

2020. gada decembris

PAXgene® Blood RNA Kit rokasgrāmata

2. versija



50 (kataloga nr. 762174)

R4 **MAT** 1122120LV

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Ražotājs: QIAGEN GmbH pēc PreAnalytiX pasūtījuma

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

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

Komplekti PAXgene Blood RNA Kit nav pieejami visās valstīs; lūdzu, jautājiet.

Ierobežots licences līgums

Šī produkta izmantošana apliecina katra PAXgene Blood RNA Kit pircēja vai lietotāja piekrišanu tālāk minētajiem nosacījumiem.

1. PAXgene Blood RNA Kit drīkst izmantot tikai saskaņā ar norādījumiem *PAXgene Blood RNA Kit rokasgrāmatā* un tikai ar komplektā iekļautajiem komponentiem. Uzņēmums PreAnalytiX nepiešķir nekāda veida licenci uz nevienu no tā intelektuālajiem īpašumiem, lai šajā komplektā iekļautos komponentus izmantotu kopā ar jebkādiem komponentiem, kas nav iekļauti šajā komplektā, vai ar tiem apvienotu, izņemot gadījumus, kas aprakstīti *PAXgene Blood RNA Kit rokasgrāmatā* un papildu protokolos, kas pieejami vietnē www.preanalytix.com.
2. Izņemot skaidri norādītās licences, uzņēmums PreAnalytiX nesniedz citas garantijas, ka šis komplekts un/vai tā lietošana nepārkāpj trešo pušu tiesības.
3. Šis komplekts un tā sastāvdaļas ir licencētas vienreizējai lietošanai, un tās nedrīkst izmantot atkārtoti, atjaunot vai pārdot tālāk.
4. Uzņēmums PreAnalytiX īpaši atsakās no jebkādam citām tiesām vai netiešām licencēm, kas nav skaidri norādītas.
5. Komplekta pircējs un lietotājs piekrīt neveikt un neatļaut citiem veikt nekādas darbības, kas varētu izraisīt vai veicināt jebkuras no iepriekš aizliegtajām darbībām.
6. Uzņēmums PreAnalytiX var pieprasīt šī ierobežotā licences līguma aizliegumu īstenošanu jebkurā tiesā un apņemas atgūt visus savus izmeklēšanas un tiesas izdevumus, ieskaitot advokātu honorārus, kas radušies, īstenojot šī ierobežotā licences līguma nosacījumus vai jebkuru no uzņēmuma intelektuālā īpašuma tiesībām saistībā ar komplektu un/vai tā komponentiem.

Jaunākos licences nosacījumus skatiet tīmekļa vietnē www.preanalytix.com.

Pārdošanas nosacījumi

Uz šo produktu attiecas licence atbilstoši noteiktām US-7,270,953, un US-7,682,790, kā arī EP-1820793 B1 (un šo patentu prasību ārvalstu ekvivalentu) prasībām lietot šo produktu, lai apstrādātu nukleīnskābju kompleksu, kas izveidots, savācot paraugu stobriņā PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, visas tiesības paturētas.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Šveice

www.preanalytix.com

PreAnalytiX izplatītāji

PreAnalytiX produktus ražo un izplata QIAGEN vai BD pēc PreAnalytiX pasūtījuma.

Uzņēmumā PreAnalytiX GmbH produktus nevar pasūtīt.


Vietējā PreAnalytiX izplatītāja kontaktinformāciju skatiet pēdējā lappusē.

Saturs

Komplekta saturs.....	5
Simboli.....	6
Uzglabāšanas apstākļi.....	7
Paredzētais lietojums	8
Produkta lietošanas ierobežojumi.....	8
Kvalitātes kontrole	9
Tehniskā palīdzība	9
Drošības informācija.....	9
Ievads.....	13
Princips un procedūra	13
Paraugu savākšana un stabilizācija	14
RNS koncentrēšana un izdalīšana	19
Manuāla RNS izdalīšana.....	19
Automatizēta RNS izdalīšana.....	29
Aprīkojums un reaģenti, ko nodrošina lietotājs	38
Svarīgas piezīmes	40
QIAcube instrumentu lietošana	40
Protokolu instalēšana QIAcube instrumentos.....	43
QIAcube instrumentu uzpildīšana	44
Protokols: manuāla summārās RNS izdalīšana no PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinīm	54

Protokols: automatizēta summārās RNS izdalīšana no PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinīm	62
Problēmu novēršanas ceļvedis.....	70
A pielikums. Vispārīgas piezīmes par darbu ar RNS	73
B pielikums. Summārās RNS kvantifikācija un kvalitātes noteikšana	74
C pielikums. Darbs ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT)	76
Informācija par pasūtīšanu	77
Rokasgrāmatas pārskatījumu vēsture	79

Komplekta saturs

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Kataloga nr.			762174
Sagatavju skaits			50
BR1	Resuspension Buffer (Resuspendēšanas buferšķīdums)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Fiksācijas buferšķīdums)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Skalošanas buferšķīdums 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (Skalošanas buferšķīdums 2 (koncentrāts))†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Eluēšanas buferšķīdums)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (Ūdens, kas nesatur RNāzi (pudele))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (Proteināze K (ar zaļu vāciņu))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (PAXgene RNA centrifūgas stobriņi (sarkani))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Apstrādes stobriņi (2 ml))	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Sekundārās BD Hemogard™ aizdares)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Mikrocentrifūgas stobriņi (1,5 ml))	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNāze I bez RNāzes (liofilizēta))	DNA REM	1500 Kunitz vienības*
RDD	DNA Digestion Buffer (DNS noārdīšanas buferšķīdums (ar baltu vāciņu))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (DNāzes resuspendēšanas buferšķīdums (stobriņā, ar violetu vāciņu))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (PAXgene Shredder centrifūgas stobriņi (violeti))	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Rokasgrāmata	PAXgene Blood RNA Kit rokasgrāmata (2. versija)		1

* Nav saderīgs ar dezinfekcijas reaģentiem, kuri satur balinātāju. Satur guanidīna sāli. Drošības informāciju skatiet 10. lpp.

† Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts koncentrāta veidā. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet 4 reizes lielāku tilpumu etanola (96–100% tīrības pakāpe p.a.), lai iegūtu darba šķīdumu (ievērojiet norādījumus uz pudeles).

Simboli



Satur reaģentus, kuru daudzums ir pietiekams <N> testu veikšanai



Skatīt lietošanas instrukcijas



Izlietot līdz



In vitro diagnostikas medicīnas ierīce



Kataloga numurs



Partijas numurs



Materiāla numurs



Komponenti



Numurs



Sterilizācijai izmantota apstarošana



Kunitz vienības



Jāpievieno



Satur












Pagatavots šķīdums



Dezoksiribonukleāze I

* Kunitz vienības parasti tiek izmantotas DNāzes I mērīšanai, un tās ir definētas kā DNāzes I daudzums, kas rada A_{260} pieaugumu par 0,001 minūtē uz milimetru temperatūrā 25 °C un ar pH 5,0, kā substrātu izmantojot augsti polimerizētu DNS (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 un 363).

	Etanols
	Guanidīna izotiocianāts
	DNāzes komplekts bez RNāzes
	Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs
	Nelietot atkārtoti
	Temperatūras ierobežojums
	Maksimālās temperatūras ierobežojums
	Ražotājs
	Svarīga piezīme

Uzglabāšanas apstākļi

PAXgene RNA centrifūgas stobriņi (PRC), PAXgene Shredder centrifūgas stobriņi (PSC), proteināze K (PK) un buferšķīdumi (BR1, BR2, BR3, BR4 un BR5) ir jāuzglabā sausā vietā temperatūrā, kas norādīta komplekta etiķetē.

DNāzes komplekts bez RNāzes, kas satur DNāzi I (RNFD), DNS noārdīšanas buferšķīdums (RDD) un DNāzes resuspendēšanas buferšķīdums (DRB) tiek piegādāti apkārtējās vides temperatūrā. Visus DNāzes komplekta bez RNāzes komponentus pēc saņemšanas nekavējoties uzglabāji etiķetē norādītajā temperatūrā. Pareizi uzglabājot, komplekts ir stabils līdz derīguma termiņam, kas norādīts uz komplekta kārbas.

Paredzētais lietojums

Sistēma PAXgene Blood RNA System sastāv no asins parauga ņemšanas stobriņa (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) un nukleīnskābju izdalīšanas komplekta (PAXgene Blood RNA Kit). Šī sistēma ir paredzēta asins paraugu ņemšanai, glabāšanai un transportēšanai un intracelulārās RNS stabilizēšanai slēgtā stobriņā, un saimniekorganisma RNS turpmākai izolēšanai un izdalīšanai no pilnasinīm, lai veiktu RT-PCR, ko izmanto molekulārās diagnostikas testēšanā.

Sistēmas PAXgene Blood RNA System veikspējas raksturlielumi ir noteikti tikai ar FOS un IL1B gēnu transkriptiem. Lietotājs ir atbildīgs par attiecīgo sistēmas PAXgene Blood RNA System veikspējas raksturlielumu noteikšanu citiem mērķa transkriptiem.

Lietošanas indikācijas

Komplekts PAXgene Blood RNA Kit ir paredzēts intracelulārās RNS izdalīšanai no pilnasinīm, kas savāktas PAXgene Blood RNA Tube stobriņos (BRT). Ja komplekts tiek lietots kopā ar PAXgene Blood RNA Tube stobriņiem (BRT), sistēma nodrošina RT-PCR paredzētu, no pilnasinīm izdalītu intracelulāru RNS, ko izmanto molekulārās diagnostikas testēšanai.

Produkta lietošanas ierobežojumi

Komplekts PAXgene Blood RNA Kit ir paredzēts intracelulārās RNS izdalīšanai no cilvēka pilnasinīm ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leikocīti/ml) lietošanai *in vitro* diagnostikā. Tas nav paredzēts genomiskas DNS vai vīrusu nukleīnskābju izdalīšanai no cilvēka pilnasinīm. Stabilizācijas specififikācijām ir validēts ierobežots skaits transkriptu (FOS un IL1B gēnu transkripti), tāpēc veikspējas raksturlielumi nav noteikti visiem transkriptiem. Lietotājiem ir jāpārskata ražotāja dati un pašu iegūtie dati, lai noteiktu, vai ir jāveic validēšana citiem transkriptiem.

Šo produktu ir paredzēts lietot tikai profesionāliem lietotājiem, piem., laborantiem un ārstiem, kuri ir apmācīti *in vitro* diagnostikas procedūru veikšanā.

Informāciju par PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT) skatiet *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmātā*.

Kvalitātes kontrole

Atbilstoši pēc ISO prasībām sertificētajai QIAGEN Kvalitātes vadības sistēmai katra PAXgene Blood RNA Kit partija ir pārbaudīta, salīdzinot ar iepriekš noteiktiem parametriem, lai nodrošinātu nemainīgu produkta kvalitāti.

Tehniskā palīdzība

Uzņēmums QIAGEN lepojas ar nodrošinātā tehniskā atbalsta kvalitāti un pieejamību. Mūsu tehniskā atbalsta dienesta komandā strādā pieredzējuši zinātnieki ar plašu praktisku un teorētisko pieredzi molekulārajā bioloģijā un PreAnalytiX produktu izmantošanā. Ja jums ir jebkādi jautājumi par PAXgene Blood RNA Kit, lūdzu, sazinieties ar mums.

Lai saņemtu tehnisko palīdzību un plašāku informāciju, lūdzu, zvaniet QIAGEN tehniskā atbalsta dienestam.

Drošības informācija

ES — par visiem ar šo ierīci saistītajiem nopietnajiem incidentiem lietotājiem ir jāziņo ražotājam un valsts kompetentajai iestādei. Ārpus ES — par visiem ar šo ierīci saistītajiem incidentiem vai jautājumiem sazinieties ar vietējo QIAGEN pārstāvi.

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles.

Lai izvairītos no infekciju (piem., ar HIV vai B hepatīta vīrusiem) vai traumu riska, strādājot ar bioloģiskiem un ķīmiskiem materiāliem, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai iegūtu papildinformāciju, skatiet attiecīgās drošības datu lapas (DDL). Tās ērtā un kompaktā PDF formātā pieejamas vietnē www.preanalytix.com, kur var atrast, apskatīt un izdrukāt šī komplekta DDL.

UZMANĪBU!



Paraugu savienošanas atkritumiem NEDRĪKST tieši pievienot balinātāju vai skābju šķīdumus.

Fiksācijas buferšķīdums (BR2) un skalošanas buferšķīdums 1 (BR3) satur guanidīna tiocianātu, kurš ar balinātāju var veidot augsti reaktīvus savienojumus. Ja fikācijas buferšķīdums (BR2) vai skalošanas buferšķīdums 1 (BR3) izšļakstās, tīriet ar atbilstošu laboratorijas mazgāšanas līdzekli un ūdeni. Ja izšļakstās šķīdums, kas satur potenciāli infekciozas vielas, skarto apgabalu vispirms notīriet ar laboratorijas mazgāšanas līdzekli un ūdeni un pēc tam ar 1% (tilpumkoncentrācija) nātrija hipohlorītu (balinātāju).

RNS stabilizācijas šķīduma un asiņu maisījumu no PAXgene Blood RNA Tube stobriņiem (BRT) var dezinficēt, izmantojot 1 tilpumu rūpnieciskā balinātāja šķīduma (5% nātrija hipohlorīta) uz 9 tilpumiem RNS stabilizācijas šķīduma un asiņu maisījuma.

Paraugu sagatavošanas atkritumi, piemēram, supernatanti no centrifugēšanas darbībām RNS izdalīšanas procedūrā, ir jāuzskata par potenciāli infekcioziem. Pirms utilizēšanas atkritumi ir jāapstrādā autoklāvā vai jāsadedzina, lai iznīcinātu visus infekciozos materiālus. Utilizācija ir jāveic atbilstoši spēkā esošajiem noteikumiem.

Tālāk norādītie riska un piesardzības pasākumu paziņojumi attiecas uz PAXgene Blood RNA Kit komponentiem. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) drošības informāciju skatiet *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmātā*.

Bufēršķidrums BR2



Satur: guanidīna tiocianātu. Bīstami! Kaitīgs, ja norij. Var būt kaitīgs, saskaroties ar ādu vai ieelpojot. Izraisa smagas acu traumas. Kaitīgs ūdens organismiem ar ilglaicīgām sekām. Saskarē ar skābēm izdalās ļoti toksiska gāze. Izmantot aizsargcimdus/aizsargapģērbu/ acu aizsargus/sejas aizsargus. JA IEKĻŪST ACĪS: uzmanīgi skalot ar ūdeni vairākas minūtes. Izņemt kontaktlēcas, ja tās ir ievietotas un ja to ir viegli izdarīt. Turpināt skalot. Nekavējoties sazinieties ar SAINDĒŠANĀS INFORMĀCIJAS CENTRU vai ārstu/ģimenes ārstu.

Bufēršķidrums BR3



Satur: etanolu un guanidīna tiocianātu. Bīstami! Uzliesmojošs šķidrums un tvaiki. Izraisa smagas acu traumas. Saskarē ar skābēm izdalās ļoti toksiska gāze. Sargāt no karstuma/dzirkstelēm/atklātas liesmas/karstām virsmām. Nesmēķēt. Izmantot aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu aizsargus/sejas aizsargus. JA IEKĻŪST ACĪS: uzmanīgi skalot ar ūdeni vairākas minūtes. Izņemt kontaktlēcas, ja tās ir ievietotas un ja to ir viegli izdarīt. Turpināt skalot. Nekavējoties sazinieties ar SAINDĒŠANĀS INFORMĀCIJAS CENTRU vai ārstu/ģimenes ārstu.

DNāze I



Satur: DNāzi. Bīstami! Var izraisīt alerģisku ādas reakciju. Ja ieelpo, var izraisīt alerģiju vai astmas simptomus vai apgrūtināt elpošanu. Izvairīties ieelpot putekļus/tvaikus/gāzi/dūmus/izgarojumus/smīdzinājumu. Izmantot aizsargcimdus/aizsargapģērbus/acu aizsargus/sejas aizsargus. Lietot elpošanas orgānu aizsargierīces. JA ir bijusi saskare vai ir aizdomas par to: Zvaniet uz SAINDĒŠANĀS CENTRU vai ārstam/ģimenes ārstam. Pārvietot cietušo svaigā gaisā un novietot mierīgā pozīcijā, kurā nav apgrūtināta elpošana.

Proteināze K



Satur: proteināzi K. Bīstami! Izraisa mērenu ādas kairinājumu. Ja ieelpo, var izraisīt alerģiju vai astmas simptomus vai apgrūtināt elpošanu. Izvairīties ieelpot putekļus/tvaikus/gāzi/dūmus/izgarojumus/smīdzinājumu. Izmantot aizsargcimdus/aizsargapģērbus/acu aizsargus/sejas aizsargus. Lietot elpošanas orgānu aizsargierīces. JA ir bijusi saskare vai ir aizdomas par to: Zvaniet uz SAINDĒŠANĀS CENTRU vai ārstam/ģimenes ārstam. Pārvietot cietušo svaigā gaisā un novietot mierīgā pozīcijā, kurā nav apgrūtināta elpošana.

Ievads

Pilnasiņu savākšana ir pirmā darbība daudzās molekulārās analizēs, ko izmanto šūnu RNS izpētei. Tomēr nozīmīga problēma šādos eksperimentos ir šūnu RNS profila nestabilitāte *in vitro*. PreAnalytiX veiktos pētījumos ir pierādīts, ka, glabājot un transportējot istabas temperatūrā, atsevišķu mRNS veidu kopiju skaits pilnasinīs var mainīties vairāk nekā tūkstoškārtīgi.* To izraisa gan strauja RNS noārdīšanās, gan noteiktu gēnu inducēta ekspresija pēc asiņu paņemšanas. Šādu RNS ekspresijas profila izmaiņu dēļ nav iespējams veikt uzticamus pētījumus par gēnu ekspresiju. Tāpēc, lai varētu precīzi analizēt gēnu ekspresiju cilvēka pilnasinīs, ir nepieciešama metode, kas saglabā RNS ekspresijas profilu flebotomijas laikā un pēc tās.

Princips un procedūra

Uzņēmums PreAnalytiX ir izstrādājis sistēmu, kura sniedz iespēju vākt, stabilizēt, glabāt un transportēt cilvēka pilnasiņu paraugus, kā arī nodrošina ātru un efektīvu protokolu intracelulārās RNS izdalīšanai. Sistēmā asiņu savākšanai un RNS stabilizācijai ir jāizmanto PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT; ASV patenti 6,602,718 un 6,617,170) un pēc tam manuāli vai automatizēti jāveic RNS izdalīšana, izmantojot komplektu PAXgene Blood RNA Kit. Gan manuālais, gan automatizētais protokols nodrošina būtībā līdzvērtīgu veiktspēju attiecībā uz RNS kvalitāti un daudzumu. Manuālā protokola (22.–29. lpp.) un automatizētā protokola (31.–35. lpp.) veiktspējas dati ir iekļauti šajā rokasgrāmatā.



Ierīce QIAGEN QIAcube Connect MDx nav pieejama visās valstīs. Lai saņemtu plašāku informāciju, lūdzu, sazinieties ar QIAGEN tehniskā atbalsta dienestu.

