

December 2020

Handbok PAXgene® Blood RNA Kit

Version 2



50 (katalognr. 762174)

R4 **MAT** 1122120SE

REF 762174

IVD

CE



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Producerad av QIAGEN GmbH för PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

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

PAXgene Blood RNA Kit är inte tillgängligt i alla länder. Be gärna om mer information.

Begränsat licensavtal

Användning av denna produkt innebär att köparen eller användaren av PAXgene Blood RNA Kit godkänner följande villkor:

1. PAXgene Blood RNA Kit får endast användas i enlighet med handboken *PAXgene Blood RNA Kit* och endast tillsammans med produkter som ingår i kitet. PreAnalytiX ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte är inkluderade i detta kit förutom det som beskrivs i handboken *PAXgene Blood RNA Kit* och ytterligare protokoll som finns på www.preanalytix.com.
2. Förutom de uttryckta licenserna kan PreAnalytiX inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Kitet och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. PreAnalytiX avsäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckta eller underförstådda, förutom de specifikt stipulerade.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan.
6. PreAnalytiX kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol, och skall ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inkluderat advokatskostnad, vid eventuellt försök att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av sina immateriella rättigheter avseende satsen och/eller någon av dess komponenter.

Uppdaterade licensvillkor finns på www.preanalytix.com.

Villkorlig försäljning

Den aktuella produkten levereras med en licens under vissa krav i US-7,270,953 och US-7,682,790, såväl som EP-1820793 B1 och utländska motsvarigheter till dessa patentkrav, för att använda produkten för bearbetning av det nukleinsyrakomplex som bildas under provtagning i ett PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, med ensamrätt.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Schweiz

www.preanalytix.com

PreAnalytiX-distributörer

PreAnalytiX produkter produceras och distribueras av QIAGEN eller BD för PreAnalytiX. Produkterna kan inte beställas av PreAnalytiX GmbH.


Adressen till din lokala PreAnalytiX-distributör finner du på sista sidan.

Innehåll

Kitinnehåll.....	5
Symboler	6
Förvaring.....	7
Avsedd användning.....	8
Begränsningar för produktanvändning	8
Kvalitetskontroll	9
Teknisk hjälp	9
Säkerhetsinformation.....	9
Inledning	13
Princip och utförande.....	13
Provtagning och stabilisering	14
RNA koncentration och rening	19
Manuell RNA-rening	19
Automatiserad RNA-rening	29
Utrustning och reagenser som ska tillhandahållas av användaren.....	38
Viktiga anmärkningar.....	41
Använda QIAcube-instrument.....	41
Installation av protokoll på QIAcube-instrument	44
Laddning av QIAcube-instrument	45
Protokoll: Manuell rening av totalt RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	55

Protokoll: Automatisk rening av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	62
Felsökningsguide	69
Bilaga A: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering	71
Bilaga B: Bestämning av mängd och kvalitet av Total RNA	72
Bilaga C: Hantering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	74
Beställningsinformation	75
Handbokens revisionshistorik	77

Kitinnehåll

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalognr			762174
Antal beredningar			50
BR1	Resuspension Buffer (Återsuspenderingsbuffert)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Bindningsbuffert) *	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer (Tvättbuffert) 1 *	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Tvättbuffert 2 (koncentrat)†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Elueringsbuffert)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (bottle) (RNase-fritt vatten (flaska))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinas K) (grönt lock)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA-kolonner) (röd)	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 ml) (Reaktionsrör) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Sekundär BD Hemogard™-förslutning)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Mikrocentrifugrör) (1,5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNase I, fritt från RNase) (frostorkat)	DNA REM	1500 Kunitz units*
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA Digestionsbuffert) (vitt lock)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (DNase återsuspenderingsbuffert) (rör, lila lock)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (PAXgene Shredder-kolonner) (lila)	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Handbok	PAXgene Blood RNA Kit-handbok (Version 2)		1

* Får ej komma i kontakt med desinfektionsmedel som innehåller blekmedel. Innehåller guanidinsalt. Säkerhetsinformation finns på sidan 10.

† Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Tillsätt den fyrfaldiga volymen etanol (96-100 %, renhetsgrad p. a.) till flaskan (som etiketten anger) innan den används första gången för att framställa den bruksfärdiga arbetslösningen.

Symboler



Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> test



Läs bruksanvisningen innan användning



Utgångsdatum



In vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



Komponenter



Antal



Sterilisering genom UV-bestrålning



Kunitz units



Tillsätta



Innehåller












Rekonstituerad



Deoxyribonukleas I

* Kunitz units är det mått som vanligtvis används för att mäta DNase I och definieras som den mängd DNase I som ger en ökad A_{260} på 0,001 per minut och milliliter vid 25 °C, pH 5,0 med högpolymeriserat DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 och 363).

	Etanol
	Guanidinisotiocyanat
	RNase-Free DNase Set
	GS-artikelnnummer
	Får ej återanvändas
	Temperaturbegränsning
	Övre temperaturgräns
	Tillverkare
	Viktig anmärkning

Förvaring

PAXgene RNA-kolonner (PRC), PAXgene Shredder-kolonner (PSC), proteinas K (PK) och buffertar (BR1, BR2, BR3, BR4 och BR5) ska förvaras torrt och vid den temperatur som anges på etiketten.

RNase-Free DNase Set, som innehåller DNase I (RNFD), DNA-digestionsbuffert (RDD) och DNase återsuspenderingsbuffert (DRB) skickas i rumstemperatur. Direkt efter transporten skall alla komponenter som tillhör RNase-Free DNase Set förvaras i den temperatur som anges på etiketten. Vid korrekt förvaring är kitet hållbart fram till utgångsdatumet på kitförpackningen.

Avsedd användning

PAXgene Blood RNA System består av blodprovtagingsrör (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) och kitet (PAXgene Blood RNA Kit) för rening av nukleinsyra. Systemet används för tagning, förvaring och transport av blod, stabilisering av intracellulärt RNA i slutna provrör och påföljande isolering och rening av värd-RNA ur helblod för RT-PCR som används vid molekylärdiagnostiska test.

Prestandaegenskaper för PAXgene Blood RNA System har endast fastställts för FOS- och IL1B-gentranskript. Användaren är ansvarig för att fastställa lämpliga prestandaegenskaper för PAXgene Blood RNA System för andra måltranskriptioner.

Indikationer för användning

PAXgene Blood RNA Kit används för rening av intracellulärt RNA från helblod som samlats in med PAXgene Blood RNA Tube (BRT). När satsen används med PAXgene Blood RNA Tube (BRT), ger systemet renat intracellulärt RNA ur helblod för RT-PCR som används i molekylärdiagnostiska tester.

Begränsningar för produktanvändning

PAXgene Blood RNA Kit är avsett som hjälpmedel för rening av intracellulärt RNA ur humant helblod ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocyter/ml) för in vitro-diagnostisk användning. Det är inte avsett för rening av genom-DNA eller virala nukleinsyror ur humant helblod. Prestandaegenskaper har inte fastställts för alla transkript, eftersom endast ett begränsat antal RNA-transkript (FOS- och IL1B-gentranskript) har validerats för stabiliseringsvillkor. Användaren ska granska tillverkarens uppgifter samt sina egna data för att fastställa om andra transkript behöver valideras.

Produkten är avsedd att användas professionellt av t.ex. tekniker och läkare som har utbildning i diagnostiska in vitro-procedurer.

Se *PAXgene Blood RNA Tube-handboken* för information om hur PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) används.

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lot PAXgene Blood RNA Kit med fastlagda testkriterier enligt QIAGEN:s ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

Teknisk hjälp

Vi på QIAGEN är stolta över vår tekniska supports kvalitet och tillgänglighet. Erfarna vetenskapare på vår tekniska serviceavdelning hjälper gärna vid frågor angående PreAnalytiX produkter. Kontakta oss om du har frågor angående PAXgene Blood RNA Kit.

Även för fördjupad information står den tekniska servicen hos QIAGEN gärna till förfogande.

Säkerhetsinformation

EU – Användaren ska rapportera eventuella allvarliga händelser förknippade med enheten till tillverkaren och nationell behörig myndighet. Utanför EU – Kontakta din lokala QIAGEN-representant vad gäller eventuella händelser eller frågor förknippade med enheten.

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier.

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon även vid hantering av biologiskt eller kemiskt material, för att minimera risken för infektion (t.ex. av HIV eller Hepatit-B-virus) eller skada. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheet, SDS). De finns tillgängliga i praktiskt PDF-format online på www.preanalytix.com, där du kan hitta, visa och skriva ut säkerhetsdatablad för detta kit.

FÖRSIKTIGHE



Tillsätt INTE blekmedel eller sura lösningar direkt till provberedningsavfall.

Bindningsbuffert (BR2) och tvättbuffert 1 (BR3) innehåller guanidinisotiocyanat, som kan reagera starkt med blekmedel. Om en vätska som innehåller bindningsbuffert (BR2) och tvättbuffert 1 (BR3) spills ut, skall utsatta ytor tvättas med lämpliga laboratorierengöringsmedel och vatten. Om vätska som innehåller potentiellt smittsamma ämnen spills ska berörda ytor först rengöras med rengöringsmedel och vatten och därefter med 1 % (v/v) natriumhypoklorit (blekmedel).

RNA-stabiliseringslösningen och blodvätskan från PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan desinficeras med 1 volym kommersiell blekmedelslösning (5 % natriumhypoklorit) till 9 volymer RNA-stabiliseringslösning och blodvätska.

Avfall från RNA-preparering, t.ex. supernatanter efter centrifugeringssteg, ska alltid anses som potentiellt smittbärande. För att förstöra smittbärande material ska avfall därför först autoklaveras eller förbrännas innan det slängs. Beakta i varje fall gällande föreskrifter och riktlinjer angående avfallshantering.

Följande information om risker och försiktighetsåtgärder gäller för komponenter i PAXgene Blood RNA Kit. Se *PAXgene Blood RNA Tube-handboken* för säkerhetsinformation om PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

BR2-buffert



Innehåller: guanidinisotiocyanat. Fara! Farligt vid förtäring. Kan vara skadligt vid hudkontakt eller inandning. Orsakar allvarlig ögonskada. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt att göra. Fortsätt att skölja. Kontakta omedelbart GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare.

BR3-buffert



Innehåller: etanol, guanidintiocyanat. Fara! Brandfarlig vätska och ånga. Orsakar allvarlig ögonskada. Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra. Får inte utsättas för värme/gnistor/öppen låga/heta ytor. Rökning förbjuden. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt att göra. Fortsätt att skölja. Kontakta omedelbart GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare.

DNase I



Innehåller: DNase. Fara! Kan orsaka allergisk hudreaktion. Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. Andas inte in damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningskydd. Vid exponering eller oro: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. Flytta personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en ställning som underlättar andningen.

Proteinas K



Innehåller: proteinas K. Fara! Orsakar lindrig hudirritation. Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. Andas inte in damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningskydd. Vid exponering eller oro: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. Flytta personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en ställning som underlättar andningen.

Inledning

Hos många molekylärbio­logiska undersökningar av cellulärt RNA är tagning av helblod det första steget. Ett stort problem härvid är instabiliteten hos den cellulära RNA-profilen in vitro. Undersökningar hos PreAnalytiX har visat att antalet kopior av enskilda mRNA-varianter i helblod kan variera mer än tusenfalt under transport eller förvaring vid rumstemperatur.* Detta beror på snabb RNA-nedbrytning och inducerat uttryck hos särskilda gener efter att blod tagits. Sådana förändringar av RNA-profilen förhindrar tillförlitliga resultat vid studier av genuttrycket. Detta gör en metod för att bevara RNA-uttrycksprofilen under och efter blodtagning för en noggrann genuttrycksanalys av humant helblod essentiell.

Princip och utförande

PreAnalytiX har utvecklat ett system som möjliggör tagning, stabilisering, förvaring och transport av humant helblod, tillsammans med ett snabbt och effektivt protokoll för rening av intracellulärt RNA. Systemet kräver användning av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; amerikanska patent 6,602,718 och 6,617,170) för blodtagning och RNA-stabilisering samt PAXgene Blood RNA Kit för efterföljande manuell eller automatiserad RNA-rening. Både manuella och automatiserade protokoll erbjuder i stort motsvarande prestanda avseende RNA-kvalitet och -utbyte. Prestandadata för det manuella protokollet (sidorna 22–29) och det automatiserade protokollet (sidorna 31–35) är inkluderade i denna handbok.



QIAGEN QIAcube Connect MDx är inte tillgängligt i alla länder. Kontakta QIAGEN teknisk service för ytterligare information.

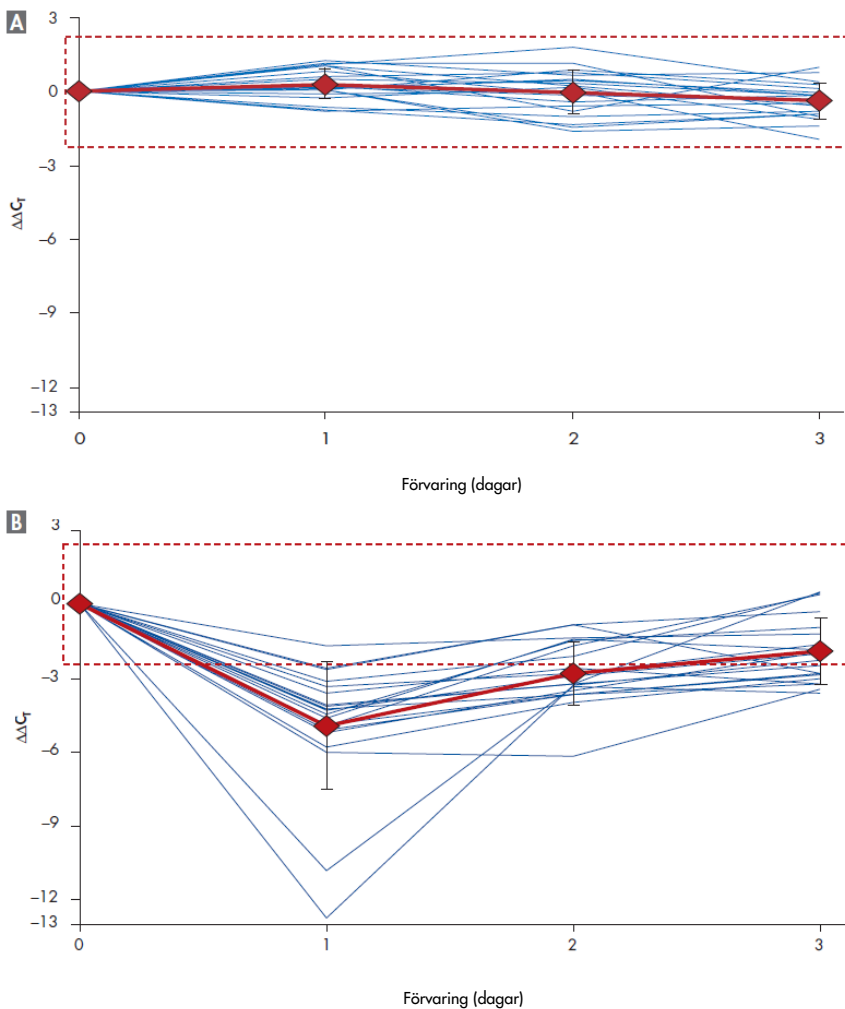
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Provtagning och stabilisering

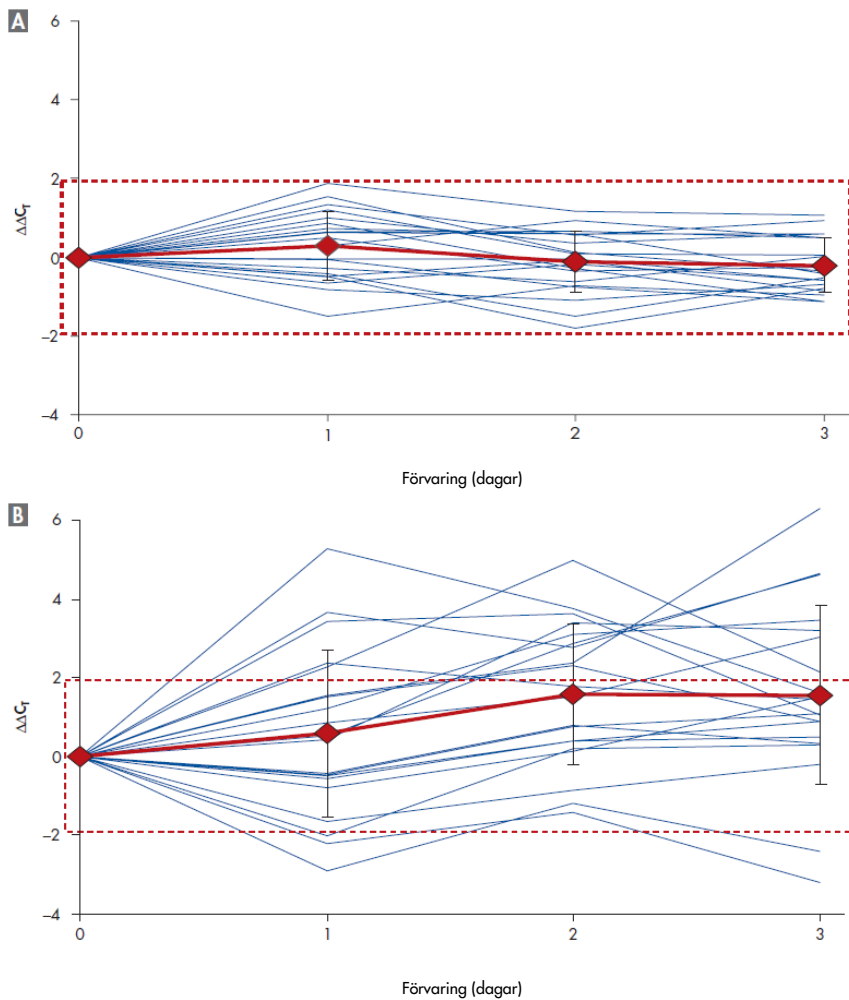
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) innehåller en reagens som baserar på en patenterad RNA-stabiliseringsmetod. Denna reagens skyddar RNA-molekyler mot Rnase orsakad nedbrytning och reducerar ex vivo-förändringar i genuttrycket till ett minimum. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) är avsedda för provtagning av humant helblod och stabilisering av cellulärt RNA i upp till 3 dagar vid 18–25 °C (figur 1 och 2, sid. 15 och 16) eller upp till 5 dagar vid 2–8 °C (figur 3 och 4, sid. 17 och 18). För närvarande visar föreliggande data att cellulärt RNA är stabilt i minst 11 år vid –20 °C eller –70 °C*. Ytterligare information angående studier av stabiliteten efter ännu längre tidsperioder kan erhållas av den tekniska servicen hos QIAGEN.

