

2023. gada februāris

PAXgene[®] Blood RNA Kit komplekts (Rokasgrāmata) Lietošanas instrukcijas



50

Versija 3 (V3)

IVD

Lietošanai in vitro diagnostikā



REF

762174

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

Ražotājs: QIAGEN[®] GmbH for PreAnalytiX GmbH

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VĀCIJA

R2

MAT

1130774LV

Preču zīmes: 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. Ja vien nav norādīts citādi, PreAnalytiX, PreAnalytiX logotips un visas pārējās preču zīmes ir PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH īpašums.

Ierobežots licences līgums PAXgene Blood RNA Kit komplektam

Šī produkta izmantošana apliecina katra produkta pircēja vai lietotāja piekrišanu tālāk minētajiem nosacījumiem.

1. Šo produktu drīkst lietot tikai saskaņā ar protokoliem, kuri ir iekļauti šī produkta komplektācijā un šajā rokasgrāmatā, un to drīkst lietot tikai kopā ar šajā panelī iekļautajiem komponentiem. Uzņēmums PreAnalytiX® nepiešķir nekāda veida licenci uz nevienu no tā intelektuālajiem īpašumiem, lai šajā panelī ietvertās sastāvdaļas izmantotu kopā ar jebkādām sastāvdaļām, kas nav ietvertas šajā panelī, vai ar tām apvienotu, izņemot gadījumus, kas aprakstīti kopā ar precīzi piegādātajos protokolos un šajā rokasgrāmatā, kā arī papildu protokolos, kas pieejami tīmekļa vietnē www.qiagen.com un www.preanalytix.com.
2. Izņemot skaidri norādītās licences, uzņēmums PreAnalytiX nesniedz citas garantijas, ka šis komplekts un/vai tā lietošana nepārkāpj trešo pušu tiesības.
3. Šis komplekts ir licencēts vienreizējai lietošanai, un to nedrīkst izmantot atkārtoti, atjaunot vai pārdot tālāk.
4. PreAnalytiX īpaši atsakās no jebkādam citām tiešām vai netiešām licencēm, kas šeit nav skaidri norādītas.
5. Komplekta pircējs un lietotājs piekrīt neveikt un neatļaut citiem veikt nekādas darbības, kas varētu izraisīt vai veicināt jebkuras no iepriekš aizliegtajām darbībām.
6. Uzņēmums PreAnalytiX var pieprasīt šī ierobežotā licences līguma aizliegumu īstenošanu jebkurā tiesā un apņemas atgūt visus savus izmeklēšanas un tiesas izdevumus, ieskaitot advokātu honorārus, kas radušies, īstenojot šo ierobežoto licences līgumu vai jebkuru no uzņēmuma intelektuālā īpašuma tiesībām saistībā ar komplektu un/vai tā komponentiem.

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

HB-3009-002 BD-8945 1130774LV © 2023 PreAnalytiX GmbH, visas tiesības paturētas.

PreAnalytiX izplatītāji

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

Saturs

Saturs	3
Paredzētais lietojums	6
Paredzētais lietotājs	6
Apraksts un darbības principi	7
Ievads	7
Princips un procedūra	7
Paraugu savākšana un stabilizēšana	8
RNS izolēšana	8
Manuāla RNS izolēšana	9
Automatizēta RNS izolēšana	11
Nodrošinātie materiāli	14
Komplekta saturs	14
Komplekta komponenti	15
Nepieciešamie materiāli, kas netiek nodrošināti	16
Visiem protokoliem	16
Manuālajam protokolam	16
Automatizētajam protokolam	17
Brīdinājumi un piesardzības pasākumi	18
Drošības informācija	18
Ar ārkārtas situācijām saistīta informācija	18
Piesardzības pasākumi	19
Reaģentu uzglabāšana un lietošana	22

Lietošanas stabilitāte	22
Parauga savākšana, glabāšana un lietošana	23
Protokols: manuāla summārās RNS izolēšana no PAXgene Blood RNA Tube stobriņos savāktām cilvēka pilnasinīm	24
Protokols: automatizēta summārās RNS izolēšana no PAXgene Blood RNA Tube stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinīm	32
Produkta lietošanas ierobežojumi	39
Kvalitātes kontrole	39
Veiktspējas raksturojums	40
Paraugu savākšana un stabilizēšana	40
Manuāla RNS izolēšana	45
Automatizēta RNS izolēšana	54
Izolētās RNS stabilitāte	57
Svarīgas piezīmes	58
QIAcube Connect MDx izmantošana	58
QIAcube Connect MDx startēšana	58
Protokolu instalēšana QIAcube Connect MDx instrumentā	60
QIAcube Connect MDx instrumenta uzpildīšana	61
Centrifūgas stobriņi (PSC, PRC), MCT un QIAcube Connect MDx plastmasas piederumi	64
Utilizēšana	70
Atsauces	71
Problēmu novēršanas ceļvedis	72
Simboli	74
Kontaktinformācija	76

A pielikums. Vispārīgas piezīmes par darbu ar RNS.....	77
B pielikums. Summārās RNS kvantificēšana un kvalitātes noteikšana	78
C pielikums. Darbs ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT)	80
Informācija par pasūtīšanu	82
Dokumenta pārskatīšanas vēsture	84

Paredzētais lietojums

Lietošanai in vitro diagnostikā.

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

PAXgene Blood RNA System sistēmas veiktspējas raksturojums ir noteikts tikai ar FOS un IL1B gēnu transkriptiem. Lietotājs ir atbildīgs par attiecīgo PAXgene Blood RNA System sistēmas veiktspējas raksturojuma noteikšanu citiem mērķa transkriptiem.

Lietošanas indikācijas

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

Paredzētais lietotājs

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

Šis komplekts ir paredzēts profesionālai lietošanai.

Apraksts un darbības principi

Ievads

Pilnasiņu savākšana ir pirmā darbība daudzās molekulārās analizēs, ko izmanto šūnu RNS izpētei. Tomēr nozīmīga problēma šādos eksperimentos ir šūnu RNS profila nestabilitāte in vitro. PreAnalytiX veiktos pētījumos ir pierādīts, ka, glabājot un transportējot istabas temperatūrā, atsevišķu mRNS veidu kopiju skaitis pilnasinīs var mainīties vairāk nekā tūkstoškārtīgi (Rainen et al., 2002). To izraisa gan strauja RNS noārdīšanās, gan noteiktu gēnu inducēta ekspresija pēc asiņu paņemšanas. Šādu RNS ekspresijas profila izmaiņu dēļ nav iespējams veikt uzticamus pētījumus par gēnu ekspresiju. Tāpēc, lai varētu precīzi analizēt gēnu ekspresiju cilvēka pilnasinīs, ir nepieciešama metode, kas saglabā RNS ekspresijas profilu flebotomijas laikā un pēc tās.

Princips un procedūra

Uzņēmums PreAnalytiX ir izstrādājis sistēmu, kura sniedz iespēju vākt, stabilizēt, glabāt un transportēt cilvēka pilnasiņu paraugus, kā arī nodrošina ātru un efektīvu protokolu intracelulārās RNS izolēšanai. Sistēmā ir nepieciešama PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT) izmantošana asiņu savākšanai un RNS stabilizēšanai un pēc tam manuāla vai automatizēta RNS izolēšana, izmantojot komplektu PAXgene Blood RNA Kit. Gan manuālais, gan automatizētais protokols nodrošina būtībā līdzvērtīgu veikspēju attiecībā uz RNS kvalitāti un iegūto daudzumu. Manuālā protokola (no 45. lpp.) un automatizētā protokola (no 54. lpp.) veikspējas dati ir iekļauti šajā rokasgrāmatā.

PAXgene Blood RNA System sistēma sniedz iespējas standartizēt priekšanalīzes darbplūsmas soļus no asins parauga savākšanas līdz šūnu RNS izolēšanai saskaņā ar standartu ISO 20186-1:2019, Molecular in vitro diagnostic examinations – Specifications for pre-examination processes for venous whole blood – Part 1: Isolated cellular RNA.

Paraugu savākšana un stabilizēšana

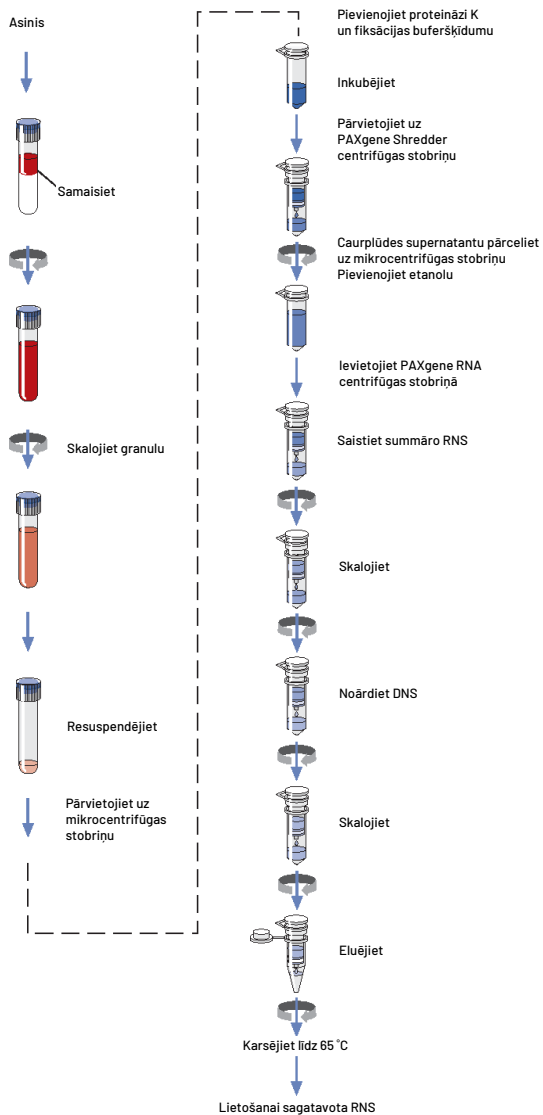
PAXgene Blood RNA Tube stobriņi (BRT) satur patentētu RNS stabilizēšanas reaģentu. Šī piedeva aizsargā RNS molekulas pret RNāžu izraisītu noārdīšanos un minimizē ex vivo izmaiņas gēnu ekspresijā. Sistēmas PAXgene Blood RNA System veikspējas raksturojums ir noteikts ar FOS un IL1B gēnu transkriptiem, kurus var skatīt no 40. lpp.

RNS izolēšana

PAXgene Blood RNA Kit komplekts ir paredzēts summārās RNS izolēšanai no 2,5 ml cilvēka pilnasiņu, kas savāktas PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT). Process ir vienkāršs, un to var veikt, izmantojot manuālās vai automatizētas procedūras (sk. 1. attēlu vai 3. attēlu, attiecīgi 10. vai 12. lpp.). Abos protokolos izolēšana sākas ar centrifugēšanas soli, lai granulētu nukleīnskābes PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT). Granula tiek skalota un resuspendēta, un pēc tam tiek veikta manuāla vai automatizēta RNS izolēšana. Abos protokolos būtībā tiek veikti vienādi protokola soļi ar tiem pašiem komplekta komponentiem.

Manuāla RNS izolēšana

Detalizēts skaidrojums: resuspendētā granula tiek inkubēta optimizētos buferšķīdumos kopā ar proteīnāzi K (PK), lai izraisītu proteīnu noārdīšanu. Tiek veikta papildu centrifugēšana ar PAXgene Shredder centrifūgas stobriņu (PSC), lai homogenizētu šūnu lizātu un izņemtu šūnu atliekas, un caurplūdes frakcijas supernatants tiek pārnesti uz jaunu mikrocentrifūgas stobriņu (MCT). Tiek pievienots etanols, lai koriģētu saistīšanās apstākļus, un lizāts tiek pievienots PAXgene RNA centrifūgas stobriņā (PRC). Veicot īsu centrifugēšanu, RNS selektīvi saistās ar PAXgene kvarca membrānu, bet kontaminanti izplūst tai cauri. Atlikušie kontaminanti tiek noņemti, veicot vairākus efektīvus skalošanas soļus. Starp pirmo un otro skalošanas soli membrāna tiek apstrādāta ar DNāzi I (RNFD), lai noņemtu niecīgos daudzumus piesaistītās DNS. Pēc skalošanas soļiem RNS tiek eluēta eluēšanas buferšķīdumā (BR5) un denaturēta karstuma ietekmē. Manuālās RNS izolēšanas veikspējas raksturojums, izmantojot PAXgene Blood RNA System sistēmu, ir redzams 45. lpp.



1. attēls. PAXgene Blood RNA manuālā procedūra.

Automatizēta RNS izolēšana

Asins RNS izolēšana QIAGEN QIAcube Connect MDx sistēmā tiek automatizēta. Novatoriskajā instrumentā QIAGEN centrifūgas stobriņu apstrādāšanai tiek izmantota moderna tehnoloģija, ļaujot laboratorijas darbpļūsmā ērti integrēt automatizētu, zemas caurplūdes parauga sagatavošanu. Paraugu sagatavošanai, izmantojot ierīci QIAcube Connect MDx, tiek izmantoti tādi paši soļi kā manuālajā procedūrā (t.i., lizēšana, saistīšana, mazgāšana un eluēšana), un to var veikt, izmantojot PAXgene Blood RNA Kit komplektu.

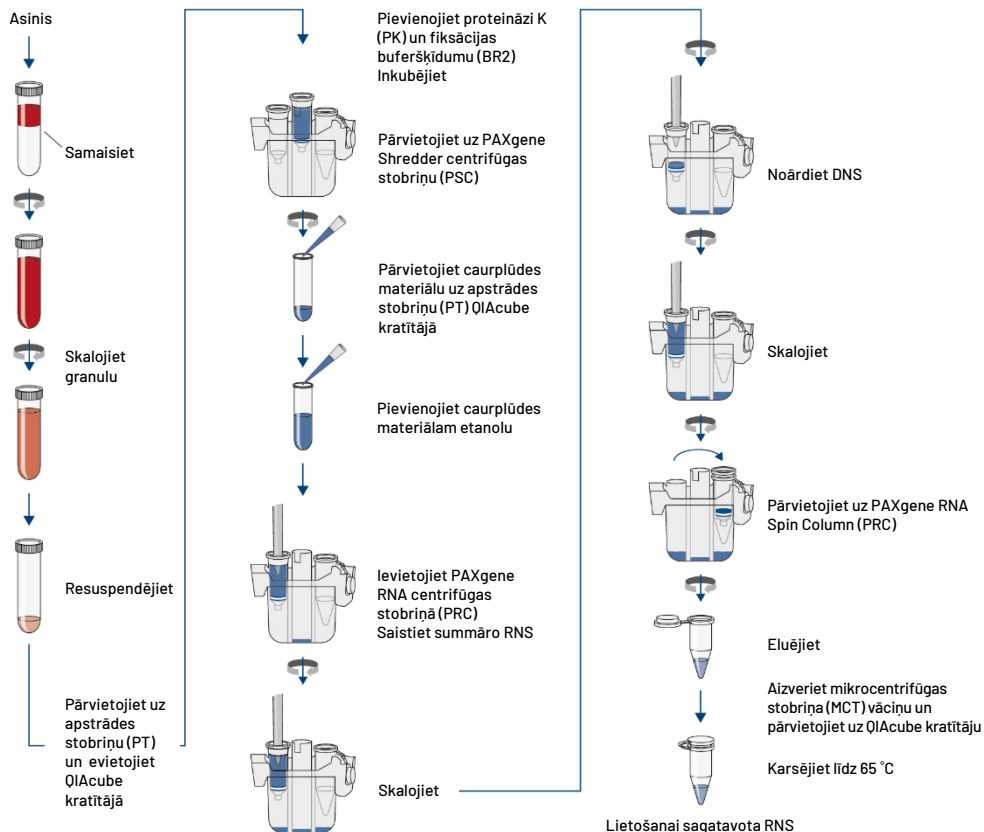


2. attēls. QIAcube Connect MDx.



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

Automatizētais RNS izolēšana protokols sastāv no 2 daļām (jeb protokoliem): "PAXgene Blood RNA Part A" (no asinīm PAXgene Blood RNA Tube stobriņā līdz eluēšanai) un "PAXgene Blood RNA Part B" (pēc eluēšanas līdz lietošanai sagatavotai RNS), un starp abām daļām ir nepieciešama neliela manuāla iejaukšanās (sk. 3. attēlu).




