediante agitación vorticial durante 5 segundos e incube durante 10 minutos a 55 °C en un agitador-incubador a 400-1400 rpm. Después de la incubación, ajuste la temperatura del agitador-incubador a 65 °C (para el paso 20).



No mezcle juntos el tampón de unión (BR2) y la proteinasa K (PK) antes de añadirlos a la muestra.

6. Pipetee el lisado directamente en una columna de centrifugación PAXgene Shredder (PSC; lila) colocada en un tubo de procesamiento (PT) de 2 ml y centrifugue durante 3 minutos a velocidad máxima (sin superar un valor de 20.000 x g).



Pipetee con cuidado el lisado en la columna de centrifugación (PSC) y compruebe visualmente que ha transferido el lisado totalmente a la columna de centrifugación (PSC).

Para evitar que se dañen las columnas (PSC) y los tubos (PT), no supere un valor de 20.000 x g.



Algunas muestras pueden fluir a través de la columna de centrifugación PAXgene Shredder (PSC) sin centrifugación. Esto se debe a la baja viscosidad de algunas muestras y no debe considerarse indicativo de un fallo del producto.

7. Transfiera con cuidado todo el sobrenadante de la fracción de filtrado a un tubo de microcentrifugadora (MCT) de 1,5 ml nuevo sin alterar el precipitado del tubo de procesamiento.
8. Añada 350 µl de etanol (grado de pureza del 96-100%, p.a.). Mezcle mediante agitación vorticial y centrifugue brevemente (1-2 segundos a 500-1.000 x g) para eliminar las gotas del interior de la tapa del tubo.



La centrifugación no debe durar más de 1-2 segundos, ya que podría producirse el precipitado de los ácidos nucleicos y una disminución de la cantidad obtenida de ARN total.

9. Pipetee 700 µl de la muestra en la columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC, roja) colocada en un tubo de procesamiento (PT) de 2 ml y centrifugue durante 1 minuto a 8.000-20.000 x g. Coloque la columna de centrifugación (PRC) en un tubo de procesamiento (PT) de 2 ml nuevo y deseche el tubo de procesamiento (PT) antiguo que contiene el filtrado.
10. Pipetee el resto de la muestra en la columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC) y centrifugue durante 1 minuto a 8.000-20.000 x g. Coloque la columna de centrifugación (PRC) en un tubo de procesamiento (PT) de 2 ml nuevo y deseche el tubo de procesamiento (PT) antiguo que contiene el filtrado.



Pipetee con cuidado la muestra en la columna de centrifugación (PRC) y compruebe visualmente que ha transferido totalmente la muestra a la columna de centrifugación (PRC).

11. Pipetee 350 µl de tampón de lavado 1 (BR3) en la columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC). Centrifugue durante 1 minuto a 8.000-20.000 x g. Coloque la columna de centrifugación (PRC) en un tubo de procesamiento (PT) de 2 ml nuevo y deseche el tubo de procesamiento (PT) antiguo que contiene el filtrado.

12. Añada 10 µl de la solución de partida de ADNasa I (RNFD) a 70 µl de tampón de digestión de ADN (RDD) en un tubo de microcentrifugadora (MCT) de 1,5 ml. Mezcle el tubo sacudiéndolo con suavidad y centrifúguelo brevemente para recoger el líquido residual de las paredes del tubo.

Si va a procesar, por ejemplo, 10 muestras, añada 100 µl de la solución de partida de ADNasa I (RNFD) a 700 µl de tampón de digestión de ADN (RDD). Use los tubos de microcentrifugadora (MCT) de 1,5 ml que se incluyen en el kit.



La ADNasa I es especialmente sensible a la desnaturalización física. Debe mezclarse únicamente sacudiendo el tubo con suavidad. No la agite en la agitadora vorticial.

13. Pipetee la mezcla de incubación de ADNasa I (RNFD) (80 µl) directamente en la membrana de la columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC) y déjela en la mesa (a 20-30 °C) durante 15 minutos.



Asegúrese de poner la mezcla de incubación de ADNasa I (RNFD) directamente en la membrana. La digestión de la ADNasa será incompleta si parte de la mezcla se aplica en las paredes o en la junta tórica de la columna de centrifugación (PRC) y permanece ahí.

14. Pipetee 350 µl del tampón de lavado 1 (BR3) en la columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC) y centrifugue durante 1 minuto a 8.000-20.000 x g. Coloque la columna de centrifugación (PRC) en un tubo de procesamiento (PT) de 2 ml nuevo y deseche el tubo de procesamiento (PT) antiguo que contiene el filtrado.