Den faktiska tiden av RNA-stabiliseringen kan variera beroende på RNA-varianten och den därpå följande applikationen. Prestandaegenskaper har inte fastställts för alla transkript, eftersom endast ett begränsat antal RNA-transkript (FOS- och IL1B-gentranskript) har validerats för stabiliseringsvillkor. Användaren ska granska tillverkarens uppgifter samt sina egna data för att fastställa om andra transkript behöver valideras.

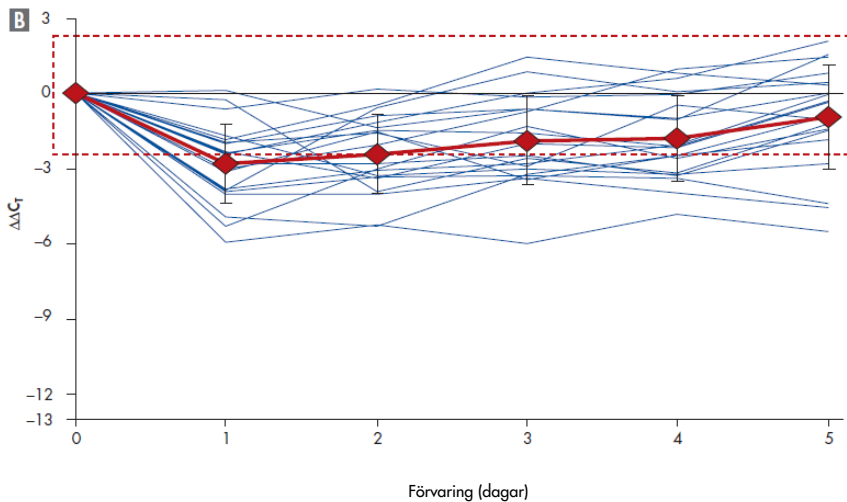
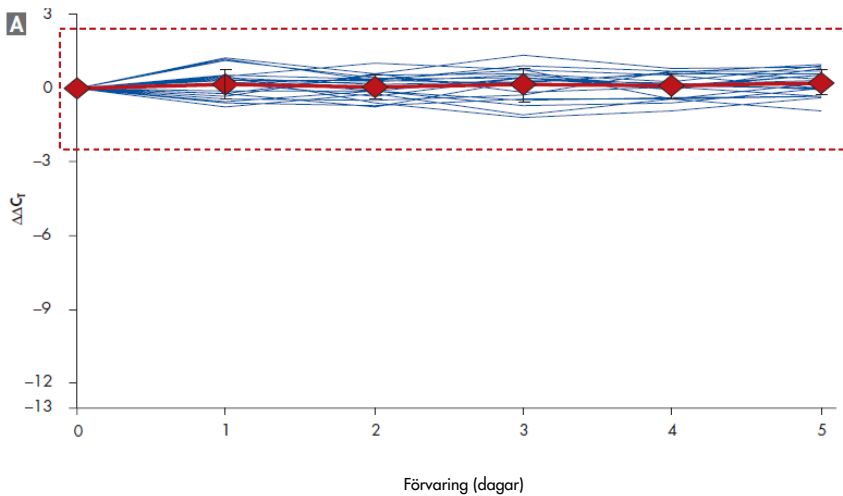
* En långtidsstudie av blodförvaring i PAXgene Blood RNA Tubes pågår.



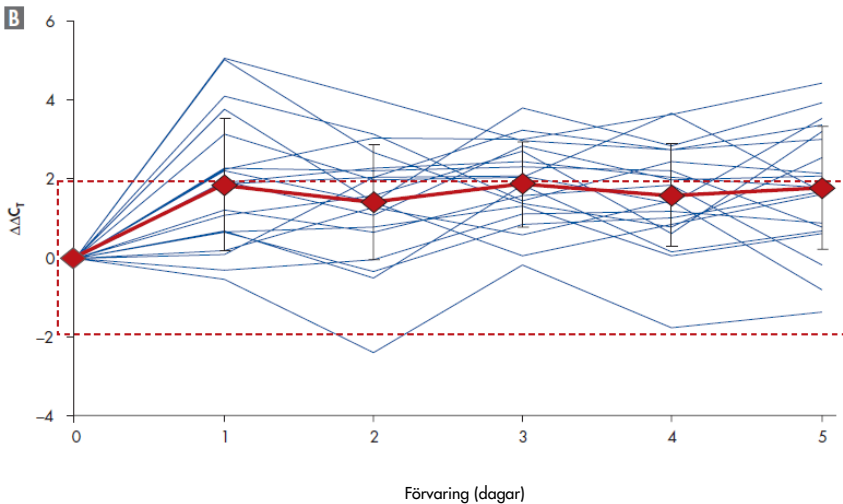
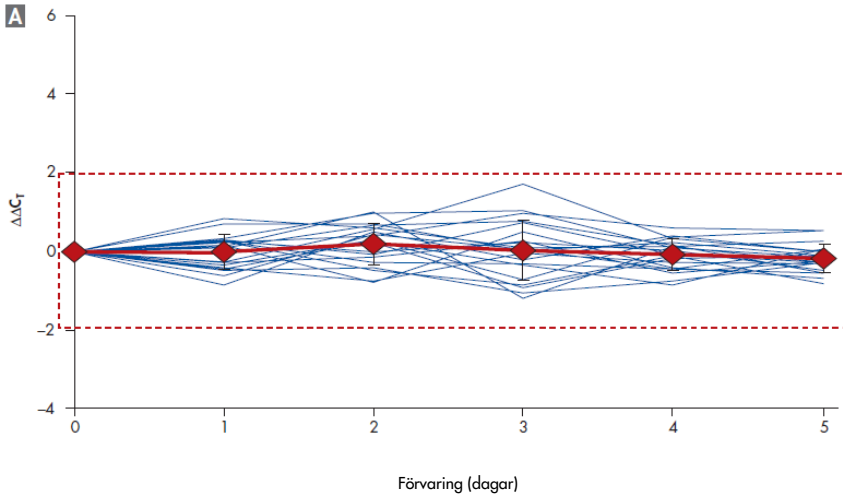
Figur 1. RNA-stabilitet i blodprov vid 18-25 °C: FOS. Blodprov från 10 givare förvarades i angivet antal dagar vid 18-25 °C, innan total RNA renades. Alla prov togs i duplikat. **[A]** Blodtagning och förvaring i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rening av total RNA med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blodprov togs och förvarades i standardblodprovsrör med EDTA som antikoaguleringsmedel och totalt RNA renades fram med en organisk standardextraktionsmetod och silikonbaserad membran-RNA-upprening. Relativ FOS-transkriptionsnivå bestämdes via realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. De analyserade provernas värden är angivna med medelvärde och standardavvikelse. Den streckade linjen anger området för metodens mät noggrannhet $\pm 3 \times$ total precision (2.34 C_t).



Figur 2. RNA-stabilitet i blodprov vid 18-25 °C: IL1B. Blodprov togs och totalt RNA renades fram efter förvaring vid 18–25 °C så som beskrivs i figur 1. De relativa koncentrationerna IL1B-transkription bestämdes genom realltids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. De analyserade provernas värden är angivna med medelvärde och standardavvikelse. Den streckade linjen anger området för metodens mätnoggrannhet $\pm 3 \times$ total precision (1.93 C_T).



Figur 3. RNA-stabilitet i blodprov vid 2-8°C: FOS. Blodprov från 10 givare förvarades i angivet antal dagar vid 2-8°C, innan total RNA renades. Alla prov togs i duplikat. **[A]** Blodtagning och förvaring i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rening av total RNA med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blodprov togs och förvarades i standardblodprovsrör med EDTA som antikoaguleringsmedel och totalt RNA renades fram med en organisk standardextraktionsmetod och silikonbaserad membran-RNA-upprening. Relativ FOS-transkriptionsnivå bestämdes via realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. De analyserade provernas värden är angivna med medelvärde och standardavvikelse. Den streckade linjen anger området för metodens mätnoggrannhet $\pm 3 \times$ total precision ($2.34 C_T$).



Figur 4. RNA-stabilitet i blodprov vid 2-8°C: IL1B. Blodprov togs och totalt RNA renades fram efter förvaring vid 2-8°C så som beskrivs i figur 3. De relativa koncentrationerna IL1B-transkription bestämdes genom realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. De analyserade provernas värden är angivna med medelvärde och standardavvikelse. Den streckade linjen anger området för metodens mätnoggrannhet $\pm 3 \times$ total precision (1.93 C_T).

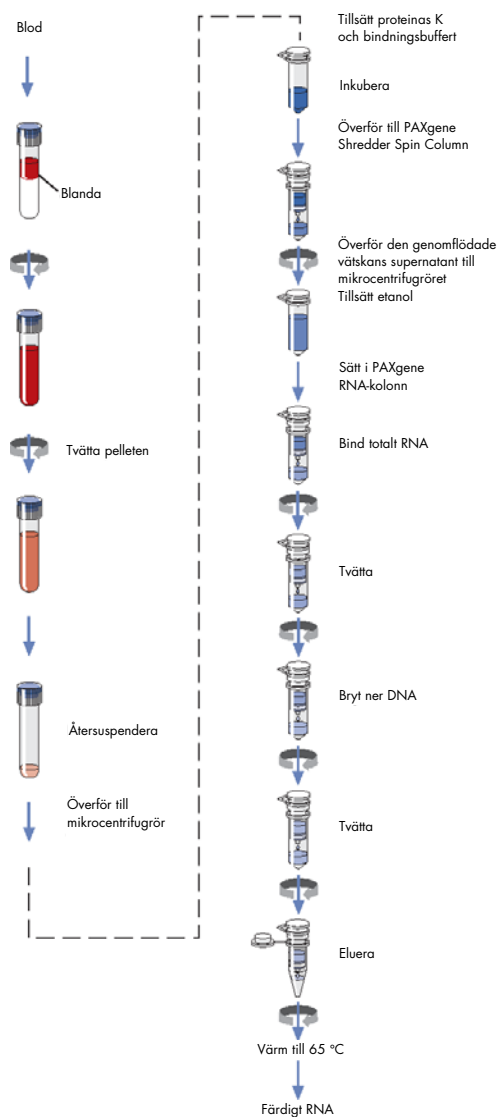
RNA koncentration och rening

PAXgene Blood RNA Kit används för att rena total RNA ur 2,5 ml humant helblod som samlats i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Proceduren är enkel och kan utföras antingen manuellt eller automatiserat (se figur 5 och 10, sid. 20 och 30). I båda fallen påbörjas reningen med en centrifugering för att sedimentera nukleinsyror i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pelleten blir tvättad och återsuspenderad, följt av manuell eller automatisk RNA-rening. I princip följer båda protokollen samma förfarande med samma satskomponenter.

Manuell RNA-rening

Den återsuspenderade pelleten blir inkuberad i optimerad buffert med proteinas K (PK), för att digester proteiner. Ytterligare en centrifugering med PAXgene Shredder-kolonnen (PSC) tjänar syftet att homogenisera cellysatet och avlägsna rester av celldebris. Supernatanten av filtratfraktionen förs över till ett nytt mikrocentrifugrör. Etanol tillsätts för att skapa optimala bindningsförhållanden, och lysatet appliceras på en PAXgene RNA-kolonn (PRC). Vid den påföljande korta centrifugeringen binder RNA selektivt på PAXgene-silikonmembranet under pågående kontamination. Resterande kontaminationer avlägsnas genom flera effektiva tvättsteg. Mellan det första och andra tvättsteget inkuberas membranet med DNase I (RNFD), för att avlägsna eventuellt bundna DNA-rester. Efter tvättstegen blir RNA eluerad i elueringsbuffert (BR5) och värmedenaturerad.

Totalt RNA som isolerats med PAXgene Blood RNA System är rent. Med det manuella protokollet ligger A_{260}/A_{280} -värdena mellan 1,8 och 2,2 och $\leq 1\%$ (w/w) genomiskt DNA finns i $\geq 95\%$ av alla prover, uppmätt med kvantitativ real-time PCR av en sekvens i beta-aktinogenen. Minst 95 % av proverna visar ingen hämning i RT-PCR, vid användning av upp till 30 % av eluatet.

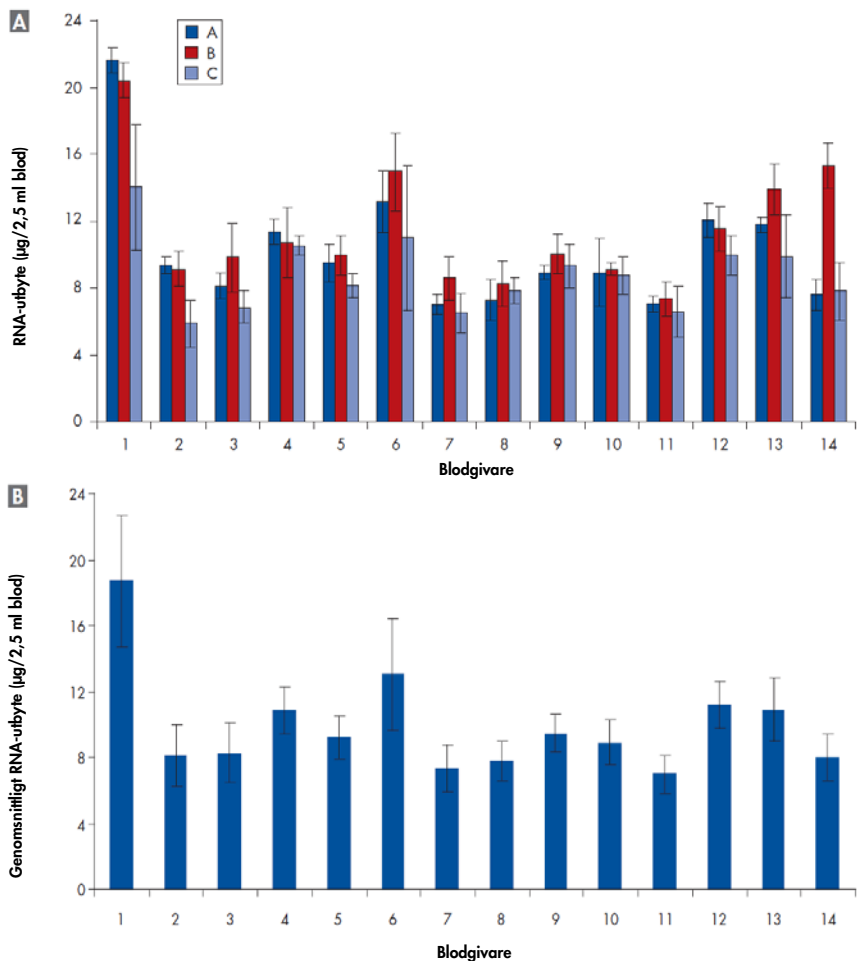


Figur 5. Den manuella PAXgene Blood RNA-proceduren.

