

Febrero de 2023

Instrucciones de uso del PAXgene® Blood RNA Kit (manual de uso)



Versión 3 (V3)

IVD

Para uso diagnóstico in vitro



REF

762174



PreAnalytiX® GmbH
Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon, Suiza

Producido por QIAGEN® GmbH para PreAnalytiX GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R2

MAT

1130774ES

Marcas comerciales: 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. A menos que se indique lo contrario, PreAnalytiX, el logotipo de PreAnalytiX y las otras marcas registradas son propiedad de PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

Acuerdo de licencia limitada para el PAXgene Blood RNA Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el panel. PreAnalytiX® no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este panel con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com y www.preanalytix.com.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, PreAnalytiX no garantiza que este kit ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit tiene licencia para un solo uso y no se puede reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. PreAnalytiX niega específicamente cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas.
6. PreAnalytiX se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidas las costas procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit o con sus componentes.

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

HB-3009-002 BD-8945 1130774ES © 2023 PreAnalytiX GmbH, todos los derechos reservados.

Distribuidores de PreAnalytiX

Los productos de PreAnalytiX los fabrican y distribuyen QIAGEN y BD para PreAnalytiX.

Contenido

Contenido	3
Uso previsto	6
Usuario previsto	6
Descripción y principio	7
Introducción	7
Principio y procedimiento	7
Obtención y estabilización de las muestras	8
Aislamiento de ARN	8
Aislamiento manual del ARN	9
Aislamiento automático del ARN	11
Materiales suministrados	14
Contenido del kit	14
Componentes del kit	15
Materiales necesarios pero no suministrados	16
Para todos los protocolos	16
Para el protocolo manual	17
Para el protocolo automatizado	17
Advertencias y precauciones	19
Información de seguridad	19
Información para emergencias	20
Precauciones	20
Almacenamiento y manipulación de reactivos	24

Estabilidad en uso	24
Recogida, almacenamiento y manipulación de las muestras	25
Protocolo: Aislamiento manual de ARN total a partir de sangre total humana recogida en tubos PAXgene Blood RNA Tubes	26
Protocolo: Aislamiento automatizado de ARN total a partir de sangre total humana recogida en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	34
Limitaciones del uso del producto	42
Control de calidad	42
Características del rendimiento.....	43
Obtención y estabilización de las muestras.....	43
Aislamiento manual del ARN.....	48
Aislamiento automático del ARN	57
Estabilidad del ARN aislado	60
Notas importantes	61
Uso del instrumento QIAcube Connect MDx	61
Inicio del instrumento QIAcube Connect MDx.....	61
Instalación de protocolos en el instrumento QIAcube Connect MDx.....	63
Carga del instrumento QIAcube Connect MDx	64
Columnas de centrifugación (PSC y PRC), MCT y material de plástico del instrumento QIAcube Connect MDx.....	67
Eliminación	73
Referencias.....	74
Guía de resolución de problemas	75
Símbolos	77
Información de contacto	79

Apéndice A: Consideraciones generales sobre la manipulación del ARN	80
Apéndice B: Cuantificación y determinación de la calidad del ARN total	81
Apéndice C: Manipulación de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	83
Información para pedidos	85
Historial de revisiones del documento	87

Uso previsto

Para uso diagnóstico in vitro.

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

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

Indicaciones de uso

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

Usuario previsto

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

Este kit se ha diseñado para uso profesional.

Descripción y principio

Introducción

La obtención de sangre total es el primer paso en muchos ensayos moleculares que se usan para analizar el ARN celular. No obstante, el principal problema de estos experimentos es la inestabilidad del perfil de ARN celular in vitro. Los estudios de PreAnalytiX han demostrado que el número de copias de cada especie de ARNm presentes en la sangre total puede experimentar cambios de una magnitud superior a 1000 veces durante el almacenamiento o el transporte a temperatura ambiente (Rainen et al., 2002). Esto se debe a la rápida degradación del ARN y a la expresión inducida de ciertos genes una vez extraída la sangre. Estos cambios del perfil de expresión del ARN hacen que sea imposible llevar a cabo estudios de expresión génica fiables. Por consiguiente, es esencial disponer de un método que conserve el perfil de expresión del ARN durante y después de la flebotomía para poder realizar un análisis exacto de la expresión génica en sangre total humana.

Principio y procedimiento

PreAnalytiX ha desarrollado un sistema que permite obtener, estabilizar, conservar y transportar muestras de sangre total humana, junto con un protocolo rápido y eficaz para el aislamiento del ARN intracelular. El sistema requiere el uso de tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) para la obtención de sangre y la estabilización del ARN, seguido del aislamiento manual o automatizado del ARN por medio del PAXgene Blood RNA Kit. Tanto el protocolo automatizado como el manual proporcionan una obtención de ARN de cantidad y calidad prácticamente idénticas. En este manual de uso, se incluyen datos de rendimiento del protocolo manual (a partir de la página 48) y del protocolo automatizado (a partir de la página 57).

El PAXgene Blood RNA System permite la estandarización de los pasos preanalíticos del flujo de trabajo, desde la recogida de la muestra de sangre hasta el aislamiento del ARN celular, de conformidad con la norma ISO 20186-1:2019, Análisis de diagnóstico molecular in vitro. Especificaciones para los procesos preanalíticos para sangre venosa total. Parte 1: ARN celular aislado.

Obtención y estabilización de las muestras

Los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contienen un reactivo para la estabilización del ARN. Este aditivo protege a las moléculas de ARN frente a la degradación por ARNasas y reduce al mínimo los cambios ex vivo de la expresión génica. Las características del rendimiento del PAXgene Blood RNA System se han establecido con los transcritos de los genes FOS e IL1B, que pueden verse a partir de la página 43.

Aislamiento de ARN

El PAXgene Blood RNA Kit está indicado para el aislamiento de ARN total a partir de 2,5 ml de sangre total humana recogida en un tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT). El procedimiento es sencillo y puede realizarse por medio de los métodos manual o automatizado (consulte la figura 1 o la figura 3, página 10 o 12, respectivamente). En ambos protocolos el aislamiento empieza con un paso de centrifugación para provocar el precipitado de los ácidos nucleicos en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT). El precipitado se lava y se pone de nuevo en suspensión y, a continuación, se realiza el aislamiento manual o automatizado del ARN. En principio, ambos protocolos siguen los mismos pasos con los mismos componentes del kit.

Aislamiento manual del ARN

El precipitado puesto de nuevo en suspensión se incuba con proteinasa K (PK) en tampones optimizados para digerir las proteínas. Se centrifuga de nuevo a través de la columna de centrifugación PAXgene Shredder (PSC) para homogeneizar el lisado celular y eliminar los restos celulares residuales y se transfiere el sobrenadante de la fracción de filtrado a un tubo de microcentrifugadora (MCT, microcentrifuge tube) nuevo. Se añade etanol para ajustar las condiciones de unión y se deposita el lisado en una columna de centrifugación PAXgene RNA (PRC). Durante una breve centrifugación, el ARN se une selectivamente a la membrana de sílice PAXgene mientras los contaminantes la atraviesan. El resto de contaminantes se eliminan en varios pasos eficaces de lavado. Entre el primer y el segundo pasos de lavado, la membrana se trata con ADNasa I (RNFD) para eliminar los restos de ADN unido. Después de los pasos de lavado, el ARN se eluye en tampón de elución (BR5) y se desnaturaliza por calor. Las características del rendimiento del aislamiento manual del ARN con el PAXgene Blood RNA System se pueden consultar en la página 48.

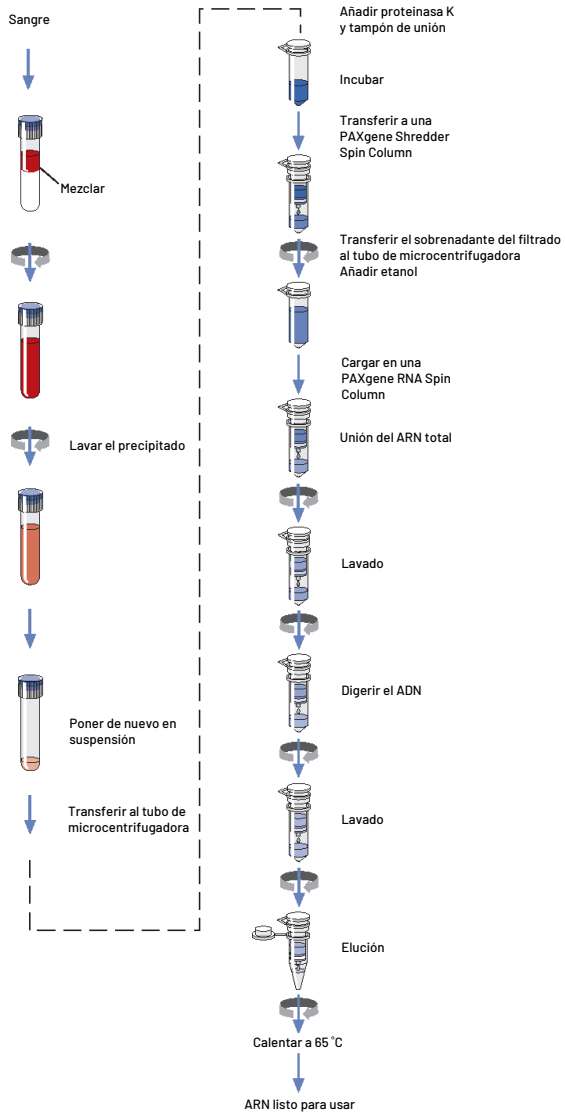


Figura 1: Procedimiento manual del sistema PAXgene Blood RNA.

Aislamiento automático del ARN

El aislamiento del ARN de la sangre se automatiza con el QIAGEN QIAcube Connect MDx. El innovador instrumento utiliza tecnología avanzada para procesar las columnas de centrifugación de QIAGEN, lo que permite una integración perfecta de la preparación automatizada de muestras de bajo volumen en el flujo de trabajo del laboratorio. La preparación de las muestras mediante el instrumento QIAcube Connect MDx sigue los mismos pasos que el procedimiento manual (es decir, lisis, unión, lavado y elución) y puede realizarse con el mismo PAXgene Blood RNA Kit.



Figura 2: QIAcube Connect MDx.



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

El protocolo automatizado de aislamiento del ARN consta de dos partes (o protocolos), «PAXgene Blood RNA Part A» (Parte A de PAXgene Blood RNA) (desde la sangre contenida en el tubo PAXgene Blood RNA Tube hasta la elución) y «PAXgene Blood RNA Part B» (Parte B de PAXgene Blood RNA) (desde después de la elución hasta el ARN listo para usar), con una breve intervención manual entre las dos partes (consulte la figura 3).

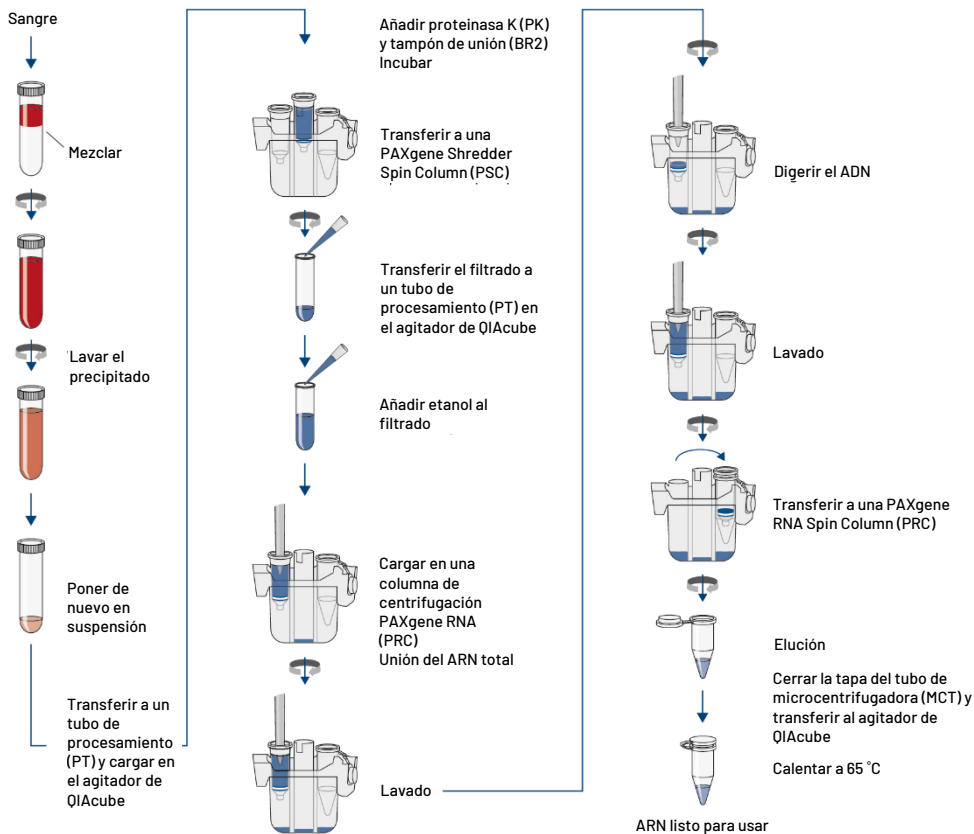



Figura 3: Procedimiento automatizado del sistema PAXgene Blood RNA.