3. attēls. PAXgene Blood RNA automatizētā procedūra.

Centrifugētās, izskalošanās un resuspendētās nukleīnskābju granulas (sk. sadaļu "RNS izolēšana", 8. lpp.) no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT) ir jāpārnes apstrādes stobriņos (PT, processing tube), kuri tiek ievietoti termokratītāja blokā uz QIAcube Connect MDx darba plates. Operatoram izvēlnē jāatlasa un jāpalaiž protokols "PAXgene Blood RNA Part A". QIAcube Connect MDx veic protokola soļus līdz RNS eluēšanai eluēšanas buferšķīdumā (BR5). Operatoram MCT ar izdalīto RNS ir jāpārvieta uz QIAcube Connect MDx termokratītāja bloku. Operatoram izvēlnē jāatlasa un jāpalaiž protokols "PAXgene Blood RNA Part B", un QIAcube Connect MDx notiek denaturācija karstuma ietekmē. Automatizētās RNS izolēšanas veikspējas raksturojums, izmantojot PAXgene Blood RNA System sistēmu QIAcube Connect MDx ierīcē, ir redzams 54. lpp.

Nodrošinātie materiāli

Komplekta saturs

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

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Kataloga Nr.			762174
Parauga ņemšanas ierīču Nr.			50
Rokasgrāmata	PAXgene Blood RNA Kit rokasgrāmata (versija 3)		1

* Nav saderīgs ar dezinfekcijas reaģentiem, kuri satur balinātāju. Satur guanidīna sāli. Skatiet 18. lpp., sadaļu Drošības informācija.

† Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts kā koncentrāts. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet 4 daļas etanola (96–100% v/v, tīrības pakāpe p.a.), kā norādīts uz pudeles, lai iegūtu darba šķīdumu.

‡ Katrs stobriņš ir iepakots blisterī, un tas ir paredzēts tikai vienreizējai lietošanai. Lūdzu, skatiet drošības informāciju, lai uzzinātu instrukcijas par utilizēšanu.

§ Stobriņi ir pieejami plastmasas maisos, un katrs stobriņš ir paredzēts tikai vienreizējai lietošanai. Lūdzu, skatiet drošības informāciju, lai uzzinātu instrukcijas par utilizēšanu.

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

Komplekta komponenti

Komponenta nosaukums	Apraksts	Aktīvā sastāvdaļa	Koncentrācija
BR1	Resuspension Buffer (Resuspendēšanas buferšķīdums)	Nav	-
BR2	Binding Buffer (Fiksācijas buferšķīdums)	Guanidīna tiocianāts	No ≥ 30 līdz $< 50\%$ w/w
BR3	Wash Buffer 1 (Skalošanas buferšķīdums 1)	Guanidīna tiocianāts Etanols	No ≥ 10 līdz $< 20\%$ w/w No ≥ 3 līdz $< 10\%$ w/w
BR4	Wash Buffer 2 (Skalošanas buferšķīdums 2 (koncentrāts))	Nav	-
BR5	Elution Buffer (Eluēšanas buferšķīdums)	Nav	-
RNFW	RNase-Free Water (Ūdens, kas nesatur RNāzi (pudele))	Nav	-
PK	Proteinase K (Proteināze K (ar zaļu vāciņu))	Proteināze K	No ≥ 1 līdz $< 3\%$ w/w
RNFD	DNase I, RNase-free (DNāze I bez RNāzes (liofilizēta))	DNāze	No ≥ 90 līdz $\leq 100\%$ w/w
RDD	DNA Digestion Buffer (DNS noārdīšanas buferšķīdums (ar baltu vāciņu))	Nav	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (Dnāzes resuspendēšanas buferšķīdums (stobriņā, ar violetu vāciņu))	Nav	-

Nepieciešamie materiāli, kas netiek nodrošināti

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizlietojamus cimdus un aizsargbrilles. Lai iegūtu sīkāku informāciju, skatiet attiecīgajās drošības datu lapas (Safety Data Sheet, SDS), kas ir pieejamas, sazinoties ar produkta piegādātāju.

Visiem protokoliem

- PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT, PreAnalytiX; kat. nr. 762165)
- Etanols (96–100% v/v, tīrības pakāpe p.a.)
- Pipetes* (10 µl – 4 ml)
- Sterili pipetes uzgaļi bez RNāzes ar aerosola barjeru[†]
- Cilindrs ar iedaļām[‡]
- Centrifūga*, kura spēj sasniegt ātrumu 3000–5000 × g un ir aprīkota ar svārstīgo kausu rotoru, kurā var ievietot PAXgene Blood RNA Tube stobriņus (BRT)
- Virpuļmaisītājs*
- Drupināts ledus
- Ūdensnoturīgā pildspalva marķēšanai

Manuālajam protokolam

- Mikrocentrifūga* ar regulējamu ātrumu, kura spēj sasniegt vismaz ātruma diapazonu 1000–8000 × g, kaut arī ir pieļaujams mazāks vai lielāks g spēks (detalizētu informāciju sk. protokola soļu aprakstā), un ir aprīkota ar rotoru, kas paredzēts 2 ml MCT stobriņiem

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

[†] Obligāti izskatiet vadlīnijas par rīkošanos ar RNS (A pielikums 75. lpp.).

[‡] Etanola pievienošanai buferšķīduma BR4 koncentrātam.

- Kratītājs–inkubators*, kurš spēj nodrošināt inkubāciju 55 °C un 65 °C temperatūrā un kratīšanu ar ≥400 apgr./min, nepārsniedzot 1400 apgr./min (piem., Eppendorf® Thermomixer Compact vai līdzīga ierīce)

Automatizētajam protokolam

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

QIAcube Connect MDx izejmateriāli

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

QIAcube Connect MDx piederumi

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

QIAcube Connect MDx apkalpošanas komplektācijas

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

* Nodrošiniet, ka ierīce un instruments tiek regulāri pārbaudīti, uzturēti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

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

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

Klientiem Eiropas Savienībā – lūdzu, ņemiet vērā, ka par visiem nopietnajiem incidentiem, kuri ir notikuši saistībā ar ierīci, jums ir jāziņo ražotājam un kompetentajai iestādei dalībvalstī, kurā lietotājs un/vai pacients ir reģistrēts.

Klientiem ārpus Eiropas Savienības – lūdzu, ņemiet vērā, ka jums var būt pienākums iepazīties ar vietējiem noteikumiem par visu nopietno incidentu, kuri ir notikuši saistībā ar ierīci, ziņošanu ražotājam un/vai tā pilnvarotajam pārstāvim, kā arī pārvaldes iestādei valstī, kurā atrodas lietotājs un/vai pacients.

Drošības informācija

Strādājot ar ķīmiskām vielām un bioloģiski bīstamiem materiāliem, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizlietojamus cimdus un aizsargbrilles. Plašāku informāciju skatiet attiecīgajās drošības datu lapas lapās (Safety Data Sheet, SDS). Tās ērtā un kompaktā PDF formātā ir pieejamas vietnē www.qiagen.com/safety, kur var atrast, apskatīt un izdrukāt katra QIAGEN komplekta un tajā ietvertā komponenta drošības datu lapu (DDL).

- Visas ķīmiskās vielas un bioloģiskie materiāli ir potenciāli bīstami. Asinis paraugi un paraugi ir potenciāli infekciozi, un ar tiem ir jārīkojas kā ar bioloģiski bīstamiem materiāliem.
- Utilizējiet bioloģiski bīstamos atkritumus un komplekta atkritumus atbilstoši vietējām drošības procedūrām.

Ar ārkārtas situācijām saistīta informācija

CHEMTREC

Ārpus ASV un Kanādas +1 703-527-3887

Piesardzības pasākumi

Strādājot ar asinīm, ir jāievēro universālie piesardzības pasākumi, lai izvairītos no iespējamās saskares ar asins patogēniem (piem., HIV, B hepatītam un citiem ar asinīm pārnēsājamiem vīrusiem). Lietojiet cimdus, halātus, aizsargbrilles, citus individuālos aizsardzības līdzekļus un tehniskos aizsargpasākumus, lai aizsargātos pret saskari ar asinīm. Plašāku informāciju skatiet attiecīgajās drošības datu lapas lapās (Safety Data Sheet, SDS). Tās ērtā un kompaktā PDF formātā pieejamas vietnē www.preanalytix.com, kur var meklēt, apskatīt un izdrukāt šī komplekta SDS.

UZMANĪBU!



Paraugu savienošanas atkritumiem NEDRĪKST tieši pievienot balinātāju vai skābju šķīdumus.

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

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

Paraugu sagatavošanas atkritumi, piemēram, supernatanti no centrifugēšanas soļiem RNS izolēšanas procedūrā, ir jāuzskata par potenciāli infekcioziem. Bioloģisko materiālu utilizēšanai izmantojiet bioloģiski bīstamu atkritumu konteinerus. Utilizēšana ir jāveic saskaņā ar vietējiem noteikumiem un jūsu iestādes procedūrām.

Specifiski PAXgene Blood RNA Kit komplekta komponenti ir paredzēti tikai vienreizējai lietošanai. Informāciju par atsevišķiem komponentiem skatiet šeit: Komplekta saturs 14. lpp.

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

Buffer BR2



Satur: guanidīna tiocianātu. Bīstami! Kaitīgs, ja norij. Var būt kaitīgs, saskaroties ar ādu vai ieelpojot. Izraisa smagas acu traumas. Kaitīgs ūdens organismiem ar ilgstošām sekām. Saskarē ar skābēm izdalās ļoti toksiska gāze. Nepieļaujiet nokļūšanu vidē. Valkājiet aizsargcimdus, aizsargapģērbu, aizsargbrilles un sejas masku. JA IEKĻŪST ACĪS: uzmanīgi skalot ar ūdeni vairākas minūtes. Izņemt kontaktlēcas, ja tās ir ievietotas un ja to ir viegli izdarīt. Turpināt skalot. JA ir bijusi saskare vai ir aizdomas par to: Nekavējoties sazinieties ar TOKSIKOLOĢIJAS CENTRU vai ārstu/ģimenes ārstu. Izmetiet saturu/konteineru, to nododot apstiprinātai atkritumu pārstrādes rūpnīcai.

Buffer BR3



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

DNase I



Satur: DNāzi. Bīstami! Var izraisīt alerģisku ādas reakciju. Ja ieelpo, var izraisīt alerģiju vai astmas simptomus, vai apgrūtināt elpošanu. Izvairieties ieelpot putekļus. Valkājiet aizsargcimdus, aizsargapģērbu, aizsargbrilles un sejas masku. Lietot elpošanas orgānu aizsargierīces. JA ir bijusi saskare vai ir aizdomas par to: Zvanīt uz TOKSIKOLOĢIJAS CENTRU vai ārstam/ģimenes ārstam. Nogādāt cietušo svaigā gaisā un nodrošināt netraucētu elpošanu. Izmazgāt piesārņoto apģērbu pirms atkārtotas lietošanas.

Reaģentu uzglabāšana un lietošana

PAXgene RNA centrifūgas stobriņi (PRC), PAXgene Shredder centrifūgas stobriņi (PSC), proteīnāze K (PK) un buferšķīdumi (BR1, BR2, BR3, BR4 un BR5) ir jāuzglabā sausā vietā un uz komplekta etiķetes norādītajā temperatūrā.

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

Pievērsiet uzmanību derīguma termiņa datumiem un uzglabāšanas nosacījumiem, kas norādīti uz visu komponentu kastītēm un etiķetēm. Neizmantojiet nederīgus vai nepareizi uzglabātus komponentus.

Lietošanas stabilitāte

Pēc komplekta izmantošanas pirmo reizi, reaģenti ir stabili līdz komplekta kārbas etiķetē norādītajam derīguma termiņam, glabājot šajā etiķetē norādītajā temperatūrā un oriģinālajās pudelēs.

Reaģenti, kas ir iepildīti QIAcube Connect MDx reaģentu pudelēs, ir stabili 3 mēnešus, glabājot istabas temperatūrā (15–25 °C).

Pagatavotā DNāze I (RNFD) ir stabila 2–8 °C temperatūrā 6 nedēļas, glabājot oriģinālajā stikla flakonā (rezerves standartšķīdums).

Rezerves standartšķiduma vienreizlietojamās alikvotas 1,5 ml MCT stobriņos (iekļauti piegādes komplektācijā) ir stabilas 9 mēnešus, glabājot -20°C temperatūrā. Pēc atkausēšanas vienreizlietojamās alikvotas ir stabilas 6 nedēļas, glabājot $2-8^{\circ}\text{C}$ temperatūrā.

Parauga savākšana, glabāšana un lietošana

PAXgene Blood RNA Kit komplekts ir paredzēts izmantošanai ar asinīm, kas savāktas PAXgene Blood RNA Tube stobriņos. Asinis ir jāsavāc PAXgene Blood RNA Tube stobriņos (BRT), kā norādīts PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmatā. Ja nepieciešams, skatiet C pielikumu (80. lpp.), kur ir sniegti ieteikumi par darbu ar PAXgene Blood RNA Tube stobriņiem (BRT). Visi paraugi ir jāuzskata par potenciāli bīstamiem. Sistēmas PAXgene Blood RNA System veikspējas raksturojums ir noteikts ar FOS un IL1B gēnu transkriptiem, kurus var skatīt 41.–44. lpp.

Protokols: manuāla summārās RNS izolēšana no PAXgene Blood RNA Tube stobriņos savāktām cilvēka pilnasinīm

Svarīga informācija pirms darba sākšanas

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

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

- Uzmanīgi pipetējiet paraugu centrifūgas stobriņā (PSC, PRC), nesamitrinot stobriņa malu.
- Vienmēr nomainiet pipete uzgaļus starp šķidrumu pārnesšanas reizēm. Izmantojiet pipetes uzgaļus ar aerosola barjeru.
- Centieties ar pipetes galu nepieskarieties centrifūgas stobriņa (PSC, PRC) membrānai.

- Pēc MCT virpuļmaisīšanas vai sildīšanas īsi centrifugējiet to, lai noņemtu vāka iekšpusē esošos pilienus.
- Visu procedūras laiku izmantojiet aizsargcimdus. Ja cimdi saskaras ar paraugu, nekavējoties nomainiet cimdus.
- Pirms centrifūgas stobriņa (PSC, PRC) ievietošanas mikrocentrifūgā noslēdziet to. Centrifugējiet, kā norādīts procedūras aprakstā.
- Vienlaikus atveriet tikai vienu centrifūgas stobriņu (PSC, PRC) un uzmanieties, lai neradītu aerosolu.
- Lai paralēli efektīvi apstrādātu vairākus paraugus, piepildiet statīvu ar stobriņiem PT, kuros pēc centrifugēšanas var pārceļt centrifūgas stobriņus (PSC, PRC). Utilizējiet izlietotos PT, kuros ir caurplūdes materiāls, un ievietojiet centrifūgas stobriņus (PSC, PRC) jaunos PT, pirms tos pārceļat atpakaļ uz mikrocentrifūgu.



Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Asinis ir jāsavāc PAXgene Blood RNA Tube stobriņos (BRT), kā norādīts *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmatā*. Ja nepieciešams, skatiet C pielikumu (80. lpp.), kur ir sniegti ieteikumi par darbu ar PAXgene Blood RNA Tube stobriņiem (BRT).
- Nodrošiniet, ka pēc asins paraugu savākšanas PAXgene Blood RNA Tube stobriņi (BRT) tiek inkubēti istabas temperatūrā vismaz 2 h, lai nodrošinātu pilnīgu asins šūnu līzi un RNS nogulsnešanos. Inkubējot PAXgene Blood RNA Tube stobriņus (BRT) visu nakti, var palielināt iegūto daudzumu. Ja sākotnējā asins inkubēšana istabas temperatūrā 2 h netiek veikta pirms paraugu novietošanas glabāšanai 2–8 °C, -20 °C vai -70 °C temperatūrā, pirms procedūras sākšanas vispirms nogaidiet, līdz PAXgene Blood RNA Tube stobriņš (BRT) sasniedz istabas temperatūru, un pēc tam inkubējiet to šajā temperatūrā 2 h.
- Izlasiet 18. lpp. sniegto drošības informāciju.
- Izlasiet vadlīnijas par darbu ar RNS (A pielikums, 77. lpp.).