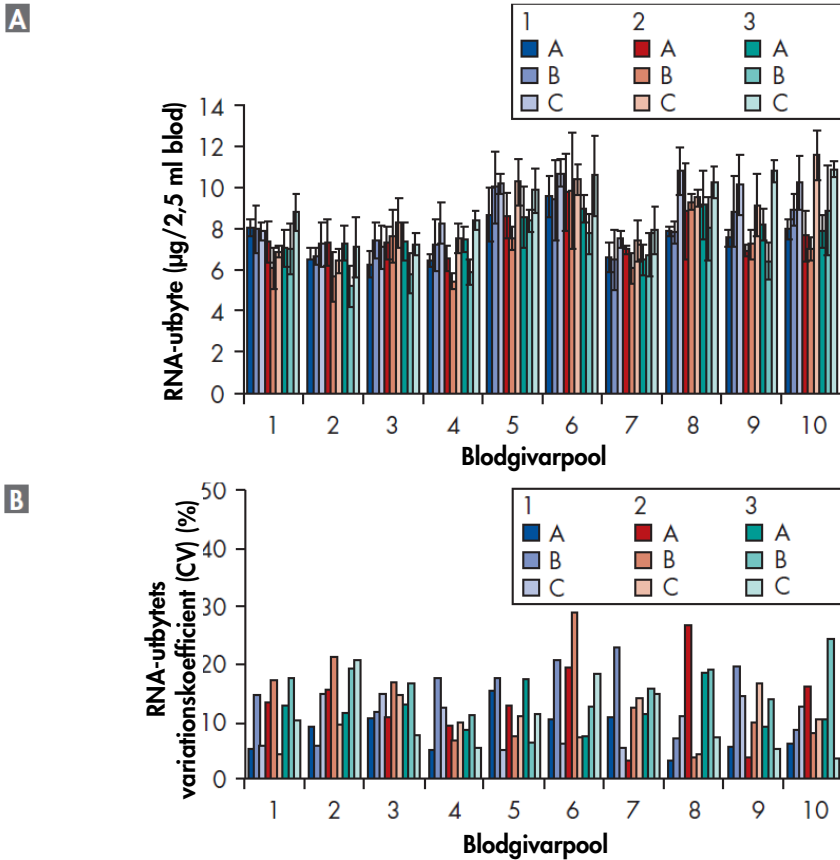
Vid användning av det manuella protokollet är den genomsnittliga tiden för provberedning (baserat på 12 genomförda RNA-preparationer) ca 90 minuter*, därav utgör ren hanteringstid ca 40 minuter. Hos mer än 95 % av de bearbetade proven är RNA-utbytet av friska givare $\geq 3 \mu\text{g}$ ur 2,5 ml helblod. Eftersom utbytet till stor del beror på givaren, kan det enskilda RNA-utbytet variera. Vid undersökning av enskilda blodgivare ger PAXgene Blood RNA System mycket reproducerbara och repeterbara resultat (se figur 6 och 7, sid. 22 och 23) samt reproducerbar och repeterbar RT-PCR (se figur 8 och 9, sid. 27 och 28), vilket gör att den är robust för kliniska diagnostiska tester.

Figur 6 (sid. 22) visar övergripande repeterbarhet och reproducerbarhet hos PAXgene Blood RNA System. Ytterligare studier gjordes för att visa hur olika lotnummer av PAXgene Blood RNA Kit och olika användare påverkar RNA-utbytets reproducerbarhet och real-time RT-PCR-resultatet. Eftersom poolade blodprov användes för dessa studier istället för enskilda PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) återspeglar resultatet inte systemets repeterbarhet, inklusive fluktuationer mellan olika blodtagningar, utan endast repeterbarheten hos provberedningen (se figur 7, sid. 23).

* Total protokolltid, inklusive initial hantering av PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugeringar, pellettvätt och pelletättersuspendering).



Figur 6. Reproducerbar och repeterbar RNA-rening. Fyra replikat av blodproven från 14 givare bearbetades manuellt av 3 olika laboranter (A, B, C). Därvid användes tre olika satser laboratorieutrustning, varvid en laborant endast använde en och samma utrustningssats för provbearbetningen. **[A]** Genomsnittligt RNA-utbyte och standardavvikelse per replikatprov från samma blodgivare och olika laborarietekniker visas. **[B]** Tolv blodprovreplikater från 14 blodgivare behandlades av 3 olika laborarietekniker. Genomsnittligt RNA-utbyte och standardavvikelse per prov från samma blodgivare och alla laborarietekniker visas. Hos alla RNA-proven låg A_{260}/A_{280} -absorptionsförhållandet mellan 1,8 och 2,2.



Figur 7. Repeterbarhet och reproducerbarhet av RNA-utbyte med olika laboranter och olika lotnummer av PAXgene Blood RNA Kit med poolade blodprov. Blodprov från 30 givare samlades i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) (12 rör per givare, dvs. totalt 360 rör). Innehållet i alla rör av vardera 3 givare blev poolat och i anslutning åter alikvoterat till 36 prov. Dessa 36 proven per pool av tre givare upparbetades manuellt av tre olika laboranter. Varje laborant använde PAXgene Blood RNA Kit ur tre olika lotnummer för RNA-isoleringen och bearbetade fyra replikat ur var och en av de tio givarpoolerna. **[A]** RNA-utbyte och standardavvikelse för varje laborant-lot-kombination. Fyra replikat av blodproven från 10 givare genomfördes av tre olika laboranter (A, B, C), med vars tre satslotnummer (1, 2, 3). Avbildat är det genomsnittliga utbytet (kolonner) och standardavvikelsen (felbalkar) per fyra replikat från en och samma givarpool för olika laboranter och satslotnummer. **[B]** RNA-utbyttets variationskoefficient (CV) per blodgivarpool för alla kombinationer av laboratorietekniker-lotnummer (A, B, C; 1, 2, 3) beräknat från genomsnittligt utbyte och standardavvikelse som visas i figur 7A.

Tabell 1A. Reproducerbarhet inom varje lot och för varje användare för utvalda blodgivarpooler (1, 6, 9, 10)

Kombination av data	Blodgivarpool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/ml			Blodgivarpool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/ml		
	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, användare A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Lot 1, användare B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Lot 1, användare C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Lot 2, användare A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Lot 2, användare B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Lot 2, användare C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Lot 3, användare A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Lot 3, användare B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Lot 3, användare C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Kombination av data	Blodgivarpool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/ml			Blodgivarpool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/ml		
	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, användare A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Lot 1, användare B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lot 1, användare C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lot 2, användare A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lot 2, användare B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lot 2, användare C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lot 3, användare A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lot 3, användare B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lot 3, användare C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Tabell 1B. Reproducerbarhet för varje användare och mellan alla lotnummer för valda givarpooler (1, 6, 9, 10)

Kombination av data	Blodgivarpool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/ml			Blodgivarpool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/ml		
	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Användare A, alla lotnummer	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Användare B, alla lotnummer	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Användare C, alla lotnummer	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombination av data	Blodgivarpool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/ml			Blodgivarpool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/ml		
	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Användare A, alla lotnummer	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Användare B, alla lotnummer	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Användare C, alla lotnummer	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tabell 1C. Reproducerbarhet inom varje lot och för varje användare för valda givarpooler (1, 6, 9, 10)

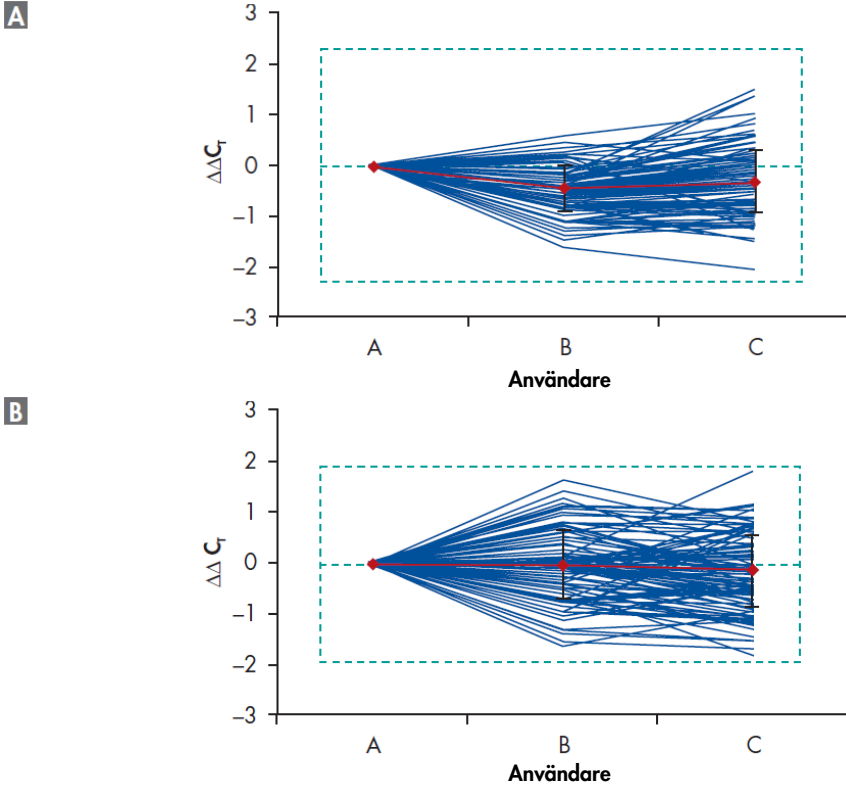
Kombination av data	Blodgivarpool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/ml			Blodgivarpool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/ml		
	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alla användare	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lot 2, alla användare	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lot 3, alla användare	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombination av data	Blodgivarpool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/ml			Blodgivarpool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/ml		
	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alla användare	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lot 2, alla användare	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lot 3, alla användare	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabell 1D. Reproducerbarhet mellan alla lotnummer och alla användare för valda givarpooler (1, 6, 9, 10)

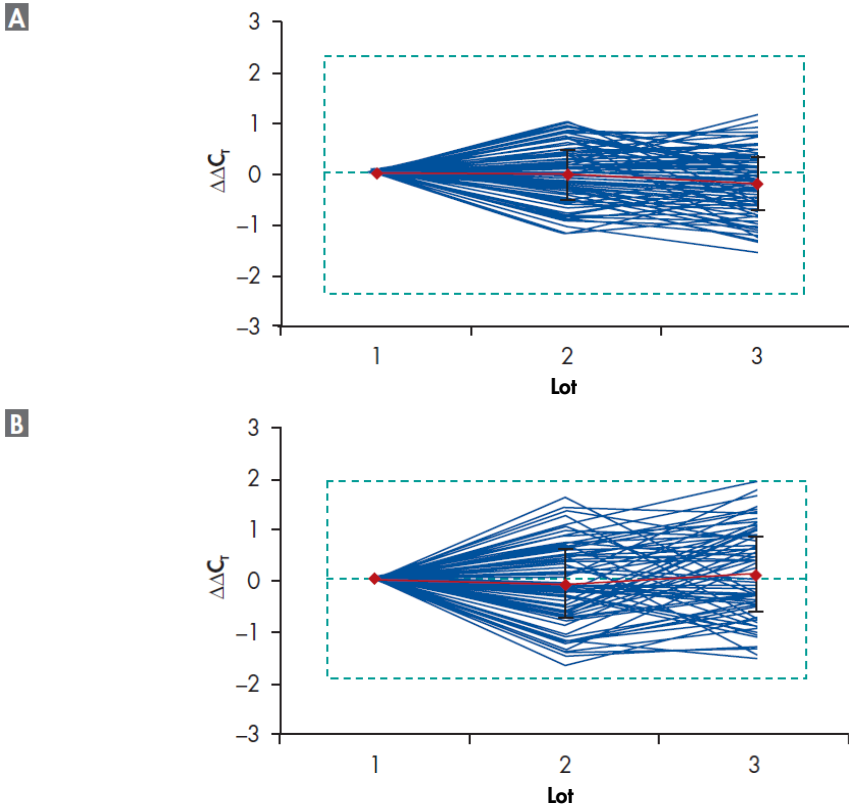
Kombination av data	Blodgivarpool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/ml			Blodgivarpool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/ml		
	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alla användare	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

Kombination av data	Blodgivarpool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/ml			Blodgivarpool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/ml		
	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Genomsnittligt utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alla användare	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detaljerad analys av 4 representativa givarpooler. Poolerna valdes i enlighet med antalet vita blodkroppar och reflekterar de övre, mellersta och lägre värdena av det normala antalet vita blodceller ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocyter/ml). Antalet vita celler representerar medelvärdet av de tre vita blodcellsvärdena från 3 givare per givarpool.



Figur 8. Reproducerbarheten för RT-PCR — mellan användare. RNA som renats i experimentet som beskrivs i figur 7 användes för real-time RT-PCR. Relativa transkriptionsnivåer av **[A]** FOS och **[B]** IL1B bestämdes med realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. Värdena för alla prover relativt till värdena för användare A (10 blodgivarpooler x 3 kit-lotnummer x 4 replikat = 120 datauppsättningar för varje gen) med medelvärde (röd linje) och standardavvikelse (svarta staplar) visas. Den streckade linjen anger området för metodens mätnoggrannhet ± 3 x total precision (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).



Figur 9. Reproducerbarheten hos RT-PCR – mellan kit-loter. RNA som renats i experimentet som beskrivs i figur 7 användes för real-time RT-PCR. Relativa transkriptionsnivåer av **[A]** FOS och **[B]** IL1B bestämdes med realtids duplex RT-PCR, med 18S rRNA som intern standard. Värdena för alla prover relativt till värdena för kit-lot-1 (10 blodgivarpooler x 3 användare x 4 replikat = 120 datauppsättningar för varje gen) med medelvärde (röd linje) och standardavvikelse (svarta staplar) visas. Den streckade linjen anger området för metodens mät noggrannhet $\pm 3 \times$ total precision (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Tabell 2. Sammanfattning av RT-PCR-data från figur 8 och 9

Testsystem	FOS/ 18S rRNA-metod		IL1B/18S rRNA-metod	
	Medelvärde ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Medelvärde ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Jämförelse av data				
Reproducerbarheten mellan alla lotnummer för varje laborant				
Alla laboranter, lot 1–lot 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Alla laboranter, lot 1–lot 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Alla laboranter, lot 1–lot 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproducerbarheten mellan alla lotnummer för varje laborant				
Alla lotnummer, laborant A–laborant A	0,00	0,00	0,00	0,00
Alla lotnummer, laborant A–laborant B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Alla lotnummer, laborant A–laborant C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Användare: Teknisk assistent som genomförde experimenten.

Lot: Satsens lotnummer.

SD: Standardavvikelse.

Genomsnittliga $\Delta\Delta C_T$ -värden (N = 120) och standardavvikelser för data visas i figur 8 och 9.

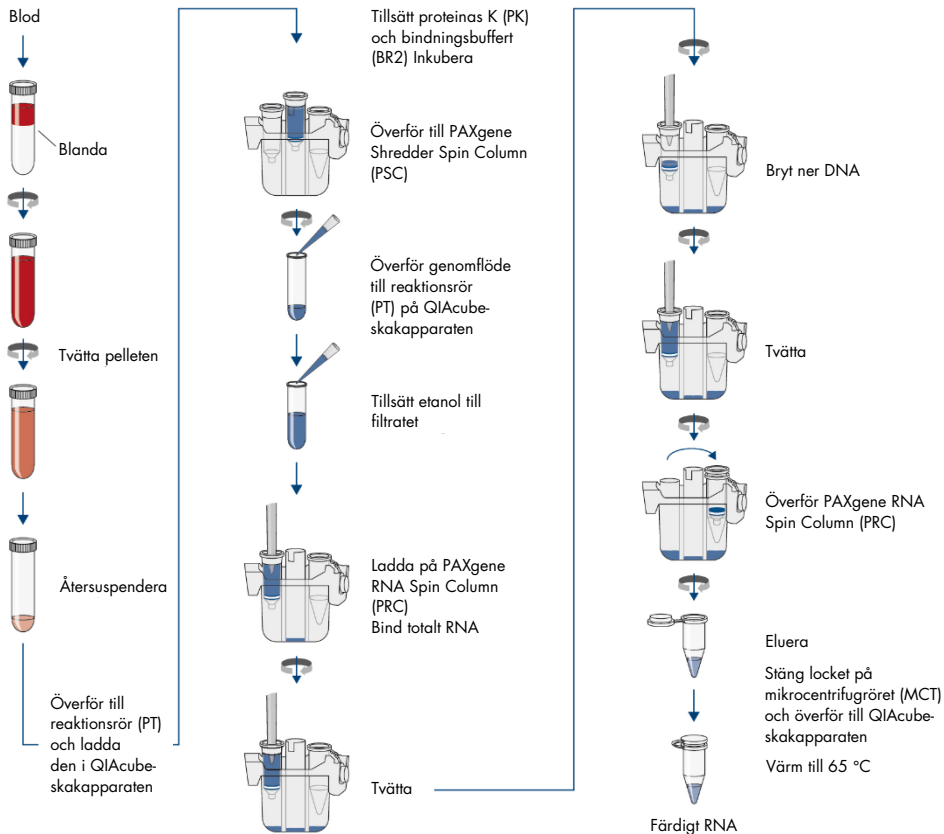
Automatiserad RNA-rening

Rening av RNA från blod är automatiserat på QIAGEN QIAcube Connect MDx eller klassiska QIAGEN QIAcube (hädanefter kallad QIAcube). De innovativa QIAcube-instrumenten använder avancerad teknik för att bearbeta QIAGEN-kolonner, vilket möjliggör en smidig integration av automatiserad provberedning med lågt genomflöde i laboratoriets arbetsflöde. Provberedning med QIAcube-instrument görs med samma steg som vid den manuella processen (dvs. lysning, bindning, tvätt och eluering), så att du kan fortsätta att använda PAXgene Blood RNA Kit för rening av högkvalitativt RNA.



