

Februar 2023

PAXgene[®] Blood RNA Kit (håndbog) Brugsanvisning



Version 3 (V3)

IVD

Til in vitro-diagnostisk brug



REF

762174



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

Fremstillet af QIAGEN[®] GmbH for PreAnalytiX

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

MAT

1130774DA

Varemærker: 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. Medmindre andet er angivet, tilhører PreAnalytiX, PreAnalytiX-logoet og alle andre varemærker PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

Aftale om begrænset licens til PAXgene Blood RNA Kit

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i overensstemmelse med protokoller leveret med produktet og denne håndbog og kun med de komponenter, der er i panelet. PreAnalytiX® giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette panel med komponenter, der ikke er inkluderet i dette panel, undtagen som beskrevet i de protokoller, der følger med produktet, denne håndbog og andre protokoller, der er tilgængelige på www.qiagen.com og www.PreAnalytiX.com.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver PreAnalytiX ingen garanti om at dette kit, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, gendannes eller videresælges.
4. PreAnalytiX fraskriver sig hermed specifikt alle andre licenser, udtrykkelige eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt, der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor.
6. PreAnalytiX kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale i enhver ret og vil inddrive alle undersøgelses- og retsombkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

Opdaterede licensbetingelser kan findes på www.qiagen.com og www.preanalytix.com.

HB-3009-002 BD-8945 1130774DA © 2023 PreAnalytiX GmbH, alle rettigheder forbeholdes.

PreAnalytiX distributører

PreAnalytiX-produkter fremstilles og distribueres af QIAGEN og BD for PreAnalytiX.

Indhold

Indhold.....	3
Tilsligtet anvendelse	6
Tilsligtet bruger	6
Beskrivelse og princip	7
Indledning.....	7
Princip og procedure.....	7
Prøvetagning og stabilisering	8
RNA-isolation.....	8
Manuel RNA-isolering.....	9
Automatisk RNA-isolering	11
Medfølgende materialer.....	14
Kit-indhold.....	14
Sættets komponenter	15
Nødvendige materialer, som ikke medfølger	16
For alle protokoller	16
Til manuel protokol	16
Til den automatiserede protokol.....	17
Advarsler og forholdsregler	18
Sikkerhedsinformation	18
Nødoplysninger.....	18
Forholdsregler	19
Opbevaring og håndtering af reagenser	22

Stabilitet under brug	22
Prøvetagning samt opbevaring og håndtering af prøver	23
Protokol: Manuel isolering af RNA i alt fra humant helblod, der er indsamlet i PAXgene Blood RNA Tubes.....	24
Protokol: Automatisk isolering af RNA i alt fra humant helblod indsamlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	32
Begrænsninger af produktets anvendelse.....	39
Kvalitetskontrol.....	39
Ydelseskarakteristika.....	40
Prøvetagning og stabilisering	40
Manuel RNA-isolering.....	45
Automatisk RNA-isolering	53
Stabilitet af isoleret RNA.....	56
Vigtige bemærkninger	57
Anvendelse af QIAcube Connect MDx.....	57
Start af QIAcube Connect MDx.....	57
Installation af protokoller på QIAcube Connect MDx	59
Isætning i QIAcube Connect MDx	60
Spin-kolonner (PSC, PRC), MCT og QIAcube Connect MDx-plastemner.....	63
Bortskaffelse	69
Litteraturhenvisninger	70
Fejlfindingsvejledning	71
Symboler.....	73
Kontaktoplysninger	75

Bilag A: Generelle bemærkninger om håndtering af RNA	76
Bilag B: Kvantificering og kvalitetsbestemmelse for RNA i alt	77
Appendiks C: Håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	79
Bestillingsinformation	81
Revisionshistorik for dokumentet	83

Tilsigtet anvendelse

Til in vitro-diagnostisk brug.

PAXgene Blood RNA System indeholder et rør til blodprøvetagning (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) og et kit (PAXgene Blood RNA Kit) til oprensning af nukleinsyrer. Systemet er beregnet til tapning, opbevaring og transport af blodprøver og til stabilisering af intracellulært RNA i lukkede prøverør, samt den efterfølgende isolering og oprensning af værts-RNA fra helblod til RT-PCR anvendt i molekylær diagnostisk testning.

Ydelseskarakteristika for PAXgene Blood RNA System er kun etableret med FOS- og IL1B-gentranskriptioner. Brugeren er ansvarlig for at etablere egnede ydelseskarakteristika for PAXgene Blood RNA System for andre mål-transkriptioner.

Indikationer for brug

PAXgene Blood RNA Kit bruges til oprensning af intracellulært RNA fra helblod, som blev opsamlet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Når kittet anvendes sammen med PAXgene Blood RNA Tube (BRT), leverer systemet oprenset intracellulært RNA fra helblod til RT-PCR anvendt i molekylær diagnostisk testning.

Tilsigtet bruger

Produktet er beregnet til brug af professionelle brugere, f.eks. laboratorieteknikere og læger, der er uddannet i in vitro-diagnostiske procedurer.

Dette kit er beregnet til professionel brug.

Beskrivelse og princip

Indledning

Det første skridt ved mange molekylærbiologiske analyser af cellulært RNA er indsamling af helblod. Ustabiliteten af den cellulære RNA-profil in vitro udgør imidlertid et væsentligt problem. Undersøgelser hos PreAnalytiX har vist, at antallet af kopier for enkelte mRNA-species i helblod kan forandre sig mere end tusind gange under transport eller opbevaring ved stuetemperatur (Rainen et al., 2002). Årsagerne til dette er den hurtige nedbrydning af RNA og den inducerede ekspression af bestemte gener efter blodtapningen. Sådanne forandringer af RNA-ekspressionsprofil forhindrer pålidelige resultater i genekspressionsundersøgelser. Det er derfor afgørende at finde en metode, som bevarer RNA-ekspressionsprofilen under og efter flebotomi, for at opnå en nøjagtig analyse af genekspression i humant helblod.

Princip og procedure

PreAnalytiX har udviklet et system, som gør det muligt at tappe, stabilisere, opbevare og transportere humane helblodsprøver og som leverer en hurtig og effektiv protokol for isolering af intracellulært RNA. Systemet kræver, at der bruges PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) til blodindsamling og RNA-stabilisering, efterfulgt af manuel eller automatisk RNA-isolering med PAXgene Blood RNA Kit. Den manuelle og automatisk protokol giver i alt væsentligt den samme præstation med hensyn til RNA-kvalitet og -udbytte. Der er inkluderet præstationsdata for den manuelle protokol (fra side 45) og den automatiske protokol (fra side 53) i denne håndbog.

PAXgene Blood RNA System muliggør standardisering af de præanalytiske arbejdsgangstrin fra blodprøvetagning til cellulær RNA-isolering i henhold til ISO 20186-1:2019, Molekylære in vitro-diagnostiske undersøgelser – specifikationer for præundersøgelsesprocesser for venøst helblod – del 1: Isoleret cellulært RNA.

Prøvetagning og stabilisering

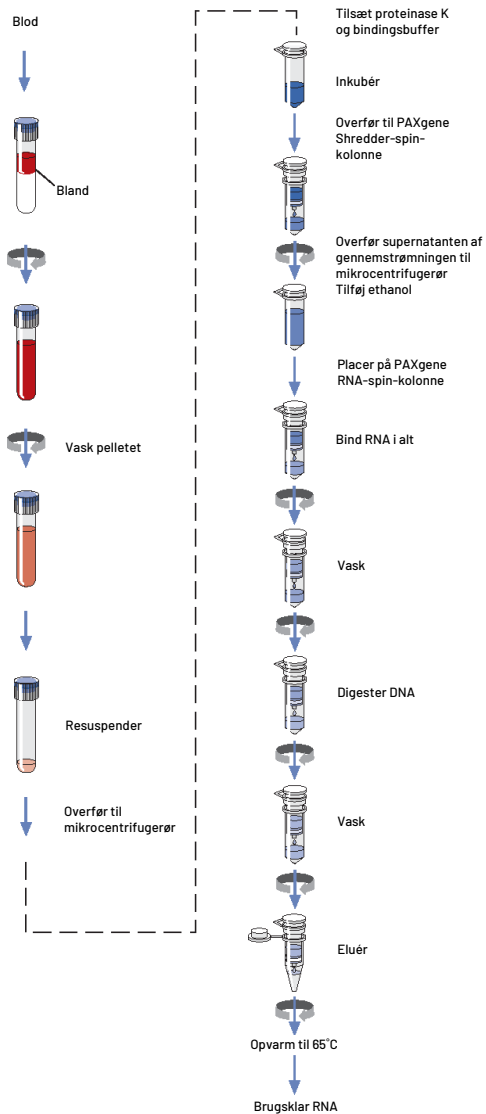
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) indeholder et proprietært RNA-stabiliseringsreagens. Dette additiv beskytter RNA-molekyler mod nedbrydning gennem RNaser og minimerer ex vivo-forandringer af genekspressionen. Ydelseskarakteristika for PAXgene Blood RNA System er etableret med FOS- og IL1B-gentranskriptioner, som kan ses på side 40 og frem.

RNA-isolation

PAXgene Blood RNA Kit bruges til isolering af RNA i alt fra 2,5 ml humant helblod, som blev indsamlet i et PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Proceduren er enkel og kan udføres manuelt eller automatisk (se Figur 1 eller figur 3, side 10 eller 12). I begge protokoller begynder isoleringen med et centrifugeringstrin for at samle nukleinsyrer i pellets i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pelletet vaskes og resuspenderes, efterfulgt af manuel eller automatisk RNA-isolering. Begge protokoller følger i princippet de samme protokoltrin, med de samme kit-komponenter.

Manuel RNA-isolering

Det resuspenderede pellet inkuberes i optimeringsbuffer og proteinase K (PK) for at digestere proteiner. En yderligere centrifugering med en PAXgene Shredder-spin-kolonne (PSC) udføres for at homogenisere cellelysatet og fjerne tiloversblevne cellerester. Supernatanten af gennemstrømningen overføres til et frisk mikrocentrifugerør (MCT). Derefter tilsættes ethanol for at justere bindingsbetingelserne, og lysatet overføres på PAXgene RNA-spin-kolonnen (PRC). Ved den efterfølgende korte centrifugering binder RNA selektivt til PAXgene silicagel-membranen, mens kontaminanter passerer igennem den. Tiloversblevne kontaminanter fjernes ved hjælp af flere effektive vasketrin. Mellem det første og det andet vasketrin bliver membranen behandlet med DNase I (RNFD) for at fjerne eventuelle bundne rester af DNA. Efter vasketrinnene bliver RNA elueret i elueringsbuffer (BR5) og varmedenatureret. Ydelseskarakteristika for manuel RNA-isolering ved hjælp af PAXgene Blood RNA System kan ses på side 45.



Figur 1: Den manuelle PAXgene Blood RNA-procedure.

Automatisk RNA-isolering

Isolering af blod-RNA sker automatisk på QIAGEN QIAcube Connect MDx. Den innovative instrument anvender avanceret teknologi til behandling af QIAGEN centrifugeringskolonner, hvilket gør det muligt problemfrit at integrere en automatiseret prøvebehandling i laboratoriets arbejdsgang, selv ved små prøvemængder. Klargøring af prøve vha. QIAcube Connect MDx følger de samme trin som den manuelle procedure (dvs. lysering, binding, vask og eluering), og de kan udføres ved hjælp af det samme PAXgene Blood RNA Kit.

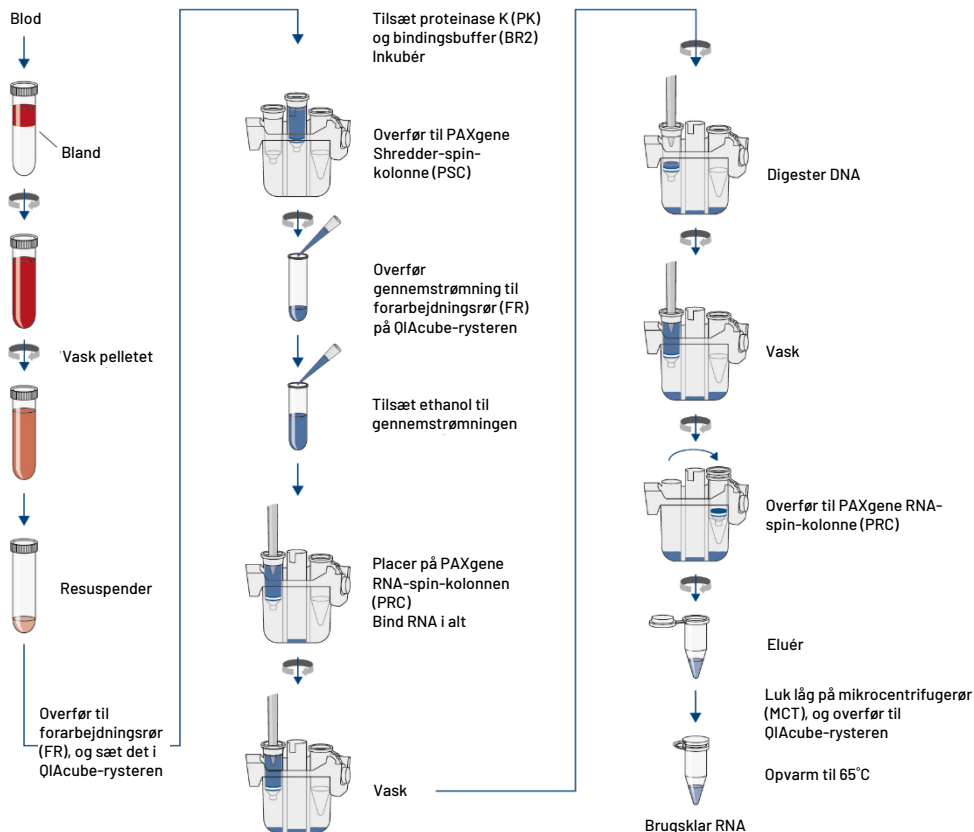


Figur 2: QIAcube Connect MDx.



QIAGEN QIAcube Connect MDx er ikke tilgængelig i alle lande. Kontakt QIAGEN Teknisk Service for at få flere oplysninger.

Den automatiske RNA-isoleringsprotokol består af 2 dele (eller protokoller), "PAXgene Blood RNA Part A" (elueres fra blodet i PAXgene Blood RNA Tube) og "PAXgene Blood RNA Part B" (efter eluering til brugsklart RNA), med en kort manuel indgriben mellem de 2 dele (se figur 3).




Figur 3: Den automatiske PAXgene Blood RNA-procedure.

Den centrifugerede, vaskede og resuspenderede nukleinsyrepellet (se "RNA-isolation" på side 8) overføres fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT) til forarbejdningsrørene (FR), som placeres i termorysterenheden på QIAcube Connect MDx-arbejdsbordet. Operatøren vælger og starter protokollen "PAXgene Blood RNA Part A" fra menuen. QIAcube Connect MDx udfører trinene i protokollen frem til elution af RNA i elueringsbuffer (BR5). Operatøren overfører MCT'er, som indeholder den oprensede RNA, til termorysterenheden på QIAcube Connect MDx. Operatøren vælger og starter protokollen "PAXgene Blood RNA Part B" fra menuen, og varmedenaturering udføres af QIAcube Connect MDx. Ydelseskarakteristika for automatisk RNA-isolering ved hjælp af PAXgene Blood RNA System på QIAcube Connect MDx kan ses på siden 53.