El precipitado de ácidos nucleicos centrifugado, lavado y puesto de nuevo en suspensión (consulte el apartado «Aislamiento de ARN» en la página 8) se transfiere del tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) a tubos de procesamiento (PT) que se colocan en el agitador térmico de la plataforma de trabajo del instrumento QIAcube Connect MDx. El usuario selecciona e inicia el protocolo «PAXgene Blood RNA Part A» (Parte A de PAXgene Blood RNA) desde el menú. El QIAcube Connect MDx realiza los pasos del protocolo hasta la elución de ARN en tampón de elución (BR5). El usuario transfiere los MCT, que contienen el ARN purificado, al agitador térmico del QIAcube Connect MDx. El usuario selecciona e inicia el protocolo «PAXgene Blood RNA Part B» (Parte B de PAXgene Blood RNA) desde el menú y el QIAcube Connect MDx realiza una desnaturalización por calor. Las características del rendimiento del aislamiento automatizado del ARN con el PAXgene Blood RNA System en QIAcube Connect MDx se pueden consultar en la página 57.

Materiales suministrados

Contenido del kit

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
N.º de catálogo			762174
Número de dispositivos de recogida			50
Nombre del componente	Descripción	Símbolo	Cantidad
BR1	Resuspension Buffer (tampón de resuspensión)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer* (tampón de unión)	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1* (tampón de lavado 1)	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash buffer 2 (tampón de lavado 2)(concentrado) [†]	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (tampón de elución)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (agua sin ARNasas)(frasco)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (proteínasa K)(tapa verde)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (columnas de centrifugación PAXgene RNA)(rojas) [‡]	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (tubos de procesamiento)(2 ml) [§]	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (cierres secundarios BD Hemogard)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (tubos de microcentrifugadora)(1,5 ml) [§]	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (ADNasa I sin ARNasas) (líofilizada)	DNA REM	1500 unidades Kunitz [¶]
RDD	DNA Digestion Buffer (tampón de digestión de ADN) (tapa blanca)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tampón de resuspensión de ADNasa)(tubo, tapa lila)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (columnas de centrifugación PAXgene Shredder)(lila) [‡]	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Manual de uso	Manual de uso del PAXgene Blood RNA Kit (versión 3)		1

* No compatible con reactivos desinfectantes que contengan lejía. Contiene una sal de guanidina. Consulte la página 19 para conocer las Información de seguridad.

- † El tampón de lavado 2 (BR4) se suministra concentrado. Antes de usarlo por primera vez, añada 4 volúmenes de etanol (96-100 % v/v, grado de pureza p.a.) según se indica en el frasco para obtener una solución de trabajo.
- ‡ Cada columna se acondiciona en un blíster y es para un solo uso. En la información de seguridad se pueden consultar las instrucciones de eliminación.
- § Los tubos se presentan en bolsas de plástico, y cada tubo es para un solo uso. En la información de seguridad se pueden consultar las instrucciones de eliminación.
- ¶ La actividad de la ADNasa I se mide habitualmente en unidades Kunitz, que se definen como la cantidad de ADNasa I que provoca un aumento de A_{260} de 0,001 por minuto y por mililitro a 25 °C y pH 5,0, utilizando ADN altamente polimerizado como sustrato (Kunitz, M. [1950] *J. Gen. Physiol.* 33, 349 y 363).

Componentes del kit

Nombre del componente	Descripción	Principio activo	Concentración
BR1	Resuspension Buffer (tampón de resuspensión)	Ninguno	-
BR2	Binding Buffer (tampón de unión)	Tiocianato de guanidina	≥30 a <50 % p/p
BR3	Wash Buffer 1 (tampón de lavado 1)	Tiocianato de guanidina Etanol	≥10 a <20 % p/p ≥3 a <10 % p/p
BR4	Wash Buffer 2 (tampón de lavado 2)(concentrado)	Ninguno	-
BR5	Elution Buffer (tampón de elución)	Ninguno	-
RNFW	RNase-Free Water (agua sin ARNasas)(frasco)	Ninguno	-
PK	Proteinase K (proteínasa K)(tapa verde)	Proteínasa K	≥1 a <3 % p/p
RNFD	DNase I, RNase-free (ADNasa I sin ARNasas) (líoofilizada)	ADNasa	≥90 a ≤100 % p/p
RDD	DNA Digestion Buffer (tampón de digestión de ADN) (tapa blanca)	Ninguno	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (tampón de resuspensión de ADNasa)(tubo, tapa lila)	Ninguno	-

Materiales necesarios pero no suministrados

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

Para todos los protocolos

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; n.º de cat. 762165)
- Etanol (96-100 % v/v, grado de pureza p.a.)
- Pipetas* (10 µl-4 ml)
- Puntas de pipeta con filtro para aerosoles, sin ARNasa, estériles†
- Probeta graduada‡
- Centrifugadora* capaz de centrifugar a 3000-5000 × g y equipada con un rotor de cubetas oscilante para colocar los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Agitadora vorticial*
- Hielo picado
- Rotulador permanente para marcar

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

† Asegúrese de que está familiarizado con las instrucciones para la manipulación del ARN (apéndice A, página 75).

‡ Para la adición de etanol al tampón BR4 concentrado.

Para el protocolo manual

- Microcentrifugadora de velocidad variable* capaz de centrifugar en un intervalo de al menos 1000–8000 × *g*, aunque pueden obtenerse fuerzas *g* menores y superiores (consulte los pasos del protocolo para obtener más detalles), y equipada con un rotor para MCT de 2 ml.
- Agitador-incubador* capaz de incubar a 55 °C y 65 °C y de agitar a ≥400 rpm, sin superar las 1400 rpm (p. ej., Eppendorf® Thermomixer Compact o equivalente).

Para el protocolo automatizado

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

Consumibles del instrumento QIAcube Connect MDx:

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, n.º de cat. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, n.º de cat. 990393)†
- Rotor Adapters (10 × 24) (QIAGEN, n.º de cat. 990394)†

Accesorios del instrumento QIAcube Connect MDx:

- Rotor Adapter Holder (soporte para adaptadores de rotor) (QIAGEN, n.º de cat. 990392)†

* Asegúrese de que el dispositivo y el instrumento se hayan verificado, sometido a mantenimiento y calibrado con regularidad conforme a las recomendaciones del fabricante.

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

Paquetes de servicios de QIAcube Connect MDx:

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

Advertencias y precauciones

Para usuarios de la Unión Europea: Tenga en cuenta que debe comunicar cualquier incidente grave que haya ocurrido en relación con el dispositivo al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que el usuario o el paciente esté establecido.

Para usuarios fuera de la Unión Europea: Tenga en cuenta que puede ser necesario que tenga que consultar las normativas locales para conocer los requisitos de notificación, en relación con los sucesos graves que hayan ocurrido referentes al dispositivo; al fabricante y/o su representante autorizado y a la autoridad sanitaria del país en el que resida el usuario y/o el paciente.

Información de seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos y materiales biopeligrosos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las SDS de todos los kits y componentes de los kits de QIAGEN.

- Todos los materiales químicos y biológicos son potencialmente peligrosos. Las muestras de sangre y de otro tipo son material potencialmente infeccioso y deben tratarse como material biopeligroso.
- Deseche los residuos biopeligrosos y de los kits conforme a los procedimientos de seguridad local.

Información para emergencias

CHEMTREC

Fuera de EE. UU. y Canadá +1 703-527-3887

Precauciones

Al trabajar con muestras de sangre, se deben aplicar las precauciones universales para evitar el riesgo de posible exposición a patógenos de transmisión hemática (p. ej., VIH, hepatitis B y otros virus de transmisión hemática). Utilice guantes, bata, protectores oculares, otros equipos de protección individual y controles de ingeniería para protegerse de la exposición a la sangre. Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Dichas hojas están disponibles en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.preanalytix.com, donde podrá encontrar, ver e imprimir las hojas de datos sobre seguridad correspondientes a este kit.

PRECAUCIÓN



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

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

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

Los residuos obtenidos durante la preparación de las muestras, como los sobrenadantes de los pasos de centrifugación del procedimiento de aislamiento del ARN, deben considerarse potencialmente infecciosos. Utilice contenedores de residuos biopeligrosos para desechar los materiales biológicos. La eliminación debe realizarse de acuerdo con la normativa local y los procedimientos del centro.

Los componentes específicos del PAXgene Blood RNA Kit son para un solo uso. Consulte el Contenido del kit en la página 14 para obtener información sobre cada componente.

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

Buffer BR2



Contiene: tiocianato de guanidina. ¡Peligro! Nocivo en caso de ingestión. Puede ser nocivo en contacto con la piel y por inhalación. Provoca lesiones oculares graves. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos a largo plazo. En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. Evitar su emisión en el medio ambiente. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llámese inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado.

Buffer BR3



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

DNase I



Contiene: ADNasa. ¡Peligro! Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Evitar la aspiración de polvo. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara. Llevar equipo de protección respiratoria. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. Transporte a la persona al exterior y manténgala en reposo en una posición cómoda para respirar. Lave la ropa contaminada antes de volver a utilizarla.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

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

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

Debe prestar especial atención a las fechas de caducidad y condiciones de almacenamiento impresas en las cajas y etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados o mal almacenados.

Estabilidad en uso

Tras el primer uso del kit, los reactivos se mantienen estables en los frascos originales a las temperaturas y hasta la fecha de caducidad indicadas en la etiqueta de la caja del kit.

Los reactivos introducidos en los frascos de reactivo del instrumento QIAcube Connect MDx se mantienen estables durante 3 meses a temperatura ambiente (15-25 °C).

La ADNasa I reconstituida (RNFD) se mantiene estable a 2-8 °C durante 6 semanas en el vial de vidrio original (solución madre).

Las alícuotas para un solo uso de solución madre en MCT de 1,5 ml (suministrados con el kit) se mantienen estables durante 9 meses a -20 °C. Una vez descongeladas, las alícuotas para un solo uso se mantienen estables durante 6 semanas a 2-8 °C.

Recogida, almacenamiento y manipulación de las muestras

El PAXgene Blood RNA Kit se utiliza con sangre recogida en los tubos PAXgene Blood RNA Tubes. La sangre debe recogerse en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conforme a las instrucciones presentadas en el manual de PAXgene Blood RNA Tube. En caso necesario, consulte en el apéndice C (página 83) las recomendaciones acerca de la manipulación de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Todas las muestras deben tratarse como potencialmente peligrosas. Las características del rendimiento del PAXgene Blood RNA System se han establecido con los transcritos de los genes FOS e IL1B, que pueden verse en las páginas 44-47.

Protocolo: Aislamiento manual de ARN total a partir de sangre total humana recogida en tubos PAXgene Blood RNA Tubes

Cuestiones importantes antes de comenzar

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

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

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

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

Antes de comenzar

- La sangre debe recogerse en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conforme a las instrucciones presentadas en el *manual de PAXgene Blood RNA Tube*. En caso necesario, consulte en el apéndice C (página 83) las recomendaciones acerca de la manipulación de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Para garantizar la lisis completa de las células sanguíneas y la precipitación del ARN después de extraer la sangre, asegúrese de que los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) se incuben a temperatura ambiente durante al menos 2 h. Si se deja el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) incubando durante toda la noche es posible que aumente la cantidad obtenida. Si la incubación inicial de la sangre a temperatura ambiente durante 2 h no se realizó antes de la conservación a 2-8 °C, -20 °C o -70 °C, entonces habrá que equilibrar primero el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) a temperatura ambiente y después incubarlo a esta temperatura durante 2 h antes de comenzar el procedimiento.

- Lea la información de seguridad en la página 19.
- Lea las instrucciones para la manipulación de ARN (apéndice A, página 80).
- Asegúrese de que los instrumentos, como las pipetas y el agitador-incubador, se han revisado y calibrado periódicamente conforme a las recomendaciones del fabricante.
- Se requiere un agitador-incubador en los pasos 5 y 20. Ajuste la temperatura del agitador-incubador a 55 °C.
- El tampón de unión (BR2) puede precipitar durante su almacenamiento. En caso necesario, caliéntelo hasta 37 °C para disolverlo.
- El tampón de lavado 2 (BR4) se suministra concentrado. Antes de usarlo por primera vez, añada 4 volúmenes de etanol (96-100 % v/v, grado de pureza p.a.) según se indica en el frasco para obtener una solución de trabajo.
- Si utiliza el RNase-Free DNase Set por primera vez, prepare la solución de partida de ADNasa I. Disuelva la ADNasa I sólida (RNFD; 1500 unidades Kunitz)* en 550 µl del tampón de resuspensión de ADNasa (DRB) que se incluye en el kit. Procure no desperdiciar ADNasa I (RNFD) al abrir el vial. No agite en el agitador vorticial la ADNasa I (RNFD) reconstituida. La ADNasa I es especialmente sensible a la desnaturalización física. Debe mezclarse únicamente invirtiendo el vial con suavidad.
- La ADNasa I reconstituida (RNFD) puede conservarse a 2-8 °C en el vial de vidrio original (solución madre) o a -20 °C después de retirar la solución madre del vial de vidrio y dividirla en alícuotas para un solo uso (utilice los MCT de 1,5 suministrados con el kit; hay suficientes para 5 alícuotas). Las alícuotas descongeladas pueden conservarse a 2-8 °C. No vuelva a congelar las alícuotas una vez descongeladas.