Figur 10. QIAcube Connect MDx.

Det automatiserade RNA-reningsprotokollet består av 2 delar (eller protokoll), "PAXgene Blood RNA Part A" och "PAXgene Blood RNA Part B", med en mindre manuell åtgärd mellan två 2 delarna (se figur 11, sid. 31).



Figur 11. Den automatiserade PAXgene Blood RNA-proceduren.

Den centrifugerade, tvättade och återsuspenderade nukleinsyrapelleten (se "RNA koncentration och rening", sid. 19) överförs från PAXgene Blood RNA Tube (BRT) till reaktionsrör (PT), vilka placeras i termoskahrenheten på QIAcube-instrumentets arbetsbänk. Användaren väljer och startar protokollet "PAXgene Blood RNA Part A" från menyn. QIAcube-instrumentet utför stegen i protokollet ända till eluering av RNA i elueringsbuffert (BR5).

Användaren överför mikrocentrifugrören (MCT) som innehåller renat RNA till termoskakarenheten på QIAcube-instrumenten. Användaren väljer och startar protokollet "PAXgene Blood RNA Part B" från menyn och värmedenaturering utförs av QIAcube-instrumenten.

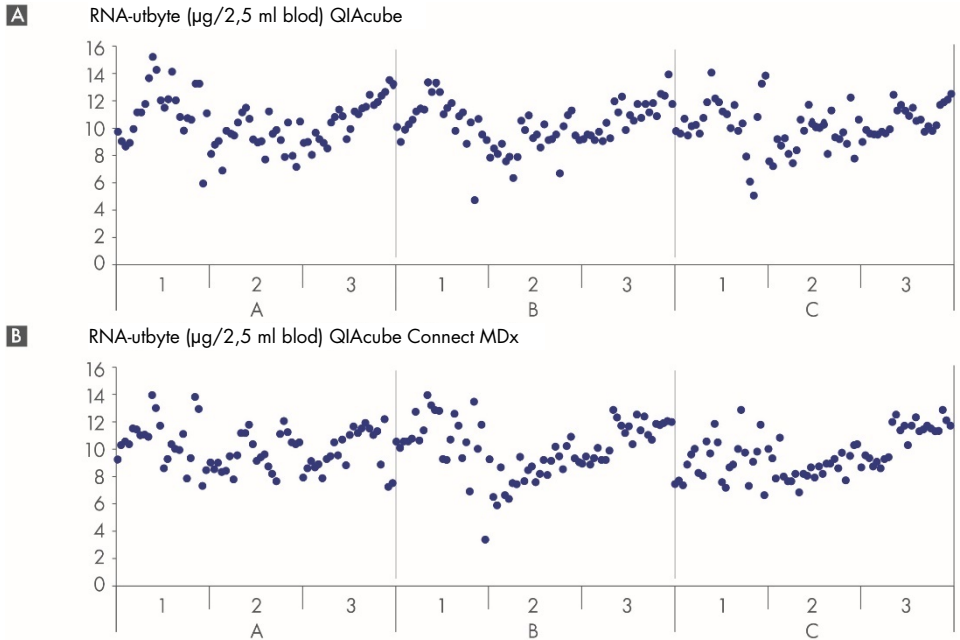
Genomsnittlig provberedningstid (baserad på data från 12 provberedningskörningar) är 151 minuter*, med betydligt mindre manuell hanteringstid jämfört med det manuella protokollet.

Hos mer än 95 % av de bearbetade proven är RNA-utbytet av friska givare $\geq 3 \mu\text{g}$ ur 2,5 ml helblod. Figur 12 (sid. 33) anger RNA-utbytet från totalt 216 prover preparerade med det automatiserade protokollet med 3 kit-lotnummer av 3 användare. Eftersom poolade blodprov har använts istället för prov som tagits individuellt med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) återspeglar resultaten inte det förväntade RNA-utbytet från enstaka prover av individuella blodtagningar. Eftersom utbytet till stor del beror på blodgivaren kan enskilt RNA-utbyte variera (se figur 12, sid. 33).

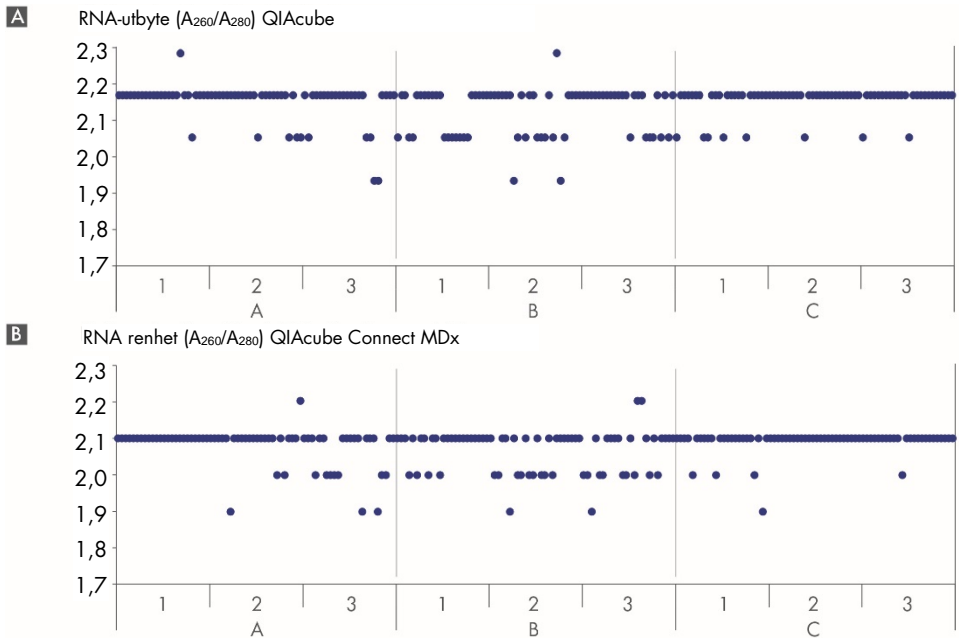
Minst 95 % av proverna visar ingen hämning i RT-PCR, vid användning av upp till 30 % av eluatet. Med det automatiska protokollet är korskontaminering mellan proverna oupptäckbar, om mätta som kvantitativa, real-time RT-PCR av sekvenser av ABL1- och FOS-transkriptioner i RNA-negativa prover (vatten) jämfört med RNA-positiva prover (humant helblod) i samma körning.

RNA som isolerats med PAXgene Blood RNA System och det automatiserade protokollet är rent, vilket visas genom bristen på RT-PCR-inhibition och A_{260}/A_{280} -värden mellan 1,8 och 2,2. Genomiskt DNA finns till $\leq 1 \%$ (w/w) i $\geq 95 \%$ av alla prover, vilket mätts med kvantitativ real-time PCR av en sekvens i beta-aktinogenen. Figur 13 och 14 (sid. 34 och 35) visar A_{260}/A_{280} -värden och relativt genomiskt DNA från totalt 216 prover som preparerats med det automatiserade protokollet med 3 kit-lotnummer av 3 användare.

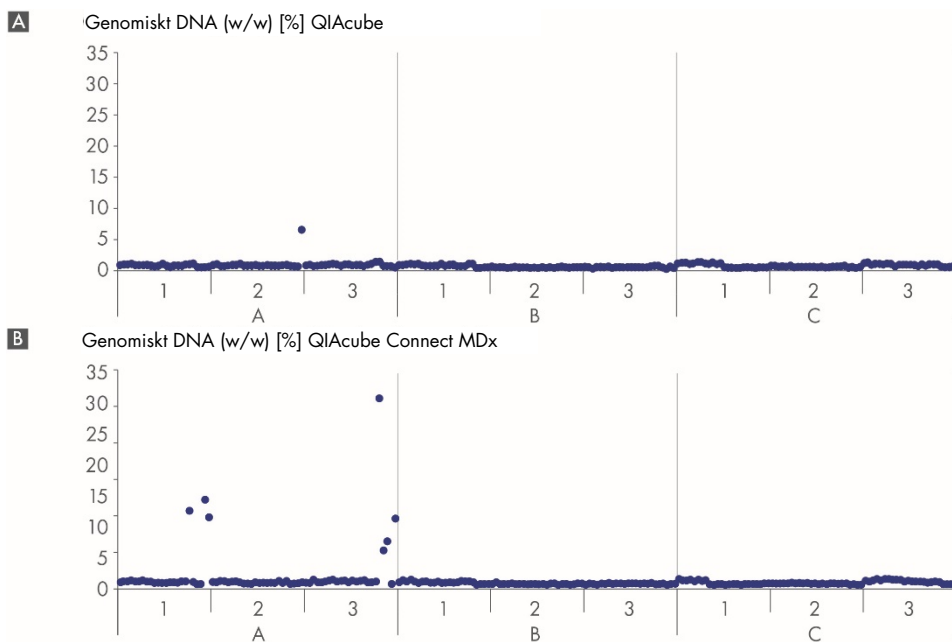
* Total protokollkörningstid, inklusive initial hantering av PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugeringar, pellettvätt och pelletättersuspension).



Figur 12. RNA-utbyte – automatiserad bearbetning A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. Blodprov från enskilda blodgivare samlades in i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Rörens innehåll poolades i 6 blodgivarpooler och återlikvoterades därefter. Totalt 216 rör (dvs. 36 per pool) bearbetades av tre olika användare (A, B, C). Varje användare använde PAXgene Blood RNA Kit från tre olika lotnummer (1, 2, 3) för automatiserad extraktion med flera QIAcube- och QIAcube Connect MDx-instrument och bearbetade fyra replikat från var och en av de 6 blodgivarpoolerna. RNA-utbytet för alla enskilda prover visas för varje kombination av användare-lotnummer.

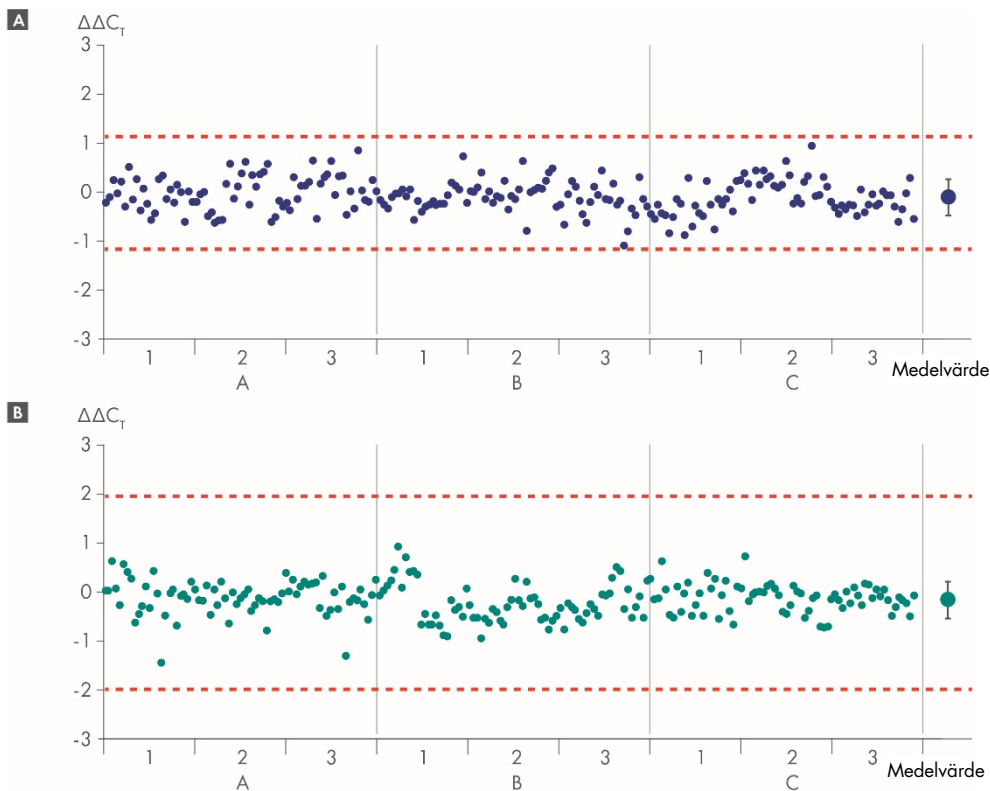


Figur 13. RNA-renhet (A_{260}/A_{280} -värden) – automatiserad bearbetning. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. RNA renades av 3 olika användare (A, B, C) som använde 3 olika lotnummer (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit med flera QIAcube- och QIAcube Connect MDx-instrument i experimentet som beskrivs i figur 12. A_{260}/A_{280} -värden för alla enskilda prover visas för varje kombination av användare-lotnummer.

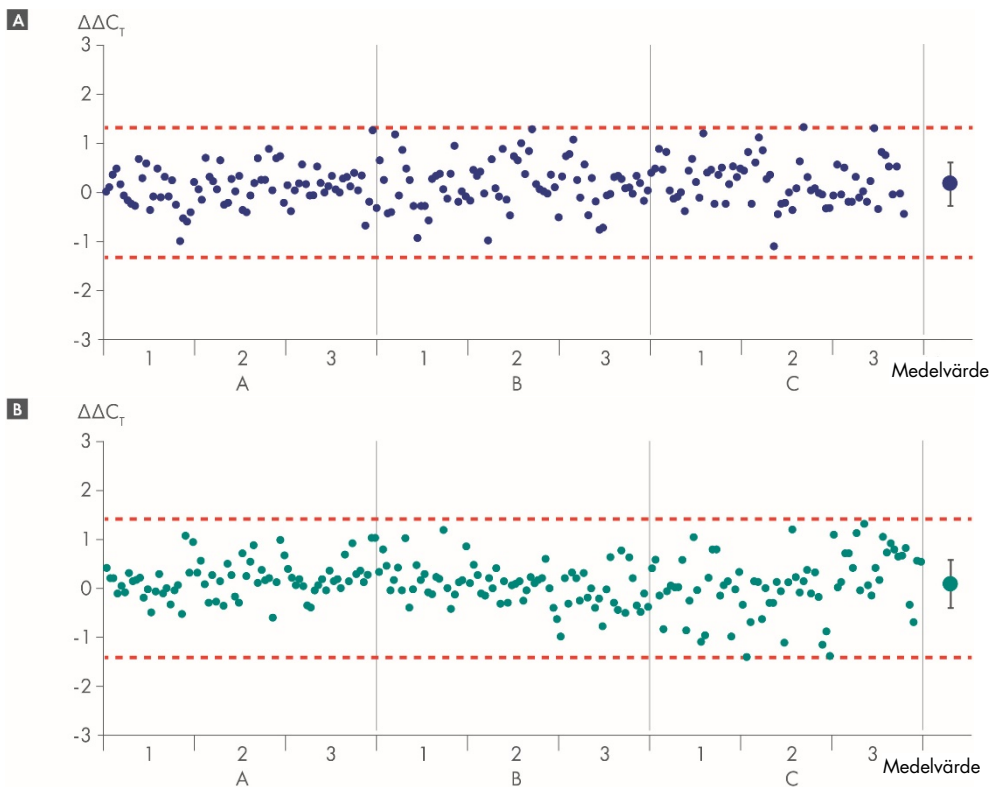


Figur 14. RNA-renhet (% kontamination av genomiskt DNA) – automatiserad bearbetning, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx. RNA renades av 3 olika användare (A, B, C) som använde 3 olika lotnummer (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit med flera QIAcube- och QIAcube Connect MDx-instrument i experimentet som beskrivs i figur 12. Mängd genomiskt DNA (w/w) i alla enskilda prover visas för varje kombination av användare-lotnummer.

Det automatiserade protokollet för RNA-rening med PAXgene Blood RNA System ger mycket reproducerbara och repeterbara RT-PCR-resultat, vilket visas i figur 15 och figur 16 (sid. 36 och 37), vilket gör det mycket robust för kliniska diagnostiska tester.



Figur 15. Reproducerbarhet för RT-PCR – mellan automatiserade (QIAcube) och manuella protokoll. RNA renades av 3 olika användare (A, B, C) som använde 3 olika lotnummer (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit med flera QIAcube- och QIAcube Connect MDx-instrument med det automatiserade protokollet i experimentet som beskrivs i figur 12. Samtidigt renades RNA från motsvarande replikatrör med det manuella protokollet. Relativa transkriptionsnivåer av **[A]** FOS och **[B]** IL1B bestämdes med realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. Möjliga skillnader i transkriptionsnivå mellan RNA som preparerats från parade blodprover med båda extraktionsprotokollen (automatiserat och manuellt protokoll) beräknades med $\Delta\Delta C_T$ -metoden. Individuella $\Delta\Delta C_T$ -värden för alla provpar (4 repetitioner x 6 givarpooler x 3 satslotnummer x 3 laboranter = 216 par för varje gen) är angivna som enstaka punkter med medelvärden (större punkter) och standardavvikelse (svarta balkar) för alla prover som visas. Den streckade linjen anger området för metodens mätnoggrannhet $\pm 3 \times$ total precision (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; olika analysprecision jämfört med figur 1–4, 8 och 9 på grund av olika analysversioner).