Medfølgende materialer

Kit-indhold

PAXgene Blood RNA Kit Katalognr. Antal prøvetagningsenheder			(50) 762174 50
Komponentnavn	Beskrivelse	Symbol	Antal
BR1	Resuspension Buffer (Resuspensionsbuffer)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Bindingsbuffer)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Vaskebuffer 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (Vaskebuffer 2)(koncentrat)†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Elueringsbuffer)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (RNase-frit vand) (i flaske)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid)(Proteinase K) (grønt låg)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (PAXgene RNA-spin-kolonner)(rød)‡	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 mL)(Prøvetagningsrør (2 ml))§	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (Sekundære BD Hemogard-lukninger)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 mL) (Mikrocentrifugerør (1,5 ml))§	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (Dnase I, RNase-frit)(lyofiliseret)	DNA REM	1.500 Kunitz-enheder¶
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA-digestionsbuffer)(hvidt låg)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (DNase-resuspensionsbuffer)(rør, lilla låg)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (PAXgene Shredder-spin-kolonner)(lilla)‡	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Håndbog	PAXgene Blood RNA Kit-håndbog (version 3)		1

* Må ikke bringes i kontakt med desinfektionsmidler, som indeholder blegemiddel. Indeholder et guanidinsalt. Se side 18 for Sikkerhedsinformation.

† Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. For at fremstille en brugsklar opløsning skal der inden første brug tilsættes fire dele ethanol (96-100 % v/v, renhedsgrad p.a.), som angivet på flaskeetiketten.

‡ Hver kolonne er pakket i en blisterpakning, der kun er beregnet til engangsbrug. Se venligst sikkerhedsinformation for bortskaffelsesinstrukser.

§ Rørene fås i plastikposer, og hvert rør er kun beregnet til engangsbrug. Se venligst sikkerhedsinformation for bortskaffelsesinstrukser.

¶ Kunitz-enheden er den almindeligt anvendte enhed til opmåling af DNase I, defineret som den mængde DNase I, som forårsager en stigning i A_{260} på 0,001 pr. minut pr. milliliter ved 25 °C, pH 5,0, hvor der anvendes høj-polymeriseret DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 og 363).

Sættets komponenter

Komponentnavn	Beskrivelse	Aktivt stof	Koncentration
BR1	Resuspension Buffer (Resuspensionsbuffer)	Ingen	-
BR2	Binding Buffer (Bindingsbuffer)	Guanidin-thiocyanat	≥ 30 til < 50 % w/w
BR3	Wash Buffer 1 (Vaskebuffer 1)	Guanidinthiocyanat Ethanol	≥ 10 til < 20 % w/w ≥ 3 til < 10 % w/w
BR4	Wash Buffer 2 (Vaskebuffer 2) (koncentrat)	Ingen	-
BR5	Elution Buffer (Elueringsbuffer)	Ingen	-
RNFW	RNase-Free Water (RNase-frit vand) (i flaske)	Ingen	-
PK	Proteinase K (grønt låg)	Proteinase K	≥ 1 til < 3 % w/w
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNase I, RNase-frit) (lyofiliseret)	DNase	≥ 90 til ≤ 100 % w/w
RDD	DNA Digestion Buffer (DNA-digestionsbuffer) (hvidt låg)	Ingen	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (DNase-resuspensionsbuffer) (rør, lilla låg)	Ingen	-

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

For alle protokoller

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; kat.-nr. 762165)
- Ethanol (96-100 % v/v, renhedsgrad p. a.)
- Pipetter* (10 µl – 4 ml)
- Sterile RNase-fri pipettespidser† med aerosol-barriere
- Målecylinder‡
- Centrifuge* med variable hastigheder fra 3.000–5.000 × g med rotor til svingbare centrifugebægre til PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Vortex-mixer*
- Knust is
- Vandfast tusch til etiketter

Til manuel protokol

- Mikrocentrifuge* med variabel hastighed mellem mindst 1.000–8.000 × g, lavere eller højere g-kraft kan dog anvendes (se yderligere oplysninger i protokoltrinnene). Centrifugen skal være udstyret med en rotor til 2 ml MCT'er

* Sørg for, at udstyret og instrumenterne regelmæssigt kontrolleres, vedligeholdes og kalibreres efter producentens anvisninger.

† Brugeren skal gøre sig bekendt med retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 75).

‡ Til tilsætning af ethanol til buffer BR4-koncentrat.

- Shaker-inkubator*, der kan inkubere ved 55 °C og 65 °C og ryste ved ≥400 omdrejninger, ikke over 1.400 omdrejninger (f.eks. Eppendorf® Thermomixer Compact eller tilsvarende)

Til den automatiserede protokol

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

QIAcube Connect MDx-forbrugsvarer:

- Filter-Tips, 1.000 µL (1024)(QIAGEN, kat.-nr. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 mL (6)(QIAGEN, kat.-nr. 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24)(QIAGEN, kat.-nr. 990394)†

QIAcube Connect MDx-tilbehør:

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

QIAcube Connect MDx-servicepakker:

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

* Sørg for, at udstyret og instrumentet regelmæssigt kontrolleres, vedligeholdes og kalibreres efter producentens anvisninger.

† Også inkluderet i Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat.-nr. 990395).

Advarsler og forholdsregler

Kunder i EU skal være opmærksomme på, at alvorlige hændelser af enhver art med relation til brugen af udstyret skal indberettes til producenten og den ansvarlige myndighed i det medlemsland, hvor brugeren og/eller patienten befinder sig.

Kunder uden for EU bedes bemærke, at alvorlige hændelser med relation til brugen af udstyret muligvis skal rapporteres til producenten og/eller dennes autoriserede repræsentant samt den ansvarlige myndighed i det land, hvor brugeren og/eller patienten befinder sig.

Sikkerhedsinformation

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer og miljøskadelige materialer. Der henvises til de relevante sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er) for yderligere information. Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN-kit og hver kitkomponent.

- Alle kemikalier og alt biologisk materiale er potentielt farligt. Blodprøver og prøver er potentielt farlige og skal håndteres som miljøskadelige materialer.
- Miljøskadeligt affald og affald fra sæt skal bortskaffes i henhold til de lokale sikkerhedsprocedurer.

Nødoplysninger

CHEMTREC

Uden for USA og Canada: +1 703-527-3887

Forholdsregler

Når man arbejder med blod, skal man tage universelle forholdsregler for at undgå risiko for potentiel eksponering for blodbårne patogener (f.eks. HIV, hepatitis B og andre blodbårne vira). Sørg for at bruge handsker, kitler, øjenværn, andre personlige værnemidler og tekniske kontroller for at beskytte mod blodeksponering. Der henvises til de relevante sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er) for yderligere information. De findes online i et bekvemt og kompakt PDF-format på **www.preanalytix.com**, hvor sikkerhedsdatabladene for dette kit kan læses eller udskrives.

FORSIGTIG



Der må IKKE tilsættes blegemiddel eller syreholdige opløsninger direkte i affaldet fra prøveklargøringen.

Bindingsbuffer (BR2) og vaskebuffer 1 (BR3) indeholder guanidin-thiocyanat, som kan reagere stærkt ved kontakt med klorblegemiddel. Hvis der spildes bindingsbuffer (BR2) eller vaskebuffer 1 (BR3), skal der gøres rent med et egnet laboratorierengøringsmiddel og vand. Hvis den spildte væske indeholder potentielt smittefarlige reagenser, renses fladen først med rengøringsmiddel og vand og derefter med 1 % (v/v) natriumhypochlorit (blegemiddel).

RNA-stabiliseringsopløsningen og blodvæsken fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan desinficeres med 1 del klorblegemiddelopløsning (5 % natriumhypochlorit) til 9 dele RNA-stabiliseringsopløsning og blodvæske.

Affaldet fra klargøring af prøve, såsom supernatanter fra centrifugeringstrinnene i RNA-isoleringsproceduren, skal altid betragtes som potentielt smittefarligt. Anvend beholdere til biologisk farligt materiale til at bortskaffe biologiske materialer. Bortskaffelse skal ske i overensstemmelse med lokale regler og procedurer på stedet.

Bestemte komponenter i PAXgene Blood RNA Kit er kun beregnet til engangsbrug. Se Kit-indhold på side 14 for at få yderligere oplysninger om individuelle komponenter.

Følgende fare- og sikkerhedssætninger gælder komponenter i PAXgene Blood RNA Kit. Se sikkerhedsinformation om PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) i *PAXgene Blood RNA Tube-håndbog*.

Buffer BR2



Indeholder: guanidin-thiocyanat. Fare! Farlig ved indtagelse. Kan være farlig ved hudkontakt eller ved indånding. Forårsager alvorlig øjenskade. Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger. Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre. Undgå udledning til miljøet. Bær beskyttelsehandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis det kan gøres let. Fortsæt med at skylle. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge. Bortskaf indholdet/beholderen på et godkendt genbrugssted.

Buffer BR3



Indeholder: ethanol; guanidin-thiocyanat. Fare! Brandfarlig væske og damp. Forårsager alvorlig øjenskade. Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre. Holdes væk fra varme/gnister/åben ild/varme overflader. Rygning forbudt. Bær beskyttelsehandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis det kan gøres let. Fortsæt med at skylle. Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge.

DNase I



Indeholder: DNase. Fare! Kan forårsage allergisk hudreaktion. Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding. Undgå indånding af støv. Bær beskytteshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. Anvend åndedrætsværn. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ring til en GIFTINFORMATION eller en læge. Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vedkommende hviler i en stilling, som letter vejrtrækningen. Vask kontamineret tøj før genbrug.

Opbevaring og håndtering af reagenser

PAXgene RNA-spin-kolonner (PRC), PAXgene Shredder-spin-kolonner (PSC), proteinase K (PK) og alle bufferne (BR1, BR2, BR3, BR4 og BR5) skal opbevares et tørt sted ved den temperatur, der er angivet på kitetiketten.

RNase-Free DNase Set, som indeholder DNase I (RNFD), DNA digestionsbuffer (RDD) og DNase resuspensionsbuffer (DRB), forsendes ved omgivelsestemperatur. Alle komponenter i det RNase-Free DNase Set skal umiddelbart efter levering opbevares ved den temperatur, som er angivet på etiketten. Ved korrekt opbevaring er kittet stabilt indtil den udløbsdato, der er angivet på kit-æskens.

Vær opmærksom på de udløbsdatoer og opbevaringsbetingelser, der er trykt på æskens og på etiketterne til samtlige komponenter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.

Stabilitet under brug

Efter første brug af kittet er reagenserne stabile i de originale flasker ved de temperaturer og indtil den udløbsdato, der er angivet på kittets kasseetiket.

Reagenser, der er fyldt i reagensflaskerne på QIAcube Connect MDx, er stabile i 3 måneder ved opbevaring ved stuetemperatur (15–25 °C).

Rekonstitueret DNase I (RNFD) er stabil ved 2–8 °C i 6 uger i det oprindelige hætteglas (stamopløsning).

Alikvoter til engangsbrug fra stamopløsningen i 1,5 ml MCT'er (leveret med sættet) er stabile i 9 måneder ved opbevaring ved -20 °C. Efter optøning er alikvoter til engangsbrug stabile i 6 uger ved opbevaring ved 2–8 °C.

Prøvetagning samt opbevaring og håndtering af prøver

PAXgene Blood RNA Kit anvendes sammen med blod, som er opsamlet i PAXgene Blood RNA Tubes. Blod skal indsamles i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) efter anvisningerne i PAXgene Blood RNA Tube-håndbogen. I Bilag C (på side 79) findes anbefalinger vedr. håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Alle prøver skal håndteres som potentielt farlige. Ydelseskarakteristika for PAXgene Blood RNA System er etableret med FOS- og IL1B-gentranskriptioner, som kan ses på siderne 41-44.

Protokol: Manuel isolering af RNA i alt fra humant helblod, der er indsamlet i PAXgene Blood RNA Tubes

Vigtige anvisninger før start

- Det skal kontrolleres, at kittets æske er ubeskadiget, og at ingen af buffer-beholderne er utætte. Beskadigede kits må ikke anvendes.
- Ved brug af pipette skal det kontrolleres, at volumenet er indstillet korrekt, og at væsken opsuges og dispenseres fuldstændigt.
- For at undgå at overføre prøver til det forkerte rør eller spin-kolonne, skal det sikres, at alle rør eller spin-kolonner er korrekt mærket med en vandfast tusch. Mærk låget og kroppen på hvert rør (PR, MCT). For spin-kolonner mærkes kroppen af det tilhørende PT. Luk hvert rør eller spin-kolonne, når væske er blevet overført til den.
- Spild af prøve- og buffervæsker under klargøringen kan nedsætte RNAs udbytte og renhed.
- Alle protokoltrin (inklusive centrifugeringerne) skal gennemføres ved stuetemperatur (15-25 °C), medmindre andet er angivet.

På grund af nukleinsyre-amplifikationsmetodernes høje sensitivitet skal følgende forholdsregler overholdes for at undgå krydskontaminering:

- Prøver skal altid pipetteres i spin-kolonnerne (PSC, PRC) uden at fugte kolonnens rand.
- Udskift altid pipettespidser mellem væskeoverførsler. Brug pipettespidser med aerosol-barriere.
- Undgå at røre ved membranen i spin-kolonnen (PSC, PRC) med pipettespidsen.
- Efter blandingen (vortex) eller opvarmning af et MCT skal det centrifugeres kortvarigt for at fjerne dråber fra lågets inderside.

- Brug handsker under hele proceduren. Skift handsker med det samme, hvis de kommer i berøring med prøven.
- Spin-kolonnerne (PSC, PRC) skal lukkes, før de sættes ind i mikrocentrifugen. Centrifugeringen skal foretages som angivet i protokollen.
- Åbn kun én spin-kolonne (PSC, PRC) ad gangen, og vær omhyggelig med at undgå aerosol-dannelse.
- For at opnå en effektiv parallel-forarbejdning af mange prøver anbefales det at fylde en holder med PT'er, hvortil spin-kolonnerne (PSC, PRC) kan overføres efter centrifugering. Kassér de brugte PT'er, der indeholder gennemløb, og anbring spin-kolonnerne (PSC, PRC) i nye PT'er, før de overføres tilbage til mikrocentrifugen.

Ting, der skal gøres før start

- Blod skal indsamles i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) efter anvisningerne i *PAXgene Blood RNA Tube-håndbogen*. I Bilag C (på side 79) findes anbefalinger vedr. håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Efter blodprøvetagningen skal PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkuberes i mindst 2 timer ved stuetemperatur for at sikre, at blodcellerne lyses fuldstændigt, og at RNA bundfalder. Inkubation af PAXgene Blood RNA Tube (BRT) natten over kan føre til et øget udbytte. Hvis den indledende blodinkubation ved stuetemperatur i 2 timer ikke blev udført før opbevaring ved 2-8 °C, -20 °C eller -70 °C, ækvilibreres PAXgene Blood RNA Tube (BRT) først til stuetemperatur, og derefter inkuberes det ved denne temperatur i 2 timer, før proceduren startes.
- Læs sikkerhedsinformationerne på side 18.
- Læs retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 76).
- Sørg for, at alle anvendte instrumenter, f.eks. pipetter og ryster-inkubator, regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens anvisninger.