15. Pipetee 500 µl del tampón de lavado 2 (BR4) en la columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC) y centrifugue durante 1 minuto a 8.000-20.000 x g. Coloque la columna de centrifugación (PRC) en un tubo de procesamiento (PT) de 2 ml nuevo y deseche el tubo de procesamiento (PT) antiguo que contiene el filtrado.



El tampón de lavado 2 (BR4) se suministra concentrado. Asegúrese de añadir etanol al tampón de lavado 2 (BR4) antes de usarlo (consulte el apartado «Antes de comenzar», página 56).

16. Añada otros 500 µl de tampón de lavado 2 (BR4) a la columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC). Centrifugue durante 3 minutos a 8.000-20.000 x g.
17. Deseche el tubo de procesamiento (PT) que contiene el filtrado y coloque la columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC) en un tubo de procesamiento (PT) de 2 ml nuevo. Centrifugue durante 1 minuto a 8.000-20.000 x g.
18. Deseche el tubo de procesamiento (PT) que contiene el filtrado. Coloque la columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC) en un tubo de microcentrifugadora (MCT) de 1,5 ml y pipetee 40 µl de tampón de elución (BR5) directamente en la membrana de la columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC). Centrifugue durante 1 minuto a 8.000-20.000 x g para eluir el ARN.

Es importante humedecer toda la membrana con tampón de elución (BR5) para conseguir la máxima eficiencia de elución.
19. Repita el paso de elución (paso 18) según se describe usando 40 µl de tampón de elución (BR5) y el mismo tubo de microcentrifugadora (MCT).
20. Incube el eluido durante 5 minutos a 65 °C en el agitador-incubador (desde el paso 5) sin agitarlo. Después de la incubación, póngalo inmediatamente en hielo.

Esta incubación a 65 °C desnatura el ARN para aplicaciones posteriores. No supere el tiempo ni la temperatura de incubación.
21. Si las muestras de ARN no van a utilizarse inmediatamente, almacénelas a -20 °C o a -70 °C.

Dado que el ARN se mantiene desnaturado después de ciclos repetidos de congelación y descongelación, no es necesario repetir la incubación a 65 °C. Si las muestras de ARN se utilizan en un ensayo diagnóstico, siga las instrucciones del fabricante.

Para una cuantificación exacta del ARN basada en una medida de absorbancia a 260 nm, recomendamos diluir las muestras en tampón Tris-HCl 10 mM con un pH de 7,5*. La dilución de la muestra en agua libre de ARNasa puede dar lugar a valores bajos inexactos.

* Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuadas. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

Calibre el espectrofotómetro utilizando un blanco que contenga la misma proporción de tampón de elución (BR5) y de tampón Tris-HCl que las muestras que va a medir. El tampón de elución (BR5) tiene una absorbancia alta a 220 nm, lo que puede dar lugar a niveles de absorbancia de fondo altos si el espectrofotómetro no está correctamente calibrado.



Para la cuantificación en tampón Tris-HCl, utilice la relación $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Consulte el apéndice B, página 74.

Protocolo: Purificación automatizada de ARN total a partir de sangre total humana recogida en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Compruebe que la caja del kit está intacta y no ha sufrido daños y que los tampones no presentan fugas. No use un kit que esté dañado.
- Cuando use una pipeta, compruebe que está ajustada en el volumen correcto y aspire y dispense el líquido con cuidado y de manera completa.
- Para evitar transferir las muestras a los tubos y consumibles de plástico incorrectos, asegúrese de que todos los tubos de procesamiento (PT), tubos de microcentrifugadora (MCT) y adaptadores de rotor están correctamente rotulados con un rotulador permanente. Rotule la tapa y el cuerpo de cada tubo de microcentrifugadora (MCT), el cuerpo de cada tubo de procesamiento (PT) y la pared exterior de cada adaptador de rotor.
- El derramamiento de muestras y tampones durante el procedimiento puede reducir la cantidad obtenida y la pureza del ARN.
- A menos que se indique lo contrario, todos los pasos de este protocolo, incluidos los pasos de centrifugación, deben realizarse a temperatura ambiente (15-25 °C).

Debido a la sensibilidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, deben tomarse las siguientes precauciones para evitar la contaminación cruzada al manipular las muestras:

- Pipetee con cuidado la muestra en el fondo del tubo de procesamiento (PT) sin humedecer el borde de este.
- Cambie siempre las puntas de pipeta entre transferencias de líquidos. Use puntas de pipeta con filtro para aerosoles.
- Evite tocar la membrana de la columna de centrifugación (PRC y PSC) con la punta de la pipeta.