Figur 16. Reproducerbarhet för RT-PCR – mellan QIAcube och QIAcube Connect MDx med det automatiserade protokollet. RNA renades av 3 olika användare (A, B, C) som använde 3 olika lotnummer (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit med det automatiserade protokollet på flera QIAcube- och QIAcube Connect MDx-instrument i experimentet som beskrivs i figur 12. Relativa transkriptionsnivåer av **[A]** FOS och **[B]** IL1B bestämdes med realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. Möjliga skillnader i transkriptionsnivå mellan RNA som preparerats från parade blodprover med båda instrumenten beräknades med $\Delta\Delta C_T$ -metoden. Individuella $\Delta\Delta C_T$ -värden för alla provpar (4 repetitioner x 6 givarpooler x 3 satslotnummer x 3 laboranter = 216 par för varje gen) är angivna som enskilda punkter med medelvärden (större punkter) och standardavvikelse (svarta balkar) för alla prover som visas. Den streckade linjen anger området för metodens mät noggrannhet $\pm 3 \times$ total precision (FOS: 1,30 C_T ; IL1B: 1,42 C_T ; olika analysprecision jämfört med figur 1–4, 8, 9 och 15 på grund av olika analysversioner).

Utrustning och reagenser som ska tillhandahållas av användaren

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som kan erhållas av produktens återförsäljare.

För alla protokoll

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; kat. no. 762165)
- Etanol (96–100 %, renhetsgrad p.a.)
- Pipetter* (10 µl till 4 ml)
- Sterila RNase-fria pipettspetsar med aerosolbarriär†
- Mätcylinder‡
- Centrifug* (med swing-out-rotor och passande centrifughållare) för PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) med variabel hastighet på 3 000–5 000 x g
- Vortexblandare*
- Krossad is
- Permanent penna för märkning

* Säkerställ att enheter och instrument har kontrollerats, underhållits och kalibrerats regelbundet i enlighet med tillverkarens rekommendationer.

† Se till att du känner till instruktionerna för hantering av RNA (Bilaga A, sidan 71).

‡ För att mäta den etanolmängd som skall tillsättas till buffert BR4-koncentratet.

För det manuella protokollet

- Mikrocentrifug* med variabel hastighet på minst 1000–8000 x g, även om lägre och högre g-krafter kan användas (se protokollstegen för detaljer), och utrustad med en rotor för 2 ml mikrocentrifugrör
- Skakinkubator* som kan inkubera vid 55 °C och 65 °C och skaka med ≥400 rpm, inte överstigande 1400 rpm (t.ex. Eppendorf® Thermomixer Compact eller liknande)

För det automatiserade protokollet (med QIAcube eller QIAcube Connect MDx)

- Sax

Förbrukningsvaror för QIAcube-instrument:

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

Tillbehör till QIAcube-instrument:

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

För det automatiserade protokollet med QIAcube Connect MDx

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

QIAcube Connect MDx servicepaket:

- QIAcube Connect MDx System FUL-2 (QIAGEN, kat. no. 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3 (QIAGEN, kat. no. 9003072)

* Säkerställ att enheter och instrument har kontrollerats, underhållits och kalibrerats regelbundet i enlighet med tillverkarens rekommendationer.

† Även inkluderat i Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat.nr. 990395).

- QIAcube Connect MDx System PRV-1 (QIAGEN, kat. no. 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1 (QIAGEN, kat. no. 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1 (QIAGEN, kat. no. 9003075)

För det automatiserade protokollet med QIAcube

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

* Säkerställ att enheter och instrument har kontrollerats, underhållits och kalibrerats regelbundet i enlighet med tillverkarens rekommendationer.

Viktiga anmärkningar

Använda QIAcube-instrument

Se till att du känner till hur man använder QIAcube-instrumentet. Läs lämplig bruksanvisning för QIAcube-instrumentet och eventuell annan information som medföljer QIAcube-instrumentet och var särskilt uppmärksam på säkerhetsinformationen innan du börjar använda automatiserade PAXgene Blood RNA-protokoll.

Anvisningarna i detta avsnitt gäller QIAcube Connect MDx samt QIAcube om inget annat anges.

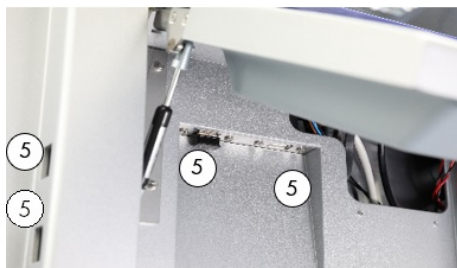
Starta QIAcube-instrumentet

Stäng QIAcube-instrumentets huv och slå på QIAcube-instrumentet med strömbrytaren (för QIAcube Connect MDx, se figur 17, sid. 42; QIAcube: Figur 18, sid. 43).

Ett pipande ljud hörs och startskärmen visas. Instrumentet utför själv initialiseringstestet.



QIAcube Connect MDx framifrån



Utdragen pekskärm



QIAcube Connect MDx bakifrån

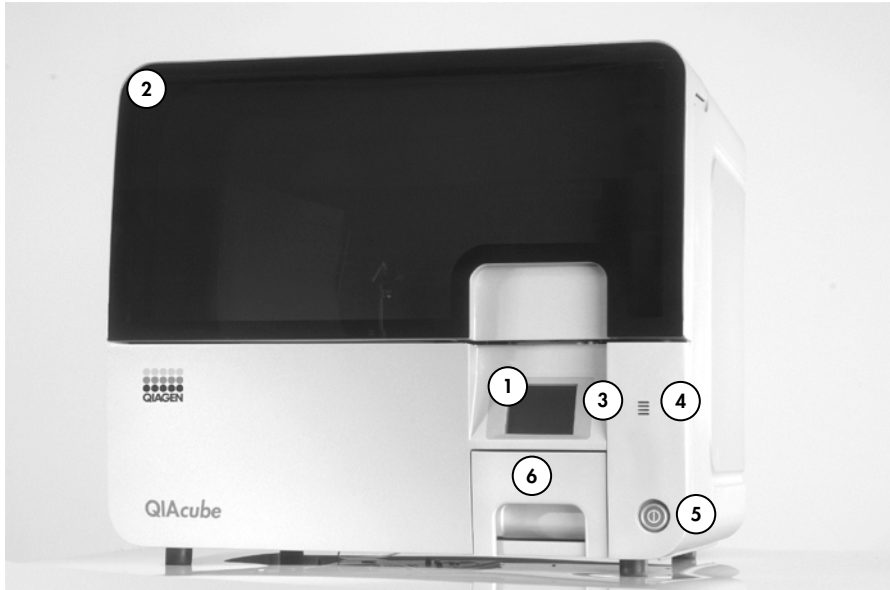


QIAcube Connect MDx bakifrån

Figur 17. Yttre funktioner hos QIAcube Connect MDx.

- ① Pejskärm
- ② Huv
- ③ Avfallslåda
- ④ Strömbrytare

- ⑤ 2 USB-portar till vänster om pejskärmen; 2 USB-portar bakom pejskärmen (Wi-Fi-modul sitter i en av USB-portarna)
- ⑥ RJ-45 Ethernetport
- ⑦ Elkontakt
- ⑧ Kylluftsutflöde



Figur 18. QIAcube framifrån.

- | | | | |
|---|---|---|-----------------------------|
| 1 | Pekskärm | 4 | USB-port bakom skyddsluckan |
| 2 | Huv | 5 | Strömbrytare |
| 3 | RS232 serieport bakom skyddsluckan
(endast avsedd för QIAGEN:s
instrumentservicespecialister) | 6 | Avfallslåda |

Pekskärm

QIAcube-instrument styrs via en pekskärm. Pekskrmen gör att användaren kan använda instrumentet och vägleder användaren genom arbetsbordets inställningar. Under provbearbetning visar pekskrmen protokollstatus och kvarvarande tid.




Figur 19. Utdragen pekskrmen hos QIAcube Connect MDx


Installation av protokoll på QIAcube-instrument

En initial protokollinstallation kan behövas innan den första RNA-prepareringskörningen kan göras på QIAcube-instrumenten. Installera de båda protokollen "PAXgene Blood RNA Part A" och "PAXgene Blood RNA Part B".

Protokoll för QIAcube Connect MDx finns på www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources (www.qiagen.com/MyQIAcube för QIAcube) och måste laddas ned till USB-minnet som levereras med QIAcube-instrumenten. Dessa protokoll överförs till instrumentet via USB-porten.

USB-porten (QIAcube Connect MDx: finns på sidan av pekskrmen, se figur 17, sid. 42; QIAcube: bakom skyddsluckan, se figur 18, sid. 43) kan användas för att ansluta QIAcube-instrumenten till USB-minnet som levereras med QIAcube-instrumenten. Datafiler, som loggfiler och rapportfiler, kan också överföras via USB-porten från QIAcube-instrumenten till USB-minnet.

 USB-porten är endast avsedd att användas med QIAGEN:s USB-minne. Anslut inte andra enheter till denna port.

 Ta inte bort USB-minnet när du laddar ned protokoll, överför datafiler eller under en protokollkörning.


Ytterligare information om att ladda upp protokoll till QIAcube-instrument finns i handboken för det instrument som används.


Laddning av QIAcube-instrument

För att spara tid kan laddningen göras under ett eller båda 10-minuters centrifugeringssteg (steg 3 och 5) i "Protokoll: Automatisk rening av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", sid. 62.

Reagensflaskor

Innan varje körning på QIAcube-instrumentet ska du fylla de 4 reagensflaskorna med de reagenser som anges i tabell 3 (sid. 46) upp till den maximala indikatornivån eller, om det inte är möjligt, till den nivå som buffertvolymerna i PAXgene Blood RNA Kit tillåter. Märk flaskor och lock tydligt med buffertnamn och placera de fyllda reagensflaskorna på lämpliga positioner i stället för reagensflaskor. Ladda stället på QIAcube-instrumentets arbetsbänk så som visas (figur 20–22, sida 46–48).

 Den medföljande volymen BR2-buffert fyller inte en reagensflaska till indikatornivån. BR3- och BR4-buffertar kanske inte fyller flaskan till indikatornivån efter bearbetning av flera prover i tidigare körningar.

 Ta bort locken innan flaskorna placeras på arbetsbänken.



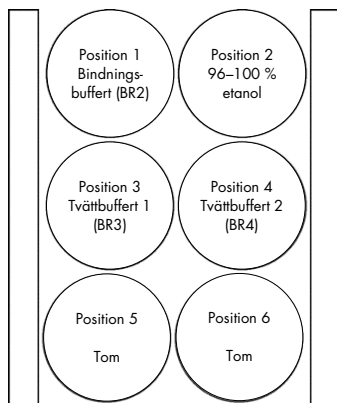
Buffertvolymerna i PAXgene Blood RNA Kit (50) räcker till maximalt sju RNA-beredningskörningar på QIACube-instrumentet, med 2 till 12 prover per körning. I allmänhet bör körningar med lägre antal prover undvikas för att kunna bearbeta totalt 50 prover per kit med maximalt sju RNA-beredningskörningar. Mer än 7 RNA-beredningskörningar kan leda till otillräckliga buffertvolym för bearbetning av de sista proven.

Tabell 3. Positioner i reagensstället

Position	Reagens
1	Bindningsbuffert (BR2)
2	96–100 % etanol
3	Tvättbuffert 1 (BR3)
4	Tvättbuffert 2 (BR4)*
5	– (lämna tom)
6	– (lämna tom)

* Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Tillsätt den fyrfaldiga volymen etanol (96–100 %, renhetsgrad p. a.) till flaskan (som etiketten anger) innan den används första gången för att framställa den bruksfärdiga arbetslösningen.

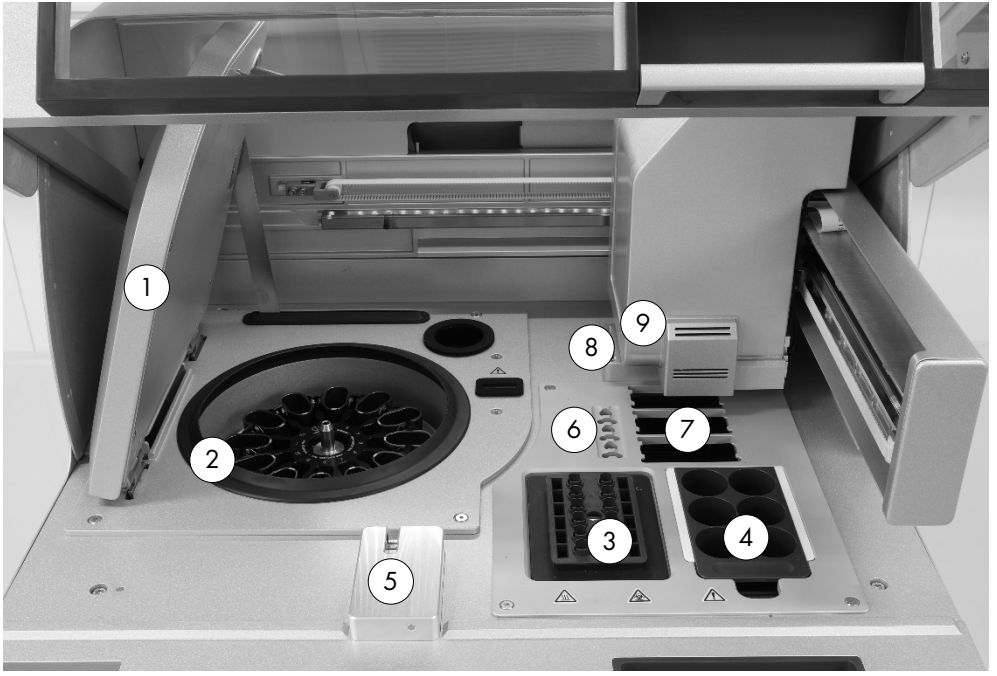
A



B

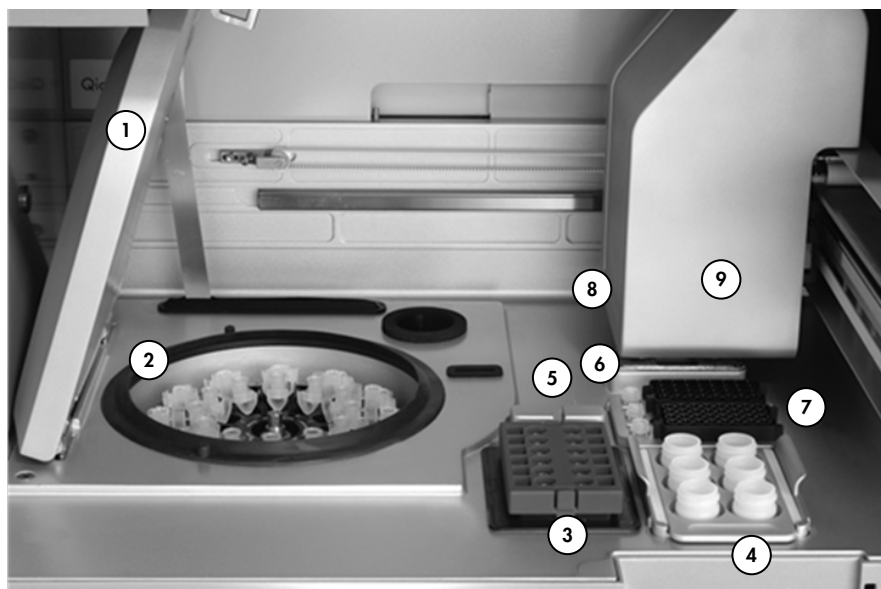


Figur 20. Laddning av stället för reagensflaskor. [A] Schema för positioner och innehåll i flaskorna i stället för reagensflaskor. [B] Laddning av stället i QIACube-instrumentet (QIACube visas som exempel).



Figur 21. QIAcube Connect MDx inifrån.


- | | | | |
|---|--------------------------|---|--|
| 1 | Centrifuglock | 6 | Fack för mikrocentrifugrör |
| 2 | Centrifug | 7 | Tre fack för spetsställ |
| 3 | Skakapparat | 8 | Kasseringsfack för spetsar och kolonner |
| 4 | Ställ för reagensflaskor | 9 | Robotarm (inklusive enkanalspipett, gripanordning, ultraljudssensor och optisk sensor samt UV LED) |
| 5 | Spetsensensor och huvlås | | |




Figur 22. QIAcube inifrån.