- En ryster-inkubator er påkrævet i trin 5 og 20. Sæt temperaturen i ryster-inkubatoren til 55 °C.
- Bindingsbufferen (BR2) kan efter længere opbevaring danne bundfald. Det kan om nødvendigt opløses ved at opvarme bufferen til 37 °C.
- Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. For at fremstille en brugsklar opløsning skal der inden første brug tilsættes fire dele ethanol (96-100 % v/v, renhedsgrad p.a.), som angivet på flaskeetiketten.
- Før den første brug af RNase-Free DNase Set skal der tilberedes en DNase I-stamopløsning. Opløs DNase I i fast form (RNFD; 1500 Kunitz-enheder)* i 550 µl DNase-resuspensionsbuffer (DRB), som leveres med kittet. Sørg for, at der ikke spildes DNase I (RNFD), når hætteglasset åbnes. Den rekonstituerede DNase I (RNFD) må ikke blandes på en vortex-mixer. DNase I er meget modtageligt for fysisk denaturering. Blandingen bør kun foregå ved at vende hætteglasset forsigtigt.
- Rekonstitueret DNase I (RNFD) kan opbevares ved 2-8 °C i det originale hætteglas (stamopløsning) eller ved -20 °C, efter at stamopløsningen er fjernet fra hætteglasset og opdelt i portioner til engangsbrug (anvend 1,5 ml MCT, som leveres med sættet; der er nok til 5 alikvoter). Optøede alikvoter kan opbevares ved 2-8 °C. Prøverne må ikke genfryses efter optøning.
- Ved rekonstituering og opdeling af DNase I (RNFD) skal retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 76).

Procedure

1. Centrifuger PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 min. ved 3.000-5.000 × g i en rotor til svingbare centrifugebægre.

* Kunitz-enheden er den almindeligt anvendte enhed til opmåling af DNase I, defineret som den mængde DNase I, som forårsager en stigning i A_{260} på 0,001 pr. minut pr. milliliter ved 25 °C, pH 5,0, hvor der anvendes høj-polymeriseret DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 og 363).



Sørg for, at blodprøverne i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) blev inkuberet i mindst 2 timer ved stuetemperatur (15-25 °C) for at opnå fuldstændig lysering af blodcellerne og bundfald af RNA.



Rotoren skal være udstyret med adaptere til rundbandede rør. Hvis der anvendes andre typer adaptere, kan rørene blive beskadigede under centrifugeringen.

2. Fjern supernatanten ved at dekantere eller pipettere. Tilsæt 4 ml RNase-frit vand (RNFV) til pelletet, og luk røret med en ny sekundær BD Hemogard-sikkerhedslukning (følger med kittet).

Hvis supernatanten dekanteres, skal det sikres, at pelletet ikke forstyrres, og rørets kant skal tørres med en ren papirserviet.

3. Opløs pillen med en vortex-mixer, og centrifuger i 10 min. ved 3.000-5.000 × g med en rotor til svingbare centrifugebægre. Fjern og bortskaf supernatanten fuldstændigt.

Små cellerester, som befinder sig i supernatanten efter vortex, men før centrifugeringen, berører ikke proceduren.



Hvis supernatanten ikke fjernes fuldstændigt, bliver lyseringen hæmmet og lysatet fortyndet, hvilket har en negativ indvirkning på betingelserne for bindingen af RNA til PAXgene-membranen.

4. Tilsæt 350 µl resuspensionsbuffer (BR1), og bland på en vortex-mixer, indtil pelletet er fuldstændigt opløst.
5. Overfør prøven med en pipette til et 1,5 ml MCT. Tilsæt 300 µl bindingsbuffer (BR2) og 40 µl proteinase K (PK). Bland i ca. 5 sek. (vortex), og inkuber i 10 min. ved 55 °C i en ryster-inkubator ved en hastighed på 400-1400 rpm. Efter inkubationen øges ryster-inkubatorens temperatur til 65 °C (for trin 20).



Bland ikke bindingsbuffer (BR2) og proteinase K (PK), før de tilsættes prøven.

6. Pipetter lysatet direkte ind i PSC (lilla), som er anbragt i et 2 ml PT, og centrifuger i 3 min. ved maksimalt omdrejningstal (dog maks. 20.000 × g).



Overfør forsigtigt lysatet til spin-kolonnen (PSC) med en pipette, og kontrollér visuelt, at lysatet er fuldstændigt overført til spin-kolonnen (PSC).

For at undgå en eventuel beskadigelse af spin-kolonnerne (PSC, PAXgene Shredder Spin Column) og rørene (PT, Processing Tubes), må der ikke centrifugeres ved mere end $20.000 \times g$.



Visse prøver kan løbe gennem PSC uden centrifugering. Dette skyldes den lave viskositet i nogle prøver, og bør ikke opfattes som tegn på produktfejl.

7. Overfør forsigtigt hele supernatanten fra gennemstrømningsfraktionen til et nyt 1,5 ml MCT uden at forstyrre pelletet i PT.
8. Tilsæt 350 µl ethanol (96-100 % v/v, renhedsgrad p.a.). Bland og centrifugér kort (1-2 sek. ved $500-1000 \times g$) for at fjerne dråber fra indersiden af rørenes låg.



Der må ikke centrifugeres længere end 1-2 sek., da dette eventuelt fører til pelletering af nukleinsyrer og dermed til et reduceret udbytte af RNA i alt.

9. Pipettér 700 µl af prøven ind i en PRC (rød), som før blev anbragt i et 2 ml PT, og centrifugér i 1 min. ved $8.000-20.000 \times g$. Sæt spin-kolonnen (PRC) i et nyt 2 ml PT, og kassér det benyttede PT med gennemløbet.
10. Overfør resten af prøven til PRC med en pipette, og centrifugér i 1 min. ved $8.000-20.000 \times g$. Anbring spin-kolonnen (PRC) i et nyt 2 ml PT, og kassér det gamle PT med gennemløb.



Overfør forsigtigt prøven til spin-kolonnen (PRC) med en pipette, og kontrollér visuelt, at prøven er fuldstændigt overført til spin-kolonnen (PRC).

11. Overfør 350 µl vaskebuffer 1 (BR3) til PRC med en pipette. Centrifugér i 1 min. ved $8.000-20.000 \times g$. Anbring spin-kolonnen (PRC) i et nyt 2 ml PT, og kassér det gamle PT med gennemløb.

12. Tilsæt 10 µl DNase I (RNFD) stamopløsning til 70 µl DNA digestionsbuffer (RDD) i et 1,5 ml MCT. Bland ved forsigtigt at slå med fingrene på røret og centrifuger kort for at samle væskerester fra rørets væg.

For at forarbejde f.eks. 10 prøver tilsættes 100 µl DNase I (RNFD) stamopløsning til 700 µl DNA digestionsbuffer (RDD). Anvend de 1,5 ml MCT, der følger med kittet.



DNase I er meget modtageligt for fysisk denaturering. Opløsningen må kun blandes ved at slå med fingrene på røret. Undlad at vortexe.

13. Pipettér DNase I (RNDF)-inkubationsblandingen (80 µl) direkte på membranen i PRC, og lad den stå på bordet (20–30 °C) i 15 min.



Sørg for, at DNase I (RNDF) inkubationsblandingen kommer direkte på membranen. Hvis en del af blandingen hænger fast på væggen eller på O-ringen i spin-kolonnen (PRC), vil DNase-digestionen muligvis være ufuldstændig.

14. Pipettér 350 µl vaskebuffer 1 (BR3) ind i PRC, og centrifuger i 1 min. Ved 8.000–20.000 × g. Anbring spin-kolonnen (PRC) i et nyt 2 ml PT, og kassér det gamle PT med gennemløb.

15. Pipettér 500 µl vaskebuffer 2 (BR4) ind i PRC, og centrifuger i 1 min. Ved 8.000–20.000 × g. Anbring spin-kolonnen (PRC) i et nyt 2 ml PT, og kassér det gamle PT med gennemløb.



Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. Sørg for at der tilsættes ethanol til vaskebuffer 2 (BR4) før den første brug (se "Ting, der skal gøres før start", på side 25).

16. Tilsæt yderligere 500 µl vaskebuffer 2 (BR4) i PRC. Centrifuger i 3 min. ved 8.000–20.000 × g.

17. Kassér det PT, der indeholder gennemløbet, og anbring PRC i et nyt 2 ml PT. Centrifuger i 1 min. ved 8.000–20.000 × g.

18. Kassér det PT, der indeholder gennemløbet. Anbring PRC i et 1,5 ml MCT, og pipetter 40 µl elueringsbuffer (BR5) direkte på membranen i PRC. Centrifuger i 1 min. ved 8.000–20.000 × g for at eluere RNA.

For at opnå en maksimal elueringseffektivitet er det vigtigt, at hele membranen fugtes med elueringsbuffer (BR5).

19. Gentag elueringstrinnet (trin 18) som beskrevet med 40 µl elueringsbuffer (BR5) og det samme MCT.

20. Inkuber eluatet i 5 min. ved 65 °C i en ryster-inkubator (se trin 5), dog uden at ryste. Derefter køles prøverne straks med is.



Denne inkubation af prøver ved 65 °C denaturerer RNA til downstream-applikationer. Dette trin må ikke udelades, selv hvis downstream-applikationen inkluderer et varmedenatureringstrin. På dette tidspunkt er tilstrækkelig RNA-denaturering yderst vigtig for maksimal effektivitet ved downstream-applikationer.

Inkubationstiden eller –temperaturen må ikke overskrides.

21. Hvis RNA-prøverne ikke straks skal bruges, skal de opbevares ved -20 °C eller -70 °C.

Da RNAen forbliver denatureret, også efter flere ganges nedfrysning og optøning, er det ikke nødvendigt at gentage inkubationen ved 65 °C. Hvis RNA-prøverne skal bruges til en diagnostisk analyse, skal producentens angivelser overholdes.

For at få en nøjagtig RNA-quantificering ved absorbering ved 260 nm, anbefaler vi, at prøven fortyndes med 10 mM Tris-Cl, pH 7,5.* En fortynding af prøven med RNase-frit vand kan føre til lave værdier og ringe præcision.

Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i de prøver, der skal måles.

* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet.



Ved kvantificering i Tris-HCl-buffer bruges forholdet
 $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Se bilag B, side 77.

22. Luk alle flasker igen, der indeholder buffere og RNase-frit vand, hætteglas og rør, der indeholder enzymer og enzymbuffere, og poser, der indeholder plastikmaterialer fra det kit, der blev brugt til protokollen. Opbevar det resterende indhold af kittet som beskrevet i afsnittet "Opbevaring og håndtering af reagenser" (side 22) og "Stabilitet under brug" (side 22) indtil videre brug.

Protokol: Automatisk isolering af RNA i alt fra humant helblod indsamlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Vigtige anvisninger før start

- Det skal kontrolleres, at kittets æske er ubeskadiget, og at ingen af buffer-beholderne er utætte. Beskadigede kits må ikke anvendes.
- Ved brug af pipette skal det kontrolleres, at volumenet er indstillet korrekt, og at væsken opsuges og dispenseres fuldstændigt.
- For at undgå at overføre prøver til de forkerte rør og plastforbrugsvarer skal det sikres, at alle PT, MCT og rotoradaptere er korrekt mærket med en vandfast tusch. Mærk låget og kroppen på hvert MCT, kroppen på hvert PT og den ydre væg på hver rotoradapter.
- Spild af prøve- og buffervæsker under klargøringen kan nedsætte RNAs udbytte og renhed.
- Alle protokoltrin (inklusive centrifugeringerne) skal gennemføres ved stuetemperatur (15-25 °C), medmindre andet er angivet.

På grund af nukleinsyre-amplifikationsmetodernes høje sensitivitet skal følgende forholdsregler overholdes for at undgå krydskontaminering:

- Pipettér forsigtigt prøven til PT på bunden af hvert rør uden at fugte kanten af røret.
- Udskift altid pipettespidser mellem væskeoverførsler. Brug pipettespidser med aerosol-barriere.
- Undgå at røre ved membranen i spin-kolonnen (PSC, PRC) med pipettespidsen.
- Efter blandingen (vortex) eller opvarmning af et MCT skal det centrifugeres kortvarigt for at fjerne dråber fra lågets inderside.
- Brug handsker under hele proceduren. Skift handsker med det samme, hvis de kommer i berøring med prøven.

Ting, der skal gøres før start

- Blod skal indsamles i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) efter anvisningerne i *PAXgene Blood RNA Tube-håndbogen*. I Bilag C (på side 79) findes anbefalinger vedr. håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Efter blodprøvetagningen skal PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkuberes i mindst 2 timer ved stuetemperatur for at sikre, at blodcellerne lyses fuldstændigt, og at RNA bundfald. Inkubation af PAXgene Blood RNA Tube (BRT) natten over kan føre til et øget udbytte. Hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) efter blodprøvetagningen blev opbevaret ved 2-8 °C, -20 °C eller -70 °C, skal røret først bringes op på stuetemperatur og derefter opbevares ved stuetemperatur i to timer, før protokollen startes.
- Læs sikkerhedsinformationerne på side 18.
- Læs "Vigtige bemærkninger", side 57.
- Læs retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 76).
- Læs brugsanvisningen til QIAcube Connect MDx og al yderligere information, der følger med instrumentet, og vær ekstra opmærksom på sikkerhedsinformationen.
- Sørg for, at udstyr og instrumenter, såsom pipetter og QIAcube Connect MDx, regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens anvisninger.
- Bindingsbufferen (BR2) kan efter længere opbevaring danne bundfald. Det kan om nødvendigt opløses ved at opvarme bufferen til 37 °C.
- Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. For at fremstille en brugsklar opløsning skal der inden første brug tilsættes den mængde ethanol (96-100 % v/v, renhedsgrad p.a.), som er angivet på flaskeetiketten.

- Før den første brug af RNase-Free DNase Set skal der tilberedes en DNase I-stamopløsning. Opløs DNase I i fast form (RNFD; 1500 Kunitz-enheder)* i 550 µl DNase-resuspensionsbuffer (DRB), som leveres med kittet. Sørg for, at der ikke spildes DNase I (RNFD), når hætteglasset åbnes. Den rekonstituerede DNase I (RNFD) må ikke blandes på en vortex-mixer. DNase I er meget modtageligt for fysisk denaturering. Blandingen bør kun foregå ved at vende hætteglasset forsigtigt.
- Rekonstitueret DNase I (RNFD) kan opbevares ved 2-8 °C i det originale hætteglas (stamopløsning) eller ved -20 °C, efter at stamopløsningen er fjernet fra hætteglasset og opdelt i portioner til engangsbrug (anvend 1,5 ml MCT, som leveres med sættet; der er nok til 5 alikvoter). Optøede alikvoter kan opbevares ved 2-8 °C. Prøverne må ikke genfryses efter optøning.
- Ved rekonstituering og opdeling af DNase I (RNFD) skal retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 76).
- Monter den korrekte ryster-adapter (følger med QIAcube Connect MDx; brug adapteren til 2 ml sikkerhedsrør, markeret med "2"), og placer rysteholderen oven på adapteren.
- Kontroller affaldsskuffen, og tøm den hvis det er nødvendigt.
- Installer eventuelle relaterede protokoller, hvis de ikke allerede er installeret ved tidligere kørsler. QIAcube Connect MDx kræver, at alle tilhørende protokoller i den tilhørende zip-fil downloades. Se "Installation af protokoller på QIAcube Connect MDx", side 59.

* Kunitz-enheden er den almindeligt anvendte enhed til opmåling af DNase I, defineret som den mængde DNase I, som forårsager en stigning i A_{260} på 0,001 pr. minut pr. milliliter ved 25 °C, pH 5,0, hvor der anvendes høj-polymeriseret DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 og 363).

Procedure

1. Luk døren til QIAcube Connect MDx, og tænd for instrumentet med strømkontakten (se figur 15, side 58).

Der lyder et bip, og opstartsskærmen vises. Instrumentet udfører automatisk opstartstest.

2. Åbn lågen til QIAcube Connect MDx, og placer de nødvendige reagenser og det nødvendige plastictilbehør i instrumentet. Se "Isætning i QIAcube Connect MDx", side 60.

For at spare tid kan opfyldningen udføres under en eller begge de 10 min. centrifugetrin (trin 3 og 5).

3. Centrifuger PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 min. ved $3.000-5.000 \times g$ i en rotor til svingbare centrifugebægre.



