

Februar 2023

PAXgene[®] Blood RNA Kit (håndbok) Bruksanvisning



Versjon 3 (V3)

IVD

Til in vitro-diagnostisk bruk



REF

762174



PreAnalytiX[®] GmbH
Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon, Sveits

Produsert av QIAGEN[®] GmbH for PreAnalytiX GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

MAT

1130774NB

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Når annet ikke er angitt, tilhører PreAnalytiX, PreAnalytiX-logoen og alle andre varemerker PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

Begrenset lisensavtale for PAXgene Blood RNA Kit

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i panelet. PreAnalytiX® gir ingen lisens når det gjelder noen av sine åndsverk til å bruke eller innlemme komponenter i dette panelet sammen med andre komponenter som ikke er inkludert i dette panelet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com og www.preanalytix.com.
2. PreAnalytiX gir ingen garantier for at dette settet og/eller bruksområdene ikke krenker rettighetene til tredjeparter bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette settet er lisensiert for engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. PreAnalytiX frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydnet, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt over.
6. PreAnalytiX kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolkostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller hvilke som helst av selskapets immaterielle rettigheter forbundet med settet og/eller komponentene.

Du finner oppdaterte lisensvilkår på www.qiagen.com og www.preanalytix.com.

HB-3009-002 BD-8945 1130774NB © 2023 PreAnalytiX GmbH, med enerett.

Distributører for PreAnalytiX

PreAnalytiX-produkter produseres og distribueres av QIAGEN og BD for PreAnalytiX.

Innhold

| | |
|---|----|
| Innhold..... | 3 |
| Tiltenkt bruk..... | 6 |
| Tiltenkt bruker | 6 |
| Beskrivelse og prinsipp | 7 |
| Innledning..... | 7 |
| Prinsipp og prosedyre | 7 |
| Prøveinnsamling og stabilisering..... | 8 |
| RNA-isolering | 8 |
| Manuell RNA-isolering..... | 8 |
| Automatisert RNA-isolering | 10 |
| Materialer som følger med | 13 |
| Settets innhold | 13 |
| Komponenter i settet | 14 |
| Nødvendige materialer som ikke følger med | 15 |
| For alle protokoller | 15 |
| For den manuelle protokollen | 15 |
| For den automatiserte protokollen | 16 |
| Advarsler og forholdsregler | 17 |
| Sikkerhetsinformasjon..... | 17 |
| Nødinformasjon | 17 |
| Forholdsregler | 18 |
| Håndtering og oppbevaring av reagenser..... | 21 |

| | |
|---|----|
| Stabilitet under bruk | 21 |
| Prøvetaking, -oppbevaring og -håndtering | 22 |
| Protokoll: Manuell isolering av totalt RNA fra humant fullblod samlet i PAXgene Blood RNA Tubes | 23 |
| Protokoll: Automatisert isolering av totalt RNA fra humant fullblod samlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) | 30 |
| Begrenset bruk av produktet | 37 |
| Kvalitetskontroll | 37 |
| Ytelsesegenskaper | 38 |
| Prøveinnsamling og stabilisering | 38 |
| Manuell RNA-isolering | 43 |
| Automatisert RNA-isolering | 52 |
| Stabilitet av isolert RNA | 55 |
| Viktige merknader | 56 |
| Bruke QIAcube Connect MDx | 56 |
| Starte QIAcube Connect MDx | 56 |
| Installere protokoller på QIAcube Connect MDx | 58 |
| Lasting av QIAcube Connect MDx | 59 |
| Spinnkolonne (PSC, PRC), MCT og QIAcube Connect MDx-plastdeler | 62 |
| Avfallshåndtering | 68 |
| Referanser | 69 |
| Feilsøkningsveiledning | 70 |
| Symboler | 72 |
| Kontaktinformasjon | 74 |

| | |
|---|----|
| Vedlegg A: Generelle kommentarer om håndtering av RNA..... | 75 |
| Vedlegg B: Kvantifisering og bestemmelse av kvalitet for totalt RNA | 76 |
| Vedlegg C: Håndtere PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) | 78 |
| Bestillingsinformasjon | 80 |
| Revisjonshistorikk for dokument | 82 |

Tiltenkt bruk

Til in vitro-diagnostisk bruk.

PAXgene Blood RNA System består av et prøvetakingsrør for blod (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) og nukleinsyrerensepakke (PAXgene Blood RNA Kit). Det er beregnet for prøvetaking, oppbevaring og transport av blod og stabilisering av intracellulært RNA i et lukket rør og etterfølgende isolering og rensing av verts-RNA fra fullblod for RT-PCR brukt i molekylær diagnostikk.

Ytelsesegenskaper for PAXgene Blood RNA System er etablert bare med FOS- og IL1B-gentranskripter. Brukeren er ansvarlig for å etablere ytelsesegenskaper for PAXgene Blood RNA System som egner seg for andre måltranskripter.

Indikasjoner for bruk

PAXgene Blood RNA Kit er for rensing av intracellulært RNA fra fullblod tatt i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Når settet brukes sammen med PAXgene Blood RNA Tube (BRT), gir systemet rensed intracellulært RNA fra fullblod for RT-PCR brukt i molekylær diagnostikk.

Tiltenkt bruker

Dette produktet skal brukes av fagpersoner, f.eks. teknikere og leger som har fått opplæring i in vitro-diagnostiske prosedyrer.

Dette settet er beregnet for profesjonell bruk.

Beskrivelse og prinsipp

Innledning

Innsamling av fullblod er det første trinnet i mange molekylære analyser som brukes til å studere cellulært RNA. Et sentralt problem i slike eksperimenter er imidlertid ustabiliteten til profilen av cellulært RNA in vitro. Studier ved PreAnalytiX har vist at kopitallene på individuelle mRNA-arter i fullblod kan endres mer enn 1000 ganger under oppbevaring eller transport ved romtemperatur (Rainen et al., 2002). Dette forårsakes både av hurtig RNA-degradering og av induisert uttrykk for visse gener etter at blod er innsamlet. Slike endringer i RNA-uttrykksprofilen gjør det umulig med pålitelige studier av genuttrykk. En metode som konserverer RNA-uttrykksprofilen under og etter prøvetaking, er derfor avgjørende for riktig analyse av genuttrykk i humant fullblod.

Prinsipp og prosedyre

PreAnalytiX har utviklet et system for prøvetaking, stabilisering, oppbevaring og transport av prøver med humant fullblod i tillegg til en hurtig og effektiv protokoll for isolering av intracellulært RNA. Systemet krever bruk av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) for blodprøvetaking og RNA-stabilisering, etterfulgt av manuell eller automatisert RNA-isolering med PAXgene Blood RNA Kit. Både manuelle og automatiserte protokoller gir i det vesentlige lik ytelse når det gjelder RNA-kvalitet og -utbytte. Ytelsesdata for den manuelle protokollen (fra side 43) og den automatiserte protokollen (fra side 52) er inkludert i denne håndboken.

PAXgene Blood RNA System muliggjør standardisering av de pre-analytiske arbeidsflyttrinnene fra blodprøvetaking til isolering av cellulært RNA i henhold til ISO 20186-1:2019, Molekylære in vitro-diagnostiske undersøkelser – Spesifikasjoner for forundersøkelser for venøst fullblod – Del 1: Isolert cellulært RNA.

Prøveinnsamling og stabilisering

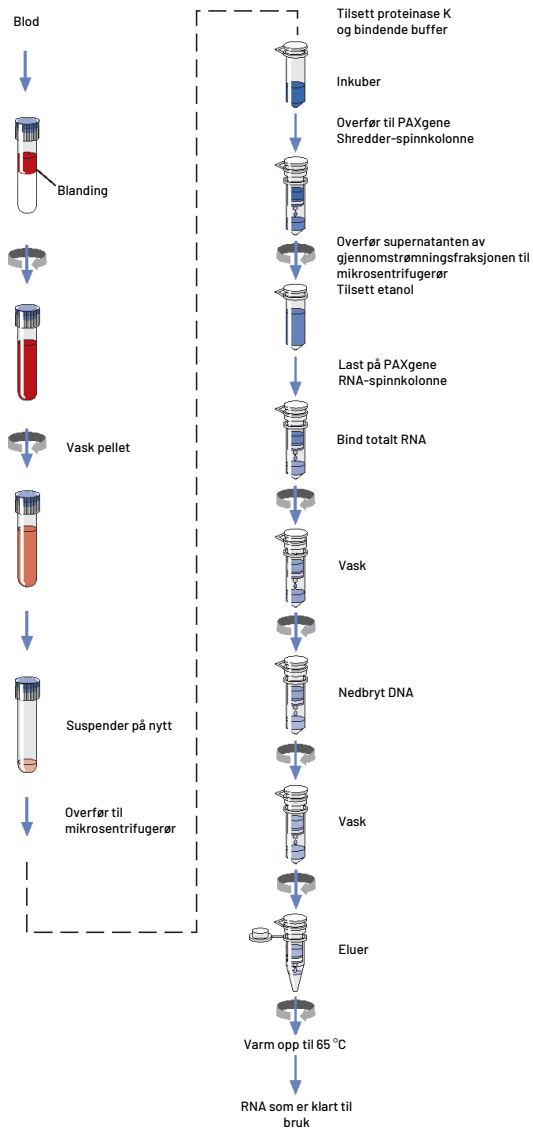
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inneholder en egen RNA-stabiliseringsreagens. Dette tilsetningsstoffet beskytter RNA-molekyler mot degradering av RNaser og minimerer ex vivo-endringer i genuttrykk. Ytelsesegenskaper for PAXgene Blood RNA System er etablert med FOS- og IL1B-gentranskripter som er vist fra side 38.

RNA-isolering

PAXgene Blood RNA Kit er for isolering av totalt RNA fra 2,5 ml humant fullblod tatt i et PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Prosedyren er enkel og kan utføres med manuelle eller automatiserte prosedyrer (se henholdsvis figur 1 eller figur 3, side 9 eller 11). I begge protokoller starter isolering med et sentrifugeringstrinn til pellet-nukleinsyrer i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pelleten vaskes og resuspenderes, etterfulgt av manuell eller automatisert RNA-isolering. I prinsippet følger begge protokollene de samme protokolltrinnene med de samme settkomponentene.

Manuell RNA-isolering

Den resuspenderte pelleten inkuberes i optimerte buffere sammen med proteinase K (PK) for å oppnå proteinnedbrytning. En tilleggssentrifugering gjennom PAXgene Shredder-spinnkolonnen (PSC) utføres for å homogenisere cellelysate og fjerne restceller, og supernatanten av gjennomstrømningsfraksjonen overføres til et nytt mikrosentrifugerør (microcentrifuge tube – MCT). Etanol tilsettes for å justere bindingsforhold, og lysatet anvendes på en PAXgene RNA-spinnkolonne (PRC). Under en kort sentrifugering bindes RNA selektivt til PAXgene-silikamembranen når kontaminanter går gjennom den. Resterende kontaminanter fjernes i flere effektive vasketrinn. Mellom første og andre vasketrinn behandles membranen med DNase I (RNFD) for å fjerne spor av bundet DNA. Etter vasketrinnene elueres RNA i elusjonsbuffer (BR5) og varmedenatureres. Ytelsesegenskaper for manuell RNA-isolering ved bruk av PAXgene Blood RNA System kan sees på side 43.



Figur 1: Manuell PAXgene Blood RNA-prosedyre.

Automatisert RNA-isolering

RNA-isolering fra blod blir automatisert på QIAGEN QIAcube Connect MDx. Det innovative instrumentet bruker avansert teknologi til å behandle QIAGEN-spinnkolonner, noe som muliggjør sømløs integrasjon av automatisert, lavproduksjons prøveklargjøring i laboratoriets arbeidsflyt. Prøveklargjøring ved bruk av QIAcube Connect MDx følger samme trinn som den manuelle prosedyren (dvs. lysere, binde, vaske og eluere), og kan utføres ved bruk av samme PAXgene Blood RNA Kit.

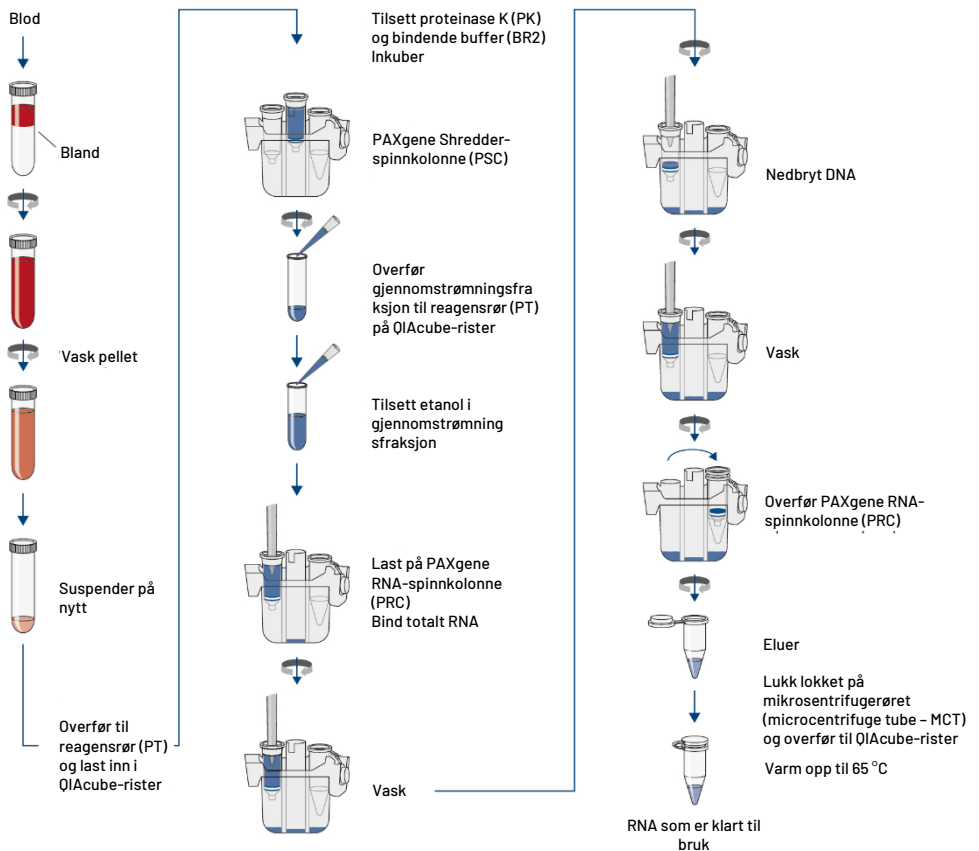


Figur 2: QIAcube Connect MDx.



QIAGEN QIAcube Connect MDx er ikke tilgjengelig i alle land. Kontakt QIAGENS tekniske serviceavdeling for mer informasjon.

Den automatiserte RNA-isoleringsprotokollen består av 2 deler (eller protokoller), «PAXgene Blood RNA Part A» (PAXgene Blood RNA del A) (fra blodet som skal elueres i PAXgene Blood RNA Tube) og «PAXgene Blood RNA Part B» (PAXgene Blood RNA del B) (etter eluering til RNA som er klart til bruk), med en kort manuell intervensjon mellom de 2 delene (se figur 3).




Figur 3: Automatisert PAXgene Blood RNA-prosedyre.

Den sentrifugerte, vaskede og resuspenderte nukleinsyrepletten (se «RNA-isolering», side 8) overføres fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT) til reagensrør (PT-er) som settes i termo-/risterenheten på QIAcube Connect MDx-arbeidsbenken. Operatøren velger og starter protokollen «PAXgene Blood RNA Part A» (PAXgene Blood RNA del A) fra menyen. QIAcube Connect MDx utfører trinnene i protokollen frem til elusjon av RNA i elusjonsbufferen (BR5). Operatøren overfører MCT-ene som inneholder rensed RNA, til termo-/risterenheten til QIAcube Connect MDx. Operatøren velger og starter protokollen «PAXgene Blood RNA Part B» (PAXgene Blood RNA del B) fra menyen, og varmedenatureringen utføres av QIAcube Connect MDx. Ytelsesegenskaper for automatisert RNA-isolering ved bruk av PAXgene Blood RNA System på QIAcube Connect MDx kan sees på side 52.