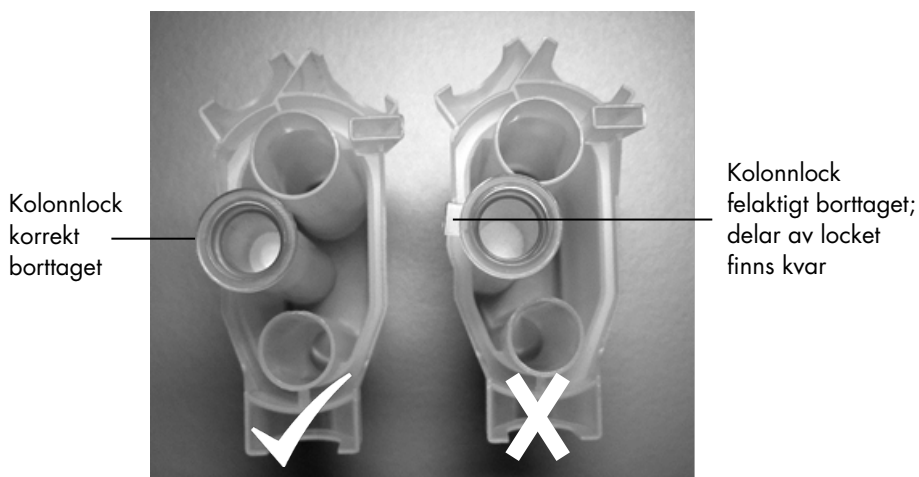
- | | | | |
|---|--------------------------|---|---|
| 1 | Centrifuglock | 6 | Fack för mikrocentrifugrör |
| 2 | Centrifug | 7 | Spetsställ |
| 3 | Skakapparat | 8 | Kasseringsfack för spetsar och kolonner |
| 4 | Ställ för reagensflaskor | 9 | Robotarm |
| 5 | Spetssensor | | |

Kolonner (PRC, PSC), mikrocentrifugrör (MCT) och QIAcube-instrumentets plastdelar
Placera 2 spetsställ fyllda med filterspetsar 1 000 µl på QIAcube-instrumentet (se figur 21 och 22, sid. 47 och 48). Fyll vid behov på ställen med spetsar.

 Använd endast 1 000 µl filterspetsar som utformats för att användas med QIAcube-instrument.

Märk rotoradapterar och mikrocentrifugrör (MCT) för varje prov med en permanent märkpena. Öppna PAXgene Shredder-kolonnerna (PSC) som skall användas och klipp av locken helt med en sax (se figur 23, sid. 49).

 För att QIAcube-instrumentets robotgripanordning ska fungera korrekt ska du helt ta bort (klippa av) locken och alla plastdelar i anslutning till locket på PAXgene Shredder-kolonnerna (PSC; se figur 23). Annars kan robotgripanordningen inte gripa tag i kolonnerna (PSC, PRC) ordentligt.



Figur 23. Laddning av PAXgene Shredder-kolonnen (PSC). PAXgene Shredder-kolonnen (PSC) laddas i mellanpositionen på rotoradaptern. Klipp av locket innan kolonnen laddas.

Ladda PAXgene RNA-kolonnen (PRC), PAXgene Shredder-kolonnen (PSC, utan lock, se figur 23, sid. 49) och det märkta mikrocentrifugröret (MCT) i lämpliga positioner i var och en av de märkta rotoradapterna såsom visas i tabell 4 och figur 24.

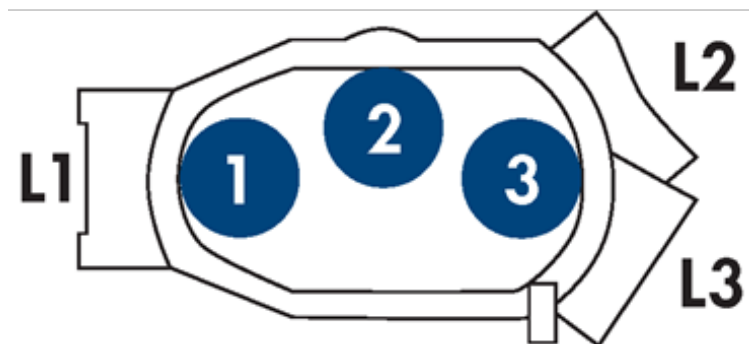


Se till att kolonnens (PRC) och mikrocentrifugrörets (MCT) lock är helt nedtryckta i botten på facken på rotoradapterns kant, annars kommer locken att lossna vid centrifugering.

Tabell 4. Labbprodukter i rotoradaptern

Position	Reagens	Lockposition
1	PAXgene RNA-kolonn (röd, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder-kolonn (lila, PSC) (klipp bort lock innan placering i rotoradapter)	–
3	Mikrocentrifugrör (MCT)*	L3

* Använd de mikrocentrifugrör (MCT; 1,5 ml) som ingår i PAXgene Blood RNA Kit.



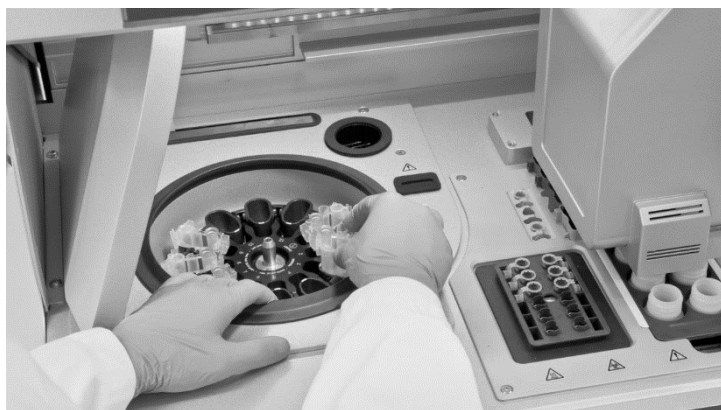
Figur 24. Positioner i rotoradaptern. Rotoradaptern har tre rörpositioner (1–3) och tre lockpositioner (L1–L3).

Laddning av centrifugen

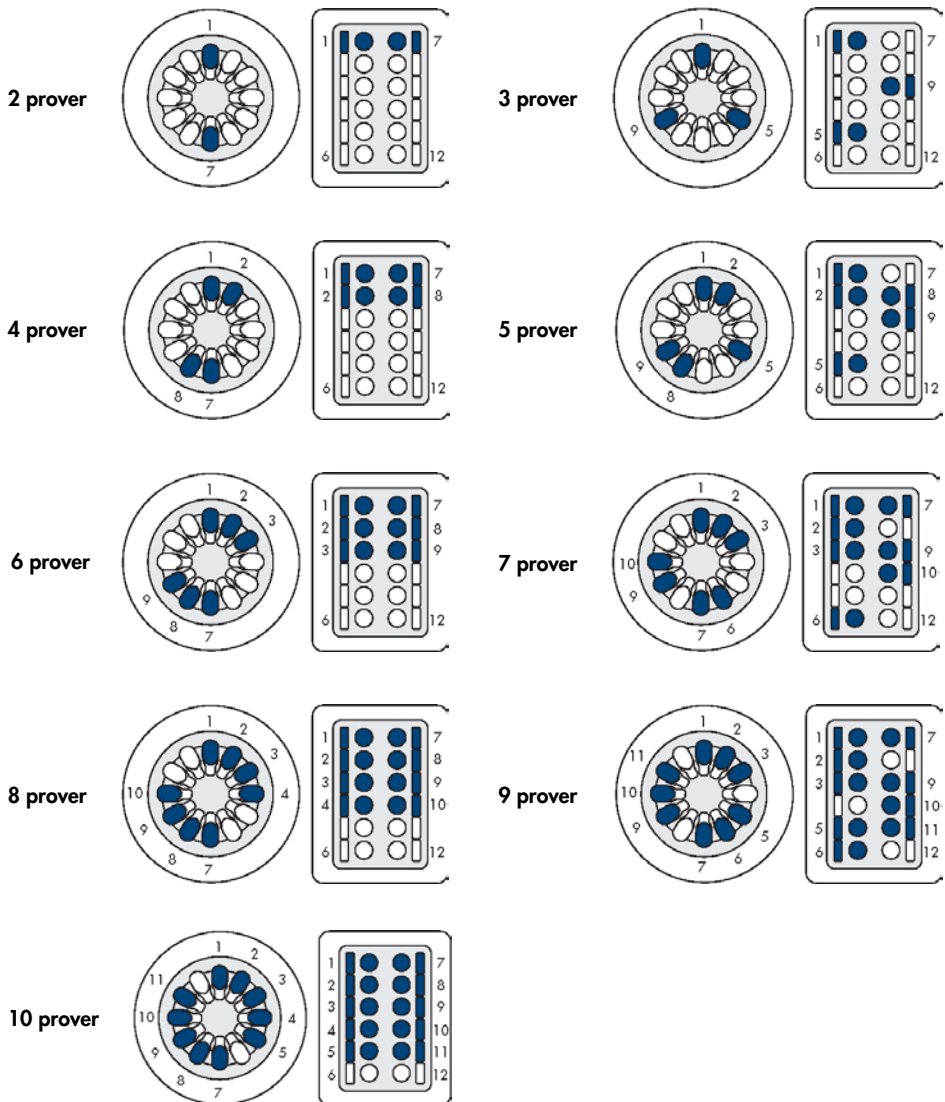
Ladda de hopmonterade rotoradapterarna i centrifughållarna så som visas i figur 25 nedan.



Om färre än 12 prover bearbetas ska du se till att centrifugrotorn laddas radialt balanserad (se figur 26, sid. 52). Alla centrifughållare måste sättas i innan protokollkörningen startas, även om färre än 12 prover skall bearbetas. Ett enda prov eller 11 prover kan inte bearbetas.



Figur 25. Laddning av centrifug på QIAcube-instrument. Ladda de hopmonterade rotoradapterarna i centrifughållarna (QIAcube Connect MDx visas som exempel).



Figur 26. Laddning av centrifug och skakapparat. Centrifug- och skakpositioner visas för bearbetning av två (2) till tio (10) prover. Ett (1) eller 11 prover kan inte bearbetas. Vid bearbetning av 12 prover är alla centrifug- och skakpositioner laddade (bild visas ej).

Reaktionsrör (Processing Tubes, PT)

Ta bort reaktionsrör (PT) som eventuellt finns kvar i mikrocentrifugrörsfacken från tidigare körningar (QIAcube Connect MDx: se figur 21, sid 47, QIAcube: se figur 22, sid. 48). Fyll 3 reaktionsrör (PT) med den mängd reagens som anges i tabell 5 i enlighet med antalet prover i körningen.

För DNase I-inkubationsblandning ska du pipettera den angivna mängden DNA-digestionsbuffert (RDD) i ett reaktionsrör (PT) och tillsätta den angivna mängden DNase I (RNFD) stamlösning. Blanda försiktigt genom att pipettera den färdiga blandningen upp och ner 3 gånger med en 1000 µl pipettspets.

Använd reaktionsrör (PT) på 2 ml som medföljer PAXgene Blood RNA Kit. Märk rören tydligt med reagensnamn och placera dem i lämplig position i mikrocentrifugrörsfacken så som anges i tabell 6 (sid. 54).



DNase I (RNFD) är särskilt känsligt för fysisk denaturering. Blanda endast genom pipettering, använd pipettspetsar med bred cylinder för att minska skjuvning. En vortex bör inte användas för att blanda.



Se till att endast pipettera den mängd som anges i tabell 5 nedan.

Tabell 5. Mängd reagens som behövs i reaktionsrören för mikrocentrifugörskassen.

Antal prover	Reagensvolym för det angivna antalet prover (µl)		
	Proteinas K (PK)	DNase I inkubationsblandning	Elueringsbuffert (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1177

Tabell 6. Fack för mikrocentrifugör

	Position		
	A	B	C
Innehåll	Proteinas K	DNase I inkubationsblandning	Elueringsbuffert (BR5)
Behållare	Reaktionsrör (PT)*	Reaktionsrör (PT)*	Reaktionsrör (PT)*

* Använd reaktionsrör på 2 ml som ingår i PAXgene Blood RNA Kit.

Protokoll: Manuell rening av totalt RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Viktigt att tänka på före start

- Kontrollera att satsen är intakt och oskadad och att buffertbehållarna inte läcker. Använd inga satser med synliga skador.
- Kontrollera att korrekt volym är inställd och att all vätska har sugits upp ordentligt och åter avgivits hos de använda pipetterna.
- För att förhindra att ett prov hamnar i fel reaktionsrör eller i fel kolonn, bör alla reaktionsrör och kolonner namnges noggrant och alla lock markeras med en permanent märkpenna. Markera locken och varje behållare (PT, MCT). Namnge även kolonnernas reaktionsrör (PT). Förslut alltid reaktionsrören och kolonnerna när vätska har tillsatts.
- Om prov- eller buffertvätska spills ut under preparationen kan RNA-utbytet och -renheten påverkas.
- Om inget annat anges, skall alla protokollsteg (inklusive centrifugeringarna) genomföras vid rumstemperatur (15–25 °C).

På grund av den höga känsligheten hos nukleinsyra-amplifikationsmetoder skall följande försiktighetsåtgärder följas för att förhindra korskontaminering:

- Var försiktig vid pipettering av proven i kolonnerna (PRC, PSC) utan att fukta randen.
- Byt alltid pipettspetsar mellan vätskeöverföringar. Använd pipettspetsar med aerosolbarriärer.
- Se till att membranet i kolonnen (PRC, PSC) inte kommer i kontakt med pipettspetsen vid pipetteringen.

- Efter blandning (vortex) eller upphettning av mikrocentrifugröret (MCT), centrifugera försiktigt för att få bort dropparna från lockets insida.
- Använd laboratoriehandskar under hela processen. Om handskarna kommer i kontakt med provet skall de genast bytas ut.
- Förslut alltid kolonnerna (PRC, PSC) innan de sätts in i mikrocentrifugen. Centrifugera enligt protokollets anvisningar.
- Öppna försiktigt endast en kolonn (PRC, PSC) åt gången och undvik aerosolbildning.
- För en effektiv parallellbearbetning av flera prov rekommenderas att ett rack med reaktionsrör (Processing Tubes) förbereds, i vilket kolonnerna kan placeras efter centrifugeringen. Kassera det använda reaktionsröret (PT) tillsammans med filtratet och ställ genast in nya reaktionsrör (PT) med kolonner (PRC, PSC) i mikrocentrifugen.

Saker som måste göras före start

- Blodprov ska samlas in i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) enligt anvisningarna i handboken för *PAXgene Blood RNA Tube*. I bilaga C (sid. 74) finns vid behov rekommendationer om hur PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ska hanteras.
- Efter blodtagningen ska PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkuberas i minst 2 timmar vid rumstemperatur för att säkerställa att blodcellerna är fullständigt lyserade. En inkubation av PAXgene Blood RNA Tube (BRT) över natten kan leda till ett högre utbyte. Om PAXgene Blood RNA Tube (BRT) har förvarats vid 2–8 °C, –20 °C eller –70 °C efter blodtagningen, skall röret först ekvilibreras till rumstemperatur och inkuberas i två timmar före start av protokollet.
- Läs säkerhetsinformationen på sida 9.
- Läs vägledningen om hur RNA hanteras (bilaga A, sid. 71).
- Se till att alla instrument som används, t.ex. pipetter och skakinkubator, kontrolleras och kalibreras regelbundet enligt tillverkarens rekommendationer.
- En skakinkubator krävs för steg 5 och 20. Ställ in temperaturen för skakinkubatorn på 55 °C.
- I bindingsbufferten (BR2) kan precipitat bildas vid förvaring. Vid behov kan denna lösas upp genom uppvärmning till 37 °C.

- Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Tillsätt den fyrfaldiga volymen etanol (96-100 %, renhetsgrad p. a.) till flaskan (som etiketten anger) innan den används första gången för att framställa den bruksfärdiga arbetslösningen.
- Innan RNase-Free DNase Set används för första gången skall en DNase I-stamlösning tillredas. Lös upp DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-units) * i 550 µl DNase återsuspenderingsbuffert (DRB), som levereras med satsen. Se till att ingen DNase I (RNFD) går förlorad när behållaren öppnas. Rekonstituerad DNase I (RNFD) får inte blandas genom vortexblandning. DNase I är särskilt känsligt för fysisk denaturering. Blanda endast genom att försiktigt vända på röret.
- För närvarande visar föreliggande data att rekonstituerad DNase I (RNFD) som förvaras vid 2-8 °C är stabilt i upp till 6 veckor. Om DNase I (RNFD) skall förvaras en längre tid rekommenderas att dela upp stamlösningen i mindre alikvoter för enstaka bruk (använd medföljande 1,5 ml mikrocentrifugrör [MCT] som räcker för 5 alikvoter) och förvara vid -20 °C i upp till 9 månader. Tinade alikvoter kan förvaras i 2-8 °C i upp till 6 veckor. Frys inte ner upptinade alikvoter.
- Se till att följa vägledningen för hantering av RNA (bilaga A, sid. 71) vid rekonstituering och alikvotering av DNase I (RNFD).