- Después de agitar en el agitador vorticial o de calentar un tubo de microcentrifugadora (MCT), centrifúguelo brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa.
- Use guantes durante todo el procedimiento. Si los guantes entran en contacto con la muestra, cámbieselos inmediatamente.

Antes de comenzar

- La sangre debe recogerse en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conforme a las instrucciones presentadas en el *manual de PAXgene Blood RNA Tube*. En caso necesario, consulte en el apéndice C (página 76) las recomendaciones acerca de la manipulación de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Para garantizar una lisis completa de las células sanguíneas después de extraer la sangre, asegúrese de que los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) se incuben a temperatura ambiente durante al menos 2 horas. Si se deja el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) incubando durante toda la noche es posible que aumente la cantidad obtenida. Si después de extraer la sangre el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT), se ha conservado a 2-8 °C, a -20 °C o a -70 °C, deje que se establezca primero a temperatura ambiente y, a continuación, consérvelo a esa temperatura durante 2 horas antes de comenzar el procedimiento.
- Lea la información sobre seguridad en la página 10.
- Lea el apartado «Notas importantes», página 41.
- Lea las instrucciones para la manipulación de ARN (apéndice A, página 73).
- Lea el manual del usuario del instrumento QIAcube pertinente y toda información adicional suministrada con el instrumento QIAcube, prestando especial atención a la información sobre seguridad.
- Asegúrese de que los dispositivos e instrumentos tales como las pipetas y el instrumento QIAcube se hayan revisado y calibrado periódicamente conforme a las recomendaciones del fabricante.
- El tampón de unión (BR2) puede precipitar durante su almacenamiento. En caso necesario, caliéntelo hasta 37 °C para disolverlo.

- El tampón de lavado 2 (BR4) se suministra concentrado. Antes de usarlo por primera vez, añada el volumen adecuado de etanol (grado de pureza del 96-100%, p.a.) según se indica en el frasco para obtener una solución de trabajo.
- Si utiliza RNase-Free DNase Set por primera vez, prepare la solución de partida de ADNasa I. Disuelva la ADNasa I sólida (RNFD; 1.500 unidades Kunitz)* en 550 µl del tampón de resuspensión de ADNasa (DRB) que se incluye en el kit. Procure no desperdiciar ADNasa I (RNFD) al abrir el vial. No agite en el agitador vorticial la ADNasa I (RNFD) reconstituida. La ADNasa I es especialmente sensible a la desnaturalización física. Debe mezclarse únicamente invirtiendo el vial con suavidad.
- Los datos actuales muestran que la ADNasa I (RNFD) reconstituida puede conservarse a 2-8 °C durante un máximo de 6 semanas. Para conservar la ADNasa I (RNFD) a largo plazo, extraiga la solución de partida del vial de vidrio, divídala en alícuotas para un solo uso (use los tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml [MCT] que se incluyen en el kit; hay una cantidad suficiente para 5 alícuotas) y guárdela a -20 °C durante un máximo de 9 meses. Las alícuotas descongeladas pueden conservarse a 2-8 °C durante un máximo de 6 semanas. No vuelva a congelar las alícuotas una vez descongeladas.
- Al reconstituir y dividir en alícuotas la ADNasa I (RNFD), asegúrese de seguir las instrucciones para la manipulación del ARN (apéndice A, página 73).
- Instale el adaptador de agitador apropiado (incluido con los instrumentos QIAcube; use el adaptador para tubos con cierre seguro de 2 ml, marcado con un «2») y coloque la gradilla del agitador sobre el adaptador.
- Compruebe el cajón de desechos y vacíelo en caso necesario.
- Instale los protocolos relacionados, si no lo ha hecho todavía, para series anteriores. El QIAcube Connect MDx requiere la descarga de todos los protocolos encontrados en el archivo zip relacionado. Para el QIAcube clásico, instale los dos protocolos «PAXgene Blood RNA Part A» y «PAXgene Blood RNA Part B». Consulte el apartado «Instalación de protocolos en los instrumentos QIAcube », en la página 44.

* La actividad de la ADNasa I se mide habitualmente en unidades Kunitz, que se definen como la cantidad de ADNasa I que provoca un aumento de A_{260} de 0,001 por minuto y por mililitro a 25 °C y pH 5,0, utilizando ADN altamente polimerizado como sustrato (Kunitz, M. [1950] J. Gen. Physiol. **33**, 349 y 363).

Procedimiento

1. Cierre la tapa del instrumento QIAcube y encienda el instrumento QIAcube con el interruptor (QIAcube Connect MDx: consulte la figura 17, página 42; QIAcube: consulte la figura 18, página 43 Figura 15).