Materialer som følger med

Settets innhold

| PAXgene Blood RNA Kit Katalognr. Antall prøvetakingsenheter | | | (50) 762174 50 |
|---|---|---|---|
| Komponentnavn | Beskrivelse | Symbol | Antall |
| BR1 | Resuspension Buffer (Resuspensjonsbuffer) | RES BUF | 20 ml |
| BR2 | Binding Buffer (Bindende buffer)* | BIND BUF | 18 ml |
| BR3 | Wash Buffer 1 (Vaskebuffer 1)* | WASH BUF 1 | 45 ml |
| BR4 | Wash Buffer 2 (Vaskebuffer 2) (konsentrat)† | WASH BUF 2 CONC | 11 ml |
| BR5 | Elution Buffer (Elusjonsbuffer) | ELU BUF | 6 ml |
| RNFW | RNase-Free Water (RNase-fritt vann) (flaske) | PEL WASH | 2 × 125 ml |
| PK | Proteinase K (Proteinase K) (grønt lokk) | PROTK | 2 × 1,4 ml |
| PRC | PAXgene RNA Spin Columns (PAXgene RNA-spinnkolonner) (rød)‡ | PAXgene RNA COL | 5 × 10 |
| PT | Processing Tubes (Reagensrør) (2 ml)§ | PROC TUBE | 6 × 50 |
| Hemogard™ | Secondary BD Hemogard Closures (Sekundær BD Hemogard-hetter) | SEC CLOS | 50 |
| MCT | Microcentrifuge Tubes (Mikrosentrifugerør) (1,5 ml)§ | MIC TUBE | 3 × 50, 1 × 10 |
| RNFD | DNase I, RNase-free (DNase I, RNase-fritt) (lyofilisert) | DNA REM | 1500 Kunitz units (1500 Kunitz- enheter)¶ |
| RDD | DNA Digestion Buffer (DNA- nedbrytningsbuffer) (hvitt lokk) | DNA DIG BUF | 2 × 2 ml |
| DRB | DNase Resuspension Buffer (DNase- resuspensjonsbuffer) (rør, lilla lokk) | DNase RES BUF | 2 ml |
| PSC | PAXgene Shredder Spin Columns (PAXgene Shredder spinnkolonner) (lilla)‡ | PAXgene SHRED COL | 5 × 10 |
| Håndbok | Håndbok for PAXgene Blood RNA Kit (versjon 3) |  | 1 |

* Ikke kompatibel med desinfiseringsreagenser som inneholder blekemiddel. Inneholder et guanidinsalt. Se side 17 for Sikkerhetsinformasjon.

- † Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som konsentrat. Før førstegangsbruk tilsettes 4 volumer etanol (96–100 % v/v, renhetsgrad p.a.) som indiserer på flasken, for å oppnå en arbeidsløsning.
- ‡ Hver kolonne er pakket i en blisterpakning som kun er beregnet for engangsbruk. Se sikkerhetsinformasjon for instruksjoner om avfallshåndtering.
- § Rør er tilgjengelige i plastposer, og hvert rør er kun beregnet for engangsbruk. Se sikkerhetsinformasjon for instruksjoner om avfallshåndtering.
- ¶ Kunitz-enheter er enhetene som vanligvis brukes til å måle DNase I, definert som mengden av DNase I som fører til en økning i A_{260} på 0,001 per minutt per milliliter ved 25 °C, pH 5,0, med sterkt polymerisert DNA som substratet (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 og 363).

Komponenter i settet

| Komponentnavn | Beskrivelse | Aktiv ingrediens | Konsentrasjon |
|---------------|---|-----------------------------|---|
| BR1 | Resuspension Buffer (Resuspensjonsbuffer) | Ingen | – |
| BR2 | Binding Buffer (Bindende buffer) | Guanidintiocyanat | ≥ 30 til < 50 % w/w |
| BR3 | Wash Buffer 1 (Vaskebuffer 1) | Guanidintiocyanat Etanol | ≥ 10 til < 20 % w/w ≥ 3 til < 10 % w/w |
| BR4 | Wash Buffer 2 (Vaskebuffer 2) (konsentrat)† | Ingen | – |
| BR5 | Elution Buffer (Elusjonsbuffer) | Ingen | – |
| RNFW | RNase-Free Water (RNase-fritt vann) (flaske) | Ingen | – |
| PK | Proteinase K (Proteinase K) (grønt lokk) | Proteinase K | ≥ 1 til < 3 % w/w |
| RNFD | DNase I, RNase-free (DNase I, RNase-fritt) (lyofilisert) | DNase | ≥ 90 til ≤ 100 % w/w |
| RDD | DNA Digestion Buffer (DNA-nedbrytningsbuffer) (hvitt lokk) | Ingen | – |
| DRB | DNase Resuspension Buffer (DNase-resuspensjonsbuffer) (rør, lilla lokk) | Ingen | – |

Nødvendige materialer som ikke følger med

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. For mer informasjon, se de relevante sikkerhetsdatabladene (Safety Data Sheet, SDS) som kan fås hos leverandøren av produktet.

For alle protokoller

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX, kat.nr. 762165)
- Etanol (96–100 % v/v, renhetsgrad p.a.)
- Pipetter* (10 µl til 4 ml)
- Sterile RNase-frie pipettespisser med aerosolbarriere[†]
- Gradert sylinder[‡]
- Sentrifuge* som kan oppnå 3000–5000 × *g*, og som er utstyrt med svingbøtterotor og beholdere for PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Virvelblander*
- Knust is
- Permanent penn for merking

For den manuelle protokollen

- Mikrosentrifuge* med variabel hastighet som kan oppnå minst 1000–8000 × *g*, men lavere og høyere *g*-krefter kan være aktuelt (se protokolltrinn for detaljer), og som er utstyrt med en rotor for 2 ml MCT-er

* Pass på at enhetene og instrumentene er sjekket, vedlikeholdt og kalibrert regelmessig i henhold til produsentens anbefalinger.

[†] Pass på at du er godt kjent med retningslinjene for håndtering av RNA (Vedlegg A, side 75).

[‡] For tilsetning av etanol til Buffer BR4-konsentrat.

- Rister/inkubator* som kan inkubere ved 55 °C og 65 °C og riste ved ≥ 400 o/min, ikke over 1400 o/min (f.eks. Eppendorf® Thermomixer Compact eller tilsvarende)

For den automatiserte protokollen

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

QIAcube Connect MDx-forbruksvarer:

- Filter-Tips, 1000 μ l (1024) (QIAGEN, kat.nr. 990352)[†]
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, kat.nr. 990393)[†]
- Rotor Adapters (10 \times 24) (QIAGEN, kat.nr. 990394)[†]

QIAcube Connect MDx-tilbehør:

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

QIAcube Connect MDx-servicepakker:

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

* Pass på at enheten og instrumentet er sjekket, vedlikeholdt og kalibrert regelmessig i henhold til produsentens anbefalinger.

[†] Også inkludert i Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat.nr. 990395).

Advarsler og forholdsregler

For kunder i EU: Vær oppmerksom på at en alvorlig hendelse knyttet til enheten må rapporteres til produsenten og den relevante myndigheten i medlemslandet der brukeren og/eller pasienten er etablert.

For kunder utenfor EU: Vær oppmerksom på at alvorlige hendelser i forbindelse med bruken av utstyret muligens må rapporteres til produsenten og/eller deres autoriserte representant og den ansvarlige myndigheten i det landet hvor brukeren og/eller pasienten befinner seg.

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier og biologisk farlige materialer. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (Safety Data Sheets, SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

- Alle kjemikalier og biologiske materialer er potensielt farlige. Blodprøver kan være smittefarlige og må behandles som biologisk farlige materialer.
- Kast biologisk farlig avfall og settavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

Nødinformasjon

CHEMTREC

Utenfor USA og Canada +1 703-527-3887

Forholdsregler

Under arbeid med blod skal du praktisere universelle forholdsregler for å unngå risiko for potensiell eksponering for blodbårne patogener (f.eks. HIV, hepatitt B og andre blodbårne virus). Bruk hansker, frakk, øyevern, annet personlig verneutstyr og tekniske kontroller som beskyttelse mot blodeksponering. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (Safety Data Sheets, SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i et praktisk og kompakt PDF-format online på www.preanalytix.com. Her kan du se, vise og skrive ut SDS-er for dette settet.

FORSIKTIG



IKKE tilsett blekemidler eller sure løsninger direkte i prøveklargjøringsavfallet.

Bindende buffer (BR2) og vaskebuffer 1 (BR3) inneholder guanidintiocyanat, som kan danne sterkt reaktive forbindelser når det kommer i kontakt med blekemiddel. Hvis bindende buffer (BR2) eller vaskebuffer 1 (BR3) søles, rengjør med egnet laboratorievaskemiddel og vann. Hvis det søles væske som inneholder potensielt smittefarlig agens, må det berørte området først rengjøres med laboratorievaskemiddel og vann og deretter med 1% (v/v) natriumhypokloritt (blekemiddel).

Den RNA-stabiliserende løsningen og blodblandingen fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan desinfiseres med 1 volum kommersiell blekemiddelløsning (5 % natriumhypokloritt) per 9 volumer RNA-stabiliserende løsning og blodblanding.

Prøveklargjøringsavfall, f.eks. supernatanter, fra sentrifugeringstrinn i RNA-isoleringsprosedyren, er å anse som potensielt smittsomt. Bruk beholdere for biologisk farlig avfall når biologiske materialer kastes. Avfallshåndtering må utføres i henhold til lokale forskrifter og prosedyrer for institusjonen.

Spesifikke komponenter i PAXgene Blood RNA Kit er kun beregnet for engangsbruk. Se Settets innhold på side 13 for informasjon om individuelle komponenter.

Følgende risiko- og sikkerhetssetninger gjelder for komponenter i PAXgene Blood RNA Kit. Se *håndboken for PAXgene Blood RNA Tube* for sikkerhetsinformasjon om bruken av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Buffer BR2



Inneholder guanidintiocyanat. Fare! Skadelig ved svelging. Kan være farlig ved hudkontakt eller innånding. Gir alvorlig øyeskade. Skadelig, med langtidsvirkning, for vannlevende organismer. Ved kontakt med syrer utvikles meget giftig gass. Unngå utslipp til miljøet. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller en lege umiddelbart. Innhold/ beholder leveres til et godkjent avfallsbehandlingssted.

Buffer BR3



Inneholder: etanol; guanidintiocyanat. Fare! Brannfarlig væske og damp. Gir alvorlig øyeskade. Ved kontakt med syrer utvikles meget giftig gass. Holdes vekk fra varme / gnister / åpen flamme / svært varme overflater. Røyking forbudt. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller en lege umiddelbart.

DNase I



Inneholder: DNase. Fare! Kan utløse en allergisk hudreaksjon. Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding. Unngå å puste inn støv. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. Benytt åndedrettsvern. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller en lege. Flytt personen til frisk luft, og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. Tilsølte klær må vaskes før de brukes på nytt.

Håndtering og oppbevaring av reagenser

PAXgene RNA-spinnkolonner (PRC), PAXgene Shredder-spinnkolonner (PSC), proteinase K (PK) og buffere (BR1, BR2, BR3, BR4 og BR5) bør oppbevares tørt ved temperaturen som er indisert på settets etikett.

Det RNase-frie DNase-settet, som inneholder DNase I (RNFD), DNA-nedbrytningsbuffer (RDD) og DNase-resuspensjonsbuffer (DRB), transporteres ved omgivelsestemperatur. Oppbevar alle komponenter av det RNase-frie DNase-settet straks ved mottak ved temperaturen som er indisert på etiketten. Forutsatt riktig oppbevaring er kitet stabilt frem til utløpsdatoen på esken.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene og oppbevaringsbetingelsene angitt på komponentenes esker og etiketter. Bruk ikke komponenter som er gått ut på dato eller oppbevart feil.

Stabilitet under bruk

Etter første gangs bruk av settet er reagensene stabile i de originale flaskene ved temperaturer og frem til utløpsdatoen som er indisert på settets etikett.

Reagenser som er fylt i reagensflaskene til QIAcube Connect MDx er stabile i 3 måneder med oppbevaring ved romtemperatur (15–25 °C).

Rekonstituert DNase I (RNFD) er stabil ved 2–8 °C i 6 uker i det originale hetteglasset (arbeidsløsning).

Engangsalikvoter av arbeidsløsningen i 1,5 ml MCT-er (følger med settet) er stabile i 9 måneders lagring ved -20 °C. Etter tining er engangsalikvotene stabile i 6 uker med oppbevaring ved 2–8 °C.

Prøvetaking, -oppbevaring og -håndtering

PAXgene Blood RNA Kit er for bruk med fullblod tatt i PAXgene Blood RNA Tubes. Blod må samles i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) i henhold til instruksjonene i håndboken for PAXgene Blood RNA Tube. Om nødvendig kan du se Vedlegg C (side 78) for anbefalinger om håndtering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Alle prøver skal behandles som potensielt smittefarlig materiale. Ytelsesegenskaper for PAXgene Blood RNA System er etablert med FOS- og IL1B-gentranskripter som kan sees på sidene 39–42.

Protokoll: Manuell isolering av totalt RNA fra humant fullblod samlet i PAXgene Blood RNA Tubes

Viktige punkter før du starter

- Pass på at settets eske er intakt og uskadet, og at bufferne ikke har lekket. Ikke bruk et sett som er skadet.
- Når du bruker pipette, må du passe på at den er stilt til riktig volum, og at væsken er forsiktig og fullstendig aspirert og dispensert.
- For å unngå å overføre prøver til feil rør eller spinnkolonne, pass på at alle rør og spinnkolonner er riktig merket med permanent penn. Merk lokket og hoveddelen på hvert rør (PT, MCT). For spinnkolonner merkes hoveddelen på PT. Lukk hvert rør eller hver spinnkolonne etter at væsken er overført.
- Hvis prøver og buffere søles under prosedyren, kan det redusere RNA-utbyttet og -renheten.
- Med mindre noe annet er indisert, skal alle trinn i denne protokollen, inkludert sentrifugeringstrinn, utføres ved romtemperatur (15–25 °C).

På grunn av sensitiviteten til nukleinsyreamplifikasjonsteknologi, er det viktig å følge disse forholdsreglene ved håndtering av prøver for å unngå krysskontaminering:

- Pipetter prøven forsiktig i spinnkolonnen (PSC, PRC) uten å fukte kanten på kolonnen.
- Skift alltid pipettespisser mellom væskeoverføringer. Bruk pipettespisser med aerosolbarriere.
- Unngå at spinnkolonnenmembranen (PSC, PRC) kommer i kontakt med pipettespissen.
- Etter virvelblanding eller oppvarming av et MCT skal det sentrifugeres kort for å fjerne dråpene fra innsiden av lokket.

- Bruk hansker gjennom hele prosedyren. Bytt hansker straks hvis de kommer i kontakt med prøven.
- Lukk spinnkolonnen (PSC, PRC) før den plasseres i mikrosentrifugen. Sentrifuger som beskrevet i prosedyren.
- Åpne bare én spinnkolonne (PSC, PRC) om gangen, og vær forsiktig så du unngår å generere aerosoler.
- For effektiv parallell behandling av flere prøver kan du fylle et stativ med PT-er som spinnkolonnene (PSC, PRC) kan overføres til etter sentrifugering. Kast de brukte PT-ene som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen, og plasser spinnkolonnene (PSC, PRC) i nye PT-er før de overføres tilbake til mikrosentrifugen.

Ting du må gjøre før du starter

- Blod må samles i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) i henhold til instruksjonene i *håndboken for PAXgene Blood RNA Tube*. Om nødvendig kan du se Vedlegg C (side 78) for anbefalinger om håndtering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Pass på at PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkuberes i minst 2 t ved romtemperatur etter at blodet er tatt, for å sikre riktig lysering av blodcellene og utfelling av RNA. Inkubasjon av PAXgene Blood RNA Tube (BRT) over natten kan føre til økning i utbytte. Hvis den første blodinkubasjonen ved romtemperatur i 2 timer ikke ble utført før oppbevaring ved 2–8 °C, -20 °C eller -70 °C, temperer først PAXgene Blood RNA Tube (BRT) til romtemperatur og inkuber deretter ved denne temperaturen i 2 t før du starter prosedyren.
- Les sikkerhetsinformasjonen på side 17.
- Les retningslinjene om håndtering av RNA (Vedlegg A, side 75).
- Pass på at instrumentene, som pipetter og rister – inkubator, er sjekket og kalibrert regelmessig i henhold til produsentens anbefalinger.
- En rister – inkubator trengs til trinn 5 og 20. Still inn temperaturen på risteren – inkubatoren til 55 °C.

- Bindende buffer (BR2) kan danne et presipitat ved oppbevaring. Om nødvendig varmes den opp til 37 °C for å løse opp.
- Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som konsentrat. Før førstegangsbruk tilsettes 4 volumer etanol (96–100 % v/v, renhetsgrad p.a.) som indisert på flasken, for å oppnå en arbeidsløsning.
- Hvis du bruker det RNase-frie DNase-settet for første gang, må en DNase I-arbeidsløsning klargjøres. Oppløs det faste DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-enheter)* i 550 µl av DNase resuspensjonsbuffer (DRB) som leveres med settet. Pass på at ikke noe DNase I (RNFD) går tapt når flasken åpnes. Ikke virvelbland rekonstituert DNase I (RNFD). DNase I er spesielt følsomt for fysisk denaturering. Blanding skal kun utføres ved å vende flasken forsiktig opp og ned.
- Rekonstituert DNase I (RNFD) kan oppbevares ved 2–8 °C i det originale hetteglasset (stamløsning) eller ved -20 °C etter at arbeidsløsningen er fjernet fra hetteglasset og delt opp i engangsalikvoter (bruk 1,5 ml MCT som følger med settet, det er nok til 5 alikvoter). Tinte alikvoter kan lagres ved 2–8 °C. Ikke frys alikvotene på nytt etter tining.
- Når du rekonstituerer og alikvoterer DNase I (RNFD), pass på at du følger retningslinjene for håndtering av RNA (Vedlegg A, side 75).