* Kunitz units är det mått som vanligtvis används för att mäta DNase I och definieras som den mängd DNase I som ger en ökad A_{260} på 0,001 per minut och milliliter vid 25 °C, pH 5,0 med högpolymeriserat DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 och 363).

Procedur

1. Centrifugera PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 minuter vid 3 000–5 000 x g med en swing-out-rotor.



Se till att blodprovet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) har inkuberats i minst 2 timmar vid rumstemperatur (15-25 °C) för att garantera att blodcellerna har lyserats fullständigt.



Rotorn skall vara utrustad med adaptrar för rör med rund botten. Om andra typer av adaptrar används kan rören skadas under centrifugeringen.

2. Aspirera försiktigt supernatanten genom att dekantera eller pipettera. Tillsätt 4 ml RNase-fritt vatten (RNFV) till pelleten och stäng röret med en ny BD Hemogard-säkerhetsförslutning (medföljer kitet).

Se till att pelleten inte störs om supernatanten dekanteras och torka rörets mynning med en ren pappershandduk.

3. Vortexa pelleten tills den har återsuspenderats och centrifugera i 10 minuter vid 3 000-5 000 x g med en swing-out-rotor. Ta därefter bort och kasta hela supernatanten.

Mindre celldebris som är kvar i supernatanten, efter skakningen men före centrifugeringen, stör inte den fortsatta proceduren.



Däremot kan lyseringen hämmas och lysatet spädas om supernatanten inte aspireras fullständigt, och på så vis påverka förutsättningarna för RNA att binda på PAXgene-membranet.

4. Tillsätt 350 µl återsuspenderingsbuffert (BR1) och vortexblanda tills pelleten är fullständigt återsuspenderad.

5. För över provet till ett 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT) med en pipett. Tillsätt 300 µl bindningsbuffert (BR2) och 40 µl proteinas K (PK). Blanda med vortex i ca 5 sekunder och inkubera i 10 minuter vid 55 °C i en skakinkubator vid 400–1 400 rpm. Höj skakinkubatorns temperatur till 65 °C (för steg 20) efter inkubationen.



Blanda inte bindningsbuffert (BR2) och proteinas K (PK) innan de tillsätts till provet.

6. Pipettera lysatet direkt i en PAXgene Shredder-kolonn (PSC, lila), som ställts i ett 2 ml reaktionsrör (PT), och centrifugera i 3 minuter med maximalt varvtal (max. 20 000 x g).



För försiktigt över hela lysatet med en pipett till kolonnen (PSC) och kontrollera visuellt att lysatet är helt överförd till kolonnen (PSC).

För att undvika att kolonnerna (PSC) eller rören (PT) skadas skall man inte centrifugera med mer än 20 000 x g.



Vissa prover kan flöda igenom PAXgene Shredder-kolonnen (PSC) utan centrifugering. Detta beror på den låga viskositeten hos vissa prover och ska inte anses som ett tecken på produktfel.

7. För därefter över hela supernatanten, utan att virvla upp pelletten i reaktionsröret, till ett nytt 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT).

8. Pipettera därtill 350 µl etanol (96-100 %, renhetsgrad p. a.). Blanda (vortexa) och centrifugera kort (1-2 sekunder vid 500-1 000 x g), för att avlägsna provvätska på insidan av locket.



Man skall inte centrifugera längre än 1-2 sekunder, då detta eventuellt kan leda till sedimentering av nukleinsyror och därmed till ett reducerat utbyte av total RNA.

9. Pipettera 700 µl av provet i en PAXgene RNA-kolonn (PRC, röd), som placerats i ett 2 ml reaktionsrör (PT), och centrifugera i 1 minut vid 8 000–20 000 x g. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 ml reaktionsrör (PT) och kasta det använda reaktionsröret (PT) samt filtratet.

10. Pipettera resten av provet i en PAXgene RNA-kolonn (PRC) och centrifugera igen i 1 minut vid 8 000–20 000 x g. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 ml reaktionsrör (PT) och kasta det använda reaktionsröret (PT) samt filtratet.



För försiktigt över provet med en pipett till kolonnen (PRC) och kontrollera visuellt att provet är helt överförd till kolonnen (PRC).

11. Tillsätt 350 µl tvättbuffert 1 (BR3) i PAXgene RNA-kolonnen (PRC). Centrifugera i 1 minut vid 8 000-20 000 x g. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 ml reaktionsrör (PT) och kasta det använda reaktionsröret (PT) samt filtratet.

12. Pipettera 10 µl DNase-I (RNFD) stamlösning till 70 µl DNA digestionsbuffert (RDD) i ett 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT). Blanda genom att försiktigt "snäppa" med fingrarna på röret och centrifugera kort för att samla vätskeresterna från rörets sidor.

För att bearbeta t.ex. 10 prov, pipetteras 100 µl DNase-I (RNFD) stamlösning till 700 µl DNA digestionsbuffert (RDD). Använd 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT) som levereras med satsen.



DNase I är särskilt känsligt för fysisk denaturering. Blanda lösningen genom att försiktigt "snäppa" med fingrarna på röret. En vortex bör inte användas för att blanda.

13. Pipettera DNase-I (RNFD)-inkubationsblandningen (80 µl) direkt på membranet i PAXgene RNA-kolonnen (PRC) och inkubera i 15 minuter vid 20–30 °C.



Se till att DNase-I (RNFD) inkubationsblandningen hamnar direkt på membranet. Digestionen med DNase kan förlöpa ofullständigt om en del av blandningen sitter fast på innerväggen eller på O-ringen av kolonnen (PRC).

14. Pipettera 350 µl tvättbuffert 1 (BR3) i PAXgene RNA-kolonnen (PRC), och centrifugera i 1 minut vid 8 000-20 000 x g. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 ml reaktionsrör (PT) och kasta det använda reaktionsröret (PT) samt filtratet.

15. Pipettera 500 µl tvättbuffert 2 (BR4) i PAXgene RNA-kolonnen (PRC), och centrifugera i 1 minut vid 8 000-20 000 x g. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 ml reaktionsrör (PT) och kasta det använda reaktionsröret (PT) samt filtratet.



Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Se till att etanol tillsätts till tvättbuffert 2 (BR4) innan användning (se "Saker som måste göras före start" på sid. 56).

16. Tillsätt ytterligare 500 µl tvättbuffert 2 (BR4) i PAXgene RNA-kolonnen (PRC). Centrifugera i 3 minuter vid 8 000-20 000 x g.

17. För över PAXgene RNA-kolonnen (PRC) till ett nytt 2 ml reaktionsrör (PT) och kasta det använda reaktionsröret (PT) samt filtratet. Centrifugera i 1 minut vid 8 000-20 000 x g.

18. Kasta reaktionsröret (PT) samt filtratet. För över PAXgene RNA-kolonnen (PRC) till ett 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT) och pipettera 40 µl elueringsbuffert (BR5) direkt på membranet i PAXgene RNA-kolonnen (PRC). Centrifugera i 1 minut vid 8 000-20 000 x g för att eluera RNA.

För att uppnå maximal elueringseffektivitet är det viktigt att hela membranet fuktas med elueringsbuffert (BR5).

19. Upprepa elueringssteget (steg 18) enligt beskrivning, med 40 µl elueringsbuffert (BR5) och med samma mikrocentrifugrör (MCT).

20. Inkubera eluatet i 5 minuter vid 65 °C i en skakinkubator (se steg 5), dock utan att skaka. Kyl därefter proven på is.

Genom inkubationen vid 65 °C denatureras RNA för påföljande applikationer. Överskrid varken inkubationstiden eller -temperaturen.

21. Om RNA-proverna inte används direkt, skall de förvaras vid –20 °C eller –70 °C.

Eftersom RNA även efter upprepad nedfrysning och upptining förblir denaturerat, är det inte nödvändigt att upprepa inkubationen vid 65 °C. Om RNA-proven skall användas för en diagnostisk metod skall tillverkarens angivelser följas.

Vi rekommenderar spädning av prover med 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 för korrekt kvantifiering av RNA genom absorbans vid 260 nm. * Spädning av provet i RNase-fritt vatten kan leda till felaktigt låga värden.

För att ställa in spektrofotometerens nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och Tris-HCl-buffert motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorbansvärden om spektrofotometerens nollpunkt inte har ställts in korrekt.



För kvantifiering i Tris HCl-buffert ska förhållandet $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ användas. Se bilaga B, sid. 72.

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas av produktens återförsäljare.

Protokoll: Automatisk rening av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Viktigt att tänka på före start

- Kontrollera att satsen är intakt och oskadad och att buffertbehållarna inte läcker. Använd inga satser med synliga skador.
- Kontrollera att korrekt volym är inställd och att all vätska har sugits upp ordentligt och åter avgivits hos de använda pipetterna.
- För att förhindra att ett prov hamnar i fel rör eller i fel plastbehållare, bör alla reaktionsrör (PT), mikrocentrifugrör (MCT) och rotoradapter namnges noggrant med en permanent penna. Markera locken samt varje del av varje mikrocentrifugrör (MCT), kolonnernas reaktionsrör (PT) samt utsidan av varje rotoradapter.
- Om prov- eller buffervätska spills ut under preparationen kan RNA-utbytet och -renheten påverkas.
- Om inget annat anges, skall alla protokollsteg (inklusive centrifugeringarna) genomföras vid rumstemperatur (15–25 °C).

På grund av den höga känsligheten hos nukleinsyra-amplifikationsmetoder skall följande försiktighetsåtgärder följas för att förhindra korskontaminering:

- Pipettera försiktigt över provet i reaktionsröret (PT), på botten av röret utan att fukta rörets kant.
- Byt alltid pipettspetsar mellan vätskeöverföringar. Använd pipettspetsar med aerosolbarriärer.
- Se till att membranet i kolonnen (PRC, PSC) inte kommer i kontakt med pipettspetsen vid pipetteringen.

- Efter blandning (vortex) eller upphettning av mikrocentrifugröret (MCT), centrifugera försiktigt för att få bort dropparna från lockets insida.
- Använd laboratoriehandskar under hela processen. Om handskarna kommer i kontakt med provet skall de genast bytas ut.

Saker som måste göras före start

- Blodprov ska samlas in i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) enligt anvisningarna i handboken för *PAXgene Blood RNA Tube*. I bilaga C (sid. 74) finns vid behov rekommendationer om hur PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ska hanteras.
- Efter blodtagningen ska PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkuberas i minst 2 timmar vid rumstemperatur för att säkerställa att blodcellerna är fullständigt lysterade. En inkubation av PAXgene Blood RNA Tube (BRT) över natten kan leda till ett högre utbyte. Om PAXgene Blood RNA Tube (BRT) har förvarats vid 2–8 °C, –20 °C eller –70 °C efter blodtagningen, skall röret först ekvilibreras till rumstemperatur och inkuberas i två timmar före start av protokollet.
- Läs säkerhetsinformationen på sida 9.
- Läs "Viktiga anmärkningar", sid. 41.
- Läs vägledningen om hur RNA hanteras (bilaga A, sid. 71).
- Läs lämplig bruksanvisning för QIAcube-instrument och annan ytterligare information som medföljer QIAcube-instrumentet och var uppmärksam på säkerhetsinformationen.
- Se till att enheter och instrument som används, t.ex. pipetter och QIAcube-instrument, kontrolleras och kalibreras regelbundet enligt tillverkarens rekommendationer.
- I bindningsbufferten (BR2) kan precipitat bildas vid förvaring. Vid behov kan denna lösas upp genom uppvärmning till 37 °C.
- Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Innan första användning ska lämplig volym etanol (96–100 %, renhetsgrad p.a.) som anges på flaskan tillsättas för att få en arbetslösning.

- Innan RNase-Free DNase Set används för första gången skall en DNase I-stamlösning tillredas. Lös upp DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-units)* i 550 µl DNase återsuspenderingsbuffert (DRB), som levereras med satsen. Se till att ingen DNase I (RNFD) går förlorad när behållaren öppnas. Rekonstituerad DNase I (RNFD) får inte blandas genom vortexblandning. DNase I är särskilt känsligt för fysisk denaturering. Blanda endast genom att försiktigt vända på röret.
- För närvarande visar föreliggande data att rekonstituerad DNase I (RNFD) som förvaras vid 2-8 °C är stabilt i upp till 6 veckor. Om DNase I (RNFD) skall förvaras en längre tid rekommenderas att dela upp stamlösningen i mindre alikvoter för enstaka bruk (använd medföljande 1,5 ml mikrocentrifugrör [MCT] som räcker för 5 alikvoter) och förvara vid -20 °C i upp till 9 månader. Tinade alikvoter kan förvaras i 2-8 °C i upp till 6 veckor. Frys inte ner upptinade alikvoter.
- Se till att följa vägledningen för hantering av RNA (bilaga A, sid. 71) vid rekonstituering och alikvotering av DNase I (RNFD).
- Installera korrekt skakadapter (som medföljer QIAcube-instrumenten: använd adaptern för 2 ml säkerhetslocksrör, märkta med "2") och placera skakstället ovanpå adaptern.
- Kontrollera avfallsbrickan och töm vid behov.
- Installera relaterade protokoll om detta inte gjorts vid tidigare körningar. För QIAcube Connect MDx måste alla protokoll i den relaterade zip-filen laddas ned. För den klassiska QIAcube ska båda protokollen "PAXgene Blood RNA Part A" och "PAXgene Blood RNA Part B" installeras. Se "Installation av protokoll på QIAcube-instrument", sid. 44.

Procedur

1. Stäng QIAcube-instrumentets huv och slå på QIAcube-instrumentet med strömbrytaren (QIAcube Connect MDx: se figur 17, sid. 42; QIAcube: se figur 18, sid. 43).

* Kunitz units är det mått som vanligtvis används för att mäta DNase I och definieras som den mängd DNase I som ger en ökad A_{260} på 0,001 per minut och milliliter vid 25 °C, pH 5,0 med högpolymeriserat DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 och 363).

Ett pipande ljud hörs och startskärmen visas. Instrumenten utför initialiseringstestet automatiskt.

2. Öppna QIAcube-instrumentets huv och sätt i de reagenser och plastdelar som behövs i QIAcube-instrumentet. Se "Laddning av QIAcube-instrument", sid. 45.

För att spara tid kan laddningen göras under ett eller båda de följande 10-minuters centrifugeringsstegen (steg 3 och 5).

3. Centrifugera PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 minuter vid 3 000–5 000 x g med en swing-out-rotor.



Se till att blodprovet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) har inkuberats i minst 2 timmar vid rumstemperatur (15-25 °C) för att garantera att blodcellerna har lyserats fullständigt.



Rotorn skall vara utrustad med adaptrar för rör med rund botten. Om andra typer av adaptrar används kan rören skadas under centrifugeringen.

4. Aspirera försiktigt supernatanten genom att dekantera eller pipettera. Tillsätt 4 ml RNase-fritt vatten (RNFV) till pelletten och stäng röret med en ny BD Hemogard-säkerhetsförslutning (medföljer kitet).

Se till att pelletten inte störs om supernatanten dekanteras och torka rörets mynning med en ren pappershandduk.

5. Vortexa pelletten tills den har återsuspenderats och centrifugera i 10 minuter vid 3 000-5 000 x g med en swing-out-rotor. Ta därefter bort och kasta hela supernatanten.

Mindre celldebris som är kvar i supernatanten, efter skakningen men före centrifugeringen, stör inte den fortsatta proceduren.



Däremot kan lyseringen hämmas och lysatet spädas om supernatanten inte aspireras fullständigt, och på så vis påverka förutsättningarna för RNA att binda på PAXgene-membranet.

6. Tillsätt 350 µl återsuspenderingsbuffert (BR1) och vortexblanda tills pelletten är fullständigt återsuspenderad.

7. För över provet till ett 2 ml reaktionsrör (PT) med en pipett.



Använd reaktionsrör (PT) på 2 ml som medföljer PAXgene Blood RNA Kit.

8. Ladda öppna reaktionsrör (PT) med prov i QIAcube-instrumentets skakapparat (QIAcube Connect MDx: se figur 21, sid. 47; QIAcube: se figur 22, sid. 48). Proverpositionerna är numrerade för enkel laddning. Sätt i skakställspluggar (ingår i QIAcube-instrument) i facken på kanten av skakstället bredvid varje reaktionsrör. Detta gör att prover kan detekteras vid laddningskontrollen.



Se till att korrekt skakadapter (skakadapter, 2 ml, säkerhetslocks rör, märkta med "2" som ingår i QIAcube-instrumenten) är installerad.



Vid bearbetning av färre än 12 prover ska du se till att ladda skakstället enligt figur 26, sid. 52. Ett (1) eller 11 prover kan inte bearbetas. Positionsnumren i skakstället motsvarar positionsnumren i centrifugen.

9. Stäng QIAcube-instrumentets huv (QIAcube Connect MDx: se figur 17, sid. 42; QIAcube: se figur 18, sid. 43).

10. Välj protokoll "PAXgene Blood RNA Part A" och starta protokollet.

Följ instruktionerna som visas på QIAcube-instrumentets pekskärm.