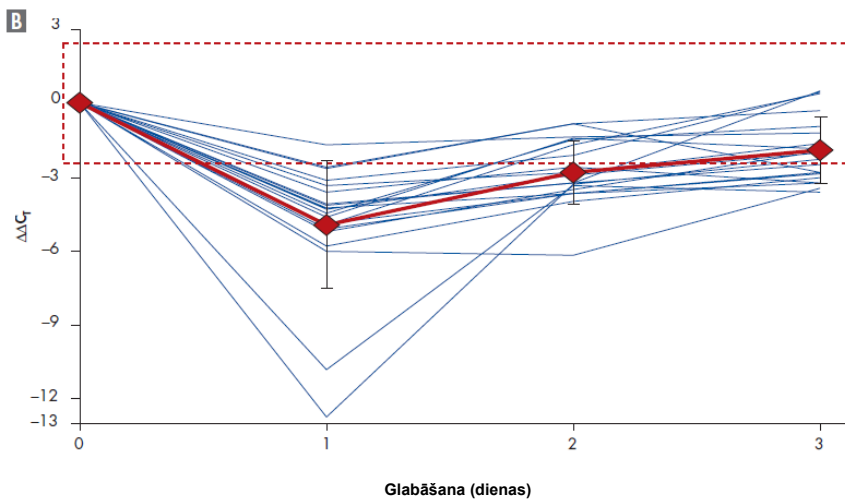
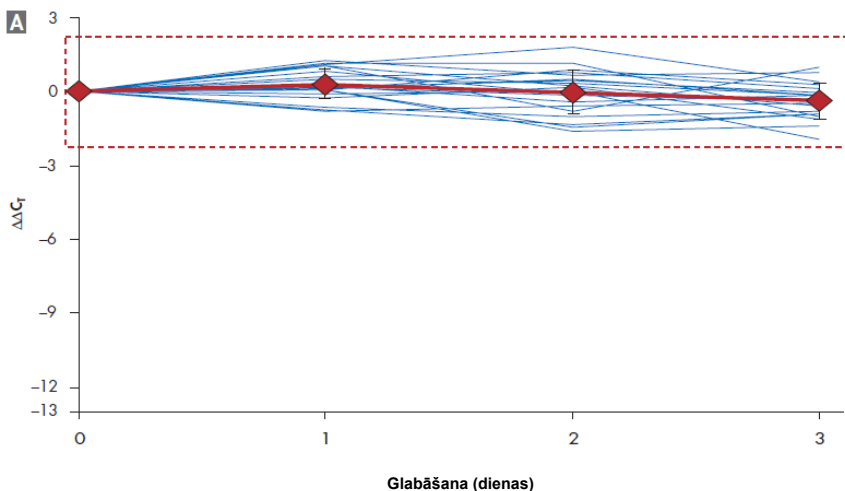
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Paraugu savākšana un stabilizācija

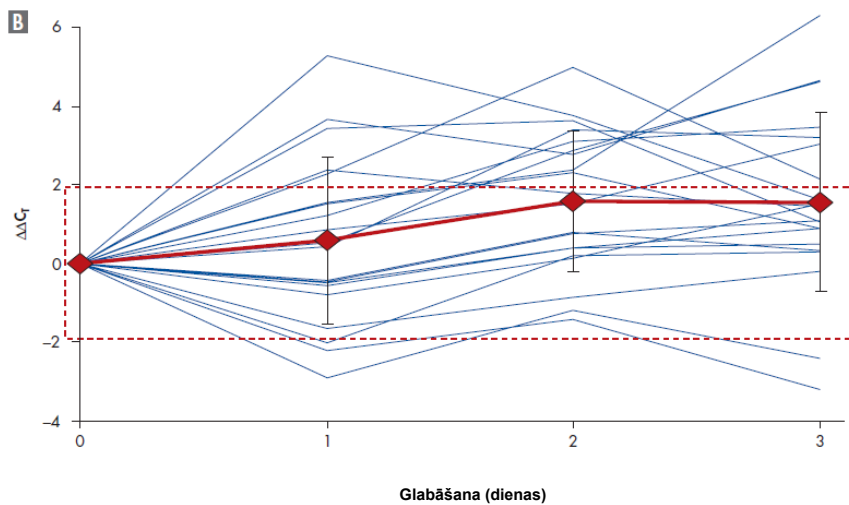
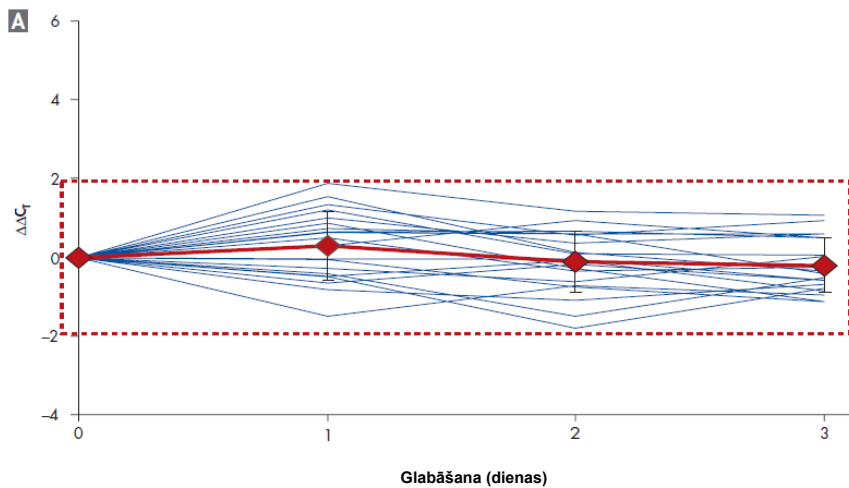
PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT) satur patentētu reaģentu maisījumu, kura pamatā ir patentēta RNS stabilizācijas tehnoloģija. Šis reaģentu maisījums novērš RNāžu izraisītu RNS molekulu noārdīšanos un minimizē *ex vivo* gēnu ekspresijas izmaiņas. PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT) ir paredzēti cilvēka pilnasiņu vākšanai un šūnu RNS stabilizēšanai maks. 3 dienas temperatūrā 18–25 °C (1. un 2. attēls 15. un 16. lpp.) vai maks. 5 dienas temperatūrā 2–8 °C (3. un 4. attēls 17. un 18. lpp.). Pašlaik pieejamie dati uzrāda šūnu RNS stabilizāciju vismaz 11 gadus –20 °C vai –70 °C temperatūrā*. Lai saņemtu plašāku informāciju par notiekošajiem pētījumiem, kuros tiek novērtēta stabilitāte ilgstošos laika periodos, lūdzu, sazinieties ar QIAGEN tehniskā atbalsta dienestu.

Faktiskais RNS stabilizācijas ilgums var atšķirties atkarībā no šūnu RNS veida un izmantotā lejupvērsta lietojuma. Stabilizācijas specifikācijām ir validēts ierobežots skaits transkriptu (FOS un IL1B gēnu transkripti), tāpēc veikspējas raksturlielumi nav noteikti visiem transkriptiem. Lietotājiem ir jāpārskata ražotāja dati un pašu iegūtie dati, lai noteiktu, vai ir jāveic validēšana citiem transkriptiem.

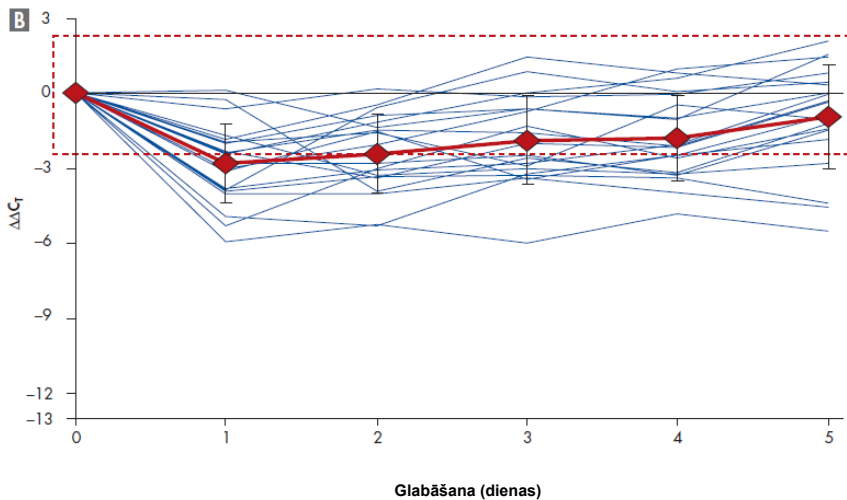
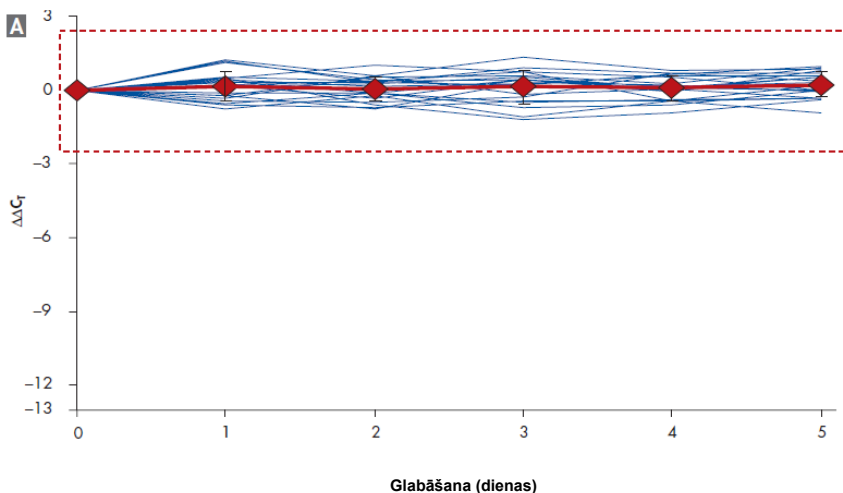
* Pašlaik turpinās ilgtermiņa pētījums par asiņu glabāšanu PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos.



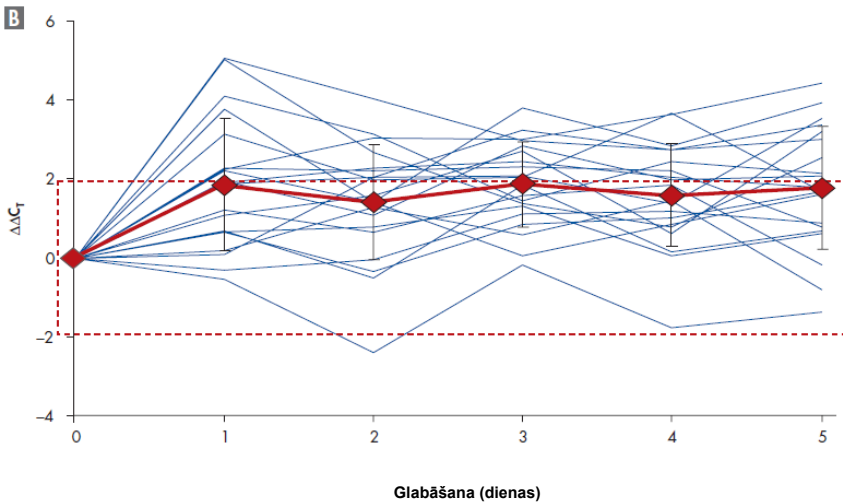
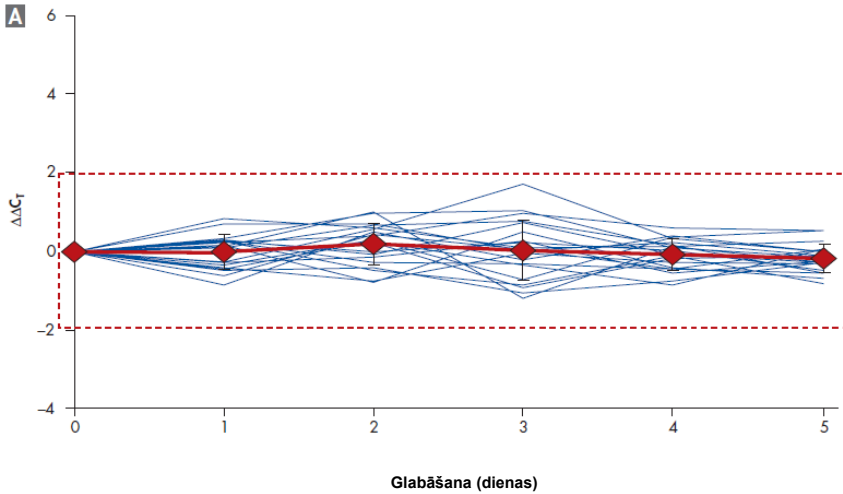
1. attēls. RNS stabilitāte asins paraugos 18–25 °C temperatūrā: FOS. Asinis tika ņemtas no 10 donoriem, no katra paņemot divus paraugu eksemplārus, un tās tika 18–25 °C temperatūrā glabātas norādīto dienu skaitu; pēc tam tika izdalīta summārā RNS. **[A]** Asinis tika savāktas un uzglabātas PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT), un summārā RNS tika izdalīta, izmantojot komplektu PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Asinis tika savāktas un uzglabātas standarta asins paraugu savākšanas stobriņos, kā antikoagulantu izmantojot EDTA, un summārā RNS tika izdalīta, izmantojot standarta organiskās ekstrakcijas metodi, kuras pamatā ir RNS attīrīšana ar kvarca membrānu. Relatīvie FOS transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības, un ir parādītas vidējās vērtības un standartnovirze. Pārtrauktās līnijas norāda analīzes $\pm 3x$ kopējo precizitāti ($2,34 C_t$).



2. attēls. RNS stabilitāte asins paraugos 18–25 °C temperatūrā: IL1B. Asinis tika ņemtas un summārā RNS tika izdalīta pēc glabāšanas 18–25 °C temperatūrā, kā aprakstīts 1. attēlā. Relatīvie IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības, un ir parādītas vidējās vērtības un standartnovirze. Pārtrauktās līnijas norāda analīzes $\pm 3x$ kopējo precizitāti ($1,93 C_T$).



3. attēls. RNS stabilitāte asins paraugos 2–8 °C temperatūrā: FOS. Asinis tika ņemtas no 10 donoriem, no katra paņemot divus parauga eksemplārus, un tās tika 2–8 °C temperatūrā glabātas norādīto dienu skaitu; pēc tam tika izdalīta summārā RNS. **[A]** Asinis tika savāktas un uzglabātas PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT), un summārā RNS tika izdalīta, izmantojot komplektu PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Asinis tika savāktas un uzglabātas standarta asins paraugu savākšanas stobriņos, kā antikoagulantu izmantojot EDTA, un summārā RNS tika izdalīta, izmantojot standarta organiskās ekstrakcijas metodi, kuras pamatā ir RNS attīrīšana ar kvarca membrānu. Relatīvie FOS transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplitonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības, un ir parādītas vidējās vērtības un standartnovirze. Pārtrauktās līnijas norāda analīzes $\pm 3x$ kopējo precizitāti ($2,34 C_t$).



4. attēls. RNS stabilitāte asins paraugos 2–8 °C temperatūrā: IL1B. Asinis tika ņemtas un summārā RNS tika izdalīta pēc glabāšanas 2–8 °C temperatūrā, kā aprakstīts 3. attēlā. Relatīvie IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplitonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības, un ir parādītas vidējās vērtības un standartnovirze. Pārtrauktās līnijas norāda analīzes $\pm 3x$ kopējo precizitāti (1,93 C_T).

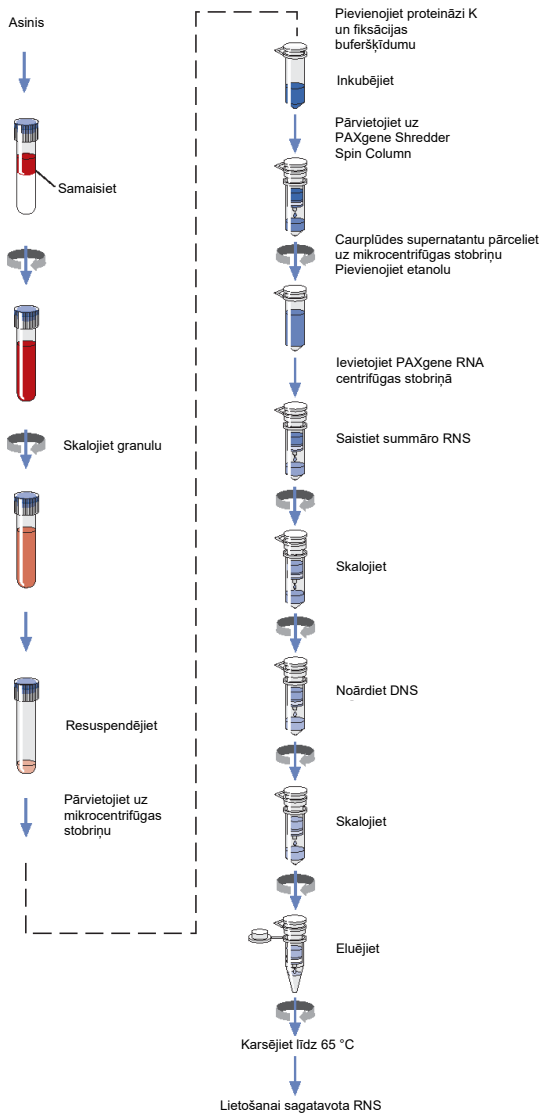
RNS koncentrēšana un izdalīšana

Komplekts PAXgene Blood RNA Kit ir paredzēts summārās RNS izdalīšanai no 2,5 ml cilvēka pilnasiņu, kas savāktas PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT). Process ir vienkāršs, un to var veikt, izmantojot manuālās vai automatizētās procedūras (sk. 5. un 10. attēlu 20. un 30. lpp.). Abos protokolos izdalīšana sākas ar centrifugēšanas darbību, lai granulētu nukleīnskābes PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT). Granula tiek skalota un resuspendēta, un pēc tam tiek veikta manuāla vai automatizēta RNS izdalīšana. Abos protokolos būtībā tiek veiktas vienādas protokola darbības ar vieniem un tiem pašiem komplekta komponentiem.

Manuāla RNS izdalīšana

Detalizēts skaidrojums: resuspendētā granula tiek inkubēta optimizētos buferšķīdumos kopā ar proteināzi K (PK), lai izraisītu proteīnu noārdīšanu. Tiek veikta papildu centrifugēšana ar PAXgene Shredder centrifūgas stobriņu (PSC), lai homogenizētu šūnu lizātu un noņemtu šūnu atliekas, un caurplūdes frakcijas supernatants tiek pārvietots uz jaunu mikrocentrifūgas stobriņu. Tiek pievienots etanols, lai pielāgotu saistīšanās apstākļus, un lizāts tiek ievietots PAXgene RNA centrifūgas stobriņā (PRC). Veicot īsu centrifugēšanu, RNS selektīvi saistās ar PAXgene kvarca membrānu, bet kontaminanti izplūst tai cauri. Atlikušie kontaminanti tiek noņemti, veicot vairākas efektīvas skalošanas darbības. Starp pirmo un otro skalošanas darbību membrāna tiek apstrādāta ar DNāzi I (RNFD), lai noņemtu DNS, kas nelielā daudzumā ir saistījusies. Pēc skalošanas darbībām RNS tiek eluēta eluēšanas buferšķīdumā (BR5) un denaturēta karstuma ietekmē.

Summārā RNS, kas izolēta, izmantojot PAXgene Blood RNA System, ir tīra. Izmantojot manuālo protokolu, A_{260}/A_{280} vērtības ir no 1,8 līdz 2,2, bet $\geq 95\%$ visu paraugu ir atrodams $\leq 1\%$ (masas daļa) genomiskās DNS, kā noteikts kvantitatīvā beta-aktīna gēna sekvences real-time PCR. Vismaz 95% paraugu neuzrāda inhibīciju RT-PCR procesā, izmantojot līdz pat 30% eluāta.

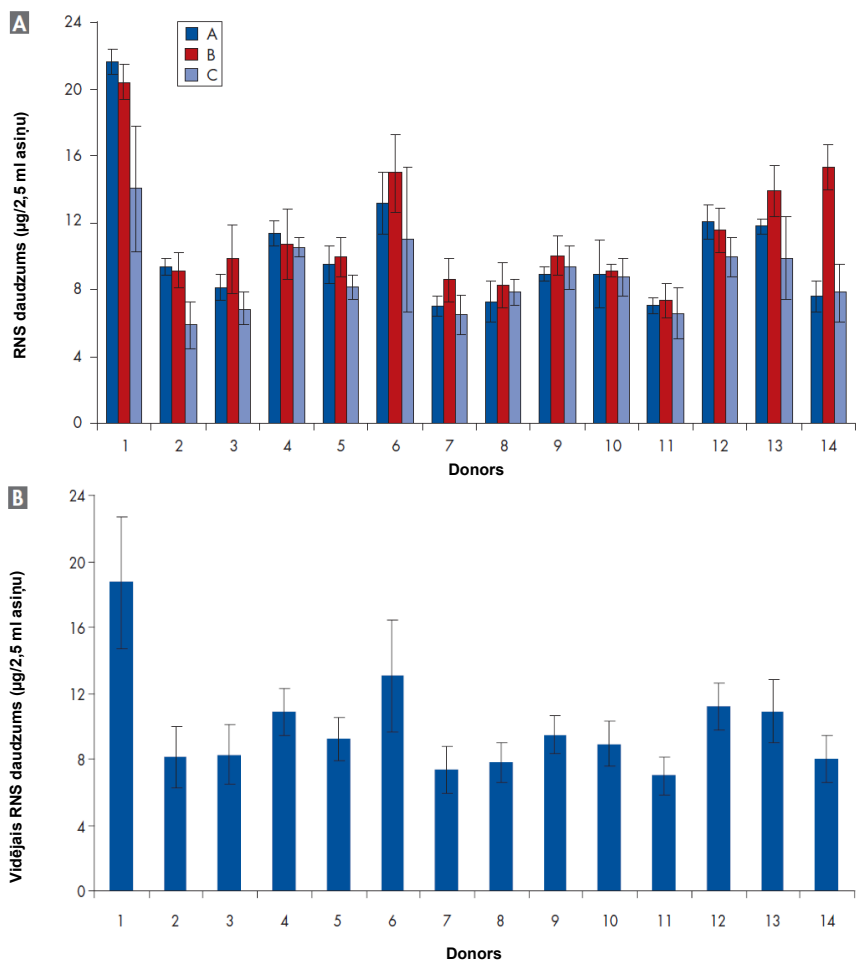


5. attēls. PAXgene Blood RNA manuālā procedūra.