Sørg for, at blodprøverne i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) blev inkuberet i mindst 2 timer ved stuetemperatur (15-25 °C) for at opnå fuldstændig lysering af blodcellerne og bundfald af RNA.



Rotoren skal være udstyret med adaptere til rundbundede rør. Hvis der anvendes andre typer adaptere, kan rørene blive beskadigede under centrifugeringen.

4. Fjern supernatanten ved at dekantere eller pipettere. Hvis supernatanten dekanteres, skal det sikres, at pelletet ikke forstyrres, og rørets kant tørres med en ren papirserviet. Tilsæt 4 ml RNase-frit vand (RNFV) til pelletet, og luk røret med en ny sekundær BD Hemogard-sikkerhedslukning (følger med kittet).
5. Opløs pillen med en vortex-mixer, og centrifuger i 10 min. ved $3.000-5.000 \times g$ med en rotor til svingbare centrifugebægre. Fjern og bortskaf supernatanten fuldstændigt.

Små cellerester, som befinder sig i supernatanten efter vortex, men før centrifugeringen, berører ikke proceduren.



Hvis supernatanten ikke fjernes fuldstændigt, bliver lyseringen hæmmet og lysatet fortyndet, hvilket har en negativ indvirkning på betingelserne for bindingen af RNA til PAXgene-membranen.

6. Tilsæt 350 µl resuspensionsbuffer (BR1), og bland på en vortex-mixer, indtil pelletet er fuldstændigt opløst.

7. Overfør prøven med en pipette til et 2 ml PT.



Brug de PT'er på 2 ml, der leveres med PAXgene Blood RNA Kit.

8. Sæt de åbne PT'er, der indeholder prøver, i QIAcube Connect MDx-rysteren (se figur 18, side 62). Prøvepositionerne har numre, så de er nemmere at fylde. Sæt rysterholderpropper (følger med QIAcube Connect MDx) i pladserne ved kanten af rysterholderen, ved siden af hvert PT. Dette tillader detektion af prøver under opfyldningskontrol.



Sørg for, at den korrekte ryster-adapter (ryster-adapter, 2 ml, sikkerhedsrør, markeret med "2", følger med QIAcube Connect MDx) er installeret.



Ved forarbejdning af færre end 12 prøver skal rysterholderen fyldes som vist i figur 22, side 66. Det er ikke muligt at forarbejde én (1) eller 11 prøver. Positionsnumrene i rysterholderen svarer til positionsnumrene i centrifugen.

9. Luk QIAcube Connect MDx-døren (se figur 15, side 58).

10. Vælg protokollen "PAXgene Blood RNA Part A", og start den.

Følg instruktionerne på berøringskærmen til QIAcube Connect MDx.



Sørg for, at begge programdele (del A og del B) er installeret på QIAcube Connect MDx (se "Installation af protokoller på QIAcube Connect MDx", side 59).



Instrumentet vil udføre opfyldningskontrol for prøver, spidser, rotoradaptere og reagensflasker.

11. Når protokollen "PAXgene Blood RNA Part A" er færdig, åbnes QIAcube Connect MDx-døren (se figur 15, side 58). Fjern og bortskaf PRC fra rotoradapterne og de tomme PT fra rysteren.



Under kørslen overføres spin-kolonnerne fra rotoradapterposition 1 (lågposition L1) til rotoradapterposition 3 (lågposition L2) af instrumentet (se figur 20, side 64).

12. Luk lågene på alle 1,5 ml MCT'er, der indeholder den oprensede RNA i rotoradapterne (position 3, lågposition L3, se Figur 20, side 64). Overfør 1,5 ml MCT'er til QIAcube Connect MDx-ryster-adapteren (se Figur 18, side 62).

13. Luk QIAcube Connect MDx-døren (se figur 15, side 58).

14. Vælg protokollen "PAXgene Blood RNA Part B", og start den.

Følg instruktionerne på berøringskærmen til QIAcube Connect MDx.



Dette program inkuberer prøverne ved 65 °C og denaturerer RNA'en til downstream-applikationer. Dette trin må ikke udelades, selv hvis downstream-applikationen inkluderer et varmedenatureringstrin. På dette tidspunkt er tilstrækkelig RNA-denaturering yderst vigtig for maksimal effektivitet ved downstream-applikationer.

15. Når protokollen "PAXgene Blood RNA Part B"-programmet er færdigt, åbnes QIAcube Connect MDx-døren (se figur 15, side 58). Placer straks MCT med den oprensede RNA på is.



ADVARSEL: Varm overflade. Rysterens temperatur kan nå op på 70 °C. Undgå berøring, når den er varm.



Efterlad ikke den oprensede RNA i QIAcube Connect MDx. Da prøverne ikke er afkølede, kan den oprensede RNA nedbrydes. Ubemandede klargøringer af prøver natten over kan derfor ikke anbefales.

16. Hvis RNA-prøverne ikke straks skal bruges, skal de opbevares ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eller $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Da RNA'en forbliver denatureret efter gentagen frysning og optøning, er det ikke nødvendigt at gentage varmeinkuberingsprotokollen ("PAXgene Blood RNA Part B"). Hvis RNA-prøverne skal bruges til en diagnostisk analyse, skal producentens angivelser overholdes.

For at få en nøjagtig RNA-quantificering ved absorbering ved 260 nm, anbefaler vi, at prøven fortyndes i 10 mM Tris-Cl, pH 7,5.* En fortynding af prøven med RNase-frit vand kan føre til lave værdier og ringe præcision.

Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i de prøver, der skal måles. Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet.



Ved kvantificering i Tris-HCl-buffer bruges forholdet

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/ml}$. Se bilag B, side 77.

17. Fjern reagensflaskeholderen fra QIAcube Connect MDx-arbejdsbordet (se figur 18, side 62), og luk alle reagensflasker med de korrekt mærkede låg. Luk alle flasker igen, der indeholder buffere og RNase-frit vand, hætteglas og rør, der indeholder enzymer og enzymbuffere, og poser, der indeholder plastikmaterialer fra det kit, der blev brugt til protokollen. Opbevar det resterende indhold af kittet og reagensflaskerne som beskrevet i afsnittet "Opbevaring og håndtering af reagenser" (side 22) og "Stabilitet under brug" (side 22) indtil videre brug.

Fjern og bortskaf resterende reagenser i PT i MCT-pladser for QIAcube Connect MDx. Fjern og bortskaf rotoradaptere fra centrifugen. Tøm QIAcube Connect MDx-affaldsskuffen (se figur 15, side 58). Luk instrumentets låg, og sluk for instrumentet på kontakten.

* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Begrænsninger af produktets anvendelse

PAXgene Blood RNA Kit er beregnet til isolering af intracellulært RNA fra humant helblod ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytter/ml) til in vitro-diagnostisk anvendelse. Det er ikke beregnet til isolering af genomisk DNA eller virale nukleinsyrer fra humant helblod. Grundet det begrænsede antal transkriptioner, der er valideret til stabiliserings-specifikationer (FOS- og IL1B-gentranskriptioner), kan der ikke angives ydelseskaraktistika for alle transkriptioner. Brugere skal gennemgå både deres egne og producentens data for at afgøre, om det er nødvendigt at validere andre transkriptioner. Komponenterne i sættet er kun beregnet til at blive brugt i den manuelle og automatiserede protokol, som er beskrevet i denne brugsanvisning.

Anvisninger vedrørende anvendelsen af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) findes i *PAXgene Blood RNA Tube-håndbogen*.

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringsystem testes hvert lot af PAXgene Blood RNA Kit efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

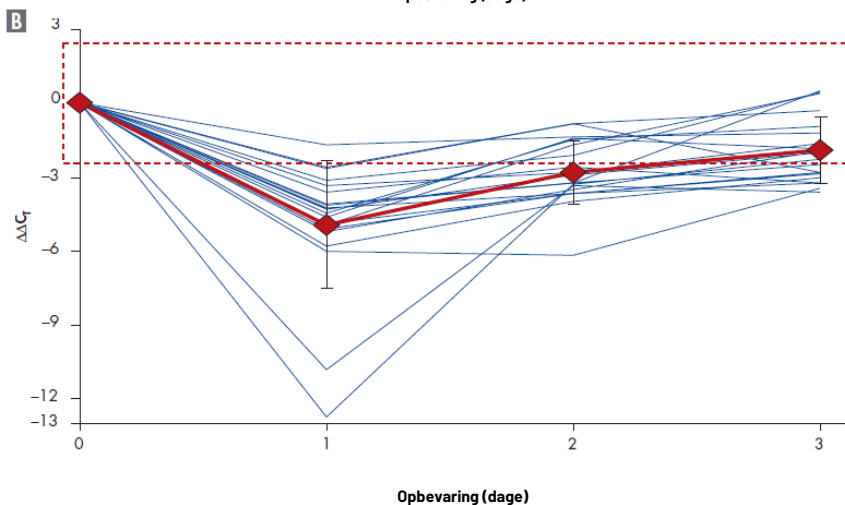
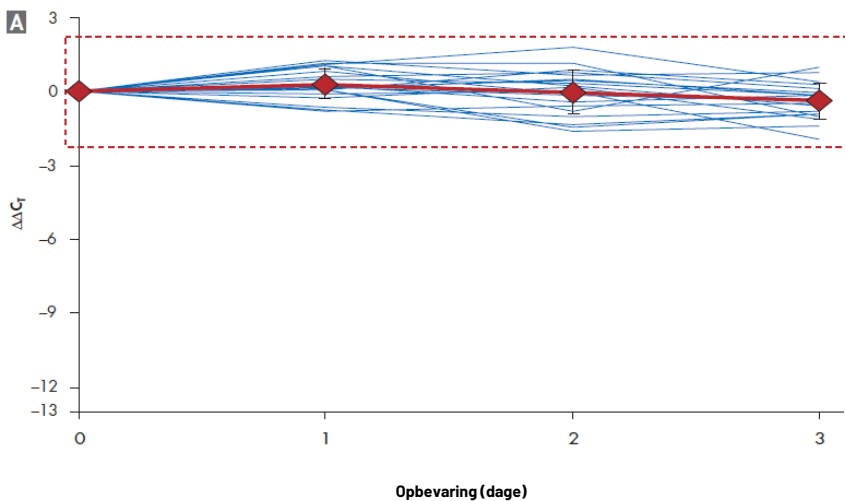
Ydelseskarakteristika

Prøvetagning og stabilisering

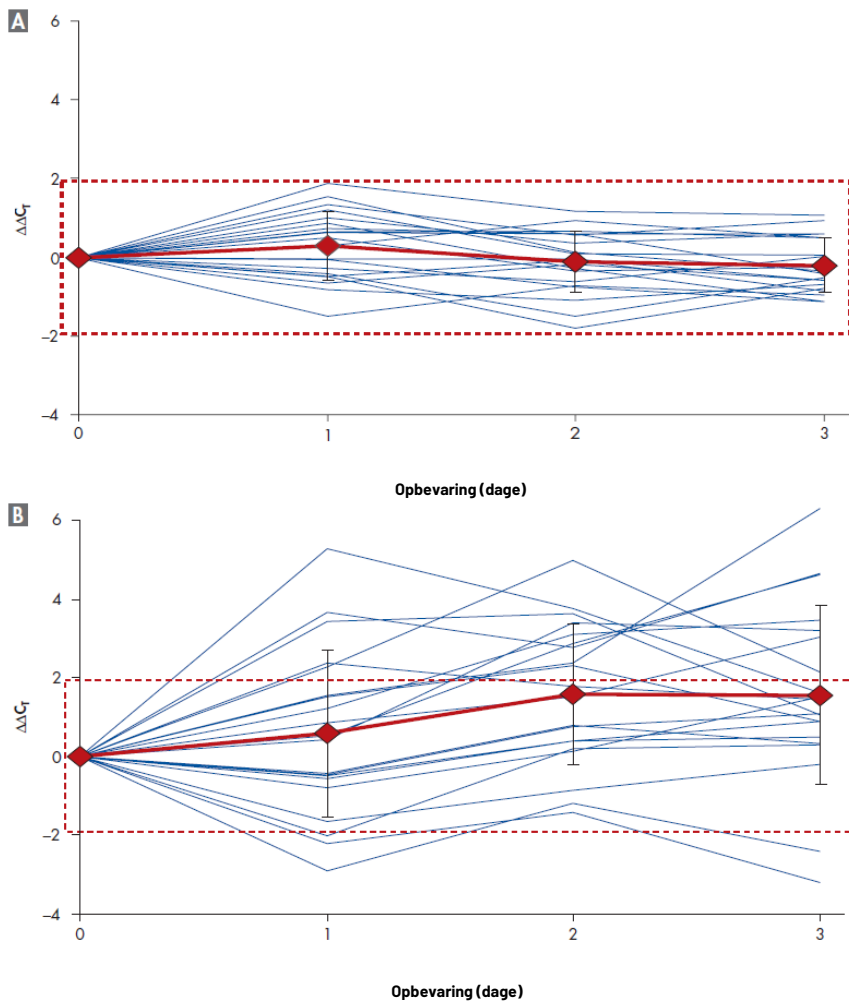
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) indeholder et proprietært RNA-stabiliseringsreagens. Dette additiv beskytter RNA-molekyler mod nedbrydning gennem RNaser og minimerer ex vivo-forandringer af genekspressionen. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) er beregnet til indsamling af humant helblod og stabilisering af cellulært RNA i op til 3 dage ved 18-25 °C (figur 4 og figur 5, siderne 41 og 42) eller op til 5 dage ved 2-8 °C (figur 6 og figur 7, siderne 43 og 44). Desuden kan stabiliseret blod opbevares frosset. Aktuelt tilgængelige data viser, at den cellulære RNA er stabil i mindst 11 år ved -20 °C eller -70 °C*. Gå ind på **ww** for at få flere oplysninger om igangværende undersøgelser af endnu længere stabiliseringstider. **ww.preanalytix.com** eller kontakt QIAGEN Teknisk Service.

Den faktiske varighed af RNA-stabiliseringen kan variere alt efter RNA-specien og den anvendte downstream-applikation. Grundet det begrænsede antal transkriptioner, der er valideret til stabiliseringsspecifikationer (FOS- og IL1B-gentranskriptioner), kan der ikke angives ydelseskarakteristika for alle transkriptioner. Brugerne skal gennemgå både deres egne og producentens data for at afgøre, om det er nødvendigt at validere andre transkriptioner.