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

- Al reconstituir y dividir en alícuotas la ADNasa I (RNFD), asegúrese de seguir las instrucciones para la manipulación del ARN (apéndice A, página 80).

Procedimiento

1. Centrifugue el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante 10 min a $3000-5000 \times g$ con un rotor de cubetas oscilante.



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



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

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

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

3. Agítelo en el agitador vorticial hasta que se vea que se ha disuelto el precipitado y centrifúguelo durante 10 min a $3000-5000 \times g$ con un rotor de cubetas oscilante. Retire y deseche todo el sobrenadante.

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



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

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

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



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

- Pipetee el lisado directamente en una PSC (lila) colocada en un PT de 2 ml y centrifugue durante 3 min a velocidad máxima (sin superar un valor de 20 000 × g).



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

Para evitar que se dañen las columnas (PSC) y los tubos (PT), no supere un valor de 20 000 × g.



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

- Transfiera con cuidado todo el sobrenadante de la fracción de filtrado a un MCT de 1,5 ml nuevo sin alterar el precipitado del PT.
- Añada 350 µl de etanol (96-100 % v/v, grado de pureza p.a.). Mezcle mediante agitación vorticial y centrifugue brevemente (1-2 segundos a 500-1000 × g) para eliminar las gotas del interior de la tapa del tubo.



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

- Pipetee 700 µl de la muestra en la PRC (roja) colocada en un PT de 2 ml y centrifugue durante 1 min a 8000-20 000 × g. Coloque la columna de centrifugación (PRC) en un PT de 2 ml nuevo y deseche el PT antiguo que contiene el filtrado.

10. Pipetee el resto de la muestra en la PRC y centrifugue durante 1 min a $8000-20\ 000 \times g$. Coloque la columna de centrifugación (PRC) en un PT de 2 ml nuevo y deseche el PT antiguo que contiene el filtrado.



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

11. Pipetee 350 μ l de tampón de lavado 1 (BR3) en la PRC. Centrifugue durante 1 min a $8000-20\ 000 \times g$. Coloque la columna de centrifugación (PRC) en un PT de 2 ml nuevo y deseche el PT antiguo que contiene el filtrado.

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

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



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

13. Pipetee la mezcla de incubación de ADNasa I (RNFD) (80 μ l) directamente en la membrana de la PRC y déjela en la mesa (a $20-30\ ^\circ\text{C}$) durante 15 min.



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

14. Pipetee 350 μ l del tampón de lavado 1 (BR3) en la PRC y centrifugue durante 1 min a $8000-20\ 000 \times g$. Coloque la columna de centrifugación (PRC) en un PT de 2 ml nuevo y deseche el PT antiguo que contiene el filtrado.

15. Pipetee 500 µl del tampón de lavado 2 (BR4) en la PRC y centrifugue durante 1 min a 8000–20 000 × *g*. Coloque la columna de centrifugación (PRC) en un PT de 2 ml nuevo y deseche el PT antiguo que contiene el filtrado.



El tampón de lavado 2 (BR4) se suministra concentrado. Asegúrese de añadir etanol al tampón de lavado 2 (BR4) antes de usarlo (consulte el apartado «Antes de comenzar» en la página 27).

16. Añada otros 500 µl de tampón de lavado 2 (BR4) a la PRC. Centrifugue durante 3 min a 8000–20 000 × *g*.
17. Deseche el PT que contiene el filtrado y coloque la PRC en un PT de 2 ml nuevo. Centrifugue durante 1 min a 8000–20 000 × *g*.
18. Deseche el PT que contiene el filtrado. Coloque la PRC en un MCT de 1,5 ml y pipetee 40 µl de tampón de elución (BR5) directamente en la membrana de la PRC. Centrifugue durante 1 min a 8000–20 000 × *g* para eluir el ARN.
- Es importante humedecer toda la membrana con tampón de elución (BR5) para conseguir la máxima eficiencia de elución.
19. Repita el paso de elución (paso 18) según se describe usando 40 µl de tampón de elución (BR5) y el mismo MCT.
20. Incube el eluido durante 5 min a 65 °C en el agitador-incubador (desde el paso 5) sin agitarlo. Después de la incubación, póngalo inmediatamente en hielo.



Esta incubación de las muestras a 65 °C desnaturaliza el ARN para aplicaciones posteriores. No omita este paso aunque la aplicación posterior incluya un paso de desnaturalización por calor. En este punto, es esencial una desnaturalización suficiente del ARN para conseguir una eficiencia máxima en aplicaciones posteriores.

No supere el tiempo ni la temperatura de incubación.

21. Si las muestras de ARN no van a utilizarse inmediatamente, almacénelas a –20 °C o a –70 °C.

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

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

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



Para la cuantificación en tampón Tris-HCl, utilice la relación $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Consulte el apéndice B, página 81.

22. Vuelva a cerrar todos los frascos que contienen los tampones y el agua sin ARNasas, los viales y los tubos que contienen enzimas y tampones enzimáticos, y las bolsas que contienen los materiales de plástico del kit utilizado para el protocolo. Almacene el resto del contenido del kit según se describe en las secciones «Almacenamiento y manipulación de reactivos» (página 24) y «Estabilidad en uso» (página 24) hasta que se vuelva a utilizar.

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

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

Cuestiones importantes antes de comenzar

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

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

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

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

Antes de comenzar

- La sangre debe recogerse en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conforme a las instrucciones presentadas en el *manual de PAXgene Blood RNA Tube*. En caso necesario, consulte en el apéndice C (página 83) las recomendaciones acerca de la manipulación de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Para garantizar la lisis completa de las células sanguíneas y la precipitación del ARN después de extraer la sangre, asegúrese de que los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) se incuben a temperatura ambiente durante al menos 2 h. Si se deja el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) incubando durante toda la noche es posible que aumente la cantidad obtenida. Si, después de extraer la sangre, el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) se ha conservado a 2-8 °C, a -20 °C o a -70 °C, deje que se estabilice primero a temperatura ambiente y, a continuación, consérvelo a esa temperatura durante 2 h antes de comenzar el procedimiento.
- Lea la información de seguridad en la página 19.
- Lea el apartado «Notas importantes» en la página 61.
- Lea las instrucciones para la manipulación de ARN (apéndice A, página 80).
- Lea el manual del usuario del instrumento QIAcube Connect Mdx pertinente y toda información adicional suministrada con el instrumento, prestando especial atención a la información de seguridad.
- Asegúrese de que los dispositivos e instrumentos, como las pipetas y el instrumento QIAcube Connect MDx, se hayan revisado y calibrado periódicamente conforme a las recomendaciones del fabricante.
- El tampón de unión (BR2) puede precipitar durante su almacenamiento. En caso necesario, caliéntelo hasta 37 °C para disolverlo.

- El tampón de lavado 2 (BR4) se suministra concentrado. Antes de usarlo por primera vez, añada el volumen adecuado de etanol (96-100 % v/v, grado de pureza p.a.) según se indica en el frasco para obtener una solución de trabajo.
- Si utiliza el RNase-Free DNase Set por primera vez, prepare la solución de partida de ADNasa I. Disuelva la ADNasa I sólida (RNFD; 1500 unidades Kunitz)* en 550 µl del tampón de resuspensión de ADNasa (DRB) que se incluye en el kit. Procure no desperdiciar ADNasa I (RNFD) al abrir el vial. No agite en el agitador vorticial la ADNasa I (RNFD) reconstituida. La ADNasa I es especialmente sensible a la desnaturalización física. Debe mezclarse únicamente invirtiendo el vial con suavidad.
- La ADNasa I reconstituida (RNFD) puede conservarse a 2-8 °C en el vial de vidrio original (solución madre) o a -20 °C después de retirar la solución madre del vial de vidrio y dividirla en alícuotas para un solo uso (utilice los MCT de 1,5 suministrados con el kit; hay suficientes para 5 alícuotas). Las alícuotas descongeladas pueden conservarse a 2-8 °C. No vuelva a congelar las alícuotas una vez descongeladas.
- Al reconstituir y dividir en alícuotas la ADNasa I (RNFD), asegúrese de seguir las instrucciones para la manipulación del ARN (apéndice A, página 80).
- Instale el adaptador de agitador apropiado (incluido con el instrumento QIAcube Connect MDx; use el adaptador para tubos con cierre seguro de 2 ml, marcado con un «2») y coloque la gradilla del agitador sobre el adaptador.
- Compruebe el cajón de desechos y vacíelo en caso necesario.
- Instale los protocolos relacionados, si no lo ha hecho todavía, para series anteriores. El QIAcube Connect MDx requiere la descarga de todos los protocolos encontrados en el archivo zip relacionado. Consulte «Instalación de protocolos en el instrumento QIAcube Connect MDx», en la página 63.

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

Procedimiento

1. Cierre la cubierta del instrumento QIAcube Connect MDx y encienda el instrumento por medio del interruptor de alimentación (consulte la figura 15 en la página 62).

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

2. Abra la cubierta del QIAcube Connect MDx y cargue los reactivos y el material de plástico necesarios en el instrumento. Consulte «Carga del instrumento QIAcube Connect MDx» en la página 64.

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

3. Centrifugue el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante 10 min a $3000\text{--}5000 \times g$ con un rotor de cubetas oscilante.



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



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

4. Retire el sobrenadante por decantación o pipeteo. Si se decanta el sobrenadante, tenga cuidado de no alterar el precipitado y seque el borde del tubo con una hoja de papel absorbente limpia. Añada 4 ml de agua libre de ARNasa (RNFw) al precipitado y cierre el tubo con un cierre BD Hemogard secundario nuevo (incluido en el kit).
5. Agítelo en el agitador vorticial hasta que se vea que se ha disuelto el precipitado y centrifúguelo durante 10 min a $3000\text{--}5000 \times g$ con un rotor de cubetas oscilante. Retire y deseche todo el sobrenadante.

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



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

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

7. Pipetee la muestra en un PT de 2 ml.



Utilice los PT de 2 ml incluidos en el PAXgene Blood RNA Kit.

8. Cargue los PT abiertos con la muestra en el agitador del QIAcube Connect MDx (consulte la figura 18 en la página 66). Las posiciones de las muestras están numeradas para facilitar la carga. Inserte los tapones de la gradilla del agitador (incluidos con el instrumento QIAcube Connect MDx) en las ranuras al borde de la gradilla del agitador junto a cada PT. Esto permite la detección de muestras durante la comprobación de la carga.



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



Si va a procesar menos de 12 muestras, asegúrese de cargar la gradilla del agitador tal como se muestra en la figura 22, página 70. No es posible procesar ni 1 ni 11 muestras. Los números de posición de la gradilla del agitador corresponden a los números de posición de la centrifugadora.

9. Cierre la cubierta del instrumento QIAcube Connect MDx (consulte la figura 15 en la página 62).

10. Seleccione el protocolo «PAXgene Blood RNA Part A» (Parte A de PAXgene Blood RNA) e inicie el protocolo.

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



Asegúrese de que ambas partes del programa (parte A y parte B) estén instaladas en el instrumento QIAcube Connect MDx (consulte «Instalación de protocolos en el instrumento QIAcube Connect MDx» en la página 63).



El instrumento realizará una comprobación de la carga de muestras, puntas de pipeta, adaptadores de rotor y frascos de reactivo.

11. Una vez finalizado el protocolo «PAXgene Blood RNA Part A» (Parte A de PAXgene Blood RNA), abra la cubierta del instrumento QIAcube Connect MDx (consulte la figura 15 en la página 62). Retire y deseche las PRC de los adaptadores de rotor y los PT vacíos del agitador.



Durante la serie, el instrumento transfiere las columnas de centrifugación de la posición 1 del adaptador de rotor (posición de tapa L1) a la posición 3 del adaptador de rotor (posición de tapa L2) (consulte la figura 20 en la página 68).

12. Cierre las tapas de todos los MCT de 1,5 ml que contienen el ARN purificado en los adaptadores de rotor (posición 3, posición de tapa L3; consulte la figura 20 en la página 68). Transfiera los MCT de 1,5 ml al adaptador del agitador del instrumento QIAcube Connect MDx (consulte la figura 18 en la página 66).
13. Cierre la cubierta del instrumento QIAcube Connect MDx (consulte la figura 15 en la página 62).
14. Seleccione el protocolo «PAXgene Blood RNA Part B» (Parte B de PAXgene Blood RNA) e inicie el protocolo.
Siga las instrucciones indicadas en la pantalla táctil del instrumento QIAcube Connect MDx.