- Nodrošiniet, ka instrumenti, piemēram, pipetes un kratītājs–inkubators, regulāri tiek pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.
- Kratītājs–inkubators ir nepieciešams 5. un 20. solī. Iestatiet kratītājam–inkubatoram temperatūru uz 55 °C.
- Buferšķīdumā (BR2) glabāšanas laikā var rasties nogulsnes. Ja nepieciešams, sasildiet līdz 37 °C temperatūrai, lai tās izšķīdinātu.
- Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts kā koncentrāts. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet 4 daļas etanola (96–100% v/v, tīrības pakāpe p.a.), kā norādīts uz pudeles, lai iegūtu darba šķīdumu.
- Ja DNāzes komplektu bez RNāzes lietojat pirmo reizi, sagatavojiet DNāzes I rezerves standartšķīdumu. Izšķīdiniet cieto DNāzi I (RNFD; 1500 Kunitz vienības)* 550 µl komplektā iekļautā DNāzes resuspendēšanas buferšķīduma (DRB). Atverot flakonu, ievērojiet piesardzību, lai nezaudētu daļu DNāzes I (RNFD). Nesaskaliniet pagatavoto DNāzes I (RNFD) šķīdumu. DNāze I ir īpaši jutīga pret fizikālu denaturāciju. Maisīšana ir jāveic, flakonu tikai uzmanīgi apgriežot.
- Sagatavoto DNāzi I (RNFD) var glabāt 2–8 °C temperatūrā oriģinālajā stikla flakonā (rezerves standartšķīdums) vai –20 °C temperatūrā pēc rezerves standartšķīduma izliešanas no stikla flakona un tās sadalīšanas vienreizlietojamās alikvotās (izmantojiet piegādes komplektācijā iekļauto 1,5 ml MCT stobriņu; daudzums pietiek 5 alikvotām). Atkausētās alikvotas var glabāt 2–8 °C temperatūrā. Pēc atkausēšanas alikvotas nedrīkst atkārtoti sasaldēt.
- Sagatavojot DNāzes I (RNFD) šķīdumu un sadalot to alikvotās, obligāti ievērojiet vadlīnijas par darbu ar RNS (A pielikums 77. lpp.).


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

Procedūra

1. Centrifugējiet PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT) 10 min ar ātrumu 3000–5000 × *g*, izmantojot svārstīgo kausu rotoru.
 -  Nodrošiniet, ka asins paraugs tiek inkubēts PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) vismaz 2 h istabas temperatūrā (15–25 °C), lai sasniegtu pilnīgu asins šūnu līzi un RNS nogulsnešanos.
 -  Rotorā ir jābūt stobriņu adapteriem, kas paredzēti stobriņiem ar noapaļotu galu. Ja tiek izmantoti citu veidu stobriņu adapteri, stobriņi centrifugēšanas laikā var saplīst.
2. Noņemiet supernatantu, to nolejot vai pipetējot. Pievienojiet granulām 4 ml ūdens, kas nesatur RNāzi (RNFV), un noslēdziet stobriņu ar jaunu sekundāro BD Hemogard aizdari (iekļautas komplektā).

Ja supernatants tiek noliets, ievērojiet piesardzību, lai nepieskartos granulām, un nosusiniet stobriņa malu ar tīru papīra dvieļi.
3. Maisiet, līdz ir redzams, ka granulas ir izšķīdušas, un 10 min centrifugējiet ar ātrumu 3000–5000 × *g*, izmantojot svārstīgo kausu rotoru. Noņemiet un izmetiet visu supernatantu.

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

 -  Nepilnīga supernatanta noņemšana var kavēt līzi un izšķīdināt lizātu, tādējādi ietekmējot apstākļus, kuros RNS saistās ar PAXgene membrānu.
4. Pievienojiet 350 μl resuspendēšanas buferšķīduma (BR1) un maisiet, līdz ir redzams, ka granulas ir izšķīdušas.
5. Pipetējiet paraugu 1,5 ml MCT stobriņā. Pievienojiet 300 μl fiksācijas buferšķīduma (BR2) un 40 μl proteīnāzes K (PK). Veiciet virpuļmaisīšanu 5 s un inkubējiet 10 min 55 °C temperatūrā, izmantojot kratītāju–inkubatoru ar 400–1400 apgr./min. Pēc inkubēšanas iestatiet kratītājam–inkubatoram temperatūru uz 65 °C (20. solim).



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

6. Pipetējiet lizātu tieši PSC stobriņā (violetā krāsā), kas ievietots 2 ml PT stobriņā, un centrifugējiet 3 min ar maksimālo ātrumu (bet nepārsniedzot ātrumu 20 000 x g).



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

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



Daži paraugi bez centrifugēšanas var izplūst caur PSC. To izraisa dažu paraugu zemā viskozitāte, un tas nav uzskatāms par produkta defektu.

7. Uzmanīgi pārnesiet visu caurplūdes frakcijas virsslāni jaunā 1,5 ml MCT stobriņā, nepieskaroties granulām PT stobriņā.

8. Pievienojiet 350 µl etanola (96–100% v/v, tīrības pakāpe p.a.). Maisiet ar virpuļmaisīšanu un īsi centrifugējiet (1–2 s ar ātrumu 500–1000 x g), lai noņemtu vāka iekšpusē esošos pilienus.



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

9. Pipetējiet 700 µl paraugu PRC stobriņā (sarkanā krāsā), kas ievietots 2 ml PT stobriņā, un 1 min centrifugējiet ar ātrumu 8000–20 000 x g. Ievietojiet centrifūgas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml PT stobriņā un izmetiet veco PT stobriņu, kurā ir caurplūdes materiāls.

10. Pipetējiet atlikušo parauga daļu PRC stobriņā un 1 min centrifugējiet ātrumu 8000–20 000 x g. Ievietojiet centrifūgas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml PT stobriņā un izmetiet veco PT stobriņu, kurā ir caurplūdes materiāls.



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

11. Pipetējiet 350 µl skalošanas buferšķīduma 1 (BR3) PRC stobriņā. Centrifugējiet 1 min ar ātrumu 8000–20 000 x g. Ievietojiet centrifūgas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml PT stobriņā un izmetiet veco PT stobriņu, kurā ir caurplūdes materiāls.
12. Pievienojiet 10 µl DNāzes I (RNFD) rezerves standartšķīduma 70 µl DNS noārdīšanas buferšķīdumam (RDD) 1,5 ml MCT stobriņā. Samaisiet, maigi uzsitot pa stobriņu, un īsi centrifugējiet, lai savāktu atlikušo šķīdumu no stobriņa malām.

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



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

13. Pipetējiet DNāzes I (RNFD) inkubācijas maisījumu (80 µl) tieši uz PRC membrānas un uz atstājiet 15 min uz galda (20–30 °C temperatūrā).



Nodrošiniet, ka DNāzes I (RNFD) inkubācijas maisījums tiek uzlikts tieši uz membrānas. Ja daļa maisījuma tiek uzlikta un paliek uz centrifūgas stobriņa (PRC) sienīņām vai gredzenblīves, DNāzes noārdīšanās notiek nepilnīgi.

14. Pipetējiet 350 µl skalošanas buferšķīduma 1 (BR3) PRC stobriņā un 1 min centrifugējiet ar ātrumu 8000–20 000 x g. Ievietojiet centrifūgas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml PT stobriņā un izmetiet veco PT stobriņu, kurā ir caurplūdes materiāls.
15. Pipetējiet 500 µl skalošanas buferšķīduma 2 (BR4) PRC stobriņā un 1 min centrifugējiet ar ātrumu 8000–20 000 x g. Ievietojiet centrifūgas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml PT stobriņā un izmetiet veco PT stobriņu, kurā ir caurplūdes materiāls.



Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts kā koncentrāts. Nodrošiniet, ka pirms lietošanas skalošanas buferšķīdumam 2 (BR4) tiek pievienots etanols (sk. sadaļu "Pirms darba sākšanas veicamās darbības", 25. lpp.).

16. Pievienojiet vēl 500 µl skalošanas buferšķīduma 2 (BR4) PRC stobriņā. Centrifugējiet 3 min ar ātrumu 8000–20 000 x g.

17. Izmetiet PT stobriņu, kurā ir caurplūdes materiāls, un ievietojiet PRC stobriņu jaunā 2 ml PT stobriņā. Centrifugējiet 1 min ar ātrumu $8000-20\,000 \times g$.
18. Izmetiet PT, kurā ir caurplūdes materiāls. Ievietojiet PRC stobriņu 1,5 ml MCT stobriņā un pipetējiet 40 μ l eluēšanas buferšķīduma (BR5) tieši uz PRC membrānas. Centrifugējiet 1 min ar ātrumu $8000-20\,000 \times g$, lai eluētu RNS. Ir svarīgi visu membrānu samitrināt ar eluēšanas buferšķīdumu (BR5), lai panāktu maksimālu eluēšanas efektivitāti.
19. Atkārtojiet eluēšanas soli (18. soli), kā aprakstīts, izmantojot 40 μ l eluēšanas buferšķīduma (BR5) un to pašu MCT stobriņu.
20. Inkubējiet eluātu 5 min $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā kratītājā–inkubatorā (no 5. soļa) bez kratīšanas. Pēc inkubēšanas nekavējoties atdzesējiet uz ledus.



Šādi paraugus inkubējot $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā, RNS tiek denaturēta pakārtotajiem lietojumiem. Neizlaidiet šo soli pat, ja pakārtotajā lietojumā ir paredzēta denaturācija karstuma ietekmē. Pietiekama RNS denaturācija šajā posmā ir būtiski svarīga, lai pakārtotajos lietojumos nodrošinātu maksimālu efektivitāti.

Nepārsniedziet inkubācijas laiku un temperatūru.

21. Ja RNS paraugus nav paredzēts izmantot uzreiz, glabājiet tos $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vai $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā.

Pēc atkārtotas sasaldēšanas un atkausēšanas RNS paliek denaturēta, tāpēc inkubēšanu $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā nav nepieciešams atkārtot. Ja RNS paraugus izmantojat diagnostikas analīzei, izpildiet ražotāja sniegtās instrukcijas.

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

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai iegūtu sīkāku informāciju, skatiet attiecīgajās drošības datu lapas (Safety Data Sheet, SDS), kas ir pieejamas, sazinoties ar produkta piegādātāju.

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



Kvantitatīvai noteikšanai Tris HCl buferšķīdumā izmantojiet sakarību $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Sk. B pielikumu 78. lpp.

22. Atkal aizveriet visas pudeles, kurās ir buferšķīdumi un RNāzi nesaturošs ūdens, flakonus un stobriņus, kuros ir enzīmi un enzīmu buferšķīdumi, un maisus, kuros ir plastmasas materiāli no protokolā izmantotā komplekta. Komplekta atlikušo saturu novietojiet glabāšanai, kā aprakstīts sadaļā "Reāģentu uzglabāšana un lietošana" (22. lpp.) un "Lietošanas stabilitāte" (22. lpp.) līdz turpmākai lietošanai.

Protokols: automatizēta summārās RNS izolēšana no PAXgene Blood RNA Tube stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinīm

Svarīga informācija pirms darba sākšanas

- Pārlicinieties, vai komplekta kārba ir vesela un bez bojājumiem, un vai buferšķīdumiem nav radusies noplūde. Nelietojiet komplektu, ja tas ir bojāts.
- Izmantojot pipeti, pārbaudiet, vai tai ir iestatīts pareizais tilpums un ka šķidrums tiek rūpīgi un pilnībā aspirēts un dozēts.
- Lai novērstu paraugu ievietošanu nepareizajos stobriņos vai plastmasas palīgmateriālos, pārbaudiet, vai visi PT, MCT stobriņi un rotoru adapteri ir atbilstoši marķēti, izmantojot ūdensnoturīgo pildspalvu. Marķējiet katra MCT stobriņa vāciņu un korpusu, katra PT stobriņa korpusu un katra rotora adaptera ārējo sienu.
- Paraugu un buferšķīdumu izšķīdināšanās procedūras laikā var samazināt iegūtās RNS daudzumu un tās tīrību.
- Ja vien nav norādīts citādi, visi šī protokola soļi, ieskaitot centrifugēšanas soļus, ir jāveic istabas temperatūrā (15–25 °C).

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

- Uzmanīgi pipetējiet paraugu PT stobriņa apakšdaļā, nesamitrinot stobriņa malu.
- Vienmēr nomainiet pipete uzgaļus starp šķidrumu pārnesšanas reizēm. Izmantojiet pipetes uzgaļus ar aerosola barjeru.
- Centieties ar pipetes galu nepieskarities centrifūgas stobriņa (PSC, PRC) membrānai.

- Pēc MCT virpuļmaisīšanas vai sildīšanas īsi centrifugējiet to, lai noņemtu vāka iekšpusē esošos pilienus.
- Visu procedūras laiku izmantojiet aizsargcimdus. Ja cimdi saskaras ar paraugu, nekavējoties nomainiet cimdus.

Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Asinis ir jāsavāc PAXgene Blood RNA Tube stobriņos (BRT), kā norādīts *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmatā*. Ja nepieciešams, skatiet C pielikumu (80. lpp.), kur ir sniegti ieteikumi par darbu ar PAXgene Blood RNA Tube stobriņiem (BRT).
- Nodrošiniet, ka pēc asins paraugu savākšanas PAXgene Blood RNA Tube stobriņi (BRT) tiek inkubēti istabas temperatūrā vismaz 2 h, lai nodrošinātu pilnīgu asins šūnu līzi un RNS nogulsņēšanas. Inkubējot PAXgene Blood RNA Tube stobriņus (BRT) visu nakti, var palielināt iegūto daudzumu. Ja PAXgene Blood RNA Tube stobriņš (BRT) pēc asins paņemšanas ir glabāts 2–8 °C, –20 °C vai –70 °C temperatūrā, pirms procedūras sākšanas vispirms nogaidiet, līdz tas sasniedz istabas temperatūru, un pēc tam glabājiet to istabas temperatūrā 2 h.
- Izlasiet 18. lpp. sniegto drošības informāciju.
- Izlasiet sadaļu “Svarīgas piezīmes”, 58. lpp.
- Izlasiet vadlīnijas par darbu ar RNS (A pielikums, 77. lpp.).
- Izlasiet atbilstošā QIAcube Connect MDx lietotāja rokasgrāmatu un visu instrumenta komplektācijā iekļauto papildinformāciju, īpašu uzmanību pievēršot drošības informācijai.
- Nodrošiniet, ka ierīces un instrumenti, piemēram, pipetes un QIAcube Connect MDx, regulāri tiek pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.
- Buferšķīdumā (BR2) glabāšanas laikā var rasties nogulsnes. Ja nepieciešams, sasildiet līdz 37 °C temperatūrai, lai tās izšķīdinātu.
- Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts kā koncentrāts. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet atbilstošo tilpumu etanola (96–100% v/v, tīrības pakāpe p.a.), kā norādīts uz pudeles, lai iegūtu darba šķīdumu.

- Ja DNāzes komplektu bez RNāzes lietojat pirmo reizi, sagatavojiet DNāzes I rezerves standartšķīdumu. Izšķīdiniet cieto DNāzi I (RNFD; 1500 Kunitz vienības)* 550 µl komplektā iekļautā DNāzes resuspendēšanas buferšķīduma (DRB). Atverot flakonu, ievērojiet piesardzību, lai nezaudētu daļu DNāzes I (RNFD). Nesaskalīniet pagatavoto DNāzes I (RNFD) šķīdumu. DNāze I ir īpaši jutīga pret fizikālu denaturāciju. Maisīšana ir jāveic, flakonu tikai uzmanīgi apgriežot.
- Sagatavoto DNāzi I (RNFD) var glabāt 2–8 °C temperatūrā oriģinālajā stikla flakonā (rezerves standartšķīdums) vai –20 °C temperatūrā pēc rezerves standartšķīduma izliešanas no stikla flakona un tās sadalīšanas vienreizlietojamās alikvotās (izmantojiet piegādes komplektācijā iekļauto 1,5 ml MCT stobriņu; daudzums pietiek 5 alikvotām). Atkausētās alikvotas var glabāt 2–8 °C temperatūrā. Pēc atkausēšanas alikvotas nedrīkst atkārtoti sasaldēt.
- Sagatavojot DNāzes I (RNFD) šķīdumu un sadalot to alikvotās, obligāti ievērojiet vadlīnijas par darbu ar RNS (A pielikums 77. lpp.).
- Uzstādiet atbilstošo kratītāja adapteri (iekļauts QIAcube Connect MDx komplektācijā; izmantojiet adapteri 2 ml droši noslēdzamiem stobriņiem, kas marķēti ar ciparu “2”) un uzlieciet kratītāja statīvu uz adaptera.
- Pārbaudiet atkritumu nodalījumu un, ja nepieciešams, iztukšojiet to.
- Instalējiet visus saistītos protokolus, ja tas vēl nav paveikts iepriekšējās izpildes reizēs. QIAcube Connect MDx instrumentam ir nepieciešams, lai visi protokoli atrastos saistītajā .zip failā, ko paredzēts lejupielādēt. Sk. sadaļu “Protokolu instalēšana QIAcube Connect MDx instrumentā”, 60. lpp.