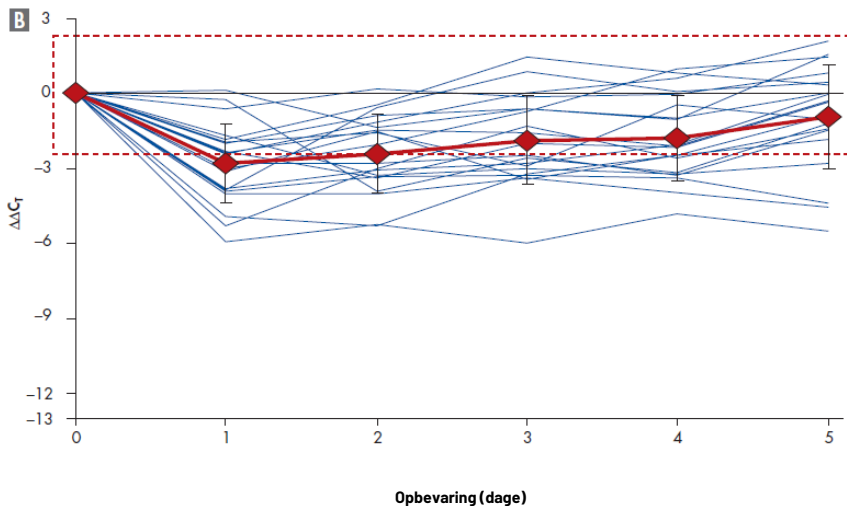
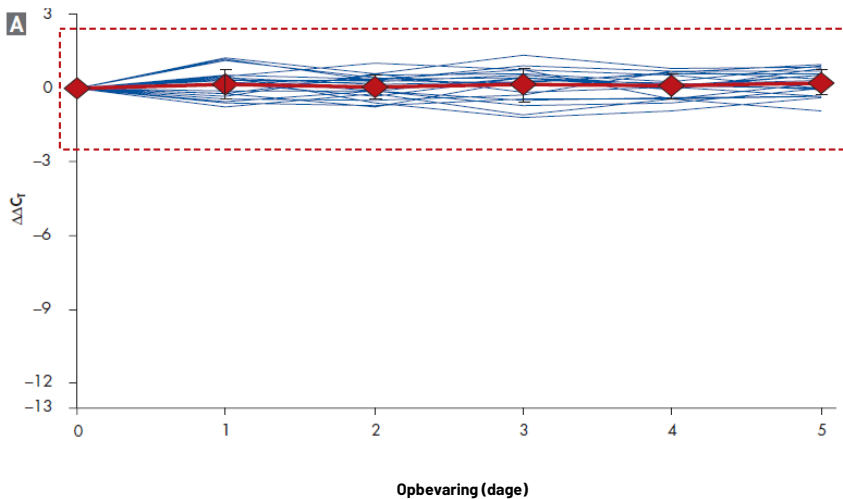
* En langtidsundersøgelse af opbevaring af blod i PAXgene Blood RNA Tubes er under udførelse.



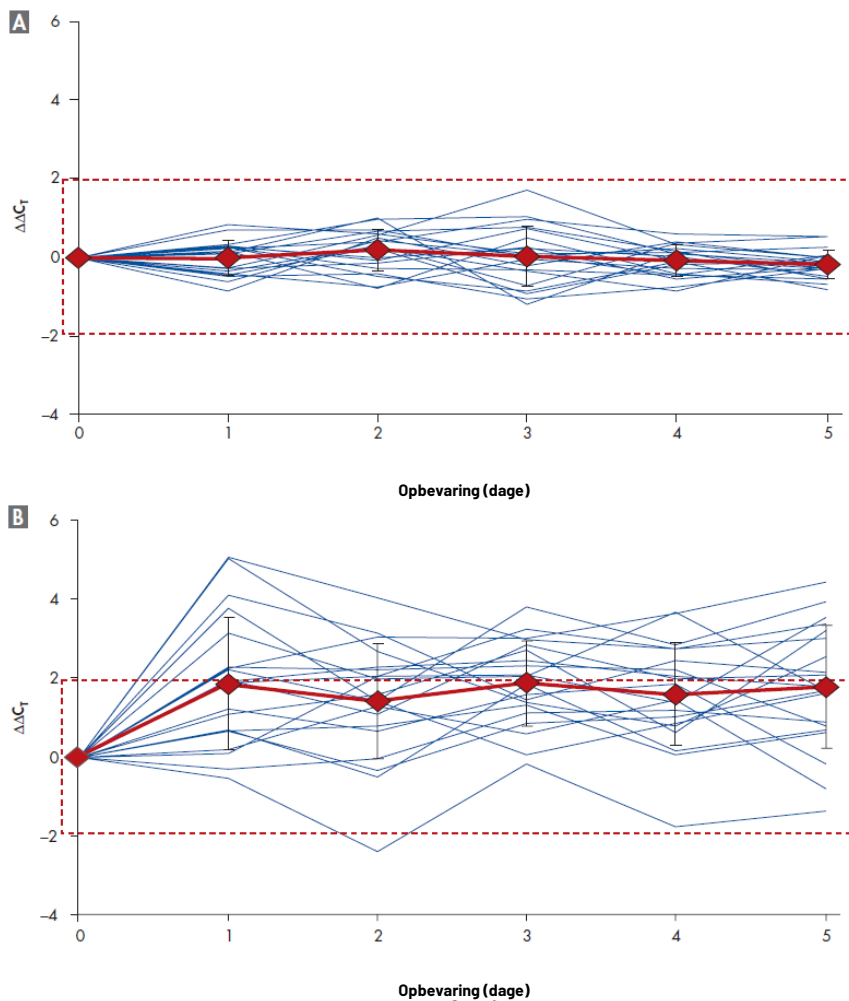
Figur 4: RNA-stabilitet i blodprøver ved 18-25 °C: FOS. Der blev taget blodprøver i duplikat fra 10 tilsyneladende raske donorer, og prøverne blev opbevaret ved 18-25 °C i det angivne antal dage, efterfulgt af RNA i alt-isolering. **[A]** Blodet blev indsamlet og opbevaret i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), og RNA i alt blev oprenset med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blodet blev indsamlet og opbevaret i standardblodprøvetagningsrør med EDTA som antikoagulant, og RNA i alt blev oprenset med en standardisoleringsmetode med organiske opløsningsmidler og RNA-rensning med silica-baseret membran. De relative FOS-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdierne for alle prøver er opført med middelværdi og standardafvigelse for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed af analysen ($\pm 3 \times$) (2,34 C_T).



Figur 5: RNA-stabilitet i blodprøver ved 18-25 °C: IL1B. Der blev udtaget blod, og RNA i alt blev oprenset efter opbevaring ved 18-25°C som beskrevet i figur 4. De relative IL1B-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdierne for alle prøver er opført med middelværdi og standardafvigelse for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed af analysen ($\pm 3 \times$) (1,93 C_T).



Figur 6: RNA-stabilitet i blodprøver ved 2-8 °C: FOS. Der blev taget blodprøver i duplikat fra 10 donorer, og prøverne blev opbevaret ved 2-8 °C i det angivne antal dage, efterfulgt af RNA i alt-isolering. **[A]** Blodet blev indsamlet og opbevaret i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), og RNA i alt blev oprenset med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blodet blev indsamlet og opbevaret i standardblodprøvetagningsrør med EDTA som antikoagulant, og RNA i alt blev oprenset med en standardisoleringsmetode med organiske opløsningsmidler og RNA-rensning med silica-baseret membran. De relative FOS-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdierne for alle prøver er opført med middelværdi og standardafvigelse for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed af analysen ($\pm 3 \times$) (2,34 C_t).



Figur 7: RNA-stabilitet i blodprøver ved 2-8 °C: IL1B. Der blev udtaget blod, og RNA i alt blev oprenset efter opbevaring ved 2-8°C som beskrevet i figur 6. De relative IL1B-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdierne for alle prøver er opført med middelværdi og standardafvigelse for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed af analysen ($\pm 3 \times$) (1,93 C_T).

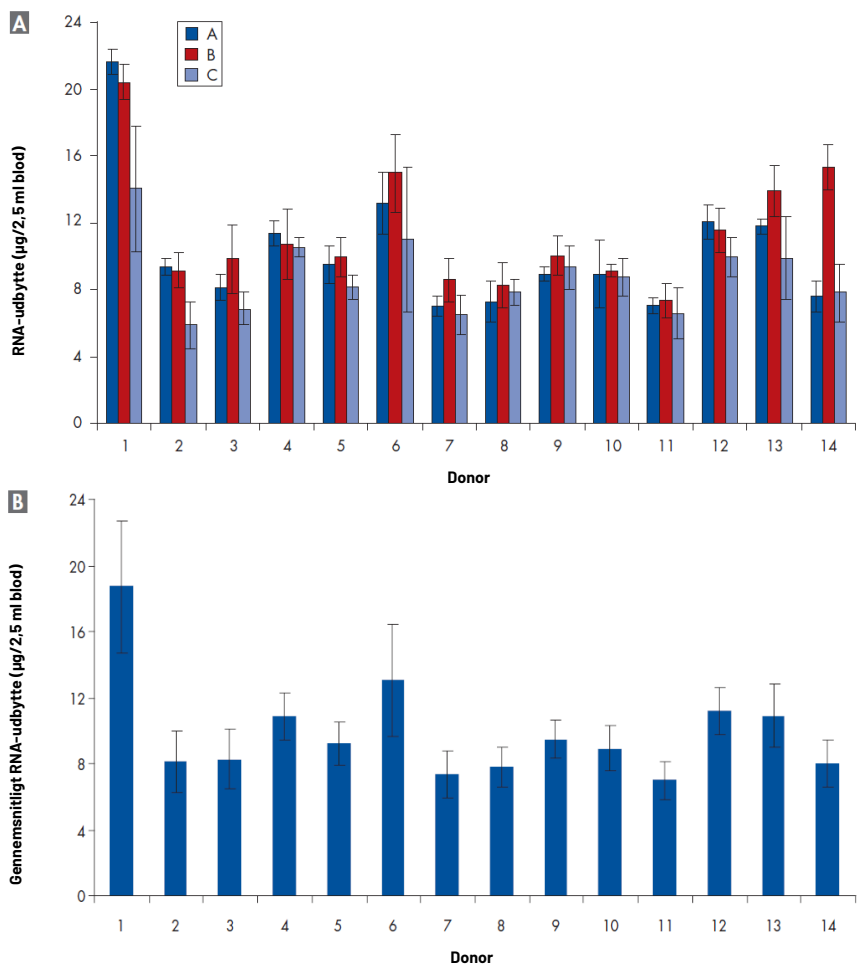
Manuel RNA-isolering

RNA i alt oprenset ved hjælp af PAXgene Blood RNA System er rent. Anvendes den manuelle protokol, er værdierne A_{260}/A_{280} mellem 1,8 og 2,2 og $\leq 1\%$ (w/w) genomisk DNA til stede i $\geq 95\%$ af alle prøver, som målt af kvantitativ real-time PCR af en sekvens af beta-actin-genet. Mindst 95 % af prøverne viser ingen hæmning i RT-PCR, når eluatet tegner sig for op til 30 % af RT-PCR-reaktionsvolumenet.

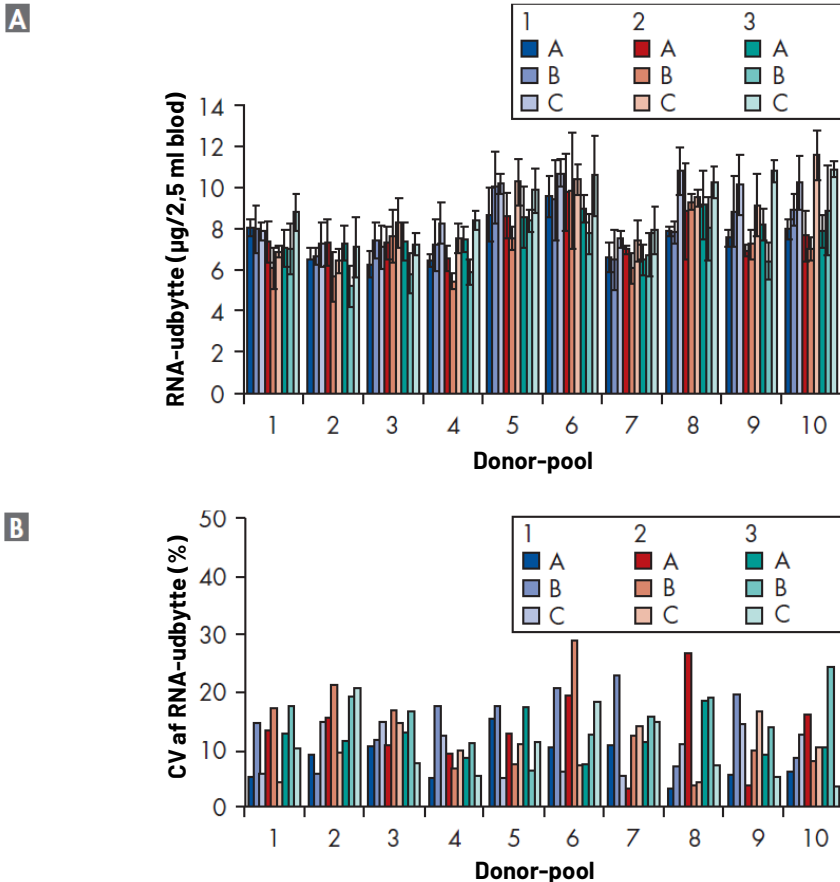
Når den manuelle protokol følges, er gennemsnitstiden for klargøring af prøve (baseret på data fra 12 prøveklargøringer) ca. 90 min.*, hvoraf den rene håndteringstid udgør ca. 40 min. RNA-udbyttet fra 2,5 ml sundt humant helblod er $\geq 3\ \mu\text{g}$ for $\geq 95\%$ af de forarbejdede prøver. Da udbyttet afhænger stærkt af donorerne, kan de enkelte udbytter variere. For individuelle donorer leverer PAXgene Blood RNA System yderst reproducerbare og gentagelige udbytter (se figur 8 og figur 9 på side 46 og 47), såvel som reproducerbare og gentagelige RT-PCR-resultater (se figur 10 og figur 11 på side 51 og 52), hvilket gør det velegnet til klinisk-diagnostiske undersøgelser.

Figur 8 (side 46) viser den generelle reproducerbarhed og gentagelighed for PAXgene Blood RNA System. Der blev foretaget yderligere undersøgelser for at påvise, hvilken indflydelse forskellige lots af PAXgene Blood RNA kit og forskellige laboranter havde på reproducerbarheden af RNA-udbyttet og realtids-RT-PCR-resultaterne. Eftersom der blev anvendt poolede blodprøver i stedet for individuelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), gengiver forsøgsresultaterne ikke systemets gentagelsespræcision, herunder fluktuationer mellem de enkelte blodindsamlinger, men kun gentagelsespræcisionen for klargøringen af prøven (se figur 9, side 47).

* Den samlede kørselstid for protokollen, inklusive den første håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugeringer, vask og resuspension af pelletet).



Figur 8: Reproducerbar og gentagelig RNA-isolering. Firedobbelte blodprøver fra 14 donorer blev alle manuelt behandlet af tre forskellige laboranter (A, B og C). Der blev benyttet tre forskellige sæt udstyr, og alle prøver, der var blevet klargjort af en enkelt laborant, blev behandlet med det samme udstyr. [A] Middelværdier og standardafvigelser for RNA-udbyttet pr. gentaget prøve fra samme donorer og forskellige laboranter vises. [B] 12 gentagne blodprøver fra hver af de 14 donorer blev forarbejdet af de 3 forskellige laboranter. Middelværdier og standardafvigelser for RNA-udbyttet pr. prøve fra samme donor og alle laboranter vises. Ved alle RNA-prøver var A_{280}/A_{260} -forholdet i området fra 1,8 til 2,2.



Figur 9: Gentagelighed og reproducerbarhed af RNA-udbyttet for forskellige laboranter og forskellige lots af PAXgene Blood RNA Kits ved anvendelse af poolede blodprøver. Der blev indsamlet blodprøver fra 30 donorer i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 rør pr. donor, dvs. i alt 360 rør). Indholdet af rørene fra 3 donorer blev poollet og derefter delt i alikvoter på 36 prøver. Disse 36 prøver pr. 3-donor-pool blev behandlet manuelt af tre forskellige laboranter. Hver laborant anvendte 3 forskellige lots af PAXgene Blood RNA Kit til isolering af RNA og forarbejdede firdobbelte prøver fra hver af de ti donor-pools. **[A]** RNA-udbytte og standardafvigelse for hver kombination af laborant og lot. Firdobbelte blodprøver fra 10 donor-pools blev forarbejdet af 3 forskellige laboranter (A, B og C) med hver af tre kit-lots (1, 2, 3). Der vises middelværdier af udbyttet (kolonner) og standardafvigelser (fejlbjælker) pr. firedobbelte prøve fra den samme donor-pool for forskellige laboranter og kit-lots. **[B]** Variationskoefficienten (CV) af RNA-udbytte pr. donor-pool for alle kombinationer af laborant og lot (A, B, C; 1, 2, 3), udregnet fra middelværdi og standardafvigelse for udbyttet, som er vist i figur 9A.