Prosedyre

1. Sentrifuger PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 min ved 3000–5000 × g med en svingbøtterotor.



Pass på at blodprøven har vært inkubert i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i minimum 2 t ved romtemperatur (15–25 °C) for å oppnå fullstendig lysing av blodceller og utfelling av RNA.

* Kunitz-enheter er enhetene som vanligvis brukes til å måle DNase I, definert som mengden av DNase I som fører til en økning i A_{260} på 0,001 per minutt per milliliter ved 25 °C, pH 5,0, med sterkt polymerisert DNA som substratet (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 og 363).



Rotoren må inneholde røradaptore for rør med rund bunn. Hvis andre typer røradaptore brukes, kan rørene knuses under sentrifugering.

2. Fjern supernatanten ved å dekantere eller pipettere. Tilsett 4 ml RNase-fritt vann (RNFV) til pelleten, og lukk røret med en fersk, sekundær BD Hemogard-hette (følger med kitet).

Hvis supernatanten er dekantert, pass på så ikke pelleten forstyrres, og tørk av kanten på røret med rent tørkepapir.

3. Virvelbland til pelleten er synlig oppløst, og sentrifuger i 10 min ved 3000–5000 × g med en svingbøtterotor. Ta av og kast hele supernatanten. Små rester som blir liggende igjen etter supernatanten etter virvelblanding, men før sentrifugering, vil ikke påvirke prosedyren.



Ufullstendig fjerning av supernatant vil hemme lyseringen og fortynne lysatet, og vil derfor påvirke forholdene for binding av RNA til PAXgenemembranen.

4. Tilsett 350 µl resuspensjonsbuffer (BR1), og virvelbland til pelleten er synlig oppløst.
5. Pipetter prøven i et 1,5 ml MCT. Tilsett 300 µl bindende buffer (BR2) og 40 µl proteinase K (PK). Virvelbland i 5 s, og inkuber i 10 minutter ved 55 °C med en rister – inkubator ved 400–1400 o/min. Etter inkubasjon må temperaturen på risteren – inkubatoren stilles inn til 65 °C (for trinn 20).



Ikke bland bindende buffer (BR2) og proteinase K (PK) sammen før de tilsettes i prøven.

6. Pipetter lysatet direkte i en PSC (lilla) plassert i et 2 ml PT, og sentrifuger i 3 min ved maksimum hastighet (men det må ikke overskride 20 000 × g).



Pipetter lysatet forsiktig i spinnkolonnen (PSC), og sjekk visuelt at alt lysatet er overført til spinnkolonnen (PSC).

For å forhindre at kolonnene (PSC) og rørene (PT) skades, ikke overstig 20 000 × g.



Noen prøver kan strømme gjennom PSC uten sentrifugering. Dette skyldes lav viskositet for noen prøver og bør ikke oppfattes som en indikasjon på produktdefekt.

7. Overfør forsiktig hele supernatanten av gjennomstrømningsfraksjonen til et nytt 1,5 ml MCT uten å forstyrre pelleten i PT.
8. Tilsett 350 µl etanol (96–100 % v/v, renhetsgrad p.a.). Virvelbland og sentrifuger en kort stund (1–2 s ved 500–1000 × g) for å fjerne dråper fra innsiden av rørlokket.



Det må ikke sentrifugeres i mer enn 1–2 s, da dette kan resultere i pelletering av nukleinsyrer og lavere utbytte av totalt RNA.

9. Pipetter 700 µl prøve i PRC (rød) plassert i et 2 ml PT og sentrifuger i 1 min ved 8000–20 000 × g. Plasser spinnkolonnen (PRC) i et nytt 2 ml PT, og kast det gamle PT som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen.
10. Pipetter resten av prøven i PRC og sentrifuger i 1 min ved 8000–20 000 × g. Plasser spinnkolonnen (PRC) i et nytt 2 ml PT, og kast det gamle PT som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen.



Pipetter prøven forsiktig i spinnkolonnen (PRC), og sjekk visuelt at hele prøven er overført til spinnkolonnen (PRC).

11. Pipetter 350 µl vaskebuffer 1 (BR3) i PRC. Sentrifuger i 1 min ved 8000–20 000 × g. Plasser spinnkolonnen (PRC) i et nytt 2 ml PT, og kast det gamle PT som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen.
12. Tilsett 10 µl DNase I (RNFD)-arbeidsløsning i 70 µl DNA-nedbrytningsbuffer (RDD) i et 1,5 ml MCT. Blant ved å slå forsiktig på røret, og sentrifuger kort for å samle resterende væske fra sidene av røret.

Hvis du for eksempel behandler 10 prøver, tilsett 100 µl DNase I (RNFD)-arbeidsløsning til 700 µl DNA-nedbrytningsbuffer (RDD). Bruk 1,5 ml MCT-ene som følger med settet.



DNase I er spesielt følsomt for fysisk denaturering. Blanding skal kun utføres ved å slå forsiktig på røret. Ikke bruk virvelblander.

13. Pipetter DNase I (RNFD)-inkubasjonsblandingen (80 µl) direkte på PRC-membranen, og plasser den på bordflaten (20–30 °C) i 15 min.



Pass på at DNase I (RNFD)-inkubasjonsblandingen plasseres direkte på membranen. DNase-nedbrytningen vil være ufullstendig hvis en del av blandingen tilsettes og blir værende på veggene eller O-ringen til spinnkolonnen (PRC).

14. Pipetter 350 µl vaskebuffer 1 (BR3) i PRC, og sentrifuger i 1 min ved 8000–20 000 × g. Plasser spinnkolonnen (PRC) i et nytt 2 ml PT, og kast det gamle PT som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen.

15. Pipetter 500 µl vaskebuffer 2 (BR4) i PRC, og sentrifuger i 1 min ved 8000–20 000 × g. Plasser spinnkolonnen (PRC) i et nytt 2 ml PT, og kast det gamle PT som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen.



Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som konsentrat. Pass på at etanol er tilsatt i vaskebuffer 2 (BR4) før bruk (se «Ting du må gjøre før du starter», side 24).

16. Tilsett ytterligere 500 µl vaskebuffer 2 (BR4) i PRC. Sentrifuger i 3 min ved 8000–20 000 × g.

17. Kast reagensrøret PT som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen, og plasser PRC i et nytt 2 ml PT. Sentrifuger i 1 min ved 8000–20 000 × g.

18. Kast PT som inneholder gjennomstrømningsfraksjonen. Plasser PRC i et 1,5 ml MCT, og pipetter 40 µl elusjonsbuffer (BR5) direkte på PRC-membranen. Sentrifuger i 1 min ved 8000–20 000 × g for å eluere RNA.

Det er viktig å fukte hele membranen med elusjonsbuffer (BR5) for å oppnå maksimum elusjonseffektivitet.

19. Gjenta elusjonstrinnet (trinn 18) som beskrevet, med 40 µl elusjonsbuffer (BR5) og det samme MCT.

20. Inkuber eluatet i 5 min ved 65 °C i risteren – inkubatoren (fra trinn 5) uten å riste. Avkjøl straks på is etter inkubasjon.



Denne inkubasjonen av prøver ved 65 °C denaturerer RNA for nedstrømapplikasjoner. Ikke utelat dette trinnet selv om nedstrømapplikasjonen inkluderer et varmedenatureringstrinn. På dette tidspunktet er det avgjørende med tilstrekkelig RNA-denaturering for maksimum effektivitet i nedstrømapplikasjoner. Ikke overstig inkubasjonstiden eller temperaturen.

21. Hvis RNA-prøvene ikke brukes straks, oppbevares de ved -20 °C eller -70 °C.

Siden RNA forblir denaturert etter gjentatt frysing og tining, er det ikke nødvendig å gjenta ved 65 °C. Hvis du bruker RNA-prøver i en diagnostisk analyse, følg produsentens anvisninger.

For nøyaktig kvantifisering av RNA ved absorbans ved 260 nm anbefaler vi at prøver fortynnes med 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Hvis du fortynner prøven i RNase-fritt vann, kan dette føre til unøyaktig lave verdier.

Nullstill spektralfotometeret ved hjelp av en blank prøve bestående av det samme forholdet av elusjonsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i prøvene som skal måles. Elusjonsbuffer (BR5) har høy absorbans ved 220 nm, noe som kan føre til høye bakgrunnsabsorbansnivåer hvis spektralfotometeret ikke er riktig nullstilt.



For kvantifisering i Tris-HCl-buffer brukes forholdet $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$.
Se Vedlegg B, side 76.

22. Lukk på nytt alle flasker som inneholder buffere og RNase-fritt vann, hetteglass og rør som inneholder enzymer og enzymbuffer, og poser som inneholder plastmaterialer fra settet som ble brukt for protokollen. Oppbevar det gjenværende innholdet i settet som beskrevet i avsnitt «Håndtering og oppbevaring av reagenser» (side 21) og «Stabilitet under bruk» (side 21) inntil videre bruk.

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. For mer informasjon, se de relevante sikkerhetsdatabladene (Safety Data Sheet, SDS) som kan fås hos leverandøren av produktet.

Protokoll: Automatisert isolering av totalt RNA fra humant fullblod samlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Viktige punkter før du starter

- Pass på at settets eske er intakt og uskadet, og at bufferne ikke har lekket. Ikke bruk et sett som er skadet.
- Når du bruker pipette, må du passe på at den er stilt til riktig volum, og at væsken er forsiktig og fullstendig aspirert og dispensert.
- For å unngå å overføre prøver til feil rør og forbruksvarer av plast, pass på at alle PT, MCT-er og rotoradaptere er riktig merket med permanent penn. Merk lokket og hoveddelen på hvert MCT, hoveddelen på hvert PT og den utvendige veggen av hver rotoradapter.
- Hvis prøver og buffere søles under prosedyren, kan det redusere RNA-utbyttet og -renheten.
- Med mindre noe annet er indisert, skal alle trinn i denne protokollen, inkludert sentrifugeringstrinn, utføres ved romtemperatur (15–25 °C).

På grunn av sensitiviteten til nukleinsyreamplifikasjonsteknologi, er det viktig å følge disse forholdsreglene ved håndtering av prøver for å unngå krysskontaminering:

- Pipetter prøven forsiktig inn i PT, i bunnen av røret, uten å fukte kanten.
- Skift alltid pipettespisser mellom væskeoverføringer. Bruk pipettespisser med aerosolbarriere.
- Unngå at spinnkolonnenmembranen (PSC, PRC) kommer i kontakt med pipettespissen.
- Etter virvelblanding eller oppvarming av et MCT skal det sentrifugeres kort for å fjerne dråpene fra innsiden av lokket.

- Bruk hansker gjennom hele prosedyren. Bytt hansker straks hvis de kommer i kontakt med prøven.

Ting du må gjøre før du starter

- Blod må samles i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) i henhold til instruksjonene i *håndboken for PAXgene Blood RNA Tube*. Om nødvendig kan du se Vedlegg C (side 78) for anbefalinger om håndtering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Pass på at PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkuberes i minst 2 t ved romtemperatur etter at blodet er tatt, for å sikre riktig lysering av blodcellene og utfelling av RNA. Inkubasjon av PAXgene Blood RNA Tube (BRT) over natten kan føre til økning i utbytte. Hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ble oppbevart ved 2–8 °C, -20 °C eller -70 °C etter at blodet er tatt, må det først nå romtemperatur og deretter oppbevares ved romtemperatur i 2 timer før prosedyren startes.
- Les sikkerhetsinformasjonen på side 17.
- Les «Viktige merknader», side 56.
- Les retningslinjene om håndtering av RNA (Vedlegg A, side 75).
- Les tilhørende brukerhåndbok for QIAcube Connect MDx og eventuell tilleggsinformasjon som er levert med instrumentet, og vær spesielt oppmerksom på sikkerhetsinformasjonen.
- Pass på at enheter og instrumenter, som pipetter og QIAcube Connect MDx, er sjekket og kalibrert regelmessig i henhold til produsentens anbefalinger.
- Bindende buffer (BR2) kan danne et presipitat ved oppbevaring. Om nødvendig varmes den opp til 37 °C for å løse opp.
- Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som konsentrat. Før førstegangsbruk tilsettes egnet volum av etanol (96–100 % v/v, renhetsgrad p.a.) som indisert på flasken, for å oppnå en arbeidsløsning.

- Hvis du bruker det RNase-frie DNase-settet for første gang, må en DNase I-arbeidsløsning klargjøres. Oppløs det faste DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-enheter)* i 550 µl av DNase resuspensjonsbuffer (DRB) som leveres med settet. Pass på at ikke noe DNase I (RNFD) går tapt når flasken åpnes. Ikke virvelbland rekonstituert DNase I (RNFD). DNase I er spesielt følsomt for fysisk denaturering. Blanding skal kun utføres ved å vende flasken forsiktig opp og ned.
- Rekonstituert DNase I (RNFD) kan oppbevares ved 2–8 °C i det originale hetteglasset (stamløsning) eller ved -20 °C etter at arbeidsløsningen er fjernet fra hetteglasset og delt opp i engangsalikvoter (bruk 1,5 ml MCT som følger med settet, det er nok til 5 alikvoter). Tinte alikvoter kan lagres ved 2–8 °C. Ikke frys alikvotene på nytt etter tining.
- Når du rekonstituerer og alikvoterer DNase I (RNFD), pass på at du følger retningslinjene for håndtering av RNA (Vedlegg A, side 75).
- Installer riktig risteradapter (følger med QIAcube Connect MDx, bruk adapteren til 2 ml rør med sikkerhetslås, merket med «2»), og plasser risterstativet på toppen av adapteren.
- Sjekk avfallsskuffen, og tøm den om nødvendig.
- Installer aktuelle protokoller hvis dette ikke allerede er gjort for tidligere kjøring. For QIAcube Connect MDx må alle protokoller i den aktuelle zip-filen lastes ned. Se «Installere protokoller på QIAcube Connect MDx», på side 58.

Prosedyre

1. Lukk QIAcube Connect MDx-døren, og slå på instrumentet med strømbryteren (se figur 15, side 57).

En pipelyd avgis, og oppstartskjermbildet vises. Instrumentet utfører initialiseringstester automatisk.

* Kunitz-enheter er enhetene som vanligvis brukes til å måle DNase I, definert som mengden av DNase I som fører til en økning i A_{260} på 0,001 per minutt per milliliter ved 25 °C, pH 5,0, med sterkt polymerisert DNA som substratet (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 og 363).

2. Åpne døren til QIAcube Connect MDx, og sett inn de nødvendige reagensene og plastdelene i instrumentet. Se «Lasting av QIAcube Connect MDx» på side 59.

For å spare tid kan lasting utføres under ett av eller begge sentrifugeringstrinnene på 10 min (trinn 3 og 5).

3. Sentrifuger PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 min ved 3000–5000 × g med en svingbøtterotor.



Pass på at blodprøven har vært inkubert i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i minimum 2 t ved romtemperatur (15–25 °C) for å oppnå fullstendig lysering av blodceller og utfelling av RNA.



Rotoren må inneholde røradaptore for rør med rund bunn. Hvis andre typer røradaptore brukes, kan rørene knuses under sentrifugering.

4. Fjern supernatanten ved å dekantere eller pipettere. Hvis supernatanten er dekantert, pass på så ikke pelleten forstyrres, og tørk av kanten på røret med rent tørkepapir. Tilsett 4 ml RNase-fritt vann (RNFV) til pelleten, og lukk røret med en fersk, sekundær BD Hemogard-hette (følger med kitet).

5. Virvelbland til pelleten er synlig oppløst, og sentrifuger i 10 min ved 3000–5000 × g med en svingbøtterotor. Ta av og kast hele supernatanten.

Små rester som blir liggende igjen etter supernatanten etter virvelblanding, men før sentrifugering, vil ikke påvirke prosedyren.



Ufullstendig fjerning av supernatant vil hemme lyseringen og fortenne lysatet, og vil derfor påvirke forholdene for binding av RNA til PAXgenemembranen.

6. Tilsett 350 µl resuspensjonsbuffer (BR1), og virvelbland til pelleten er synlig oppløst.

7. Pipetter prøven i et 2 ml PT.



Bruk 2 ml PT-er som er inkludert i PAXgene Blood RNA Kit.