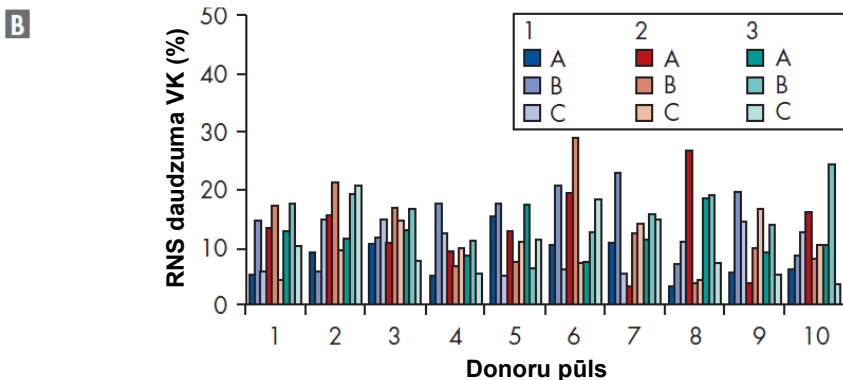
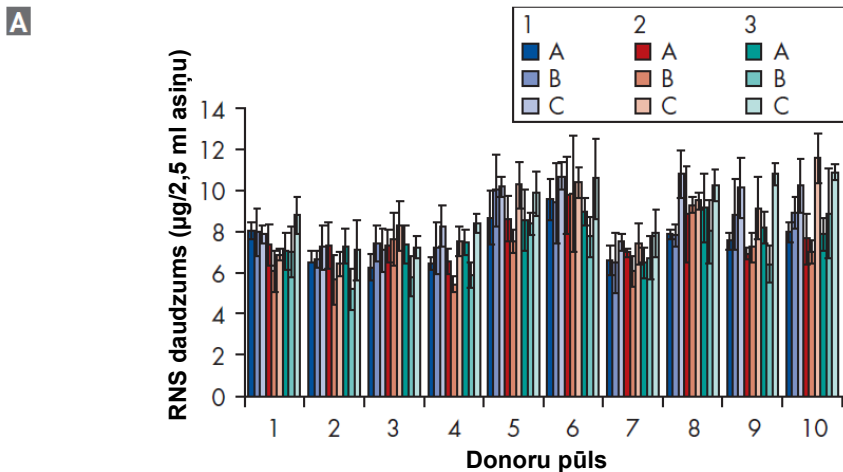
Izmantojot manuālo protokolu, vidējais parauga sagatavošanas laiks (balstoties uz datiem no 12 paraugu sagatavošanas izpildes reizēm) ir aptuveni 90 minūtes*, un roku darba laiks ir tikai 40 minūtes. Iegūtais RNS daudzums no 2,5 ml vesela cilvēka pilnasiņu $\geq 95\%$ apstrādāto paraugu ir $\geq 3 \mu\text{g}$. Iegūtais daudzums ir lielā mērā atkarīgs no donora, tāpēc daudzums katrā atsevišķā gadījumā var atšķirties. Atsevišķiem donoriem PAXgene Blood RNA System nodrošina augsti reproducējamu un atkārtojamu iegūto daudzumu (6. un 7. attēls 22. un 23. lpp.) un reproducējamu un atkārtojamu RT-PCR (8. un 9. attēls 27. un 28. lpp.), tādēļ tas ir ļoti noturīgs klīniskiem diagnostiskiem izmeklējumiem.

6. attēlā (22. lpp.) ir parādīta sistēmas PAXgene Blood RNA System kopējā atkārtojamība un reproducējamība. Tika veikti papildu pētījumi, lai parādītu dažādu komplekta PAXgene Blood RNA Kit partiju un dažādu operatoru ietekmi uz iegūtā RNS daudzuma un reālā laika RT-PCR izpildes reproducējamību. Šiem pētījumiem tika izmantoti apkopoti asins paraugi, nevis individuāli PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT), tāpēc rezultāti neatspoguļo sistēmas atkārtojamību, ieskaitot atšķirības starp atsevišķām asins paraugu ņemšanas reizēm, bet gan tikai paraugu sagatavošanas atkārtojamību (sk. 7. attēlu 23. lpp.).

* Kopējais protokola izpildlaiks, ieskaitot PAXgene Blood RNA Tubes stobriņu iepriekšēju apstrādi (centrifugēšanas, granulas skalošanu un granulas resuspendēšanu).



6. attēls. Reproducējama un atkārojama RNS izdalīšana. No 14 donoriem iegūtas asins paraugus četros eksemplāros katru manuāli apstrādāja 3 tehniķi (A, B, C). Tika izmantoti trīs aprīkojuma komplekti, un visi viena tehniķa sagatavotie paraugi tika apstrādāti, izmantojot vienu un to pašu aprīkojumu. **[A]** Parādītas iegūtās RNS daudzuma vidējās vērtības un standartnovirze katram atkārtotajam paraugam no vieniem un tiem pašiem donoriem un atšķirīgiem tehniķiem. **[B]** Divpadsmit atkārtotus asins paraugus no katra no 14 donoriem apstrādāja 3 dažādi tehniķi. Parādītas RNS daudzuma vidējās vērtības un standartnovirze katram paraugam no vieniem un tiem pašiem donoriem un visiem tehniķiem. Visiem RNS paraugiem A_{260}/A_{280} attiecība bija no 1,8 līdz 2,2.



7. attēls. Iegūtā RNS daudzums atkārtojamība un reproducējamība atšķirīgiem operatoriem un komplekta PAXgene Blood RNA Kit partijām, izmantojot apkopotus asins paraugus. PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) tika savākti asins paraugi no 30 dažādiem donoriem (12 stobriņi no katra donora, kopā 360 stobriņi). Stobriņu saturs no 3 donoriem tika apkopots un pēc tam atkārtoti sadalīts alikvotos 36 paraugos. Šos 36 paraugus no 3 donoru pūla manuāli apstrādāja 3 dažādi operatori. Katrs operators ekstrakcijai izmantoja 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas un apstrādāja četrus paraugu eksemplārus no katra no 10 donoru pūliem. **[A]** RNS daudzums un standartnovirze katrai operatora–partijas kombinācijai. Četrus asins paraugu eksemplārus no 10 donoru pūliem apstrādāja 3 dažādi operatori (A, B, C) ar katru no 3 komplekta partijām (1, 2, 3). Parādītas iegūtā daudzuma vidējās vērtības (kolonnas) un standartnovirze (kļūdu stabiņi) četriem paraugu eksemplāriem no viena un tā paša donoru pūla dažādiem operatoriem un dažādām komplekta partijām. **[B]** 7.A attēlā ir parādīts iegūtā RNS daudzuma variācijas koeficients (VK) katram donoru pūlam visām operatora–partijas kombinācijām (A, B, C; 1, 2, 3), aprēķinot pēc iegūtā daudzuma vidējās vērtības un standartnovirzes (SN).

1.A tabula. Reproducējamība katras partijas ietvaros un katram lietotājam izvēlētajos donoru pūlos (1, 6, 9, 10)

Datu kombinācija	1. donoru pūls 5,1 x 10 ⁶ šūnas/ml			6. donoru pūls 6,5 x 10 ⁶ šūnas/ml		
	Vidējais			Vidējais		
	daudzums (µg)	SN (µg)	VK (%)	daudzums (µg)	SN (µg)	VK (%)
1. partija, lietotājs A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
1. partija, lietotājs B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
1. partija, lietotājs C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
2. partija, lietotājs A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
2. partija, lietotājs B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
2. partija, lietotājs C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
3. partija, lietotājs A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
3. partija, lietotājs B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
3. partija, lietotājs C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Datu kombinācija	9. donoru pūls 8,4 x 10 ⁶ šūnas/ml			10. donoru pūls 10,2 x 10 ⁶ šūnas/ml		
	Vidējais			Vidējais		
	daudzums (µg)	SN (µg)	VK (%)	daudzums (µg)	SN (µg)	VK (%)
1. partija, lietotājs A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
1. partija, lietotājs B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
1. partija, lietotājs C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
2. partija, lietotājs A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
2. partija, lietotājs B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
2. partija, lietotājs C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
3. partija, lietotājs A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
3. partija, lietotājs B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
3. partija, lietotājs C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

1.B tabula. Reproducējamība katram lietotājam un starp visām partijām izvēlētajos donoru pūšos (1, 6, 9, 10).

Datu kombinācija	1. donoru pūšs 5,1 x 10 ⁶ šūnas/ml			6. donoru pūšs 6,5 x 10 ⁶ šūnas/ml		
	Vidējais daudzums (µg)	SN (µg)	VK (%)	Vidējais daudzums (µg)	SN (µg)	VK (%)
Lietotājs A, visas partijas	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Lietotājs B, visas partijas	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Lietotājs C, visas partijas	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Datu kombinācija	9. donoru pūšs 8,4 x 10 ⁶ šūnas/ml			10. donoru pūšs 10,2 x 10 ⁶ šūnas/ml		
	Vidējais daudzums (µg)	SN (µg)	VK (%)	Vidējais daudzums (µg)	SN (µg)	VK (%)
Lietotājs A, visas partijas	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Lietotājs B, visas partijas	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Lietotājs C, visas partijas	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

1.C tabula. Reproducējamība katras partijas ietvaros un starp visiem lietotājiem izvēlētajos donoru pūšos (1, 6, 9, 10).

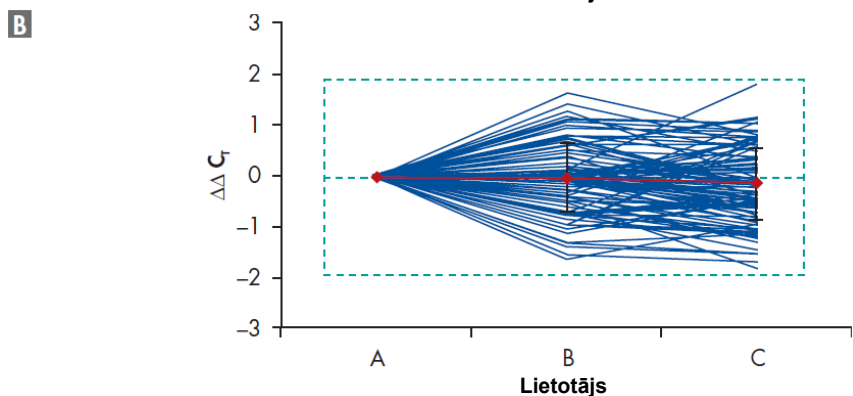
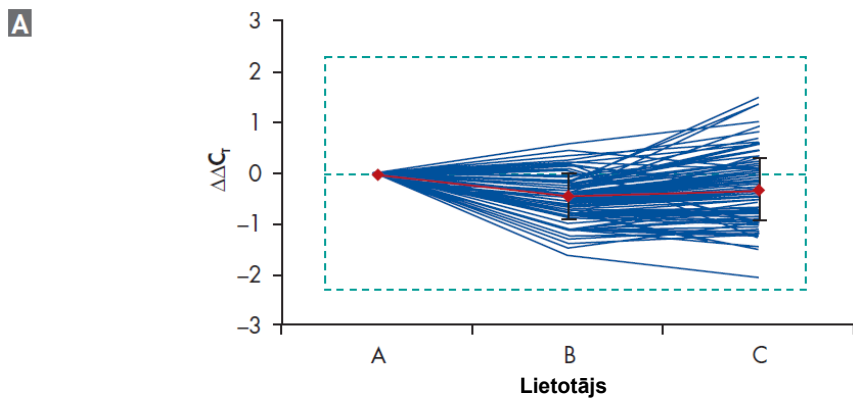
Datu kombinācija	1. donoru pūšs 5,1 x 10 ⁶ šūnas/ml			6. donoru pūšs 6,5 x 10 ⁶ šūnas/ml		
	Vidējais daudzums (µg)	SN (µg)	VK (%)	Vidējais daudzums (µg)	SN (µg)	VK (%)
1. partija, visi lietotāji	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
2. partija, visi lietotāji	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
3. partija, visi lietotāji	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Datu kombinācija	9. donoru pūšs 8,4 x 10 ⁶ šūnas/ml			10. donoru pūšs 10,2 x 10 ⁶ šūnas/ml		
	Vidējais daudzums (µg)	SN (µg)	VK (%)	Vidējais daudzums (µg)	SN (µg)	VK (%)
1. partija, visi lietotāji	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
2. partija, visi lietotāji	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
3. partija, visi lietotāji	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

1.D tabula. Reproducējamība starp visām partijām un visiem lietotājiem izvēlētajos donoru pūšos (1, 6, 9, 10).

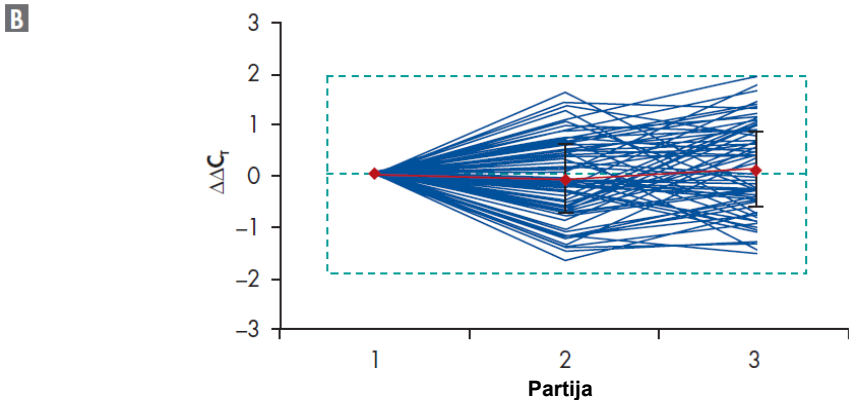
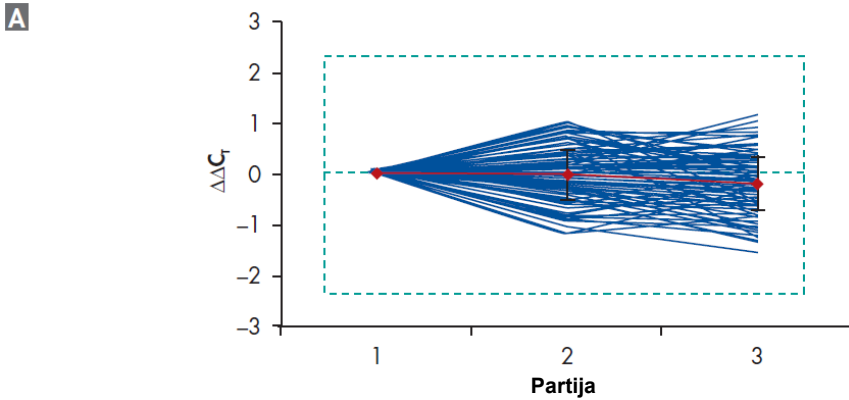
Datu kombinācija	1. donoru pūšs 5,1 x 10 ⁶ šūnas/ml			6. donoru pūšs 6,5 x 10 ⁶ šūnas/ml		
	Vidējais daudzums (μg)	SN (μg)	VK (%)	Vidējais daudzums (μg)	SN (μg)	VK (%)
1. partija, visi lietotāji	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

Datu kombinācija	9. donoru pūšs 8,4 x 10 ⁶ šūnas/ml			10. donoru pūšs 10,2 x 10 ⁶ šūnas/ml		
	Vidējais daudzums (μg)	SN (μg)	VK (%)	Vidējais daudzums (μg)	SN (μg)	VK (%)
1. partija, visi lietotāji	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

4 reprezentatīvo donoru pūšu detalizēta analīze. Šie pūši tika izvēlēti pēc balto asins šūnu skaita un atspoguļo balto asins šūnu skaita standarta diapazona augstāko, vidējo un zemāko vērtību ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leikocīti/ml). Balto asins šūnu skaits parāda 3 donoru pūšā iekļauto donoru 3 balto asins šūnu skaita vidējo vērtību.



8. attēls. RT-PCR reproducējamība — starp lietotājiem. 7. attēlā aprakstītajā eksperimentā izdalītā RNS tika izmantota reālā laika RT-PCR. Relatīvie **[A]** FOS un **[B]** IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības attiecībā pret lietotāja A vērtībām (10 donoru pūli x 3 komplekta partijas x 4 atkārtojumi = 120 datu kopas katram gēnam), un ir parādītas visu paraugu vidējās vērtības (sarkanās līnijas) un standartnovirze (melnie stabiņi). Pārtrauktās līnijas norāda analīzi $\pm 3x$ kopējo precizitāti (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



9. attēls. RT-PCR reproducējamība — starp komplekta partijām. 7. attēlā aprakstītajā eksperimentā izdalītā RNS tika izmantota reālā laika RT-PCR. Relatīvie **[A]** FOS un **[B]** IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības attiecībā pret 1. komplekta partijas vērtībām (10 donoru pūli x 3 lietotāji x 4 atkārtojumi = 120 datu kopas katram gēnam), un ir parādītas visu paraugu vidējās vērtības (sarkanās līnijas) un standartnovirze (melnie stabiņi). Pārtrauktās līnijas norāda analīžu $\pm 3x$ kopējo precizitāti (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

2. tabula. 8. un 9. attēlā parādīto RT-PCR datu kopsavilkums

Testēšanas sistēma	FOS/18S rRNS analīze		IL1B/18S rRNS analīze	
	Vidējais ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SN ($\Delta\Delta C_T$)	Vidējais ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SN ($\Delta\Delta C_T$)
Reproducējamība katram lietotājam un starp visām partijām				
Visi lietotāji, 1. partija–1. partija	0,00	0,00	0,00	0,00
Visi lietotāji, 1. partija–2. partija	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Visi lietotāji, 1. partija–3. partija	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproducējamība katram lietotājam un starp visām partijām				
Visas partijas, lietotājs A–lietotājs A	0,00	0,00	0,00	0,00
Visas partijas, lietotājs A–lietotājs B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Visas partijas, lietotājs A–lietotājs C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Lietotājs: tehniķis, veica pētījumu.

Partija: šajā pētījumā izmantotais komplekta partijas numurs.

SN: standartnovirze.

Parādītas vidējās $\Delta\Delta C_T$ vērtības (N = 120) un standartnovirze datiem, kas attēloti 8. un 9. attēlā.