Se till att båda programdelarna (del A och del B) är installerade på QIAcube-instrumentet (se "Installation av protokoll på QIAcube-instrument", sid. 44).



QIAcube-instrumenten gör laddningskontroller för prover, spetsar, rotoradapterar och reagensflaskor.

11. När protokollet "PAXgene Blood RNA Part A" är klart öppnar du QIAcube-instrumentets huv (QIAcube Connect MDx: se figur 17, sid. 42; QIAcube: se figur 18, sid. 43). Ta bort PAXgene RNA-kolonnerna (PRC) från rotoradapterarna och de tomma reaktionsrören (PT) från skakapparaten och släng dem.



Under körningen överförs kolonnerna från rotoradapterposition 1 (lockposition L1) till rotoradapterposition 3 (lockposition L2) av instrumentet (se figur 24, sid. 50).

12. Stäng locken på alla 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT) som innehåller renat RNA i rotoradapterna (position 3, lockposition L3, se figur 24, sid. 50). Överför 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT) till QIAcube-instrumentets skakadapter (QIAcube Connect MDx: se figur 21, sid. 47; QIAcube: se figur 22, sid. 48).

13. Stäng QIAcube-instrumentets huv (QIAcube Connect MDx: se figur 17, sid. 42; QIAcube: se figur 18, sid. 43).

14. Välj protokoll "PAXgene Blood RNA Part B" och starta protokollet.

Följ instruktionerna som visas på QIAcube-instrumentets pekskärm.



Detta program inkuberar proverna vid 65 °C och denaturerar RNA för efterföljande steg. Även om följande applikation inkluderar ett värmedenatureringssteg, skall detta steg inte utlämnas. Tillräcklig RNA-denaturering är nödvändig för maximal effektivitet i efterföljande applikationer.

15. När protokollet "PAXgene Blood RNA Part B" är klart öppnar du QIAcube-instrumentets huv (QIAcube Connect MDx: se figur 17, sid. 42; QIAcube: se figur 18, sid. 43). Placera omedelbart mikrocentrifugrören (MCT) med renat RNA på is.



WARNING: Mycket varm yta. Skakapparaten kan uppnå temperaturer på upp till 70 °C (158 °F). Undvik att vidröra ytan när den är het.



Låt inte renat RNA vara kvar i QIAcube-instrumentet. Om proverna inte kyls kan det renade RNA:t brytas ner. Övervakade provberedningar under natten rekommenderas därför inte.

16. Om RNA-proverna inte används direkt, skall de förvaras vid -20 °C eller -70 °C.

Om RNA, även efter upprepad nedfrysning och upptining förblir denaturerat, är det inte nödvändigt att upprepa inkubationen ("PAXgene Blood RNA Part B"). Om RNA-proven skall användas för en diagnostisk metod skall tillverkarens angivelser följas.

Vi rekommenderar spädning av provet i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, för korrekt kvantifiering av RNA genom absorbans vid 260 nm.* Spädning av provet i RNase-fritt vatten kan leda till felaktigt låga värden.

För att ställa in spektrofotometerens nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och Tris-HCl-buffert motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorbansvärden om spektrofotometerens nollpunkt inte har ställts in korrekt.



För att bestämma koncentrationen i Tris-HCl-buffert, använd förhållandet

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Se bilaga B, sid. 72.

17. Ta bort reagensflaskstället från QIAcube-instrumentets arbetsbänk (QIAcube Connect MDx: se figur 21, sid. 47; QIAcube: se figur 22, sid. 48) och stäng alla flaskor med korrekt märkta lock. Buffert i flaskor kan förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) i upp till 3 månader. Ta bort och släng kvarvarande reagenser i reaktionsrören (PT) i QIAcube-instrumentets mikrocentrifugrörsfack. Ta bort och släng rotoradapterna i centrifugen. Töm QIAcube-instrumentets avfallslåda (QIAcube Connect MDx: se figur 17, sid. 42; QIAcube: se figur 18, sid. 43). Stäng QIAcube-instrumentets huv och slå på instrumentet med strömbrytaren.

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som kan erhållas av produktens återförsäljare.

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. Mer information finns på sidan med vanliga frågor (Frequently Asked Questions, FAQ) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar QIAGEN teknisk service gärna på frågor om informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (kontaktinformation finns på sista sidan eller på www.qiagen.com).

Kommentarer och förslag

RNA är nedbrutet

RNase-kontamination



Se till att inget RNase hamnar i reagenserna under proceduren eller efterföljande hantering (se bilaga A, sid. 71).

Lågt RNA-utbyte

a) Mindre än 2,5 ml blod har samlats i PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Se till att det samlas 2,5 ml blod vid blodtagningen i PAXgene Blood RNA Tube (BRT, se *PAXgene Blood RNA Tube-handboken*).

b) RNA-koncentration uppmätt i vatten



RNA måste spädas i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* för korrekt kvantifiering (se bilaga B, sid. 72).



c) Celldebris förs över till PAXgene RNA-kolonnen (PRC) i steg 9 och 10 av det manuella protokollet





Undvik att föra över större partiklar när supernatanten pipetteras efter steg 7 av det manuella protokollet (små celledbris påverkar inte preparationen).

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som kan erhållas av produktens återförsäljare.

Kommentarer och förslag

- d) Supernatanten aspireras inte fullständigt efter steg 3  Se till att supernatanten aspireras fullständigt. Om den dekanteras, skall droppar på randen till PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tas bort med en pappershandduk. Genomför rimliga försiktighetsåtgärder för att undvika korskontaminering.
- e) Efter blodtagning i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inkuberas blodet i högst 2 timmar  Inkubera blod i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i minst 2 timmar efter provtagning.

Lågt A_{260}/A_{280} -värde

- a) Vatten används för att späda RNA för A_{260}/A_{280} -mätning  Använd 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 för spädning av RNA innan renheten mäts* (se bilaga B, sid. 72).
- b) Spektrofotometern är inte korrekt nollställd  För att ställa in spektrofotometerns nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorptionsvärden om spektrofotometerns nollpunkt inte har ställts in korrekt.

Instrumentfel

QIACube-instrumenten fungerade inte korrekt

Läs lämplig QIACube-bruksanvisning och var uppmärksam på felsökningsavsnittet. Se till att QIACube-instrumentet är korrekt underhållet, enligt beskrivningen i bruksanvisningen.

* 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.

Bilaga A: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering

Arbeta med RNA



Ribonukleaser (RNaser) är mycket motståndskraftiga och aktiva enzymer, som normalt inte behöver kofaktorer för att fungera. RNaser är svåra att inaktivera och även små mängder kan bryta ner RNA. Använd därför inga laboratoriematerial av glas eller plast utan att först eliminera eventuell RNase-kontamination. Se till att inga RNase-kontaminationer kan tillkomma på RNA-proven under eller efter reningsproceduren. För att skapa och bevara en RNase-fri omgivning bör de påföljande försiktighetsåtgärderna följas vid förbehandling och bruk av engångs- och flergångsbehållare och lösningar vid arbete med RNA.

Allmän hantering



Arbetet med RNA ska alltid följa principerna för korrekt mikrobiologisk aseptiska teknik. Händer och dammpartiklar kan bära på bakterier och mögelsvampar, vilket är de vanligaste orsakerna till RNase-kontaminering. För att undvika RNase-kontaminering via hud eller dammig laborieutrustning ska du alltid bära latex- eller vinylhandskar vid hantering av reagenser och RNA-prover. Byt laboreriehandskarna ofta och stäng alltid alla rör direkt efter användning. Låt renat RNA ligga kvar på is, om alikvoter pipetteras för nedströmstillämpningar.

Protokoll för att ta bort RNase-kontaminering från glasmaterial och lösningar finns i allmänna molekylärbio-logiska metodböcker som t.ex. Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bilaga B: Bestämning av mängd och kvalitet av Total RNA

Bestämma mängden RNA

Koncentrationen av RNA ska bestämmas genom mätning av absorbansen vid 260 nm (A_{260}) i en spektrofotometer. Absorbansvärdena skall ligga i spektrofotometerens linjära område för att ge en så noggrann mätning som möjligt. En absorbans på 1 enhet vid 260 nm motsvarar 44 µg RNA per ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Detta förhållande gäller endast för mätningar i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, *. Om det är nödvändigt att späda RNA-provet skall det därför göras i 10 mM Tris-HCl. Så som anges nedan (se "RNA-renhet", sid. 73) ger förhållandet mellan absorbansvärdena vid 260 nm och 280 nm ett mått på RNA:ts renhet. Se till att kyvetterna som används för mätning av RNA-prov är RNase-fria. För att ställa in spektrofotometerens nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och Tris-HCl-buffert motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorbansvärden om spektrofotometerens nollpunkt inte har ställts in korrekt. Nedan finns ett exempel på hur RNA-koncentrationen beräknas.

RNA-provets volym	=	80 µl
Spädning (1/15)	=	10 µl RNA-prov + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Mät absorbans av utspätt prov i en kyvett (RNase-fri).		
A_{260}	=	0,3
Provets koncentration	=	$44 \times A_{260} \times \text{spädningsfaktor}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 µg/ml
Totalt utbyte	=	koncentration x provvolym i milliliter
	=	$198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 µg RNA

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som kan erhållas av produktens återförsäljare.

RNA-renhet

Förhållandet av absorbansvärdena från 260 nm till 280 nm (A_{260}/A_{280}) är ett mått på RNA renheten avseende kontaminanter som absorberar UV, som t.ex. protein. A_{260}/A_{280} -förhållandet beror dock till stor del på pH-värdet. Lägre pH-värde resulterar i ett lägre A_{260}/A_{280} -förhållande och minskad känslighet för proteinkontaminering.* För korrekta värden rekommenderar vi absorbansmätningar i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Ren RNA har ett A_{260}/A_{280} -förhållande på 1,8–2,2 i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. För att ställa in spektrofotometerens nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och Tris-HCl-buffert motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorbansvärden om spektrofotometerens nollpunkt inte har ställts in korrekt.

* 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.

Bilaga C: Hantering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Följande rekommendationer från BD kan vara hjälpsamma vid hantering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Se *PAXgene Blood RNA Tube-handboken* för mer information om PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Anvisningar för borttagning av BD Hemogard-säkerhetsförslutning

1. Ta tag i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) med ena handen och placera tummen under BD Hemogard-säkerhetsförslutningen. (Ytterligare stabilitet kan uppnås om underarmen stöds mot en fast yta.) Skruva av BD Hemogard-förslutningen med ena handen, samtidigt som du med den andra handens tumme trycker uppåt **ENDAST TILLS PROPPEN I RÖRET LOSSNAR**.
2. Ta bort tummen innan förslutningen tas av. Använd **INTE** tummen för att trycka av förslutningen från PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Försiktighet! Om PAXgene Blood RNA Tube (BRT) innehåller blod, utgör detta en potentiell infektionsrisk. För att undvika att skada sig när förslutningen tas bort, är det viktigt att ta bort tummen (med vilken förslutningen trycks upp) från PAXgene Blood RNA Tube (BRT), så snart BD Hemogard-förslutningen lossnar.
3. Lyft av förslutningen från PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Om det mycket osannolika inträffar att plasthöljet lossnar från gummiproppen, **FÖRSÖK INTE ATT SÄTTA IHOP FÖRSLUTNINGEN IGEN**. Avlägsna försiktigt gummiproppen från PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Beskrivning om återförslutning med en sekundär BD Hemogard-säkerhetsförslutning

1. Sätt en ny förslutning på PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Skruva och tryck samtidigt ned proppen på röret tills det sitter ordentligt. Proppen skall tryckas in fullständigt så att förslutningen sitter säkert på PAXgene Blood RNA Tube (BRT) vid hantering.

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat. nr
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, Reaktionsrör , RNase-fri DNase I, RNase-fria reagenser och buffertar. För att användas tillsammans med PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 blodtagningsrör	762165
Relaterade produkter som kan beställas från QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Förpackningen innehåller: reagensflaskställ (3); etikettremsor (8); 200 µl-filterspetsar (1024); 1000 µl filterspetsar (1024); 1000 µl filterspetsar, bred cylinder (1024); 30 ml reagensflaskor (18); rotoradapterar (240); rotoradapterhållare	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Sterila engångsfilterspetsar, i ställ	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagensflaskor (30 ml) med lock; 6 pack; ska användas med QIAcube-instrumentets reagensflaskställ	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	För 240 prepareringar: 240 rotoradapterar för engångsbruk för QIAcube-instrument	990394
Reagent Bottle Rack	Ställ med plats för 6 x 30 ml reagensflaskor på QIAcube-instrumentets arbetsbänk	990390
Rotor Adapter Holder	Hållare för 12 rotoradapterar för engångsbruk för QIAcube-instrument	990392

Relaterade produkter som kan beställas från BD*

Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,75 tums-kanyler (0,8 x 19 mm), 12 tums-slang (305 mm) med luer-adapter; 50 per box, 200 per behållare	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Behållare endast för 13 mm och 16 mm diameter; 1 000/behållare	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4,0 ml, med röd BD Hemogard-säkerhetsförslutning och pappersetikett; 100/box, 1 000/behållare	368975

* Dessa blodprovtagningstillbehör är typiska produkter som kan användas tillsammans med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Mer information, inklusive beställningsinformation för dessa tillbehör, finns på www.preanalytix.com.

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive bruksanvisning eller handbok för PreAnalytiX eller QIAGEN kit. Handböcker och bruksanvisningar för PreAnalytiX och QIAGEN finns tillgängliga på www.preanalytix.com och www.qiagen.com eller kan beställas från PreAnalytiX tekniska service.

Handbokens revisionshistorik

Dokument och revision	Ändringar	Datum
HB-0101-004, R2	Ändringar för överensstämmelse med GHS-föreskrifter i hela dokumentet	Juni 2015
HB-0101-005, R3	Ny mall; revideringar av automatiserat protokoll och prestandadata; uppdatering av säkerhetsinformation för överensstämmelse med GHS-föreskrifter; ändringar av instrumentdetaljer och dokumentet Begränsningar för produktanvändning.	Februari 2019
HB-0101-006, R3	Korrigerig av kitets namn i kitets innehållsförteckning, sid. 5.	Januari 2020
HB-0101-007, R4	Tillägg av QIAcube Connect MDx till automatiserade protokoll; genomgående uppdatering av språk för att innefatta referenser till QIAcube Connect MDx; genomgående uppdatering av tabell-, sid- och bildnummer.	December 2020

PreAnalytiX över hela världen

PreAnalytiX produkter säljs av QIAGEN och BD företag

QIAGEN – Kundtjänst

Beställning www.QIAGEN.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com

BD – Kundtjänst

Argentina, Uruguay and Paraguay

Orders: 0800.444.5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Australia

Orders: 1.800.656.100

Fax: 1.800.656.110

E-mail: bd_anz@bd.com

Austria

Orders: 43.1.7063660

Fax: 43.1.706366011

E-mail: customer-care.at@bd.com

Belgium

Orders: 32.53.720.556

Fax: 32.53.720.549

E-mail: orders.be@bd.com

Brazil

Orders: 0800.055.56.54

E-mail: consultoria_vacutainer@bd.com

Canada

Technical support: 1.800.631.0174

Orders: 1.866.979.9408

Fax: 1.800.565.0897

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

Central and Eastern Europe

Orders: 48.22.377.11.11

Fax: 48.22.377.11.02

Bulgaria orders: info_bulgaria@bd.com

Czech Republic orders: info_czech@bd.com

Croatia orders: info_croatia@bd.com

Hungary orders: info_hungary@bd.com

Poland orders: info_poland@bd.com

Romania orders: info_romania@bd.com

Southeast Europe orders: info_balkan@bd.com

Serbia orders: info_serbia@bd.com

Slovakia orders: info_slovakia@bd.com

Slovenia orders: info_slovenia@bd.com

Denmark

Orders: 45.43.43.45.66

Fax: 45.43.96.56.76

Orders: ordre.dk@bd.com

Technical support: bddenmark@bd.com

Finland

Orders: 358.9.88.70.780

Fax: 358.9.88.70.7816

Orders: tilaukset.fi@bd.com

E-mail: bdsuomi@bd.com

France

Orders: 33.476.68.36.36

Fax: 33.476.68.36.93

E-mail: serviceclientbdf@bd.com

Orders: commandesfr@bd.com

Technical support: vacutainerfr@bd.com

Germany

Orders: 49.6221.3050

Fax: 49.6221.305.216

E-mail: customer-care.de@bd.com

India

Orders: 91.124.3949390

Orders: bd_india@bd.com

Ireland (Aquilant Specialist Healthcare Services)

Customer support: 353.1.404.8350

Fax: 353.1.404.8352

E-mail: contactus@aquilantscientific.ie

Israel (Lapidot Medical)

Customer Support: 972.700.70.90.22

E-mail: cs@lapidot.com

Italy

Orders: 39.02.48240.500

Fax: 39.02.48240.775

Technical support: 39.3450655140

E-mail: ordini.it@bd.com

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



HB-0101-007 1122120SE BD-8945 12/2020
Produkt från Tyskland