8. Last de åpne PT-ene som inneholder prøven, i QIAcube Connect MDx-risteren (se figur 18, side 61). Prøveposisjonene er nummerert for å gjøre lasting enklere. Sett inn risterstativpluggen (følger med QIAcube Connect MDx) i plassene i kanten av risterstativet ved siden av hvert PT. Dette aktiverer deteksjon av prøver under innsetningskontrollen.



Pass på at riktig risteradapter (risteradapter, 2 ml rør med sikkerhetslås, merket med «2», følger med QIAcube Connect MDx) er installert.



Hvis det behandles færre enn 12 prøver, pass på at du setter inn risterstativet som vist i figur 22, side 65. Én (1) eller 11 prøver kan ikke behandles. Posisjonsnumrene i risterstativet tilsvarer posisjonsnumrene i sentrifugen.

9. Lukk QIAcube Connect MDx-døren (se figur 15, side 57).

10. Velg protokollen «PAXgene Blood RNA Part A» (PAXgene Blood RNA del A), og start protokollen.

Følg instruksjonene som står på trykkskjermen til QIAcube Connect MDx.



Pass på at begge programdeler (del A og del B) er installert på QIAcube Connect MDx (se «Installere protokoller på QIAcube Connect MDx», side 58).



Instrument utfører lastkontroller for prøver, spisser, rotoradaptere og reagensflasker.

11. Etter at protokollen «PAXgene Blood RNA Part A» (PAXgene Blood RNA del A) er ferdig, åpne døren til QIAcube Connect MDx-instrumentet (se figur 15, side 57).

Ta ut og kast PRC fra rotoradapterne og de tomme PT-ene fra risteren.



Under kjøringen overfører instrumentet spinnkolonner fra rotoradapterens posisjon 1 (lokkposisjon L1) til rotoradapterposisjon 3 (lokkposisjon L2) (se figur 20, side 63).

12. Lukk lokkene på alle 1,5 ml MCT-er som inneholder rensset RNA i rotoradapterne (posisjon 3, lokkposisjon L3, se figur 20, side 63). Overfør 1,5 ml MCT-ene til QIAcube Connect MDx-risteradapteren (se figur 18, side 61).
13. Lukk QIAcube Connect MDx-døren (se figur 15, side 57).
14. Velg protokollen «PAXgene Blood RNA Part B» (PAXgene Blood RNA del B), og start protokollen.

Følg instruksjonene som står på QIAcube Connect MDx-trykkskjermen.



Dette programmet inkuberer prøvene ved 65 °C og denaturerer RNA for nedstrømapplikasjoner. Ikke utelat dette trinnet selv om nedstrømapplikasjonen inkluderer et varmedenatureringstrinn. På dette tidspunktet er det avgjørende med tilstrekkelig RNA-denaturering for maksimum effektivitet i nedstrømapplikasjoner.

15. Etter at programmet «PAXgene Blood RNA Part B» (PAXgene Blood RNA del B) er ferdig, åpne døren til QIAcube Connect MDx-instrumentet (se figur 15, side 57). MCT-er som inneholder rensset RNA, skal straks plasseres på is.



ADVARSEL: Svært varm overflate. Risteren kan nå temperaturer på opptil 70 °C. Ikke rør den når den er svært varm.



Ikke la rensset RNA bli værende i QIAcube Connect MDx. Rensset RNA kan degraderes, siden prøvene ikke er nedkjølt. Det anbefales derfor ikke å kjøre prøveklargjøringskjøringer over natten uten tilsyn.

16. Hvis RNA-prøvene ikke brukes straks, oppbevares de ved -20 °C eller -70 °C. Siden RNA forblir denaturert etter gjentatt frysing og tining, er det ikke nødvendig å gjenta varmeinkubasjonsprotokollen («PAXgene Blood RNA Part B» (PAXgene Blood RNA del B)). Hvis du bruker RNA-prøver i en diagnostisk analyse, følg produsentens anvisninger.

For nøyaktig kvantifisering av RNA ved absorbansmåling ved 260 nm, anbefaler vi at prøver fortynnes i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. * Hvis du fortynner prøven i RNase-fritt vann, kan dette føre til unøyaktig lave verdier.

Nullstill spektralfotometeret ved hjelp av en blank prøve bestående av det samme forholdet av elusjonsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i prøvene som skal måles. Elusjonsbuffer (BR5) har høy absorbans ved 220 nm, noe som kan føre til høye bakgrunnsabsorbansnivåer hvis spektralfotometeret ikke er riktig nullstilt.



For kvantifisering i Tris-HCl-buffer brukes forholdet

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Se Vedlegg B, side 76.

17. Fjern reagensflaskestativet fra QIAcube Connect MDx-arbeidsbenken (se figur 18, side 61), og lukk alle reagensflasker med riktig merkede lokk. Lukk på nytt alle flasker som inneholder buffere og RNase-fritt vann, hetteglass og rør som inneholder enzymer og enzymbuffere, og poser som inneholder plastmaterialer fra settet som ble brukt for protokollen. Oppbevar det gjenværende innholdet i settet og reagensflaskene som beskrevet i avsnitt «Håndtering og oppbevaring av reagenser» (side 21) og «Stabilitet under bruk» (side 21) inntil videre bruk.

Ta ut og kast resterende reagenser i PT-ene i MCT-sporene på mikrosentrifugerørene i QIAcube Connect MDx. Ta ut og kast rotoradaptere fra sentrifugen. Tøm QIAcube Connect MDx-avfallsskuffen (se figur 15, side 57). Lukk instrumentdøren, og slå av instrumentet med strømbryteren.

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. For mer informasjon, se de relevante sikkerhetsdatabladene (Safety Data Sheet, SDS) som kan fås hos leverandøren av produktet.

Begrenset bruk av produktet

PAXgene Blood RNA Kit er beregnet på isolering av intracellulært RNA fra humant fullblod ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytter/ml) for in vitro-diagnostiske applikasjoner. Det er ikke for isolering av genomisk DNA eller virusnukleinsyrer fra humant fullblod. På grunn av det begrensede antallet transkripter som er validert for stabiliseringsspesifikasjoner (FOS- og IL1B-gentranskripter), er ikke ytelseegenskapene etablert for alle transkripter. Brukere skal gjennomgå produsentens data og egne data for å avgjøre om validering er nødvendig for andre transkripter. Komponentene i settet er kun ment å brukes i den manuelle og automatiserte protokollen beskrevet i denne bruksanvisningen.

Se *håndboken for PAXgene Blood RNA Tube* for informasjon om bruken av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem testes hvert parti med PAXgene Blood RNA Kit mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

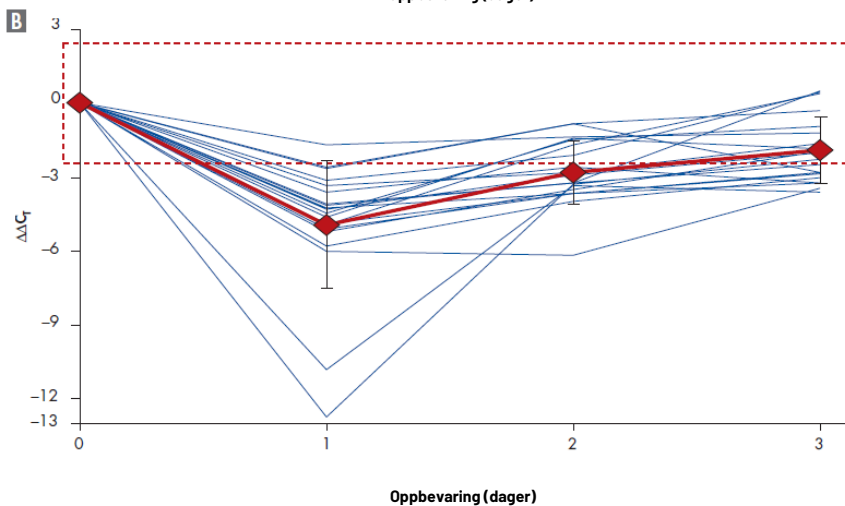
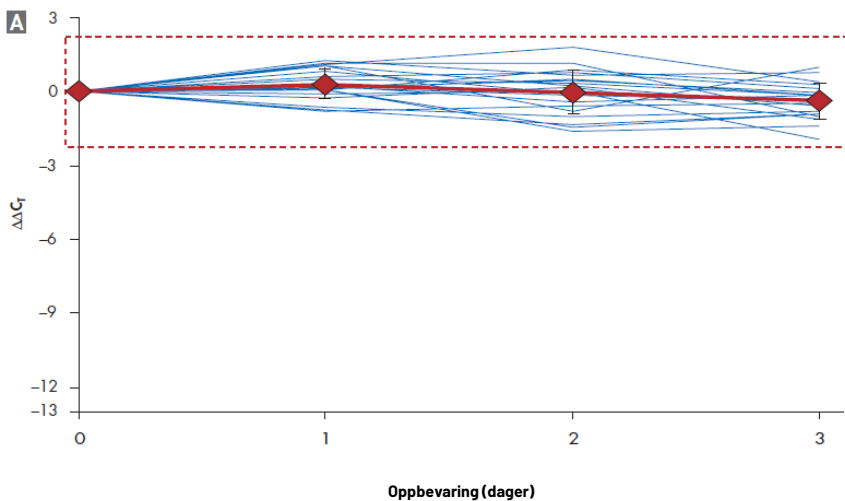
Ytelseegenskaper

Prøveinnsamling og stabilisering

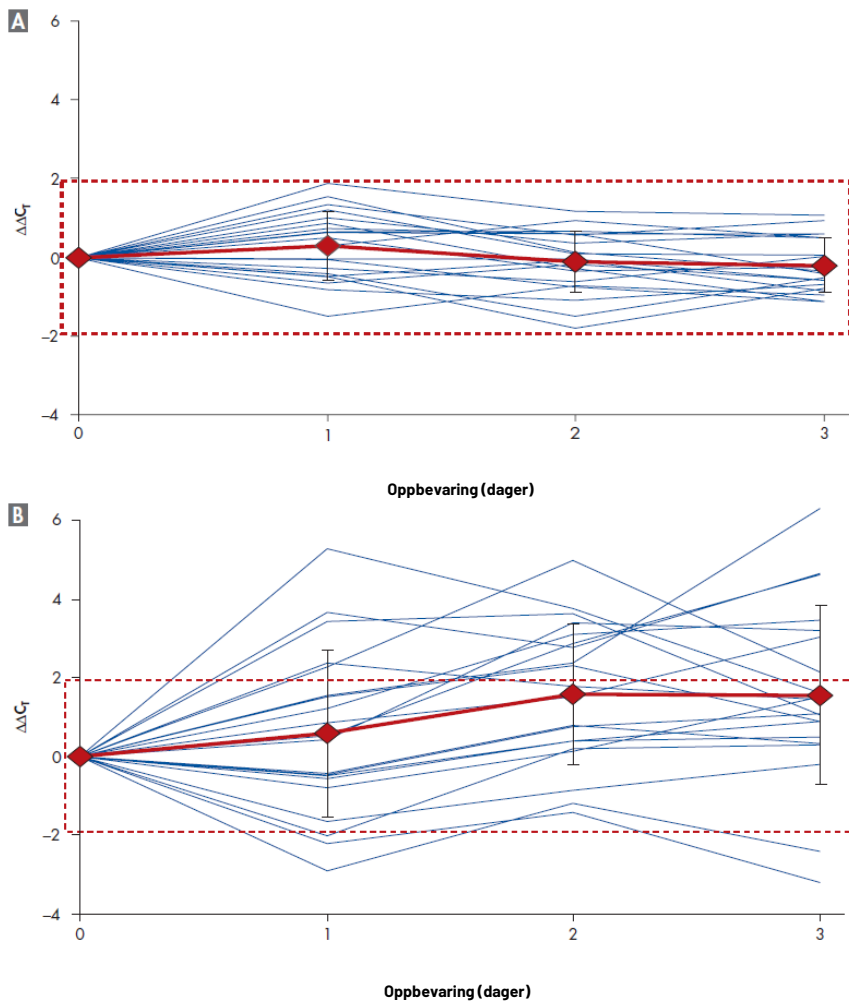
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inneholder en egen RNA-stabiliseringsreagens. Dette tilsetningsstoffet beskytter RNA-molekyler mot degradering av RNaser og minimerer ex vivo-endringer i genuttrykk. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) skal brukes til humant fullblod og stabilisere cellulært RNA i opptil 3 dager ved 18-25 °C (figur 4 og figur 5, henholdsvis side 39 og 40) eller opp til 5 dager ved 2-8 °C (figur 6 og 7, side 41 og 42). Stabilisert blod kan i tillegg lagres frosset. Data som nå er tilgjengelige, viser stabilisering av cellulært RNA i minst 11 år ved -20 °C eller -70 °C*. For mer informasjon fra pågående studier som evaluerer stabilitet over lengre tidsperioder, kan du besøke www.preanalytix.com eller kontakt QIAGENS tekniske serviceavdeling.

Den faktiske varigheten av RNA-stabilisering kan variere avhengig av arten med cellulært RNA og nedstrømapplikasjonen som brukes. På grunn av det begrensede antallet transkripter som er validert for stabiliseringsspesifikasjoner (FOS- og IL1B-gentranskripter), er ikke ytelseegenskapene etablert for alle transkripter. Brukere skal gjennomgå produsentens data og egne data for å avgjøre om validering er nødvendig for andre transkripter.

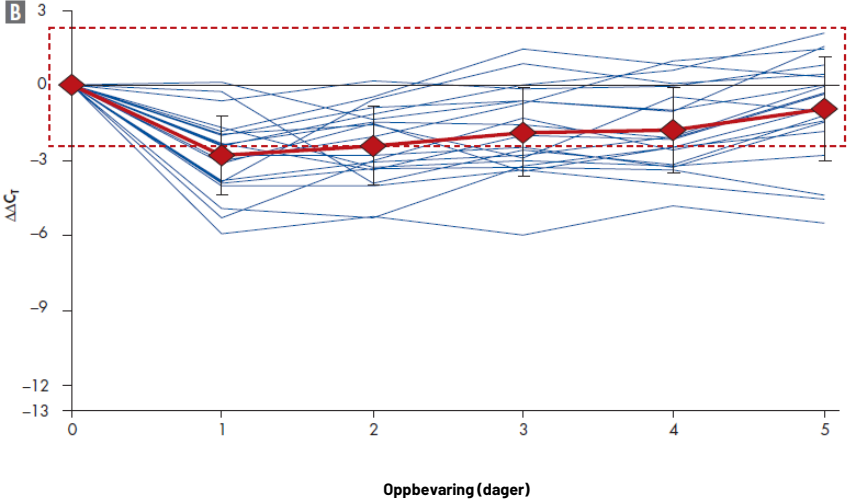
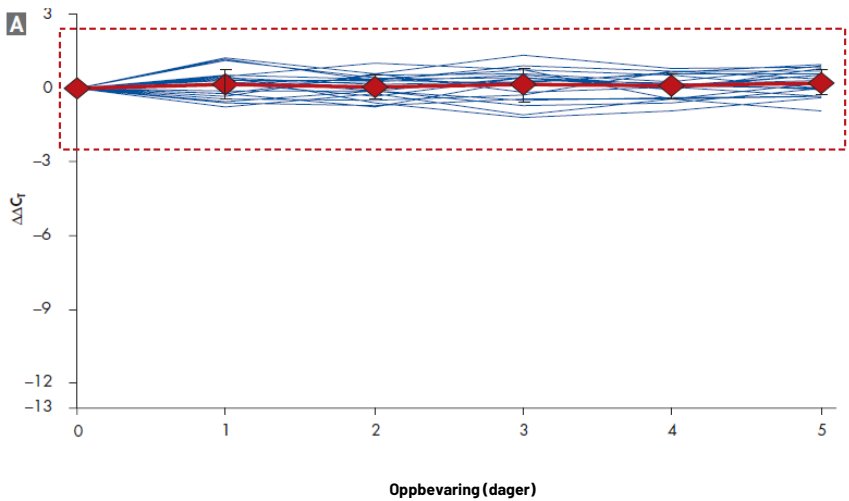
* Det pågår en langsiktig studie av blodlagring i PAXgene Blood RNA Tubes.