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

15. Una vez finalizado el protocolo «PAXgene Blood RNA Part B» (Parte B de PAXgene Blood RNA), abra la cubierta del instrumento QIAcube Connect MDx (consulte la figura 15 en la página 62). Coloque inmediatamente los MCT que contienen el ARN purificado en hielo.



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



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

16. Si las muestras de ARN no van a utilizarse inmediatamente, almacénelas a -20 °C o a -70 °C.

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

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

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

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



Para la cuantificación en tampón Tris-HCl, utilice la relación

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Consulte el apéndice B, página 81.

17. Retire la gradilla de frascos de reactivo de la plataforma de trabajo del instrumento QIAcube Connect MDx (consulte la figura 18 en la página 66) y cierre todos los frascos de reactivos con las tapas debidamente rotuladas. Vuelva a cerrar todos los frascos que contienen los tampones y el agua sin ARNasas, los viales y los tubos que contienen enzimas y tampones enzimáticos, y las bolsas que contienen los materiales de plástico del kit utilizado para el protocolo. Almacene el contenido sobrante del kit y de los frascos de reactivos como se describe en las secciones «Almacenamiento y manipulación de reactivos» (página 24) y «Estabilidad en uso» (página 24) hasta que vuelvan a utilizarse. Retire y deseche los restos de reactivos que queden en los PT en las ranuras para MCT del instrumento QIAcube Connect MDx. Retire y deseche los adaptadores de rotor de la centrifugadora. Vacíe el cajón de desechos del instrumento QIAcube Connect MDx (consulte la figura 15 en la página 62). Cierre la cubierta del instrumento y apague el instrumento por medio del interruptor de alimentación.

Limitaciones del uso del producto

El PAXgene Blood RNA Kit está indicado para aislar ARN intracelular a partir de sangre total humana ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leucocitos/ml) para aplicaciones de diagnóstico in vitro. No está indicado para el aislamiento de ADN genómico ni ácidos nucleicos virales a partir de sangre total humana. No se han establecido las características del rendimiento para todos los transcritos debido al escaso número de estos que han sido validados para especificaciones de estabilización (transcritos de los genes FOS e IL1B). Los usuarios deben revisar los datos del fabricante y sus propios datos para determinar si es necesario validar el sistema para otros transcritos. Los componentes del kit solo están concebidos para utilizarse en los protocolos manual y automatizado que se describen en estas instrucciones de uso.

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

Control de calidad

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

Características del rendimiento

Obtención y estabilización de las muestras

Los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contienen un reactivo para la estabilización del ARN. Este aditivo protege a las moléculas de ARN frente a la degradación por ARNasas y reduce al mínimo los cambios ex vivo de la expresión génica. Los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) están indicados para la obtención de sangre total humana y la estabilización del ARN celular durante un máximo de 3 días a 18-25 °C (figura 4 y figura 5, páginas 44 y 45, respectivamente) o durante un máximo de 5 días a 2-8 °C (figura 6 y figura 7, páginas 46 y 47). Además, la sangre estabilizada se puede conservar congelada. Los datos actualmente disponibles muestran la estabilización del ARN celular durante al menos 11 años a -20 °C o -70 °C*. Si desea obtener más información sobre los estudios en curso que evalúan la estabilidad durante periodos de tiempo más largos, visite www.preanalytix.com o póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN.

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

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

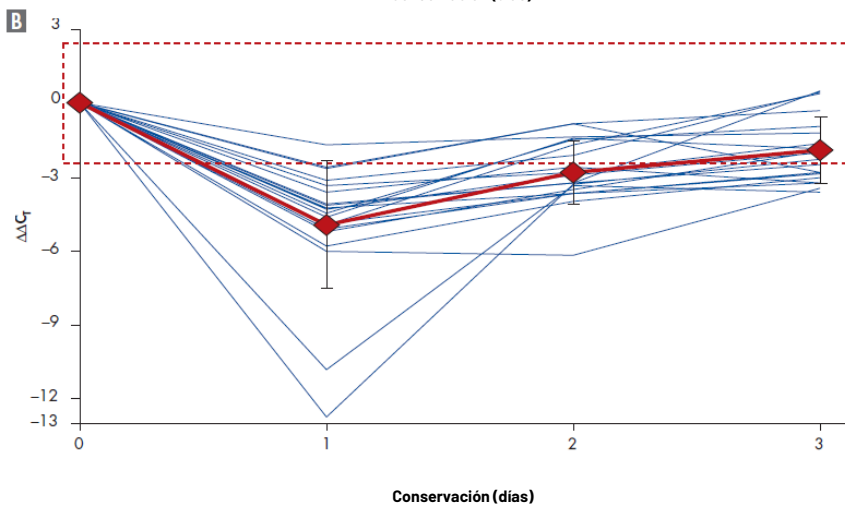
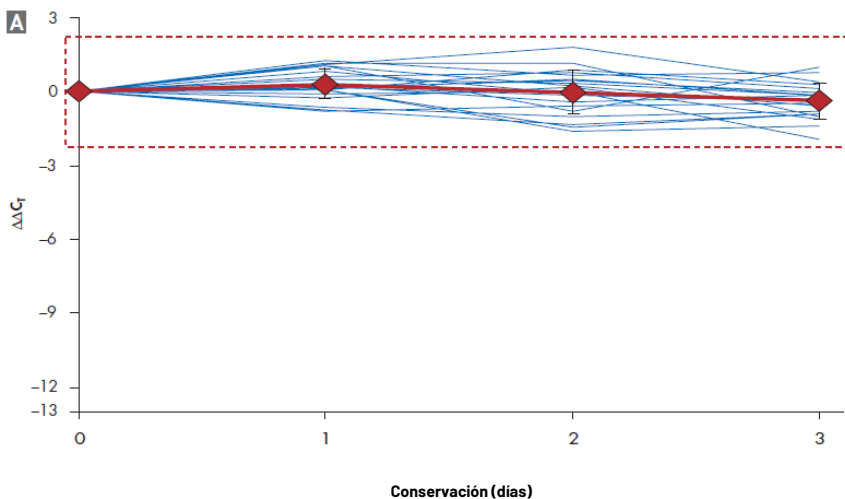


Figura 4: Estabilidad del ARN en muestras de sangre a 18-25 °C: FOS Se extrajo sangre de 10 donantes aparentemente sanos, obteniéndose muestras duplicadas que se conservaron a 18-25 °C durante el número indicado de días; a continuación se llevó a cabo un aislamiento del ARN total. **[A]** La sangre se extrajo y se conservó en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) y el ARN total se purificó con el PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** La sangre se extrajo y se conservó en tubos estándar de extracción de sangre con EDTA como anticoagulante y el ARN total se purificó con un método estándar de aislamiento orgánico con purificación de ARN con membrana de sílice. Las concentraciones relativas del transcrito de FOS se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Se representan los valores de todas las muestras, indicándose las medias y las desviaciones estándar. Las líneas discontinuas indican el intervalo $\pm 3 \times$ de precisión total del ensayo ($2,34 \text{ } ^\circ\text{Ct}$).

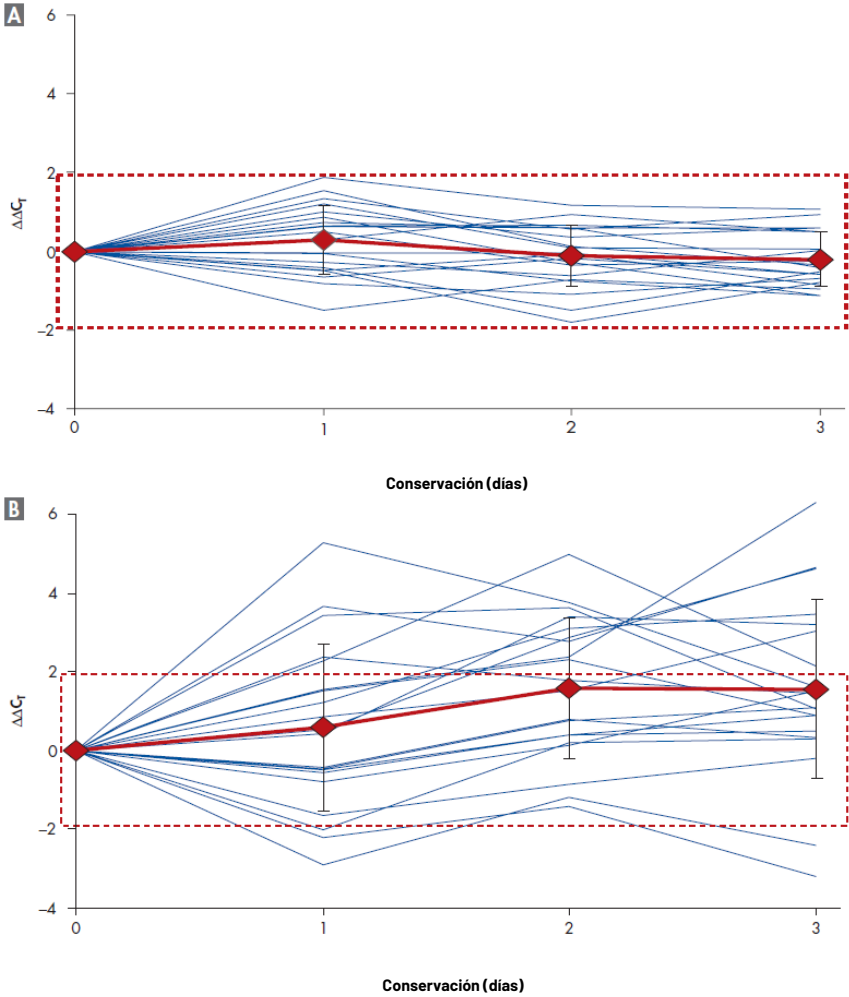


Figura 5: Estabilidad del ARN en muestras de sangre a 18-25 °C: IL1B. Se extrajo la sangre y se purificó el ARN total, después de conservarla a 18-25 °C, tal como se describe en la figura 4. Las concentraciones relativas del transcrito de IL1B se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Se representan los valores de todas las muestras, indicándose las medias y las desviaciones estándar. Las líneas discontinuas indican el intervalo $\pm 3 \times$ de precisión total del ensayo ($1,93 \text{ } ^\circ\text{C}_T$).

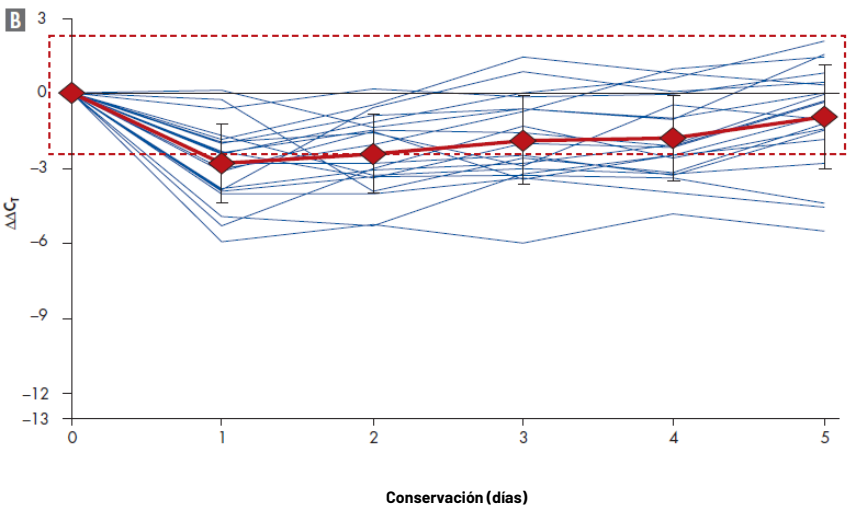
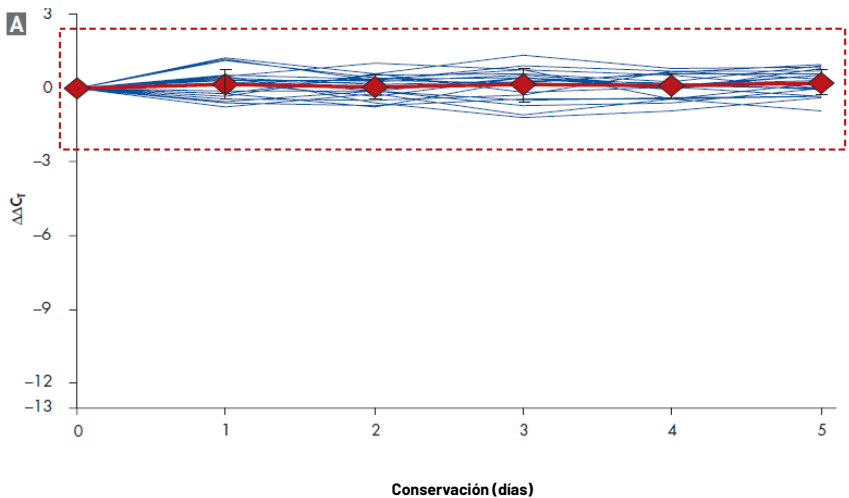


Figura 6: Estabilidad del ARN en muestras de sangre a 2-8 °C: FOS Se extrajo sangre de 10 donantes, obteniéndose muestras duplicadas que se conservaron a 2-8 °C durante el número indicado de días; a continuación se llevó a cabo un aislamiento del ARN total. **[A]** La sangre se extrajo y se conservó en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) y el ARN total se purificó con el PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** La sangre se extrajo y se conservó en tubos estándar de recogida de sangre con EDTA como anticoagulante y el ARN total se purificó con un método estándar de aislamiento orgánico con purificación de ARN con membrana de sílice. Las concentraciones relativas del transcrito de FOS se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Se representan los valores de todas las muestras, indicándose las medias y las desviaciones estándar. Las líneas discontinuas indican el intervalo $\pm 3 \times$ de precisión total del ensayo ($2,34 \text{ } ^\circ\text{C}_t$).