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

Procedūra

1. Aizveriet QIAcube Connect MDx pārsegu un ieslēdziet instrumentu ar barošanas slēdzi (sk. 15. attēlu 59. lpp.).

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

2. Atveriet QIAcube Connect MDx pārsegu un ievietojiet nepieciešamos reaģentus un plastmasas piederumus. Sk. sadaļu "QIAcube Connect MDx instrumenta uzpildīšana", 61. lpp.

Lai taupītu laiku, uzpildi var veikt vienas vai abu 10 min ilgo centrifugēšanas soļu laikā (3. un 5. solis).

3. Centrifugējiet PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT) 10 min ar ātrumu 3000–5000 × g, izmantojot svārstīgo kausu rotoru.



Nodrošiniet, ka asins paraugs tiek inkubēts PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) vismaz 2 h istabas temperatūrā (15–25 °C), lai sasniegtu pilnīgu asins šūnu līzi un RNS nogulsnešanos.



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

4. Noņemiet supernatantu, to nolejot vai pipetējot. Ja supernatants tiek noliets, ievērojiet piesardzību, lai nepieskartos granulām, un nosusiniet stobriņa malu ar tīru papīra dvieļi. Pievienojiet granulām 4 ml ūdens, kas nesatur RNāzi (RNFW), un noslēdziet stobriņu ar jaunu sekundāro BD Hemogard aizdari (iekļautas komplektā).

5. Maisiet, līdz ir redzams, ka granulas ir izšķīdušas, un 10 min centrifugējiet ar ātrumu 3000–5000 × g, izmantojot svārstīgo kausu rotoru. Noņemiet un izmetiet visu supernatantu.

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



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

6. Pievienojiet 350 µl resuspendēšanas buferšķīduma (BR1) un maisiet, līdz ir redzams, ka granulas ir izšķīdušas.

7. Pipetējiet paraugu 2 ml PT stobriņā.



Izmantojiet PAXgene Blood RNA Kit komplektā iekļautos 2 ml PTI stobriņus.

8. Stobriņus PT, kuros ir paraugs, ievietojiet QIAcube Connect MDx kratītājā (sk. 18. attēlu 63. lpp.). Lai atvieglotu ievietošanu, paraugu pozīcijas ir numurētas. Ievietojiet kratītāja statīva aizbāžņus (iekļauti QIAcube Connect MDx komplektācijā) slotos, kas atrodas kratītājs statīva malā blakus katram PT. Tādējādi ielādes pārbaudes laikā varēs noteikt paraugus.



Pārliedcinieties, vai ir uzstādīts atbilstošais kratītāja adapteris (kratītāja adapteris, 2 ml, droši noslēdzami stobriņi, kas marķēti ar ciparu "2"; iekļauti QIAcube Connect MDx komplektācijā).



Ja apstrādājat mazāk nekā 12 paraugus, kratītāja statīvs noteikti ir jāaizpilda, kā parādīts 22. attēlā, 67. lpp. Vienu (1) paraugu vai 11 paraugus apstrādāt nevar. Kratītāja statīva pozīciju numuri atbilst pozīciju numuriem centrifūgā.

9. Aizveriet QIAcube Connect MDx pārsegu (sk. 15. attēlu 59. lpp.).

10. Atlasiet protokolu "PAXgene Blood RNA Part A" un startējiet šo protokolu.

Izpildiet QIAcube Connect MDx skārienekrānā rādītās instrukcijas.



Nodrošiniet, ka QIAcube Connect MDx instrumentā ir instalētas abas programmas daļas (A daļa un B daļa) (sk. sadaļu "Protokolu instalēšana QIAcube Connect MDx instrumentā", 60. lpp.).



Instrumentu veic uzpildes pārbaudes attiecībā uz paraugiem, uzgaļiem, rotora adapteriem un reaģentu pudelēm.

11. Kad protokola "PAXgene Blood RNA Part A" izpilde ir pabeigta, atveriet QIAcube Connect MDx pārsegu (sk. 15. attēlu 59. lpp.). Izņemiet PRC stobriņus no rotora adapteriem un tukšos stobriņus PT no kratītāja un izmetiet tos.



Izpildes laikā instruments centrifūgas stobriņus no rotora adaptera pozīcijas 1 (vāciņa pozīcija L1) pārvietoto uz rotora adaptera pozīciju 3 (vāciņa pozīcija L2) (sk. 20. attēlu 65. lpp.).

12. Aizveriet vāciņus visiem 1,5 ml MCT stobriņiem ar izdalīto RNS rotora adapteros (pozīcija 3, vāciņa pozīcija L3, sk. 20. attēlu 65. lpp.). Pārvietojiet 1,5 ml MCT stobriņus uz QIAcube Connect MDx kratītāja adapterī (sk. 18. attēlu 63. lpp.).

13. Aizveriet QIAcube Connect MDx pārsegu (sk. 15. attēlu 59. lpp.).

14. Atlasiet protokolu "PAXgene Blood RNA Part B" un startējiet šo protokolu.

Izpildiet QIAcube Connect MDx skārienekrānā rādītās instrukcijas.



Šī programma inkubē paraugus 65 °C temperatūrā un denaturē RNS pakārtotajiem lietojumiem. Neizlaidiet šo soli pat, ja pakārtotajā lietojumā ir paredzēta denaturācija karstuma ietekmē. Pietiekama RNS denaturācija šajā posmā ir būtiski svarīga, lai pakārtotajos lietojumos nodrošinātu maksimālu efektivitāti.

15. Kad programma "PAXgene Blood RNA Part B" ir pabeigta, atveriet QIAcube Connect MDx pārsegu (sk. 15. attēlu 59. lpp.). Izdalīto RNS saturošos MCT stobriņus nekavējoties novietojiet uz ledus.



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



Izdalīto RNS nedrīkst atstāt QIAcube Connect MDx instrumentā. Tā kā paraugi netiek atdzesēti, izdalītā RNS var noārdīties. Tāpēc nav ieteicams veikt paraugu sagatavošanas izpildes nakti bez uzraudzības.

16. Ja RNS paraugus nav paredzēts izmantot uzreiz, glabājiet tos -20 °C vai -70 °C temperatūrā.

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

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

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



Kvantifikācijai Tris-HCl buferšķīdumā izmantojiet šādu sakarību:

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Sk. B pielikumu 78. lpp.

17. Izņemiet reaģentu pudeļu statīvu no QIAcube Connect MDx instrumenta plates (sk. 18. attēlu 63. lpp.), un aizveriet visas reaģentu pudeles ar atbilstoši marķētajiem vāciņiem. Atkal aizveriet visas pudeles, kurās ir buferšķīdumi un RNāzi nesaturošs ūdens, flakonus un stobriņus, kuros ir enzīmi un enzīmu buferšķīdumi, un maisus, kuros ir plastmasas materiāli no protokolā izmantotā komplekta. Komplekta atlikušo saturu un reaģentu pudeles novietojiet glabāšanai, kā aprakstīts sadaļā "Reaģentu uzglabāšana un lietošana" (22. lpp.) un "Lietošanas stabilitāte" (22. lpp.) līdz turpmākai lietošanai.

Izņemiet reaģentus, kas QIAcube Connect MDx MCT slotos atlikuši stobriņos PT, un izmetiet tos. Izņemiet rotora adapterus no centrifūgas un izmetiet tos. Iztukšojiet QIAcube Connect MDx atkritumu atvilktni (sk. 15. attēlu 59. lpp.). Aizveriet instrumenta pārsegu un izslēdziet instrumentu ar barošanas slēdzi.

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizlietojamus cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu iegūtu sīkāku informāciju, skatiet attiecīgās drošības datu lapas (Safety Data Sheet, SDS), kas ir pieejamas, sazinoties ar produkta piegādātāju.

Produkta lietošanas ierobežojumi

PAXgene Blood RNA Kit komplekts ir paredzēts intracelulārās RNS izolēšanai no cilvēka pilnasinīm ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leikocīti/ml) in vitro diagnostikas procedūrās. Tas nav paredzēts genomiskas DNS vai vīrusu nukleīnskābju izolēšanai no cilvēka pilnasinīm. Stabilizācijas specififikācijām ir validēts ierobežots skaits transkriptu (FOS un IL1B gēnu transkripti), tāpēc veikspējas raksturojums nav noteikts visiem transkriptiem. Lietotājiem ir jāpārskata ražotāja dati un pašu iegūtie dati, lai noteiktu, vai ir jāveic validēšana citiem transkriptiem. Komplekta komponentus ir paredzēts lietot tikai veidā, kā aprakstīts rokasgrāmatā un šajās lietošanas instrukcijās aprakstītajā automatizētajā protokolā.

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

Kvalitātes kontrole

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

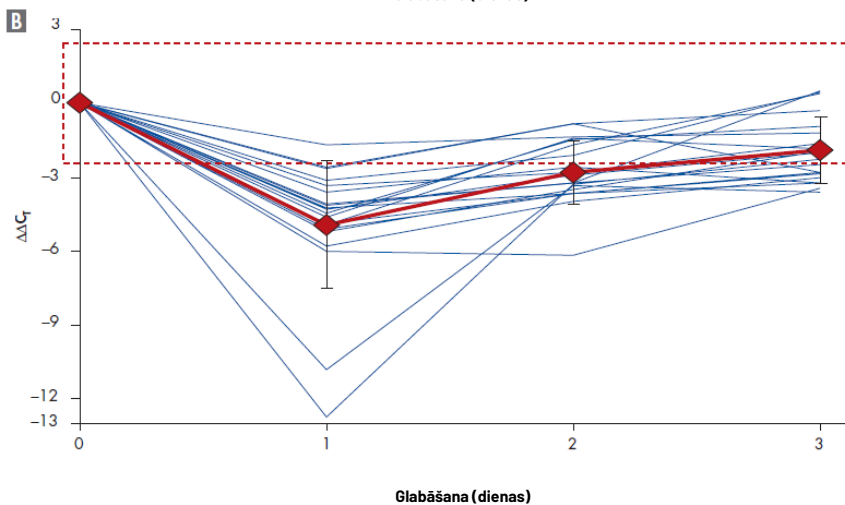
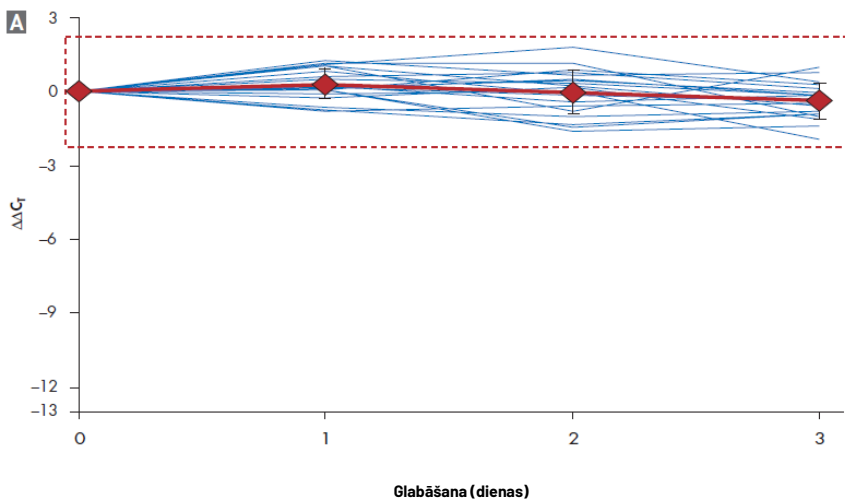
Veiktspējas raksturojums

Paraugu savākšana un stabilizēšana

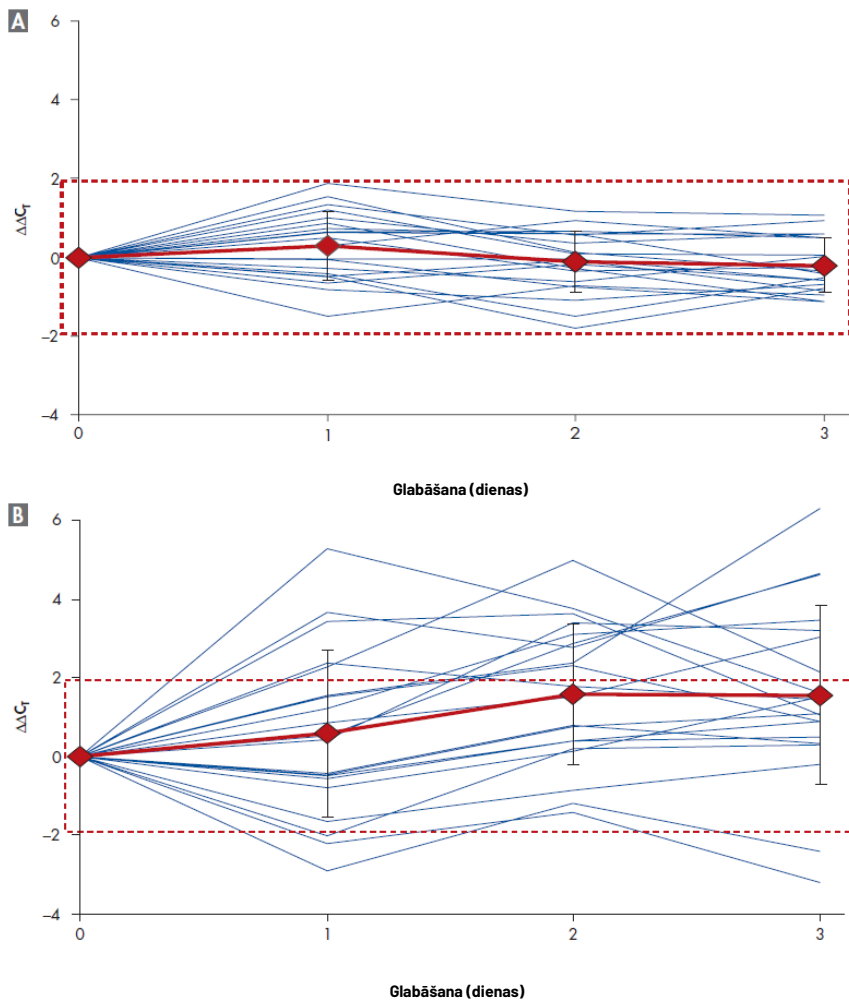
PAXgene Blood RNA Tube stobriņi (BRT) satur patentētu RNS stabilizēšanas reaģentu. Šī piedeva aizsargā RNS molekulas pret RNāžu izraisītu noārdīšanos un minimizē ex vivo izmaiņas gēnu ekspresijā. PAXgene Blood RNA Tube stobriņi (BRT) ir paredzēti cilvēka pilnasiņu vākšanai un šūnu RNS stabilizēšanai maks. 3 dienas 18–25 °C temperatūrā (4. attēls un 5. attēls attiecīgi 41. un 42. lpp.) vai maks 5 dienas 2–8 °C temperatūrā (6. attēls un 7. attēls 43. un 44. lpp.). Turklāt stabilizētās asinis var glabāt sasaldētā veidā. Pašlaik pieejamie dati uzrāda šūnu RNS stabilizāciju vismaz 11 gadus –20 °C vai –70 °C temperatūrā*. Lai iegūtu sīkāku informāciju par notiekošajiem pētījumiem, kuros tiek novērtēta stabilitāte ilgstošos laika periodos, apmeklējiet vietni **www.preanalytix.com** vai sazinieties ar QIAGEN tehniskā atbalsta dienestu.