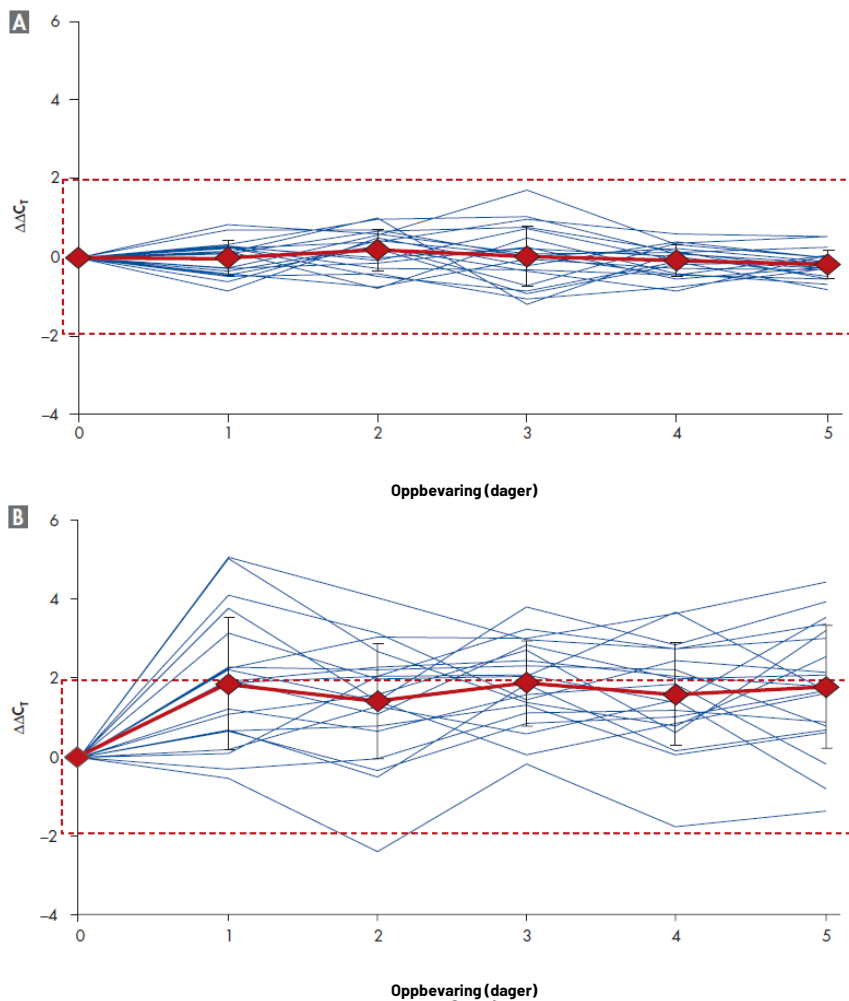
Figur 4: RNA-stabilitet i blodprøver ved 18–25 °C: FOS. Blod ble tatt fra 10 tilsynelatende friske donorer med duplikate prøver og oppbevart ved 18–25 °C i det indiserte antallet dager, etterfulgt av isolering av totalt RNA. **[A]** Blod ble tatt og lagret i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), og totalt RNA ble rensset med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blod ble tatt og lagret i standard prøvetakingsrør for blod med EDTA som antikoagulant, og totalt RNA ble rensset med standard organisk isoleringsmetode med silikamembranbasert RNA-rengjøring. Relative transkriptnivåer av FOS ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR, med 18S rRNA som intern standard. Verdiene for alle prøver er plottet med middelverdier og standardavvik for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3 \times$ presisjon for analysen (2,34 C_t).



Figur 5: RNA-stabilitet i blodprøver ved 18–25 °C: IL1B. Det ble tatt blodprøver, og totalt RNA ble renset etter oppbevaring ved 18–25 °C, som beskrevet i figur 4. Relative transkriptnivåer av IL1B ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR, med 18S rRNA som intern standard. Verdiene for alle prøver er plottet med middelerdier og standardavvik for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3 \times$ presisjon for analysen ($1,93 C_T$).



Figur 6: RNA-stabilitet i blodprøver ved 2–8 °C: FOS. Blod ble tatt fra 10 donorer med duplikate prøver og oppbevart ved 2–8 °C i det indiserte antallet dager, etterfulgt av isolering av totalt RNA. **[A]** Blod ble tatt og lagret i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), og totalt RNA ble rensset med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blod ble tatt og lagret i standard prøvetakingsrør for blod med EDTA som antikoagulant, og totalt RNA ble rensset med standard organisk isoleringsmetode med silikamembranbasert RNA-rengjøring. Relative transkriptnivåer av FOS ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR, med 18S rRNA som intern standard. Verdiene for alle prøver er plottet med middelværdir og standardavvik for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3 \times$ presisjon for analysen (2,34 C_t).



Figur 7: RNA-stabilitet i blodprøver ved 2–8 °C: IL1B. Det ble tatt blodprøver, og totalt RNA ble renset etter oppbevaring ved 2–8 °C, som beskrevet i figur 6. Relative transkriptnivåer av IL1B ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR, med 18S rRNA som intern standard. Verdiene for alle prøver er plottet med middelværdier og standardavvik for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3 \times$ presisjon for analysen ($1,93 C_T$).

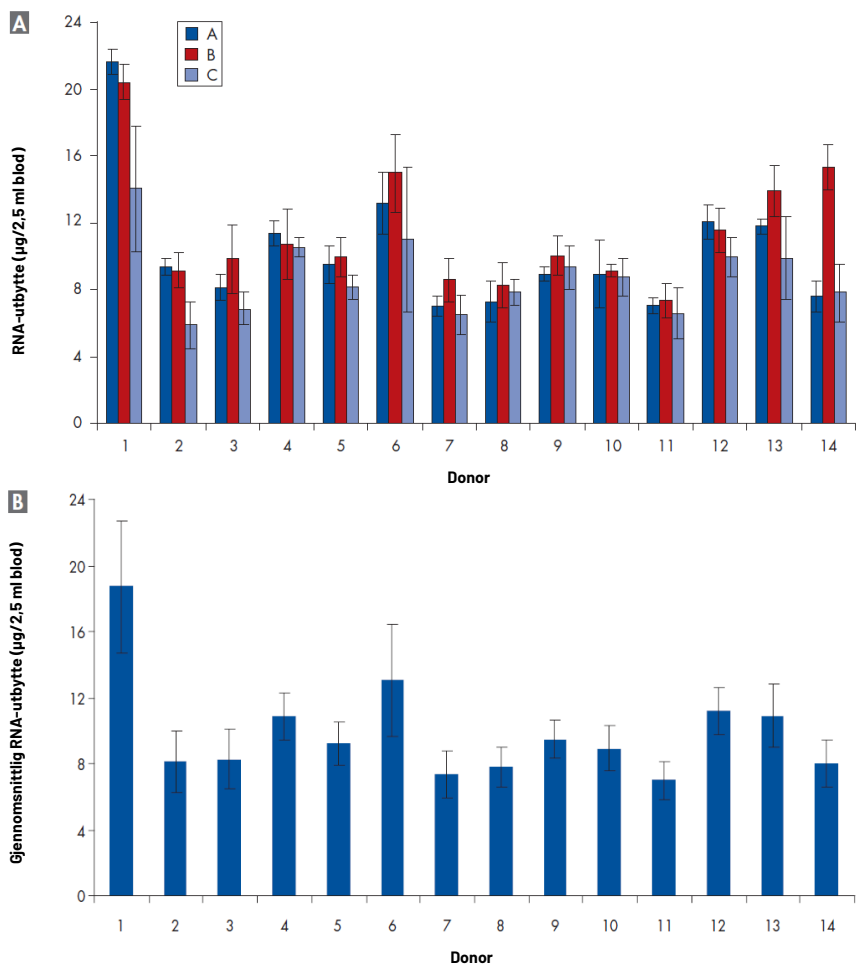
Manuell RNA-isolering

Totalt RNA som isoleres med PAXgene Blood RNA System, er rent. Med den manuelle protokollen er A_{260}/A_{280} -verdier mellom 1,8 og 2,2, og $\leq 1\%$ (vekt/vekt) genomisk DNA finnes i $\geq 95\%$ av alle prøver, som målt med kvantitativ, real-time PCR av en sekvens av beta-aktin-genet. Minst 95 % av prøvene viser ingen hemming i RT-PCR når eluatet utgjør opptil 30 % av RT-PCR-reaksjonsvolumet.

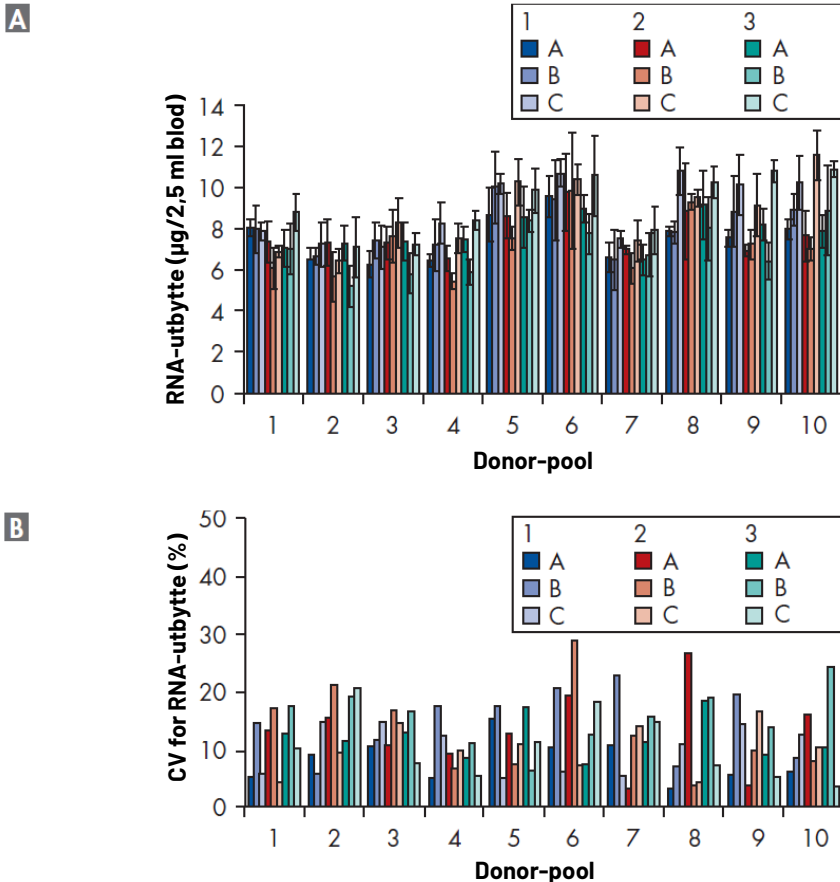
Med den manuelle protokollen er gjennomsnittlig prøveklargjøringstid (basert på data fra 12 prøveklargjøringer) ca. 90 min*, med bare 40 min praktisk arbeidstid. RNA-utbytte fra 2,5 ml friskt humant fullblod er $\geq 3\mu\text{g}$ for $\geq 95\%$ av prøvene som er behandlet. Siden utbytte er sterkt donoravhengig, kan individuelle utbytteverdier variere. For individuelle donorer gir PAXgene Blood RNA System svært reproducerbare og repeterbare utbytteverdier (figur 8 og figur 9, henholdsvis sidene 44 og 45) og reproducerbar og repeterbar RT-PCR (figur 10 og figur 11, henholdsvis sidene 50 og 51), noe som gjør systemet svært robust for kliniske diagnostiske tester.

Figur 8 (side 44) indikerer den generelle repeterbarheten og reproducerbarheten for PAXgene Blood RNA System. Flere studier ble utført for å vise påvirkningen av forskjellige PAXgene Blood RNA Kit-partier og forskjellige operatører på reproducerbarheten av RNA-resultater og sanntids-RT-PCR-ytelse. Da samlinger av blodprøver ble brukt i stedet for individuelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) for disse studiene, gjenspeiler ikke resultatene systemets repeterbarhet, inkludert variasjoner mellom individuelle blodprøver, men bare repeterbarheten av prøveklargjøringen (se figur 9, side 45).

* Samlet protokollkjøretid, herunder foregående håndtering av PAXgene Blood RNA Tubes (sentrifugeringer, pelletvask og pelletresuspensjon).



Figur 8: Reproduerbar og repeterbar RNA-isolering. Blodprøver i kvadruplikat fra 14 donorer ble behandlet manuelt av hver av 3 teknikere (A, B, C). Tre sett med utstyr ble brukt, og alle prøver klargjort av én tekniker ble behandlet med det samme utstyret. [A] Gjennomsnitt og standardavvik for RNA-utbytte per replikatprøve fra de samme donorene og forskjellige teknikere vises. [B] Tolv replikatblodprøver fra hver av 14 donorer ble behandlet av de 3 forskjellige teknikerne. Gjennomsnitt og standardavvik for RNA-utbytte for prøver fra de samme donorene samt alle teknikere vises. For alle RNA-prøver varierte A_{260}/A_{280} -forhold fra 1,8 til 2,2.



Figur 9: Repeterbarhet og reproduserbarhet for RNA-utbytte for forskjellige operatører og PAXgene Blood RNA Kit-partier som bruker samlede blodprøver. Blodprøver fra 30 forskjellige donorer ble tatt i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, 12 rør per donor, totalt 360 rør). Innholdet i rørene fra 3 donorer ble samlet og deretter alikvotert på nytt til 36 prøver. Disse 36 prøvene per 3 donor-pool ble behandlet manuelt av 3 forskjellige operatører. Hver operatør brukte 3 forskjellige PAXgene Blood RNA Kit-partier til isolering av RNA og behandlet firedoble prøver fra hver av de 10 donor-poolene. **[A]** RNA-utbytte og standardavvik for hver operatør-parti-kombinasjon. Firedoble blodprøver fra 10 donor-pooler ble behandlet av 3 forskjellige operatører (A, B, C) med hvert av de 3 settpartiene (1, 2, 3). Gjennomsnittlige utbytteverdier (kolonnene) og standardavvikene (feilsøyler) per kvadruplikate prøve fra den samme donor-poolen for forskjellige operatører og forskjellige kit-partier vises. **[B]** CV for RNA-utbytte per donor-pool for alle operatør-parti-kombinasjoner (A, B, C, 1, 2, 3) som beregnet fra gjennomsnittlig utbytte og standardavvik for utbyttet vises i figur 9A.

Tabell 1A: Reproduserbarhet innenfor hvert parti og innenfor hver bruker for valgte donor-pooler (1, 6, 9, 10)

| Kombinasjon av data | Donor-pool 1 ($5,1 \times 10^6$ celler/ml) | | | Donor-pool 6 ($6,5 \times 10^6$ celler/ml) | | |
|---------------------|---|----------------------|--------|---|----------------------|--------|
| | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) |
| Parti 1, bruker A | 8,03 | 0,42 | 5 | 9,55 | 0,99 | 10 |
| Parti 1, bruker B | 7,98 | 1,17 | 15 | 9,38 | 1,94 | 21 |
| Parti 1, bruker C | 7,87 | 0,45 | 6 | 10,71 | 0,65 | 6 |
| Parti 2, bruker A | 7,32 | 0,98 | 13 | 9,78 | 1,89 | 19 |
| Parti 2, bruker B | 6,09 | 1,04 | 17 | 9,82 | 2,83 | 29 |
| Parti 2, bruker C | 6,87 | 0,31 | 4 | 10,37 | 0,74 | 7 |
| Parti 3, bruker A | 7,04 | 0,90 | 13 | 8,96 | 0,68 | 8 |
| Parti 3, bruker B | 6,98 | 1,22 | 17 | 7,73 | 0,97 | 13 |
| Parti 3, bruker C | 8,78 | 0,89 | 10 | 10,59 | 1,94 | 18 |
| | Donor-pool 9 ($8,4 \times 10^6$ celler/ml) | | | Donor-pool 10 ($10,2 \times 10^6$ celler/ml) | | |
| | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) |
| Parti 1, bruker A | 7,52 | 0,41 | 6 | 7,96 | 0,49 | 6 |
| Parti 1, bruker B | 8,82 | 1,72 | 19 | 8,90 | 0,76 | 9 |
| Parti 1, bruker C | 10,14 | 1,46 | 14 | 10,22 | 1,29 | 13 |
| Parti 2, bruker A | 6,92 | 0,27 | 4 | 7,63 | 1,23 | 16 |
| Parti 2, bruker B | 7,20 | 0,71 | 10 | 7,00 | 0,56 | 8 |
| Parti 2, bruker C | 9,14 | 1,52 | 17 | 11,56 | 1,21 | 10 |
| Parti 3, bruker A | 8,18 | 0,76 | 9 | 7,85 | 0,82 | 10 |
| Parti 3, bruker B | 6,41 | 0,88 | 14 | 8,88 | 2,17 | 24 |
| Parti 3, bruker C | 10,78 | 0,56 | 5 | 10,88 | 0,37 | 3 |