Table 1A: Reproducibility for each lot and user for selected donor-pools (1, 6, 9, 10)

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

Tabel 1B: Reproducerbarhed inden for hver bruger og mellem alle lots til valgte donor-pools (1, 6, 9, 10)

Kombination af data	Donor-pool 1 ($5,1 \times 10^6$ celler/ml)			Donor-pool 6 ($6,5 \times 10^6$ celler/ml)		
	Gennemsnitligt udbytte (μg)	SD (μg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (μg)	SD (μg)	CV (%)
Bruger A, alle lots	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Bruger B, alle lots	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Bruger C, alle lots	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
	Donor-pool 9 ($8,4 \times 10^6$ celler/ml)			Donor-pool 10 ($10,2 \times 10^6$ celler/ml)		
	Gennemsnitligt udbytte (μg)	SD (μg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (μg)	SD (μg)	CV (%)
Bruger A, alle lots	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Bruger B, alle lots	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Bruger C, alle lots	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

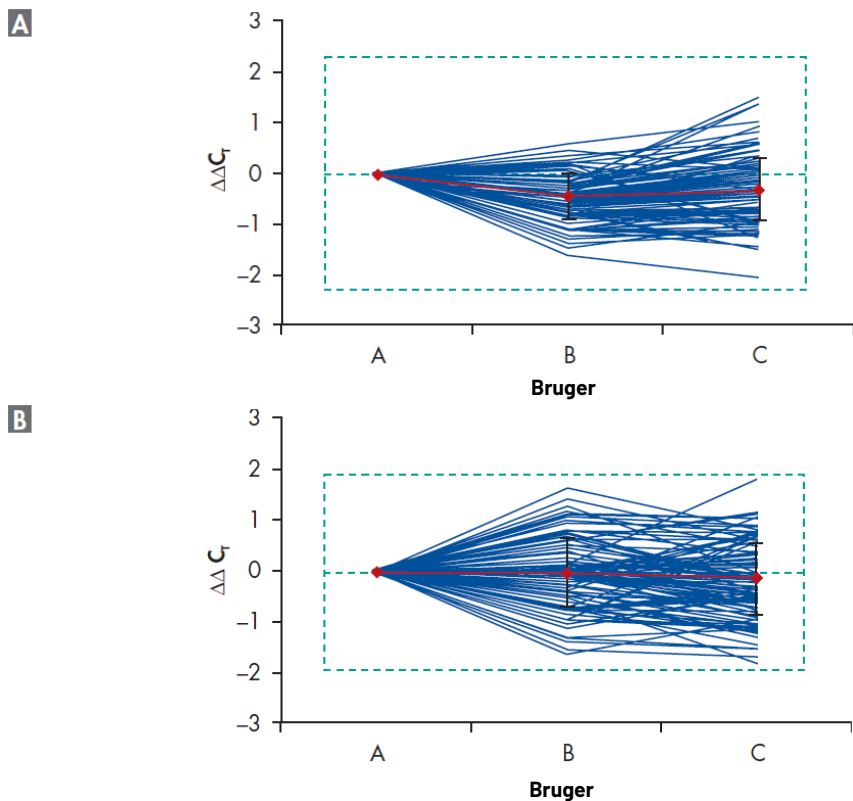
Tabel 1C: Reproducerbarhed inden for hver bruger og mellem alle brugere til valgte donor-pools (1, 6, 9, 10)

Kombination af data	Donor-pool 1 ($5,1 \times 10^6$ celler/ml)			Donor-pool 6 ($6,5 \times 10^6$ celler/ml)		
	Gennemsnitligt udbytte (μg)	SD (μg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (μg)	SD (μg)	CV (%)
Lot 1, alle brugere	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lot 2, alle brugere	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lot 3, alle brugere	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
	Donor-pool 9 ($8,4 \times 10^6$ celler/ml)			Donor-pool 10 ($10,2 \times 10^6$ celler/ml)		
	Gennemsnitligt udbytte (μg)	SD (μg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (μg)	SD (μg)	CV (%)
Lot 1, alle brugere	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lot 2, alle brugere	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lot 3, alle brugere	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

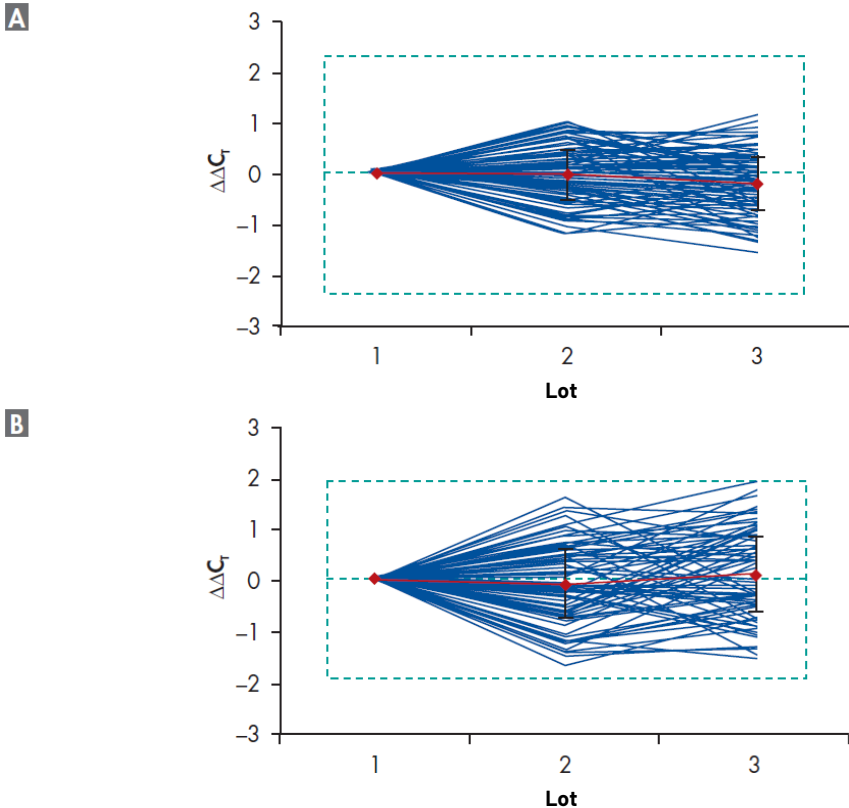
Tabel 1D: Reproducerbarhed mellem alle lots og alle brugere til valgte donor-pools (1, 6, 9, 10)

Kombination af data	Donor-pool 1 ($5,1 \times 10^6$ celler/ml)			Donor-pool 6 ($6,5 \times 10^6$ celler/ml)		
	Gennemsnitligt udbytte (μg)	SD (μg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (μg)	SD (μg)	CV (%)
Lot 1, alle brugere	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Donor-pool 9 ($8,4 \times 10^6$ celler/ml)			Donor-pool 10 ($10,2 \times 10^6$ celler/ml)		
	Gennemsnitligt udbytte (μg)	SD (μg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (μg)	SD (μg)	CV (%)
Lot 1, alle brugere	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detaljeret analyse af 4 repræsentative donor-pools. Pools blev valgt i henhold til antallet af hvide blodlegemer og viser høje, mellem og lave værdier i det normale område for antallet af hvide blodlegemer ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytter/ml). Antallet af hvide blodlegemer repræsenterer gennemsnitsværdien af de 3 tællinger af hvide blodlegemer fra de 3 donorer pr. donor-pool.



Figur 10: Reproducerbarhed for RT-PCR – mellem brugere. RNA, som blev oprenset i det eksperiment, der er beskrevet i figur 9, blev benyttet til real-time RT-PCR. De relative [A] FOS og [B] IL1B-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdier for alle prøver vises relativt til værdierne af bruger A (10 donor-pools \times 3 kit-lots \times 4 gentagelser = 120 datasæt for hvert gen) med middelværdi (rød linje) og standardafvigelse (sort, lodret bjælke) for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed af analyserne ($\pm 3 \times$) (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Figur 11: Reproducerbarhed af RT-PCR – mellem kit-lots. RNA, som blev oprenset i det eksperiment, der er beskrevet i figur 9, blev benyttet til real-time RT-PCR. De relative [A] FOS og [B] IL1B-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med real time-duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdier for alle prøver vises relativt til værdierne for kitlot 1 (10 donor-pools × 3 brugere × 4 gentagelser = 120 datasæt for hvert gen) med middelværdi (rød linje) og standardafvigelse (sort, lodret bjælke) for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed af analyserne ($\pm 3 \times$) (FOS: $2,34 C_T$; IL1B: $1,93 C_T$).

Tabel 2: Sammenfatning af RT-PCR-data fra figur 10 og figur 11

Testsystem	FOS/18S rRNA-analyse		IL1B/18S rRNA-analyse	
Sammenligning af data	Middelværdi ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Middelværdi ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reproducerbarhed inden for hver bruger og mellem alle lots				
Alle brugere, lot 1 – lot 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle brugere, lot 1 – lot 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Alle brugere, lot 1 – lot 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproducerbarhed inden for hver bruger og mellem alle lots				
Alle lots, bruger A – bruger A	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle lots, bruger A – bruger B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Alle lots, bruger A – bruger C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Bruger: Laborant, udførte undersøgelsen.

Lot: Lotnummer for det anvendte kit.

SD: Standardafvigelse.

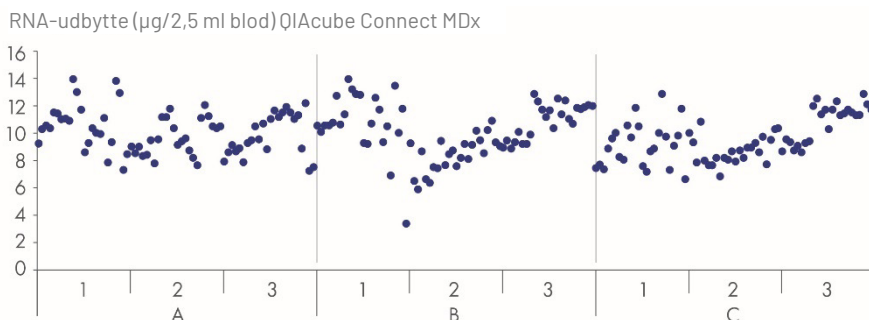
Middelværdi $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) og standardafvigelse er vist for de data, som præsenteres i figur 10 og figur 11.

Automatisk RNA-isolering

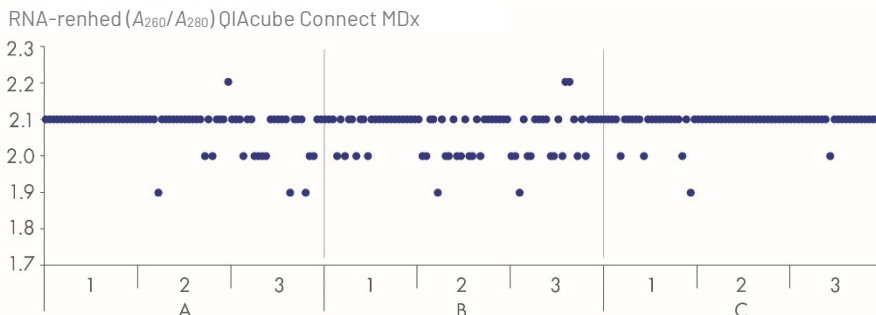
RNA-udbyttet fra 2,5 ml sundt humant helblod er $\geq 3 \mu\text{g}$ for $\geq 95 \%$ af de forarbejdede prøver. Figur 12 (side 54) viser RNA-udbyttet fra 216 prøver der blev forberedt med den automatiske protokol, med 3 kitlots af 3 operatører. Eftersom der blev brugt poolede blodprøver i stedet for individuelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) til disse undersøgelser, viser resultaterne ikke det forventede RNA-udbyttet fra enkelte prøver i individuelle blodindsamlinger. Da udbyttet afhænger stærkt af donorerne, kan de enkelte udbytter variere (figur 12, side 54).

Mindst 95 % af prøverne viser ingen hæmning i RT-PCR, når eluatet tegner sig for op til 30 % af RT-PCR-reaktionsvolumenet. Hvis den automatiske protokol bruges, kan krydskontaminering mellem prøver ikke detekteres, som målt i kvantitativ, realtids RT-PCR af sekvenser af ABL1- og FOS-transkriptioner i RNA-negative prøver (vand) mod RNA-positive prøver (humant helblod) i samme kørsel.

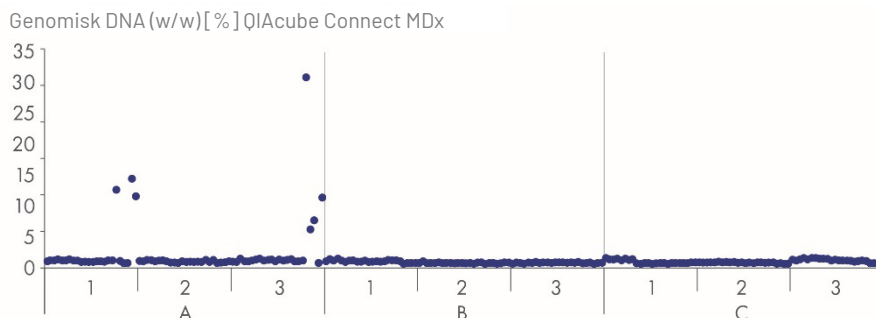
RNA, der er isoleret med PAXgene Blood RNA System og den automatiske protokol, er ren, som det fremgår af manglen på RT-PCR-hindring og A_{260}/A_{280} -værdier mellem 1,8 og 2,2. Genomisk DNA er til stede ved $\leq 1\%$ (w/w) i $\geq 95\%$ af alle prøver, som målt i kvantitativ, real-time PCR af en sekvens af beta-actin-genet. Figur 13 og figur 14 (side 55) viser A_{260}/A_{280} -værdierne og relativt genomisk DNA af de i alt 216 prøver, der er klargjort med den automatiske protokol med 3 kitlots af 3 operatører.



Figur 12: RNA-udbytte – automatisk forarbejdning med QIAcube Connect MDx. Blodprøver fra individuelle donorer blev indsamlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Rørenes indhold blev poollet i 6 donor-pools og derefter delt i alikvoter. Der blev behandlet i alt 216 rør (36 rør pr. pool) af 3 forskellige laboranter (A, B, C). Hver operatør anvendte PAXgene Blood RNA Kit fra 3 forskellige lots (1, 2, 3) til automatisk isolering med QIAcube Connect MDx og forarbejdede firdobbelte prøver fra hver af de 6 donor-pools. RNA-udbytte for alle individuelle prøver er vist for hver kombination af laborant og lot.



Figur 13: RNA-renhed (A_{260}/A_{280} -værdier) – automatisk forarbejdning med QIAcube Connect MDx. RNA blev oprenset af 3 forskellige operatører (A, B, C) med 3 forskellige lots (1, 2, 3) af PAXgene Blood RNA Kit med QIAcube Connect MDx i det eksperiment, der er beskrevet i figur 12. A_{260}/A_{280} -værdier for alle individuelle prøver er vist for hver kombination af laborant og lot.



Figur 14: RNA-renhed (% genomisk DNA-forening) – automatisk forarbejdning med QIAcube Connect MDx. RNA blev oprenset af 3 forskellige operatører (A, B, C) med 3 forskellige lots (1, 2, 3) af PAXgene Blood RNA Kit med QIAcube Connect MDx i det eksperiment, der er beskrevet i figur 12. Genomiske DNA-mængder (w/w) for alle individuelle prøver er vist for hver kombination af laborant og lot.