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

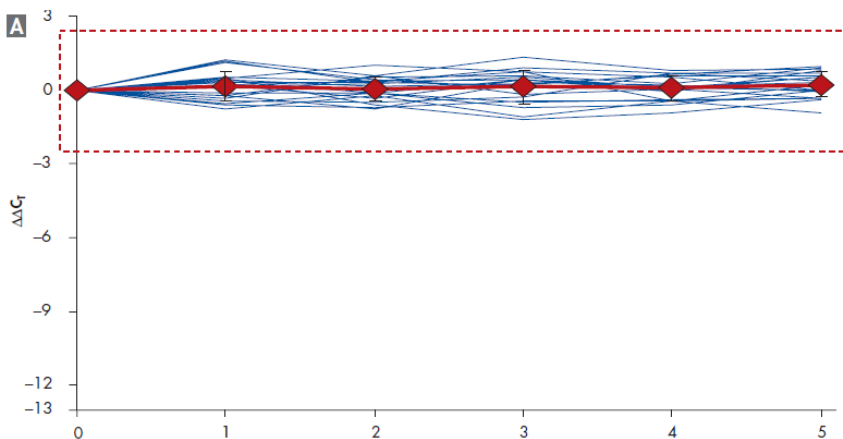
* Pašlaik turpinās ilgtermiņa pētījums par asiņu glabāšanu PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos.



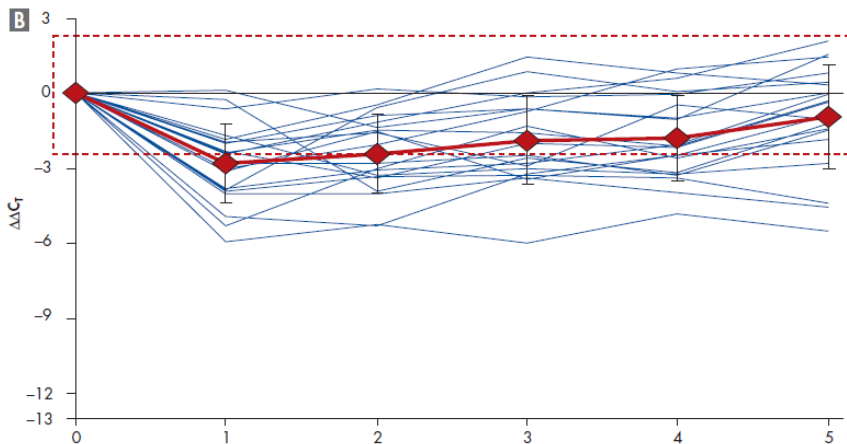
4. attēls. RNS stabilitāte asins paraugos 18–25 °C temperatūrā: FOS. Asinis tika ņemtas no 10 šķietami veseliem donoriem, no katra paņemot divus parauga eksemplārus, un tika glabātas 18–25 °C temperatūrā norādīto dienu skaitu; pēc tam tika veikta summārās RNS izolēšana. **[A]** Asinis tika paņemtas un uzglabātas PAXgene Blood RNA Tube stobriņos (BRT), un summārā RNS tika izdalīta, izmantojot PAXgene Blood RNA Kit komplektu. **[B]** Asinis tika paņemtas un uzglabātas standarta asins paraugu ņemšanas stobriņos, kā antiokagulantu izmantojot EDTA, un summārā RNS tika izdalīta, izmantojot standarta organiskās izolēšanas metodi, kuras pamatā ir RNS attīrīšana ar kvarca membrānu. Relatīvie FOS transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības, un ir parādītas visu paraugu vidējās vērtības un standartnovirzes. Pārtrauktās līnijas norāda analīzes $\pm 3 \times$ kopējo precizitāti ($2,34 C_T$).



5. attēls. RNS stabilitāte asins paraugos 18–25 °C temperatūrā: IL1B. Asinis tika ņemtas un summārā RNS tika izdalīta pēc glabāšanas 18–25 °C temperatūrā, kā aprakstīts 4. attēlā. Relatīvie IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības, un ir parādītas visu paraugu vidējās vērtības un standartnovirzes. Pārtrauktās līnijas norāda analīzes $\pm 3\times$ kopējo precizitāti ($1,93 C_T$).

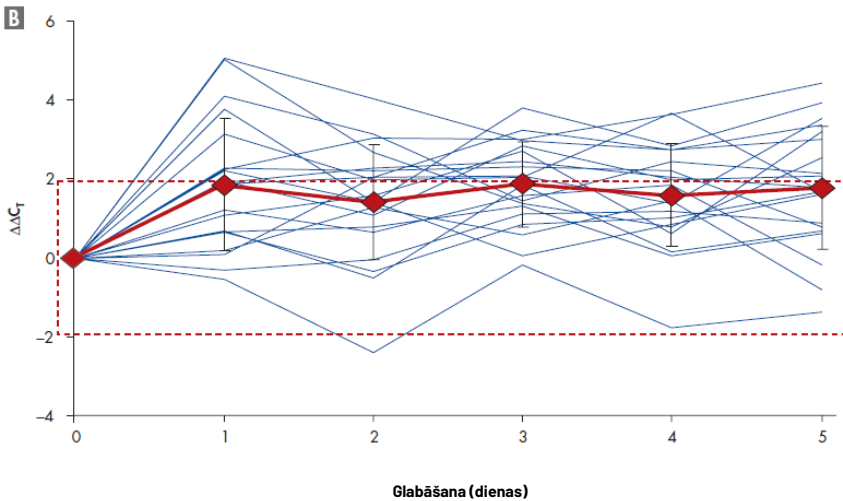
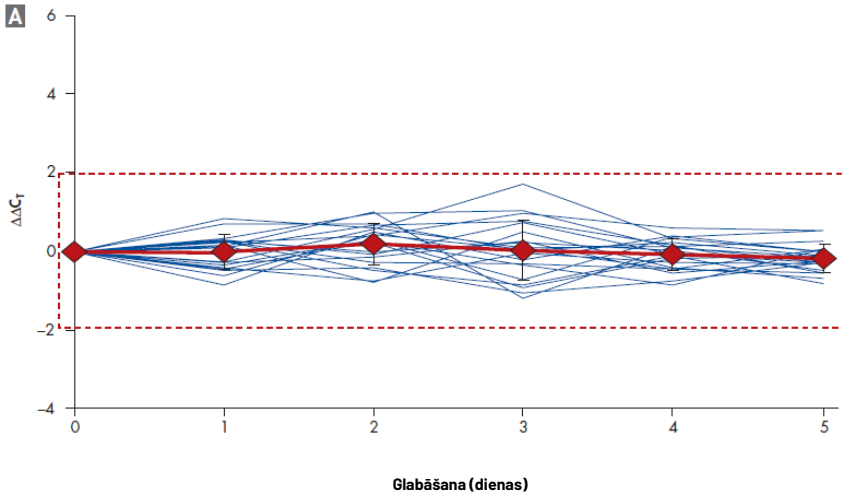


Glabāšana (dienas)



Glabāšana (dienas)

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



7. attēls. RNS stabilitāte asins paraugos 2–8 °C temperatūrā: IL1B. Asinis tika ņemtas un summārā RNS tika izdalīta pēc glabāšanas 2–8 °C temperatūrā, kā aprakstīts 6. attēlā. Relatīvie IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reāla laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības, un ir parādītas visu paraugu vidējās vērtības un standartnovirzes. Pārtrauktās līnijas norāda analīzes $\pm 3\times$ kopējo precizitāti ($1,93 C_T$).

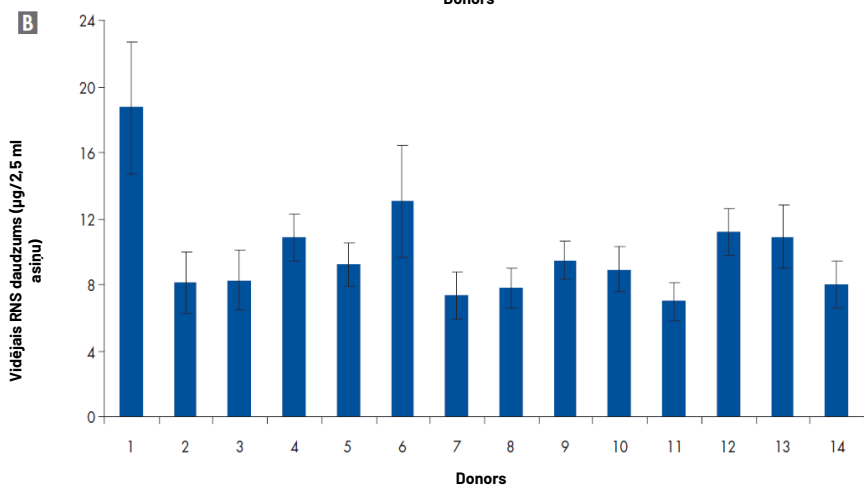
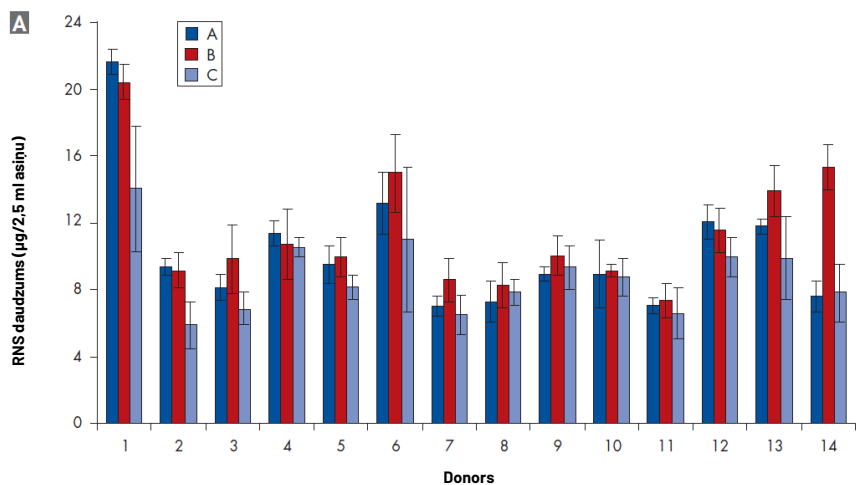
Manuāla RNS izolēšana

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

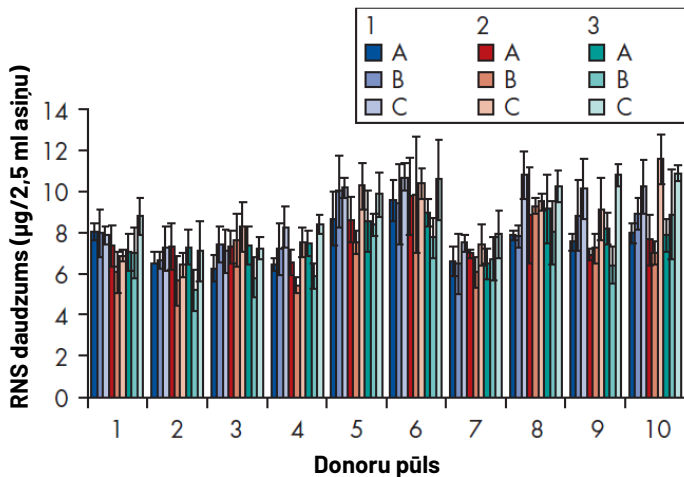
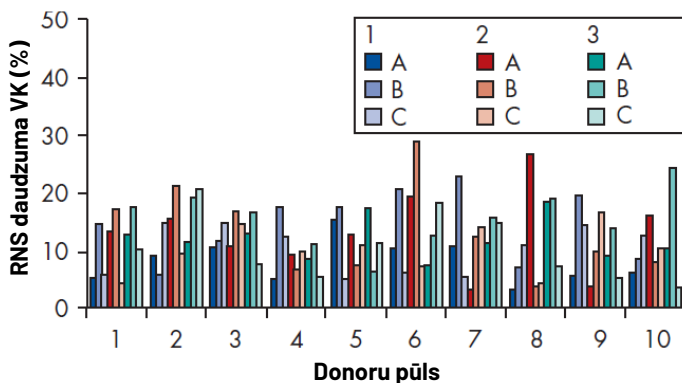
Izmantojot manuālo protokolu, vidējais parauga sagatavošanas laiks (balstoties uz datiem no 12 paraugu sagatavošanas izpildēm) ir aptuveni 90 min*, un praktiskā darba laiks ir tikai 40 min. Iegūtais RNS daudzums no 2,5 ml vesela cilvēka pilnasiņu $\geq 95\%$ apstrādāto paraugu ir ≥ 3 μg . Iegūtais daudzums ir lielā mērā atkarīgs no donora, tāpēc daudzums katrā atsevišķā gadījumā var atšķirties. Atsevišķiem donoriem PAXgene Blood RNA System nodrošina augsti reproducējamu un atkārtojamu iegūto daudzumu (8. attēls un 9. attēls, attiecīgi 46. un 47. lpp.) un reproducējamu un atkārtojamu RT-PCR (10. attēls un 11. attēls, attiecīgi 52. un 53. lpp.), padarot to par ļoti noturīgu klīniskiem diagnostiskiem izmeklējumiem.

8. attēlā (46. lpp.) ir parādīta PAXgene Blood RNA System sistēmas vispārējā atkārtojamība un reproducējamība. Tika veikti papildu pētījumi, lai parādītu dažādu PAXgene Blood RNA Kit komplekta partiju un dažādu operatoru ietekmi uz iegūtā RNS daudzuma un real time RT-PCR veikspējas reproducējamību. Šiem pētījumiem tika izmantoti apkopoti asins paraugi, nevis atsevišķi PAXgene Blood RNA Tube stobriņi (BRT), tāpēc rezultāti neatspoguļo sistēmas atkārtojamību, ieskaitot svārstības starp atsevišķām asins paraugu ņemšanas reizēm, bet gan tikai paraugu sagatavošanas atkārtojamību (sk. 9. attēlu 47. lpp.).

* Kopējais protokola izpildlaiks, ieskaitot faktisko darbu ar PAXgene Blood RNA Tube stobriņiem (centrifugēšana, granulu skalošana un granulu resuspendēšana).



8. attēls. Reproducējama un atkārtojama RNS izolēšana. No 14 donoriem iegūti asins paraugi četros eksemplāros katru manuāli apstrādāja 3 tehnikā (A, B, C). Tika izmantoti trīs aprīkojuma komplekti, un visi viena tehnikā sagatavotie paraugi tika apstrādāti, izmantojot vienu un to pašu aprīkojumu. [A] Parādītas iegūtās RNS daudzuma vidējās vērtības un standartnovirze katram atkārtotajam paraugam no vieniem un tiem pašiem donoriem un atšķirīgiem tehniķiem. [B] Katra no 14 donoriem paņemtā asins parauga divpadsmit atkārtojumus apstrādāja 3 dažādi tehniķi. Parādītas RNS daudzuma vidējās vērtības un standartnovirze katram paraugam no vieniem un tiem pašiem donoriem un visiem tehniķiem. Visiem RNS paraugiem A_{280}/A_{280} attiecība bija no 1,8 līdz 2,2.

A**B**

9. attēls. Iegūtā RNS daudzums atkārtojamība un reproducējamība atšķirīgiem operatoriem un komplekta PAXgene Blood RNA Kit partijām, izmantojot apkopotus asins paraugus. PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) tika paņemti asins paraugi no 30 dažādiem donoriem (12 stobriņi katram donoram, kopā 360 stobriņi). Stobriņu saturs no 3 donoriem tika apkopots un pēc tam atkārtoti sadalīts alikvotos 36 paraugos. Šos 36 paraugus no 3 donoru kopparauga manuāli apstrādāja 3 dažādi operatori. Katrs operators RNS izolēšanai izmantoja 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas un apstrādāja četrus paraugu eksemplārus no katra no 10 donoru kopparaugiem. [A] RNS iegūtais daudzums un standartnovirze katrai operatora–partijas kombinācijai. Četrus asins paraugu eksemplārus no 10 donoru kopparaugiem apstrādāja 3 dažādi operatori (A, B, C) ar katru no 3 komplekta partijām (1, 2, 3). Parādītas iegūtā daudzuma vidējās vērtības (kolonnas) un standartnovirze (klūdu stabiņi) četriem paraugu eksemplāriem no viena un tā paša donoru kopparauga dažādiem operatoriem un dažādām komplekta partijām. [B] Iegūtā RNS daudzuma variācijas koeficients (VK) katram donoru kopparaugam visām operatora–partijas kombinācijām (A, B, C; 1, 2, 3), aprēķinot pēc iegūtā daudzuma vidējās vērtības un standartnovirzes (SN), ir norādīts 9.A. attēlā.