Tabell 1B: Reproduserbarhet innenfor hver bruker og mellom alle partier for valgte donor-pooler (1, 6, 9, 10)

| Kombinasjon av data | Donor-pool 1 ($5,1 \times 10^6$ celler/ml) | | | Donor-pool 6 ($6,5 \times 10^6$ celler/ml) | | |
|------------------------|---|----------------------|--------|---|----------------------|--------|
| | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) |
| Bruker A, alle partier | 7,46 | 0,85 | 11 | 9,43 | 1,22 | 13 |
| Bruker B, alle partier | 7,02 | 1,31 | 19 | 8,98 | 2,09 | 23 |
| Bruker C, alle partier | 7,84 | 0,98 | 13 | 10,56 | 1,15 | 11 |
| | Donor-pool 9 ($8,4 \times 10^6$ celler/ml) | | | Donor-pool 10 ($10,2 \times 10^6$ celler/ml) | | |
| | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) |
| Bruker A, alle partier | 7,54 | 0,72 | 10 | 7,81 | 0,82 | 11 |
| Bruker B, alle partier | 7,48 | 1,50 | 20 | 8,26 | 1,54 | 19 |
| Bruker C, alle partier | 10,02 | 1,34 | 13 | 10,89 | 1,10 | 10 |

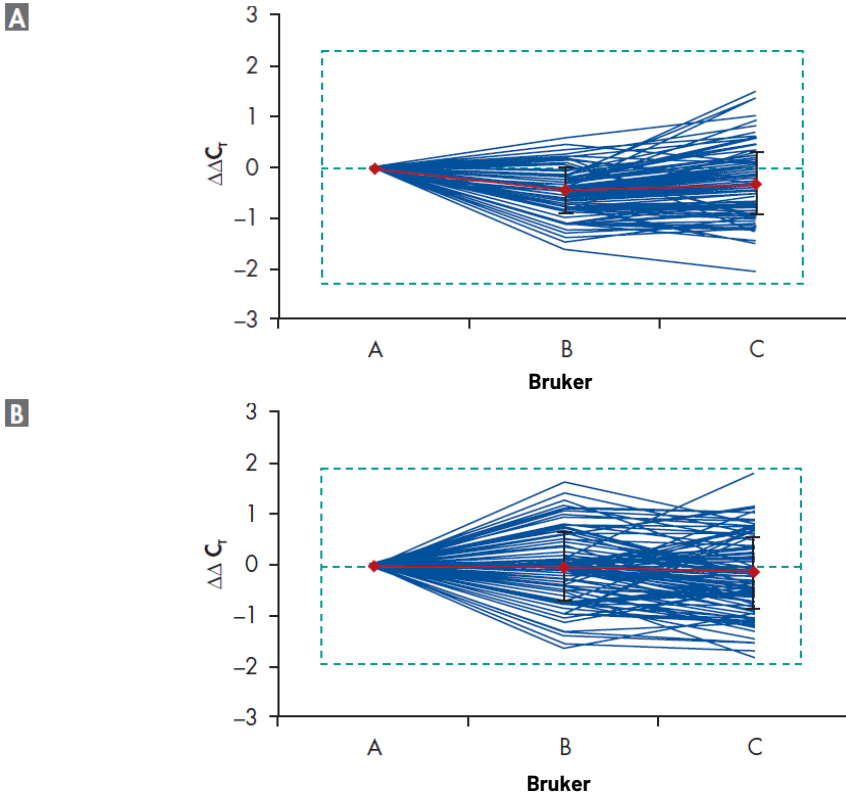
Tabell 1C: Reproduserbarhet innenfor hvert parti og mellom alle brukere for valgte donor-pooler (1, 6, 9, 10)

| Kombinasjon av data | Donor-pool 1 ($5,1 \times 10^6$ celler/ml) | | | Donor-pool 6 ($6,5 \times 10^6$ celler/ml) | | |
|-----------------------|---|----------------------|--------|---|----------------------|--------|
| | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) |
| Parti 1, alle brukere | 7,96 | 0,69 | 9 | 9,88 | 1,34 | 14 |
| Parti 2, alle brukere | 6,76 | 0,93 | 14 | 9,99 | 1,84 | 18 |
| Parti 3, alle brukere | 7,60 | 1,27 | 17 | 9,09 | 1,71 | 19 |
| | Donor-pool 9 ($8,4 \times 10^6$ celler/ml) | | | Donor-pool 10 ($10,2 \times 10^6$ celler/ml) | | |
| | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) |
| Parti 1, alle brukere | 8,83 | 1,63 | 19 | 9,02 | 1,27 | 14 |
| Parti 2, alle brukere | 7,75 | 1,36 | 18 | 8,73 | 2,31 | 26 |
| Parti 3, alle brukere | 8,46 | 1,99 | 24 | 9,20 | 1,80 | 20 |

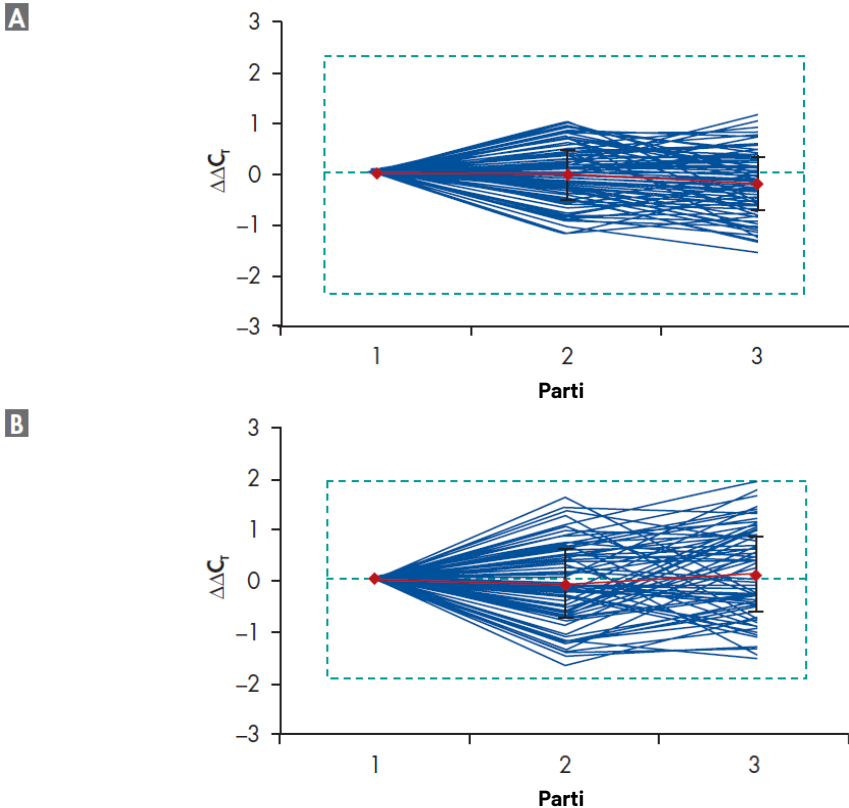
Tabell 1D: Reproduserbarhet mellom alle partier og alle brukere for valgte donor-pooler (1, 6, 9, 10)

| Kombinasjon av data | Donor-pool 1 ($5,1 \times 10^6$ celler/ml) | | | Donor-pool 6 ($6,5 \times 10^6$ celler/ml) | | |
|-----------------------|---|----------------------|--------|---|----------------------|--------|
| | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) |
| Parti 1, alle brukere | 7,44 | 1,09 | 15 | 9,66 | 1,65 | 17 |
| | Donor-pool 9 ($8,4 \times 10^6$ celler/ml) | | | Donor-pool 10 ($10,2 \times 10^6$ celler/ml) | | |
| | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) | Gjennomsnittlig utbytte (μg) | SD (μg) | VK (%) |
| Parti 1, alle brukere | 8,35 | 1,70 | 20 | 8,99 | 1,80 | 20 |

Detaljert analyse av 4 representative donor-pooler. Valg av poolene var basert på leukocyttantallet og reflekterte de øvre, mellomste og nedre verdiene for normalområdet for leukocyttantall ($4,8 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^7$ leukocytter/ml). Leukocyttantallet representerer gjennomsnittet for 3 leukocyttinger fra 3 donorer per donor-pool.



Figur 10: Reproduserbarhet for RT-PCR – mellom brukere. RNA renset i eksperimentet beskrevet i figur 9 ble brukt i sanntids-RT-PCR. Relative transkriptnivåer av **[A]** FOS og **[B]** IL1B ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR med 18S rRNA som intern standard. Verdiene for alle prøver er plottet inn, i forhold til verdiene for bruker A (10 donor-pooler \times 3 kit-partier \times 4 replikater = 120 datasett for hvert gen), med gjennomsnitt (røde linjer) og standardavvik (svarte søyler) for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser $\pm 3x$ total presisjon for analysene (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Figur 11: Reproduerbarhet for RT-PCR – mellom kit-partier. RNA renset i eksperimentet beskrevet i figur 9 ble brukt i sanntids-RT-PCR. Relative transkriptnivåer av **[A]** FOS og **[B]** IL1B ble bestemt i sanntid, dupleks RT-PCR med 18S rRNA som intern standard. Verdiene for alle prøver er plottet inn, i forhold til verdiene for kit-parti 1 (10 donor-pooler × 3 brukere × 4 replikater = 120 datasett for hvert gen), med gjennomsnitt (røde linjer) og standardavvik (svarte søyler) for alle prøver som vises. De stiplede linjene viser ±3x total presisjon for analysene (FOS: 2,34 Ct; IL1B: 1,93 Ct).

Tabell 2: Sammendrag av RT-PCR-data fra figur 10 og figur 11

| Testsystem | FOS/18S rRNA-analyse | | IL1B/18S rRNA-analyse | |
|--|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Sammenligning av data | Gjennomsnitt ($\Delta\Delta C_T$) | \pm SD ($\Delta\Delta C_T$) | Gjennomsnitt ($\Delta\Delta C_T$) | \pm SD ($\Delta\Delta C_T$) |
| Reproduserbarhet innen hver bruker og mellom alle partier | | | | |
| Alle brukere, parti 1 – parti 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Alle brukere, parti 1 – parti 2 | -0,03 | 0,48 | -0,07 | 0,66 |
| Alle brukere, parti 1 – parti 3 | -0,21 | 0,52 | 0,11 | 0,71 |
| Reproduserbarhet innen hver bruker og mellom alle partier | | | | |
| Alle partier, bruker A – bruker A | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Alle partier, bruker A – bruker B | -0,46 | 0,44 | -0,06 | 0,69 |
| Alle partier, bruker A – bruker C | -0,31 | 0,60 | -0,15 | 0,71 |

Bruker: Tekniker, utførte studien.

Parti: Nummer på kit-parti som er brukt i denne studien.

SD: Standardavvik.

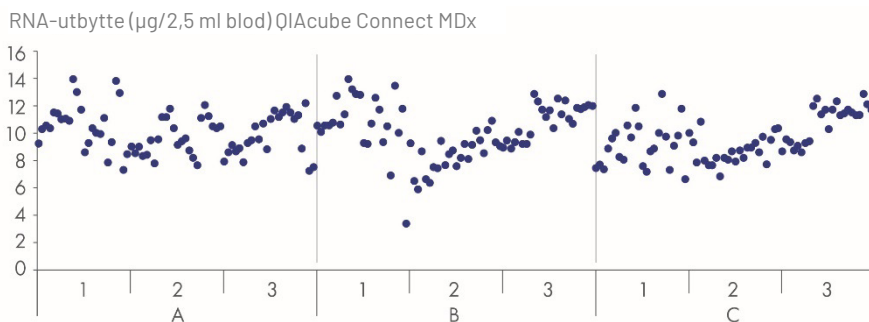
Gjennomsnittlige $\Delta\Delta C_T$ -verdier (N = 120) og standardavvik vises for data som presenteres i figur 10 og figur 11.

Automatisert RNA-isolering

RNA-utbytte fra 2,5 ml friskt humant fullblod er $\geq 3 \mu\text{g}$ for $\geq 95 \%$ av prøvene som er behandlet. Figur 12 (side 53) viser RNA-utbytteverdiene fra totalt 216 prøver klargjort med den automatiske protokollen med 3 settpartier av 3 operatører. Da samlede blodprøver ble brukt til disse studiene i stedet for individuelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), viser ikke resultatene RNA-utbyttet forventet fra enkeltprøver av individuelle blodprøver. Siden utbytteverdier er sterkt donoravhengige, kan individuelle utbytteverdier variere (figur 12, side 53).

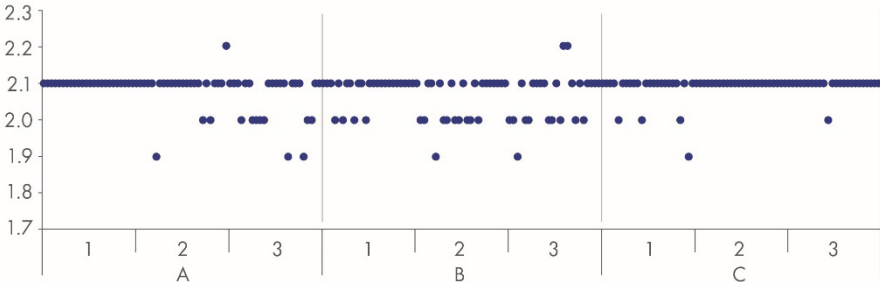
Minst 95 % av prøvene viser ingen hemming i RT-PCR når eluatet utgjør opptil 30 % av RT-PCR-reaksjonsvolumet. Krysskontaminering mellom prøvene kan ikke detekteres med den automatiserte protokollen, målt med kvantitativ, sanntids-RT-PCR av sekvensene av ABL1- og FOS-transkripter i RNA-negative prøver (vann) parett med RNA-positive prøver (humant fullblod) i samme kjøring.

RNA isolert med PAXgene Blood RNA System og den automatiserte protokollen er rent, som vist av manglende RT-PCR-hemming og A_{260}/A_{280} -verdier mellom 1,8 og 2,2. Genomisk DNA finnes ved $\leq 1\%$ (vekt/vekt) i $\geq 95\%$ av alle prøver, som målt med kvantitativ, real-time PCR av en sekvens av beta-aktin-genet. Figur 13 og figur 14 (side 54) viser A_{260}/A_{280} -verdiene og relativt genomisk DNA av totalt 216 prøver klargjort med den automatiserte protokollen med 3 settpartier av 3 operatører.



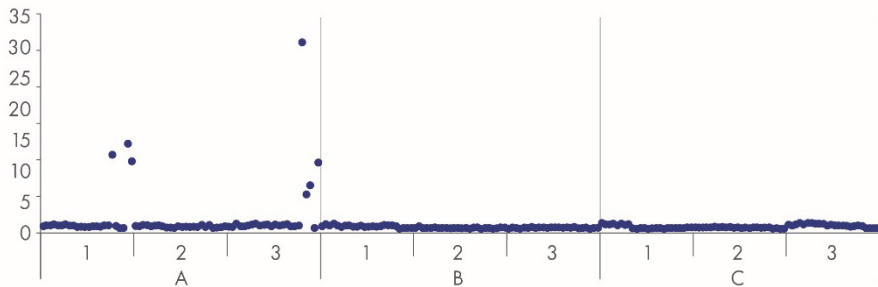
Figur 12: RNA-utbytte – automatisk behandling med QIAcube Connect MDx. Blodprøver fra individuelle donorer ble tatt i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Innholdet i rørene ble samlet i 6 donor-pooler og deretter omfordelt. Totalt 216 rør (dvs. 36 per pool) ble behandlet av 3 forskjellige operatører (A, B, C). Hver operatør brukte 3 forskjellige partier (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit til automatisert isolering med QIAcube Connect MDx og behandlet fire doble prøver fra hver av de 6 donor-poolene. RNA-utbytter for alle individuelle prøver vises for hver operatør-parti-kombinasjon.

RNA-renhet (A_{260}/A_{280}) QIAcube Connect MDx



Figur 13: RNA-renhet (A_{260}/A_{280} -verdier) – automatisk behandling med QIAcube Connect MDx. RNA ble renset av 3 forskjellige operatører (A, B, C) med 3 forskjellige partier (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit med QIAcube Connect MDx i eksperimentet beskrevet i figur 12. A_{260}/A_{280} -verdier av alle individuelle prøver vises for hver operatør-parti-kombinasjon.

Genomisk DNA (vekt/vekt) [%] QIAcube Connect MDx



Figur 14: RNA-renhet (% genomisk DNA-kontaminasjon) – automatisk behandling med QIAcube Connect MDx. RNA ble renset av 3 forskjellige operatører (A, B, C) med 3 forskjellige partier (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit med QIAcube Connect MDx i eksperimentet beskrevet i figur 12. Genomiske DNA-mengder (w/w) i alle individuelle prøver vises for hver operatør-parti-kombinasjon.

Den automatiske protokollen av RNA-isolering med PAXgene Blood RNA System gir meget lett reproduerbare og repeterbare RT-PCR-resultater og gjør resultatet meget robust for kliniske diagnostiske tester.

Stabilitet av isolert RNA

RNA-prøver isolert fra blodfylte PAXgene Blood RNA Tubes med PAXgene Blood RNA Kit er stabile i 5 års oppbevaring ved -20 °C og i 7 års oppbevaring ved -70 °C (endepunkt for studier).