Den automatiske protokol for RNA-isolering med PAXgene Blood RNA System giver RT-PCR-resultater med høj reproducerbarhed og gentagelighed, hvilket gør den meget robust til klinisk-diagnostiske tests.

Stabilitet af isoleret RNA

RNA-prøver, som er isoleret fra blodfyldte PAXgene Blood RNA Tubes med PAXgene Blood RNA Kit er stabile i 5 år ved opbevaring ved -20°C og i 7 år ved opbevaring ved -70°C (endepunkt for undersøgelser).

Vigtige bemærkninger

Anvendelse af QIAcube Connect MDx

Brugeren skal være bekendt med betjeningen af QIAcube Connect MDx. Læs venligst instrumentets brugervejledning og al yderligere information, der følger med instrumentet, og vær ekstra opmærksom på sikkerhedsinformationen, før den automatiske PAXgene Blood RNA-protokol påbegyndes.

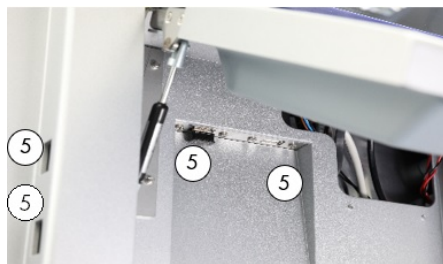
Start af QIAcube Connect MDx

Luk døren til QIAcube Connect MDx, og tænd for instrumentet med strømkontakten (se figur 15, side 58).

Der lyder et bip, og opstartsskærmen vises. Instrumentet udfører automatisk opstartstest.



QIAcube Connect MDx set forfra



Berøringskærmen trukket ud



QIAcube Connect MDx set bagfra (venstre side)



QIAcube Connect MDx set bagfra (højre side)

Figur 15: Eksterne funktioner på QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ① Berøringsskærm ② Låge ③ Affaldsskuffe ④ Strømafbryder | <ul style="list-style-type: none"> ⑤ 2 USB-porte på venstre side af berøringskærmen; 2 USB-porte bag berøringskærmen (Wi-Fi-modul tilsluttet 1 USB-port) ⑥ RJ-45 Ethernet-port ⑦ Stik til elledningen ⑧ Køleluftudtag |
|--|---|

Berøringsskærm

QIAcube Connect MDx styres via en berøringskærm. Berøringskærmen giver brugeren mulighed for at betjene instrumentet og guide brugeren gennem konfigurationen af arbejdsbordet. Under prøvebehandling viser berøringskærmen protokolstatus og resterende tid.





Figur 16: Berøringskærm trukket ud på QIAcube Connect MDx.

Installation af protokoller på QIAcube Connect MDx

En indledende protokollinstallation kan være påkrævet, før den første RNA-klargøringskørsel kan udføres på QIAcube Connect MDx. Installer begge protokollerne "PAXgene Blood RNA Part A" og "PAXgene Blood RNA Part B".

På www.qiagen.com finder man protokoller til QIAcube Connect MDx, som skal downloades til den USB-nøgle, der følger med instrumentet. Disse protokoller overføres til instrumentet via USB-porten.

USB-porten (placeret på siden af berøringskærmen, se figur 15, side 58) gør det muligt at koble QIAcube Connect MDx til den USB-nøgle, der følger med instrumentet. Datafiler, såsom log- eller rapportfiler, kan også overføres via USB-porten fra instrumentet til USB-nøglen.

-  USB-porten må kun bruges til den USB-nøgle, der leveres af QIAGEN. Slut ikke andre enheder til denne port.
-  Fjern ikke USB-nøglen, mens protokoller downloades eller datafiler overføres, eller under en protokolkørsel.



Du kan finde flere oplysninger om processen til upload af protokoller til QIAcube Connect MDx i håndbogen til instrumentet.

Isætning i QIAcube Connect MDx

For at spare tid kan opfyldningen udføres under en eller begge de 10 min. centrifugetrin (trin 3 og 5) i "Protokol: Automatisk isolering af RNA i alt fra humant helblod indsamlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", side 32.

Reagensflasker

Før hver kørsel på QIAcube Connect MDx fyldes de 4 reagensflasker forsigtigt med reagenserne fra tabel 3 (side 61) op til det maksimale niveau eller, hvis dette ikke er muligt, til det niveau, som er muligt med de buffermængder, der leveres i PAXgene Blood RNA Kit. Mærk tydeligt flasker og låg med buffernavne, og placer de fyldte reagensflasker korrekt i reagensflaskeholderen. Sæt holderen ind på instrumentarbejdsbordet som vist (figur 17 og figur 18, siderne 61 og 62).

-  Den leverede mængde af buffer BR2 vil ikke fylde en reagensflaske op til det viste niveau. Buffer BR3 og BR4 vil muligvis ikke fylde flasken op til det viste niveau efter forarbejdning af flere prøver i tidligere kørsler.
-  Sørg for at fjerne lågene fra flaskerne, før de placeres på arbejdsbordet.



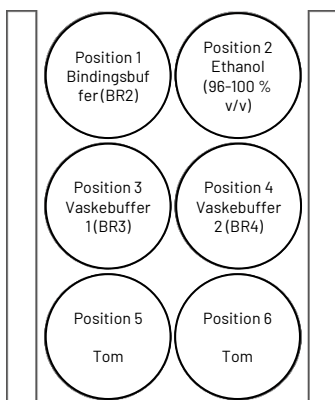
Der er tilstrækkelig buffer i PAXgene Blood RNA Kit (50) til maksimalt 7 RNA klargøringskørsler på QIAcube Connect MDx med 2 til 12 prøver pr. kørsel. Generelt bør kørsler med et lille antal prøver pr. kørsel undgås, således at der behandles i alt 50 prøver pr. sæt. Mere end 7 kørsler af RNA-klargøring kan medføre, at der ikke er en tilstrækkelig buffervolumen til behandling af de sidste prøver.

Tablet 3: Placeringer i reagensflaskeholderen

Position	Reagens
1	Bindingsbuffer (BR2)
2	Ethanol (96-100 % v/v)
3	Vaskebuffer 1 (BR3)
4	Vaskebuffer 2 (BR4)*
5	– (skal være tom)
6	– (skal være tom)

* Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. For at fremstille en brugsklar opløsning skal der inden første brug tilsættes fire dele ethanol (96-100 % v/v, renhedsgrad p.a.), som angivet på flaskeetiketten.

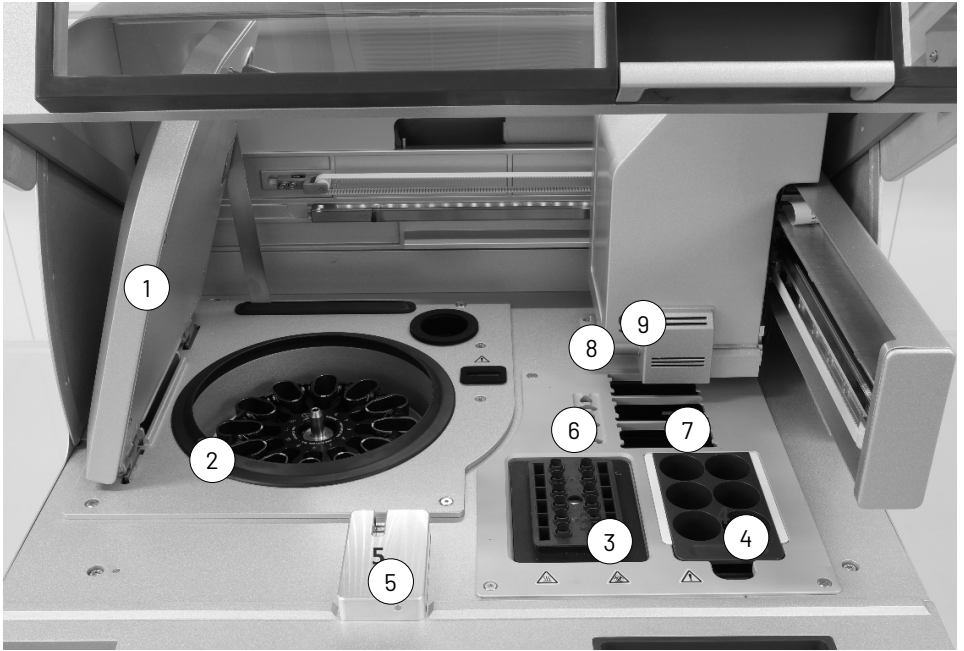
A



B



Figur 17: Opfyldning af reagensflaskeholderen. [A] Tegning over positioner og indhold af flaskerne i reagensflaskeholderen. **[B]** Placering af holder i QIAcube Connect MDx.



Figur 18: QIAcube Connect MDx indeni.

- | | | | |
|---|------------------------|---|--|
| ① | Centrifugelåg | ⑥ | MCT-placeringer |
| ② | Centrifuge | ⑦ | 3 pladser til spidsracks |
| ③ | Ryster | ⑧ | Bortskaffelsesåbninger til spidser og kolonner |
| ④ | Reagent bottle rack | ⑨ | Robotarm (omfatter 1 kanalpipetteringsenhed, gribearm, ultralydssensor og optisk sensor og UV-LED) |
| ⑤ | Spidssensor og lågelås | | |

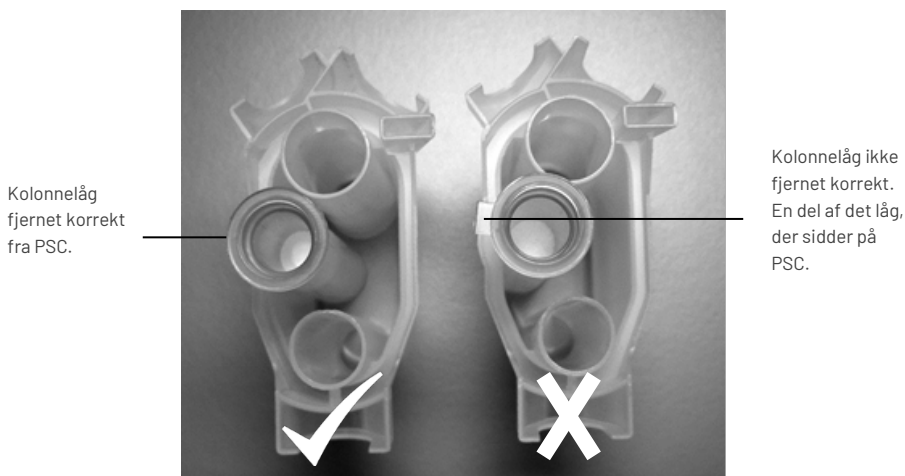
Spin-kolonner (PSC, PRC), MCT og QIAcube Connect MDx-plastemner

Placer 2 spidsholdere med filterspidser på 1.000 µl på QIAcube Connect MDx (se figur 18, side 62). Genopfyld holderen med spidser, når det er nødvendigt.

i Brug kun 1.000 µl-filterspidser, der er designet til brug med QIAcube Connect MDx.

Mærk rotoradaptore og MCT for hver prøve med en vandfast tusch. Åben den PSC, der skal anvendes, og klip låget helt af med en saks (se figur 19).

i For at robotgribearmen til QIAcube Connect MDx kan fungere korrekt, skal lågene og alle plastikdele, der forbinder låget til PSC, fjernes helt (klippes af) (se figur 19). Ellers kan robotgribearmen ikke få ordentligt fat i PSC.



Figur 19: Isætning af PSC. PSC er placeret i midterpositionen af rotoradapteren. Klip låget af PSC, før kolonnen placeres.

Placer PSC (uden låg, se figur 19, side 63), PRC og det markerede MCT i de korrekte positioner i hver mærket rotoradapter, som vist i tabel 4 og figur 20.

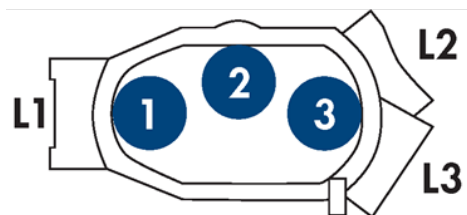


Sørg for, at spin-kolonnens (PRC) og MCT-låg er trykket helt ned til bunden af åbningerne ved kanten af rotoradapteren, ellers vil lågene gå af under centrifugering.

Tabel 4: Plastforbrugsvarer i rotoradapteren

Position	Reagens	Placering af låg
1	PAXgene RNA-spin-kolonne (rød, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder-spin-kolonne (lilla, PSC)(klip låget af, før kolonnen placeres i rotoradapteren)	-
3	MCT*	L3

* Brug de MCT'er (1,5 ml), der følger med i PAXgene Blood RNA Kit.



Figur 20: Positioner i rotoradapteren. Rotoradapteren har 3 rørpositioner (1-3) og 3 lågpositioner (L1-L3).

Opfyldning af centrifugen

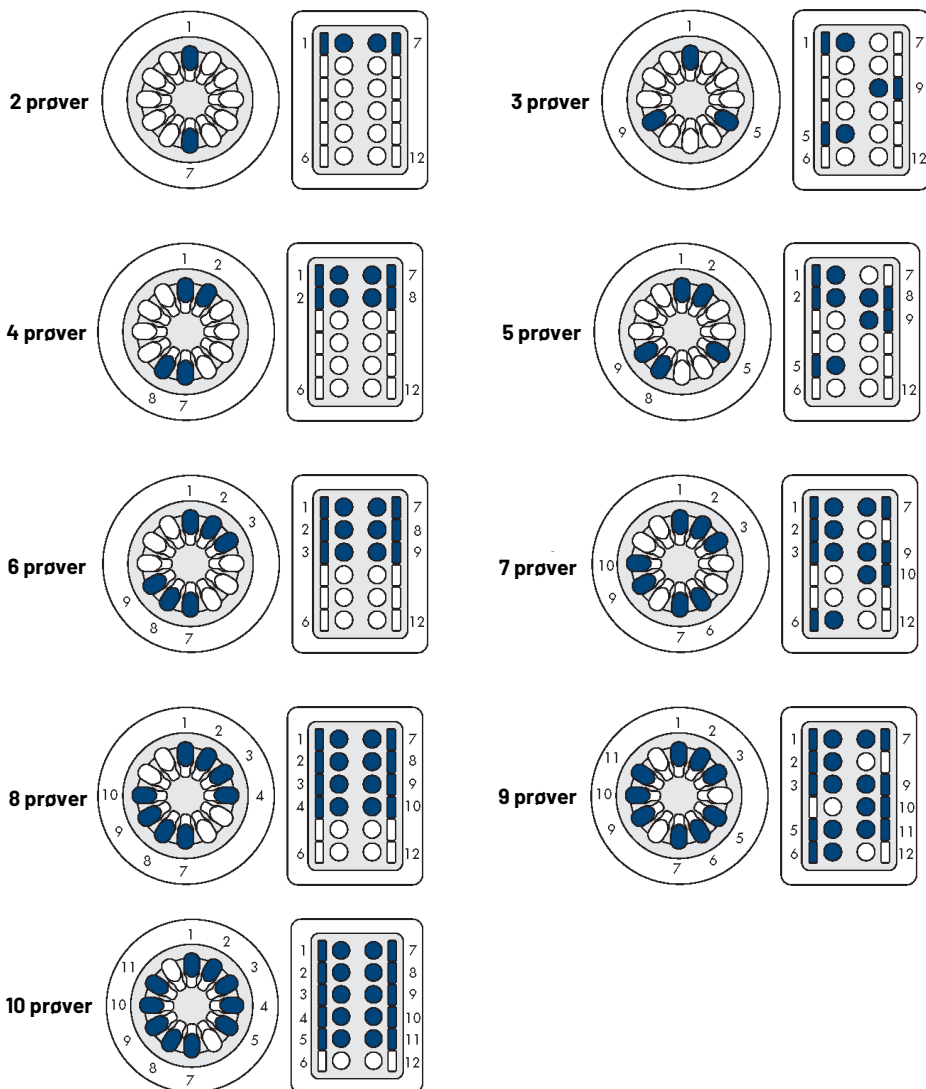
Sæt de samlede rotoradaptere i centrifugespandene i QIAcube Connect MDx som vist i figur 21 nedenfor.