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

Datu kombinācija	Donoru kopparaugs 1 ($5,1 \times 10^6$ šūnas/ml)			Donoru kopparaugs 6 ($6,5 \times 10^6$ šūnas/ml)		
	Vidējais iegūtais daudzums (μg)	SN (μg)	VK (%)	Vidējais iegūtais daudzums (μg)	SN (μg)	VK (%)
Partija 1, lietotājs A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Partija 1, lietotājs B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Partija 1, lietotājs C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Partija 2, lietotājs A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Partija 2, lietotājs B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Partija 2, lietotājs C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Partija 3, lietotājs A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Partija 3, lietotājs B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Partija 3, lietotājs C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18

Datu kombinācija	Donoru kopparaugs 9 ($8,4 \times 10^6$ šūnas/ml)			Donoru kopparaugs 10 ($10,2 \times 10^6$ šūnas/ml)		
	Vidējais iegūtais daudzums (μg)	SN (μg)	VK (%)	Vidējais iegūtais daudzums (μg)	SN (μg)	VK (%)
Partija 1, lietotājs A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Partija 1, lietotājs B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Partija 1, lietotājs C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Partija 2, lietotājs A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Partija 2, lietotājs B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Partija 2, lietotājs C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Partija 3, lietotājs A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Partija 3, lietotājs B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Partija 3, lietotājs C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

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

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

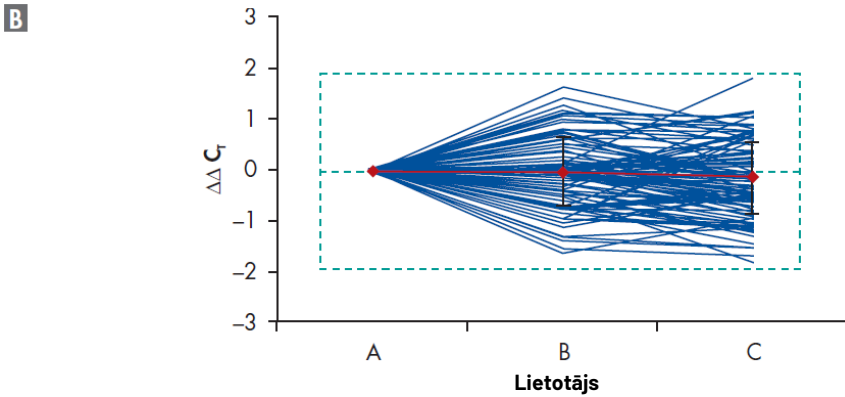
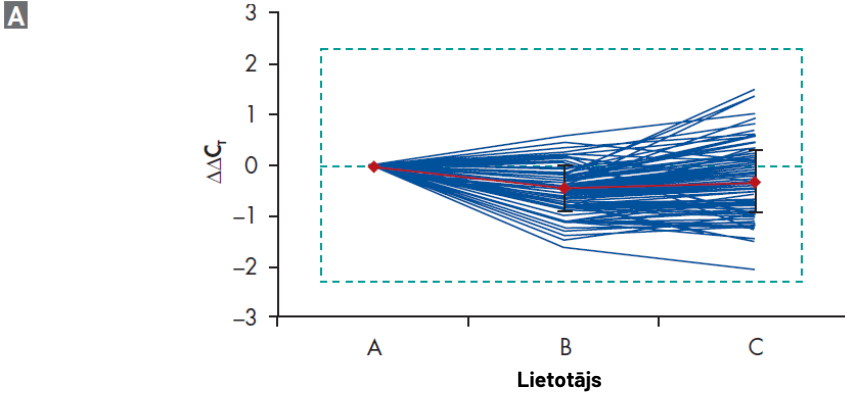
Tabula 1C. Reproducējamība katras partijas ietvaros un starp visiem lietotājiem izvēlētajos donoru kopparaugos (1, 6, 9, 10)

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

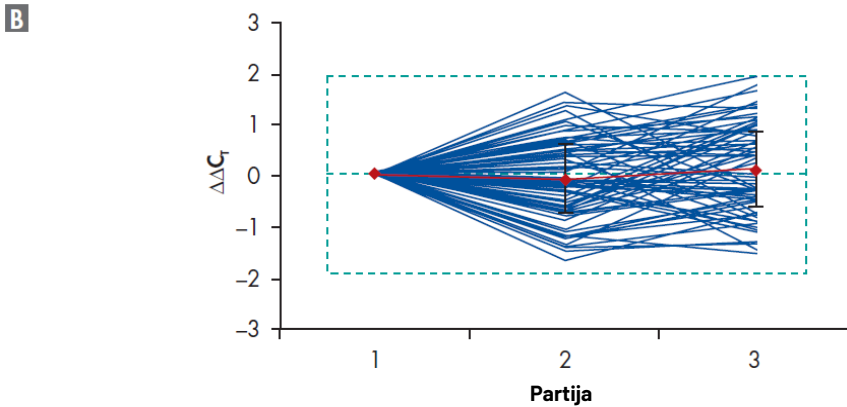
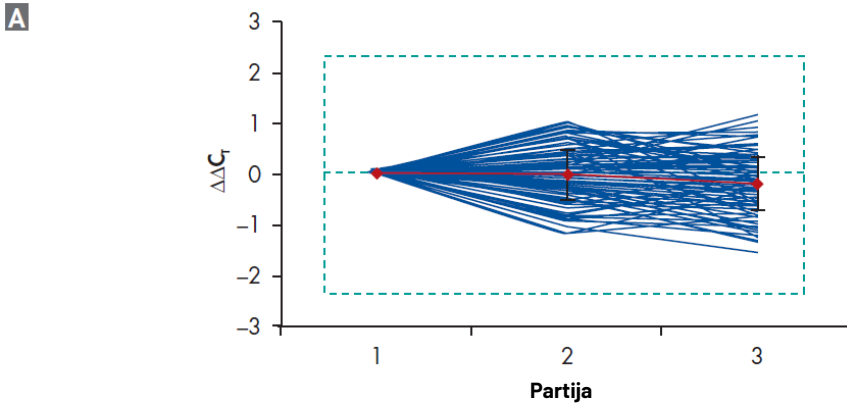
Tabula 1D. Reproducējamība starp visām partijām un visiem lietotājiem izvēlētajos donoru kopparaugos (1, 6, 9, 10)

Datu kombinācija	Donoru kopparaugs 1 ($5,1 \times 10^6$ šūnas/ml)			Donoru kopparaugs 6 ($6,5 \times 10^6$ šūnas/ml)		
	Vidējais iegūtais daudzums (μg)	SN (μg)	VK (%)	Vidējais iegūtais daudzums (μg)	SN (μg)	VK (%)
1. partija, visi lietotāji	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Donoru kopparaugs 9 ($8,4 \times 10^6$ šūnas/ml)			Donoru kopparaugs 10 ($10,2 \times 10^6$ šūnas/ml)		
	Vidējais iegūtais daudzums (μg)	SN (μg)	VK (%)	Vidējais iegūtais daudzums (μg)	SN (μg)	VK (%)
1. partija, visi lietotāji	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

4 reprezentatīvo donoru kopparaugu detalizēta analīze. Šie kopparaugi tika izvēlēti pēc balto asins šūnu skaita, un tie uzrāda balto asins šūnu skaita standarta diapazona augstāko, vidējo un zemāko vērtību ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leikocīti/ml). Balto asins šūnu skaits parāda 3 balto asins šūnu skaitu vidējo vērtību no 3 donoriem katram donoru kopparaugam.



10. attēls. RT-PCR reproducējamība – starp lietotājiem. 9. attēlā aprakstītajā eksperimentā izdalītā RNS tika izmantota reālā laika RT-PCR. Relatīvie **[A]** FOS un **[B]** IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Diagrammā ir norādītas visu paraugu vērtības attiecībā pret lietotāja A vērtībām (10 donoru kopparaugi \times 3 komplekta partijas \times 4 atkārtojumi = 120 datu kopas katram gēnam), kā arī visu paraugu vidējās vērtības (sarkanās līnijas) un standartnovirze (melnie stabiņi). Ar pārtrauktajām līnijām ir norādīta analīžu kopējā precizitāte $\pm 3\sigma$ (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



11. attēls. RT-PCR reproducējamība – starp komplekta partijām. 9. attēlā aprakstītajā eksperimentā izdalītā RNS tika izmantota reālā laika RT-PCR. Relatīvie **[A]** FOS un **[B]** IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Diagrammā ir norādītas visu paraugu vērtības attiecībā pret 1. komplekta partijas vērtībām (10 donoru kopparaugi \times 3 lietotāji \times 4 atkārtojumi = 120 datu kopas katram gēnam), kā arī visu paraugu vidējās vērtības (sarkanās līnijas) un standartnovirze (melnie stabiņi). Ar pārtrauktajām līnijām ir norādīta analīžu kopējā precizitāte $\pm 3\sigma$ (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Tabula 2. RT-PCR datu kopsavilkums no 10. attēla un 11. attēla

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

Lietotājs: tehniķis, veica pētījumu.

Partija: šajā pētījumā izmantotais komplekta partijas numurs.

SN: standartnovirze.

Parādītas Vidējās $\Delta\Delta C_T$ vērtības (N = 120) un standartnovirzes vērtības ir dati, kas attēloti 10. attēlā. un 11. attēlā.

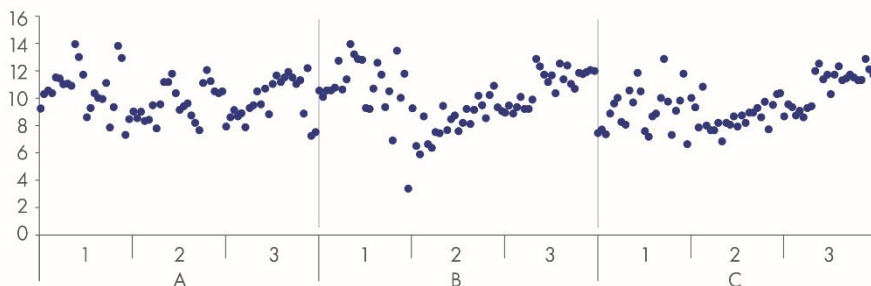
Automatizēta RNS izolēšana

Iegūtais RNS daudzums no 2,5 ml vesela cilvēka pilnasiņu $\geq 95\%$ apstrādāto paraugu ir $\geq 3 \mu\text{g}$. 12. attēls (55. lpp) ir parādīts RNS daudzums, kas iegūts kopā no 216 paraugiem, kuri sagatavoti, 3 operatoriem izmantojot automatizēto protokolu ar 3 komplekta partijām. Šiem pētījumiem tika izmantoti apkopotu asins paraugi, nevis atsevišķi PAXgene Blood RNA Tube stobriņi (BRT), tāpēc rezultāti neatspoguļo RNS daudzumu, ko paredzēts iegūt no viena parauga eksemplāra, kas iegūts atsevišķā asins parauga ņemšanas reizē. Iegūtais daudzums ir lielā mērā atkarīgs no donora, tāpēc daudzums katrā atsevišķā gadījumā var atšķirties (12. attēls 55. lpp.).

Vismaz 95% paraugu neuzrāda inhibīciju RT-PCR procesā, eluātam veidojot līdz pat 30% no RT-PCR reakcijas tilpuma. Izmantojot automatizēto protokolu, krusteniskā kontaminācija starp paraugiem nav nosakāma, kā noteikts, veicot kvantitatīvu reālā laika RT-PCR ar ABL1 un FOS transkriptu sekvencēm RNS negatīvos paraugos (ūdens), kas sakārtotas pāros ar RNS pozitīviem paraugiem (cilvēka pilnasinis) vienā izpildes reizē.

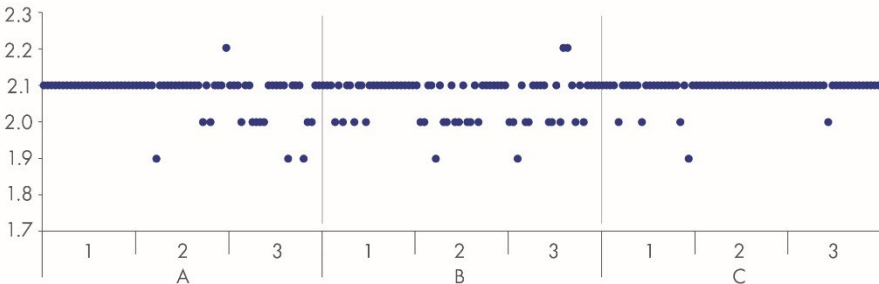
Ar sistēmu PAXgene Blood RNA System un automatizēto protokolu izolētā RNS ir tīra, ko pierāda RT-PCR inhibīcijas neesamība un A_{260}/A_{280} vērtības no 1,8 līdz 2,2. $\geq 95\%$ visu paraugu ir atrodams $\leq 1\%$ (masas daļa) genomiskās DNS, kā noteikts kvantitatīvā beta-aktīna gēna sekvences real-time PCR. 13. attēlā un 14. attēlā (56. lpp.) ir parādītas A_{260}/A_{280} vērtības un relatīvais genomiskās DNS daudzums kopā 216 paraugos, kas sagatavoti, 3 operatoriem izmantojot automatizēto protokolu ar 3 komplektu partijām.

RNS daudzums ($\mu\text{g}/2,5 \text{ ml}$ asiņu) QIAcube Connect MDx



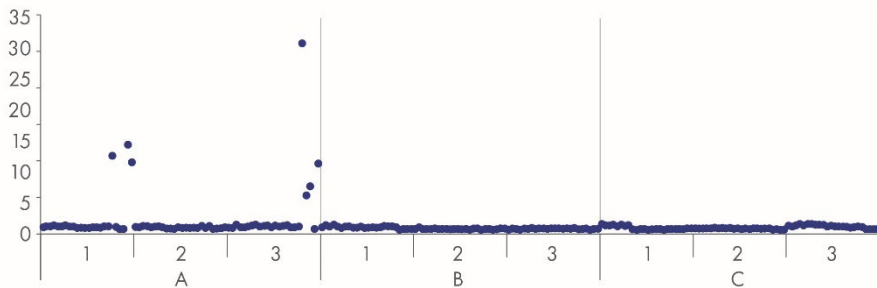
12. attēls. RNS iegūtais daudzums –automatizētā apstrāde ar QIAcube Connect MDx. Asins paraugi no atsevišķiem donoriem tika savākti PAXgene Blood RNA Tube stobriņos (BRT). Stobriņu saturs tika apkopots 6 donoru kopparaugos un pēc tam atkārtoti sadalīts alikvotās. Kopā 216 stobriņus (t.i., 36 stobriņus katram kopparaugam) apstrādāja 3 dažādi operatori (A, B, C). Katrs operators izmantoja 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit komplekta partijas (1, 2, 3) automatizētajai izolēšanai ar QIAcube Connect MDx un paraugus no katra no šiem 6 donoru kopparaugiem apstrādāja četros eksemplāros. Visiem atsevišķajiem paraugiem RNS iegūtais daudzums tiek rādīts katrai operatora-partijas kombinācijai.

RNS tīrības pakāpe (A_{260}/A_{280}) QIAcube Connect MDx



13. attēls. RNS tīrības pakāpe (A_{260}/A_{280} vērtības) – automatizēta apstrāde ar QIAcube Connect MDx. 12. attēlā aprakstītajā eksperimentā RNS izdalīšanu veica 3 dažādi operatori (A, B, C), izmantojot 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas (1, 2, 3) ar QIAcube Connect MDx. Visiem atsevišķajiem paraugiem A_{260}/A_{280} vērtības tiek rādītas katrai operatora–partijas kombinācijai.