Oirá un pitido y aparecerá la pantalla de inicio. Los instrumentos realizan automáticamente pruebas de inicialización.

2. Abra la tapa del instrumento QIAcube y cargue los reactivos y el material de plástico necesarios en el instrumento QIAcube. Consulte el apartado «Carga de los instrumentos QIAcube», en la página 45.

Para ahorrar tiempo, la carga puede realizarse durante uno o los dos pasos siguientes de 10 minutos de centrifugación (pasos 3 y 5).

3. Centrifugue el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante 10 minutos a 3.000-5.000 x g con un rotor oscilante.



Para conseguir una lisis completa de las células sanguíneas, asegúrese de que la muestra de sangre se ha incubado en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) a temperatura ambiente (15-25 °C) durante al menos 2 horas.



El rotor debe contener adaptadores para tubos de fondo redondo. Si se usan otros tipos de adaptador de tubos, los tubos podrían romperse durante la centrifugación.

4. Retire el sobrenadante por decantación o pipeteo. Añada 4 ml de agua libre de ARNasa (RNFW) al precipitado y cierre el tubo con un cierre BD Hemogard secundario nuevo (incluido en el kit).

Si se decanta el sobrenadante, tenga cuidado de no alterar el precipitado y seque el borde del tubo con una hoja de papel absorbente limpia.

5. Agítelo en el agitador vorticial hasta que vea que se ha disuelto el precipitado y centrifugue durante 10 minutos a 3.000-5.000 x g con un rotor oscilante. Retire y deseche todo el sobrenadante.

Los pequeños restos que quedan en el sobrenadante después de la agitación vorticial pero antes de la centrifugación no afectan al procedimiento.



Si queda algo de sobrenadante, inhibirá la lisis y diluirá el lisado, por lo que se verán afectadas las condiciones para la unión del ARN a la membrana PAXgene.

6. Añada 350 µl de tampón de resuspensión (BR1) y agite en el agitador vorticial hasta que vea que el precipitado se ha disuelto.

7. Pipetee la muestra en un tubo de procesamiento (PT) de 2 ml.



Utilice los tubos de procesamiento (PT) de 2 ml incluidos en PAXgene Blood RNA Kit.

8. Cargue los tubos de procesamiento (PT) abiertos que contienen la muestra en el agitador del instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte la figura 21, página 47; QIAcube: consulte la figura 22, página 48 Figura 15). Las posiciones de las muestras están numeradas para facilitar la carga. Inserte los tapones de la gradilla del agitador (incluidos con los instrumentos QIAcube) en las ranuras al borde de la gradilla del agitador junto a cada tubo de procesamiento. Esto permite la detección de muestras durante la comprobación de la carga.



Asegúrese de instalar el adaptador de agitador apropiado (adaptador de agitador, 2 ml, tubos con cierre seguro, marcado con un «2», incluido con los instrumentos QIAcube).



Si va a procesar menos de 12 muestras, asegúrese de cargar la gradilla del agitador tal como se muestra en la figura 26, página 52. No es posible procesar ni 1 ni 11 muestras. Los números de posición de la gradilla del agitador corresponden a los números de posición de la centrifugadora.

9. Cierre la tapa del instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte la figura 17, página 42; QIAcube: consulte la figura 18, página 43).

10. Seleccione el protocolo «PAXgene Blood RNA Part A» e inicie el protocolo.

Siga las instrucciones que aparecen en la pantalla táctil del instrumento QIAcube.



Asegúrese de que ambas partes del programa (parte A y parte B) estén instaladas en el instrumento QIAcube (consulte el apartado «Instalación de protocolos en los instrumentos QIAcube », página 44).



Los instrumentos QIAcube realizarán una comprobación de la carga de muestras, puntas de pipeta, adaptadores de rotor y frascos de reactivo.

11. Una vez finalizado el protocolo «PAXgene Blood RNA Part A», abra la tapa del instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte la figura 17, página 42; QIAcube: consulte la figura 18, página 43). Retire y deseche las columnas de centrifugación PAXgene RNA (PRC) de los adaptadores de rotor y los tubos de procesamiento (PT) vacíos del agitador.



Durante la serie, el instrumento transfiere las columnas de centrifugación de la posición 1 del adaptador de rotor (posición de tapa L1) a la posición 3 del adaptador de rotor (posición de tapa L2) (consulte la figura 24, página 50).

12. Cierre las tapas de todos los tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml (MCT) que contienen el ARN purificado en los adaptadores de rotor (posición 3, posición de tapa L3; consulte la figura 24, página 50). Transfiera los tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml (MCT) al adaptador del agitador del instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte la figura 21, página 47; QIAcube: consulte la figura 22, página 48).