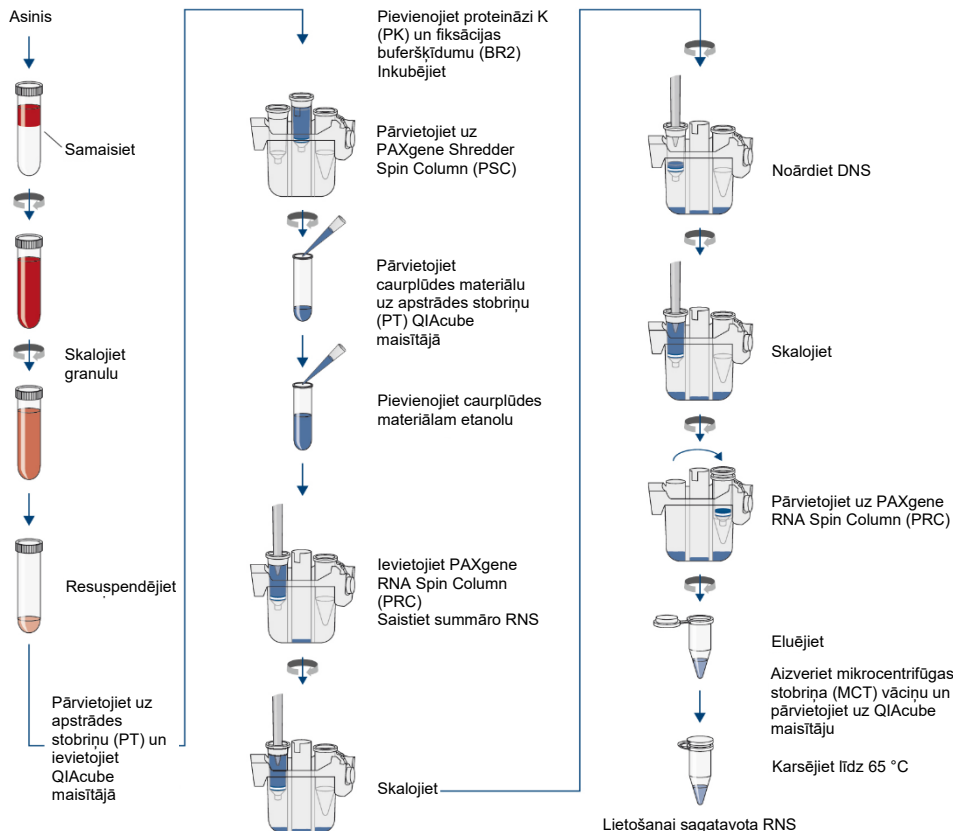
Automatizēta RNS izdalīšana

Instrumentā QIAGEN QIAcube Connect MDx vai klasiskajā QIAGEN QIAcube (tālāk dēvēts par QIAcube) asins RNS izdalīšana ir automatizēta. Novatoriskajos QIAcube instrumentos QIAGEN centrifūgas stobriņu apstrādāšanai tiek izmantota uzlabota tehnoloģija, kas sniedz iespējas zemas caurplūdes parauga sagatavi ērti integrēt jūsu laboratorijas darbplūsmā. Paraugu sagatavošanai, izmantojot QIAcube instrumentus, tiek lietotas tās pašas darbības, kas manuālajai procedūrai (t.i., lizēšana, saistīšana, skalošana un eluēšana), tādēļ komplektu PAXgene Blood RNA Kit varat turpināt lietot augstas kvalitātes RNS izdalīšanai.



10. attēls. QIAcube Connect MDx.

Automatizētais RNS izdalīšanas protokols sastāv no 2 daļām (jeb protokoliem): “PAXgene Blood RNA Part A” un “PAXgene Blood RNA Part B”, un starp abām daļām nepieciešama neliela manuāla iejaukšanās (sk. 11. attēlu 31. lpp.).



11. attēls. PAXgene Blood RNA automatizētā procedūra.

Centrifugētā, izskatotā un resuspendētā nukleīnskābju granula (sk. sadaļu “RNS koncentrēšana un izdalīšana” 19. lpp.) no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT) jāpārviļo uz apstrādes stobriņiem (PT), kuri tiek ievietoti QIAcube instrumenta darba plates termomaisītāja ierīcē. Operatoram izvēlnē jāatlasa un jāpalaiz protokols “PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA A daļa). QIAcube instrumenti veic šī protokola darbības līdz RNS eluēšanai eluēšanas buferšķīdumā (BR5). Operatoram mikrocentrifūgas stobriņi (MCT) ar izdalīto RNS jāpārviļo uz QIAcube instrumentu termomaisītāja ierīci.

Operatoram izvēlnē jāatlasa un jāpalaiž protokols "PAXgene Blood RNA Part B", un QIAcube instrumentos notiek denaturācija karstuma ietekmē.

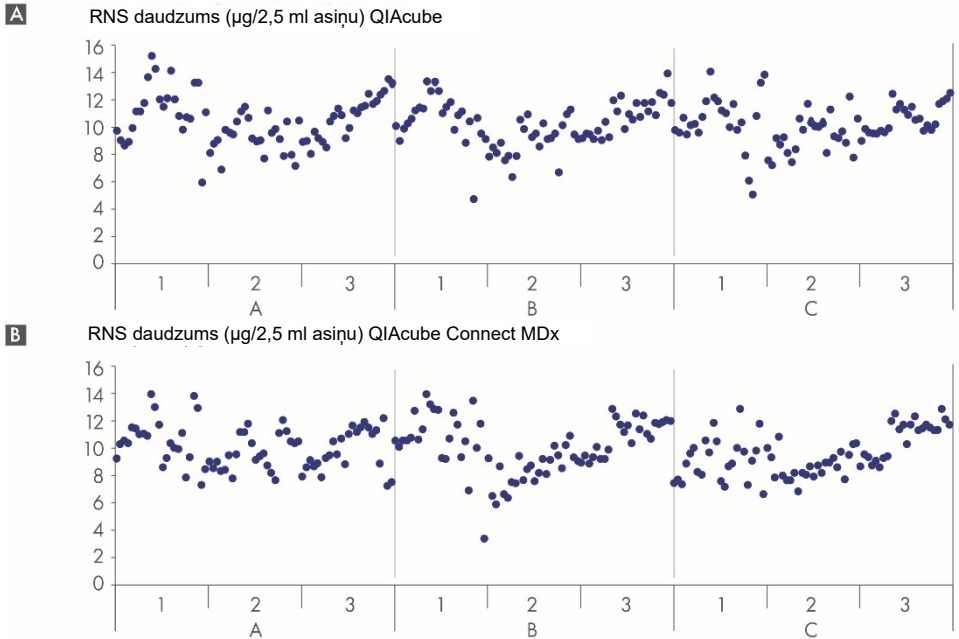
Vidējais parauga sagatavošanas laiks (balstoties uz datiem no 12 paraugu sagatavošanas izpildes reizēm) ir 151 minūte*, bet, salīdzinot ar manuālo protokolu, būtiski mazāk laika jāvelta roku darbam.

Iegūtais RNS daudzums no 2,5 ml vesela cilvēka pilnasiņu $\geq 95\%$ apstrādāto paraugu ir $\geq 3 \mu\text{g}$. 12. attēlā (33. lpp.) ir parādīts RNS daudzums, kas iegūts kopā no 216 paraugiem, kuri sagatavoti, 3 operatoriem izmantojot automatizēto protokolu ar 3 komplekta partijām. Šiem pētījumiem tika izmantoti apkopotī asins paraugi, nevis individuāli PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT), tāpēc rezultāti neatspoguļo RNS daudzumu, ko paredzēts iegūt no viena parauga eksemplāra, kas iegūts atsevišķā asins parauga ņemšanas reizē. Iegūtais daudzums ir lielā mērā atkarīgs no donora, tāpēc daudzums katrā atsevišķā gadījumā var atšķirties (12. attēls 33. lpp.).

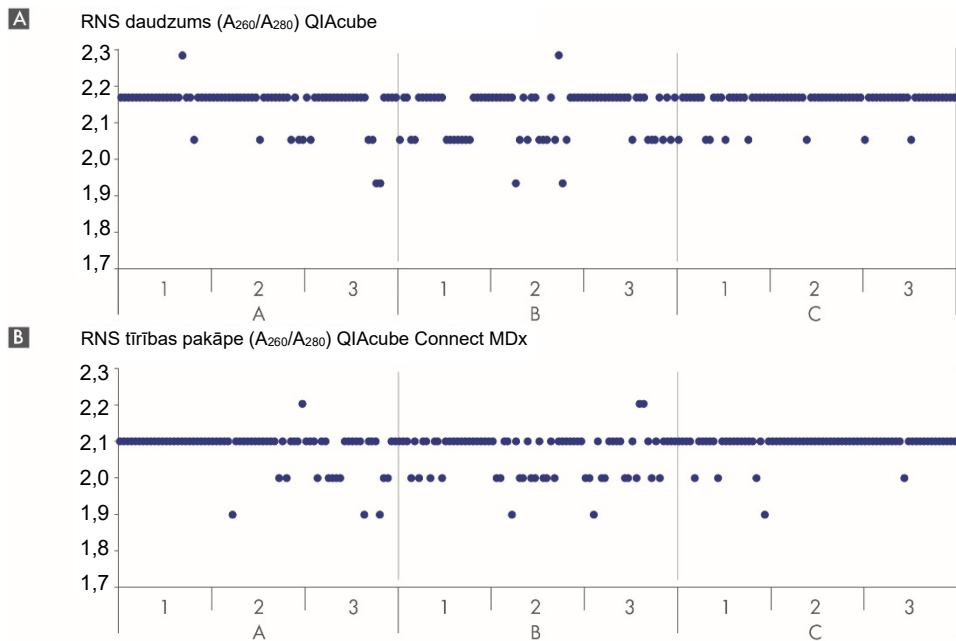
Vismaz 95% paraugu neuzrāda inhibīciju RT-PCR procesā, izmantojot līdz pat 30% eluāta. Izmantojot automatizēto protokolu, krusteniskā kontaminācija starp paraugiem nav nosakāma, kā noteikts, veicot kvantitatīvu reālā laika RT-PCR ar ABL1 un FOS transkriptu sekvencēm RNS negatīvos paraugos (ūdens), kas sakārtotas pāros ar RNS pozitīviem paraugiem (cilvēka pilnasinis) vienā izpildes reizē.

Ar sistēmu PAXgene Blood RNA System un automatizēto protokolu izolētā RNS ir tīra, ko pierāda RT-PCR inhibīcijas neesamība un A_{260}/A_{280} vērtības no 1,8 līdz 2,2. $\geq 95\%$ visu paraugu ir atrodams $\leq 1\%$ (masas daļa) genomiskās DNS, kā noteikts kvantitatīvā beta-aktīna gēna sekvences real-time PCR. 13. un 14. attēlā (34. un 35. lpp.) ir parādītas A_{260}/A_{280} vērtības un relatīvais genomiskās DNS daudzums kopā 216 paraugos, kas sagatavoti, 3 operatoriem izmantojot automatizēto protokolu ar 3 komplektu partijām.

* Kopējais protokola izpildlaiks, ieskaitot PAXgene Blood RNA Tubes stobriņu iepriekšēju apstrādi (centrifugēšanas, granulas skalošanu un granulas resuspendēšanu).

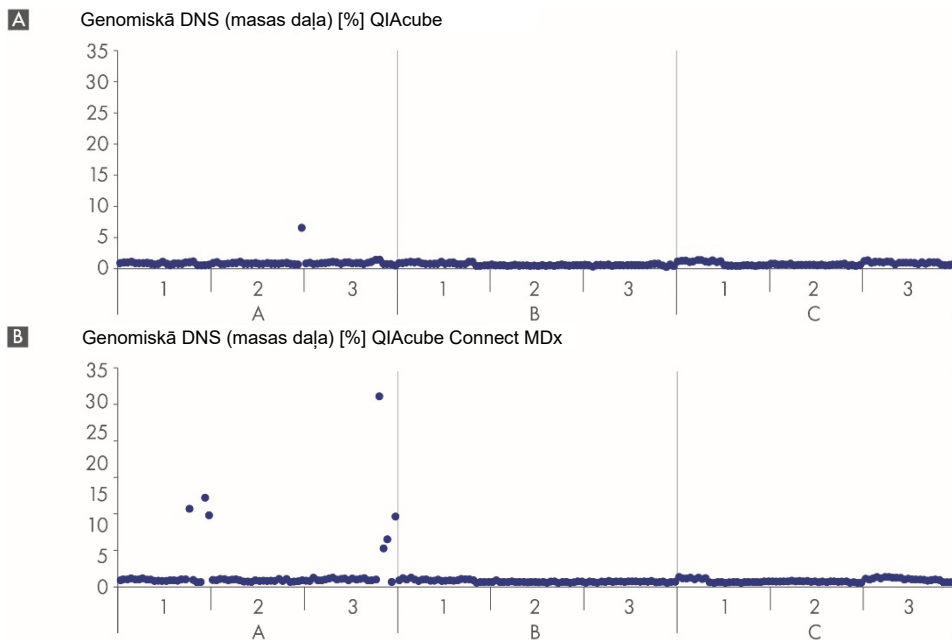


12. attēls. RNS daudzums — automatizēta apstrāde A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Asins paraugi no atsevišķiem donoriem tika savākti PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT). Stobriņu saturs tika apkopots 6 donoru pūlos un pēc tam atkārtoti sadalīts alikvotos. Kopā 216 stobriņus (t.i., 36 stobriņus katram pūlam) apstrādāja 3 dažādi operatori (A, B, C). Katrs operators automatizētai ekstrakcijai izmantoja 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas (1, 2, 3) ar vairākiem QIAcube un QIAcube Connect MDx instrumentiem un apstrādāja četrus paraugu eksemplārus no katra no 6 donoru pūliem. Parādīts katra atsevišķā parauga RNS daudzums katrai operatora–partijas kombinācijai.



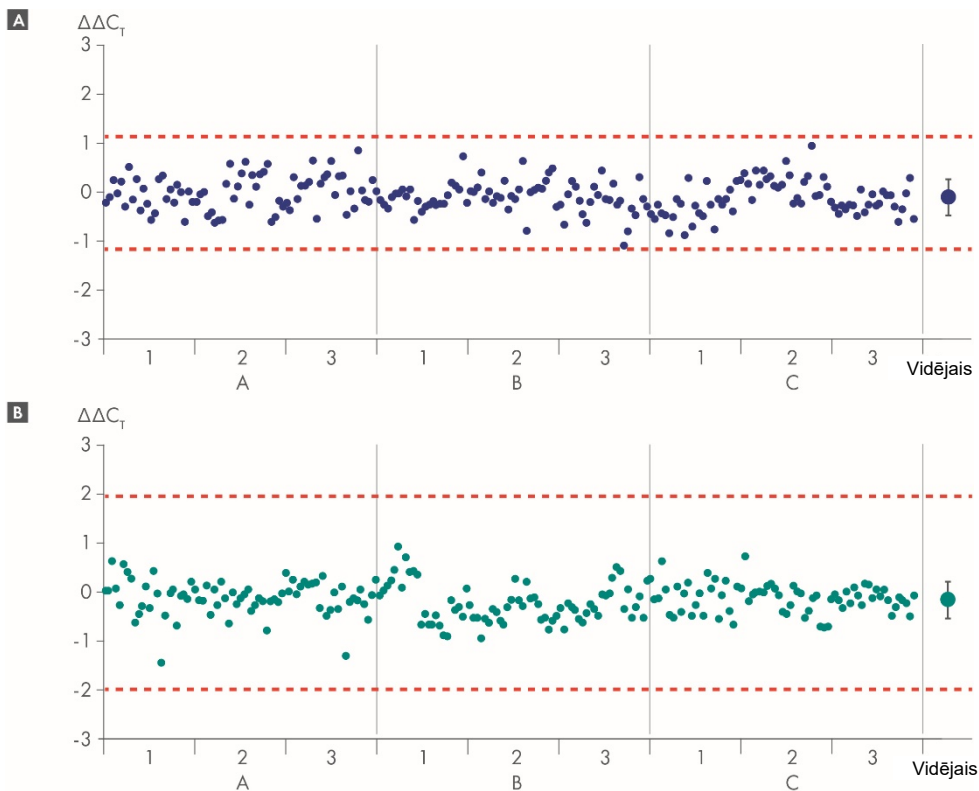
13. attēls. RNS tīrības pakāpe (A_{260}/A_{280} vērtības) — automatizēta apstrāde. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx.

12. attēlā aprakstītajā eksperimentā RNS izdalīšanu veica 3 dažādi operatori (A, B, C), izmantojot 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas (1, 2, 3) ar vairākiem QIAcube un QIAcube Connect MDx instrumentiem. Parādītas katra atsevišķā parauga A_{260}/A_{280} vērtības katrai operatora–partijas kombinācijai.

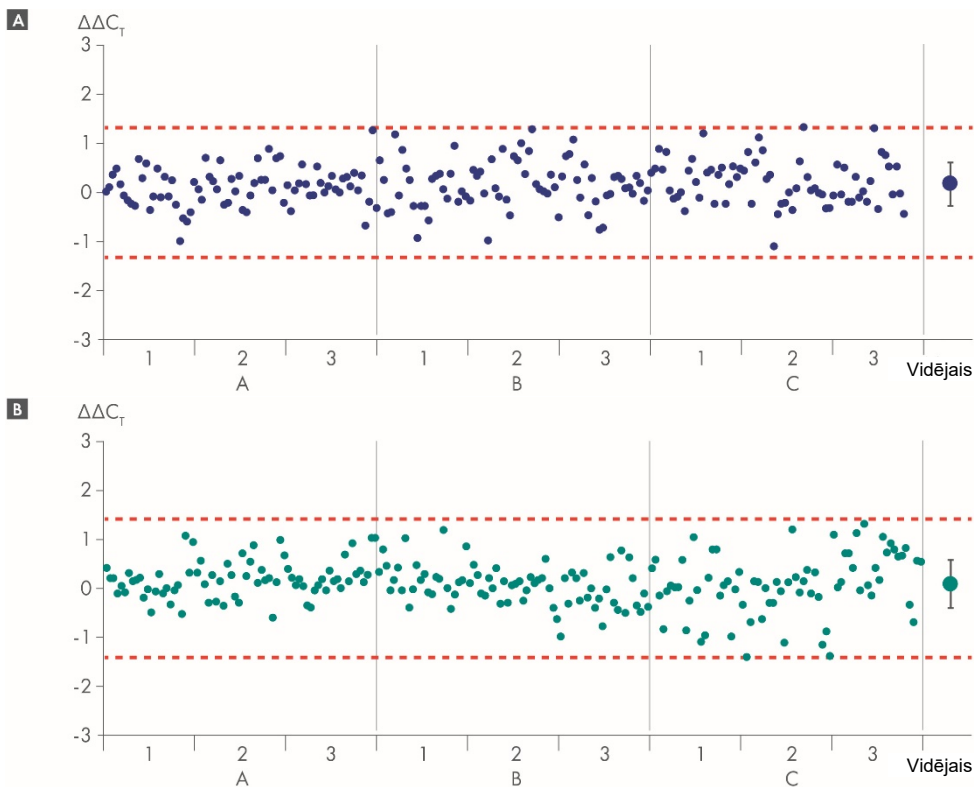


14. attēls. RNS tīrības pakāpe (% genomiskās DNS kontaminācija) — automatizēta apstrāde, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. 12. attēlā aprakstītajā eksperimentā RNS izdalīšanu veica 3 dažādi operatori (A, B, C), izmantojot 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas (1, 2, 3) ar vairākiem QIAcube un QIAcube Connect MDx instrumentiem. Parādīts genomiskās DNS daudzums (masas daļa) katrā atsevišķajā paraugā katrai operatora-partijas kombinācijai.

RNS izdalīšanas automatizētais protokols, izmantojot sistēmu PAXgene Blood RNA System, nodrošina augsti reproducējamus un atkārtojamus RT-PCR rezultātus, kā parādīts 15. attēlā un 16. attēlā (36. un 37. lpp.), tāpēc tas ir ļoti noturīgs klīniskiem diagnostiskiem izmeklējumiem.



15. attēls. RT-PCR reproducējamība — starp automatizēto (QIAcube) un manuālo protokolu. 12. attēlā aprakstītajā eksperimentā RNS izdalīšanu veica 3 dažādi operatori (A, B, C), izmantojot 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas (1, 2, 3) ar vairākiem QIAcube un QIAcube Connect MDx instrumentiem un automatizēto protokolu. Paraleli RNS tika izdalīta no atbilstošajiem atkārtotajiem stobriņiem, izmantojot manuālo protokolu. Relatīvie **[A]** FOS un **[B]** IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Iespējamās transkriptu līmeņa atšķirības RNS, kas sagatavota no pāros sakārotiem asins paraugiem, izmantojot abus ekstrakcijas protokolus (automatizēto un manuālo protokolu), tika aprēķinātas, izmantojot $\Delta\Delta C_T$ metodi. Atsevišķas $\Delta\Delta C_T$ vērtības visiem paraugu pāriem (4 atkārtējumi x 6 donoru pūli x 3 komplekta partijas x 3 operatori = 216 pāri katram gēnam) visiem paraugiem diagrammā ir parādītas kā atsevišķi punkti ar vidējām vērtībām (lielāki punkti) un standartnovirzi (melnī stabiņi). Pārtrauktās līnijas norāda analīžu $\pm 3x$ kopējo precizitāti (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; analīžu precizitāte atšķiras no 1.–4., 8. un 9. attēlā norādītās, jo analīžu versijas atšķiras).