Viktige merknader

Bruke QIAcube Connect MDx

Sørg for at du er kjent med bruken av QIAcube Connect MDx. Les brukerhåndboken til instrumentet og eventuell tilleggsinformasjon som er levert med instrumentet, og vær spesielt oppmerksom på sikkerhetsinformasjonen før du starter den automatiserte PAXgene Blood RNA-protokollen.

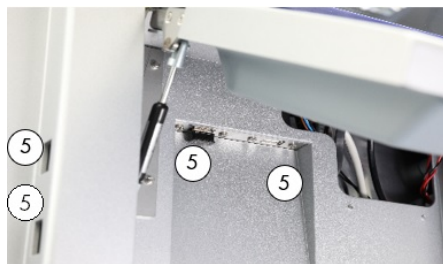
Starte QIAcube Connect MDx

Lukk QIAcube Connect MDx-døren, og slå på instrumentet med strømbryteren (se figur 15, side 57).

En pipelyd avgis, og oppstartskjermbildet vises. Instrumentet utfører initialiseringstester automatisk.



Fronten av QIAcube Connect MDx



Uttrukket trykkskjerm



QIAcube Connect MDx sett bakfra (venstre side)



QIAcube Connect MDx sett bakfra (høyre side)

Figur 15: Eksterne funksjoner i QIAcube Connect MDx.

- 1 Trykkskjerm
- 2 Deksel
- 3 Avfallsskuff
- 4 Strømbryter
- 5 2 USB-porter på venstre side av trykkskjermen, 2 USB-porter bak trykkskjermen (wifi-modul koblet til 1 USB-port)
- 6 RJ-45 Ethernet-port
- 7 Strømledningskontakt
- 8 Kjølsluftutløp

Trykkskjerm

QIAcube Connect MDx kontrolleres via en trykkskjerm. Trykkskjermen gjør at brukeren kan betjene instrumentet og at brukeren blir veiledet gjennom oppsett av arbeidsbenk. Under prøvebehandling viser trykkskjermen protokollstatus og gjenværende tid.





Figur 16: Uttrukket trykkskjerm på QIAcube Connect MDx.

Installere protokoller på QIAcube Connect MDx

Det kan være nødvendig å utføre en innledende protokollinstallasjon før den første RNA-klargjøringskjøringen på QIAcube Connect MDx kan utføres. Installer både protokollene «PAXgene Blood RNA Part A» (PAXgene Blood RNA del A) og «PAXgene Blood RNA Part B» (PAXgene Blood RNA del B).

Protokoller for QIAcube Connect MDx er tilgjengelig på **www.qiagen.com** og må nedlastes til USB-minnepinnen som følger med instrumentet. Disse protokollene vil bli overført til instrumentet via USB-porten.

Med USB-porten (på siden av trykkskjermen, se figur 15, side 57) kan QIAcube Connect MDx kobles til en USB-minnepinne som følger med instrumentet. Datafiler, f.eks. loggfiler eller rapportfiler, kan også overføres via USB-porten fra instrumentet til USB-minnepinnen.

-  USB-porten er kun til bruk med USB-minnepinnen som er levert av QIAGEN. Ikke koble andre enheter til denne porten.
-  Ikke ta ut USB-pinnen når du laster ned protokoller eller overfører datafiler, eller under en protokollkjøring.



Du finner mer informasjon om prosessen med å laste opp protokoller til QIAcube Connect MDx i brukerhåndboken for instrumentet.

Lasting av QIAcube Connect MDx

For å spare tid kan lasting skje under ett av eller begge sentrifugeringstrinnene på 10 min (trinn 3 og 5) i «Protokoll: Automatisert isolering av totalt RNA fra humant fullblod samlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)», side 30.

Reagensflasker

Før hver kjøring på QIAcube Connect MDx må du forsiktig fylle de 4 reagensflaskene med reagensene angitt i tabell 3 (side 60) opp til maksimum indikatornivå eller, hvis dette ikke er mulig, til nivået tillatt av buffervolumene som følger med PAXgene Blood RNA Kit. Merk flaskene og lokkene tydelig med buffernavnene, og sett de fylte reagensflaskene i riktig posisjon i reagensflaskestativet. Last stativet på instrumentarbeidsbenken som vist (figur 17 og figur 18, henholdsvis side 60 og 61).

-  Det leverte volumet av Buffer BR2 vil ikke fylle en reagensflaske til indikatornivået. Buffere BR3 og BR4 fyller kanskje ikke flasken til indikatornivået etter behandling av flere prøver i tidligere kjøring.
-  Pass på å fjerne lokkene fra flaskene før de settes på arbeidsbenken.



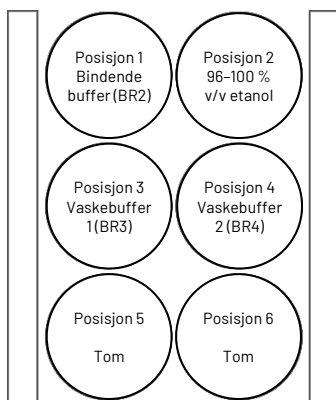
Buffervolumer som er gitt i PAXgene Blood RNA Kit (50) er nok for maksimum 7 kjøring av RNA-preparater på QIAcube Connect MDx med 2 til 12 prøver per kjøring. Generelt bør kjøring med et lite antall prøver per kjøring unngås for å behandle totalt 50 prøver per sett. Mer enn 7 RNA-klargjøringskjøring kan føre til utilstrekkelige buffervolumer for behandling av de siste prøvene.

Tabell 3: Posisjoner i reagensflaskestativet

| Posisjon | Reagens |
|----------|-----------------------|
| 1 | Bindende buffer (BR2) |
| 2 | Etanol (96-100 % v/v) |
| 3 | Vaskebuffer 1 (BR3) |
| 4 | Vaskebuffer 2 (BR4)* |
| 5 | – (la stå tomt) |
| 6 | – (la stå tomt) |

* Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som konsentrat. Før førstegangsbruk tilsettes 4 volumer etanol (96-100 % v/v, renhetsgrad p.a.) som indisert på flasken, for å oppnå en arbeidsløsning.

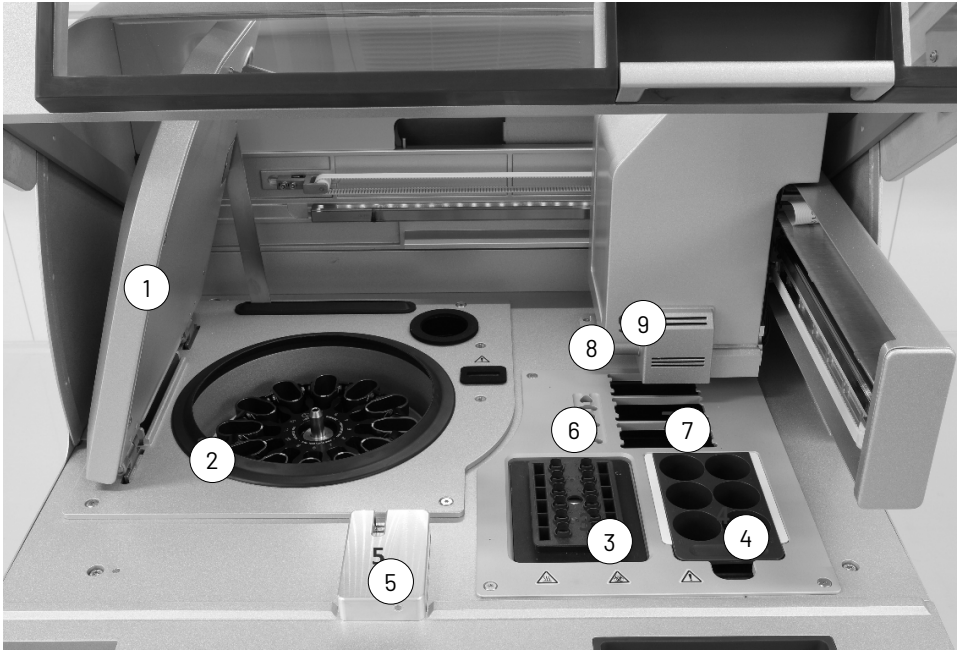
A



B



Figur 17: Lasting av reagensflaskestativet. [A] Oversikt over posisjoner og innhold i flaskene i reagensflaskestativet. [B] Lasting av stativet på QIAcube Connect MDx.



Figur 18: Intern visning av QIAcube Connect MDx.

- | | | | |
|---|------------------------|---|---|
| ① | Sentrifugelokk | ⑥ | MCT-spor |
| ② | Sentrifuge | ⑦ | 3 spor til spisstativer |
| ③ | Rister | ⑧ | Engangsspor for spisser og kolonner |
| ④ | Reagensflaskestativ | ⑨ | Robotarm (inkluderer 1 kanalpipette, gripeenhet, ultralydsensor, optisk sensor og UV-LED) |
| ⑤ | Spiss-sensor og dørlås | | |

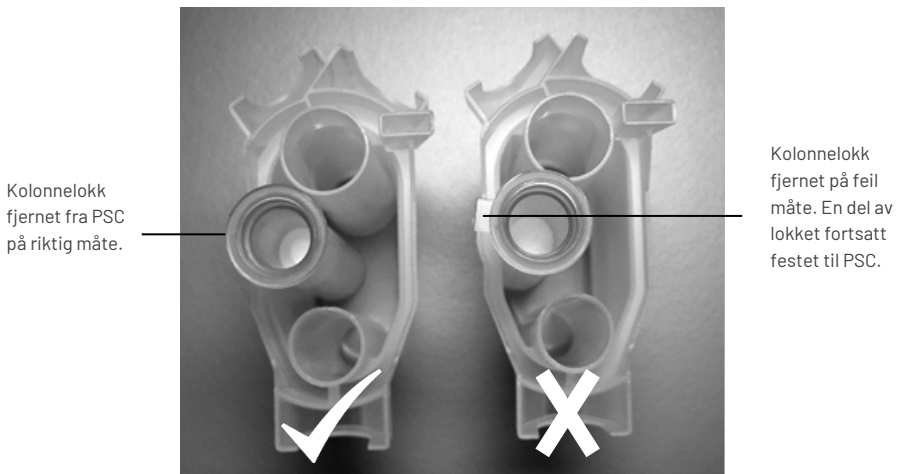
Spinnkolonne (PSC, PRC), MCT og QIAcube Connect MDx-plastdeler

Sett 2 spisstativer fylt med filterspisser 1000 µl i QIAcube Connect MDx (se figur 18, side 61). Fyll på stativene med spisser ved behov.

i Bruk bare 1000 µl filterspisser utviklet til bruk med QIAcube Connect MDx.

Merk rotoradaptere og MCT-er for hver prøve med permanent penn. Åpne PSC som skal brukes, og klipp lokket helt av med saks (se figur 19).

i For riktig bruk av QIAcube Connect MDx-robotgrep: Ta helt av (klipp av) lokkene og alle plastdeler som kobler lokket til PSC (se figur 19). Ellers kan ikke robotgrepet ta tak i PSC på riktig måte.



Figur 19: Lasting av PSC. PSC settes inn i midtre posisjon i rotoradapteren. Klipp av lokket på PSC før lasting av kolonnen.

Sett inn PSC (uten lokk, se figur 19, side 62), og merket PRC og MCT i riktige posisjoner i hver merkede rotoradapter som vist i tabell 4 og figur 20.

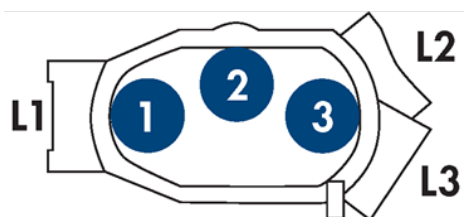


Pass på at spinnkolonnen (PRC) og lokkene til MCT er trykt helt ned i bunnen av sporene på kanten av rotoradapteren, ellers vil de brykkes av under sentrifugering.

Tabell 4: Forbruksvarer av plast i rotoradapteren

| Posisjon | Reagens | Lokkposisjon |
|----------|--|--------------|
| 1 | PAXgene RNA spinnkolonne (rød, PRC) | L1 |
| 2 | PAXgene Shredder-spinnkolonne (lilla, PSC)(klipp av lokket før den plasseres i rotoradapteren) | - |
| 3 | MCT* | L3 |

* Bruk MCT (1,5 ml) som er inkludert i PAXgene Blood RNA Kit.



Figur 20: Posisjoner i rotoradapteren. Rotoradapteren har 3 rørposisjoner (1–3) og tre lokkposisjoner (L1–L3).

Lasting av sentrifugen

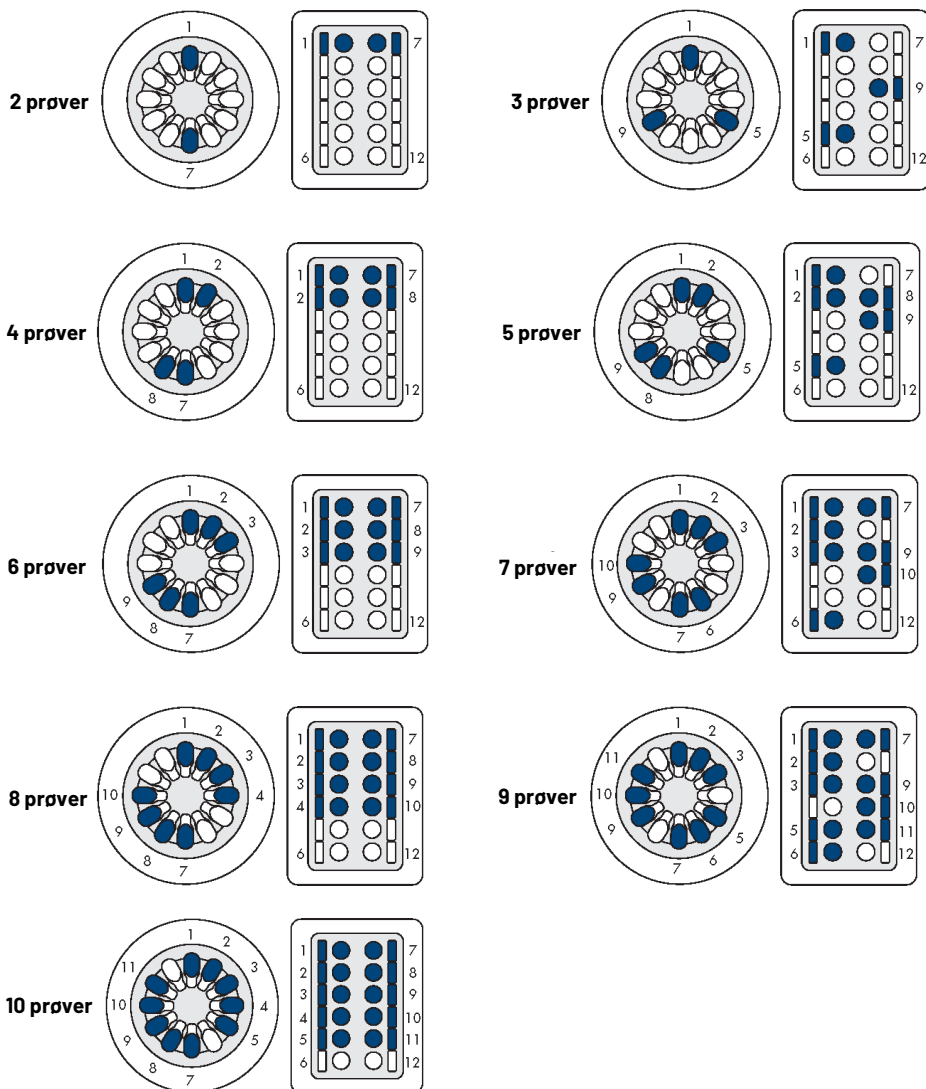
Sett inn de monterte rotoradapterne i sentrifugebeholderne på QIAcube Connect MDx som vist i figur 21 under.



Hvis det behandles færre enn 12 prøver, må du passe på at du setter inn sentrifugerotoren slik at den er balansert radially (se figur 22, side 65). Alle sentrifugebeholdere må monteres før en protokoll kjøres, selv om det skal behandles færre enn 12 prøver. Én enkelt prøve eller 11 prøver kan ikke behandles.



Figur 21: Lasting av sentrifugen på QIAcube Connect MDx. Last de monterte rotoradapterne i sentrifugebeholderne.



Figur 22: Lasting av sentrifugen og risteren. Sentrifuge- og risterposisjoner vises for behandling av to (2) til ti (10) prøver. En (1) eller 11 prøver kan ikke behandles. Ved behandling av 12 prøver vil alle sentrifuge- og risterposisjoner bli opptatt (ikke bilde av dette).

Reagensrør

Ta ut PT-er som sitter igjen i MCT-sporene fra tidligere kjøring (se figur 18, side 61). Fyll 3 PT-er med mengden reagenser gitt i tabell 5 i henhold til antall prøver i kjøringen.