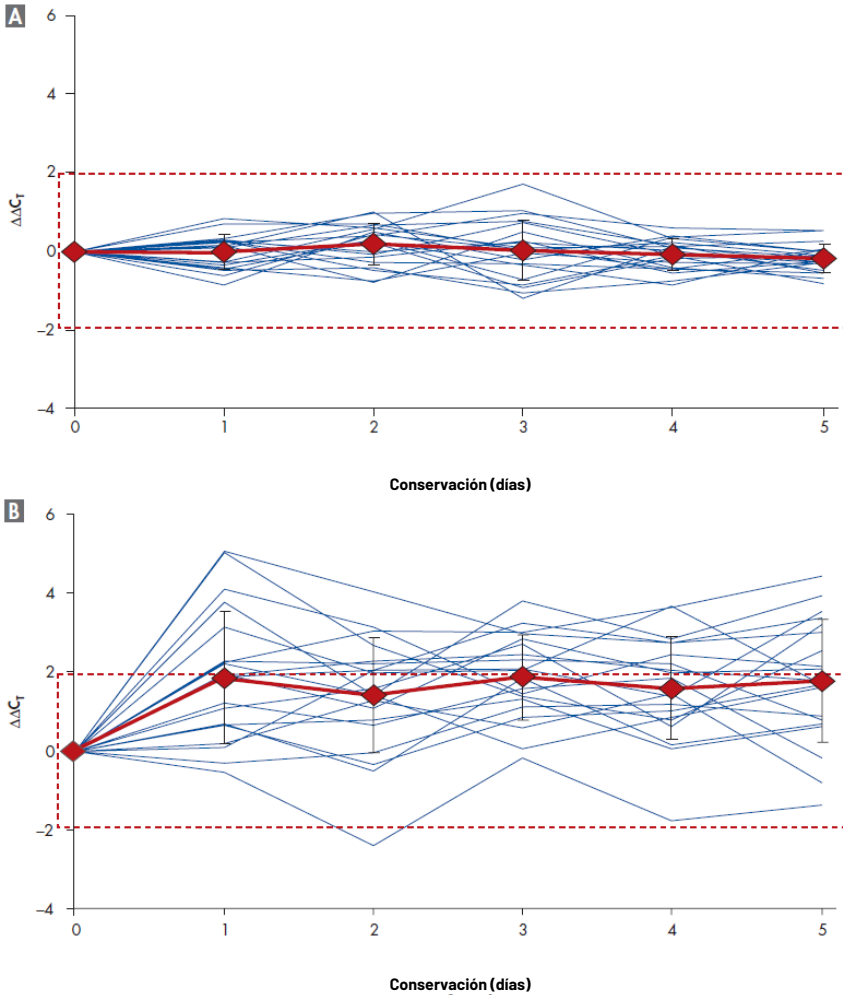


Figura 7: Estabilidad del ARN en muestras de sangre a 2-8 °C: IL1B. Se extrajo la sangre y se purificó el ARN total, después de conservarla a 2-8 °C, tal como se describe en la figura 6. Las concentraciones relativas del transcrito de IL1B se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Se representan los valores de todas las muestras, indicándose las medias y las desviaciones estándar. Las líneas discontinuas indican el intervalo $\pm 3 \times$ de precisión total del ensayo ($1,93 \text{ } ^\circ\text{C}_T$).

Aislamiento manual del ARN

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

Al usar el protocolo manual, el tiempo medio de preparación de las muestras (según los datos de 12 series de preparación de las muestras) es de unos 90 min*, y solamente hay 40 min de manipulación. La cantidad de ARN obtenida a partir de 2,5 ml de sangre total humana de un sujeto sano es $\geq 3\ \mu\text{g}$ para $\geq 95\%$ de las muestras procesadas. Dado que las cantidades obtenidas dependen en gran medida del donante, las cantidades obtenidas individuales pueden variar. En cuanto a los donantes individuales, el PAXgene Blood RNA System proporciona cantidades obtenidas altamente reproducibles y repetibles (figura 8 y figura 9, páginas 49 y 50, respectivamente) y resultados reproducibles y repetibles en la RT-PCR (figura 10 y figura 11, páginas 55 y 56, respectivamente), lo cual lo convierte en un método muy sólido para pruebas de diagnóstico clínico.

En la figura 8 (página 49) se muestran los datos globales de repetibilidad y reproducibilidad del PAXgene Blood RNA System. Se llevaron a cabo estudios adicionales para mostrar la influencia de distintos lotes del kit PAXgene Blood RNA y distintos usuarios en la reproducibilidad de la cantidad obtenida del ARN y del rendimiento de la RT-PCR en tiempo real. Dado que en estos estudios se usaron muestras mezcladas en lugar de muestras individuales obtenidas en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), los resultados no reflejan la repetibilidad del sistema, incluida la fluctuación entre extracciones individuales de sangre, sino solamente la repetibilidad de la preparación de las muestras (consulte la figura 9 en la página 50).

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

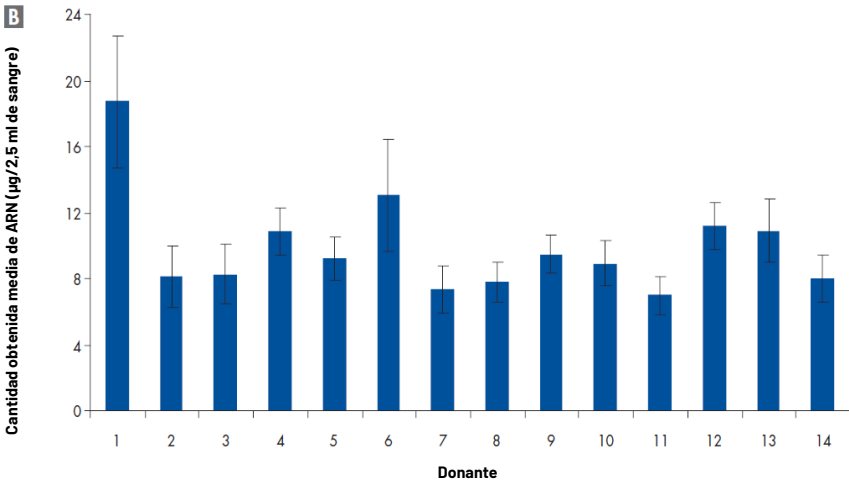
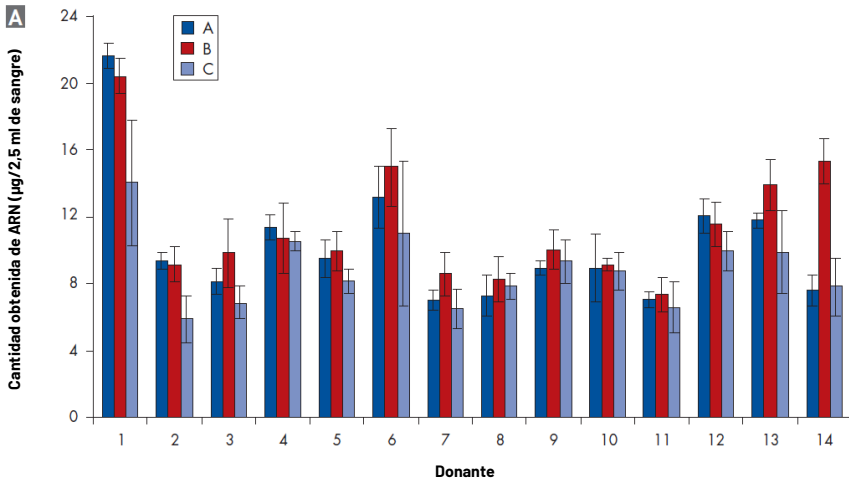


Figura 8: Aislamiento reproducible y repetible del ARN. Tres técnicos distintos (A, B y, C) procesaron manualmente las muestras de sangre por cuadruplicado de 14 donantes. Se usaron tres juegos de equipos, y todas las muestras preparadas por un determinado técnico se procesaron usando el mismo equipo.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

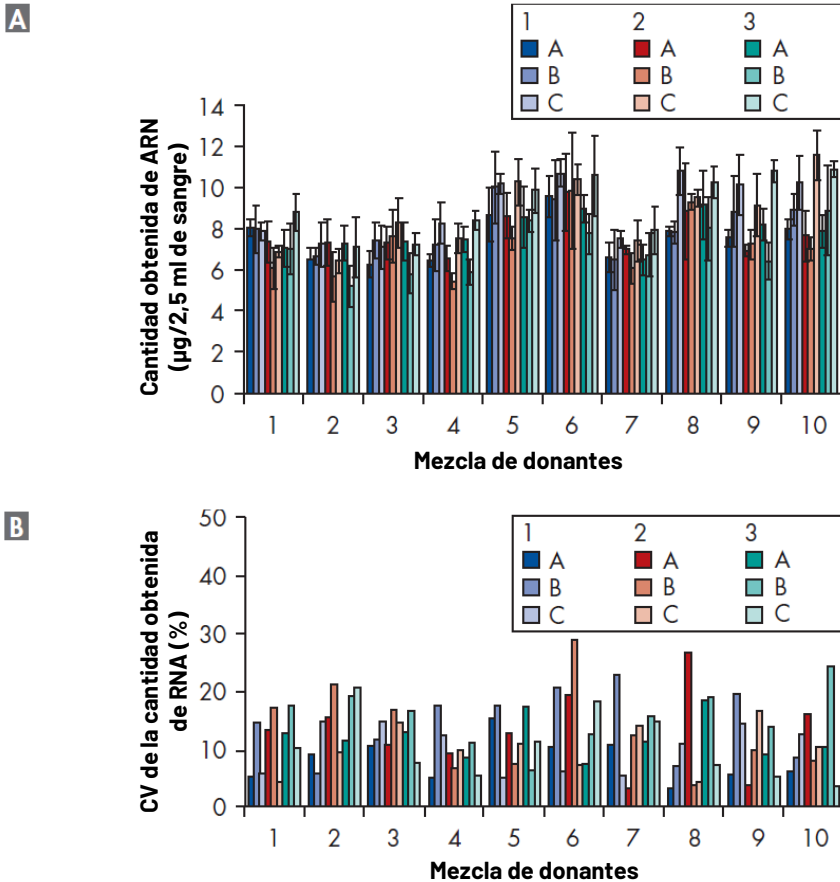


Figura 9: Repetibilidad y reproducibilidad de la cantidad obtenida de ARN para diferentes usuarios y lotes de PAXgene Blood RNA Kit usando muestras de sangre mezcladas. Se recogieron muestras de sangre de 30 donantes diferentes en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, 12 tubos por donante, 360 tubos en total). Se mezcló el contenido de los tubos de tres donantes y posteriormente se volvió a dividir el contenido mezclado en 36 muestras. Estas 36 muestras de una mezcla de tres donantes fueron procesadas manualmente por tres usuarios distintos. Cada usuario usó para el aislamiento del ARN tres lotes diferentes de PAXgene Blood RNA Kit y procesó las muestras por cuadruplicado a partir de cada una de las diez mezclas de donantes. **[A]** Cantidad obtenida de ARN y desviación estándar de la cantidad obtenida para cada combinación usuario-lote. Tres usuarios distintos (A, B y C) procesaron muestras de sangre por cuadruplicado de 10 mezclas de donantes con cada uno de los tres lotes del kit (1, 2 y 3). Se presentan las medias de la cantidad obtenida (columnas) y las desviaciones estándar (barras de error) por muestra cuadruplicada de cada mezcla de donantes para cada usuario y cada lote del kit. **[B]** Coeficiente de variación (CV) de la cantidad obtenida de ARN por mezcla de donantes para todas las combinaciones usuario-lote (A, B, C; 1, 2, 3), calculado a partir de la media de la cantidad obtenida y de la desviación estándar de la cantidad obtenida que se muestra en la figura 9A.