16. attēls. RT-PCR reproducējamība — starp QIAcube un QIAcube Connect MDx instrumentiem, izmantojot automatizēto protokolu. 12. attēlā aprakstītajā eksperimentā RNS izdalīšanu veica 3 dažādi operatori (A, B, C), izmantojot 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas (1, 2, 3) un automatizēto protokolu vairākos QIAcube un QIAcube Connect MDx instrumentos. Relatīvie **[A]** FOS un **[B]** IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Iespējamās transkriptu līmeņa atšķirības RNS, kas sagatavota no pāros sakārotiem asins paraugiem, izmantojot abus instrumentus, tika aprēķinātas, izmantojot $\Delta\Delta C_T$ metodi. Atsevišķas $\Delta\Delta C_T$ vērtības visiem paraugu pāriem (4 atkārtējumi x 6 donoru pūli x 3 komplekta partijas x 3 operatori = 216 pāri katram gēnam) visiem paraugiem diagrammā ir parādītas kā atsevišķi punkti ar vidējām vērtībām (lielāki punkti) un standartnovirzi (melnī stabiņi). Pārtrauktās līnijas norāda analīžu $\pm 3x$ kopējo precizitāti (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; analīžu precizitāte atšķiras no 1.–4., 8., 9. un 15. attēlā norādītās, jo analīžu versijas atšķiras).

Aprīkojums un reaģenti, ko nodrošina lietotājs

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

Visiem protokoliem

- PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT, PreAnalytiX; kat. nr. 762165)
- Etanols (96–100% tīrības pakāpe p.a.)
- Pipetes* (10 µl–4 ml)
- Sterili pipešu uzgaļi bez RNāzes, ar aerosola barjeru†
- Cilindrs ar iedaļām‡
- Centrifūga*, kura spēj sasniegt 3000–5000 x g, aprīkota ar svārstīgo rotoru un kausiem PAXgene Blood RNA Tubes stobriņu (BRT) ievietošanai
- Virpuļmaisītājs*
- Drupināts ledus
- Ūdensnoturīgā pildspalva marķēšanai

Manuālajam protokolam

- Mikrocentrifūga* ar regulējamu ātrumu, kura spēj sasniegt vismaz 1000–8000 x g diapazonu, kaut arī ir pieļaujams mazāks vai lielāks g spēka rādītājs (detalizētu informāciju sk. protokola darbībās), aprīkota ar rotoru 2 ml mikrocentrifūgas stobriņiem
- Maisītājs-inkubators§, kurš spēj veikt inkubāciju 55 °C un 65 °C temperatūrā un sajaukšanu ar ≥400 apgr./min, nepārsniedzot 1400 apgr./min (piem., Eppendorf® Thermomixer Compact vai ekvivalents)

* Nodrošini, ka ierīces un instrumenti tiek regulāri pārbaudīti, uzturēti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

† Noteikti iepazīstieties ar RNS apstrādes vadlīnijām (A pielikums, 71. lpp.).

‡ Etanola pievienošanai buferšķīduma BR4 koncentrātam.

§ Nodrošini, ka ierīces un instrumenti tiek regulāri pārbaudīti, uzturēti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

Automatizētajam protokolam (izmantojot QIAcube vai QIAcube Connect MDx)

- Šķēres

QIAcube instrumentu palīgmateriāli

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

QIAcube instrumentu piederumi

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, kat. nr. 990392)†

Automatizētajam protokolam, izmantojot QIAcube Connect MDx

- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, kat. nr. 9003070)

QIAcube Connect MDx apkalpošanas komplektācijas

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

Automatizētajam protokolam, izmantojot QIAcube

- QIAcube† (QIAGEN, kat. nr. 9001882 [110 V])

* Iekļauti arī sākuma komplektā Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. nr. 990395).

† Nodrošiniet, ka ierīces un instrumenti tiek regulāri pārbaudīti, uzturēti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

Svarīgas piezīmes

QIAcube instrumentu lietošana

Noteikti iepazīstieties ar QIAcube instrumenta darbības principiem. Pirms PAXgene Blood RNA automatizēto protokolu izmantošanas, lūdzu, izlasiet QIAcube instrumenta lietotāja rokasgrāmatu un visu QIAcube instrumenta komplektācijā iekļauto papildinformāciju, īpašu uzmanību pievēršot drošības informācijai.

Ja nav norādīts atsevišķi, šajā sadaļā sniegtās instrukcijas attiecas gan uz QIAcube Connect MDx, gan uz QIAcube.

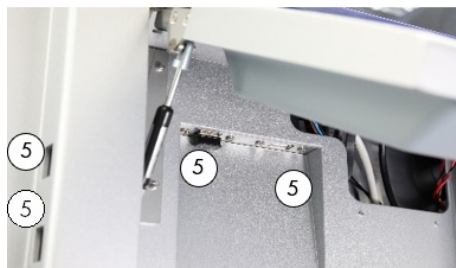
QIAcube ierīču startēšana

Aizveriet QIAcube instrumenta pārsegu un ieslēdziet QIAcube instrumentu ar ieslēgšanas/izslēgšanas slēdzi (QIAcube Connect MDx: sk. 17. attēlu 41. lpp.; QIAcube: 18. attēls 42. lpp.).

Atskan skaņas signāls, un tiek parādīts sākuma ekrāns. Instruments automātiski veic inicializēšanas pārbaudes.



QIAcube Connect MDx skats no priekšpuses



Izvilktis skārienekrāns



QIAcube Connect MDx skats no aizmugures



QIAcube Connect MDx skats no aizmugures

17. attēls. QIAcube Connect MDx ārējie līdzekļi.

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ① Skārienekrāns ② Pārsegs ③ Atkritumu atvilktnē ④ Ieslēgšanas/izslēgšanas slēdzis | <ul style="list-style-type: none"> ⑤ 2 USB porti skārienekrāna kreisajā malā;
2 USB porti aiz skārienekrāna (Wi-Fi modulis iesprausts 1 USB portā) ⑥ RJ-45 Ethernet ports ⑦ Strāvas vada ligzda ⑧ Dzesējošā gaisa izeja |
|--|---|



18. attēls. QIAcube priekšpuses skats.

- | | | | |
|---|--|---|---------------------------------|
| 1 | Skārienukrāns | 4 | USB ports aiz aizsargpaneļa |
| 2 | Pārsegs | 5 | Ieslēgšanas/izslēgšanas slēdzis |
| 3 | RS232 seriālais ports aiz aizsargpaneļa (to paredzēts lietot tikai QIAGEN instrumentu servisa speciālistiem) | 6 | Atkritumu atvilktnē |

Skārienekrāns

QIAcube instrumenti tiek kontrolēti ar skārienekrānu. Izmantojot skārienekrānu, lietotājs var lietot instrumentu un skatīt norādījumus par darba plātes iestatīšanu. Parauga apstrādes laikā skārienekrānā ir redzams protokola statuss un atlikušais laiks.




19. attēls. QIAcube Connect MDx skārienekrāns izvilkta stāvoklī


Protokolu instalēšana QIAcube instrumentos

Lai QIAcube instrumentos varētu veikt pirmo RNS sagatavošanu, vispirms var būt nepieciešama sākotnējo protokolu instalēšana. Instalējiet protokolus “PAXgene Blood RNA Part A” un “PAXgene Blood RNA Part B”.

QIAcube Connect MDx instrumentam paredzētie protokoli ir pieejami šeit: **www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources** (QIAcube instrumentam šeit: www.qiagen.com/MyQIAcube), un tie ir jālejupielādē QIAcube komplektācijā iekļautajā USB atmiņas ierīcē. Šie protokoli uz instrumentu ir jāpārceļ, izmantojot USB portu.

USB ports (QIAcube Connect MDx: atrodas skārienekrāna sānos, sk. 17. attēlu 41. lpp.; QIAcube: aiz aizsargpaneļa, sk. 18. attēlu 42. lpp.) sniedz iespēju QIAcube instrumentus savienot ar QIAcube instrumentu komplektācijā iekļauto USB atmiņas ierīci. Izmantojot USB portu, no QIAcube instrumentiem uz USB atmiņas ierīci var pārceļt arī datu failus, piemēram, žurnālfailus vai atskaišu failus.

 USB portu ir paredzēts izmantot tikai ar QIAGEN nodrošināto USB atmiņas ierīci. Nepievienojiet šim portam citas ierīces.

 USB atmiņas ierīci nedrīkst izņemt, kamēr tiek lejupielādēti protokoli vai pārsūtīti datu faili, kā arī protokolu izpildes laikā.


Plašāku informāciju par protokolu augšupielādēšanu QIAcube instrumentos, lūdzu, skatiet izmantotā instrumenta attiecīgajā rokasgrāmatā.


QIAcube instrumentu uzpildīšana

Lai taupītu laiku, uzpildi var veikt vienas vai abu 10 minūšu ilgo centrifugēšanas darbību laikā (3. un 5. darbība), kā aprakstīts sadaļā “Protokols: automatizēta summārās RNS izdalīšana no PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinām”, 62. lpp.

Reaģentu pudeles

Pirms katras izpildes reizes QIAcube instrumentā rūpīgi piepildiet 4 reaģentu pudeles ar 3. tabulā (45. lpp.) norādītajiem reaģentiem līdz maksimālā līmeņa indikatoram vai, ja tas nav iespējams, līdz līmenim, ko nodrošina komplektā PAXgene Blood RNA Kit iekļautais buferšķīdumu daudzums. Skaidri marķējiet pudeles un vāciņus, norādot buferšķīdumu nosaukumus, un uzpildītās reaģentu pudeles ielieciet atbilstošajās pozīcijās reaģentu pudeļu statīvā. Ievietojiet statīvu QIAcube instrumenta darba platē, kā parādīts (20.–22. attēls 45.–47. lpp.).

 Ar buferšķīduma BR2 komplektā iekļauto daudzumu reaģenta pudeli nevar piepildīt līdz indikatoram. Buferšķīdumi BR3 un BR4, iespējams, nepiepilda pudeli līdz indikatora līmenim, ja iepriekšējās izpildes reizēs ir apstrādāti vairāki paraugi.

 Pirms pudeļu ievietošanas darba platē obligāti noņemiet pudeļu vāciņus.



Ar buferšķīdumu tilpumu, kas iekļauts komplektā PAXgene Blood RNA Kit (50), pietiek ne vairāk kā 7 RNS izdalīšanas izpildes reizēm QIAcube instrumentā, vienā izpildes reizē apstrādājot 2–12 paraugus. Parasti nav ieteicams veikt izpildes ar nelielu paraugu skaitu, lai ar vienu komplektu varētu apstrādāt kopumā 50 paraugus, veicot ne vairāk kā 7 RNS izdalīšanas izpildes. Veicot vairāk nekā 7 RNS izdalīšanas izpildes, pēdējo paraugu apstrādei buferšķīdumu var nepietikt.

3. tabula. Pozīcijas reaģentu pudeļu statīvā

Pozīcija	Reaģents
1	Fiksācijas buferšķīdums (BR2)
2	96–100% etanols
3	Skalošanas buferšķīdums 1 (BR3)
4	Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4)*
5	– (atstājiet tukšu)
6	– (atstājiet tukšu)

* Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts koncentrāta veidā. Pirms pirmās lietošanas pievienojiet 4 reizes lielāku tilpumu etanola (96–100% tīrības pakāpe p. a.), lai iegūtu darba šķīdumu (ievērojiet norādījumus uz pudeles).

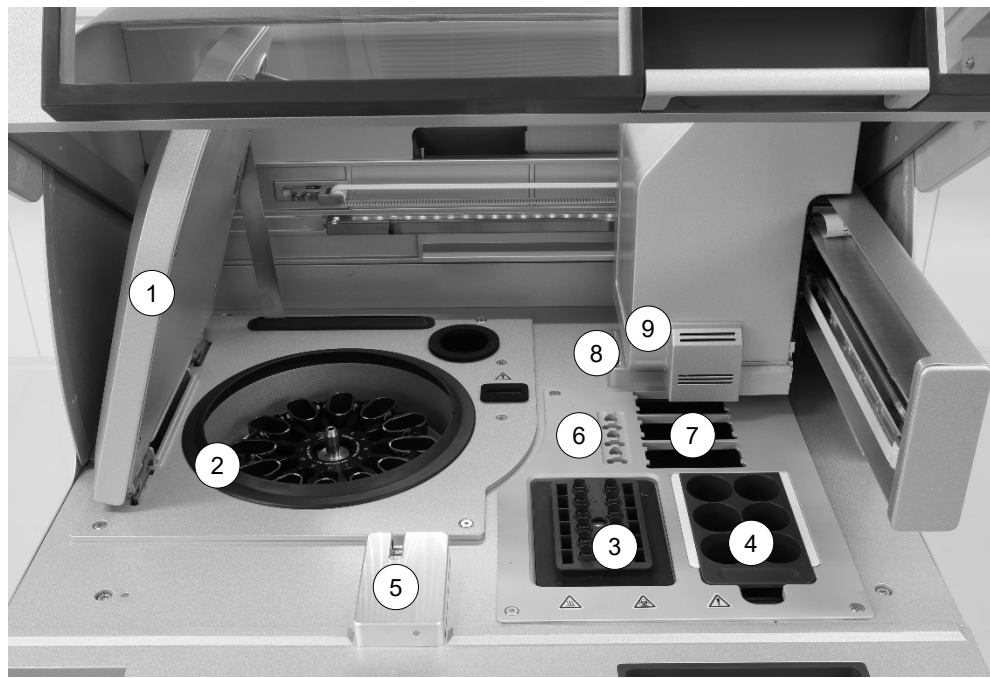
A



B

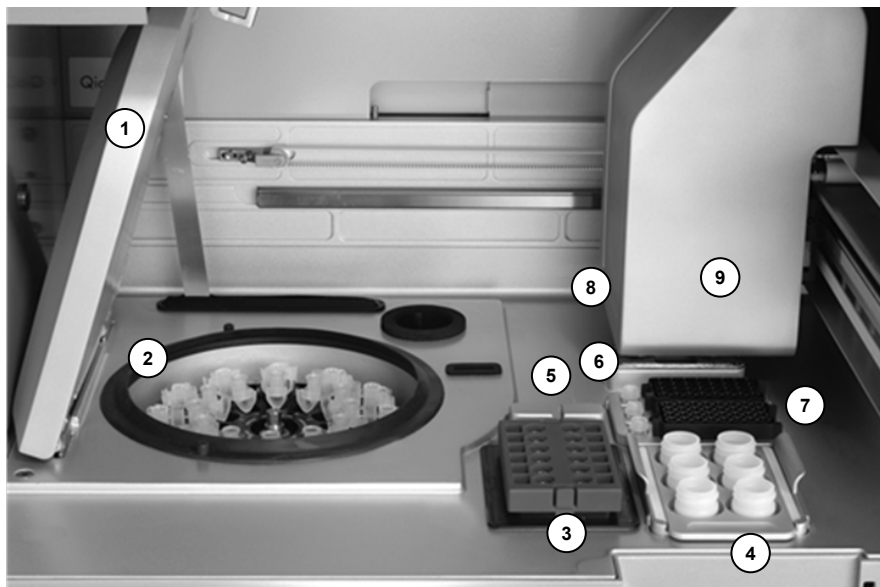


20. attēls. Reaģentu pudeļu statīva ievietošana. [A] Pozīciju un pudeļu satura shēma reaģentu pudeļu statīvā. **[B]** Statīva ievietošana QIAcube instrumentā (QIAcube parādīts kā piemērs).



21. attēls. QIAcube Connect MDx iekšpuses skats.

- | | |
|---|---|
| <p>1 Centrifūgas vāks</p> <p>2 Centrifūga</p> <p>3 Maisītājs</p> <p>4 Reaģentu pudeļu statīvs</p> <p>5 Uzgaļu sensors un pārsega bloķēšanas mehānisms</p> | <p>6 Mikrocentrifūgas stobriņu spraugas</p> <p>7 3 spraugas uzgaļu statīviem</p> <p>8 Uzgaļu un stobriņu izmešanas spraugas</p> <p>9 Robotizēta svira (ietver 1 kanāla pipetētāju, satvērēju, ultraskaņas un optisko sensoru un UV gaismas diodi)</p> |
|---|---|



22. attēls. QIAcube instrumenta iekšpuses skats.

- | | | | |
|---|-------------------------|---|---------------------------------------|
| 1 | Centrifūgas vāks | 6 | Mikrocentrifūgas stobriņu spraugas |
| 2 | Centrifūga | 7 | Uzgaļu statīvi |
| 3 | Maisītājs | 8 | Uzgaļu un stobriņu izmešanas spraugas |
| 4 | Reaģentu pudeļu statīvs | 9 | Robotizēta svira |
| 5 | Uzgaļu sensors | | |

Centrifūgas stobriņi (PRC, PSC), mikrocentrifūgas stobriņi (MCT) un QIAcube instrumentu plastmasas piederumi

Ar Filter-Tips 1000 µl piepildītus 2 uzgaļu statīvus ievietojiet QIAcube instrumentā (sk. 21. un 22. attēlu 46. un 47. lpp.). Kad nepieciešams, papildiniet statīvus ar uzgaļiem.



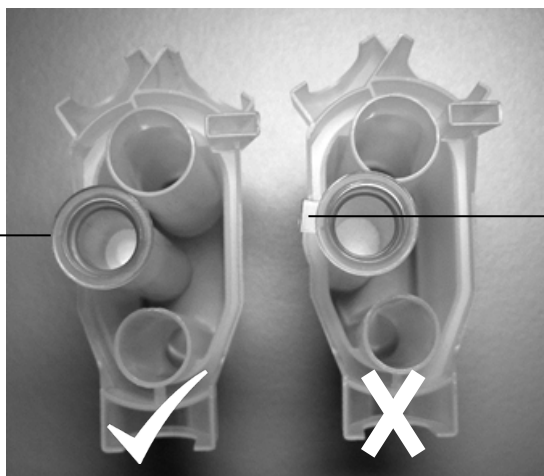
Izmantojiet tikai 1000 µl filtru uzgaļus, kas ir paredzēti lietošanai ar QIAcube instrumentiem.

Marķējiet katru parauga rotora adapteri un mikrocentrifūgas stobriņu (MCT), izmantojot ūdensnoturīgo pildspalvu. Atveriet PAXgene Shredder centrifūgas stobriņus (PSC), ko paredzēts lietot, un ar šķērēm pilnībā nogrieziet vāciņus (sk. 23. attēlu 48. lpp.).



Lai QIAcube instrumenta robotizētais satvērējs darbotos pareizi, pilnībā noņemiet (nogrieziet) vāciņus un visas plastmasas daļas, kas vāciņu savieno ar PAXgene Shredder centrifūgas stobriņiem (PSC; sk. 23. attēlu). Pretējā gadījumā robotizētais satvērējs nevar pareizi satvert centrifūgas stobriņus (PSC, PRC).

Pareizi
noņemts
stobriņa
vāciņš



Nepareizi
noņemts
stobriņa
vāciņš — daļa
vāciņa joprojām
ir piestiprināta

23. attēls. PAXgene Shredder centrifūgas stobriņa (PSC) ievietošana. PAXgene Shredder centrifūgas stobriņš (PSC) jāievieto rotora adaptera vidējā pozīcijā. Pirms stobriņa ievietošanas nogrieziet vāciņu.

PAXgene RNA centrifūgas stobriņu (PRC), PAXgene Shredder centrifūgas stobriņu (PSC, bez vāciņa, sk. 23. attēlu 48. lpp.) un marķēto mikrocentrifūgas stobriņu ievietojiet atbilstošajās pozīcijās katrā no marķētajiem rotora adapteriem, kā parādīts 4. tabulā un 24. attēlā.

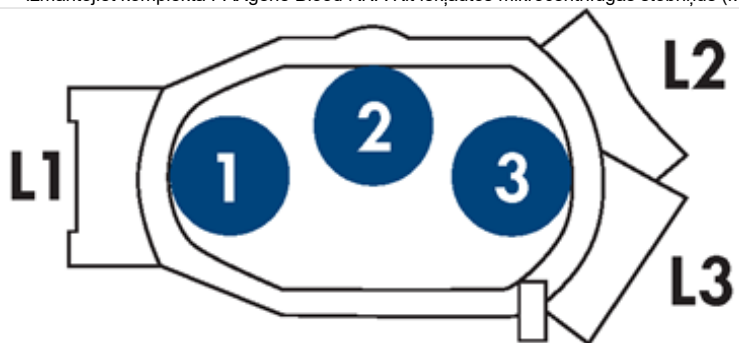


Nodrošīniet, ka centrifūgas stobriņa (PRC) un mikrocentrifūgas stobriņa (MCT) vāciņi ir nospiesti līdz pat spraugu apakšai rotora adaptera malā; citādi centrifugēšanas laikā šie vāciņi nolūzīs.