13. Cierre la tapa del instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte la figura 17, página 42; QIAcube: consulte la figura 18, página 43).

14. Seleccione el protocolo «PAXgene Blood RNA Part B» e inicie el protocolo.

Siga las instrucciones indicadas en la pantalla táctil del instrumento QIAcube.



Este programa incuba las muestras a 65 °C y desnaturaliza el ARN para aplicaciones posteriores. No omita este paso aunque la aplicación posterior incluya un paso de desnaturalización por calor. Es esencial una desnaturalización suficiente del ARN para conseguir una eficiencia máxima en aplicaciones posteriores.

15. Una vez finalizado el programa «PAXgene Blood RNA Part B», abra la tapa del instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte la figura 17, página 42; QIAcube: consulte la figura 18, página 43). Coloque inmediatamente los tubos de microcentrifugadora (MCT) que contienen el ARN purificado en hielo.



ADVERTENCIA: Superficie caliente El agitador puede alcanzar temperaturas de hasta 70 °C. No lo toque cuando esté caliente.



No deje el ARN purificado en el instrumento QIAcube. Al no estar las muestras refrigeradas, el ARN purificado puede degradarse. Por consiguiente, no se recomienda realizar series de preparación de muestras durante la noche sin supervisión.

16. Si las muestras de ARN no van a utilizarse inmediatamente, almacénelas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dado que el ARN permanece desnaturalizado después de ciclos repetidos de congelación y descongelación, no es necesario repetir el protocolo de incubación en calor («PAXgene Blood RNA Part B»). Si las muestras de ARN se utilizan en un ensayo diagnóstico, siga las instrucciones del fabricante.

Para una cuantificación exacta del ARN basada en una medida de absorbancia a 260 nm, recomendamos diluir las muestras en tampón Tris-HCl 10 mM con un pH de 7,5*. La dilución de la muestra en agua libre de ARNasa puede dar lugar a valores bajos inexactos.

Calibre el espectrofotómetro utilizando un blanco que contenga la misma proporción de tampón de elución (BR5) y de tampón Tris-HCl que las muestras que va a medir. El tampón de elución (BR5) tiene una absorbancia alta a 220 nm, lo que puede dar lugar a niveles de absorbancia de fondo altos si el espectrofotómetro no está correctamente calibrado.



Para la cuantificación en tampón Tris-HCl, utilice la relación $A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/ml}$. Consulte el apéndice B, página 74.

* Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

17. Retire la gradilla de frascos de reactivo de la plataforma de trabajo del instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte la figura 21, página 47; QIAcube: consulte la figura 22, página 48) y cierre todos los frascos con las tapas debidamente rotuladas. El tampón de los frascos puede conservarse a temperatura ambiente (15-25 °C) durante un máximo de 3 meses. Retire y deseche los restos de reactivos que queden en los tubos de procesamiento (PT) en las ranuras para tubos de microcentrifugadora del instrumento QIAcube. Retire y deseche los adaptadores de rotor de la centrifugadora. Vacíe el recipiente para desechos del QIAcube Connect MDx (QIAcube Connect MDx: consulte la figura 17, página 42; QIAcube: consulte la figura 18, página 43). Cierre la tapa del instrumento QIAcube y apague el instrumento por medio del interruptor de alimentación.

Guía para la resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, consulte la página de preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions) de nuestro Centro de servicio técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN estarán siempre encantados de responder a cualquier pregunta que tenga sobre la información y los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para el tratamiento de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en la contraportada o en www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

ARN degradado

Contaminación con ARNasa



Procure no introducir ARNasa en los reactivos durante el procedimiento o la manipulación posterior (consulte el apéndice A, página 73).

Baja cantidad obtenida de ARN

a) Se han recogido menos de 2,5 ml de sangre en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Asegúrese de recoger 2,5 ml de sangre en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT; consulte el *manual de PAXgene Blood RNA Tube*).

b) La concentración de ARN se ha medido en agua



El ARN debe diluirse en tampón Tris-HCl 10 mM, con un pH de 7,5* para que la cuantificación sea exacta (consulte el apéndice B, página 74).

c) Se han transferido restos celulares a la columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC) en los pasos 9 y 10 del protocolo manual



Evite transferir partículas grandes al pipetear el sobrenadante en el paso 7 del protocolo manual (la transferencia de restos pequeños no afectará al procedimiento).

* Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

Comentarios y sugerencias

- d) El sobrenadante no se ha eliminado por completo en el paso 3
-  Asegúrese de que ha eliminado todo el sobrenadante. Si se decanta el sobrenadante, quite las gotas del borde del tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) dando unos golpecitos en una hoja de papel absorbente. Tome las precauciones oportunas para evitar la contaminación cruzada.
- e) Después de recoger la sangre en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT), la sangre se ha incubado menos de 2 horas
-  Incube la sangre en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante al menos 2 horas después de su recogida

Valor A_{260}/A_{280} bajo

- a) Se ha utilizado agua para diluir el ARN para medir el cociente A_{260}/A_{280}
-  Use tampón Tris-HCl 10 mM con un pH de 7,5 para diluir el ARN antes de medir la pureza* (consulte el apéndice B, página 74).
- b) El espectrofotómetro no está calibrado correctamente
-  Calibre el espectrofotómetro utilizando un blanco que contenga la misma proporción de tampón de elución (BR5) y de tampón Tris-HCl 10 mM con un pH de 7,5 que las muestras que va a medir. El tampón de elución (BR5) tiene una absorbancia alta a 220 nm, lo que puede dar lugar a niveles de absorbancia de fondo altos si el espectrofotómetro no está correctamente calibrado.

El instrumento no funciona correctamente

Los instrumentos QIAcube no funcionan correctamente

Lea el manual del usuario de QIAcube pertinente, prestando especial atención al apartado sobre la resolución de problemas. Asegúrese de que se realiza un mantenimiento correcto del instrumento QIAcube, tal como se describe en el manual del usuario.

* 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.

Apéndice A: Consideraciones generales sobre la manipulación del ARN

Manipulación del ARN



Las ribonucleasas (ARNasas) son enzimas muy estables y activas que, en general, no requieren cofactores para actuar. Dado que las ARNasas son difíciles de inactivar y que se necesitan solamente cantidades minúsculas para degradar el ARN, no utilice ningún material de plástico o de vidrio sin eliminar antes una posible contaminación con ARNasa. Deben tomarse precauciones extremas para evitar introducir accidentalmente ARNasas en la muestra de ARN durante el procedimiento de purificación o después de este. Para crear y mantener un entorno libre de ARNasa, deben tomarse precauciones durante el pretratamiento y el uso de soluciones y recipientes desechables y no desechables cuando se trabaje con ARN.

Manipulación general



Siempre que se trabaje con ARN debe utilizarse una técnica aséptica microbiológica adecuada. Las manos y las partículas de polvo transportan bacterias y hongos y son las fuentes más frecuentes de contaminación con ARNasa. Al manipular los reactivos y las muestras de ARN, use siempre guantes de látex o de vinilo para prevenir la contaminación con ARNasa procedente de la superficie de la piel o de un equipo de laboratorio con polvo. Cámbiese los guantes con frecuencia y mantenga los tubos cerrados siempre que sea posible. Mantenga el ARN purificado en hielo cuando pipetee las alícuotas para aplicaciones posteriores.

Los protocolos para eliminar la contaminación con ARNasa del material de vidrio y de las soluciones se pueden encontrar en guías generales de biología molecular, tales como Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Apéndice B: Cuantificación y determinación de la calidad del ARN total

Cuantificación del ARN

La concentración del ARN debe determinarse midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en un espectrofotómetro. Para garantizar que las lecturas sean significativas, deben estar comprendidas dentro del intervalo lineal del espectrofotómetro. Una absorbancia de 1 unidad a 260 nm corresponde a 44 µg de ARN por mililitro ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Esta relación solamente es válida para las mediciones realizadas en tampón Tris-HCl 10 mM* con un pH de 7,5. Por consiguiente, si es necesario diluir la muestra de ARN, dilúyala en tampón Tris-HCl 10 mM. Como se comenta más adelante (consulte el apartado «Pureza del ARN», página 75), el cociente entre los valores de absorbancia a 260 nm y 280 nm proporciona una estimación de la pureza del ARN. Cuando mida muestras de ARN, asegúrese de que las cubetas no contienen ARNasa. Calibre el espectrofotómetro utilizando un blanco que contenga la misma proporción de tampón de elución (BR5) y de tampón Tris-HCl que las muestras que va a medir. El tampón de elución (BR5) tiene una absorbancia alta a 220 nm, lo que puede dar lugar a niveles de absorbancia de fondo altos si el espectrofotómetro no está correctamente calibrado. A continuación se presenta un ejemplo de cálculo para la cuantificación del ARN.

Volumen de la muestra de ARN = 80 µl
Dilución (1/15) = 10 µl de muestra de ARN + 140 µl de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,5

Mida la absorbancia de la muestra diluida en una cubeta (libre de ARNasa).