Genomiskā DNS (w/w) [%] QIAcube Connect MDx



14. attēls. RNS tīrības pakāpe (% genomiskās DNS kontaminācijas) – automatizēta apstrāde ar QIAcube Connect MDx. 12. attēlā aprakstītajā eksperimentā RNS izdalīšanu veica 3 dažādi operatori (A, B, C), izmantojot 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas (1, 2, 3) ar QIAcube Connect MDx. Visiem atsevišķajiem paraugiem genoma DNS daudzums (w/w) tiek rādīts katrai operatora–partijas kombinācijai.

RNS izolēšanas automatizētais protokols, izmantojot PAXgene Blood RNA System sistēmu, nodrošina augsti reproducējamus un atkārtojamus RT-PCR rezultātus, kas palielina to uzticamību klīniskiem diagnostiskiem testiem.

Izolētās RNS stabilitāte

RNS paraugi, ko izolē no asinīm pildītajiem PAXgene Blood RNA Tube stobriņiem ar PAXgene Blood RNA Kit komplektu, ir stabili 5 gadus, glabājot -20°C temperatūrā, un 7 gadus, glabājot -70°C temperatūrā (pētījumu mērķkritērijs).

Svarīgas piezīmes

QIAcube Connect MDx izmantošana

Noteikti iepazīstieties ar QIAcube Connect MDx instrumentā ekspluatāciju. Lūdzu, izlasiet instrumenta lietotāja rokasgrāmatu un visu instrumenta komplektācijā iekļauto papildinformāciju, īpašu uzmanību pievēršot drošības informācijai, pirms sākat izmantot automatizēto PAXgene Blood RNA protokolu.

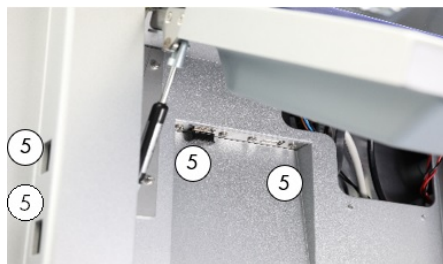
QIAcube Connect MDx startēšana

Aizveriet QIAcube Connect MDx pārsegu un ieslēdziet instrumentu ar barošanas slēdzi (sk. 15. attēlu 59. lpp.).

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



QIAcube Connect MDx skats no priekšpuses



Izvilks skārienkrāns



QIAcube Connect MDx skats no aizmuģures (kreisā puse)



QIAcube Connect MDx skats no aizmuģures (labā puse)

15. attēls. QIAcube Connect MDx ārējie līdzekļi.

- | | |
|---|--|
| <p>1 Skārienkrāns</p> <p>2 Pārsegs</p> <p>3 Atkritumu nodalījums</p> <p>4 Barošanas slēdzis</p> | <p>5 2 USB porti skārienkrāna kreisajā malā; 2 USB porti aiz skārienkrāna (Wi-Fi modulis iesprausts 1 USB portā)</p> <p>6 RJ-45 Ethernet ports</p> <p>7 Strāvas vada līgзда</p> <p>8 Dzesējošā gaisa izeja</p> |
|---|--|

Skārienekrāns

QIAcube Connect MDx instruments tiek vadīts, izmantojot skārienekrānu. Skārienekrāns sniedz iespējas lietotājam ekspluatēt instrumentu un sniedz lietotājam norādījumus par darba plates iestatīšanu. Parauga apstrādes laikā skārienekrānā ir redzams protokola statuss un atlikušais laiks.




16. attēls. QIAcube Connect MDx skārienekrāns izvilkta stāvoklī.


Protokolu instalēšana QIAcube Connect MDx instrumentā

Lai QIAcube Connect MDx instrumentā varētu veikt pirmo RNS sagatavošanas izpildi, vispirms var būt nepieciešams instalēt sākotnējo protokolu. Instalējiet protokolus "PAXgene Blood RNA Part A" un "PAXgene Blood RNA Part B".

QIAcube Connect MDx instrumentam paredzētie protokoli ir pieejami vietnē **www.qiagen.com**, un tos ir nepieciešams lejupielādēt instrumenta komplektācijā iekļautajā USB atmiņā. Šie protokoli uz instrumentu ir jāpārceļ, izmantojot USB portu.

Izmantojot USB portu (atrodas skārienekrāna sānos, sk. 15. attēlu 59. lpp.), QIAcube Connect MDx instrumentu var savienot ar instrumenta komplektācijā iekļauto USB atmiņu. Izmantojot USB portu, no instrumenta uz USB atmiņu var pārcelt arī datu failus, piemēram, žurnālfailus vai atskaišu failus.

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

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


Plašāku informāciju par protokolu augšupielādēšanu uz QIAcube Connect MDx instrumentu, lūdzu, skatiet instrumenta rokasgrāmatā.


QIAcube Connect MDx instrumenta uzpildīšana

Lai taupītu laiku, uzpildi var veikt vienas vai abu 10 min ilgo centrifugēšanas soļu laikā (3. un 5. solis), sadaļā "Protokols: automatizēta summārās RNS izolēšana no PAXgene Blood RNA Tube stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinīm", 32. lpp.

Reāģentu pudeles

Pirms katras izpildes reizes QIAcube Connect MDx instrumentā rūpīgi piepildiet 4 reāģentu pudeles ar Tabulā 3 (62. lpp.) norādītajiem reāģentiem līdz maksimālā līmeņa indikatoram vai, ja tas nav iespējams, līdz līmenim, ko nodrošina PAXgene Blood RNA Kit komplektā iekļautais buferšķīdumu daudzums. Skaidri marķējiet pudeles un vāciņus, norādot buferšķīdumu nosaukumus, un uzpildītās reāģentu pudeles ielieciet atbilstošajās pozīcijās reāģentu pudeļu statīvā. Ievietojiet statīvu instrumenta darba platē, kā parādīts (17. attēlā un 18. attēlā, attiecīgi 62. un 63. lpp.).

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

 Pirms pudeļu ievietošanas darba platē obligāti noņemiet pudeļu vāciņus.



Ar buferšķīdumu tilpumu, kas iekļauts PAXgene Blood RNA Kit komplektā (50), pietiek maksimāli 7 RNS izdalīšanas izpildes reizēm QIAcube Connect MDx instrumentā, vienā izpildes reizē apstrādājot 2–12 paraugus. Vajadzētu izvairīties no izpildēm ar mazāku paraugu skaitu, lai apstrādātu kopā 50 paraugus uz vienu komplektu. Veicot vairāk par 7 RNS sagatavošanas izpildēm, pēdējo paraugu apstrādei buferšķīdumu var nepietikt.

Tabula 3. Pozīcijas reaģentu pudeļu statīvā

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

* Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts kā koncentrāts. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet 4 daļas etanola (96–100% v/v, tīrības pakāpe p.a.), kā norādīts uz pudeles, lai iegūtu darba šķīdumu.

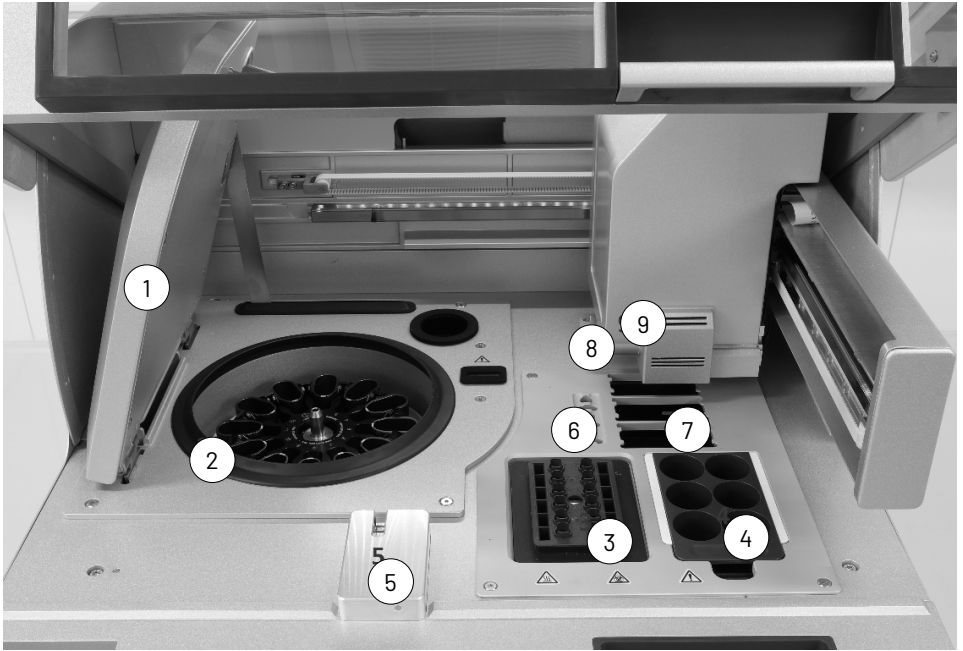
A



B



17. attēls. Reaģentu pudeļu statīva ievietošana. **[A]** Pudeļu pozīciju un saturs shēma reaģentu pudeļu statīvā. **[B]** Statīva ievietošana QIAcube Connect MDx instrumentā.



18. attēls. QIAcube Connect MDx iekšpuses skats.

- | | | | |
|---|--|---|--|
| ① | Centrifūgas vāks | ⑥ | MCT sloti |
| ② | Centrifūga | ⑦ | 3 sloti uzgaļu statīviem |
| ③ | Kratītājs | ⑧ | Izmešanas sloti uzgaļiem un stobriņiem |
| ④ | Reaģentu pudeļu statīvs | ⑨ | Robotizēta svira (ietver 1 kanāla pipetētāju, satvērēju, ultraskaņas un optisko sensoru un UV gaismas diodi (LED)) |
| ⑤ | Uzgaļu sensors un pārsega bloķēšanas mehānisms | | |

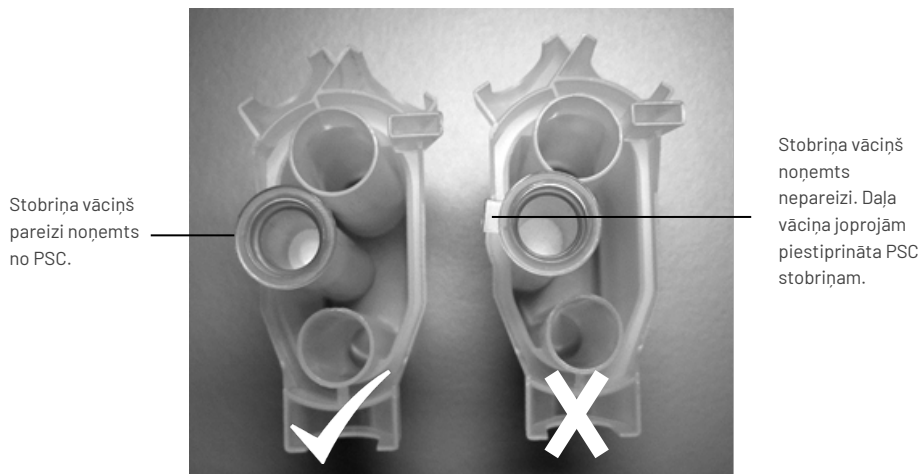
Centrifūgas stobriņi (PSC, PRC), MCT un QIAcube Connect MDx plastmasas piederumi

Novietojiet 2 uzgaļu statīvus, kuros ievietoti filtru uzgaļi Filter-Tips 1000 µl, sistēmā QIAcube Connect MDx (sk. 18. attēlu 63. lpp.). Kad nepieciešams, papildiniet statīvus ar uzgaļiem.

i Izmantojiet tikai 1000 µl filtru uzgaļus, kas ir paredzēti lietošanai ar QIAcube Connect MDx.

Marķējiet rotora adapterus un MCT katram paraugam, izmantojot ūdensnoturīgo pildspalvu. Atveriet PSC, ko paredzēts lietot, un ar šķērēm pilnībā nogrieziet vāciņu (sk. 19. attēlu).

i Lai QIAcube Connect MDx robotizētais satvērējs darbotos pareizi, pilnībā noņemiet (nogrieziet) vāciņus un visas plastmasas daļas, kas vāciņu savieno ar PSC (sk. 19. attēlu). Pretējā gadījumā robotizētais satvērējs nevar pareizi satvert stobriņu PSC.



19. attēls. PSC ievietošana. PSC stobriņš jāievieto rotora adaptera vidējā pozīcijā. Pirms stobriņa ievietošanas nogrieziet PSC vāciņu.

Ievietojiet PSC stobriņu (bez vāciņa, sk. 19. attēlu 64. lpp.), PRC stobriņu un marķēto MCT stobriņu atbilstošajās pozīcijās katrā marķētajā rotora adapterī, kā parādīts Tabulā 4 un 20. attēlā.

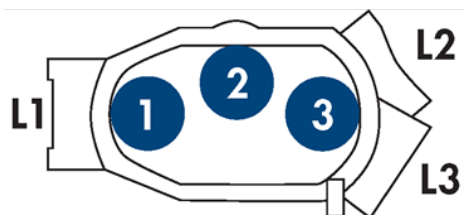


Nodrošiniet, ka centrifūgas stobriņa (PRC) un MCT vāciņi ir nospiesti līdz pat slotu apakšai rotora adaptera malā, citādi centrifugēšanas laikā šie vāciņi nolūzīs.

Tabula 4. Plastmasas izejmateriāli rotora adapterī

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

* Izmantojiet PAXgene Blood RNA Kit komplektā iekļauto MCT stobriņu (1,5 ml).



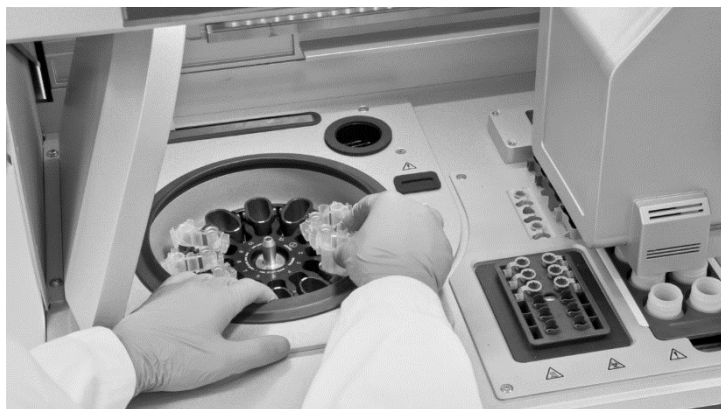
20. attēls. Pozīcijas rotora adapterī. Rotora adapterim ir 3 stobriņu pozīcijas (1–3) un trīs vāciņu pozīcijas (L1–L3).

Centrifūgas uzpilde

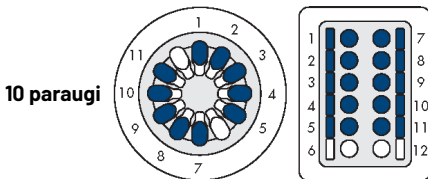
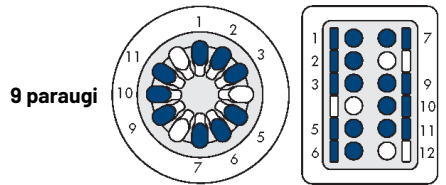
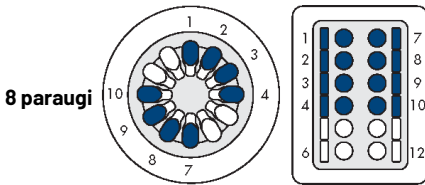
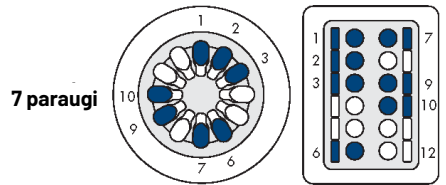
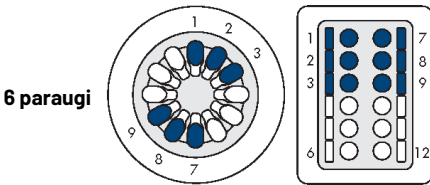
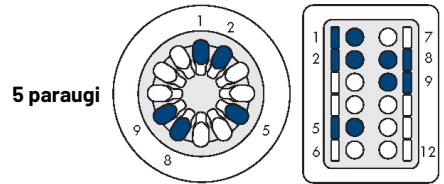
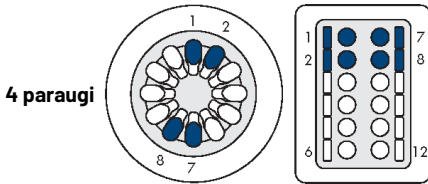
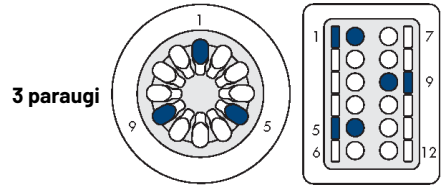
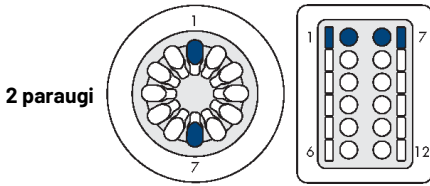
Saliktos rotoru adapterus ievieto jiet QIAcube Connect MDx centrifūgas kausos, kā tālāk parādīts 21. attēlā.