4. tabula. Laboratorijas piederumi rotora adapterī

Pozīcija	Reaģents	Vāciņa pozīcija
1	PAXgene RNA centrifūgas stobriņš (sarkans, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder centrifūgas stobriņš (violets, PSC) (nogrieziet vāciņu, pirms ievietojat rotora adapterī)	–
3	Mikrocentrifūgas stobriņš (MCT)*	L3

* Izmantojiet komplektā PAXgene Blood RNA Kit iekļautos mikrocentrifūgas stobriņus (MCT; 1,5 ml).



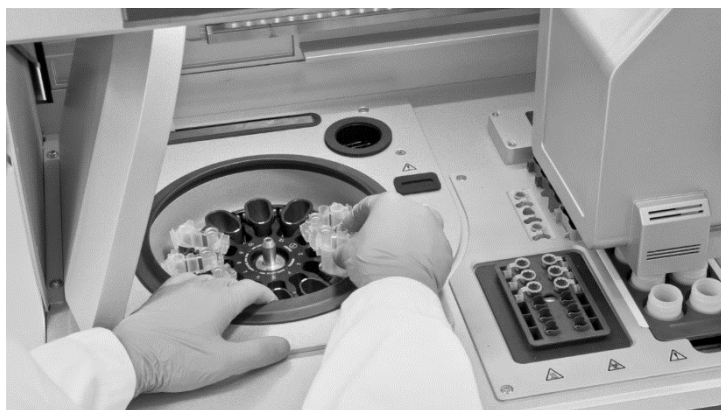
24. attēls. Pozīcijas rotora adapterī. Rotora adapterim ir trīs stobriņu pozīcijas (1–3) un trīs vāciņu pozīcijas (L1–L3).

Centrifūgas uzpilde

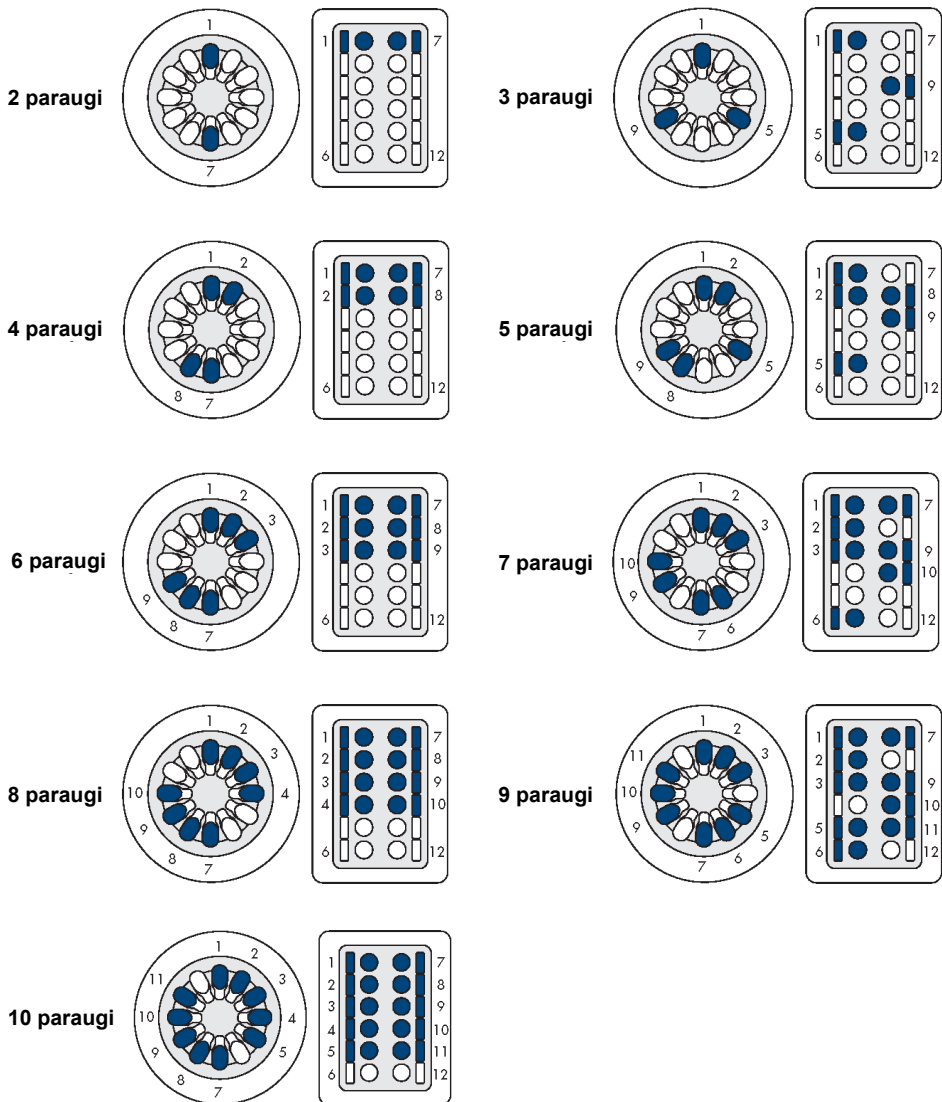
Saliktos rotoru adapterus ievietoņiet centrifūgas kausos, kā tālāk parādīts 25. attēlā.



Ja apstrādājat mazāk nekā 12 paraugus, noslogoņiet centrifūgas rotoru radiāli līdzsvaroti (sk. 26. attēlu 51. lpp.). Pirms tiek sākta protokola izpilde, ir jāievieto visi centrifūgas kausi, pat ja paredzēts apstrādāt mazāk nekā 12 paraugus. Nevar apstrādāt vienu paraugu vai 11 paraugus.



25. attēls. Centrifūgas uzpilde QIAcube instrumentos. Saliktos rotoru adapterus ievietoņiet centrifūgas kausos (kā piemērs parādīts QIAcube Connect MDx).



26. attēls. Centrifūgas un maisītāja uzpildīšana. Parādītas centrifūgas un maisītāja pozīcijas ir paredzētas divu (2) līdz desmit (10) paraugu apstrādei. Vienu (1) paraugu vai 11 paraugus apstrādāt nevar. Lai apstrādātu 12 paraugus, tiek aizpildītas visas centrifūgas un maisītāja pozīcijas (attēls nav parādīts).

Apstrādes stobriņi (PT)

Izņemiet visus apstrādes stobriņus (PT), kas mikrocentrifūgas stobriņu spraugās palikuši no iepriekšējām izpildes reizēm (QIACube Connect MDx: sk. 21. attēlu 46. lpp., QIACube: sk. 22. attēlu 47. lpp.). Piepildiet 3 apstrādes stobriņus (PT) ar 5. tabulā norādīto reaģentu daudzumu atbilstoši izpildes reizes paraugu skaitam.

DNāzes I inkubācijas maisījumam pipetējiet norādīto tilpumu DNS noārdīšanas buferšķīduma (RDD) apstrādes stobriņā (PT) un pievienojiet norādīto tilpumu DNāzes I (RNFD) rezerves standartšķīduma. Lai samaisītu, visu maisījumu 3 reizes uzmanīgi pipetējiet uz augšu un uz leju, izmantojot 1000 µl pipetes uzgali.

Izmantojiet komplektā PAXgene Blood RNA Kit iekļautos 2 ml apstrādes stobriņus (PT). Skaidri marķējiet stobriņus, norādot reaģentu nosaukumus, un ievietojiet tos atbilstošajā pozīcijā mikrocentrifūgas stobriņu ligzdās, kā norādīts 6. tabulā (53. lpp.).



DNāze I (RNFD) ir īpaši jutīga pret fizikālu denaturāciju. Maisīšanai izmantojiet tikai pipetēšanu ar liela diametra pipešu uzgaļiem, lai samazinātu bīdi. Nesaskalīniet.



Pipetējiet tikai nepieciešamo tilpumu, kā tālāk norādīts 5. tabulā.

5. tabula. Nepieciešamais reaģentu tilpums apstrādes stobriņos mikrocentrifūgas stobriņu spraugām.

Paraugu skaits	Reaģentu tilpums norādītajam skaitam paraugu (µl)		
	Proteināze K (PK)	DNāzes I inkubācijas maisījums	Eluēšanas buferšķīdums (BR5)
2	126	187 (23 DNāze I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNāze I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNāze I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNāze I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNāze I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNāze I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNāze I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNāze I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNāze I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNāze I + 806 Buffer RDD)	1177

6. tabula. Mikrocentrifūgas stobriņu spraugas

	Pozīcija		
	A	B	C
Saturs	Proteināze K	DNāzes I inkubācijas maisījums	Eluēšanas buferšķīdums (BR5)
Trauks	Apstrādes stobriņš (PT)*	Apstrādes stobriņš (PT)*	Apstrādes stobriņš (PT)*

* Izmantojiet komplektā PAXgene Blood RNA Kit iekļautos 2 ml apstrādes stobriņus.

Protokols: manuāla summārās RNS izdalīšana no PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinīm

Svarīga informācija pirms darba sākšanas

- Pārliecinieties, vai komplekta iepakojums ir neskarts un bez bojājumiem un vai nav radusies buferšķīdumu noplūde. Nelietojiet komplektu, ja tas ir bojāts.
- Izmantojot pipeti, pārliecinieties, vai tai ir iestatīts pareizs tilpums un vai šķidrums tiek rūpīgi un pilnībā aspirēts un dozēts.
- Lai nepieļautu paraugu ievietošanu nepareizajos stobriņos vai centrifūgas stobriņos, nodrošiniet, lai visi stobriņi un centrifūgas stobriņi būtu atbilstoši marķēti, izmantojot ūdensnoturīgo pildspalvu. Marķējiet katra stobriņa vāciņu un korpusu (PT, MCT). Centrifūgas stobriņiem marķējiet apstrādes stobriņu (PT) korpusu. Pēc šķidruma ievietošanas noslēdziet visus stobriņu un centrifūgas stobriņus.
- Paraugu un buferšķīdumu izšķīdināšanās procedūras laikā var samazināt iegūtās RNS daudzumu un tās tīrību.
- Ja vien nav norādīts citādi, visas šī protokola darbības, ieskaitot centrifugēšanas darbības, ir jāveic istabas temperatūrā (15–25 °C).

Nukleīnskābju amplifikācijas tehnoloģijas ir ļoti jutīgas, tāpēc, apstrādājot paraugus, ir jāievēro tālāk aprakstītie piesardzības pasākumi, lai izvairītos no krusteniskās kontaminācijas.

- Uzmanīgi pipetējiet paraugu centrifūgas stobriņā (PRC, PSC), nesamitrinot stobriņa malu.
- Starp šķidrumu pārvešanas reizēm vienmēr nomainiet pipešu uzgaļus. Izmantojiet pipešu uzgaļus ar aerosola barjeru.
- Centieties ar pipetes galu nepieskarieties centrifūgas stobriņa (PRC, PSC) membrānai.

- Pēc mikrocentrifūgas stobriņa (MCT) saskalošanas vai sildīšanas īsi to centrifugējiet, lai noņemtu vāka iekšpusē esošos pilienus.
- Visu procedūras laiku izmantojiet aizsargcimdus. Ja cimdi saskaras ar paraugu, nekavējoties nomainiet cimdus.
- Pirms centrifūgas stobriņa (PRC, PSC) ievietošanas mikrocentrifūgā noslēdziet to. Centrifugējiet, kā norādīts procedūras aprakstā.
- Vienlaikus atveriet tikai vienu centrifūgas stobriņu (PRC, PSC) un uzmanieties, lai neradītu aerosolu.
- Lai paralēli efektīvi apstrādātu vairākus paraugus, papildiet statīvu ar apstrādes stobriņiem (PT), kuros pēc centrifugēšanas var pārvietot centrifūgas stobriņus (PRC, PSC). Izmetiet izmantotos apstrādes stobriņus (PT), kuros atrodas caurplūdes materiāls, un jaunus apstrādes stobriņus (PT) ar centrifūgas stobriņiem (PRC, PSC) ievietojiet tieši mikrocentrifūgā.

Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Asinis jāsavāc PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT), kā norādīts *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmātā*. Ja nepieciešams, skatiet C pielikumu (76. lpp.), kur ir sniegti ieteikumi par darbu ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT).
- Nodrošiniet, lai PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT) pēc asins paraugu savākšanas vismaz 2 stundas tiktu inkubēti istabas temperatūrā, lai nodrošinātu pilnīgu asins šūnu līzi. Inkubējot PAXgene Blood RNA Tube stobriņus (BRT) visu nakti, var palielināt iegūto daudzumu. Ja PAXgene Blood RNA Tube stobriņš (BRT) pēc asins parauga savākšanas ir glabāts 2–8 °C, –20 °C vai –70 °C temperatūrā, vispirms ļaujiet tam sasniegt istabas temperatūru un pēc tam pirms procedūras sākšanas vismaz 2 stundas glabāiet to istabas temperatūrā.
- Izlasiet 9. lpp. sniegto drošības informāciju.
- Izlasiet vadlīnijas par darbu ar RNS (A pielikums, 73. lpp.).
- Nodrošiniet, ka instrumenti, piemēram, pipetes un maisītājs-inkubators, regulāri tiek pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

- Maisītājs-inkubators ir nepieciešams 5. un 20. darbībā. Iestatiet maisītājam-inkubatoram temperatūru līdz 55 °C.
- Buferšķīdumā (BR2) glabāšanas laikā var rasties nogulsnes. Ja nepieciešams, sasildiet līdz 37 °C temperatūrai, lai tās izšķīdinātu.
- Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts koncentrāta veidā. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet 4 reizes lielāku tilpumu etanola (96–100% tīrības pakāpe p.a.), lai iegūtu darba šķīdumu (ievērojiet norādījumus uz pudeles).
- Ja DNāzes komplektu bez RNāzes lietojat pirmo reizi, sagatavojiet DNāzes I rezerves standartšķīdumu. Izšķīdiniet cieto DNāzi I (RNFD; 1500 Kunitz vienības)* 550 µl komplektā iekļautā DNāzes resuspendēšanas buferšķīduma (DRB). Atverot flakonu, rīkojieties uzmanīgi, lai nezaudētu daļu DNāzes I (RNFD). Nesaskaliniet pagatavoto DNāzes I (RNFD) šķīdumu. DNāze I ir īpaši jutīga pret fizikālu denaturāciju. Maisīšana ir jāveic, flakonu tikai uzmanīgi apgriežot.
- Pašreizējie dati rāda, ka pagatavotu DNāzes I (RNFD) šķīdumu var glabāt 2–8 °C temperatūrā līdz pat 6 nedēļām. Lai DNāzi I (RNFD) uzglabātu ilgstoši, izlejiet rezerves standartšķīdumu no stikla flakona, sadaliet to vienai lietošanas reizei paredzētās alikvotās (izmantojiet komplektā iekļautos 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņus [MCT]; to pietiek 5 alikvotām) un glabājiet –20 °C temperatūrā ne ilgāk kā 9 mēnešus. Atkausētas alikvotās daļas var glabāt 2–8 °C temperatūrā līdz pat 6 nedēļām. Pēc atkausēšanas alikvotās daļas nedrīkst atkārtoti sasaldēt.
- Gatavojot DNāzes I (RNFD) šķīdumu un to sadalot alikvotās daļās, obligāti ievērojiet vadlīnijas darbam ar RNS (A pielikums, 73. lpp.).

* Kunitz vienības parasti tiek izmantotas DNāzes I mērīšanai, un tās ir definētas kā DNāzes I daudzums, kas rada A_{260} pieaugumu par 0,001 minūtē uz milimetru temperatūrā 25 °C un ar pH 5,0, kā substrātu izmantojot augsti polimerizētu DNS (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 un 363).

Procedūra

1. Centrifugējiet PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT) 10 minūtes ar 3000–5000 x g, izmantojot svārstīgo rotoru.



Pārlicinieties, vai asins paraugs ir vismaz 2 stundas istabas temperatūrā (15–25 °C) inkubēts PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT), lai sasniegtu asins šūnu pilnīgu līzi.



Rotorā ir jābūt stobriņu adapteriem, kas paredzēti stobriņiem ar noapaļotu galu. Ja tiek izmantoti citu veidu stobriņu adapteri, stobriņi centrifugēšanas laikā var saplīst.

2. Noņemiet supernatantu, to nolejot vai pipetējot. Pievienojiet granulai 4 ml ūdens, kas nesatur RNāzi (RNFW), un noslēdziet stobriņu ar jaunu sekundāro BD Hemogard aizdari (iekļautas komplektā).

Ja supernatants tiek noliets, rīkojieties uzmanīgi, lai nesabojātu granulu, un nosusiniet stobriņa malu ar tīru papīra dvieli.

3. Saskaliniet, līdz ir redzams, ka granula ir izšķīdusi, un 10 minūtes centrifugējiet ar 3000–5000 x g, izmantojot svārstīgo rotoru. Noņemiet un izmetiet visu supernatantu.

Nelielas atliekas, kas paliek supernatantā pēc saskalošanas, bet pirms centrifugēšanas, neietekmē procedūru.



Nepilnīga supernatanta noņemšana var kavēt līzi un izšķīdināt lizātu, tādējādi ietekmējot apstākļus, kuros RNS saistās ar PAXgene membrānu.

4. Pievienojiet 350 µl resuspendēšanas buferšķīduma (BR1) un saskalojiet, līdz ir redzams, ka granula ir izšķīdusi.
5. Pipetējiet paraugu 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā (MCT). Pievienojiet 300 µl fiksācijas buferšķīduma (BR2) un 40 µl proteināzes K (PK). Saskalojot maisiet 5 sekundes un uz 10 minūtēm inkubējiet 55 °C temperatūrā, izmantojot maisītāju-inkubatoru ar 400–1400 apgr./min. Pēc inkubācijas iestatiet maisītājam-inkubatoram temperatūru 65 °C (20. darbībai).



Pirms pievienošanas paraugam nesamaisiet kopā fiksācijas buferšķīdumu (BR2) un proteināzi K (PK).

6. Pipetējiet lizātu tieši PAXgene Shredder centrifūgas stobriņā (PSC; violets), kas ievietots 2 ml apstrādes stobriņā (PT), un centrifugējiet 3 minūtes ar maksimālo ātrumu (bet nepārsniedzot 20 000 x g).



Uzmanīgi pipetējiet lizātu centrifūgas stobriņā (PSC) un vizuāli pārbaudiet, vai viss lizāts pilnībā ir pārvietots uz centrifūgas stobriņu (PSC).

Lai neradītu stobriņu (PSC un PT) bojājumus, nepārsniedziet 20 000 x g.



Daži paraugi bez centrifugēšanas var izplūst caur PAXgene Shredder centrifūgas stobriņu (PSC). To izraisa dažu paraugu zemā viskozitāte, un tā nav uzskatāma par produkta kļūmes pazīmi.

7. Uzmanīgi pārvietojiet visu caurplūdes frakcijas supernatantu uz jaunu 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņu (MCT), nebojājot apstrādes stobriņā esošo granulu.
8. Pievienojiet 350 µl etanola (96–100% tīrības pakāpe p.a.). Saskaļinot samaisiet un īsi centrifugējiet (1–2 sekundes ar 500–1000 x g), lai noņemtu vāka iekšpusē esošos pilienus.



Centrifugēšanas ilgums nedrīkst pārsniegt 1–2 sekundes; pretējā gadījumā var veidoties nukleīnskābju granulas un samazināties iegūtais summārās RNS daudzums.

9. Pipetējiet 700 µl parauga PAXgene RNA centrifūgas stobriņā (PRC; sarkans), kas ievietots 2 ml apstrādes stobriņā (PT), un 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g. Ielieciet centrifūgas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml apstrādes stobriņā (PT) un izmetiet veco apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls.
10. Pipetējiet atlikušo parauga daļu PAXgene RNA centrifūgas stobriņā (PRC) un 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g. Ielieciet centrifūgas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml apstrādes stobriņā (PT) un izmetiet veco apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls.



Uzmanīgi pipetējiet paraugu centrifūgas stobriņā (PRC) un vizuāli pārbaudiet, vai viss paraugs pilnībā ir pārvietots uz centrifūgas stobriņu (PRC).