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

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

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

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

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

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

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

Combinación de datos	Mezcla de donantes 1 ($5,1 \times 10^6$ células/ml)			Mezcla de donantes 6 ($6,5 \times 10^6$ células/ml)		
	Cantidad obtenida media (μg)	SD (μg)	CV (%)	Cantidad obtenida media (μg)	SD (μg)	CV (%)
Lote 1, todos los usuarios	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Mezcla de donantes 9 ($8,4 \times 10^6$ células/ml)			Mezcla de donantes 10 ($10,2 \times 10^6$ células/ml)		
	Cantidad obtenida media (μg)	SD (μg)	CV (%)	Cantidad obtenida media (μg)	SD (μg)	CV (%)
Lote 1, todos los usuarios	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

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

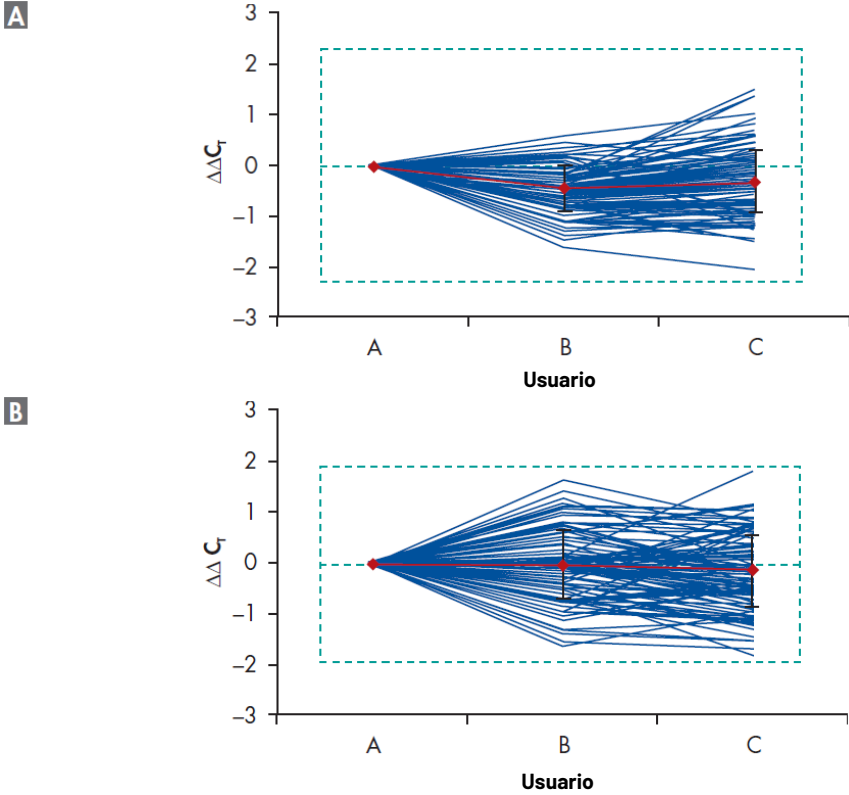


Figura 10: Reproducibilidad de la RT-PCR: entre usuarios. El ARN purificado en el experimento descrito en la figura 9 se utilizó para una RT-PCR en tiempo real. Las concentraciones relativas del transcrito de **[A] FOS** y **[B] IL1B** se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr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

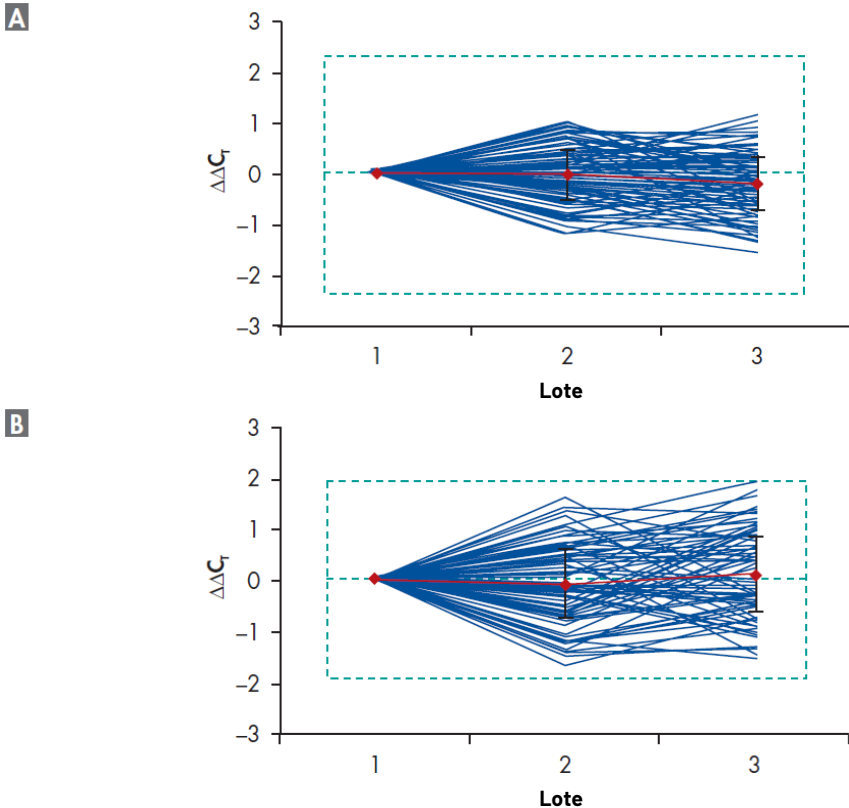


Figura 11: Reproducibilidad de la RT-PCR: entre lotes del kit. El ARN purificado en el experimento descrito en la figura 9 se utilizó para una RT-PCR en tiempo real. Las concentraciones relativas del transcrito de **[A]** FOS y **[B]** IL1B se determinaron mediante RT-PCR dúplex en tiempo real usando ARNr 18S como estándar interno. Se representan los valores de todas las muestras en relación con los valores del lote del kit 1 (10 mezclas de donantes \times 3 usuarios \times 4 duplicados = 120 conjuntos de datos para cada gen), con las medias (líneas rojas) y las desviaciones estándar (barras negras) para todas las muestras. Las líneas discontinuas indican el intervalo $\pm 3 \times$ precisión total de los ensayos (FOS: $2,34 C_T$; IL1B: $1,93 C_T$).

Tabla 2: Resumen de los datos de RT-PCR mostrados en la figura 10 y la figura 11

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

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

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

SD: desviación estándar.

Se presentan las medias de $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) y las desviaciones estándar de los datos presentados en la figura 10 y la figura 11.

Aislamiento automático del ARN

La cantidad de ARN obtenida a partir de 2,5 ml de sangre total humana de un sujeto sano es $\geq 3 \mu\text{g}$ para $\geq 95 \%$ de las muestras procesadas. La Figura 12 (página 58) indica las cantidades obtenidas de ARN a partir de un total de 216 muestras preparadas por medio del protocolo automatizado con tres lotes del kit y por tres usuarios. Dado que en estos estudios se usaron muestras de sangre mezcladas en lugar de muestras de tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuales, los resultados no reflejan la cantidad obtenida de ARN prevista a partir de muestras únicas de extracciones individuales de sangre. Puesto que las cantidades obtenidas dependen en gran medida del donante, las cantidades obtenidas individuales pueden variar (figura 12, página 58).

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

El ARN aislado con el PAXgene Blood RNA System y el protocolo automatizado es puro, como demuestran la falta de inhibición de la RT-PCR y los valores A_{260}/A_{280} de entre 1,8 y 2,2. Hay ADN genómico en valores $\leq 1\%$ (p/p) en $\geq 95\%$ de todas las muestras, medido mediante una PCR cuantitativa en tiempo real de una secuencia del gen de la actina beta. La figura 13 y la figura 14 (página 59) muestran los valores A_{260}/A_{280} y la cantidad relativa de ADN genómico de un total de 216 muestras preparadas por medio del protocolo automatizado con 3 lotes del kit y por 3 usuarios.

Cantidad obtenida de ARN ($\mu\text{g}/2,5\text{ ml}$ de sangre), instrumento QIAcube Connect MDx

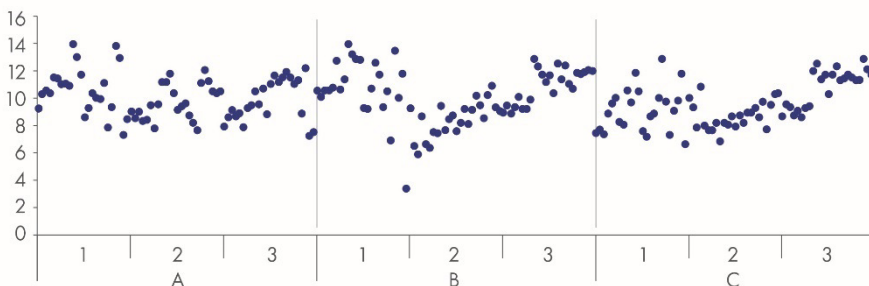


Figura 12: Rendimiento de ARN: procesamiento automatizado con el instrumento QIAcube Connect MDx. Las muestras de sangre de donantes individuales se recogieron en PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). El contenido de los tubos se agrupó en 6 mezclas de donantes y, posteriormente, se volvió a dividir. Se procesaron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

Pureza del ARN (A_{260}/A_{280}), instrumento QIAcube Connect MDx

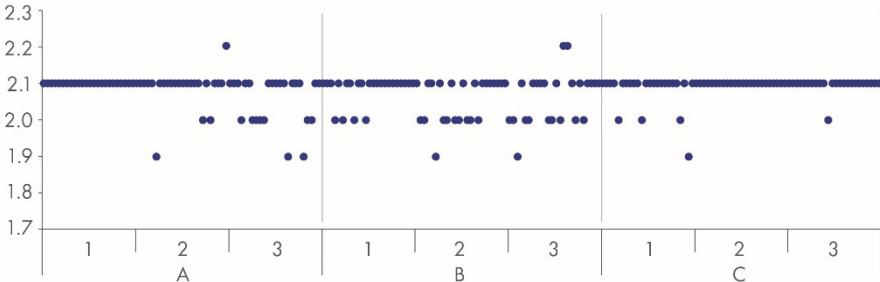


Figura 13: Pureza del ARN (valores A_{260}/A_{280}): procesamiento automatizado con el instrumento QIAcube Connect MDx. Tres usuarios diferentes (A, B y C) purificaron el ARN usando tres lotes distintos (1, 2 y 3) del PAXgene Blood RNA Kit con el instrumento QIAcube Connect MDx en el experimento descrito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

ADN genómico (p/p) [%] QIAcube Connect MDx

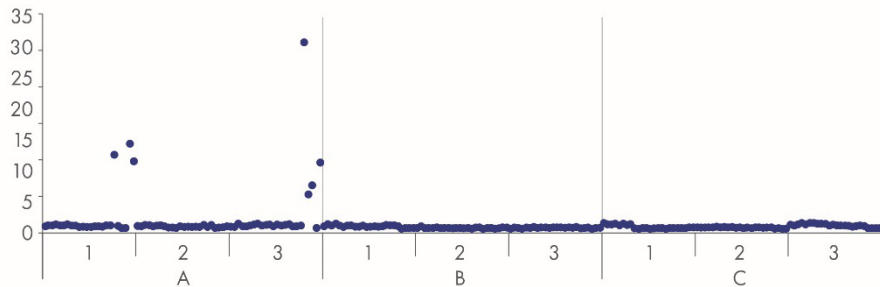


Figura 14: Pureza del ARN (% de contaminación del ADN genómico): procesamiento automatizado con el instrumento QIAcube Connect MDx. Tres usuarios diferentes (A, B y C) purificaron el ARN usando tres lotes distintos (1, 2 y 3) de PAXgene Blood RNA Kit con el instrumento QIAcube Connect MDx en el experimento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

El protocolo automatizado de aislamiento del ARN usando el PAXgene Blood RNA System proporciona resultados de RT-PCR altamente reproducibles y repetibles, lo cual hace de él un sistema sumamente sólido para pruebas de diagnóstico clínico.

Estabilidad del ARN aislado

Las muestras de ARN aisladas a partir de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes llenos de sangre con el PAXgene Blood RNA Kit son estables durante 5 años de conservación a -20°C y durante 7 años de conservación a -70°C (criterio de valoración de los estudios).

Notas importantes

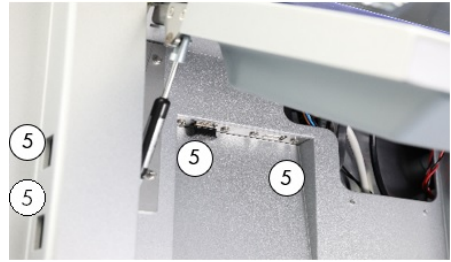
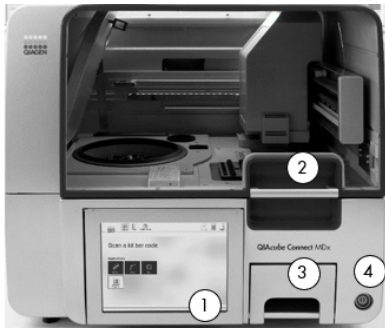
Uso del instrumento QIAcube Connect MDx

Asegúrese de que está familiarizado con el uso del instrumento QIAcube Connect MDx. Antes de empezar el protocolo automatizado PAXgene Blood RNA, lea el manual del usuario del instrumento y toda información adicional suministrada con el instrumento, prestando especial atención a la información de seguridad.