For DNase I-inkuberingsmiks pipetterer du det indiserte volumet av DNA-nedbrytningsbufferen (RDD) i et PT og tilsetter indisert volum av DNase I (RNFD)-arbeidsløsning. Bland ved å pipettere hele blandingen forsiktig opp og ned 3 ganger med en 1000 µl pipettespiss.



Bruk 2 ml PT-er som er inkludert i PAXgene Blood RNA Kit. Merk rørene tydelig med reagensnavnene, og plasser dem i riktig posisjon i MCT-sporene, som indisert i tabell 6 (side 67).



DNase I (RNFD) er spesielt sensitiv for fysisk denaturering. Bland bare ved pipettering, ved bruk av pipettespiss med stor åpning for å redusere avskjæring. Ikke bruk virvelblander.

Sørg for at du bare pipetterer nødvendig volum som angitt i tabell 5.

Tabell 5: Reagensvolumer som kreves i PT-er for MCT-spor

| Antall prøver | Reagensvolum for indisert antall prøver (µl) | | |
|---------------|--|------------------------------------|----------------------|
| | Proteinase K (PK) | DNase I-inkubasjonsblanding | Elusjonsbuffer (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: MCT-spor

| | Posisjon | | |
|---------|--------------|-----------------------------|----------------------|
| | A | B | C |
| Innhold | Proteinase K | DNase I-inkubasjonsblanding | Elusjonsbuffer (BR5) |
| Kar | Reagensrør* | Reagensrør* | Reagensrør* |

* Bruk 2 ml PT-er som er inkludert i PAXgene Blood RNA Kit.

Avfallshåndtering

For sikker avfallshåndtering etter prøvetaking og manuell RNA-isolering, se sikkerhetsinformasjon og forholdsregler på henholdsvis side 17 og 18.

For automatisert RNA-isolering ved bruk av QIAcube Connect MDx, se i tillegg figur 21 og figur 22, henholdsvis sidene 64 og 65, som indikerer dedikerte spor for brukte spisser og kolonner for avfallshåndtering.

Referanser

Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, Herdman C, Bankaitis-Davis D, Nicholls N, Trollinger D, Tryon V (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. 48, 1883-90.







Sambrook J and Russell D W (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

International Organization for Standardization (2019) Molecular in vitro diagnostic examinations – Specifications for pre-examination processes for venous whole blood – Part 1: Isolated cellular RNA (ISO Standard No. 20186-1:2019).

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.

Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, kan du se siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENs tekniske serviceavdeling er alltid klare til å svare på eventuelle spørsmål, enten det dreier seg om innholdet og protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (du finner kontaktinformasjon på siste side eller ved å gå til www.qiagen.com).

| Kommentarer og forslag | |
|--|--|
| RNA degradert | |
| a) RNase-kontaminering |  Pass på så det ikke innføres noen RNaser i reagensene under prosedyren eller senere håndtering (se Vedlegg A, side 75). |
| Lavt RNA-utbytte | |
| b) Mindre enn 2,5 ml blod tappet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) |  Pass på at 2,5 ml blod er tatt i PAXgene Blood RNA Tube (BRT, se <i>håndboken for PAXgene Blood RNA Tube</i>) |
| c) RNA-konsentrasjon målt i vann |  RNA må fortynnes i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* for nøyaktig kvantifisering (se Vedlegg B, side 76). |
| d) Cellerester overført til PRC i trinn 9 og 10 i den manuelle protokollen |  Ikke overfør store partikler ved pipettering av supernatanten i trinn 7 av den manuelle protokollen (overføring av smårester vil ikke påvirke prosedyren). |
| e) Supernatanten ikke helt fjernet i trinn 3 |  Pass på at hele supernatanten er fjernet. Hvis supernatanten er dekantert, fjern dråpene fra kanten av PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ved hjelp av tørkepapir. Bruk riktige forholdsregler for å forhindre krysskontaminering. |
| f) Etter innsamling i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inkuberes blodet i mindre enn 2 t |  Inkuber blodet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i minst 2 t etter prøvetaking. |




* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. For mer informasjon, se de relevante sikkerhetsdatabladene (Safety Data Sheet, SDS) som kan fås hos leverandøren av produktet.

| Kommentarer og forslag | |
|--|---|
| Lav A_{260}/A_{280}-verdi | |
| g) Vann brukt til å fortynne RNA for A_{260}/A_{280} -måling |  Bruk 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, for å fortynne RNA før måling av renhet* (se Vedlegg B, side 76). |
| h) Spektrofotometeret ikke riktig nullstilt |  Nullstill spektrofotometeret ved hjelp av en blank prøve bestående av det samme forholdet av elusjonsbuffer (BR5) og 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, som i prøvene som skal måles. Elusjonsbuffer (BR5) har høy absorpsjon ved 220 nm, noe som kan føre til høye bakgrunnsabsorpsjonsnivåer hvis spektrofotometeret ikke er riktig nullstilt. |
| Instrumentfeil | |
| i) QIAcube Connect MDx fungerte ikke som normalt | Les <i>brakerhåndboken for QIAcube Connect MDx</i> , og vær spesielt oppmerksom på avsnittet Feilsøking. Pass på at instrumentet blir riktig vedlikeholdt, som beskrevet i brukerhåndboken. |

* 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.

Symboler

Følgende symboler kan vises i bruksanvisningen eller på emballasjen og merkingen. Ytterligere symboler er forklart i Settets innhold (side 6).

| Symbol | Symboldefinisjon |
|---|---|
| V<N1> | Versjon <N1> av produktet |
|  <N2> | Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N2> tester |
|  | Se bruksanvisningen |
|  | Brukes innen |
| IVD | In vitro-diagnostisk medisinsk enhet |
| REF | Katalognummer |
| LOT | Partinummer |
| MAT | Materialnummer |
| COMP | Komponenter |
| NUM | Nummer |
| KU | Kunitz-enheter |
| ADD | Tilsetter |
| CONT | Inneholder |
| RCNS | Rekonstituert |

DNase

Deoksyribonuklease I

EtOH

Etanol

GITC

Guanidinisotiocyanat

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Globalt artikkelnummer



Temperaturbegrensninger



Øvre temperaturgrense



Produsent

EC REP

Europeisk autorisert representant i henhold til forordning (EU) 2017/746



Viktig merknad



Tilsetning av etanol



CE-merke. Dette produktet oppfyller kravene i forordning (EU) 2017/746 om in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr.

UDI

Unik enhetsidentifikator



Forsiktig



ADVARSEL: Svært varm overflate

Kontaktinformasjon

Hos QIAGEN er vi stolte av kvaliteten på og tilgjengeligheten av vår tekniske støtte. Våre tekniske serviceavdelinger er bemannet av erfarne vitenskapsfolk med omfattende praktisk og teoretisk ekspertise i molekylær biologi og bruken av PreAnalytiX-produkter. Hvis du har spørsmål om PAXgene Blood RNA Kit, må du gjerne ta kontakt med oss.

Hvis du trenger teknisk hjelp eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportsenter på **www.qiagen.com/Support**, ringe 00800-22-44-6000 eller kontakte en av QIAGENS tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller gå til **www.qiagen.com**).

Vedlegg A: Generelle kommentarer om håndtering av RNA

Håndtere RNA



Ribonukleaser (RNaser) er svært stabile og aktive enzymer som vanligvis ikke trenger kofaktorer for å fungere. Fordi RNaser er vanskelige å inaktivere og selv svært små mengder er nok til å nedbryte RNA, skal det ikke brukes plast- eller glassartikler uten først å eliminere mulig RNase-kontaminering. Du bør være svært nøye med å unngå at RNase utilsiktet introduseres i RNA-prøven under eller etter isolasjonsprosedyren. For å opprette og vedlikeholde et RNase-fritt miljø må du være nøye under forhåndsbehandling og bruk av engangs- og ikke-engangskar og løsninger når du jobber med RNA.

Generell håndtering



Riktig mikrobiologisk, aseptisk teknikk skal alltid brukes ved arbeid med RNA. Det er bakterier og muggsopper på hender og støvpartikler, og disse er de vanligste kildene til RNase-kontaminering. Bruk alltid lateks- eller vinylhansker ved håndtering av reagenser og RNA-prøver for å forhindre RNase-kontaminering fra overflaten av huden eller fra støvete laboratorieutstyr. Bytt hansker ofte, og hold rørene lukket når det er mulig. Oppbevar rensed RNA på is når alikvoter pipetteres for nedstrømapplikasjoner.

Protokoller for fjerning av RNase-kontaminering fra glassartikler og løsninger står i generelle veiledninger for molekylær biologi, for eksempel Sambrook, J. og Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Vedlegg B: Kvantifisering og bestemmelse av kvalitet for totalt RNA

Kvantifisering av RNA

Konsentrasjonen av RNA bør bestemmes ved å måle absorbansen ved 260 nm (A_{260}) i et spektralfotometer. For å sikre signifikans skal avlesningene være i spektralfotometerets lineære område. En absorbans på 1 enhet ved 260 nm tilsvarer 44 µg RNA per ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Dette forholdet er bare gyldig for målinger i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Hvis det er nødvendig å fortynne RNA-prøven, må dette derfor utføres i 10 mM Tris-HCl. Som vist nedenfor (se «Renhet av RNA», side 77) gir forholdet mellom absorbansverdiene ved 260 og 280 nm et estimat av RNA-renhet. Pass på at kyvettene er RNase-frie ved måling av RNA-prøver. Nullstill spektralfotometeret ved hjelp av en blank prøve bestående av det samme forholdet av elusjonsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i prøvene som skal måles. Elusjonsbuffer (BR5) har høy absorbans ved 220 nm, noe som kan føre til høye bakgrunnsabsorbansnivåer hvis spektralfotometeret ikke er riktig nullstilt. Et eksempel på beregningen involvert i kvantifisering av RNA vises nedenfor.

| | | |
|---|---|---|
| Volum av RNA-prøve | = | 80 µl |
| Fortynning (1/15) | = | 10 µl av RNA-prøve + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 |
| Mål absorbans for fortynnet prøve i en kyvette (RNase-fri). | | |
| A_{260} | = | 0,3 |
| Konsentrasjon av prøve | = | $44 \times A_{260} \times \text{fortynningsfaktor}$ |
| | = | $44 \times 0,3 \times 15$ |
| | = | 198 µg/ml |
| Totalt utbytte | = | konsentrasjon \times volum av prøven i milliliter |
| | = | 198 µg/ml \times 0,08 ml |
| | = | 15,8 µg RNA |

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. For mer informasjon, se de relevante sikkerhetsdatabladene (Safety Data Sheet, SDS) som kan fås hos leverandøren av produktet.

Renhet av RNA

Forholdet mellom avlesningene ved 260 og 280 nm (A_{260}/A_{280}) gir et estimat av renheten av RNA når det gjelder kontaminanter som absorberes i UV, for eksempel protein. A_{260}/A_{280} -forholdet påvirkes imidlertid i stor grad av pH. Lavere pH fører til et lavere A_{260}/A_{280} -forhold og redusert sensitivitet for proteinkontaminasjon.* For nøyaktige verdier anbefaler vi å måle absorbans i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Rent RNA har et A_{260}/A_{280} -forhold på 1,8-2,2 i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Nullstill spektralfotometeret ved hjelp av en blank prøve bestående av det samme forholdet av elusjonsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i prøvene som skal måles. Elusjonsbuffer (BR5) har høy absorbans ved 220 nm, noe som kan føre til høye bakgrunnsabsorbansnivåer hvis spektralfotometeret ikke er riktig nullstilt.

* 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.

Vedlegg C: Håndtere PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Følgende anbefalinger fra BD kan være nyttige ved håndtering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Se *håndboken for PAXgene Blood RNA Tube* for mer informasjon om bruken av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Instruksjoner for fjerning av BD Hemogard-hetten

1. Hold PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i den ene hånden, og hold tommelen under BD Hemogard-hetten. (For ekstra stabilitet kan du legge armen på et fast underlag.) Vri BD Hemogard-hetten med den andre hånden samtidig som du skyver opp med tommelen på den andre hånden bare til rørstopperen er løsnet.
2. Ta bort tommelen før hetten løftes. Ikke bruk tommelen til å skyve hetten av PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Forsiktig: Det foreligger eksponeringsfare hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inneholder blod. For å bidra til å forhindre skade når hetten fjernes, er det viktig at tommelen som du bruker til å skyve hetten oppover, ikke er i kontakt med PAXgene Blood RNA Tube (BRT) når BD Hemogard-hetten er løsnet.
3. Løft hetten av PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Hvis plastskjoldet mot formodning ikke separeres fra gummistopperen, ikke sett hetten tilbake. Fjern gummistopperen forsiktig fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Instruksjoner for innsetting av sekundær BD Hemogard-hette

1. Sett hetten tilbake over PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Vri og skyv godt ned til stopperen sitter helt på plass. Stopperen må settes helt inn for at hetten skal sitte godt på PAXgene Blood RNA Tube under håndtering.

Bestillingsinformasjon

| Produkt | Innhold | Kat. nr. |
|--|---|---------------|
| PAXgene Blood RNA Kit (50) | 50 PAXgene-spinnkolonner, 50 Shredder-spinnkolonner, reagensrør, RNase-fri DNase I, RNase-frie reagenser og buffere. Brukes sammen med PAXgene Blood RNA Tubes | 762174 |
| PAXgene Blood RNA Tubes (100) | 100 prøvetakingsrør for blod | 762165 |
| Relaterte produkter som kan bestilles fra QIAGEN for RNA-isolering automatisert på QIAcube | | |
| Starter Pack, QIAcube | Pakken inneholder: reagensflaskestativer (3), stativmerkingsstrips (8), 200 µl filterspisser (1024), 1000 µl filterspisser (1024), 1000 µl filterspisser med stor åpning (1024), 30 ml reagensflasker (18), rotoradaptere (240), rotoradapterholder | 990395 |
| Filter-Tips, 1000 µL (1024) | Sterile, engangsfilterspisser, i stativ | 990352 |
| Reagent Bottles, 30 mL (6) | Reagensflasker (30 ml) med lokk, pakke med 6; til bruk med QIAcube reagensflaskestativ | 990393 |
| Rotor Adapters (10 × 24) | For 240 klargjøringer: 240 engangsrotoradaptere, til bruk med QIAcube | 990394 |
| Reagent Bottle Rack | Stativ for 6 × 30 ml reagensflasker på QIAcube-arbeidsbenken | 9026197 |
| Rotor Adapter Holder | Holder for 12 engangsrotoradaptere, til bruk med QIAcube | 990392 |
| Relaterte produkter som kan bestilles fra BD for blodprøvetaking med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)* | | |
| BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set | 21G, 0,75 tommers (0,8 × 19 mm) nål, 12 tommers (305 mm) slange med luer-adapter; 50 per eske, 200 per kasse | 367286/367281 |
| BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set | 21G 3/4 tommers (0,8 × 19 mm) nål, 12 tommers (305 mm) slange med lueradapter. 50/eske, 200/kasse | 367344 |

| Produkt | Innhold | Kat. nr. |
|------------------------------------|---|---------------|
| BD Vacutainer One-Use Holder | Kasse bare til 13 mm og 16 mm diameter, 1000/kasse | 364815 |
| BD Vacutainer Plus Serum Tubes | 13 × 75 mm 4,0 ml prøve med rød BD Hemogard-hette og papiretikett, 100/eske, 1000/kasse | 368975/367812 |
| BD Vacutainer EST Tube | 13 × 75 mm 3,0 ml prøve med rød BD Hemogard-hette og gjennomsiktig etikett, 100/eske, 1000/kasse | 362725 |
| BD Vacutainer No Additive (Z) Tube | 13 × 75 mm 3,0 ml prøve med gjennomsiktig BD Hemogard-hette og papiretikett, 100/eske, 1000/kasse | 366703 |

* Slikt utstyr til blodprøvetaking representerer vanlige produkter som kan brukes med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Hvis du vil ha mer informasjon om dette utstyret, bl.a. hvordan det skal bestilles, se www.preanalytix.com.

Revisjonshistorikk for dokument

| Dato | Endringer |
|-------------------|---|
| [R1] april 2022 | Første IVDR-utgave |
| [R2] februar 2023 | Endret adresse for PreAnalytiX GmbH fra «Feldbachstrasse» til «Garstligweg 8». Lagt til Bd-produkter i bestillingsinformasjon. Oppdatert sikkerhetsinformasjon. |

Merknader



Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, kan du se i den aktuelle håndboken eller bruksanvisningen for PreAnalytiX- eller QIAGEN-kitet. Håndbøker og bruksanvisninger for PreAnalytiX- og QIAGEN-sett er tilgjengelige på www.preanalytix.com og www.qiagen.com eller kan leveres fra QIAGENS tekniske serviceavdeling eller den lokale distributøren.

**Better samples
More to explore**



Utforsk mer på: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023