A_{260} = 0,3
Concentración de la muestra = $44 \times A_{260} \times \text{factor de dilución}$
= $44 \times 0,3 \times 15$
= 198 µg/ml

Cantidad obtenida total = concentración \times volumen de la muestra en mililitros
= 198 µg/ml \times 0,08 ml
= 15,8 µg de ARN

* Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

Pureza del ARN

El cociente de las lecturas a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}) proporciona una estimación de la pureza del ARN con respecto a los contaminantes que absorben la luz ultravioleta, como es el caso de las proteínas. Sin embargo, el cociente A_{260}/A_{280} depende enormemente del pH. Un pH más bajo disminuye el cociente A_{260}/A_{280} y reduce la sensibilidad a la contaminación con proteínas*. Para obtener valores exactos se recomienda medir la absorbancia en tampón Tris-HCl 10 mM con un pH de 7,5. El ARN puro presenta un cociente A_{260}/A_{280} de 1,8-2,2 en tampón Tris-HCl 10 mM con un pH de 7,5. Calibre el espectrofotómetro utilizando un blanco que contenga la misma proporción de tampón de elución (BR5) y de tampón Tris-HCl que las muestras que va a medir. El tampón de elución (BR5) tiene una absorbancia alta a 220 nm, lo que puede dar lugar a niveles de absorbancia de fondo altos si el espectrofotómetro no está correctamente calibrado.

* 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.

Apéndice C: Manipulación de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Las siguientes recomendaciones de BD pueden ser de utilidad para la manipulación de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Consulte el *manual de PAXgene Blood RNA Tube* si desea obtener más información sobre los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Instrucciones para quitar el cierre BD Hemogard

1. Sujete el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) con una mano, colocando el pulgar bajo el cierre BD Hemogard. (Para mayor estabilidad, apoye el brazo sobre una superficie sólida). Con la otra mano, gire el cierre BD Hemogard empujando simultáneamente hacia arriba con el pulgar de la otra mano SOLAMENTE HASTA QUE SE AFLOJE EL TAPÓN DEL TUBO.
2. Retire el pulgar antes de levantar el cierre. NO use el pulgar para quitar el cierre del tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Precaución: Si el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) contiene sangre, existe riesgo de exposición. Para prevenir lesiones al quitar el cierre, es importante en cuanto se afloje el cierre BD Hemogard retirar el pulgar que se ha usado para levantar el cierre de forma que ya no toque el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
3. Levante el cierre del tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT). En el caso poco probable de que el protector de plástico se separe del tapón de caucho, NO VUELVA A MONTAR EL CIERRE. Quite con cuidado el tapón de caucho del tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Instrucciones para insertar un segundo cierre BD Hemogard

1. Vuelva a poner el cierre en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Gire y empuje con fuerza hacia abajo hasta que el tapón esté completamente introducido de nuevo. Para que el cierre se mantenga sujeto al tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante la manipulación, es necesario introducir completamente el tapón.

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de cat.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, tubos de procesamiento, ADNasa I libre de ARNasa, reactivos libres de ARNasa y tampones; para usar en combinación con los tubos PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 tubos de recogida de sangre	762165
Productos relacionados que pueden solicitarse a QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	El paquete incluye: gradillas de frascos de reactivo (3); tiras para etiquetado de gradillas (8); puntas con filtro de 200 µl (1.024); puntas con filtro de 1.000 µl (1.024); puntas con filtro de 1.000 µl de calibre ancho (1.024); frascos de reactivo de 30 ml (18); adaptadores de rotor (240); soporte para adaptadores de rotor	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Puntas de pipeta estériles desechables engradilladas	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Frascos de reactivo (30 ml) con tapa; paquete de 6; para usar con la gradilla de frascos de reactivo del instrumento QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Para 240 preparaciones: 240 adaptadores de rotor desechables; para usar con los instrumentos QIAcube	990394

Reagent Bottle Rack	Gradilla para alojar 6 frascos de reactivo de 30 ml en la plataforma de trabajo del instrumento QIAcube	990390
Rotor Adapter Holder	Soporte para 12 adaptadores de rotor desechables; para su uso con los instrumentos QIAcube	990392
Productos relacionados que pueden solicitarse a BD*		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: aguja de 21 G y 0,75 pulgadas (0,8x19 mm), tubo de 12 pulgadas (305 mm) con adaptador luer; 50 por caja, 200 por estuche	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Estuche solamente para diámetros de 13 mm y 16 mm; 1.000/estuche	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Tubos de extracción de 13 x 75 mm y 4,0 ml con cierre BD Hemogard rojo y etiqueta de papel; 100/caja, 1.000/estuche	368975

* Estos accesorios para la recogida de sangre son los productos habituales que pueden usarse con los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Si desea obtener más información sobre estos accesorios, incluida la información para pedidos, visite www.preanalytix.com.