Ved forarbejdning af færre end 12 prøver skal centrifugerotoren fyldes, så den er i radial balance (se figur 22, side 66). Alle centrifugespande skal være monteret, før en protokolkørsel påbegyndes, selv hvis der skal forarbejdes mindre end 12 prøver. Det er ikke muligt at forarbejde en enkelt (én) eller 11 prøver.



Figur 21: Placering af centrifugen på QIAcube Connect MDx. Placer de samlede rotoradaptere i centrifugespandene.



Figur 22: Opfyldning af centrifuge og ryster. Centrifuge- og rysterpositioner er vist for forarbejdning af to (2) til ti (10) prøver. Det er ikke muligt at forarbejde én (1) eller 11 prøver. Ved behandling af 12 prøver skal alle centrifuge- og rysterpositioner fyldes (ikke afbildet).

Forarbejdningsrør

Fjern alle PT, der stadig sidder i MCT-åbninger fra tidligere kørsler (se figur 18, side 62). Fyld 3 PT med den mængde reagens, der er angivet i tabel 5, i overensstemmelse med antallet af prøver i kørslen.

Til DNase I-inkuberingsblanding pipetteres den angivne mængde DNA-digestionsbuffer (RDD) i et PT, og den angivne mængde DNase I (RNFD)-stamopløsning tilsættes. Bland forsigtigt ved at pipettere hele blandingen op og ned 3 gange med en 1.000 µl-pipettespids.



Brug de PT'er på 2 ml, der leveres med PAXgene Blood RNA Kit. Mærk rørene tydeligt med reagensnavne, og placer dem i de korrekte positioner i MCT-åbningerne, som vist i tabel 6 (side 68).



DNase I (RNFD) er meget modtageligt for fysisk denaturering. Bland kun ved pipettering, hvor wide-bore-pipettespidser anvendes for at reducere forskydning. Undlad at vortexe.

Sørg for kun at pipettere den påkrævede mængde, som angivet i tabel 5 nedenfor.

Tabel 5: Den påkrævede mængde reagens i PT'er til MCT-åbninger

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

Tabel 6: MCT-placeringer

	Position		
	A	B	C
Indhold	Proteinase K	DNase I inkuberingsblanding	Elueringsbuffer (BR5)
Kar	Forarbejdningsrør*	Forarbejdningsrør*	Forarbejdningsrør*

* Brug de PT'er på 2 ml, der leveres med PAXgene Blood RNA Kit.

Bortskaffelse

For sikker bortskaffelse efter prøveindsamling og manuel RNA-isolering henvises til sikkerhedsinformation og forholdsregler på siderne 18 og 19.

For automatisk RNA-isolering ved brug af QIAcube Connect MDx henvises der desuden til henholdsvis figur 21 og figur 22, siderne 65 og 66, som angiver dedikerede pladser med brugte spidser og kolonner til bortskaffelse.

Litteraturhenvisninger

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.

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises til siden med hyppigt stillede spørgsmål (Frequently Asked Questions, FAQ) hos vores tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGEN Teknisk Service gerne på spørgsmål vedrørende informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se sidste side, eller besøg www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag	
RNA er nedbrudt	
a) RNase-kontaminering	 Vær forsigtig med ikke at tilføre RNaser til reagenserne under proceduren eller ved senere håndtering (se bilag A, side 76).
Lavt RNA-udbytte	
b) Mindre end 2,5 ml blod, der er indsamlet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	 Sørg for, at der indsamles 2,5 ml blod i PAXgene Blood RNA Tube (BRT; se <i>PAXgene Blood RNA Tube-håndbog</i>)
c) RNA-koncentrationen målt i vand	RNA skal fortyndes i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* for at få en nøjagtig kvantifikation (se bilag B, side 77).
d) Der blev overført cellerester til PRC i trin 9 og 10 af den manuelle protokol	 Undgå at overføre større partikler, når supernatanten pipetteres efter trin 7 i den manuelle protokol (små cellerester påvirker dog ikke proceduren).
e) Supernatanten blev ikke fuldstændigt fjernet i trin 3	 Sørg for, at supernatanten fjernes fuldstændigt. Hvis supernatanten dekanteres, skal dråber på randen af PAXgene Blood RNA Tube (BRT) fjernes ved hjælp af en papirserviet. Overhold rimelige forholdsregler for at undgå krydskontaminering.
f) Efter indsamlingen i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inkuberes blodet i mindre end 2 timer	 Efter indsamling skal blodet inkuberes i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i mindst 2 timer.




* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Kommentarer og forslag	
Lav A_{260}/A_{280}-værdi	
g) Vand, der bruges til at fortynde RNA til måling af A_{260}/A_{280}	 Brug 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 til at fortynde RNA, før renheden måles* (se bilag B, side 77).
h) Spektrofotometeret er ikke korrekt nulstillet	 Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, som i de prøver, der skal måles. Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet.
Fejlfunktion i instrumentet	
i) QIAcube Connect MDx fungerede ikke korrekt	Læs <i>QIAcube Connect MDx-brugervejledningen</i> , og vær især opmærksom på afsnittet om fejlfinding. Sørg for, at instrumentet vedligeholdes korrekt, som beskrevet i brugsanvisningen.

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

Symboler

Følgende symboler vises muligvis i brugsanvisningen eller på emballagen og etiketten. Yderligere symboler er forklaret i Kit-indhold (side 6).

Symbol	Symboldefinition
V<N1>	Version <N1> af produktet
 <N2>	Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N2> test
	Læs brugsanvisningen
	Holdbarhedsdato
IVD	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
REF	Katalognummer
LOT	Lotnummer
MAT	Materialenummer
COMP	Komponenter
NUM	Antal
KU	Kunitz-enheder
ADD	Tilsætter
CONT	Indeholder
RCNS	Rekonstitueret

DNase

Deoxyribonuclease I

EtOH

Ethanol

GITC

Guanidin-isothiocyanat

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Globalt handelsvarenummer



Temperaturbegrænsning



Øvre temperaturgrænse



Producent

EC REP

Europæisk autoriseret repræsentant i henhold til forordning (EU) 2017/746



Vigtig bemærkning



Tilføjelse af ethanol



CE-mærke. Dette produkt opfylder kravene i direktivet (EU) 2017/746 for medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik.

UDI

Unikt enheds-id



Forsigtig



ADVARSEL: Varm overflade

Kontaktoplysninger

QIAGEN Teknisk Service leverer høj kvalitet og er altid til rådighed. De tekniske serviceafdelinger er bemandede med erfarne videnskabelige medarbejdere med vidtrækkende praktisk og teoretisk erfaring i molekylærbiologi og brugen af PreAnalytiX-produkterne. Kontakt os, hvis der er spørgsmål vedrørende PAXgene Blood RNA Kit.

For teknisk bistand og yderligere information kan du gå ind på vores tekniske supportcenter på **www.qiagen.com/Support**, ringe på 00800-22-44-6000 eller kontakte QIAGEN Teknisk Service eller lokale forhandlere (se bagsiden, eller besøg **www.qiagen.com**).

Bilag A: Generelle bemærkninger om håndtering af RNA

Håndtering af RNA



Ribonukleaser (RNase) er meget stabile og aktive enzymer, som normalt ikke kræver kofaktorer, for at være aktive. RNaser er svære at deaktivere og selv små mængder er nok til at nedbryde RNA. Derfor må der ikke anvendes laboratoriematerialer af glas eller plastik uden først at eliminere en eventuel RNase-kontaminering. Vær meget forsigtig med ikke utilsigtet at introducere RNaser til RNA-prøven under eller efter isoleringsproceduren. For at skabe og bevare et RNase-fri miljø, når der arbejdes med RNA, skal visse forholdsregler overholdes under forbehandling og brug af engangs- og flergangsbeholdere og opløsninger.

Generel håndtering



Arbejdet med RNA skal altid følge principperne for korrekt mikrobiologisk og aseptisk arbejdsteknik. Hænder og støvpartikler kan bære bakterier og skimmelsvampe og leverer dermed den hyppigste årsag til RNase-kontaminering. Derfor skal der altid bæres latex- eller vinylhandsker, når der arbejdes med reagenser eller RNA-prøver, for at undgå RNase-kontaminering via huden eller fra støvet laboratorieudstyr. Skift laboratoriehandskerne hyppigt, og hold rørene lukket, når det er muligt. Lad den oprensede RNA forblive på is, når den opdeles til efterfølgende anvendelser.

Protokoller til fjernelse af RNase-kontaminering fra glasmaterialer og opløsninger findes i almene molekylærbiologiske metodebøger såsom Sambrook, J. og Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bilag B: Kvantificering og kvalitetsbestemmelse for RNA i alt

Kvantificering af RNA

Koncentrationen af RNA kan bestemmes ved at måle absorptionen ved 260 nm (A_{260}) i et spektrofotometer. For at sikre signifikans bør aflæsninger være i det lineære område på spektrofotometeret. Absorption af 1 enhed ved 260 nm svarer til 44 µg RNA pr. ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Denne relation er kun gyldig for målinger i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Det er derfor nødvendigt at fortynde RNA-prøven, hvilket skal gøres i 10 mM Tris-HCl. Som oplyst længere nede (se "Renhed af RNA", side 78) er forholdet af absorptionsværdierne ved 260 nm og 280 nm en måleenhed for renheden af RNA. Sørg for, at kvetterne, som bruges til måling af RNA-prøverne, er RNase-frie. Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i de prøver, der skal måles. Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet. Nedenfor vises et eksempel på beregning af RNA-quantificering.

Volumen af RNA-prøven = 80 µl
Fortynding (1/15) = 10 µl RNA-prøve + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Absorptionsmåling af den fortyndede prøve i en kuvette (RNase-fri).
 A_{260} = 0,3
Koncentration af prøve = $44 \times A_{260} \times \text{fortyndingsfaktoren}$
= $44 \times 0,3 \times 15$
= 198 µg/ml
Samlet udbytte = koncentration \times prøvevolumen i milliliter
= 198 µg/ml \times 0,08 ml
= 15,8 µg RNA

* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Renhed af RNA

Forholdet mellem læsninger ved 260 og 280 nm (A_{260}/A_{280}) anslår renheden af RNA i forhold til urenheder, der absorberes i UV, såsom proteiner. A_{260}/A_{280} -forholdet påvirkes dog meget af pH. Ved relativt lave pH-værdier er A_{260}/A_{280} -forholdet og sensitiviteten reduceret over for proteinkontamination.* Det anbefales at måle absorptionsforholdet i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, når der er behov for nøjagtige værdier. Ren RNA har et A_{260}/A_{280} -forhold på 1,8-2,2 i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i de prøver, der skal måles. Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet.

* 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.

Appendiks C: Håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Følgende anbefalinger fra BD kan hjælpe ved håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Se *PAXgene Blood RNA Tube-håndbog* for at læse yderligere oplysninger om PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Instruktioner til fjernelse af BD Hemogard-sikkerhedslukningen

1. Tag PAXgene Blood RNA Tube (BRT) med den ene hånd, og anbring tommelfingeren direkte under BD Hemogard-lukningen. (Der kan opnås mere stabilitet, hvis underarmen placeres på en fast overflade.) Med den anden hånd drejes BD Hemogard-lukningen, mens der samtidigt trykkes opad med tommelfingeren, men kun indtil proppen i røret løsner sig.
2. Fjern tommelfingeren, før lukningen fjernes. Tryk ikke lukningen af PAXgene Blood RNA Tube (BRT) med tommelfingeren. Forsigtig: Hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) indeholder blod, kan der være en potentiel infektionsfare. For at undgå skader under fjernelse af lukningen er det vigtigt at fjerne tommelfingeren, som lukningen trykkes op med, fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT), så snart BD Hemogard-lukningen har løsnet sig.
3. Løft lukningen af PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Det er usandsynligt, at plastikkappen kan løsne sig fra gummiproppen, men prøv ikke at samle lukningen igen, hvis det skulle ske. Fjern gummiproppen forsigtigt fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Anvisninger for indføring af den sekundære BD Hemogard-sikkerhedslukning

1. Udskift lukningen af PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Drej og tryk nedad, indtil proppen er på plads igen. Proppen skal trykkes helt ind, for at PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan håndteres sikkert.

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene-spin-kolonner, 50 Shredder-spin-kolonner, forarbejdningsrør, RNase-fri DNase I, RNase-fri reagenser og buffere. Til anvendelse sammen med PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 prøvetagningsrør	762165
Relaterede produkter, der kan bestilles fra QIAGEN til RNA-isolering, som er automatiseret på QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	Pakningen indeholder: reagensflaskeholdere (3); mærkningsstrips til holder (8); 200 µl-filterspidser (1024); 1.000 µl-filterspidser (1024); 1.000 µl-filterspidser, wide-bore (1024); 30 ml-reagensflasker (18); rotoradaptere (240); rotoradapterholder	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Sterile engangsfilterspidser i holder	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Reagensflasker (30 ml) med låg; pakke med 6; til brug med QIAcube reagent bottle rack	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Til 240 præparater: 240 engangsrotoradaptere; til brug sammen med QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Holder med plads til 6 x 30 ml-reagensflasker på QIAcube arbejdsbordet	9026197
Rotor Adapter Holder	Holder til 12 engangsrotoradaptere; til brug sammen med QIAcube	990392
Relaterede produkter, der kan bestilles fra BD til blodprøvetagning med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	21G, 0,75" (0,8 x 19 mm) nål, 12" (305 mm) slange med luer-adapter; 50 pr. æske, 200 pr. kasse	367286/367281

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	21G 3/4-tommers nål (0,8 × 19 mm), 12-tommers slange (305 mm) med Luer-adapter. 50/kasse, 200/æske	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Kasse, kun til 13 mm og 16 mm diameter; 1.000/æske	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 × 75 mm 4,0 ml træk med rød BD Hemogard-lukning og papiretiket; 100/æske, 1.000/kasse	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	13 × 75 mm 3,0 ml træk med rød BD Hemogard-lukning og transparent etiket; 100/æske, 1.000/kasse	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	13 × 75 mm 3,0 ml træk med klar BD Hemogard-lukning og papiretiket; 100/æske, 1.000/kasse	366703

* Disse produkter er typiske tilbehørsartikler for blodtapning, som kan anvendes sammen med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Der findes mere information om dette tilbehør, inklusiv om, hvordan man bestiller, på www.preanalytix.com.

Revisionshistorik for dokumentet

Dato	Ændringer
[R1] april 2022	Første IVDR-udgivelse
[R2] februar 2023	Adresse på PreAnalytiX GmbH er blevet ændret fra "Feldbachstrasse" til "Garstligweg 8". BD-produkter er blevet tilføjet under Bestillingsinformation. Sikkerhedsinformation er blevet tilføjet.

Bemærkninger



For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle PreAnalytiX eller QIAGEN kit-håndbog eller -brugervejledning. PreAnalytiX- og QIAGEN kit-håndbøger og -brugermanualer kan fås på www.preanalytix.com og www.qiagen.com eller kan rekvireres hos QIAGEN Teknisk Service eller den lokale distributør.

**Better samples
More to explore**

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

Oplev mere på: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023