Inicio del instrumento QIAcube Connect MDx

Cierre la cubierta del instrumento QIAcube Connect MDx y encienda el instrumento por medio del interruptor de alimentación (consulte la figura 15 en la página 62).

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



Vista frontal del instrumento QIAcube Connect MDx

Pantalla táctil desplegada



Vista posterior del instrumento QIAcube Connect MDx (lado izquierdo)

Vista posterior del instrumento QIAcube Connect MDx (lado derecho)

Figura 15: Características externas del QIAcube Connect MDx.

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

Pantalla táctil

El instrumento QIAcube Connect MDx se controla por medio de una pantalla táctil. La pantalla táctil permite al usuario utilizar el instrumento y guiar al usuario por la configuración de la mesa de trabajo. Durante el procesamiento de las muestras, en la pantalla táctil aparecen el estado del protocolo y el tiempo restante.





Figura 16: Pantalla táctil extraíble del QIAcube Connect MDx.

Instalación de protocolos en el instrumento QIAcube Connect MDx

Se requiere una instalación inicial de protocolos antes de poder realizar la primera serie de preparación de ARN en el instrumento QIAcube Connect MDx. Instale los dos protocolos «PAXgene Blood RNA Part A» (Parte A de PAXgene Blood RNA) y «PAXgene Blood RNA Part B» (Parte B de PAXgene Blood RNA).

Los protocolos para el instrumento QIAcube Connect MDx se pueden encontrar en **www.qiagen.com** y es preciso descargarlos en el lápiz USB proporcionado con el instrumento. Estos protocolos se transferirán al instrumento a través del puerto USB.

El puerto USB (situado en un lateral de la pantalla táctil; consulte la figura 15 en la página 62) permite conectar el lápiz USB suministrado con el instrumento al QIAcube Connect MDx. También pueden transferirse archivos de datos, tales como archivos de registro o archivos de informe, del instrumento al lápiz USB a través del puerto USB.

-  El puerto USB solamente está destinado a utilizarse con el lápiz USB suministrado por QIAGEN. No conecte otros dispositivos en este puerto.
-  No extraiga el lápiz USB mientras esté descargando protocolos o transfiriendo archivos de datos o durante una serie de un protocolo.


Para obtener más información sobre el proceso de carga de protocolos al instrumento QIAcube Connect MDx, consulte el manual de usuario del instrumento.

Carga del instrumento QIAcube Connect MDx

Para ahorrar tiempo, la carga puede realizarse durante uno o los dos pasos de 10 min de centrifugación (pasos 3 y 5) descritos en «Protocolo: Aislamiento automatizado de ARN total a partir de sangre total humana recogida en tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)», en la página 34.

Frascos de reactivo

Antes de cada serie en el instrumento QIAcube Connect MDx, llene con cuidado los cuatro frascos de reactivo con los reactivos indicados en la tabla 3 (página 65) hasta el indicador de nivel máximo o, si eso no es posible, hasta el nivel que permitan los volúmenes de tampón suministrados en el PAXgene Blood RNA Kit. Rotule los frascos de reactivo y las tapas claramente con el nombre de los tampones y coloque los frascos de reactivo llenos en las posiciones adecuadas en la gradilla de frascos de reactivo. Cargue la gradilla en la plataforma de trabajo del instrumento tal como se muestra (figura 17 y figura 18, páginas 65 y 66,).

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

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

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

Tabla 3: Posiciones en la gradilla de frascos de reactivo

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

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

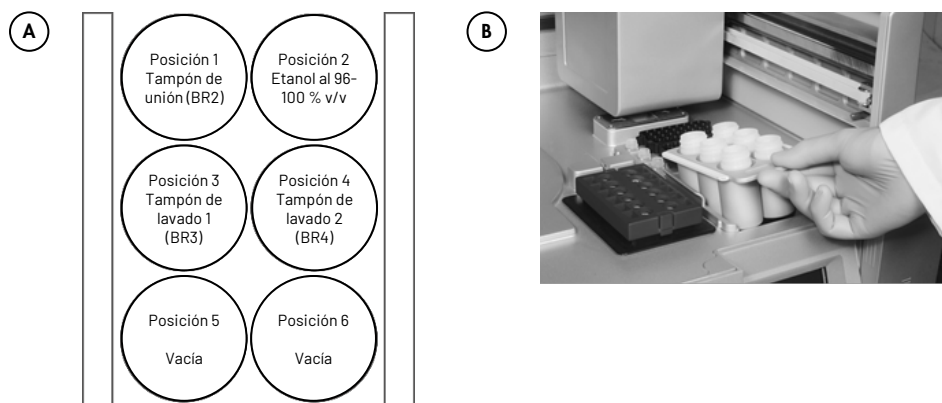


Figura 17: Carga de la gradilla de frascos de reactivo. [A] Esquema de las posiciones y del contenido de los frascos en la gradilla de frascos de reactivo. **[B]** Carga de la gradilla en el instrumento QIAcube Connect MDx.

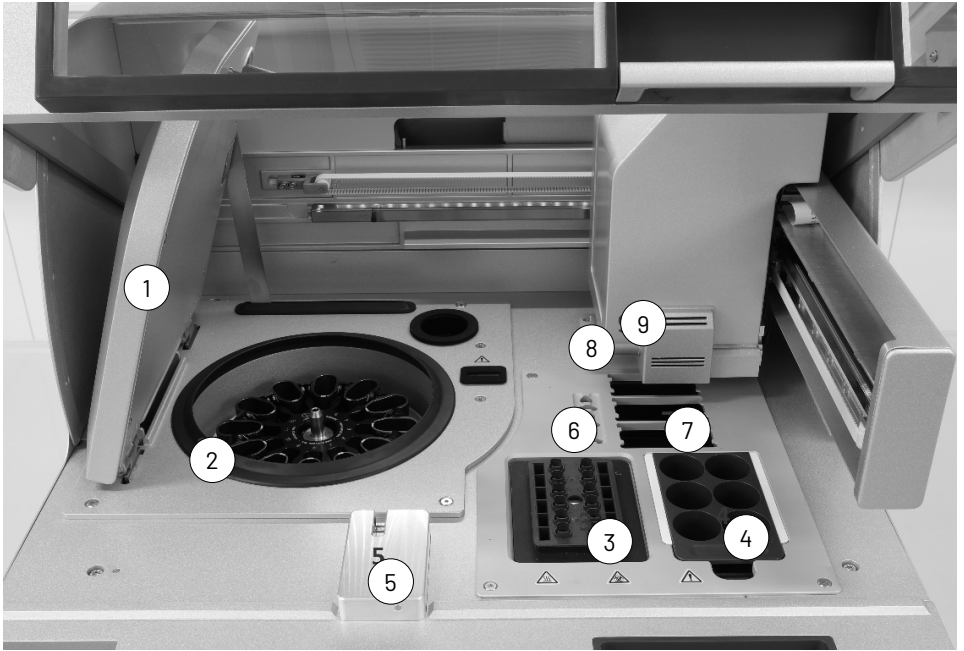


Figura 18: Vista interna del instrumento QIAcube Connect MDx.

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

Columnas de centrifugación (PSC y PRC), MCT y material de plástico del instrumento QIAcube Connect MDx

Coloque en el instrumento QIAcube Connect MDx 2 gradillas de puntas llenas con Filter-Tips, 1000 µl (consulte la figura 18 en la página 66). Llene las gradillas con puntas cuando sea necesario.

i Use únicamente Filter-Tips, 1000 µl diseñadas para su uso con el instrumento QIAcube Connect MDx.

Rotule los adaptadores de rotor y los MCT para cada muestra con un rotulador permanente. Abra la PSC que vaya a utilizar y corte la tapa totalmente usando unas tijeras (consulte la figura 19).

i Para un funcionamiento correcto del brazo robótico del instrumento QIAcube Connect MDx, retire (corte) completamente las tapas y todas las partes de plástico que conectan la tapa a las PSC (consulte la figura 19). De lo contrario, el brazo robótico no puede sujetar las PSC adecuadamente.

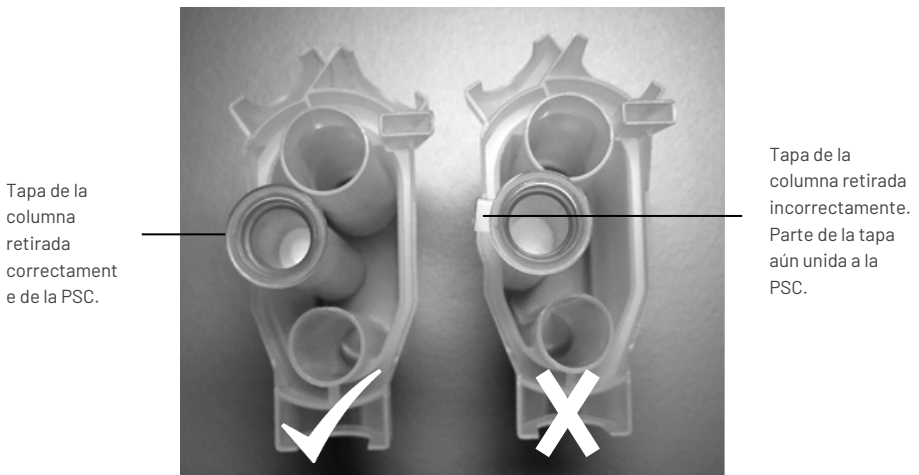


Figura 19: Carga de la PSC. La PSC se carga en la posición intermedia del adaptador de rotor. Corte la tapa de la PSC antes de cargar la columna.

Cargue la PSC (consulte la figura 19 en la página 67), la PRC y el MCT rotulado en las posiciones adecuadas en cada adaptador de rotor rotulado tal como se muestra en la tabla 4 y en la figura 20.



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

Tabla 4: Consumibles de plástico en el adaptador de rotor

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

* Use los MCT (1,5 ml) incluidos en el PAXgene Blood RNA Kit.

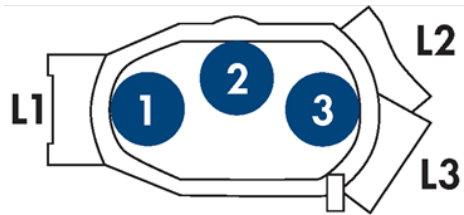


Figura 20: Posiciones en el adaptador de rotor. El adaptador de rotor tiene tres posiciones para tubos (1-3) y tres posiciones para tapas (L1-L3).

Carga de la centrifugadora

Cargue los adaptadores de rotor preparados en las cubetas de la centrifugadora del instrumento QIAcube Connect MDx tal como se muestra en la figura 21, que aparece a continuación.



Si va a procesar menos de 12 muestras, asegúrese de cargar el rotor de la centrifugadora equilibrado radialmente (consulte la figura 22 en la página 70). Deben montarse todas las cubetas de la centrifugadora antes de empezar una serie de un protocolo, incluso si se van a procesar menos de 12 muestras. No es posible procesar ni una (1) sola muestra ni 11 muestras.



Figura 21: Carga de la centrifugadora en el instrumento QIAcube Connect MDx. Cargue los adaptadores de rotor preparados en las cubetas de la centrifugadora.