11. Pipetējiet 350 µl skalošanas buferšķīduma 1 (BR3) PAXgene RNA centrifūgas stobriņā (PRC). 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g. Ielieciet centrifūgas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml apstrādes stobriņā (PT) un izmetiet veco apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls.

12. Pievienojiet 10 µl DNāzes I (RNFD) rezerves standartšķīduma pie 70 µl DNS noārdīšanas buferšķīduma (RDD) 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā (MCT). Samaisiet, viegli kustinot stobriņu, un īsi centrifugējiet, lai savāktu atlikušo šķidrumu no stobriņa malām.

Ja apstrādājat, piemēram, 10 paraugus, pievienojiet 100 µl DNāzes I (RNFD) rezerves standartšķīduma pie 700 µl DNS noārdīšanas buferšķīduma (RDD). Izmantojiet komplektā iekļautos 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņus (MCT).



DNāze I ir īpaši jutīga pret fizikālu denaturāciju. Maisīšana ir jāveic, tikai maigi uzsitot pa stobriņu. Nesaskaliniet.

13. Pipetējiet DNāzes I (RNFD) inkubācijas maisījumu (80 µl) tieši uz PAXgene RNA centrifūgas stobriņa (PRC) membrānas un uz 15 minūtēm nolieciet uz galda (20–30 °C temperatūrā).



Pārliecinieties, vai DNāzes I (RNFD) inkubācijas maisījums ir uzlikts tieši uz membrānas. Ja daļa maisījuma tiks uzlikta un paliks uz centrifūgas stobriņa (PRC) sienīņām vai gredzenblīves, DNāzes noārdīšanās būs nepilnīga.

14. Pipetējiet 350 µl skalošanas buferšķīduma 1 (BR3) PAXgene RNA centrifūgas stobriņā (PRC) un 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g. Ielieciet centrifūgas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml apstrādes stobriņā (PT) un izmetiet veco apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls.

15. Pipetējiet 500 µl skalošanas buferšķīduma 2 (BR4) PAXgene RNA centrifūgas stobriņā (PRC) un 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g. Ielieciet centrifūgas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml apstrādes stobriņā (PT) un izmetiet veco apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls.



Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts koncentrāta veidā. Nodrošiniet, ka pirms lietošanas skalošanas buferšķīdumam 2 (BR4) tiek pievienots etanols (sk. sadaļu “Pirms darba sākšanas veicamās darbības”, 55. lpp.).

16. Pievienojiet vēl 500 µl skalošanas buferšķīduma 2 (BR4) PAXgene RNA centrifūgas stobriņā (PRC). 3 minūtes centrifugējiet ar 8000–20 000 x g.
17. Izmetiet apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls, un ielieciet PAXgene RNA centrifūgas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml apstrādes stobriņā (PT). 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g.
18. Izmetiet apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls. Ielieciet PAXgene RNA centrifūgas stobriņu (PRC) 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā (MCT) un pipetējiet 40 µl eluēšanas buferšķīduma (BR5) tieši uz PAXgene RNA centrifūgas stobriņa (PRC) membrānas. 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g, lai eluētu RNS.
Ir svarīgi ar eluēšanas buferšķīdumu (BR5) samitrināt visu membrānu, lai nodrošinātu maksimālu eluēšanas efektivitāti.
19. Atkārtojiet eluēšanas darbību (18. darbību), kā aprakstīts, izmantojot 40 µl eluēšanas buferšķīduma (BR5) un to pašu mikrocentrifūgas stobriņu (MCT).
20. 5 minūtes inkubējiet eluātu 65 °C temperatūrā maisītājā-inkubatorā (no 5. darbības) bez maisīšanas. Pēc inkubācijas nekavējoties atdzesējiet uz ledu.
Inkubējot 65 °C temperatūrā, RNS tiek denaturēta lejuvēršam lietojumam. Nepārsniedziet inkubācijas laiku un temperatūru.
21. Ja RNS paraugus nav paredzēts izmantot tūlīt, glabājiet –20 °C vai –70 °C temperatūrā.
Pēc atkārtotas sasaldēšanas un atkausēšanas RNS paliek denaturēta, tāpēc inkubēšanu 65 °C temperatūrā nav nepieciešams atkārtot. Ja RNS paraugus izmantojat diagnostikas analīzei, izpildiet ražotāja sniegtos norādījumus.
Precīzai RNS kvantifikācijai ar absorbcijas vērtību pie 260 nm mēs iesakām paraugus atšķaidīt ar 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5. * Paraugu atšķaidot ar ūdeni, kas nesatur RNāzi, var tikt uzrādītas neatbilstoši zemas vērtības.

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

Nullējiet spektrofotometru, izmantojot tukšu paraugu, kurā ir tāda pati eluēšanas buferšķīduma (BR5) un Tris-HCl buferšķīduma proporcija kā mērāmajos paraugos. Eluēšanas buferšķīdumam (BR5) ir augsta absorbcijas vērtība pie 220 nm, kas var radīt augstu fona absorbcijas līmeni, ja spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts.



Kvantificēšanai Tris HCl buferšķīdumā izmantojiet sakarību $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Sk. B pielikumu, 74. lpp.

Protokols: automatizēta summārās RNS izdalīšana no PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinām

Svarīga informācija pirms darba sākšanas

- Pārliecinieties, vai komplekta iepakojums ir neskarts un bez bojājumiem un vai nav radusies buferšķīdumu noplūde. Nelietojiet komplektu, ja tas ir bojāts.
- Izmantojot pipeti, pārliecinieties, vai tai ir iestatīts pareizs tilpums un vai šķidrums tiek rūpīgi un pilnībā aspirēts un dozēts.
- Lai nepieļautu paraugu ievietošanu nepareizajos stobriņos vai plastmasas palīgmateriālos, nodrošiniet, lai visi apstrādes stobriņi (PT), mikrocentrifūgas stobriņi (MCT) un rotoru adapteri būtu atbilstoši marķēti, izmantojot ūdensnoturīgo pildspalvu. Marķējiet katra mikrocentrifūgas stobriņa (MCT) vāciņu un korpusu, katra apstrādes stobriņa (PT) korpusu un katra rotora adaptera ārējo sienu.
- Paraugu un buferšķīdumu izšķīstīšanās procedūras laikā var samazināt iegūtās RNS daudzumu un tās tīrību.
- Ja vien nav norādīts citādi, visas šī protokola darbības, ieskaitot centrifugēšanas darbības, ir jāveic istabas temperatūrā (15–25 °C).

Nukleīnskābju amplifikācijas tehnoloģijas ir ļoti jutīgas, tāpēc, apstrādājot paraugus, ir jāievēro tālāk aprakstītie piesardzības pasākumi, lai izvairītos no krusteniskās kontaminācijas.

- Uzmanīgi pipetējiet paraugu apstrādes stobriņā (PT) stobriņa apakšdaļā, nesamitrinot stobriņa malu.
- Starp šķidrumu pārvešanas reizēm vienmēr nomainiet pipešu uzgaļus. Izmantojiet pipešu uzgaļus ar aerosola barjeru.

- Centieties ar pipetes galu nepieskarieties centrifūgas stobriņa (PRC, PSC) membrānai.
- Pēc mikrocentrifūgas stobriņa (MCT) saskalošanas vai sildīšanas īsi to centrifugējiet, lai noņemtu vāka iekšpusē esošos pilienus.
- Visu procedūras laiku izmantojiet aizsargcimdus. Ja cimdi saskaras ar paraugu, nekavējoties nomainiet cimdus.

Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Asinis jāsavāc PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT), kā norādīts *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmatā*. Ja nepieciešams, skatiet C pielikumu (76. lpp.), kur ir sniegti ieteikumi par darbu ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT).
- Nodrošiniet, lai PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT) pēc asins paraugu savākšanas vismaz 2 stundas tiktu inkubēti istabas temperatūrā, lai nodrošinātu pilnīgu asins šūnu līzi. Inkubējot PAXgene Blood RNA Tube stobriņus (BRT) visu nakti, var palielināt iegūto daudzumu. Ja PAXgene Blood RNA Tube stobriņš (BRT) pēc asins parauga savākšanas ir glabāts 2–8 °C, –20 °C vai –70 °C temperatūrā, vispirms ļaujiet tam sasniegt istabas temperatūru un pēc tam pirms procedūras sākšanas vismaz 2 stundas glabājat to istabas temperatūrā.
- Izlasiet 9. lpp. sniegto drošības informāciju.
- Izlasiet sadaļu “Svarīgas piezīmes”, 40. lpp.
- Izlasiet vadlīnijas par darbu ar RNS (A pielikums, 73. lpp.).
- Izlasiet atbilstošā QIAcube instrumenta lietotāja rokasgrāmatu un visu QIAcube instrumenta komplektācijā iekļauto papildinformāciju, īpašu uzmanību pievēršot drošības informācijai.
- Nodrošiniet, ka ierīces un instrumenti, piemēram, pipetes un QIAcube instruments, regulāri tiek pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.
- Buferšķīdumā (BR2) glabāšanas laikā var rasties nogulsnes. Ja nepieciešams, sasildiet līdz 37 °C temperatūrai, lai tās izšķīdinātu.

- Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts koncentrāta veidā. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet atbilstošu daudzumu etanola (96–100%, tīrības pakāpe p.a.), kā norādīts uz pudeles, lai iegūtu darba šķīdumu.
- Ja DNāzes komplektu bez RNāzes lietojat pirmo reizi, sagatavojiet DNāzes I rezerves standartšķīdumu. Izšķīdiniet cieto DNāzi I (RNFD; 1500 Kunitz vienības)* 550 µl komplektā iekļautā DNāzes resuspendēšanas buferšķīduma (DRB). Atverot flakonu, rīkojieties uzmanīgi, lai nezaudētu daļu DNāzes I (RNFD). Nesaskaliniet pagatavoto DNāzes I (RNFD) šķīdumu. DNāze I ir īpaši jutīga pret fizikālu denaturāciju. Maisīšana ir jāveic, flakonu tikai uzmanīgi apgriežot.
- Pašreizējie dati rāda, ka pagatavotu DNāzes I (RNFD) šķīdumu var glabāt 2–8 °C temperatūrā līdz pat 6 nedēļām. Lai DNāzi I (RNFD) uzglabātu ilgstoši, izlejiet rezerves standartšķīdumu no stikla flakona, sadaliet to vienai lietošanas reizei paredzētās alikvotās (izmantojiet komplektā iekļautos 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņus [MCT]; to pietiek 5 alikvotām) un glabājiet –20 °C temperatūrā ne ilgāk kā 9 mēnešus. Atkausētas alikvotās daļas var glabāt 2–8 °C temperatūrā līdz pat 6 nedēļām. Pēc atkausēšanas alikvotās daļas nedrīkst atkārtoti sasaldēt.
- Gatavojot DNāzes I (RNFD) šķīdumu un to sadalot alikvotās daļās, obligāti ievērojiet vadlīnijas darbam ar RNS (A pielikums, 73. lpp.).
- Uzstādiet atbilstošu maisītāja adapteri (iekļauts QIAcube instrumentu komplektācijā; izmantojiet adapteri 2 ml droši noslēdzamiem stobriņiem, kas marķēti ar ciparu “2”) un uzlieciet maisītāja statīvu uz adaptera.
- Pārbaudiet atkritumu atvilktni un, ja nepieciešams, iztukšojiet to.
- Instalējiet visus saistītos protokolus, ja tas vēl nav paveikts iepriekšējās izpildes reizēs. QIAcube Connect MDx instrumentam ir nepieciešams, lai visi protokoli atrastos saistītajā .zip failā, ko paredzēts lejupielādēt. Klasiskajam QIAcube instrumentam instalējiet gan protokolu “PAXgene Blood RNA Part A”, gan protokolu “PAXgene Blood RNA Part B”. Sk. sadaļu “Protokolu instalēšana QIAcube instrumentos” 43. lpp.

* Kunitz vienības parasti tiek izmantotas DNāzes I mērīšanai, un tās ir definētas kā DNāzes I daudzums, kas rada A_{260} pieaugumu par 0,001 minūtē uz milimetru temperatūrā 25 °C un ar pH 5,0, kā substrātu izmantojot augsti polimerizētu DNS (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 un 363).

Procedūra

1. Aizveriet QIAcube instrumenta pārsegu un ieslēdziet QIAcube instrumentu ar ieslēgšanas/izslēgšanas slēdzi (QIAcube Connect MDx: sk. 17. attēlu 41. lpp.; QIAcube: sk. 18. attēlu 42. lpp.).

Atskan skaņas signāls, un tiek parādīts sākuma ekrāns. Instruments automātiski veic inicializēšanas testus.

2. Atveriet QIAcube instrumenta pārsegu un ievietojiet QIAcube instrumentā nepieciešamos reaģentus un plastmasas piederumus. Sk. sadaļu "QIAcube instrumentu uzpildīšana" 44. lpp.

Lai taupītu laiku, uzpildi var veikt vienas vai abu 10 minūšu ilgo centrifugēšanas darbību laikā (3. un 5. darbība).

3. Centrifugējiet PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT) 10 minūtes ar 3000–5000 x g, izmantojot svārstīgo rotoru.



Pārliecinieties, vai asins paraugs ir vismaz 2 stundas istabas temperatūrā (15–25 °C) inkubēts PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT), lai sasniegtu asins šūnu pilnīgu līzi.



Rotorā ir jābūt stobriņu adapteriem, kas paredzēti stobriņiem ar noapaļotu galu. Ja tiek izmantoti citu veidu stobriņu adapteri, stobriņi centrifugēšanas laikā var saplīst.

4. Noņemiet supernatantu, to nolejot vai pipetējot. Pievienojiet granulai 4 ml ūdens, kas nesatur RNāzi (RNFW), un noslēdziet stobriņu ar jaunu sekundāro BD Hemogard aizdari (iekļautas komplektā).

Ja supernatants tiek noliets, rīkojieties uzmanīgi, lai nesabojātu granulu, un nosusiniet stobriņa malu ar tīru papīra dvieli.

5. Saskaliniet, līdz ir redzams, ka granula ir izšķīdusi, un 10 minūtes centrifugējiet ar 3000–5000 x g, izmantojot svārstīgo rotoru. Noņemiet un izmetiet visu supernatantu.

Nelielas atliekas, kas paliek supernatantā pēc saskalošanas, bet pirms centrifugēšanas, neietekmē procedūru.



Nepilnīga supernatanta noņemšana var kavēt līzi un izšķīdināt lizātu, tādējādi ietekmējot apstākļus, kuros RNS saistās ar PAXgene membrānu.

6. Pievienojiet 350 µl resuspendēšanas buferšķīduma (BR1) un saskalojiet, līdz ir redzams, ka granula ir izšķīdusi.

7. Pipetējiet paraugu 2 ml apstrādes stobriņā (PT).



Izmantojiet komplektā PAXgene Blood RNA Kit iekļautos 2 ml apstrādes stobriņus (PT).

8. Atvērtos apstrādes stobriņus (PT), kuros atrodas paraugs, ievietojiet QIAcube instrumenta maisītājā (QIAcube Connect MDx: sk. 21. attēlu 46. lpp.; QIAcube: sk. 22. attēlu 47. lpp.). Lai atvieglotu ievietošanu, paraugu pozīcijas ir numurētas. Ievietojiet maisītāja statīva aizbāžņus (iekļauti QIAcube instrumentu komplektācijā) spraugās maisītāja statīva malā blakus katram apstrādes stobriņam. Tādējādi ielādes pārbaudes laikā varēs noteikt paraugus.



Pārlicinieties, vai ir uzstādīts atbilstošais maisītāja adapteris (maisītāja adapteris, 2 ml, droši noslēdzami stobriņi, kas marķēti ar ciparu “2”; iekļauti QIAcube instrumentu komplektācijā).



Ja apstrādājat mazāk nekā 12 paraugus, maisītāja statīvs noteikti ir jāaizpilda, kā parādīts 26. attēlā 51. lpp. Vienu (1) paraugu vai 11 paraugus apstrādāt nevar. Maisītāja statīva pozīciju numuri atbilst pozīciju numuriem centrifūgā.

9. Aizveriet QIAcube instrumenta pārsegu (QIAcube Connect MDx: sk. 17. attēlu 41. lpp.; QIAcube: sk. 18. attēlu 42. lpp.).

10. Atlasiet protokolu “PAXgene Blood RNA Part A” un palaidiet protokola izpildi.

Izpildiet QIAcube instrumenta skārienekrānā rādītās instrukcijas.



Nodrošiniet, ka QIAcube instrumentā ir instalētas abas programmas daļas (A daļa un B daļa) (sk. sadaļu “Protokolu instalēšana QIAcube instrumentos” 43. lpp.).



QIAcube instrumenti veic uzpildes pārbaudi, lai noteiktu paraugus, uzgaļus, rotora adapterus un reaģentu pudeles.

11. Kad protokols “PAXgene Blood RNA Part A” ir pabeigts, atveriet QIAcube instrumenta pārsegu (QIAcube Connect MDx: sk. 17. attēlu 41. lpp.; QIAcube: sk. 18. attēlu 42. lpp.). Izņemiet PAXgene RNA centrifūgas stobriņus (PRC) no rotora adapteriem un tukšos apstrādes stobriņus (PT) no maisītāja un izmetiet tos.



Izpildes laikā instruments centrifūgas stobriņus no rotora adaptera 1. pozīcijas (vāciņa pozīcija L1) pārvietoto uz rotora adaptera 3. pozīciju (vāciņa pozīcija L2) (sk. 24. attēlu 49. lpp.).

12. Aizveriet vāciņus visiem rotora adapteros esošajiem 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņiem (MCT), kuros ir izdalītā RNS (3. pozīcija, vāciņa pozīcija L3, sk. 24. attēlu 49. lpp.). Šos 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņus (MCT) pārceļiet uz QIAcube instrumenta maisītāja adapteri (QIAcube Connect MDx: sk. 21. attēlu 46. lpp.; QIAcube: sk. 22. attēlu 47. lpp.).
13. Aizveriet QIAcube instrumenta pārsegu (QIAcube Connect MDx: sk. 17. attēlu 41. lpp.; QIAcube: sk. 18. attēlu 42. lpp.).
14. Atlasiet protokolu “PAXgene Blood RNA Part B” un palaidiet protokola izpildi.

Izpildiet QIAcube instrumenta skārienekrānā rādītās instrukcijas.



Šī programma inkubē paraugus 65 °C temperatūrā un denaturē RNS lejupvērstam lietojumam. Pat ja lejupvērstajā lietojumā ir paredzēta denaturācija karstuma ietekmē, neizlaidiet šo darbību. Pietiekama RNS denaturācija ir būtiski svarīga, lai nodrošinātu maksimālu efektivitāti lejupvērstajos lietojumos.

15. Kad programma “PAXgene Blood RNA Part B” ir pabeigta, atveriet QIAcube instrumenta pārsegu (QIAcube Connect MDx: sk. 17. attēlu 41. lpp.; QIAcube: sk. 18. attēlu 42. lpp.). Mikrocentrifūgas stobriņus (MCT) ar izdalīto RNS nekavējoties novietojiet uz ledus.



BRĪDINĀJUMS Karsta virsma. Maisītājs var sasilt līdz 70 °C temperatūrai. Nepieskarieties tam, kad tas ir sakarsis.



Izdalīto RNS nedrīkst atstāt QIAcube instrumentā. Paraugi netiek atdzesēti, tāpēc izdalītās RNS var noārdīties. Tāpēc nav ieteicams veikt paraugu sagatavošanas izpildes naktī bez uzraudzības.

16. Ja RNS paraugus nav paredzēts izmantot tūlīt, glabājiet –20 °C vai –70 °C temperatūrā.

Pēc atkārtotas sasaldēšanas un atkausēšanas RNS paliek denaturēta, tāpēc nav nepieciešams atkārtot protokolu inkubēšanai karstumā (“PAXgene Blood RNA Part B”). Ja RNS paraugus izmantojat diagnostikas analīzei, izpildiet ražotāja sniegtos norādījumus.

Precīzai RNS kvantifikācijai ar absorbcijas vērtību pie 260 nm mēs iesakām paraugus atšķaidīt ar 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5. * Paraugu atšķaidot ar ūdeni, kas nesatur RNāzi, var tikt uzrādītas neatbilstoši zemas vērtības.