Ja apstrādājat mazāk par 12 paraugiem, noteikti noslogo jiet centrifūgas rotoru radiāli līdzsvaroti (sk. 22. attēlu 67. lpp.). Pirms tiek sākta protokola izpilde, ir jāievieto visi centrifūgas kausi, pat ja paredzēts apstrādāt mazāk nekā 12 paraugus. Nevar apstrādāt vienu paraugu vai 11 paraugus.



21. attēls. Centrifūgas uzpilde QIAcube Connect MDx instrumentā. Ievieto jiet saliktos rotoru adapterus centrifūgas kausos.



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

Apstrādes stobriņi

Izņemiet visus apstrādes stobriņus PT, kas MCT slotos palikuši no iepriekšējām izpildes reizēm (sk. 18. attēlu 63. lpp.). Piepildiet 3 stobriņus PT ar Tabulā 5 norādīto reaģentu daudzumu atbilstoši izpildes reizes paraugu skaitam.

DNāzes I inkubācijas maisījumam pipetējiet norādīto tilpumu DNS noārdīšanas buferšķīduma (RDD) PT stobriņā un pievienojiet norādīto DNāzes I (RNFD) rezerves standartšķīduma tilpumu. Samaisiet, visu maisījumu 3 reizes uzmanīgi aspirējot un izvadot ar pipeti un izmantojot 1000 µl pipetes uzgali.



Izmantojiet PAXgene Blood RNA Kit komplektā iekļautos 2 m PTI stobriņus. Skaidri marķējiet stobriņus, norādot reaģentu nosaukumus, un ievietojiet tos atbilstošajā pozīcijā MCT slotos, kā norādīts Tabulā 6 (69. lpp.).



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

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

5. tabula. Stobriņos PT nepieciešamais reaģentu tilpums MCT slotos

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

Tabula 6. MCT sloti

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

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

Utilizēšana

Informāciju par drošu utilizēšanu pēc paraugu vākšanas un manuālas RNS izolēšanas, lūdzu, skatiet drošības informācijā un piesardzības pasākumos attiecīgi 18. un 19. lpp.

Turklāt saistībā ar automatizētu RNS izolēšanu, izmantojot QIAcube Connect MDx, lūdzu, skatiet 21. attēlu un 22. attēlu attiecīgi 66. un 67. lpp., kur norādīti izlietoto uzgaļu un stobriņu izmešanai atvēlētie sloti.

Atsauces

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.

Problēmu novēršanas ceļvedis

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

Komentāri un ieteikumi	
RNS ir noārdījusies	
a) RNāzes kontaminācija	 Rīkojieties uzmanīgi, lai procedūras laikā vai pēc tās reaģentos nenokļūtu jebkāds RNāzes daudzums (sk. A pielikumu 77. lpp.).
Mazs iegūtās RNS daudzums	
b) PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) ir paņemts mazāk nekā 2,5 ml asiņu	 Pārlicinieties, vai PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT; sk. PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmatu) ir paņemts 2,5 ml asiņu.
c) RNS koncentrācija ir mērīta ūdenī	 Precīzai kvantitatīvai noteikšanai RNS ir jāatšķaida ar 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5* (sk. B pielikumu 78. lpp.).
d) Manuālā protokola 9. un 10. soli uz PRC ir pārceltas šūnu atliekas	 Manuālā protokola 7. darbībā, pipetējot virsslāni, izvairieties pārnest lielas daļiņas (sīku atlieku pārvešana procedūru neietekmē).
e) 3. soli supernatants nav noņemts pilnībā	 Pārlicinieties, vai tiek noņemts viss virsslānis. Ja supernatants tiek noliets, noslaukiet pilienu no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT) malas ar papīra dvieļi. Veiciet atbilstošus piesardzības pasākumus, lai nepieļautu krustenisko kontamināciju.
f) Pēc savākšanas PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) asinis ir inkubētas mazāk nekā 2 h	 Inkubējiet asinis PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) 2 h pēc parauga paņemšanas.




* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimds un aizsargbrilles. Lai saņemtu iegūtu sīkāku informāciju, skatiet attiecīgās drošības datu lapas (Safety Data Sheet, SDS), kas ir pieejamas, sazinoties ar produkta piegādātāju.

Komentāri un ieteikumi	
Zema A_{260}/A_{280} vērtība	
g) A_{260}/A_{280} mērījuma veikšanai RNS atšķaidīšanai izmantots ūdens	 Izmantojiet 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5, lai atšķaidītu RNS pirms tīrības pakāpes mērīšanas* (sk. B pielikumu 78. lpp.).
h) Spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts	 Nullējiet spektrofotometru, izmantojot tukšu paraugu, kurā ir tāda pati eluēšanas buferšķīduma (BR5) un 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5 buferšķīduma proporcija kā mērāmajos paraugos. Eluēšanas buferšķīdumam (BR5) ir augsta absorbcijas vērtība pie 220 nm, kas var radīt augstu fona absorbcijas līmeni, ja spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts.
Ierīces nepareiza darbība	
i) QIAcube Connect MDx nedarbojas pareizi	Izlasiet <i>QIAcube Connect MDx lietotāja rokasgrāmatu</i> , īpašu uzmanību pievēršot sadaļai par problēmu novēršanu. Nodrošiniet, ka instruments tiek pareizi apkopts, kā aprakstīts lietotāja rokasgrāmatā.

* 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.

Simboli

Lietošanas instrukcijās vai uz iepakojuma un marķējuma var būt tālāk norādītie simboli. Papildu simboli ir aprakstīti sadaļā Komplekta saturs (6. lpp.).

Simbols	Simbola definīcija
V<N1>	Produkta versija <N1>
 <N2>	Satur reaģentus, kuru daudzums ir pietiekams <N2> testu veikšanai
	Skatīt lietošanas instrukcijas
	Izlietot līdz
IVD	In vitro diagnostikas medicīnas ierīce
REF	Kataloga numurs
LOT	Partijas numurs
MAT	Materiāla numurs
COMP	Komponenti
NUM	Numurs
KU	Kunitz vienības
ADD	Jāpievieno
CONT	Satur
RCNS	Pagatavots šķīdums

DNase

Dezoksiribonukleāze I

EtOH

Etanols

GITC

Guanidīna izotiocianāts

RNase-Free DNase Set

DNāzes komplekts bez RNāzes

GTIN

Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs



Temperatūras ierobežojums



Maksimālās temperatūras ierobežojums



Ražotājs

EC REP

Pilnvarotais pārstāvis Eiropā saskaņā ar Regulu (ES) 2017/746



Svarīga piezīme



Etanola pievienošana



CE zīme. Šis produkts atbilst prasībām, ko nosaka Regula (ES) 2017/746 par in vitro diagnostikas medicīniskajām ierīcēm.

UDI

Unikāls ierīces identifikators



Uzmanību!



BRĪDINĀJUMS. Karsta virsma

Kontaktinformācija

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

Lai saņemtu tehnisko palīdzību un papildu informāciju, apmeklējiet mūsu tehniskā atbalsta centra vietni **www.qiagen.com/Support**, zvaniet pa tālruni 00800-22-44-6000 vai sazinieties ar kādu no QIAGEN tehnisko pakalpojumu dienesta nodaļām vai vietējiem izplatītājiem (skatiet aizmugurējo vāku vai apmeklējiet vietni **www.qiagen.com**).

A pielikums. Vispārīgas piezīmes par darbu ar RNS

Darbs ar RNS



Ribonukleāzes (RNāzes) ir ļoti stabili un aktīvi enzīmi, kuru darbībai parasti nav nepieciešami kofaktori. Tā kā RNāzes ir grūti inaktivējamas un pat ar nelielu daudzumu pietiek, lai noārdītu RNS, nedrīkst lietot nekādus plastmasas vai stikla piederumus, ja pirms tam nav novērsta iespējamā kontaminācija ar RNāzi. Jārīkojas ļoti uzmanīgi, lai RNāzes nejauši nenokļūtu RNS paraugā izolēšanas procedūras laikā vai pēc tās. Lai izveidotu un uzturētu vidi bez RNāzēm, strādājot ar RNS, priekšapstrādes laikā un vienreizlietojamu un vairākkārt lietojamu traukus un šķīdumu lietošanas laikā ir jāievēro piesardzības pasākumi.

Vispārīga rīkošanās



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

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

B pielikums. Summārās RNS kvantificēšana un kvalitātes noteikšana

RNS kvantificēšana

RNS koncentrācija ir jānosaka, spektrofotometrā mērot absorbciju pie 260 nm (A_{260}). Lai nodrošinātu nozīmīgumu, mērījumiem ir jābūt spektrofotometra lineārajā diapazonā. Absorbcijas 1 vienība pie 260 nm atbilst 44 μg RNS uz ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Šī sakarībā ir spēkā tikai mērījumiem 10 mM Tris-HCl šķīdumā ar pH 7,5*. Tāpēc RNS paraugs ir jāatšķaida ar 10 mM Tris-HCl. Kā aprakstīts tālāk (sk. sadaļu "RNS tīrība", 79. lpp.), attiecība starp absorbcijas vērtībām pie 260 un 280 nm ļauj noteikt RNS tīrību. Mērot RNS paraugus, nodrošiniet, lai kivetes nesaturētu RNāzi. Nullējiet spektrofotometru, izmantojot tukšu paraugu, kurā ir tāda pati eluēšanas buferšķīduma (BR5) un Tris-HCl buferšķīduma proporcija kā mērāmajos paraugos. Eluēšanas buferšķīdumam (BR5) ir augsta absorbcijas vērtība pie 220 nm, kas var radīt augstu fona absorbcijas līmeni, ja spektrofotometrs nav atbilstoši nulllēts. Tālāk ir parādīts RNS kvantifikācijas aprēķina piemērs.

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

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu iegūtu sīkāku informāciju, skatiet attiecīgās drošības datu lapas (Safety Data Sheet, SDS), kas ir pieejamas, sazinoties ar produkta piegādātāju.

RNS tīrība

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

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

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



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

Instrukcijas par BD Hemogard aizdaru noņemšanu

1. Vienā rokā satveriet PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT), novietojot īkšķi zem BD Hemogard aizdares. (Papildu stabilitātei atbalstiet roku pret stingru virsmu.) Ar otru roku pagrieziet BD Hemogard aizdari un vienlaikus bīdiet to uz augšu ar otras rokas īkšķi tikai tik ilgi, līdz stobriņa aizbāznis ir atbrīvots.
2. Noņemiet īkšķi pirms aizdares pacelšanas. Nenobīdiet aizdari no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT) ar īkšķi. Uzmanību! Ja PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) ir asinis, pastāv saskares risks. Lai, noņemot aizdari, nesavainotos, ir svarīgi, lai īkšķis, ar kuru aizdare tiek stumta uz augšu, tiktu noņemts no saskares vietas ar PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT), tiklīdz BD Hemogard aizdare ir atbrīvota.
3. Noņemiet aizdari no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT). Maz ticamajā gadījumā, ja plastmasas aizsargs atdalās no gumijas aizbāžņa, necentieties salikt aizdari atpakaļ. Uzmanīgi izņemiet gumijas aizbāzni no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT).

Norādījumi par sekundārās BD Hemogard aizdares ievietošanu

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

Informācija par pasūtīšanu

Produkts	Saturs	Kat. nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene centrifūgas stobriņi, 50 Shredder centrifūgas stobriņi, apstrādes stobriņi, DNāze I bez RNāzes, reaģenti un buferšķīdumi bez RNāzes. Lietošanai kopā ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 asins savākšanas stobriņi	762165
Saistītie produkti, ko var pasūtīt no uzņēmuma QIAGEN automatizētai RNS izolēšanai ar QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	Komplektā iekļautie materiāli: reaģentu pudeļu statīvi (3); sloksnes statīvu marķēšanai (8); 200 µl filtru uzgaļi (1024); 1000 µl filtru uzgaļi (1024); 1000 µl liela diametra filtru uzgaļi (1024); 30 ml reaģentu pudeles (18); rotora adapteri (240); rotora adapteru turētājs	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Sterili, vienreizlietojami filtru uzgaļi, statīvos	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Reaģentu pudeles (30 ml) ar vāciņiem; komplektā 6 gab.; lietošanai ar QIAcube reaģentu pudeļu statīvu	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	240 paraugu sagatavošanai: 240 vienreizlietojami rotora adapteri; lietošanai ar QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Statīvs, kurā QIAcube darba platē var ievietot 6 × 30 ml reaģentu pudeles	9026197
Rotor Adapter Holder	Turētājs 12 vienreizlietojamiem rotora adapteriem; lietošanai ar QIAcube	990392

Produkts	Saturs	Kat. nr.
Saistītie produkti, ko var pasūtīt no uzņēmuma BD asins vākšanai ar PAXgene Blood RNA Tube stobriņiem (BRT)*		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	21G, 0,8 × 19 mm adata, 305 mm caurulīte ar Luer adapteri; 50 gab./kastītē, 200 gab./kārbā	367286/367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	21G adata 0,8 × 19 mm (3/4 collu), caurulīte ar luera adapteru 305 mm (12 collas). 50 gab./kastītē, 200 gab./kārbā	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Kārba tikai 13 mm un 16 mm diametram; 1000 gab./kārbā	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Paraugu ņemšanas stobriņi 13 × 75 mm 4,0 ml ar sarkanu BD Hemogard aizdari un papīra etiķeti; 100 gab./kastītē, 1000 gab./kārbā	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	Paraugu ņemšanas stobriņi 13 × 75 mm 3,0 ml ar caurspīdīgu BD Hemogard aizdari un caurspīdīgu etiķeti; 100 gab./kastītē, 1000 gab./kārbā	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	Paraugu ņemšanas stobriņi 13 × 75 mm 3,0 ml ar caurspīdīgu BD Hemogard aizdari un papīra etiķeti; 100 gab./kastītē, 1000 gab./kārbā	366703

* Šie asins parauga ņemšanas piederumi ir tipiski produkti, ko var izmantot kopā ar PAXgene Blood RNA Tube stobriņiem (BRT). Lai iegūtu sīkāku informāciju par šiem piederumiem, tostarp to pasūtīšanu, apmeklējiet vietni www.preanalytix.com.

Dokumenta pārskatīšanas vēsture

Datums	Izmaiņas
[R1] 2022. gada aprīlis	Sākotnējais IVDR izdevums
[R2] 2023. gada februāris	PreAnalytiX GmbH adreses "Feldbachstrasse" nomaiņa ar "Garstligweg 8". Pasūtījuma informācijā pievienoti BD produkti. Atjaunināta drošības informācija.

Piezīmes



Jaunāko informāciju par licencēšanu un preču juridiskās atrunas skatiet attiecīgā PreAnalytiX vai QIAGEN komplekta rokasgrāmatā vai lietotāja instrukcijā. PreAnalytiX un QIAGEN komplektu rokasgrāmatas un lietotāja rokasgrāmatas ir pieejamas vietnē www.preanalytix.com un www.qiagen.com vai tās var saņemt, sazinoties ar QIAGEN tehniskā atbalsta dienestu vai vietējo izplatītāju.

**Better samples
More to explore**

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

Sīkāku informāciju skatīt šeit: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023