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit de PreAnalytiX o de QIAGEN correspondiente. Los manuales y los manuales del usuario de los kits de PreAnalytiX y QIAGEN están disponibles en www.preanalytix.com y www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de PreAnalytiX.

Historial de revisiones del manual

Documento y revisión	Cambios	Fecha
HB-0101-004, R2	Cambios para cumplir con las normativas del Sistema Mundialmente Armonizado (Globally Harmonized System, GHS) a lo largo del documento	Junio 2015
HB-0101-005, R3	Nueva plantilla; revisiones en el protocolo automatizado y en los datos de rendimiento; actualización de Información de seguridad para cumplir con las normativas del GHS; cambios en los detalles del instrumento y declaración de Limitaciones del uso del producto.	Febrero 2019
HB-0101-006, R3	Corrección del nombre del kit en la tabla de contenidos del kit, pág. 5.	Enero 2020
HB-0101-007, R4	Se ha añadido QIAcube Connect MDx al protocolo automatizado; se ha actualizado el idioma para incluir las referencias a QIAcube Connect MDx; se han actualizado los números de tablas,páginas y figuras.	Diciembre de 2020

PreAnalytiX en el mundo

Los productos de PreAnalytiX son distribuidos por las empresas QIAGEN y BD

QIAGEN: Servicio de atención al cliente sobre pedidos www.QIAGEN.com/shop | Asistencia técnica support.qiagen.com | Página web www.qiagen.com

BD: Servicio de atención al cliente

Argentina, Uruguay and Paraguay
Orders: 0800.444.5523
E-mail: crc_argentina@bd.com

Australia
Orders: 1.800.656.100
Fax: 1.800.656.110
E-mail: bd_anz@bd.com

Austria
Orders: 43.1.7063660
Fax: 43.1.706366011
E-mail: customercare.at@bd.com

Belgium
Orders: 32.53.720.556
Fax: 32.53.720.549
E-mail: orders.be@bd.com

Brazil
Orders: 0800.055.56.54
E-mail: consultoria_vacutainer@bd.com

Canada
Technical support: 1.800.631.0174
Orders: 1.866.979.9408
Fax: 1.800.565.0897
E-mail: customer.service.canada@bd.com

Central and Eastern Europe
Orders: 48.22.377.11.11
Fax: 48.22.377.11.02
Bulgaria orders: info_bulgaria@bd.com
Czech Republic orders: info_czech@bd.com
Croatia orders: info_croatia@bd.com
Hungary orders: info_hungary@bd.com
Poland orders: info_poland@bd.com
Romania orders: info_romania@bd.com
Southeast Europe orders: info_balkan@bd.com
Serbia orders: info_serbia@bd.com
Slovakia orders: info_slovakia@bd.com
Slovenia orders: info_slovenia@bd.com

Denmark
Orders: 45.43.43.45.66
Fax: 45.43.96.56.76
Orders: ordre.dk@bd.com
Technical support: bddenmark@bd.com

Finland
Orders: 358.9.88.70.780
Fax: 358.9.88.70.7816
Orders: tilaukset.fi@bd.com
E-mail: bdsuomi@bd.com

France
Orders: 33.476.68.36.36
Fax: 33.476.68.36.93
E-mail: serviceclientbdf@bd.com
Orders: commandesfr@bd.com
Technical support: vacutainerfr@bd.com

Germany
Orders: 49.6221.3050
Fax: 49.6221.305.216
E-mail: customercare.de@bd.com

India
Orders: 91.124.3949390
Orders: bd_india@bd.com

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

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

Italy
Orders: 39.02.48240.500
Fax: 39.02.48240.775
Technical support: 39.3450655140
E-mail: ordini.it@bd.com

Middle East & Africa

Orders: 971.45.592.555
Fax: 971.45.592.599
E-mail: EMA_PAS@bd.com

The Netherlands

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

New Zealand

Orders: 0800.572.468
Fax: 0800.572.469
E-mail: nz_customerservice@bd.com

Norway

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

Southeast Asia

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

South Korea

Orders: 02.3404.3706
Fax: 02.3404.3785
Technical: 02.3404.3706
Technical support: Korea_PAS@bd.com

Spain, Portugal and Andorra

Orders: 34.91.848.8174
Customer support: 34.902.27.17.27
Fax: 34.91.848.8115
E-mail: info.spain@bd.com

Sweden

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

Switzerland

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

UK

Orders: 0800.917.8776
E-mail: bduk_customerservice@bd.com

USA

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