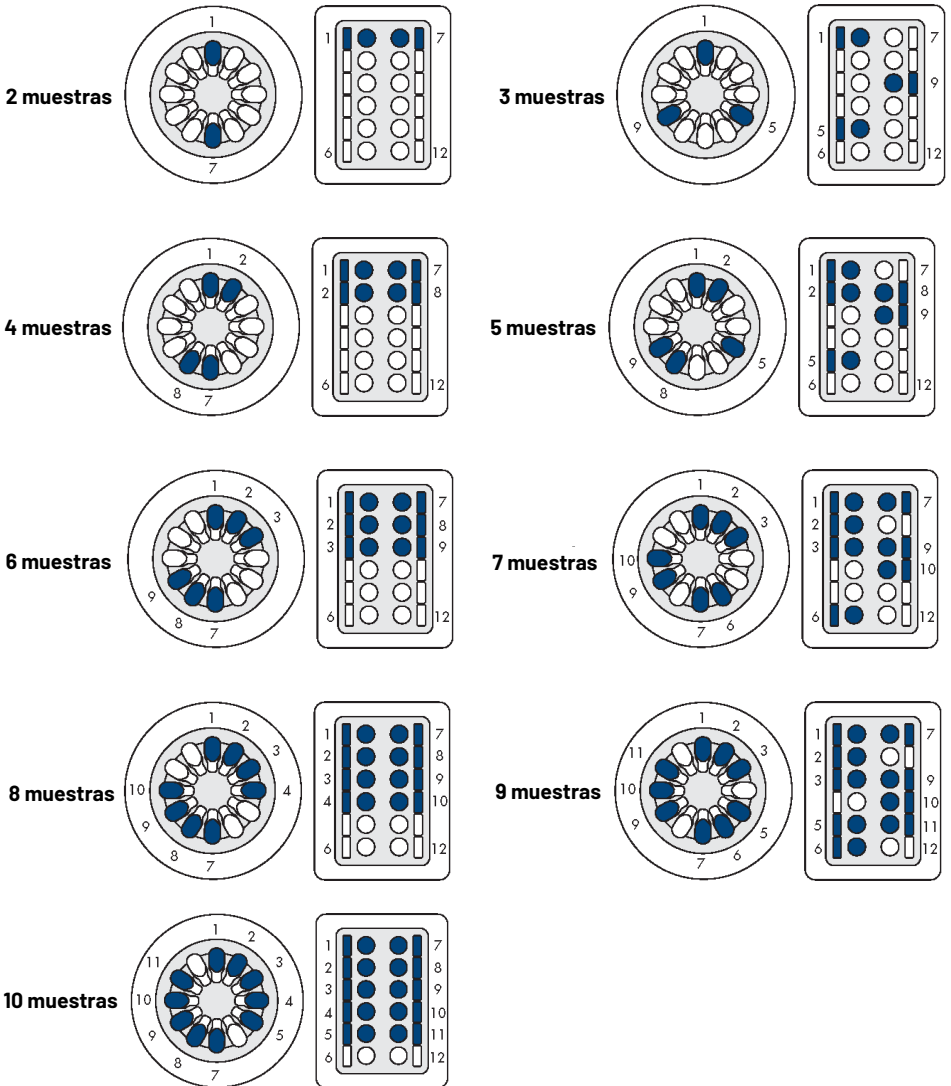


Figura 22: Carga de la centrifugadora y del agitador. Se muestran las posiciones de la centrifugadora y del agitador para procesar entre dos (2) y diez (10) muestras. No es posible procesar ni 1 ni 11 muestras. Para procesar 12 muestras, se cargan todas las posiciones de la centrifugadora y del agitador (no se muestra la imagen).

Tubos de procesamiento

Retire cualquier PT que haya quedado en las ranuras para los MCT de series anteriores (consulte la figura 18 en la página 66). Llene 3 PT con la cantidad de reactivos que se indica en la tabla 5, según el número de muestras de la serie.

Para la mezcla de incubación con ADNasa I, pipetee el volumen indicado de tampón de digestión de ADN (RDD) en un PT y añada el volumen indicado de la solución madre de ADNasa I (RNFD). Pipetee la mezcla completa arriba y abajo suavemente 3 veces para mezclarla usando una punta de pipeta de 1000 µl.



Utilice los PT de 2 ml incluidos en el PAXgene Blood RNA Kit. Rotule los tubos de forma clara con el nombre de los reactivos y colóquelos en la posición adecuada en las ranuras para MCT, tal como se indica en tabla 6 (página 72).



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

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

Tabla 5: Volumen de reactivos necesario en los PT para las ranuras para los MCT

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

Tabla 6: Ranuras para los MCT

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

* Utilice los PT de 2 ml incluidos en el PAXgene Blood RNA Kit.

Eliminación

Para una eliminación segura tras la recogida de muestras y el aislamiento manual del ARN, consulte la información de seguridad y las precauciones en las páginas 19 y 20, respectivamente.

Además, para el aislamiento automático del ARN con el instrumento QIAcube Connect MDx, consulte la figura 21 y la figura 22, en las páginas 69 y 70, respectivamente, donde se indican las ranuras específicas de las columnas y las puntas usadas destinadas a eliminación.

Referencias

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.

Guía de resolución de problemas

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

Comentarios y sugerencias	
ARN degradado	
a) Contaminación con ARNasa	 Procure no introducir ARNasa en los reactivos durante el procedimiento o la manipulación posterior (consulte el apéndice A, página 80).
Baja cantidad obtenida de ARN	
b) Se ha extraído menos de 2,5 ml de sangre en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	 Asegúrese de extraer 2,5 ml de sangre en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT; consulte el <i>Manual de uso del PAXgene Blood RNA Tube</i>)
c) La concentración de ARN se ha medido en agua	 El ARN debe diluirse en tampón Tris-HCl 10 mM, con un pH de 7,5* para que la cuantificación sea exacta (consulte el apéndice B, página 81).
d) Se han transferido restos celulares a la PRC en los pasos 9 y 10 del protocolo manual	 Evite transferir partículas grandes a la hora de pipetear el sobrenadante en el paso 7 del protocolo manual (la transferencia de restos pequeños no afectará al procedimiento).
e) El sobrenadante no se ha eliminado por completo en el paso 3	 Asegúrese de que ha eliminado todo el sobrenadante. Si se decanta el sobrenadante, quite las gotas del borde del tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) dando unos golpecitos en una hoja de papel absorbente. Tome las precauciones oportunas para evitar la contaminación cruzada.
f) Después de recoger la sangre en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT), la sangre se ha incubado menos de 2 h	 Incube la sangre en el tubo PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante al menos 2 h después de su extracción.

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

Comentarios y sugerencias	
Valor A_{260}/A_{280} bajo	
g) Se ha utilizado agua para diluir el ARN para medir el cociente A_{260}/A_{280}	 <p>Use un tampón Tris-HCl 10 mM con un pH de 7,5 para diluir el ARN antes de medir la pureza* (consulte el apéndice B, página 81).</p>
h) El espectrofotómetro no está calibrado correctamente	 <p>Calibre el espectrofotómetro utilizando un blanco que contenga la misma proporción de tampón de elución (BR5) y de tampón Tris-HCl 10 mM con un pH de 7,5 que las muestras que va a medir. El tampón de elución (BR5) tiene una absorbancia alta a 220 nm, lo que puede dar lugar a niveles de absorbancia de fondo altos si el espectrofotómetro no está correctamente calibrado.</p>
El instrumento no funciona correctamente	
i) El instrumento QIAcube Connect MDx no funciona correctamente	<p>Lea el <i>Manual del usuario de QIAcube Connect MDx</i>, prestando especial atención al apartado sobre la resolución de problemas. Asegúrese de que se realiza un mantenimiento correcto del instrumento, tal como se describe en el manual del usuario.</p>

* 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.

Símbolos

En las instrucciones de uso o en el embalaje y en el etiquetado, pueden aparecer los siguientes símbolos. Se explican otros símbolos en Contenido del kit (página 6).

Símbolo	Definición del símbolo
V<N1>	Versión <N1> del producto
 <N2>	Contiene reactivos suficientes para <N2> ensayos
	Consultar las instrucciones de uso
	Fecha de caducidad
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
REF	Número de catálogo
LOT	Número de lote
MAT	Número de material
COMP	Componentes
NUM	Número
KU	Unidades Kunitz
ADD	Adición
CONT	Contiene
RCNS	Reconstituido

DNase

Desoxirribonucleasa I

EtOH

Etanol

GITC

Isotiocianato de guanidina

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Número mundial de artículo comercial



Limitación de temperatura



Límite superior de temperatura



Fabricante

EC REP

Representante autorizado en la Unión Europea de conformidad con el Reglamento (UE) 2017/746



Nota importante



Adición de etanol



Marca CE. Este producto cumple los requisitos del reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro.

UDI

Identificador único de dispositivo



Precaución



ADVERTENCIA: Superficie caliente

Información de contacto

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

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, consulte nuestro Centro de asistencia técnica en **www.qiagen.com/Support**, llame al 00800-22-44-6000 o póngase en contacto con uno de los departamentos de servicio técnico de QIAGEN o con distribuidores locales (consulte la contracubierta o visite **www.qiagen.com**).

Apéndice A: Consideraciones generales sobre la manipulación del ARN

Manipulación del ARN



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

Manipulación general



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

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

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

Cuantificación del ARN

La concentración del ARN debe determinarse midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en un espectrofotómetro. Para garantizar que las lecturas sean significativas, deben estar comprendidas dentro del intervalo lineal del espectrofotómetro. Una absorbancia de 1 unidad a 260 nm corresponde a 44 µg de ARN por mililitro ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Esta relación solamente es válida para las mediciones realizadas en tampón Tris-HCl 10 mM con un pH de 7,5.* Por consiguiente, si es necesario diluir la muestra de ARN, dilúyala en tampón Tris-HCl 10 mM. Como se comenta más adelante (consulte el apartado «Pureza del ARN» en la página 82), el cociente entre los valores de absorbancia a 260 nm y 280 nm proporciona una estimación de la pureza del ARN. Cuando mida muestras de ARN, asegúrese de que las cubetas no contienen ARNasa. Calibre el espectrofotómetro utilizando un blanco que contenga la misma proporción de tampón de elución (BR5) y de tampón Tris-HCl que las muestras que va a medir. El tampón de elución (BR5) tiene una absorbancia alta a 220 nm, lo que puede dar lugar a niveles de absorbancia de fondo altos si el espectrofotómetro no está correctamente calibrado. A continuación se presenta un ejemplo de cálculo para la cuantificación del ARN.

$$\begin{aligned}\text{Volumen de la muestra de ARN} &= 80 \mu\text{l} \\ \text{Dilución (1/15)} &= 10 \mu\text{l de muestra de ARN} + 140 \mu\text{l de tampón} \\ &\quad \text{Tris-HCl 10 mM con un pH de 7,5} \\ \text{Mida la absorbancia de la muestra diluida en una cubeta (libre de ARNasa).} \\ A_{260} &= 0,3 \\ \text{Concentración de la muestra} &= 44 \times A_{260} \times \text{factor de dilución} \\ &= 44 \times 0,3 \times 15 \\ &= 198 \mu\text{g/ml}\end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned}
 \text{Cantidad obtenida total} &= \text{concentración} \times \text{volumen de la muestra en} \\
 &\text{mililitros} \\
 &= 198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml} \\
 &= 15,8 \mu\text{g de ARN}
 \end{aligned}$$

Pureza del ARN

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

* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22, 474.

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



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

Instrucciones para quitar el cierre BD Hemogard

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

Instrucciones para insertar un segundo cierre BD Hemogard

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

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de cat.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, tubos de procesamiento, ADNasa I libre de ARNasa, reactivos libres de ARNasa y tampones; para usar en combinación con los tubos PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 tubos de recogida de sangre	762165
Productos relacionados que pueden solicitarse a QIAGEN para el aislamiento automatizado del ARN en QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	El paquete incluye: gradillas de frascos de reactivo (3); tiras para etiquetado de gradillas (8); puntas con filtro de 200 µl (1024); puntas con filtro de 1000 µl (1024); puntas con filtro de 1000 µl de calibre ancho (1024); frascos de reactivo de 30 ml (18); adaptadores de rotor (240); soporte para adaptadores de rotor	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Puntas de pipeta estériles desechables engradilladas	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Frascos de reactivo (30 ml) con tapa; paquete de 6; para usar con la gradilla de frascos de reactivo del QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	Para 240 preparaciones: 240 adaptadores de rotor desechables; para su uso con QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Gradilla para alojar 6 frascos de reactivo de 30 ml en la plataforma de trabajo de QIAcube	9026197
Rotor Adapter Holder	Soporte para 12 adaptadores de rotor desechables; para su uso con QIAcube	990392

Producto	Contenido	N.º de cat.
Productos relacionados que pueden solicitarse a BD para la recogida de sangre con los tubos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	aguja de 21 G y 0,8 × 19 mm, tubo de 305 mm con adaptador luer; 50 por caja, 200 por estuche	367286/367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	aguja de 21 G de 0,8 × 19 mm, tubo de 305 mm con adaptador luer; 50 por caja, 200 por estuche	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Estuche solamente para diámetros de 13 mm y 16 mm; 1000/estuche	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Tubos de extracción de 13 × 75 mm y 4,0 ml con cierre BD Hemogard rojo y etiqueta de papel; 100 por caja, 1000 por estuche	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	Tubos de extracción de 13 × 75 mm y 3,0 ml con cierre BD Hemogard transparente y etiqueta transparente; 100 por caja, 1000 por estuche	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	Tubos de extracción de 13 × 75 mm y 3,0 ml con cierre BD Hemogard transparente y etiqueta de papel; 100 por caja, 1000 por estuche	366703

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

Historial de revisiones del documento

Fecha	Cambios
[R1] abril de 2022	Versión inicial de IVDR
[R2] febrero de 2023	La dirección postal de PreAnalytiX GmbH ha cambiado de "Feldbachstrasse" a "Garstligweg 8". Se han añadido productos de BD en la información para pedidos. Actualización de la información de seguridad.

Notas



Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit de PreAnalytiX o de QIAGEN correspondiente. Puede encontrar los manuales de uso y las guías del usuario de los kits de QIAGEN y PreAnalytiX en www.preanalytix.com y www.qiagen.com, o puede solicitarlos al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

**Better samples
More to explore**



Más información en: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023