Nullējiet spektrofotometru, izmantojot tukšu paraugu, kurā ir tāda pati eluēšanas buferšķīduma (BR5) un Tris-HCl buferšķīduma proporcija kā mērāmajos paraugos. Eluēšanas buferšķīdumam (BR5) ir augsta absorbcijas vērtība pie 220 nm, kas var radīt augstu fona absorbcijas līmeni, ja spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts.



Kvantifikācijai Tris-HCl buferšķīdumā izmantojiet sakarību

$$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml. Sk. B pielikumu, 74. lpp.}$$

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

17. Izņemiet reaģentu pudeļu statīvu no QIAcube instrumenta darba plates (QIAcube Connect MDx: sk. 21. attēlu 46. lpp.; QIAcube: sk. 22. attēlu 47. lpp.) un aizveriet visas pudeles ar atbilstoši marķētajiem vāciņiem. Buferšķīdumus pudelēs var glabāt istabas temperatūrā (15–25 °C) līdz pat 3 mēnešiem. Izņemiet un izmetiet reaģentus, kas atlikuši apstrādes stobriņos (PT) QIAcube instrumenta mikrocentrifūgas stobriņu spraugās. Izņemiet rotora adapterus no centrifūgas un izmetiet tos. Iztukšojiet QIAcube Connect MDx atkritumu atvilktni (QIAcube Connect MDx: sk. 17. attēlu 41. lpp.; QIAcube: sk. 18. attēlu 42. lpp.). Aizveriet QIAcube instrumenta pārsegu un izslēdziet instrumentu ar ieslēgšanas/izslēgšanas slēdzi.

Problēmu novēršanas ceļvedis

Šis problēmu novēršanas ceļvedis var noderēt iespējamo problēmu risināšanā. Plašāku informāciju skatiet lapā “Frequently Asked Questions” (Biežāk uzdotie jautājumi), kura pieejama mūsu tehniskā atbalsta centra vietnē: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN tehniskā atbalsta darbinieki vienmēr labprāt atbild uz visiem jūsu jautājumiem par šajā rokasgrāmatā sniegto informāciju un protokoliem vai par paraugu un analīžu tehnoloģijām (kontakinformāciju skatiet pēdējā lappusē vai vietnē www.qiagen.com).

Komentāri un ieteikumi

RNĀzes ir noārdījusies

RNāzes kontaminācija



RTkojieties uzmanīgi, lai procedūras laikā vai pēc tās reaģentos nenokļūtu RNāzes (sk. A pielikumu 73. lpp.).

Mazs iegūtās RNS daudzums

a) PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) ir savākts mazāk nekā 2,5 ml asiņu



Nodrošiniet, lai PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT; sk. *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmatu*) tiktu savākti 2,5 ml asiņu.

b) RNS koncentrācija ir mērīta ūdenī



Precīzai kvantificēšanai RNS ir jāatšķaida ar 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5* (sk. B pielikumu 74. lpp.).



c) Manuālā protokola 9. un 10. darbībā PAXgene RNA centrifūgas stobriņā (PRC) ir pārvietotas šūnu atliekas





Manuālā protokola 7. darbībā, pipetējot supernatantu, nepārvietojiet lielas daļiņas (sīku atlieku pārvietošana procedūru neietekmē).

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

Komentāri un ieteikumi

- d) 3. darbībā nav pilnībā noņemts supernatants  Nodrošiniet, lai tiktu noņemts viss supernatants. Ja supernatants tiek noliets, noslaukiet pilienu no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT) malas ar papīra dvieli. Veiciet atbilstošus piesardzības pasākumus, lai nepieļautu krustenisko kontamināciju.
- e) Pēc savākšanas PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) asinis ir inkubētas mazāk nekā 2 stundas  Asinis pēc savākšanas PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) inkubējiet vismaz 2 stundas.

Zema A_{260}/A_{280} vērtība

- a) A_{260}/A_{280} mērījuma veikšanai RNS atšķaidīšanai izmantots ūdens  Izmantojiet 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5, lai atšķaidītu RNS pirms tīrības pakāpes mērīšanas* (sk. B pielikumu 74. lpp.).
- b) Spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts  Nullējiet spektrofotometru, izmantojot tukšu paraugu, kurā ir tāda pati eluēšanas buferšķīduma (BR5) un 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5 buferšķīduma proporcija kā mērāmajos paraugos. Eluēšanas buferšķīdumam (BR5) ir augsta absorbcijas vērtība pie 220 nm, kas var radīt augstu fona absorbcijas līmeni, ja spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts.

* 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.

Komentāri un ieteikumi

Ierīces nepareiza darbība

QIAcube instrumenti
nedarbojās pareizi

Izlasiet atbilstošo QIAcube lietotāja rokasgrāmatu, tīrīšanas uzmanību pievēršot sadaļai par problēmu novēršanu. Nodrošiniet, ka QIAcube instruments tiek pareizi apkopts, kā aprakstīts lietotāja rokasgrāmatā.

A pielikums. Vispārīgas piezīmes par darbu ar RNS

Darbs ar RNS



Ribonukleāzes (RNāzes) ir ļoti stabili un aktīvi enzīmi, kuru darbībai parasti nav nepieciešami kofaktori. RNāzes ir grūti inaktivējamas, un pat ar nelielu daudzumu pietiek, lai noārdītu RNS, tāpēc nedrīkst izmantot plastmasas vai stikla piederumus, pirms tam nenovēršot iespējamo kontamināciju ar RNāzi. Jārīkojas ļoti uzmanīgi, lai RNāzes nejauši nenokļūtu RNS paraugā izdalīšanas procedūras laikā vai pēc tās. Lai izveidotu un uzturētu vidi bez RNāzēm, strādājot ar RNS, priekšapstrādes laikā un lietojot vienreizlietojamus un vairākkārt lietojamus traukus un šķīdumus, jāveic piesardzības pasākumi.

Vispārīga rīkošanās



Strādājot ar RNS, vienmēr jāizmanto atbilstoši mikrobioloģiski, aseptiski paņēmieni. Uz rokām un putekļu daļiņām ir baktērijas un pelējuma sēnītes, kas ir visbiežāk sastopamie kontaminācijas avoti. Strādājot ar reaģentiem un RNS paraugiem, vienmēr valkājiet lateksa vai vinila cimdus, lai novērstu kontamināciju ar RNāzi no ādas virsmas vai putekļaina laboratorijas aprīkojuma. Bieži mainiet cimdus un, kad vien iespējams, turiet stobriņus noslēgtus. Kad alikvotās daļas tiek pipetētas lejuvērstajiem lietojumiem, turiet izdalīto RNS uz ledu.

Protokoli RNāzes kontaminācijas noņemšanai no stikla piederumiem un šķīdumiem ir sniegti vispārīgās molekulārās bioloģijas rokasgrāmatās, piemēram, Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

B pielikums. Summārās RNS kvantifikācija un kvalitātes noteikšana

RNS kvantifikācija

RNS koncentrācija ir jānosaka, mērot absorbciju spektrofotometrā pie 260 nm (A_{260}). Lai nodrošinātu nozīmīgumu, mērījumiem ir jābūt spektrofotometra lineārajā diapazonā. 1 vienības absorbcija pie 260 nm atbilst 44 μg RNS uz ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Šī sakarībā ir spēkā tikai mērījumiem 10 mM Tris-HCl šķīdumā ar pH 7,5*. Tāpēc RNS paraugs ir jāatšķaida ar 10 mM Tris-HCl. Kā aprakstīts tālāk (sk. sadaļu "RNS tīrība" 75. lpp.), attiecība starp absorbcijas vērtībām pie 260 un 280 nm ļauj noteikt RNS tīrību. Mērot RNS paraugus, nodrošiniet, lai kivetes nesaturētu RNāzi. Nullējiet spektrofotometru, izmantojot tukšu paraugu, kurā ir tāda pati eluēšanas buferšķīduma (BR5) un Tris-HCl buferšķīduma proporcija kā mērāmajos paraugos. Eluēšanas buferšķīdumam (BR5) ir augsta absorbcijas vērtība pie 220 nm, kas var radīt augstu fona absorbcijas līmeni, ja spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts. Tālāk ir parādīts RNS kvantifikācijas aprēķina piemērs.

RNS parauga tilpums	=	80 μl
Atšķaidījums (1/15)	=	10 μl RNS parauga + 140 μl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Izmēriet atšķaidītā parauga absorbciju kivetē (bez RNāzes).		
A_{260}	=	0,3
Parauga koncentrācija	=	$44 \times A_{260} \times \text{atšķaidīšanas koeficients}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 $\mu\text{g/ml}$
Kopējais iegūtais daudzums	=	koncentrācija x parauga tilpums mililitros
	=	$198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 μg RNS

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

RNS tīrība

Mērījumu attiecība pie 260 nm un 280 nm (A_{260}/A_{280}) ļauj noteikt RNS tīrību attiecībā uz kontaminantiem, kuri tiek absorbēti UV ietekmē, piemēram, proteīniem. Tomēr A_{260}/A_{280} attiecību būtiski ietekmē pH līmenis. Pie zemāka pH līmeņa A_{260}/A_{280} attiecība ir mazāka un ir samazināts jutīgums pret proteīnu kontamināciju.* Lai iegūtu precīzas vērtības, ieteicams mērīt absorbciju 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5. Tīrai RNS A_{260}/A_{280} attiecība 10 mM Tris-HCl šķīdumā ar pH 7,5 ir 1,8–2,2. Nullējiet spektrofotometru, izmantojot tukšu paraugu, kurā ir tāda pati eluēšanas buferšķīduma (BR5) un Tris-HCl buferšķīduma proporcija kā mērāmajos paraugos. Eluēšanas buferšķīdumam (BR5) ir augsta absorbcijas vērtība pie 220 nm, kas var radīt augstu fona absorbcijas līmeni, ja spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts.

* 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.

C pielikums. Darbs ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT)



Tālāk sniegtie uzņēmuma BD ieteikumi var būt noderīgi, strādājot ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT). Plašāku informāciju par PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT) skatiet *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmātā*.

Instrukcijas par BD Hemogard aizdaru noņemšanu

1. Vienā rokā satveriet PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT), novietojot īkšķi zem BD Hemogard aizdares. (Papildu stabilitātei atbalstiet roku pret stingru virsmu.) Ar otru roku pagrieziet BD Hemogard aizdari un vienlaikus bīdīet to uz augšu ar otras rokas īkšķi TIKAI TIK ILGI, LĪDZ STOBRIŅA AIZBĀZNIS IR ATBRĪVOTS.
2. Noņemiet īkšķi pirms aizdares pacelšanas. NENOĪDIET aizdari no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT) ar īkšķi. Uzmanību! Ja PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) ir asinis, pastāv saskares risks. Lai, noņemot aizdari, nesavainotos, ir svarīgi, lai īkšķis, ar kuru aizdare tiek stumta uz augšu, tiktu noņemts no saskares vietas ar PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT), tiklīdz BD Hemogard aizdare ir atbrīvota.
3. Noņemiet aizdari no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT). Maz ticamajā gadījumā, ja plastmasas aizsargs atdalās no gumijas aizbāžņa, NECENTĪTIES SALIKT AIZDARI ATPAKAĻ. Uzmanīgi izņemiet gumijas aizbāzni no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT).

Norādījumi par sekundārās BD Hemogard aizdares ievietošanu

1. Nomainiet PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT) aizdari.
2. Pagrieziet un stingri spiediet uz leju, līdz aizbāznis ir pilnībā ievietots atpakaļ. Aizbāznis ir pilnībā jāievieto atpakaļ, lai aizdare apstrādes laikā stingri turētos uz PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT).

Informācija par pasūtīšanu

Produkts	Saturs	Kat. nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene centrifūgas stobriņi, 50 Shredder centrifūgas stobriņi, apstrādes stobriņi, DNāze I bez RNāzes, reaģenti un buferšķīdumi bez RNāzes. Lietošanai kopā ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 asins savākšanas stobriņi	762165
Saisītās preces, ko var pasūtīt no uzņēmuma QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Komplektā iekļauti: reaģentu pudeļu statīvi (3); sloksnes statīvu marķēšanai (8); 200 µl filtru uzgaļi (1024); 1000 µl filtru uzgaļi (1024); 1000 µl liela diametra filtru uzgaļi (1024); 30 ml reaģentu pudeles (18); rotora adapteri (240); rotora adapteru turētājs	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Sterili, vienreizlietojami filtru uzgaļi, statīvos	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reaģentu pudeles (30 ml) ar vāciņiem; komplektā 6 gab.; lietošanai ar QIAcube instrumenta reaģentu pudeļu statīvu	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	240 paraugu sagatavošanai: 240 vienreizlietojami rotora adapteri; lietošanai ar QIAcube instrumentiem	990394

Produkts	Saturs	Kat. nr.
Reagent Bottle Rack	Statīvs, kurā QIAcube instrumenta darba platē ievietot 6 x 30 ml reaģentu pudeles	990390
Rotor Adapter Holder	Turētājs 12 vienreizlietojamiem rotora adapteriem; lietošanai ar QIAcube instrumentiem	990392
Saistītās preces, ko var pasūtīt no uzņēmuma BD*		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,8 × 19 mm adata, 305 mm caurulīte ar Luer adapteri; 50 gab. kastītē, 200 gab. kārbā	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Ar diametru 13 mm un 16 mm pieejami tikai kārbā; 1000 gab. kārbā	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4,0 ml stobriņi ar sarkanu BD Hemogard aizdari un papīra etiķeti; 100 gab. kastītē, 1000 gab. kārbā	368975

* Šie asins paraugu savākšanas piederumi ir tipiski produkti, ko var izmantot kopā ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT). Lai uzzinātu vairāk par šiem piederumiem, tostarp to pasūtīšanu, apmeklējiet vietni www.preanalytix.com.

Jaunāko informāciju par licencēšanu un preču juridiskās atrunas skatiet attiecīgā PreAnalytiX vai QIAGEN komplekta rokasgrāmatā vai lietotāja instrukcijā. PreAnalytiX un QIAGEN komplektu rokasgrāmatas un lietotāja rokasgrāmatas ir pieejamas vietnēs www.preanalytix.com un www.qiagen.com, vai arī tās var pieprasīt PreAnalytiX tehniskā atbalsta dienestam.

Rokasgrāmatas pārskatījumu vēsture

Dokuments un pārskatījums	Izmaiņas	Datums
HB-0101-004, R2	Izmaiņas visā dokumentā, lai nodrošinātu atbilstību GHS noteikumiem	2015. gada jūnijs
HB-0101-005, R3	Jauna veidne; pārskatīts automatizētais protokols un veikspējas dati; drošības informācija atjaunināta, lai nodrošinātu atbilstību GHS noteikumiem; izmaiņas informācijā par ierīci un paziņojumā par produkta izmantošanas ierobežojumiem.	2019. gada februāris
HB-0101-006, R3	Komplekta nosaukuma labojums komplekta komponentu tabulā 5. lpp.	2020. gada janvāris
HB-0101-007, R4	Automatizētajam protokolam pievienots QIAcube Connect MDx; visā dokumentā atjaunināts formulējums, lai iekļautu atsauci uz QIAcube Connect MDx; visā dokumentā atjaunināti tabulu, lappušu un attēlu numuri.	2020. gada decembris

PreAnalytiX Worldwide

PreAnalytiX produktus izplata uzņēmumi QIAGEN un BD

QIAGEN – Klientu apkalpošanas dienests

Pasūtīšana www.QIAGEN.com/shop | Tehniskais atbalsts support.qiagen.com | Tīmekļa vietne www.qiagen.com

BD – Klientu apkalpošanas dienests

Argentīna, Urugvaja un Paragvaja

Pasūtījumi: 0800.444.5523

E-pasts: crc_argentina@bd.com

Austrālija

Pasūtījumi: 1.800.656.100

Fakss: 1.800.656.110

E-pasts: bd_anz@bd.com

Austrija

Pasūtījumi: 43.1.7063660

Fakss: 43.1.706366011

E-pasts: customercare.at@bd.com

Beļģija

Pasūtījumi: 32.53.720.556

Fakss: 32.53.720.549

E-pasts: orders.be@bd.com

Brazīlija

Pasūtījumi: 0800.055.56.54

E-pasts: consultoria_vacutainer@bd.com

Kanāda

Tehniskais atbalsts: 1.800.631.0174

Pasūtījumi: 1.866.979.9408

Fakss: 1.800.565.0897

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

Centrālā Eiropa un Austrumeiropa

Pasūtījumi: 48.22.377.11.11

Fakss: 48.22.377.11.02

Bulgārija, pasūtījumi: info_bulgaria@bd.com

Cēhija, pasūtījumi: info_czech@bd.com

Horvātijā, pasūtījumi: info_croatia@bd.com

Ungārijā, pasūtījumi: info_hungary@bd.com

Polijā, pasūtījumi: info_poland@bd.com

Rumānijā, pasūtījumi: info_romania@bd.com

Dienvideiropa, pasūtījumi: info_balkan@bd.com

Serbijā, pasūtījumi: info_serbia@bd.com

Slovākijā, pasūtījumi: info_slovakia@bd.com

Slovēnijā, pasūtījumi: info_slovenia@bd.com

Dānija

Pasūtījumi: 45.43.43.45.66

Fakss: 45.43.96.56.76

Pasūtījumi: ordre.dk@bd.com

Tehniskais atbalsts: bdedenmark@bd.com

Somija

Pasūtījumi: 358.9.88.70.780

Fakss: 358.9.88.70.7816

Pasūtījumi: tilaukset.fi@bd.com

E-pasts: bdsuomi@bd.com

Francija

Pasūtījumi: 33.476.68.36.36

Fakss: 33.476.68.36.93

E-pasts: serviceclientbdf@bd.com

Pasūtījumi: commandesfr@bd.com

Tehniskais atbalsts: vacutainerfr@bd.com

Vācija

Pasūtījumi: 49.6221.3050

Fakss: 49.6221.305.216

E-pasts: customercare.de@bd.com

Indija

Pasūtījumi: 91.124.3949390

Pasūtījumi: bd_india@bd.com

Īrija (Aquilant Specialist Healthcare Services)

Klientu atbalsts: 353.1.404.8350

Fakss: 353.1.404.8352

E-pasts: contactus@aquilantscientific.ie

Izraēla (Lapidot Medical)

Klientu atbalsts: 972.700.70.90.22

E-pasts: cs@lapidot.com

Itālija

Pasūtījumi: 39.02.48240.500

Fakss: 39.02.48240.775

Tehniskais atbalsts: 39.3450655140

E-pasts: ordini.it@bd.com

Tuvie Austrumi un Āfrika

Pasūtījumi: 971.45.592.555

Fakss: 971.45.592.599

E-pasts: EMA_PAS@bd.com

Nīderlande

Pasūtījumi: 31.20.582.94.20

Fakss: 31.20.582.94.21

Pasūtījumi: orders.nl@bd.com

Jaunzēlande

Pasūtījumi: 0800.572.468

Fakss: 0800.572.469

E-pasts: nz_customerservice@bd.com

Norvēģija

Klientu atbalsts: 64.00.99.00

E-pasts: bdnorge@bd.com

Pasūtījumi: ordre.no@bd.com

Dienvidaustumāzija

E-pasts: PAS_SEA@bd.com

Indonēzija, pasūtījumi: 622.1577.1920

Malaizija, pasūtījumi: 603.2093.8788

Filipīnas, pasūtījumi: 63.2478.8881

Singapūra, pasūtījumi: 65.6861.0633

Taizeme, pasūtījumi: 662.646.1800

Vjetnama, pasūtījumi: 848.3822.7409

Dienvīdijoreja

Pasūtījumi: 02.3404.3706

Fakss: 02.3404.3785

Tehniskais: 02.3404.3706

Tehniskais atbalsts: Korea_PAS@bd.com

Spānija, Portugāle un Andora

Pasūtījumi: 34.91.848.8174

Klientu atbalsts: 34.902.27.17.27

Fakss: 34.91.848.8115

E-pasts: info.spain@bd.com

Zviedrija

Pasūtījumi: 46.8.775.51.00

Fakss: 46.8.645.08.08

Pasūtījumi: order.se@bd.com

Tehniskais atbalsts: bdswweden@bd.com

Šveice

Pasūtījumi: 41.61.485.22.24

Fakss: 41.61.485.22.00

E-pasts: infoch@bd.com

Apvienotā Karaliste

Pasūtījumi: 0800.917.8776

E-pasts: bduk_customerservice@bd.com

ASV

Klientu atbalsts: 800.631.0174

E-pasts: productcomplaints@bd.com



A QIAGEN / BD Company